

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA  
Dottorato di ricerca in Fisiopatologia sistemica  
Ciclo XXV

**Modelli sperimentali e nuovi target per la  
terapia della BPCO: indagine sul ruolo  
delle isoforme gamma e delta di PI3K**

Coordinatore:  
Chiar.ma Prof.ssa Donatella Stilli

Tutor:  
Chiar.ma Dott.ssa Chiara Carnini

Dottorando: Anna Rita Pisano

# Indice

• . Introduzione .....	4
BPCO: Linee generali .....	5
Definizione .....	5
Fattori di rischio .....	7
Meccanismi patogenetici .....	9
Inflammatione delle vie aeree nella BPCO .....	12
Neutrofili .....	13
Monociti/Macrofagi .....	13
Linfociti T .....	14
Cellule dendritiche .....	15
Cellule epiteliali .....	15
Mediatori dell'inflammatione rilevanti nella patogenesi della BPCO	16
Stress Ossidativo e specie reattive dell'ossigeno nella BPCO .....	17
Modelli animali e BPCO .....	21
Modelli di insulto inalatorio .....	21
Modelli di modificazione genica .....	23
Terapia della BPCO .....	24
Resistenza ai corticosteroidi .....	26
Nuovi antiinflammatori per la terapia della BPCO .....	28
Nuovi antiinflammatori: Inibitori delle fosfatidilinositolo-3-kinasi (PI3Ks) ....	31
Nuovi antiinflammatori: PDE4 inibitori .....	35
PDE4 e PI3K: possibile crosstalk? .....	40
Scopo dello studio .....	42
Materiali e Metodi .....	45
Animali .....	46
Metodica di esposizione al fumo di sigaretta .....	46
Lavaggio Broncoalveolare (BAL) .....	48
Studio dose-risposta degli effetti pro- infiammatori indotti dal fumo di sigaretta .....	51
Protocollo sperimentale adottato .....	51
Studi d'intervento farmacologico .....	51

Determinazione dei mediatori pro-infiammatori nel BAL .....	53
Valutazione dell'effetto di budesonide nel modello d'inflammatione polmonare indotta da Lipopolisaccaride (LPS) .....	54
Determinazione dei Lipidi Idroperossidi nell'omogenato polmonare	54
Colture cellulari .....	55
Isolamento delle cellule muscolari lisce murine (TSMC).....	56
Preparazione di CSE .....	57
Analisi di western blotting .....	57
Misura di contrattilità delle trachee murine .....	58
Costrutti .....	58
Trasfezione cellulare .....	59
Lisi cellulare, immunoprecipitazione proteica e Western Blotting ....	60
Saggio di attività fosfodiesterasica (PDE Assay).....	61
Analisi FRET.....	61
Analisi dei dati.....	62
<b>Risultati .....</b>	<b>63</b>
1) Messa a punto del modello d'inflammatione polmonare indotta dal fumo di sigaretta nel topo .....	64
a) Effetti dose-risposta indotti dal fumo di sigaretta sulla cellularità nel BAL	64
b) Valutazione dei livelli di Lipidi Idroperossidi (LPO) dopo esposizione al fumo di sigaretta.....	68
2) Studi d'intervento farmacologico nel modello di inflammatione polmonare indotta da fumo di sigaretta .....	70
a) Trattamento con budesonide per os.....	70
b) Trattamento con roflumilast per os .....	75
c) Trattamento con GSK256066 (PDE4 inibitore inalatorio).....	79
d) Effetto dell'inibizione costitutiva .....	81
a) Effetto d'inibitori di PI3K $\delta$ in modelli di corticosteroido-resistenza indotta da stress ossidativo.....	85
a) Effetti del trattamento con inibitori delle PI3Ks in modelli di stress ossidativo in vitro .....	85
b) Effetti del trattamento combinato con IC87114 e budesonide nel modello corticosteroido resistente di esposizione acuta al fumo di sigaretta nel topo ....	87
4) Ruolo di PI3K $\gamma$ nei meccanismi di contrazione e rilassamento del muscolo liscio delle vie aeree .....	92
a) Espressione di PI3K $\gamma$ nel muscolo liscio delle vie aeree .....	92
b) Ruolo di PI3K $\gamma$ nei meccanismi di contrattilità del muscolo liscio delle vie aeree .....	93
c) Ruolo di PI3K $\gamma$ nel controllo del signaling di cAMP .....	94
d) Ruolo di PI3K $\gamma$ nella regolazione della fosfodiesterasi 4B (PDE4B).....	96

Discussione e Conclusioni.....	101
Bibliografia.....	119

## **1 . Introduzione**

## **BPCO: Linee generali**

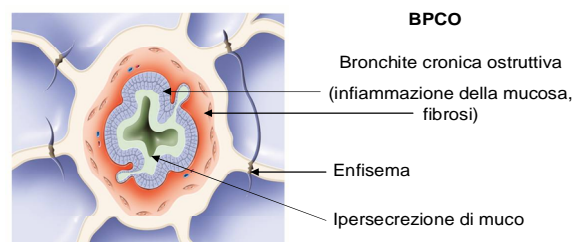
La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) è una delle maggiori cause di morbidità e mortalità in tutto il mondo. Affligge 600 milioni di uomini e donne nel mondo, rappresentando la quarta causa di morte subito dopo le patologie cardiache, tumorali e le malattie cerebrovascolari. La diffusione della BPCO risulta in continua crescita, con un aumento elevato della mortalità negli ultimi 30 anni (Mannino *et al*, 2007). Questa malattia riveste pertanto una grande importanza dal punto di vista epidemiologico e d'impegno delle risorse sanitarie. Nonostante le numerose campagne di sensibilizzazione e di prevenzione, il fumo di sigaretta risulta ancora la principale causa della BPCO. Negli ultimi anni l'attenzione rivolta a questa patologia da parte delle organizzazioni sanitarie mondiali e della ricerca farmaceutica ha contribuito all'ampliamento delle conoscenze sulla patogenesi e nella fisiopatologia, aprendo alla malattia stessa nuove possibilità per la diagnostica e la terapia.

## **Definizione**

La definizione di BPCO è stata modificata nel corso degli anni, grazie alle sempre più approfondite conoscenze delle caratteristiche anatomico-patologiche, funzionali e immunologiche di tale patologia. Il termine BPCO (o, come definita dalla scuola anglosassone, COPD: *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*) è stato utilizzato per la prima volta nel 1962 per definire una “ostruzione cronica delle vie aeree d’incerta eziologia”. Successivamente, nel 1987, l’American Thoracic Society (ATS) ha precisato che la BPCO (COPD) è “una patologia caratterizzata da ostruzione del flusso espiratorio che non si modifica significativamente nel corso del tempo”, differenziandola quindi dall’asma bronchiale, che risulta caratterizzata da ampia variabilità dei flussi espiratori. Nel 1995, l’*European Respiratory Society* (ERS) ha aggiunto il concetto che “la limitazione al flusso aereo risulta lentamente progressiva e irreversibile, dovuta in parte ad un interessamento delle vie aeree ed in parte a modificazioni parenchimali (enfisema polmonare)”. Infine, nel progetto GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) è stato inserito il concetto di possibile parziale reversibilità dell’ostruzione bronchiale, definendo la BPCO come una “sindrome caratterizzata da una limitazione del flusso aereo espiratorio non completamente reversibile né spontaneamente né con trattamento farmacologico” In genere, tale riduzione del flusso aereo espiratorio è progressiva e si associa ad una risposta infiammatoria broncopolmonare dovuta all’inalazione di particelle o gas tossici. Pertanto oggi è corretto definire la BPCO sinteticamente come una *malattia caratterizzata da ostruzione irreversibile o non completamente reversibile del flusso aereo, caratterizzata da una limitazione funzionale progressiva e*

*associata a una persistente risposta infiammatoria dovuta all'inalazione di particelle o gas irritanti (Petty, 2006).*

L'enfisema polmonare, compreso nella definizione di BPCO, è caratterizzato da un aumento permanente e distruttivo degli spazi aerei dai bronchi distali ai bronchioli terminali: esso rappresenta solo una parte delle alterazioni morfologiche che si osservano nella BPCO. Nello stesso paziente che soffre di BPCO, possono, infatti, coesistere diversi tipi di manifestazioni cliniche (bronchite cronica, enfisema) associate a ostruzione delle vie aeree, fibrosi e ipersecrezione di muco (Fig.1).



**Figura 1:** Aspetti anatomo-patologici della BPCO (bronchite cronica ostruttiva, infiammazione della mucosa, fibrosi, enfisema e ipersecrezione di muco).

## **Fattori di rischio**

I fattori di rischio per la BPCO possono essere divisi in due classi: 1) irritanti ambientali e 2) predisponenti genetici. Spesso la malattia è frutto dell'interazione di entrambe queste tipologie di fattori (Tabella 1).

## **Tabella 1.** Fattori di rischio per la BPCO

<b><u>Fattori ambientali</u></b>	<b><u>Fattori legati all'ospite</u></b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Fumo di sigaretta</li><li>• Inquinamento ambientale</li><li>• Infezioni ricorrenti polmonare</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Deficit di alfa1 antitripsina</li><li>• Iper responsività bronchiale</li><li>• Anomalie di sviluppo</li></ul>

Il più importante tra i fattori di rischio è sicuramente il fumo di sigaretta. I fumatori, rispetto ai non fumatori, presentano una mortalità per la BPCO più alta e una prevalenza e incidenza maggiore per tosse produttiva e altri sintomi respiratori. Inoltre l'età in cui s'inizia a fumare il numero di pacchetti/anno fumati, e lo stato attuale del fumatore risultano predittivi della mortalità per BPCO.

In diversi studi è stato osservato come la prevalenza della BPCO sia più alta nei paesi dove il fumo di sigaretta è più diffuso, mentre risulta più bassa nei paesi dove il consumo di tabacco pro-capite è più basso. È stato stimato che circa il 15% dei soggetti fumatori sviluppano una BPCO clinicamente significativa (Mannino *et al*, 2007).

Altre documentate cause di BPCO includono l'inalazione prolungata di polveri e vapori chimici in ambienti lavorativi e l'inquinamento ambientale *indoor* e *outdoor*, anche se il ruolo degli inquinanti atmosferici nel favorire la BPCO è ancora poco chiaro. Infatti, non



risultano ancora ben evidenti i reali rapporti tra effetti a breve termine, esposizione a picchi di concentrazione e concentrazioni di fondo del particolato atmosferico e BPCO.

Tra i fattori predisponenti legati all'ospite, risultano particolari deficit genetici (alfa1-antitripsina) ed uno stato di atopia ed iper responsività bronchiale. Anche le infezioni respiratorie ricorrenti possono predisporre alla genesi della BPCO. Risulta tuttavia difficile, ancora oggi, stabilire se l'iper reattività bronchiale rappresenta un fattore di rischio per la BPCO oppure una conseguenza della malattia.

Anche un anomalo sviluppo dell'apparato respiratorio può favorire lo sviluppo della patologia ostruttiva cronica, mentre il fumo durante la gravidanza può predisporre il feto a patologie respiratorie, influenzando lo sviluppo e la crescita polmonare in utero. Anche il sesso sembra essere un fattore di rischio; infatti, le donne, per la particolare conformazione anatomica delle vie aeree e per le caratteristiche di deposizione delle particelle nelle vie aeree, risultano più suscettibili degli uomini all'effetto dannoso del fumo di sigaretta (Hajiro *et al*, 2000).

## **Meccanismi patogenetici**

La BPCO è una malattia infiammatoria cronica delle vie aeree, caratterizzata da una limitazione del flusso progressiva e non reversibile. L'ostruzione cronica delle vie aeree risulta determinata prevalentemente da alterazioni della struttura delle piccole vie aeree e dalla distruzione del parenchima polmonare (enfisema). Infatti, l'infiammazione cronica bronchiale, favorendo il rimodellamento e il restringimento delle piccole

vie aeree e, a livello parenchimale, la perdita della struttura alveolare, determina la riduzione del ritorno elastico polmonare con conseguente precoce chiusura delle piccole vie aeree durante l'atto espiratorio (Hogg *et al*, 2004 ).

Il processo infiammatorio, inoltre, riduce i meccanismi di difesa utili nel limitare la distruzione tissutale e altera i meccanismi riparativi favorendo la persistenza del danno broncopolmonare (Fig.2). In particolare, il processo infiammatorio cronico che s'instaura nelle BPCO comporta l'instaurarsi di un'ipersecrezione mucosa, contrazione delle vie aeree, distruzione della struttura alveolare e modificazioni dei vasi polmonari.



**Figura 2:** Nella BPCO lo stato infiammatorio cronico determina alterazioni anatomiche che inducono ad un quadro di ostruzione irreversibile o scarsamente reversibile

Nella BPCO l'ipersecrezione mucosa è indotta dalla stimolazione delle ghiandole muco secernenti, che appaiono di dimensioni aumentate, e

dalla proliferazione delle cellule mucipare indotta dai mediatori della flogosi.

L'infiammazione, l'edema della mucosa e l'iperproduzione di muco possono causare una cospicua riduzione del calibro del lume dei piccoli bronchi e dei bronchioli. In seguito, l'organizzazione dell'essudato da parte di tessuto di granulazione e la successiva evoluzione cicatriziale, possono determinare una bronchiolite fibrosa obliterante (Barnes *et al* , 2004 ).

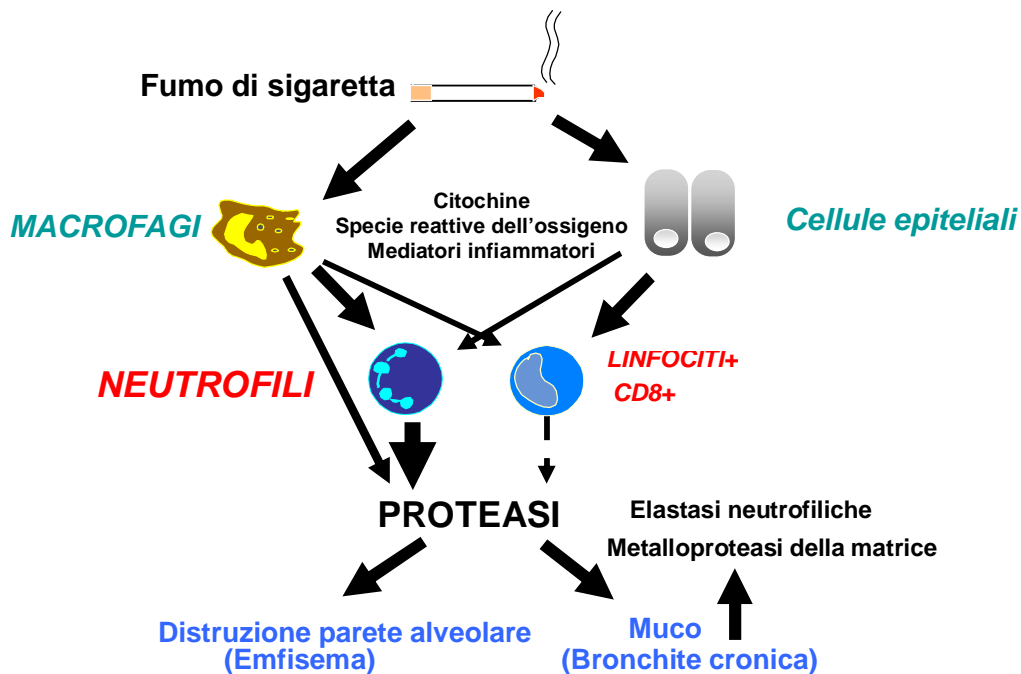
Lo spasmo muscolare della parete bronchiale (broncocostrizione) è ascrivibile alle alterazioni a carico della mucosa respiratoria, che rendono più esposte le terminazioni nervose sensitive in grado di evocare, per via riflessa vagale, la contrazione della muscolatura liscia bronchiale.

Inoltre è stato osservato come, a causa dell'insulto flogistico sulle pareti bronchiali, si produce una deplezione dei recettori  $\beta$ 2-adrenergici collocati a livello del muscolo liscio bronchiale, deputati a un ruolo di protezione nei confronti di agenti bronco-costrittori. Nei pazienti con BPCO di conseguenza si assiste a un cronico incremento del tono broncomotore. Tale condizione può favorire la creazione di un circolo vizioso che tenderà a sostenere il fenomeno della broncocostrizione, rendendo il paziente più sensibile ai molteplici fattori irritanti di natura chimica, fisica o biologica presenti nell'aria inalata.

L'evoluzione della BPCO è spesso accompagnata da un'infiammazione sistemica che si estende al cuore, ai vasi sanguigni e al muscolo scheletrico.

## Infiammazione delle vie aeree nella BPCO

L'infiammazione che caratterizza la BPCO si manifesta con accumulo di neutrofili, macrofagi, linfociti B e linfociti T soprattutto nelle piccole vie aeree (Fig.3). Un ruolo chiave nell'orchestrare la flogosi è data anche dalle cellule dendritiche e dalle cellule epiteliali.



**Figura 3:** Nella BPCO le principali cellule infiammatorie coinvolte sono neutrofili, macrofagi e linfociti T CD8+, con attivazione di mediatori pro infiammatori e proteasi. Questo processo infiammatorio porta ad una distruzione della parete alveolare e ad una fibrosi delle vie aeree.

## **Neutrofili**

I granulociti neutrofili hanno un ruolo essenziale nella patogenesi della BPCO: nei pazienti affetti da BPCO si osserva un aumento del numero di neutrofili nell'espettorato e nel lavaggio broncoalveolare (BAL) correlato alla presenza di ostruzione delle vie aeree, soprattutto periferiche, e a un rapido declino funzionale (Lacoste *et al*, 1993 ). Il reclutamento neutrofilico nella BPCO è dovuto a fattori chemiotattici, tra cui LTB<sub>4</sub>, IL-8 e le chemochine CXC, che tendono ad aumentare nelle vie aeree di pazienti affetti da BPCO (Tanino *et al*, 2002 ).

I neutrofili passano dalla circolazione sistemica a quella polmonare e aderiscono alle cellule endoteliale della parete vascolare passando nello spazio alveolare. La migrazione dei neutrofili nelle grandi vie aeree segue un percorso meno certo, ma è probabile che essi raggiungano le vie respiratorie dalla circolazione tracheo-bronchiale e migrino attraverso piccole vene post-capillari (Pettersen and Adler, 2002). I neutrofili sono in grado di rilasciare radicali liberi dell'ossigeno, elastasi e citochine con effetti sulle cellule a calice e sulle ghiandole sottomucose (e quindi sulla secrezione di muco) e nell'induzione dell'enfisema e dell'infiammazione (Saetta *et al*, 1997).

## **Monociti/Macrofagi**

I monociti /macrofagi hanno un ruolo molto importante nella patogenesi della BPCO e sono responsabili di molte caratteristiche della malattia, a causa della loro capacità di rilasciare specie reattive dell'ossigeno (ROS), proteine della matrice extracellulare e mediatori lipidici, come

leucotrieni, prostaglandine, citochine, chemochine e metalloproteasi (Barnes, 2004). È stato osservato un marcato aumento del numero di macrofagi nelle vie aeree, nel parenchima polmonare, nel BAL e nell'espettorato di pazienti affetti da BPCO. L'aumento del numero di macrofagi nei soggetti fumatori e nei pazienti con BPCO può essere dovuto all'aumentato reclutamento dei precursori monocitari dalla circolazione in seguito al rilascio di chemochine selettive per i monociti, a un'aumentata proliferazione e a una prolungata sopravvivenza dei macrofagi nel polmone (Tomita *et al*, 2002).

I macrofagi hanno anche la capacità di fagocitare i batteri e giocano un ruolo importante nella difesa dell'organismo. È probabile che una compromessa capacità di fagocitosi da parte dei macrofagi comporti un aumento della carica batterica nel tratto respiratorio di pazienti con BPCO.

## **Linfociti T**

I linfociti T, così come i neutrofili e i macrofagi, sembrano essere coinvolti nella patogenesi della BPCO. È stato osservato, infatti, un aumento del numero totale di linfociti T nel parenchima polmonare e nelle vie aeree centrali e periferiche di pazienti con BPCO, con un incremento più elevato delle cellule CD8+ rispetto alle cellule CD4+ (Retamales *et al*, 2001). Questo aumento dei linfociti T sembra essere correlato con la distruzione alveolare e con l'ostruzione delle vie aeree, segni tipici della BPCO.

Nei pazienti con BPCO, inoltre, si osserva una riduzione delle cellule natural killer (NK) e della loro attività fagocitaria, comportando un

indebolimento dei meccanismi di difesa contro le infezioni virali e l'instaurarsi di un processo infiammatorio sempre più intenso (Prieto *et al*, 2001).

### **Cellule dendritiche**

Le cellule dendritiche hanno un ruolo importante nella risposta polmonare al fumo di sigaretta e ad altri agenti nocivi inalati, e possono quindi essere considerati un elemento chiave nella BPCO. Sono localizzate sulla superficie di polmoni e delle vie respiratorie, e possono essere attivate da cellule infiammatorie e immunitarie, come i macrofagi, i neutrofili e i linfociti T e B (Huang *et al*, 2001). Le cellule dendritiche, insieme ai linfociti B, costituiscono i follicoli linfoidi, dove agiscono come “sentinelle” nei confronti degli agenti patogeni con cui l'organismo entra in contatto. Per tale motivo l'aumento delle cellule dendritiche nel parenchima polmonare e nelle vie aeree di pazienti con BPCO dimostra il coinvolgimento di meccanismi immunitari in questa malattia.

### **Cellule epiteliali**

Le cellule epiteliali alveolari e delle vie respiratorie rappresentano un'importante fonte di mediatori infiammatori nella BPCO. Vengono attivate dal fumo di sigaretta e rilasciano mediatori infiammatori come Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleuchina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ),

Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) e Interleuchina 8 (IL-8) (Hellerman *et al*, 2002).

In particolare, le cellule epiteliali delle piccole vie aeree hanno la capacità di rilasciare il fattore TGF-  $\beta$ , responsabile della fibrosi locale.

## **Mediatori dell'inflammazione rilevanti nella patogenesi della BPCO**

Il processo infiammatorio che caratterizza la patogenesi della BPCO è influenzato da diversi tipi di mediatori che possono avere natura lipidica o peptidica.

I mediatori lipidici derivano dall'acido arachidonico e giocano un ruolo importante nella patogenesi della BPCO. Appartengono a questa classe di mediatori la Prostaglandina E2 (PGE2), la Prostaglandina F 2 $\alpha$  (PGF2  $\alpha$ ), il Trombossano (Tx) B2 e il Leucotriene B4 (LTB4) .

I mediatori di tipo peptidico che giocano un ruolo importante nella patogenesi della BPCO sono citochine, chemochine e metalloproteasi.

Le citochine e le chemochine sono coinvolte in molti aspetti della BPCO, tra cui il reclutamento dei neutrofili, macrofagi, linfociti B e T, l'induzione dell'enfisema e il rimodellamento della parete delle vie aeree, compresa la metaplasia delle cellule a calice e l'iperplasia delle cellule epiteliali (Chung and Adcock , 2008).

Tra le principali citochine implicate nella patogenesi della BPCO si annoverano TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ), IL-1  $\beta$  (*Interleuchina 1*



$\beta$ ), IL-6 (*Interleuchina 6*), GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*), IL-10 (*Interleuchina 10*), IL-12 (*Interleuchina 12*), IL-13 (*Interleuchina 13*), IFN- $\gamma$  (*Interferone- $\gamma$* ).

Le principali chemochine implicate nella patogenesi della BPCO sono IL-8 (*interleuchina-8*), GRO- $\alpha$  (*Growth-Related Oncogene- $\alpha$* ), MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) e MIP-1 (*Macrophage Inflammatory Protein 1*).

Le metalloproteasi sono una famiglia di proteasi zinco-dipendenti, in grado di degradare componenti della matrice extracellulare. Sono coinvolte nella regolazione di citochine, chemochine e fattori di crescita, e hanno un ruolo importante nella patogenesi della BPCO e soprattutto nello sviluppo dell'enfisema. È stato osservato, infatti, un aumento della metalloelastasi (MMP-12) e della gelatinasi B (MMP-9) nel parenchima polmonare e nel BAL di pazienti con BPCO caratterizzati da enfisema (Leclercq *et al*, 2006).

## **Stress Ossidativo e specie reattive dell'ossigeno nella BPCO**

Lo stress ossidativo è il risultato di uno sbilanciamento tra carica ossidante e difese antiossidanti. Negli anni numerosi studi hanno evidenziato la presenza di un aumento dello stress ossidativo nei fumatori e nei pazienti con BPCO (Rahman *et al*, 1996).

Il fumo di sigaretta è costituito da una miscela di più di 4700 sostanze chimiche diverse tra cui radicali liberi e altri ossidanti sono presenti in alte concentrazioni (Pryor and Stone, 1993). Radicali liberi sono presenti

sia nella tara che nella fase gassosa del fumo di sigaretta. La fase gassosa contiene approssimativamente  $10^{15}$  radicali per puff, principalmente di tipo alchilico e perossidico. L'ossido nitrico (NO) è un altro ossidante presente nel fumo di sigaretta in concentrazioni molto alte (500-1000 ppm). NO è in grado di reagire velocemente con l'anione superossido ( $O_2^-$ ) a formare perossinitrito e con radicali perossidici a dare origine ad alchil perossinitriti. L'aumento diretto nell'insulto ossidante prodotto dall'inalazione di fumo di sigaretta può essere ulteriormente amplificato nei polmoni dei fumatori dal rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte delle cellule infiammatorie (neutrofili e macrofagi) che si accumulano nel polmone dei soggetti fumatori.

La normale produzione di ossidanti nel tratto respiratorio umano viene neutralizzata da meccanismi antiossidanti endogeni. Gli antiossidanti possono essere enzimatici o non enzimatici. I principali antiossidanti enzimatici nelle vie aeree sono: catalasi, superossido dismutasi (SOD), glutatione perossidasi, glutatione S-trasferasi e tireodossina, mentre la categoria di antiossidanti non enzimatici comprende glutatione, acido ascorbico, bilirubina e acido lipoico. Nel tratto respiratorio di soggetti fumatori e pazienti con BPCO si osserva una riduzione delle difese antiossidanti, perché sembra che l'aumento di ROS in seguito all'esposizione al fumo di sigaretta porti a una riduzione dell'attività degli antiossidanti enzimatici (Kondo *et al*, 1994).

Dal momento che il fumo di sigaretta rappresenta il principale fattore di rischio per la BPCO, lo stress ossidativo costituisce un aspetto importante nella fisiopatologia di questa malattia: l'aumento dello stress ossidativo può portare all'attivazione di chinasi e fattori di trascrizione

ed accompagnarsi ad eventi epigenetici che modulano e amplificano la risposta infiammatoria (Rahman *et al*, 1996).

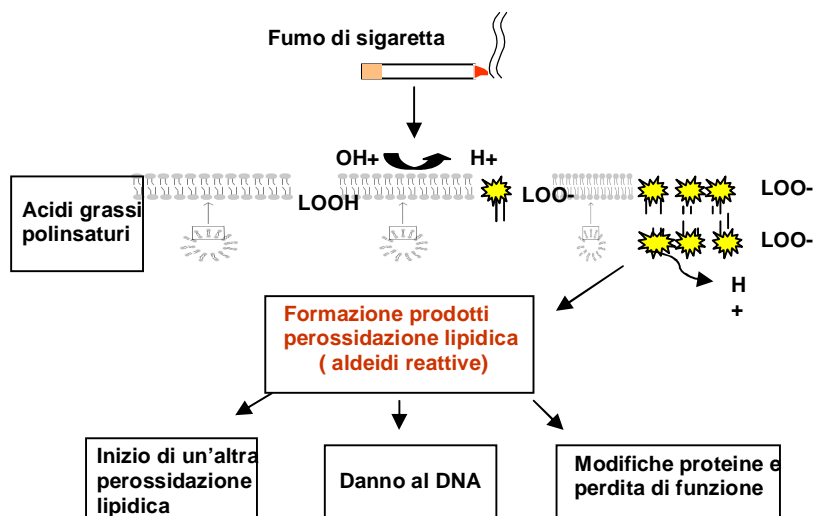
I ROS possono influenzare le cellule delle vie aeree in vari modi. Quando vengono prodotti in prossimità della membrana cellulare essi sono in grado di ossidare i fosfolipidi di membrana in un processo che può perpetuarsi come una reazione a catena. Il principale sito di attacco dei radicali liberi è rappresentato dagli acidi grassi polinsaturi presenti nelle membrane cellulari, e questo causa un'ossidazione lipidica che genera idroperossidi e aldeidi (Fig.4). I livelli di lipidi perossidi sono aumentati in maniera significativa nel plasma e nel BAL di fumatori sani e pazienti con esacerbazioni acute di BPCO, rispetto ai non fumatori (Rahman *et al* 1996).

Gli ossidanti inducono citotossicità delle cellule epiteliali alveolari con riduzione della loro aderenza e aumento del loro distacco (Lannan *et al*, 1994). È stato osservato che lo stress ossidativo può indurre apoptosi di cellule endoteliali ed epiteliali, come gli pneumociti di tipo II, contribuendo ulteriormente allo sviluppo dell'enfisema polmonare (Haddad, 2004).

I pazienti con BPCO presentano un aumentato numero di neutrofili e macrofagi a livello intravascolare e nelle vie aeree, dove rilasciano una maggiore quantità di ioni perossidi rispetto ai controlli sani (Selby *et al*, 1991). Sembra esista una correlazione tra il rilascio di ioni perossidi da parte dei neutrofili del sangue periferico e l'iper-reattività bronchiale osservata nei pazienti con BPCO (Postma *et al*, 1988).

Gli ossidanti prodotti dal fumo di sigaretta sono in grado anche di degradare componenti della matrice polmonare, elastina e collagene, e di

inattivare antiproteasi delle vie aeree, che normalmente svolgono un ruolo di protezione contro l'attacco proteolitico della matrice extracellulare, favorendo lo sviluppo di enfisema polmonare. Gli antiossidanti diminuiscono anche la capacità dei neutrofilici circolanti di modificare la loro forma e di muoversi attivamente, e questo porta ad un loro accumulo nella microcircolazione polmonare e ad una maggiore migrazione nelle vie aeree di soggetti fumatori (MacNee *et al*, 1989). L'aumento della risposta infiammatoria e dei meccanismi di distruzione tissutale in BPCO possono essere mediati non solo dall'azione diretta dei radicali liberi sulle cellule delle vie respiratorie, ma anche indirettamente influenzando l'attivazione di specifici fattori di trasduzione del segnale, come NF-Kb (Barnes and Karin, 1997).



**Figura 4:** Meccanismo di perossidazione lipidica degli acidi grassi polinsaturi indotta dal fumo di sigaretta con la formazione di aldeidi reattive. Le aldeidi reattive mediano diversi eventi cellulari.

## **Modelli animali e BPCO**

Allo scopo di approfondire la conoscenza dei meccanismi molecolari che caratterizzano la fisiopatologia della BPCO e di trovare nuovi approcci terapeutici sono stati sviluppati, nel corso degli anni, modelli animali capaci di mimare diverse caratteristiche di questa malattia. I modelli animali sviluppati fino ad oggi tuttavia, presentano delle pesanti limitazioni in quanto non esiste un modello che mimi il completo fenotipo della BPCO, patologia cronica a carattere progressivo caratterizzata dalla compresenza di diverse manifestazioni cliniche (bronchite cronica, enfisema, ostruzione delle vie aeree).

Per allestire modelli animali utili nello studio della BPCO sono stati perseguiti tre principali approcci sperimentali:

- L'inalazione di stimoli nocivi, come il fumo di sigaretta
- L'instillazione intratracheale di enzimi degradanti i tessuti per indurre lesioni tipiche dell'enfisema (enfisema sperimentale)
- Tecniche di manipolazione genica

Poiché il fumo di sigaretta costituisce il principale inquinante ambientale responsabile dello sviluppo della BPCO, il modello considerato più rilevante per la patologia umana è costituito dall'esposizione cronica al fumo di sigaretta di roditori (ratti, topi) o lagomorfi (cavie) (Groneberg and Chung, 2004).

## **Modelli d'insulto inalatorio**

Uno dei principali modelli d'insulto inalatorio consiste nell'esposizione dell'animale da laboratorio (ratti, topi, cavie) al fumo di sigaretta.

Le cavie sono una specie molto sensibile al fumo di sigaretta: esse sviluppano, infatti, lesioni enfisematose e un allargamento delle vie aeree dopo pochi mesi di esposizione al fumo di sigaretta (Wright and Chung, 1990). I ratti, invece, sembrano essere molto più resistenti allo sviluppo di enfisema da fumo.

Il topo è la specie maggiormente utilizzata per questo tipo di studi: la possibilità di effettuare manipolazioni genetiche, come la sovra espressione o il knock down di particolari geni, rende il topo una specie particolarmente utile nella comprensione del ruolo giocato da specifiche proteine nei meccanismi di danno alla base delle manifestazioni della BPCO (March *et al*, 1999).

La suscettibilità al fumo nei topi varia da un ceppo all'altro suggerendo un ruolo importante del background genetico nell'influenzare le risposte al danno indotto dal fumo (Bartalesi B *et al*, 2005): anche nell'uomo la predisposizione allo sviluppo della BPCO non è uguale in tutti i fumatori cronici ed è presumibilmente influenzata da fattori genetici.

Nonostante i topi differiscano notevolmente dagli esseri umani sia nell'anatomia sia nelle funzioni del tratto respiratorio, l'esposizione acuta al fumo di sigaretta (tipicamente per 3 giorni) è in grado di indurre una risposta infiammatoria a livello polmonare che mima alcuni aspetti caratteristici della flogosi presente nei pazienti colpiti da BPCO, come il reclutamento neutrofilico, l'aumento dell'espressione di citochine pro-infiammatorie e di mediatori chemiotattici nel BAL e nel tessuto polmonare e l'attivazione di specifici pathways intracellulari responsabili dell'amplificazione della risposta infiammatoria. (Hautamaki *et al*, 1997). Recenti studi sull'esposizione acuta al fumo di sigaretta nei topi

indicano inoltre che questo modello possiede caratteristiche di corticosteroido resistenza (Yao *et al*, 2008).

L'esposizione cronica al fumo di sigaretta (fino a 6 mesi) è in grado di indurre una risposta infiammatoria polmonare più intensa rispetto a quella osservata nell'esposizione acuta accompagnata da importanti alterazioni nella struttura (distruzione alveolare) e nella funzionalità polmonare (ostruzione delle vie aeree) (Retamales *et al*, 2001). Oltre a macrofagi e neutrofili, si osserva un aumento nel numero di linfociti T CD8+ e CD4+ nel parenchima polmonare e nelle vie aeree centrali e periferiche. In questo tipo di protocollo si osserva attivazione massiccia di specifiche proteasi, come la metalloproteasi MMP-12 e l'elastasi neutrofilica, coinvolta nella distruzione del parenchima polmonare e nello sviluppo dell'enfisema (Chung A *et al*, 2002).

### **Modelli di modificazione genica**

Negli ultimi anni, mediante moderne tecniche di biologia molecolare, sono stati sviluppati modelli animali modificati geneticamente che mimano alcuni aspetti della BPCO. L'overespressione e la deplezione genica nei topi è una tecnica importante per identificare la funzione di geni diversi coinvolti nella regolazione dell'omeostasi polmonare in vivo e i meccanismi molecolari di malattie come la BPCO. In particolare, nel campo della BPCO, è stata prestata particolare attenzione ai geni relativi alla matrice tra cui l'elastina. È stato osservato che animali knock out per l'elastina subiscono un arresto nello sviluppo delle vie aeree terminali e un'alterazione della funzione e della struttura del polmone maturo,

tipiche dell'enfisema, dimostrando che l'elastina ha un ruolo fondamentale nello sviluppo polmonare (Wendel *et al*, 2000).

Un altro approccio sperimentale consiste nell'esporre animali modificati geneticamente a stimoli nocivi esogeni come il fumo di sigaretta. Questo permette di identificare il ruolo di specifiche proteine nei meccanismi coinvolti nell'infiammazione e nelle alterazioni strutturali indotte dal fumo. In alcuni studi è stato osservato che dopo esposizione cronica al fumo di sigaretta, i topi privi del gene per la metalloproteasi MMP-12 mantengono la loro struttura polmonare, a differenza dei topi normali (Azoulay-Dupuis *et al*, 1983).

## **Terapia della BPCO**

Come descritto precedentemente, la BPCO è una patologia caratterizzata da una progressiva limitazione del flusso aereo non completamente reversibile, associata ad una risposta infiammatoria polmonare conseguente all'inalazione di particelle o gas nocivi. Viene accelerata nel suo decorso dai fenomeni di riacutizzazione, rappresentati essenzialmente dalle infezioni, con alterazione della qualità di vita del paziente. A oggi non esiste una terapia efficace nel limitare la progressione della malattia.

La cessazione del fumo rappresenta la prima misura da adottare per cercare di frenare la progressione della malattia. In parallelo viene intrapresa una terapia farmacologica di mantenimento basata sull'assunzione di sostanze in grado di ridurre da un lato le resistenze al flusso, dall'altro l'infiammazione cronica. I primi farmaci indicati nel



trattamento della BPCO sono stati i broncodilatatori, tra cui agonisti  $\beta_2$ -adrenergici a lunga durata d'azione (LABA) e anticolinergici.

I LABA provocano il rilassamento della muscolatura liscia delle vie aeree e hanno dimostrato essere efficaci nel sollievo a breve termine dei sintomi della BPCO. I LABA, tuttavia, presentano effetti collaterali a livello cardiovascolare e aumentano il rischio di eventi cardiaci avversi. Questo rischio aumenta nei pazienti con BPCO e malattie cardiache concomitanti (Rossi *et al*, 2008).

Gli anticolinergici fungono da broncocostrittori e riducono la secrezione di muco: il loro utilizzo si associa a una riduzione delle riacutizzazioni. Gli antagonisti muscarinici mostrano effetti collaterali evidenti come secchezza delle fauci, glaucoma e ritenzione urinaria (Scullion *et al*, 2007).

In associazione ai broncodilatatori, allo scopo di limitare il processo infiammatorio caratteristico della BPCO, sono stati utilizzati i farmaci antiinfiammatori steroidei (corticosteroidi). Questi farmaci, nonostante mostrino una notevole efficacia nel trattamento dell'asma, sembrano non avere efficacia nel trattamento dei pazienti con BPCO a causa dell'instaurarsi di un meccanismo di resistenza (Barnes PJ *et al*, 2004). Per tale motivo sono stati investiti numerosi sforzi al fine di sviluppare nuovi farmaci antiinfiammatori specifici per il trattamento della BPCO tra cui particolarmente interessanti risultano essere gli inibitori della Fosfodiesterasi 4 (PDE4) e gli inibitori delle Fosatidilinositolo-3-chinasi (PI3Ks).

## **Resistenza ai corticosteroidi**

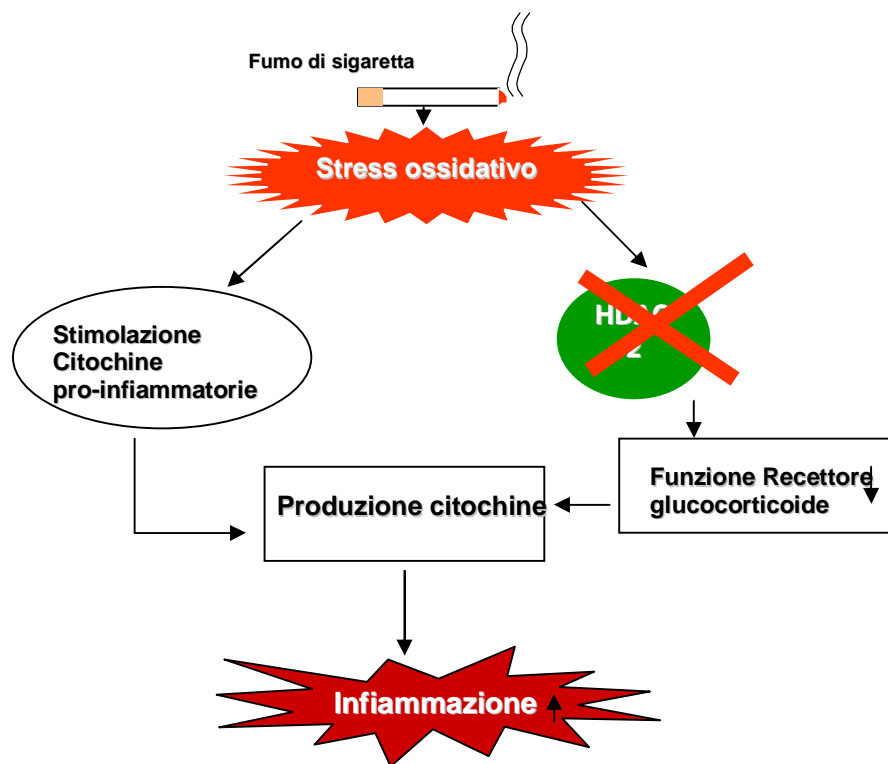
I corticosteroidi, sebbene risultino efficaci come trattamento antiinfiammatorio in un'ampia gamma di malattie immunitarie e infiammatorie croniche, non mostrano uguale efficacia in tutte le patologie. Essi sono abbastanza efficaci nella maggior parte dei pazienti con asma, ma hanno minore efficacia nei pazienti con BPCO, nonostante entrambe le malattie siano caratterizzate da un attivo processo infiammatorio nel tratto respiratorio. Questo suggerisce che nella BPCO ci sia un meccanismo di resistenza ai corticosteroidi, che non si osserva in altre patologie infiammatorie (Barnes *et al*, 2004).

I corticosteroidi esercitano un effetto antiinfiammatorio regolando l'espressione genica in diversi modi. I corticosteroidi entrano nelle cellule e si legano al recettore per i glucocorticoidi (GR) nel citoplasma: il complesso trasloca nel nucleo dove può legarsi a specifiche sequenze di DNA (glucocorticoid-response elements o GRE) presenti nel promotore di geni responsivi ai corticosteroidi portando a cambiamenti nella trascrizione genica. L'interazione di GR con GRE classicamente porta ad un aumento della trascrizione genica (trans-attivazione), anche se si sono osservati casi in cui il legame GR-GRE porta a soppressione dell'espressione genica (cis-repressione). Il numero di geni regolato direttamente dai corticosteroidi è stimato essere tra 10 e 100 ma molti geni sono indirettamente regolati dai corticosteroidi mediante interazione con altri fattori di trascrizione e coattivatori. Condizione necessaria perché si possa verificare la trascrizione genica è l'acetilazione degli istoni nucleari, intorno ai quali si organizza il DNA nel cromosoma: l'acetilazione degli istoni porta a una modificazione conformazionale

nella struttura della cromatina che permette il legame del RNA polimerasi II e dei fattori di trascrizione al DNA e di conseguenza l'attivazione della trascrizione genica (Ito and Adcock, 2001).

GR è in grado di spegnere la trascrizione genica legandosi a coattivatori per impedire l'attività istone acetil-transferasica e reclutando l'enzima Istone Deacetilasi 2 (HDAC2) in grado di deacetilare gli istoni (Ito *et al*, 2002).

La resistenza ai corticosteroidi, nella BPCO, sembra essere associata a una riduzione dell'espressione e dell'attività della HDAC2 nei macrofagi alveolari d'individui fumatori rispetto ai non fumatori. Sembra che sia proprio lo stress ossidativo, mediante la formazione di perossinitriti, a danneggiare la funzionalità della HDAC2 (Ito and Adcock 2001). Questo evento amplifica la risposta infiammatoria con un aumento dell'attivazione di NF- $\kappa$ B, e riduce gli effetti antiinfiammatori dei corticosteroidi, dal momento che la HDAC2 non è più in grado di revertire l'acetilazione degli istoni (Fig.5).



**Figura 5:** Resistenza ai corticosteroidi causata da stress ossidativo e amplificazione della risposta infiammatoria.

## Nuovi antiinfiammatori per la terapia della BPCO

La deludente efficacia dei corticosteroidi (da soli o in combinazione con i  $\beta_2$  agonisti) nella BPCO ha portato ad un notevole sforzo dell'industria farmaceutica e della comunità scientifica nella ricerca di nuovi antiinfiammatori per la BPCO. Attualmente ci sono numerosi approcci terapeutici in fase di sviluppo clinico che appaiono molto promettenti come potenziale terapia antiinfiammatoria per la BPCO.

Molti di questi farmaci antiinfiammatori ad ampio spettro appaiono molto efficaci e includono:

- ***Inibitori della protein chinasi attivata dal mitogeno p38 (p38 MAPK):*** Le protein chinasi attivate dai mitogeni (MAPK) sembrano avere un ruolo importante nell'inflammatione cronica, anche se non sono state ancora ben definite le complesse cascate enzimatiche con le quali agiscono sull'inflammatione. Uno di queste, il pathway p38 MAPK, è attivato dallo stress cellulare e regola l'espressione di citochine infiammatorie, tra cui CXCL8, TNF- $\alpha$  e le MMPs. La p38 MAPK è attivata nei macrofagi alveolari dei polmoni di pazienti con BPCO (Renda T et al, 2008). Diversi inibitori p38 MAPK sono entrati in sviluppo clinico, tra questi un potente inibitore dell'isoforma  $\alpha$  di p38, SD-282, sembra essere efficace nell'inibire il rilascio di TNF-  $\alpha$  da parte dei macrofagi alveolari umani in vitro (Smith SJ et al, 2006) e nel sopprimere l'inflammatione in un modello murino di fumo di sigaretta resistente ai corticosteroidi (Medicherla S et al, 2007).
- ***Inibitori del fattore nucleare kB (NF-kB):*** NF-kB è capace di regolare l'espressione di diverse chemochine e citochine infiammatorie, come CXCL8 e TNF-  $\alpha$ , e della metalloelastasi MMP-9. NF-kB è attivato nei macrofagi e nelle cellule epiteliali di pazienti con BPCO, in particolare durante le esacerbazioni. Inibitori di IKK2, un enzima capace di fosforilare la protein chinasi I $\kappa$ B, che lega NF-kB e ne inibisce l'attività, sembrano essere molto efficaci nel modello animale di esposizione a LPS, ma non sembrano avere molta efficacia nel modello animale di

instillazione dell'elastasi neutrofilica (Birrell MA et al, 2006).  
Diversi IKK2 inibitori sono attualmente in sviluppo preclinico.

- ***Inibitori dell'elastasi neutrofilia:*** l'elastasi neutrofilica è una proteasi serinica rilasciata dai neutrofili durante il processo infiammatorio. Una delle sue funzioni principali è quella di degradare le proteine della matrice. È in grado di aumentare l'attività delle MMPs attraverso un'attivazione diretta di MMPs come la MMP-9 (Ferry G et al, 1997) e attraverso una inattivazione di inibitori endogeni delle MMPs e di inibitori tissutali delle metalloproteinasi della matrice (TIMP) (Okada Y et al, 1988). Sembra stimolare la secrezione della mucina e modulare l'apoptosi delle cellule epiteliali umane del polmone. L'elastasi neutrofilica, quindi, ha un ruolo importante nell'enfisema e nel rimodellamento polmonare attraverso la degradazione della matrice e l'induzione di apoptosi. In modelli di esposizione al fumo di sigaretta topi knockout per l'elastasi neutrofilica sono protetti dallo sviluppo di enfisema e questo effetto è accompagnato dall'inibizione del reclutamento di macrofagi e neutrofili (Shapiro SD et al, 2003). Inibitori di questa proteasi potrebbero essere usati nel prevenire lo sviluppo di enfisema tipico della BPCO.

## **Nuovi antiinfiammatori: Inibitori delle fosfatidilinositolo-3-kinasi (PI3Ks)**

Un approccio terapeutico mirato alla riduzione della risposta infiammatoria caratteristica della BPCO e alla riattivazione della responsività all'effetto antiinfiammatorio dei glucocorticoidi in situazioni di forte stress ossidativo è dato dall'utilizzo degli inibitori della fosfatidilinositolo-3-kinasi (PI3Ks).

Le PI3Ks sono una famiglia di proteine coinvolte in una varietà di risposte cellulari, come la sopravvivenza cellulare, la proliferazione, la differenziazione e la migrazione cellulare (Cantley, 2002) .

Questi enzimi sono in grado di fosforilare l'anello inositolico dei fosfatidilinositoli in posizione D3 (PtdIns). In base alle loro proprietà biochimiche e strutturali, le PI3Ks sono organizzate in tre diverse classi.

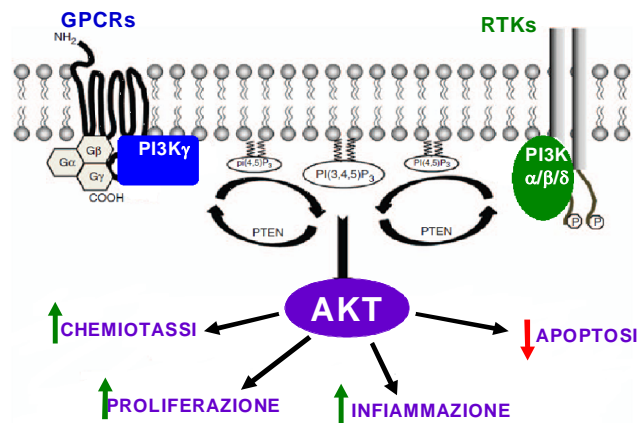
Le PI3Ks di classe I sono le più caratterizzate e fosforilano, su attivazione dei recettori specifici ( recettori a tirosin chinasi o associati a proteine G), il fosfatidilinositolo-4,5-difosfato (PIP2) in posizione 3, formando così in fosfatidilinositolo-3,4,5- trifosfato (PIP3).

Le PI3Ks di classe II e III producono diversi prodotti di fosforilazione, ma la loro funzione non è chiara.

Le PI3Ks di classe I sono etero dimeri composti da una sub unità catalitica (p110) e da una sub unità adattatrice, capace di legare il recettore, con conseguente attivazione dell'enzima. Le quattro PI3Ks di classe I sono ben identificate e conosciute come PI3K di tipo  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , in linea con la nomenclatura della sub unità p110. Mentre le p110 $\alpha$  e p110 $\beta$  sono espresse in maniera ubiquitaria, le p110  $\gamma$  e  $\delta$  sono maggiormente espresse nei leucociti (Cantley, 2002).

Le PI3K di classe I sono responsabili della produzione del PIP3, in seguito all'attivazione dei recettori a tirosin chinasi o associati a proteine G. Questo lipide fosforilato funge da secondo messaggero, evocando una elevata quantità di risposte biologiche. Infatti, il PIP3 funge da sito di ancoraggio per diverse proteine caratterizzate da uno specifico dominio chiamato dominio PH (pleckstrin homology). Le protein chinasi attivate dal legame con il PIP3 determinano l'attivazione di una cascata di segnali che culmina con l'attivazione della serin/treonina chinasi PKB/Akt. Attraverso il suo dominio PH, Akt viene reclutata a livello della membrana e fosforilata in due diversi siti dalle chinasi PDK1 e mTORC2 (rispettivamente a livello della treonina 305 e della serina 473). Questi eventi determinano l'attivazione di Akt, che a sua volta sarà in grado di controllare il metabolismo, la sintesi proteica, proliferazione, la sopravvivenza e l'apoptosi cellulare (Franke, 2008) (Fig.6). Il signaling delle PI3Ks viene terminato da una serie di fosfatasi capaci di rimuovere il fosfato in posizione D3 dall'anello inositico dei fosfatidilinositoli, come ad esempio PTEN. PTEN è un enzima espresso in maniera ubiquitaria e sembra capace di associare la subunità p85, innescando un feedback negativo che controlla i livelli di PIP3.





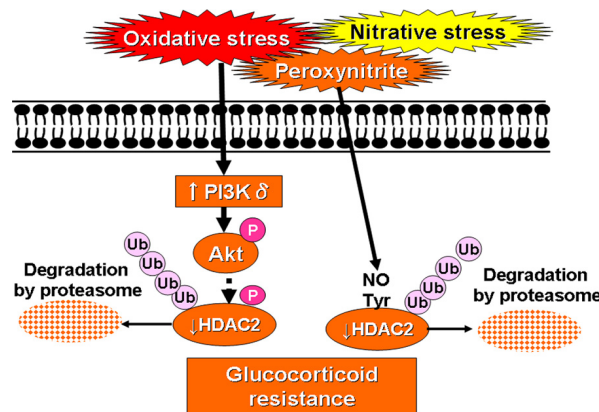
**Figura 6 : Patway fosfoinositolo-3-kinasi ( PI3K)/Akt.** Le PI3K inducono un'attivazione di Akt, determinando aumento della chemiotassi, della proliferazione, dell'infiammazione e riduzione dell'apoptosi.

Recenti studi hanno suggerito che le PI3Ks di classe I hanno un ruolo cruciale nell'espressione e nell'attivazione di mediatori infiammatori, nel reclutamento di cellule infiammatorie (neutrofili e macrofagi) e nel rimodellamento delle vie aeree (Takeda et al, 2010). Le PI3Ks di classe I sono anche coinvolte nell'espressione della metalloproteasi MMP-9, capace di degradare componenti della matrice extracellulare ( in particolare l'elastina). La MMP-9 è infatti presente in basse quantità nei polmoni dei pazienti sani, mentre nei pazienti con BPCO è maggiormente espressa contribuendo alla patogenesi della malattia (Barnes PJ *et al*, 2003).

Nella BPCO, alti livelli di ROS, prodotti dall'esposizione al fumo di sigaretta o altri irritanti, rappresentano un elemento chiave di amplificazione della risposta infiammatoria nel polmone (Rahman and Adcock, 2006), che porta all'attivazione di diversi pathways, tra i quali quello di PI3K/Akt. I pazienti con BPCO non rispondono bene ai

corticosteroidi probabilmente a causa di una ridotta espressione dell'enzima HDAC2 (Ito K et al, 2005). In particolare, sembra che l'isoforma delta delle PI3Ks abbia un'importante ruolo nella riduzione dell'attività della HDAC2 indotta da stress ossidativo (Fig.7).

Inibitori di questa isoforma, infatti, sembrano in grado di riattivare la responsività all'effetto antiinfiammatorio dei glucocorticoidi in situazioni di forte stress ossidativo.



**Figura 7 : Patway di resistenza ai glucocorticoidi.** Lo stress ossidativo attiva la PI3K $\delta$  che induce fosforilazione di Akt e una riduzione della HDAC2, comportando un fenomeno di resistenza ai glucocorticoidi.

Una caratteristica del processo infiammatorio che caratterizza la BPCO è la migrazione dei leucociti (eosinofili, neutrofili, macrofagi e cellule T) al sito di lesione infiammatoria in risposta a chemochine e altri chemioattrattanti (Curnock et al., 2002). Questo meccanismo viene regolato dal signaling PI3K/Akt (Ito et al, 2007). In particolare, sembra

che sia l'isoforma gamma delle PI3Ks ad avere un ruolo importante nella regolazione dell'infiammazione e nei meccanismi di chemiotassi.

In modelli animali di esposizione al fumo di sigaretta, inibitori di questa isoforma sembrano capaci di determinare una ridotta chemiotassi di neutrofili e una riduzione dei livelli di citochine e chemochine indotte dal fumo di sigaretta (Ito et al, 2007).

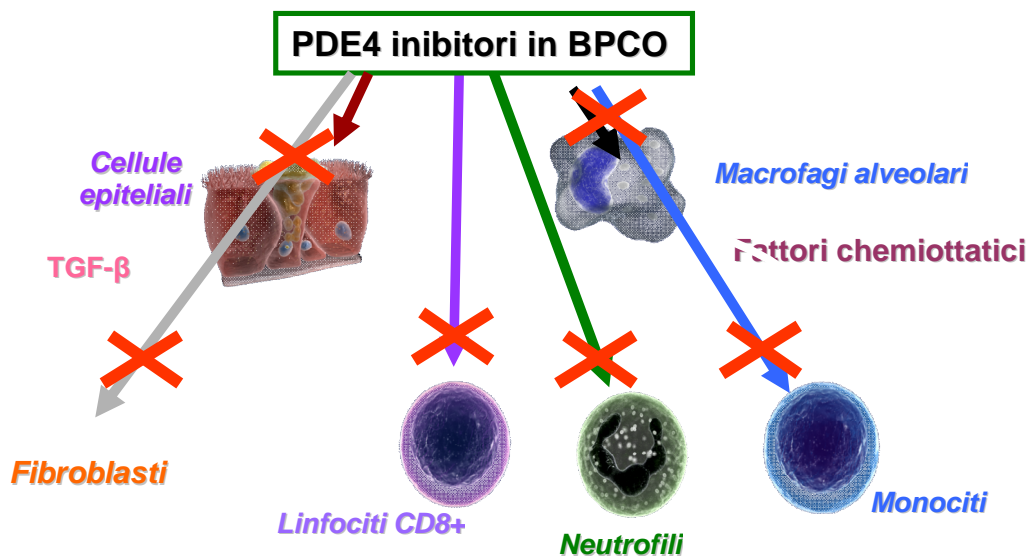
Questo suggerisce che inibitori selettivi per le isoforme gamma e delta delle PI3Ks possano avere una rilevante attività antiinfiammatoria nella patogenesi della BPCO.

### **Nuovi antiinfiammatori: PDE4 inibitori**

Un nuovo approccio terapeutico mirato alla riduzione della risposta infiammatoria caratteristica della BPCO è rappresentato dagli inibitori della Fosfodiesterasi 4 (PDE4). La PDE4 appartiene ad una grande famiglia di enzimi intracellulari capaci di inattivare i secondi messaggeri cAMP e cGMP. Le fosfodiesterasi hanno diversa distribuzione tissutale e substrati specifici. L'enzima PDE4 ha suscitato particolare interesse come target per il trattamento dell'asma e della BPCO. Questa isoforma è espressa nelle cellule infiammatorie, nel muscolo liscio delle vie aeree e nelle fibre nervose del polmone e la sua inibizione sopprime il reclutamento e l'attivazione di cellule infiammatorie, come i neutrofili, i linfociti T CD8+, i macrofagi e gli eosinofili (Grootendorst DC *et al*, 2007). I PDE4 inibitori, infatti, agiscono aumentando le concentrazioni intracellulari di AMP ciclico, un secondo messaggero che esercita effetti inibitori su molte cellule infiammatorie.

In modelli sperimentali l'esposizione acuta e cronica al fumo di sigaretta porta a risposte polmonari che, almeno in parte, mimano gli effetti infiammatori e i cambiamenti strutturali del polmone osservati nella BPCO. Il fumo di sigaretta attiva il fattore nucleare NF- $\kappa$ B, che stimola la produzione di proteine infiammatorie come la metalloproteasi MMP-12. Questa proteasi media l'infiammazione indotta dal fumo di sigaretta mediante il rilascio di TNF- $\alpha$  da parte dei macrofagi, con conseguente attivazione endoteliale, reclutamento neutrofilico, degradazione proteolitica della matrice e sviluppo dell'enfisema (Martorana PA *et al*, 2005). In modelli di esposizione cronica al fumo di sigaretta i PDE4 inibitori esprimono un'attività antiinfiammatoria a livello polmonare, attraverso una riduzione dello stress ossidativo e della produzione di citochine infiammatorie da parte dei linfociti T CD4+ e CD8+, e attraverso una limitazione del reclutamento dei neutrofili nelle vie aeree (Martorana *et al*, 2005) (Fig. 8). Sembra abbiano, inoltre, un effetto protettivo sullo sviluppo dell'enfisema, perché inibiscono il rilascio e l'attivazione delle metalloproteasi (MMP-12) da parte dei macrofagi alveolari, e quindi prevengono il danno del parenchima polmonare. I PDE4 inibitori sono in grado di sopprimere la chemiotassi dei fibroblasti e la contrazione del collagene nativo, misura dell'attività dei fibroblasti, e il rilascio di due metalloproteasi (MMP-1 e MMP-2), coinvolte nello sviluppo della fibrosi delle piccole vie aeree e dell'enfisema, da parte dei fibroblasti polmonari umani (Martin-Chouly *et al*, 2004). In particolare, Cilomilast sopprime il rilascio di TNF- $\alpha$  da parte delle cellule epiteliali di pazienti con BPCO, mentre Roflumilast inibisce la trascrizione del mRNA indotta dal fattore di crescita epiteliale MUC5AC e l'espressione

proteica nelle cellule epiteliali delle vie aeree umane, suggerendo che i PDE4 inibitori possano sopprimere la secrezione di muco nelle malattie delle vie aeree (Mata *et al*, 2005). I PDE4 inibitori hanno anche la capacità di sopprimere le contrazioni del muscolo liscio delle vie aeree umane in risposta a LTC<sub>4</sub> e all'istamina, anche se questo antagonismo funzionale risulta più significativo quando i PDE4 inibitori vengono combinati con i PDE3 inibitori, suggerendo che i PDE4 inibitori non hanno una significativa efficacia come broncodilatatori se somministrati da soli (Engelstatter *et al*, 2005). I PDE4 inibitori risultano molto efficaci nel sopprimere, nei roditori, il reclutamento dei neutrofili e l'ipersecrezione di muco causati dal trattamento con LPS, nel ridurre la fibrosi sub epiteliale e l'ipertrofia nei modelli murini di asma, nel prevenire il danno parenchimale, e nel sopprimere il processo infiammatorio nei topi esposti al fumo di sigaretta, indicando che questi farmaci possono intervenire significativamente nei processi infiammatori e di alterazione della struttura del parenchima polmonare osservati nella BPCO (Martorana *et al*, 2005).



**Figura 8:** I PDE4 inibitori in BPCO sopprimono il reclutamento e l'attivazione di cellule infiammatorie.

Alcuni PDE4 inibitori sono in sviluppo clinico avanzato (Tabella 2), mentre Roflumilast, un composto sviluppato per la somministrazione orale, è entrato recentemente in commercio nei Paesi dell'Unione Europea con il nome di Daxas®. I quattro studi di fase III condotti in pazienti con BPCO da moderata a severa hanno dimostrato che roflumilast (500 mg una volta al giorno) produce una significativa riduzione delle esacerbazioni anche nei pazienti già in terapia con beta 2 agonisti a lunga durata di azione ed è in grado di migliorare la funzionalità polmonare (misurata attraverso la valutazione della FEV1) in pazienti con BPCO (Calverley *et al*, 2009; Fabbri *et al*, 2009). I risultati di questi studi, oltre a confermare i miglioramenti importanti, prolungati e statisticamente significativi della funzionalità polmonare,

mostrano che roflumilast ha anche rivelato una tendenza a ridurre le complicanze se somministrato in aggiunta ai broncodilatatori (salmeterolo o tiotropio) e a lunga durata d'azione (Fabbri *et al*,2009).

Lo sviluppo clinico dei PDE4 inibitori ha presentato alcuni ostacoli, soprattutto a causa degli effetti collaterali associati a questa classe di farmaci: tra i disturbi più evidenti si osservano quelli gastrointestinali, come nausea e diarrea. Lo sviluppo di PDE4 inibitori somministrabili per via inalatoria rappresenta il futuro di questa nuova importante classe di antiinfiammatori.

**Tabella 2: PDE4 inibitori in studio clinico**

<b>FARMACO</b>	<b>AZIENDA</b>	<b>FASE</b>	<b>Modalità di somministrazione</b>	<b>NOTE</b>
<b>GSK256066</b>	<b>GSK</b>	<b>II</b>	<b>Inalazione</b>	<b>Studi in BPCO, rinite allergica e asma lieve</b>
<b>CHF 6001</b>	<b>Chiesi</b>	<b>I</b>	<b>Inalazione</b>	<b>Studi in fase I completati con risultati positivi</b>
<b>OX914</b>	<b>Orexo</b>	<b>II</b>	<b>PO</b>	<b>Studi in fase II completati in rinite allergica asma e BPCO</b>
<b>Tetomilast</b>	<b>Otsuka</b>	<b>II</b>	<b>PO</b>	<b>Studi in BPCO associata ad enfisema</b>
<b>Cilomilast</b>	<b>GSK</b>	<b>III</b>	<b>PO</b>	<b>Studi in fase III completati nella BPCO</b>

## **PDE4 e PI3K: possibile crosstalk?**

La risposta infiammatoria cronica, che si manifesta nella BPCO, determina la comparsa di un'ostruzione delle vie aeree scarsamente reversibile e progressiva che deve essere trattata con farmaci broncodilatatori (Rabe *et al*, 2007), tra cui agonisti  $\beta$ 2-adrenergici a lunga durata d'azione (LABA) e anticolinergici.

Per il progresso della terapia di questa patologia diventa quindi molto importante identificare nuovi potenziali meccanismi che leghino l'infiammazione alla progressiva perdita di funzionalità respiratoria.

L'attivazione dell'asse costituito da recettori  $\beta$ -adrenergici / adenosina monofosfato ciclica (cAMP)/ protein chinasi A (PKA) è alla base dei meccanismi di rilassamento del muscolo liscio delle vie aeree: il legame delle catecolamine ai recettori  $\beta$ -adrenergici promuove l'attivazione dell'enzima adenilato ciclasi (AC) con conseguente sintesi di cAMP che induce il rilassamento della muscolatura liscia delle vie aeree (Billington C.K. , *et al* 2012). I livelli intracellulari di cAMP sono controllati dall'attività delle fosfodiesterasi (PDE) che metabolizzano questo nucleotide ciclico, bloccandone l'attività. L'inibizione delle fosfodiesterasi specifiche per cAMP (PDE3, PDE4, PDE7 e PDE1), provocando un aumento dei livelli di cAMP, può contribuire al rilassamento delle muscolatura delle vie aeree (Zhai K.*et al*, 2012).

Recenti studi hanno evidenziato il potenziale ruolo delle PI3Ks nel controllo della contrattilità del muscolo liscio delle vie aeree, attraverso una regolazione dei livelli di cAMP (Jiang H. *et al* 2012).



Tra le tre classi di PI3Ks, l'isoforma gamma della classe I di PI3Ks sembra avere un ruolo predominante nella modulazione del signaling di cAMP nelle cellule del muscolo liscio cardiaco, attraverso un meccanismo di interazione proteina-proteina (Perino *et al.* 2011).

Da questi studi emerge la necessità di indagare su una potenziale interazione tra PI3K $\gamma$  e le PDEs anche a livello della muscolatura liscia delle vie aeree e su un potenziale coinvolgimento di PI3K $\gamma$  nel controllo della regolazione del tono della muscolatura delle vie aeree.

## **2. Scopo dello studio**

La BPCO è caratterizzata da una risposta infiammatoria cronica associata a una limitazione irreversibile del flusso d'aria nelle vie aeree. È noto come l'esposizione a fumo di sigaretta sia la causa più comune d'insorgenza di BPCO (Rabe *et al*, 2007) e come l'infiammazione che guida la progressione di questa patologia sia scarsamente sensibile all'effetto dei corticosteroidi (Barnes NC *et al*, 2006).

La cessazione del fumo di sigaretta, associato all'uso di broncodilatatori e di farmaci antiinfiammatori di tipo steroideo, non costituisce una terapia sufficiente per frenare la progressione della malattia. Per questo motivo le industrie farmaceutiche stanno cercando di sviluppare nuovi farmaci antiinfiammatori capaci di ridurre non solo le resistenze al flusso d'aria, ma soprattutto di prevenire il processo infiammatorio alla base della BPCO.

Dal momento che il fumo di sigaretta costituisce il principale agente eziologico responsabile dell'instaurarsi della BPCO, modelli animali di esposizione al fumo di sigaretta consentono di esplorare i meccanismi che stanno alla base dell'instaurarsi della patologia e di testare l'efficacia di nuovi potenziali farmaci antiinfiammatori .

Lo scopo dello studio, condotto presso il Dipartimento di Farmacologia della Chiesi Farmaceutici S.p.A nel primo e nel secondo anno di dottorato, è stata la messa a punto e la caratterizzazione di un modello di infiammazione polmonare indotta dall'esposizione acuta al fumo di sigaretta nel topo.

Il modello sperimentale da noi allestito prevede l'esposizione al fumo di sigaretta di topi C57BL/6J mediante un sistema d'inalazione "nose only".

Tale modello è stato utilizzato per la valutazione dell'effetto di farmaci antiinfiammatori con diverso meccanismo d'azione e diverse vie di somministrazione: in particolare sono stati testati il composto roflumilast (orale) e GSK256066 (inalatorio) ad attività inibitoria sull'enzima PDE4, e budesonide, un composto appartenente alla classe dei corticosteroidi. In questo modello è stato possibile osservare la resistenza agli steroidi tipica della BPCO e indagare il ruolo delle fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3Ks) in tale fenomeno, con particolare riferimento alla capacità d'inibitori di PI3K di ripristinare l'effetto anti-infiammatorio degli steroidi. Questo modello è stato anche usato per valutare il ruolo dell'isoforma gamma di PI3K nell'infiammazione, grazie alla possibilità di usare topi geneticamente modificati con inattivazione costitutiva di PI3K $\gamma$ .

Nel corso del terzo anno di dottorato, lo scopo dello studio condotto presso il Dipartimento di Biotecnologie Molecolari dell'Università di Torino (MBC), è stato l'approfondimento del target PI3K $\gamma$  con particolare attenzione al ruolo di PI3K $\gamma$  nei meccanismi di contrazione e rilassamento del muscolo liscio delle vie aeree, allo scopo di identificare possibili meccanismi che leghino l'infiammazione alla progressiva perdita di funzionalità respiratoria osservata nella BPCO.

## **3. Materiali e Metodi**

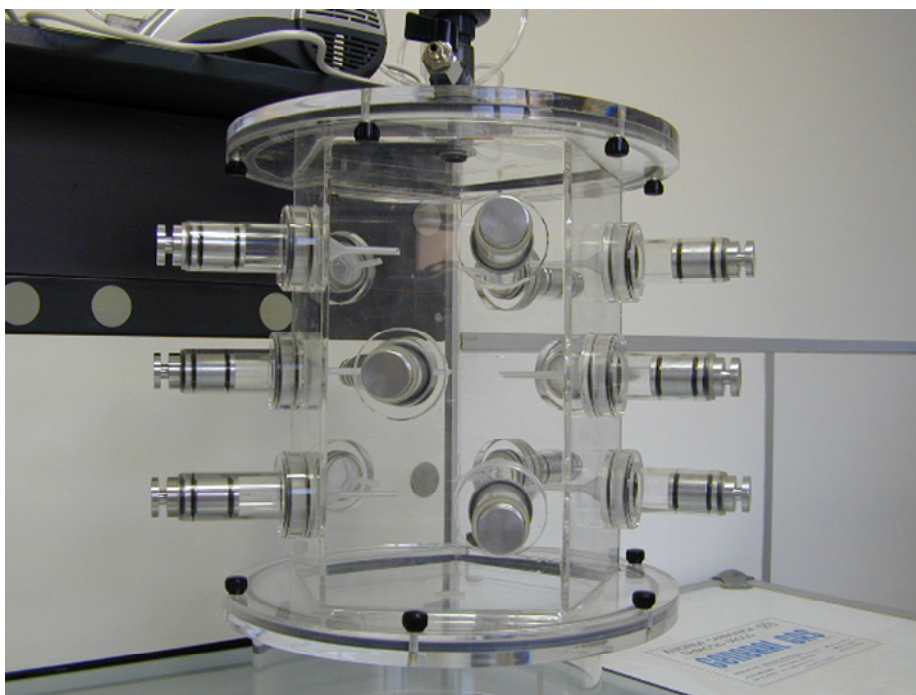
## **Animali**

Per la messa a punto del modello e la sua caratterizzazione sono stati utilizzati topi maschi C57BL/6J di 8-11 settimane forniti da Charles River Italy, topi aventi una soppressione genica dell'isoforma  $\gamma$  di PI3K (PI3K $\gamma$  knockout), e topi aventi un'inattivazione costitutiva a livello dell'isoforma  $\gamma$  di PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma$  kinase dead) (Hirsch *et al*, 2000; Patrucco *et al*, 2004) di 8-10 settimane, forniti dal Dipartimento di Biotecnologie Molecolari dell'università di Torino. I topi PI3K $\gamma$  knockout sono stati geneticamente modificati in modo da risultare privi di questo enzima, mentre i topi PI3K $\gamma$  kinase dead sono stati geneticamente modificati in modo da avere una inibizione dell'attività catalitica di questo enzima, mimando in questo modo una condizione d'inibizione farmacologica. Tutti gli animali sono stati stabulati in una stanza mantenuta a temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e umidità ( $55 \pm 15$  %) costante con un ciclo di 12 ore di luce / 12 ore di buio e 15 ricambi d'aria all'ora. Tutte le procedure effettuate sugli animali sono state eseguite rispettando le normative etiche relative alla conduzione di ricerche sugli animali (D.L.vo 116/92, Ministero della Salute, numero: 196/2008-B).

## **Metodica di esposizione al fumo di sigaretta**

I topi (almeno 5 per gruppo per condizione sperimentale) sono stati esposti al fumo attivo di sigarette commerciali (Marlboro Rosse, Altria Group, Virginia: 12 mg di catrame e 0.9 mg di nicotina), attraverso un sistema di inalazione “nose only”

(Fig.9). Questo sistema d'inalazione è stato messo a punto sulla base della torre inalatoria descritta da Pauluhn, la quale è stata impiegata per studi di inalazione acuti e sub cronici con aerosol, polveri e vapori su topi, ratti e cavie (Pauluhn, 1994). I topi, contenuti in appositi alloggiamenti, sono stati inseriti in una torre inalatoria, ed esposti ad una miscela di fumo e aria (rapporto 1:8). Questa miscela viene ottenuta introducendo il fumo prodotto dalle sigarette in una camera di esposizione o torre inalatoria (volume interno 11,61 L) con un flusso generato da un ventilatore meccanico (7025 Rodent Ventilator, Ugo Basile, Biological Research Instruments, Comerio, Varese, Italia) che lavora ad una velocità di 250 ml/minuto. Un secondo ventilatore meccanico viene utilizzato per introdurre nella camera di esposizione il flusso d'aria necessario per la diluizione del fumo. La scelta delle condizioni di esposizione si è basata sul modello descritto da Cavarra (Cavarra *et al*,2001). Animali della stessa età, ceppo e sesso sono stati esposti esclusivamente ad aria nello stesso modo e per la stessa durata di tempo, e considerati come gruppo controllo. L'esposizione al fumo è stata ripetuta per quattro giorni consecutivi.



**Figura 9:** Sistema di esposizione “nose- only”

## **Lavaggio Broncoalveolare (BAL)**

Gli animali, 24 ore dopo l'ultima esposizione al fumo di sigaretta, sono stati sacrificati con un'overdose dell'anestetico gassoso isoflurano (Isoba, Schering Plough) seguita da dissanguamento. Per la raccolta del BAL, un volume pari a 0,6 ml di Hank's Buffer addizionato con Heps 10 mM e EDTA 10 mM è stato instillato nell'albero bronchiale mediante una cannula inserita in trachea. Il volume di BAL recuperato non si differenzia in modo significativo tra gli animali, ed è rappresentato da circa l'80 % del volume instillato.

I campioni di BAL raccolto sono stati sottoposti a conta totale e differenziale della cellularità come indice primario d'infiammazione.



Le conte cellulari totali in ogni campione di BAL sono state ottenute, attraverso un sistema automatico di analisi cellulare ematologica (Sysmex, DASIT, Italia) (Fig.10). Questo strumento permette di distinguere le diverse popolazioni cellulari, sfruttando il principio della Citometria a Flusso in fluorescenza che permette una separazione delle cellule, l'individuazione delle loro caratteristiche cellulari (volume, complessità interna e quantificazione di RNA e DNA) e il conteggio totale delle varie popolazioni cellulari. Le conte differenziali sono state effettuate manualmente su vetrini allestiti con citocentrifuga sulla base di criteri morfologici standard. Per la preparazione dei vetrini i campioni di BAL sono stati inizialmente centrifugati a 400 g alla temperatura di 4° C per 10 minuti in centrifuga da banco (Allegra, Beckmann). Il sovrantante ottenuto da ciascun campione è stato conservato a - 80°C per una successiva determinazione dei mediatori pro-infiammatori. Il pellet cellulare di ciascun campione è stato risospeso in 0,2 ml di Hank's Buffer e sottoposto a centrifugazione su vetrino mediante citocentrifuga Cytospin (Shandon). Questa metodica consente di depositare le cellule su un'area definita del vetrino come monostrato e di distenderle per meglio evidenziarne la morfologia. I vetrini sono stati sottoposti a colorazione mediante kit MGG Quick Stain (Bio-Optica). Si tratta di un metodo rapido di colorazione differenziale degli elementi figurati del sangue, usato anche per la colorazione di preparati citologici. La rapidità con cui avviene il processo di colorazione è dovuta al grado di dissociazione delle specie chimiche attive (eosina e coloranti tiazinici) che rende rapido il loro assorbimento sulle strutture cellulari. Le conte delle diverse cellule infiammatorie sono state effettuate in base ai criteri

morfologici mediante osservazione al microscopio ottico (Nikon AZ 100M; ingrandimento 400). Sono state valutate almeno 200 cellule per vetrino. La concentrazione di ciascuna popolazione cellulare è stata determinata moltiplicando la percentuale di ciascuna sottopopolazione leucocitaria per la concentrazione totale di cellule in ciascun campione, ed è stato espresso come cellule/ml.



**Figura 10** : Sistema automatico di analisi cellulare ematologica (DASIT).

## **Studio dose-risposta degli effetti pro- infiammatori indotti dal fumo di sigaretta**

Allo scopo di trovare le condizioni ottimali di esposizione al fumo, sono stati eseguiti una serie di esperimenti dose-risposta, in cui i topi C57BL/6J sono stati esposti al fumo di 5, 7, 10, 15 sigarette per 4 giorni consecutivi, come descritto sopra. 24 ore dopo l'ultima esposizione, gli animali sono stati sacrificati con un'overdose di anestetico volatile isoflurano, per la raccolta del BAL e successiva determinazione della cellularità e delle citochine.

### **Protocollo sperimentale adottato**

Dopo aver valutato i risultati ottenuti dai precedenti studi preliminari, è stato ritenuto che il protocollo più efficace e meglio tollerato per l'instaurazione di una significativa infiammazione polmonare consista nell'esporre i topi C57BL/6J ad una dose di 10 sigarette per 4 giorni consecutivi con prelievo del BAL 24 ore dopo l'ultima esposizione al fumo.

Questo protocollo è stato utilizzato per gli studi d'intervento farmacologico.

### **Studi d'intervento farmacologico**

Per testare la sensibilità del modello all'intervento farmacologico, i topi C57BL/6J sono stati trattati con diversi antiinfiammatori di riferimento appartenenti alla classe dei PDE4 inibitori (roflumilast e GSK256066),

alla classe dei corticosteroidi (budesonide) e alla classe degli inibitori PI3K (IC87114). In una prima serie di esperimenti i topi sono stati trattati per via orale con roflumilast (1-5 mg/Kg) o budesonide (0.3-3 mg/Kg), sospesi in metilcellulosa 1% e polietilenglicole (PEG) 400 in un rapporto di 95:5, e somministrati ogni giorno un'ora prima dell'esposizione al fumo di sigaretta. I topi controllo sono stati trattati con il solo veicolo. Il volume di somministrazione utilizzato per i composti e il veicolo è stato 10 ml/Kg.

GSK256066, è stato invece somministrato ai topi per via inalatoria (aerosol), ogni giorno un'ora prima dell'esposizione al fumo di sigaretta. Il composto è stato micronizzato e sospeso in NaCl 0,9%, Polisorbato 0,2 % e Sorbitan Monolaurato 0,1 % alla concentrazione di 10 mM, vaporizzato e convogliato in una torre inalatoria del tutto simile a quella utilizzata per l'esposizione al fumo. Il trattamento aerosolico ha avuto la durata di 30 minuti.

In esperimenti successivi i topi sono stati trattati per via orale con il corticosteroide budesonide (1.5 mg/Kg), con un inibitore delta di PI3K IC87114 (20 mg/Kg) e con una combinazione dei due composti, sospesi in metilcellulosa 1% e polietilenglicole (PEG) 400 in un rapporto di 95:5, due volte al giorno, un'ora prima e 4 ore dopo l'esposizione al fumo di sigaretta, per 4 giorni consecutivi. In tutti gli esperimenti i topi controllo sono stati trattati con il solo veicolo.

## **Determinazione dei mediatori pro-infiammatori nel BAL**

Il sovranatante ottenuto da ciascun campione di BAL e congelato a  $-80^{\circ}\text{C}$  è stato usato per la simultanea quantificazione dei livelli di citochine e chemochine, attraverso l'utilizzo della tecnica Luminex su piattaforma Bio-Plex™ (Bio-Rad). È un sistema che permette l'analisi simultanea di più di 100 diverse biomolecole in una singola micropiastra, aumentando la quantità d'informazioni ricavate da campioni di volume limitato, in modo da poter decifrare le complesse relazioni tra proteine coinvolte nei meccanismi di trasduzione dei segnali. I campioni sono stati analizzati mediante il kit 23-Plex panel Mouse Cytokine Assay che permette la simultanea quantificazione dei livelli di IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12(p70), IL-13, IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, INF- $\gamma$ , KC, MCP-1 MIP-  $\alpha$ , MIP-  $\beta$ , RANTES e TNF- $\alpha$ .

La piattaforma Bio-Plex™ utilizza biglie di polistirene colorate con diverse combinazioni di due fluorofori spettralmente distinti. Le biglie sono coniugate con anticorpi monoclonali specifici per una determinata proteina o peptide (citochine e chemochine). L'immunodosaggio si basa sul legame delle biglie coniugate con gli anticorpi ad anticorpi secondari presenti nella micro piastra.

## **Valutazione dell'effetto di budesonide nel modello d'inflammatione polmonare indotta da Lipopolisaccaride (LPS)**

Il modello d'inflammatione polmonare indotta da LPS prevede l'esposizione dei topi, tramite un sistema "nose only" analogo a quello utilizzato per il fumo, a un aerosol di LPS (*Escherichia Coli*, Sigma, 100 mg/ml in NaCl 0.9%) o di salina (NaCl 0.9%) generato da un nebulizzatore Medel Pro per 40 minuti. I topi C57BL/6J sono stati trattati per via orale con il corticosteroide budesonide (0.3- 3 mg/Kg), risospeso in metilcellulosa 1% e Polietilenglicole (PEG) 400 in un rapporto di 95:5, un'ora prima dell'esposizione all'aerosol. I topi controllo sono stati trattati con il solo veicolo un'ora prima dell'esposizione (40 minuti) all'aerosol di salina. Gli animali sono stati sacrificati, con un'overdose di anestetico volatile isoflurano, 24 ore dopo l'esposizione a LPS, e il BAL recuperato da ciascun animale è stato sottoposto alle analisi descritte sopra.

## **Determinazione dei Lipidi Idroperossidi nell'omogenato polmonare**

La quantificazione dei livelli polmonari di Lipidi idroperossidi (LPO) costituisce una misura indiretta dello stress ossidativo. Per l'estrazione della frazione lipidica i polmoni sono stati lavati attraverso perfusione intracardiaca con 5 ml di RPMI freddo, rimossi in blocco, pesati e omogeneizzati in 500 µl di acqua distillata mediante Ultra-Turrax. I

lipidi idroperossidi sono stati estratti e dosati utilizzando il kit *LPO Assay (Calbiochem)* seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Questo kit misura direttamente i lipidi perossidi sfruttando una reazione redox con ioni ferrosi. Gli idroperossidi sono altamente instabili e reagiscono facilmente con gli ioni ferrosi per formare ioni ferrici. Gli ioni ferrici ottenuti sono rilevati usando ioni tiocianato come cromogeno. Nonostante questo metodo si basi sulla misura degli ioni ferrici prodotti durante la reazione, gli ioni ferrici presenti nel campione rappresentano una potenziale fonte di errore, dando una sovra estimazione dei lipidi idroperossidi. Questo problema si può eludere eseguendo un'estrazione in cloroformio. L'estratto ottenuto viene usato direttamente nel dosaggio. Questa procedura fornisce un dosaggio sensibile e affidabile per la perossidazione lipidica.

## **Colture cellulari**

Per esplorare il ruolo di PI3K in un modello di stress ossidativo in vitro e nei meccanismi di contrazione e rilassamento del muscolo liscio delle vie aeree, sono state usate cellule muscolari lisce di bronco umano (ASMC), ottenute da Lonza (Milano, Italia), cellule muscolari lisce murine (TSMC), isolate dalla trachea di topi wild-type, PI3K $\gamma$  knock-out e kinase-dead e cellule umane embrionali di rene (HEK293T), ottenute da Lonza (Milano, Italia). Le cellule AMSC e le cellule HEK293T sono state tenute in coltura, secondo le istruzioni fornite dal produttore, in un medium (DMEM) arricchito con 10% di siero bovino fetale (FBS), antibiotici (penicillina 50 U·mL<sup>-1</sup> e streptomina 0,005 mg·mL<sup>-1</sup>) e

2mM di L-glutammina in un ambiente opportuno, rappresentato da un'atmosfera di 95% di aria e 5% di CO<sub>2</sub> a 37°C.

## **Isolamento delle cellule muscolari lisce murine (TSMC)**

Le cellule muscolari lisce murine (TSMC) sono state isolate dalla trachea di topi wild-type, PI3K $\gamma$  knock out e kinase-dead, secondo un protocollo descritto da McGraw (McGraw DW *et al*,1999).

La trachea intera è stata rimossa tra la laringe e la parte superiore dell'albero bronchiale e sistemata in una piastra per colture cellulare contenente una soluzione salina di Hank's Buffer addizionato con antimicotico 2x. La trachea è stata divisa in segmenti longitudinali e in seguito dissezionata in frammenti di 2-3 mm. Tutti i segmenti, ottenuti da una singola trachea, sono stati sistemati in una piastra per colture cellulari da 60 mm con l'intima rivolta verso il basso, e tenute in coltura in un medium (DMEM) arricchito con 20% di siero bovino fetale (FBS) e antimicotico 2x in un ambiente opportuno, rappresentato da un'atmosfera di 95% di aria e 5% di CO<sub>2</sub> a 37°C.

Dopo tre giorni di crescita cellulare, la concentrazione di siero e di antimicotico è stata ridotta rispettivamente al 10% e a 1x. I frammenti di trachea sono stati rimossi dalla piastra nel momento in cui le cellule hanno raggiunto una confluenza locale. Le cellule, una volta raggiunta la confluenza, sono state staccate con tripsina e messe in coltura in fiasche da 75 cm<sup>2</sup>.



## **Preparazione di CSE**

L'estratto acquoso di sigaretta (CSE), usato per stimolare le cellule BSMC, è stato ottenuto tramite la formazione di bolle di fumo generate dalla combustione di 4 sigarette (Malboro rosse) in 50 ml di DMEM con rosso fenolo e successivamente filtrate attraverso un filtro da 0,2 µm (Millipore).

## **Analisi di western blotting**

Dopo la stimolazione cellulare con il CSE, sono stati preparati gli estratti cellulari totali, bolliti per 5 minuti e sottoposti ad elettroforesi su un gel di poliacrilamide. Dopo l'elettroforesi, le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa. I filtri sono stati saturati con latte 5% in TBS-Tween 0,1% per 1 ora a temperatura ambiente, e in seguito incubati a temperatura ambiente per 1 ora con l'anticorpo primario per p-akt e per vinculina, usata come proteina di riferimento. Gli anticorpi primari sono stati visualizzati con un anticorpo secondario anti-mouse. Il segnale di fluorescenza è stato determinato con l'Odissey Scanner (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska). La quantificazione è stata effettuata misurando l'intensità media delle regioni d'interesse con l'Odissey software. I rapporti tra proteina d'interesse e proteina di riferimento sono stati espressi in valori densitometrici.

## **Misura di contrattilità delle trachee murine**

Per effettuare misure di contrattilità del muscolo liscio delle vie aeree, le trachee di topi wildtype, PI3K $\gamma$  knock out e kinase-dead sono state rapidamente rimosse e montate in sospensione sul miografo, uno strumento usato per misure di contrattilità muscolare. Un'estremità della trachea è stata fissata a una molla, mentre l'altra estremità è stata collegata a un trasduttore di forza, in modo da ottenere una misura della tensione muscolare. Le trachee sono state messe a bagno in una soluzione di Krebs buffer e areato con 95% di aria e 5% di CO<sub>2</sub> a 30°C. Le trachee sono state stimulate attraverso elettrodi situati parallelamente al muscolo. Lo stato di contrattilità del muscolo è stato modificato con l'aggiunta di diverse concentrazioni (da 10<sup>-9</sup> a 10<sup>-4</sup>) di carbacolo, un agonista muscarinico che si lega al recettore dell'acetilcolina, provocando una risposta colinergica.

## **Costrutti**

Per effettuare gli esperimenti di trasfezione cellulare, sono stati usati i seguenti costrutti:

PI3K-pcDNA3 fornito da R. Wetzker (Università di Jena, Germania); PDE4B cDNA fornito da OriGene Technologies (Medical Center , Rockville); PI3K shRNA Vectors forniti da OriGene Technologies ( Medical Center,Rockville).

## **Trasfezione cellulare**

Per esperimenti di trasfezione cellulare sono state utilizzate cellule BSMC e cellule HEK293T. Le cellule HEK293T sono una linea cellulare usata da molti anni in biologia molecolare, poiché facilmente trasfettabili. Queste cellule non presentano un'espressione endogena di PI3K $\gamma$  e della PDE4B, rappresentando pertanto un'ottima linea cellulare per esplorare meccanismi d'interazione tra queste due proteine. Per effettuare esperimenti di valutazione di attività fosfodiesterasica e di western blotting, le cellule HEK293T, sono state piastrate a bassa densità e trasfettate con i plasmidi descritti nel paragrafo precedente secondo il metodo del calcio fosfato, una procedura che prevede il mescolamento di una soluzione tampone Hepes contenente ioni fosfato insieme a una soluzione di cloruro di calcio cloruro (CaCl<sub>2</sub>) e il DNA da trasfettare. Il mescolamento delle due soluzioni produce un precipitato di calcio fosfato, che andrà a legare la molecola di DNA. Il precipitato è stato prelevato, risospeso e aggiunto al terreno di coltura. Con un processo ancora non ben noto le cellule legano il precipitato e permettono l'ingresso del DNA. 24 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state lavate con PBS e sottoposte a lisi come descritto sotto.

Per effettuare esperimenti di FRET, le cellule ASMC sono state trasfettate con i PI3K $\gamma$  shRNA con l'Amaya Nucleofector kit per cellule muscolari lisce primarie, fornito da Lonza (Milano, Italia) e con una sonda d'ibridazione ICUE3, costituita da un dominio di legame all'c-AMP fuso a due molecole fluorescenti, la CFP (Cyan Fluorescent Protein) che funge da donatore, e la YFP (Yellow Fluorescent Protein) che funge da accettore (Di Pilato LM et al, 2009). Le cellule sono state

sottoposte a trasfezione per elettroporazione (programma A-033) e sottoposte ad analisi di FRET 72 ore dopo la trasfezione.

## **Lisi cellulare, immunoprecipitazione proteica e Western Blotting**

Le trachee murine sono state rapidamente rimosse, congelate e omogeneizzate in un buffer, costituito da 120 mM di NaCl, 50 mM di Tris-HCl (pH 8.0), 1% Triton X-100, inibitori delle proteasi (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), 1 mM di PMSF (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) e inibitori delle fosfatasi ( fluoruro di sodio 50 mM, sodio ortovanadato 1 mM, and sodio pirofosfato 10 mM). Le cellule HEK293T trasfettate e le trachee murine sono state lisate con lo stesso buffer di lisi. I lisati sono stati incubati in ghiaccio per 20 minuti e centrifugati a 13.000 rpm per 15 minuti a 4°C. La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo Bradford. Gli estratti sono stati incubati con proteina A- o G-Sepharose (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) e 1 µg di anticorpo/ mg di proteina per due ore a 4°C. Gli immunocomplessi, legati alla proteina A o G, sono stati lavati e sottoposti a elettroforesi su un gel di policrilammide. Dopo l'elettroforesi, le proteine sono state trasferite su una membrana di polivinilidenefluoruro (PVDF, Millipore, Billerica, MA). I filtri sono stati saturati con latte 5% in TBS-Tween 0,1% per un'ora a temperatura ambiente, in seguito incubati a 4°C overnight sotto agitazione con gli anticorpi specifici e sviluppati per chemiluminescenza (ECL, Millipore, Billerica, MA).

## **Saggio di attività fosfodiesterasica (PDE Assay)**

L'attività PDE negli immunoprecipitati è stata misurata con il metodo di Thompson and Appleman (Thompson e Appleman, 1971). Gli immunoprecipitati sono stati dosati in 200  $\mu$ l di una miscela di reazione contenente 40 mM di Tris-HCl pH 8.0, 5 mM di MgCl<sub>2</sub>, 10 mM di 2-mercapto-etanolo, [3H]cAMP (0.1  $\mu$ Ci/tube, approssimativamente 1x10<sup>5</sup> cpm/tube, Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK) con o senza 10  $\mu$ M di cAMP (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). I campioni sono stati incubati sotto agitazione a 30°C per 5-15 minuti, bolliti per 3 minuti in modo da fermare la reazione e incubati con snake venom nucleotidase da Crotalus Atrox (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). I prodotti di reazione sono stati separati per cromatografia a scambio ionico attraverso l'aggiunta di una sospensione di resina Dowex AG1-X8 (Bio-5 Rad, Segrate, Milano, Italy).

## **Analisi FRET**

Le cellule ASMC, una volta trasfettate, sono state tenute in K<sup>+</sup>-Ringer buffer, contenente 121.6 mM di NaCl, 5.4 mM di KCl, 1.8 mM di MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mM di CaCl<sub>2</sub>, 4 mM di NaHCO<sub>3</sub>, 0.8 mM di NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM di D-glucose, 5 mM di sodio piruvato, 10 mM di HEPES, portato ad un pH di 7.4. Le cellule sono state stimulate con isoproterenolo, un'agonista dei recettori  $\beta$ <sub>2</sub>-adrenergici, alla concentrazione di 100 nM, in presenza di CGP-20712, antagonista selettivo dei recettori  $\beta$ <sub>1</sub>-adrenergici, alla concentrazione di 100 nM.

Le immagini sono state catturate ogni 5 secondi usando l'obiettivo 40x di un microscopio invertito TE 300 della Nikon, connesso ad un software di controllo

(Metafluor, Molecular Devices, Sunnyvale, CA), a sua volta collegato a una fotocamera (Sensicam PE; PCO, Kelheim, Germany).

La molecola donatore CFP (Cyan Fluorescent Protein) è stata eccitata in un tempo di 150-300 ms da una lampada a Xenon, attraverso l'uso di un filtro 440/20BP e uno specchio dicroico.

La doppia immagine di emissione delle due molecole CFP e YFP (Yellow Fluorescent Protein) è stata effettuata da uno splitter dotato di uno specchio dicroico 495LP e dai filtri 470/30 and 535/30.

L'intensità media di fluorescenza è stata misurata in una regione d'interesse che comprende l'intera cellula o solo una sua parte. Il background è stato sottratto e l'intensità della molecola YFP è stata corretta nel canale dei 535 nm, prima di calcolare il rapporto CFP/YFP. Le immagini sono state ottenute usando l'Image J software (National Institute of Health).

## **Analisi dei dati**

Tutti i dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi statistica ANOVA a una via seguita da opportuni post-hoc test tramite l'utilizzo del programma software GraphPad. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard della media (SEM). I dati mostrati rappresentano i risultati di almeno due esperimenti indipendenti con almeno 5 animali per gruppo sperimentale. Sono state considerate statisticamente significative le differenze che presentano un valore  $p < 0.05$ .

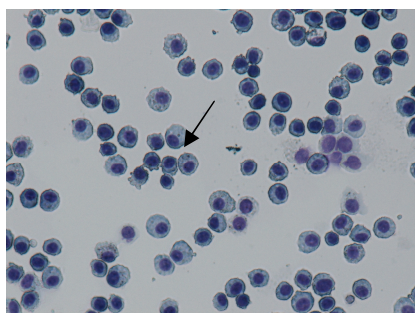
## **4. Risultati**

## 1) Messa a punto del modello d'inflammation polmonare indotta dal fumo di sigaretta nel topo

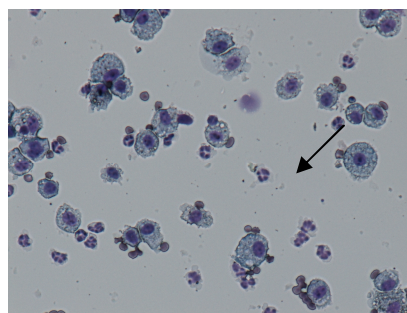
### a) Effetti dose-risposta indotti dal fumo di sigaretta sulla cellularità nel BAL

Per la valutazione di livelli d'inflammation e dell'infiltrazione leucocitaria nelle vie aeree del topo dopo esposizione al fumo, è stata effettuata un'analisi quantitativa delle popolazioni cellulari presenti nel BAL mediante un confronto tra vetrini di animali controllo e vetrini di animali infiammati. Nei vetrini di animali controllo si osserva la presenza solo della popolazione macrofagica, mentre nei vetrini di animali infiammati osserviamo un marcato aumento della popolazione neutrofilica, segno evidente di un'intensa inflammation causata dall'esposizione al fumo di sigaretta (**Fig. 11**).

A)



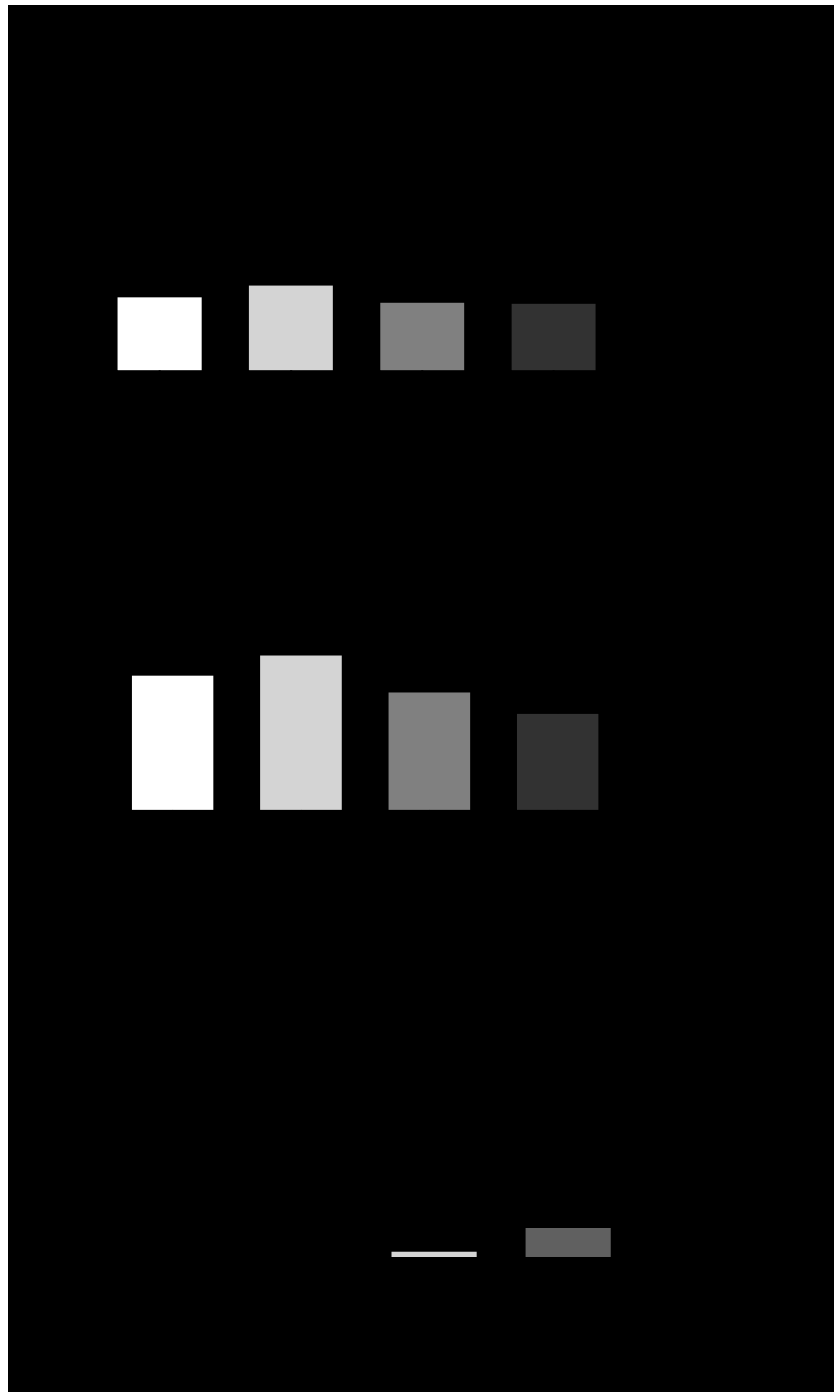
B)



**Figura 11:** A) vetrino al cytospin di un'animale controllo; B) vetrino al cytospin di un'animale esposto al fumo di sigaretta. I vetrini sono stati colorati con il kit MGG Quick Stain (Bio-Optica). Ingrandimento 400x.



Negli esperimenti in cui i topi C57BL7/6J sono stati esposti al fumo di 5, 7, 10, 15 sigarette al giorno per 4 giorni, è stato osservato un aumento statisticamente significativo del numero totale di cellule nel BAL nei topi esposti al fumo di 15 sigarette al giorno, mentre nei topi esposti al fumo di 5, 7, 10 sigarette al giorno è stato osservato un numero totale di cellule paragonabile a quello ottenuto da topi non esposti al fumo (controllo:  $2,02 \pm 0,25 \times 10^5$  cellule/ml; fumo 5 sigarette:  $2,32 \pm 0,39 \times 10^5$  cellule/ml; fumo 7 sigarette:  $1,87 \pm 0,38 \times 10^5$  cellule/ml; fumo 10 sigarette:  $1,84 \pm 0,34 \times 10^5$  cellule/ml; fumo 15 sigarette:  $4,78 \pm 0,57 \times 10^5$  cellule/ml; **Fig.12A**). Non sono stati osservati cambiamenti significativi nel numero di macrofagi dopo l'esposizione al fumo di sigaretta in nessuna delle condizioni testate (controllo:  $2,00 \pm 0,24 \times 10^5$  cellule/ml; fumo 5 sigarette:  $2,30 \pm 0,39 \times 10^5$  cellule/ml; fumo 7 sigarette:  $1,76 \pm 0,34 \times 10^5$  cellule/ml; fumo 10 sigarette:  $1,45 \pm 0,33 \times 10^5$  cellule/ml; fumo 15 sigarette:  $2,66 \pm 0,48 \times 10^5$  cellule/ml; **Fig.12B**). Al contrario è stato osservato un incremento dose-dipendente nel numero di neutrofili, il cui picco massimo è stato raggiunto nei topi esposti al fumo di 15 sigarette al giorno (controllo:  $0,015 \pm 0,012 \times 10^5$  cellule/ml; fumo 5 sigarette:  $0,022 \pm 0,006 \times 10^5$  cellule/ml; fumo 7 sigarette:  $0,12 \pm 0,05 \times 10^5$  cellule/ml; fumo 10 sigarette:  $0,40 \pm 0,11 \times 10^5$  cellule/ml  $p < 0,05$  vs controllo; fumo 15 sigarette:  $2,10 \pm 0,65 \times 10^5$  cellule/ml  $p < 0,01$  vs controllo; **Fig. 12C**).



**Figura 12: Effetto dose risposta del fumo di sigaretta sulla cellularità nel BAL dei topi C57BL/6J.** A) cellule totali; B) macrofagi; C) neutrofili. Gli animali sono stati esposti per 4 giorni consecutivi al fumo di 5, 7, 10, 15 sigarette e sacrificati 24 ore dopo l'ultima esposizione al fumo di sigaretta. I dati sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard della media. La significatività (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , test di

comparazione Bonferroni) è stata determinata verso il gruppo controllo esposto all'aria. Viene mostrato l'insieme dei dati ottenuti da tre esperimenti indipendenti.

Segni di sofferenza (debolezza, brividi) sono stati osservati nei topi esposti al fumo di 15 sigarette ma non nei topi esposti a dose più basse di fumo. Per questo motivo la quantità giornaliera di sigarette scelta per gli studi successivi è stata fissata a 10.

Nel nostro modello i topi esposti al fumo di 10 sigarette al giorno hanno mostrato un incremento significativo dei livelli delle citochine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 p40, G-CSF, e GM-CSF, e dei livelli delle chemochine KC, MCP-1 e MIP-1 $\beta$  nel BAL. Alla dose di 10 sigarette è stato osservato un consistente aumento (circa 15 volte rispetto ai controlli) delle citochine G-CSF e KC, mentre un aumento di circa 5 volte rispetto ai controlli si è osservato per la citochina GM-CSF. Un aumento più moderato (circa 2-3 volte rispetto ai controlli) è stato osservato sui livelli delle citochine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 p40 e delle chemochine MCP-1 e MIP-1 $\beta$ . Non si sono osservati cambiamenti significativi nei livelli degli altri mediatori analizzati (**Fig. 13**).

	ARIA	5 sigarette	10 sigarette
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	12,1 $\pm$ 3,4	19,3 $\pm$ 2,3	32,2 $\pm$ 4,5 (**)
IL-6 (pg/ml)	15,1 $\pm$ 3,3	19,6 $\pm$ 1,8	31,8 $\pm$ 7,1 (*)
IL-12 p40 (pg/ml)	37,3 $\pm$ 4,3	58,1 $\pm$ 4,4	128,6 $\pm$ 12,0 (**)
G-CSF (pg/ml)	3,5 $\pm$ 0,4	11,0 $\pm$ 1,0	55,3 $\pm$ 0,2 (**)
GM-CSF (pg/ml)	23,4 $\pm$ 7,3	37,1 $\pm$ 7,0	132,2 $\pm$ 12,5 (**)
KC (pg/ml)	264,1 $\pm$ 45,8	1424 $\pm$ 397,3	4537 $\pm$ 1378 (**)
MCP-1 (pg/ml)	114,1 $\pm$ 20,7	133,7 $\pm$ 11,7	187,7 $\pm$ 9,6 (**)
MIP-1 $\beta$ (pg/ml)	13,9 $\pm$ 3,5	16,4 $\pm$ 3,5	32,3 $\pm$ 6,3 (*)

**Figura 13: Dose-risposta dei livelli di citochine e chemochine indotte dal fumo di sigaretta nel BAL.** IL-1 $\beta$ ; IL-6; IL-12 p40; G-CSF; GM-CSF; KC; MCP-1; MIP-1 $\beta$ . I topi C57BL/6J sono stati esposti per 4 giorni consecutivi al fumo di 5 o 10 sigarette e sacrificati 24 ore dopo l'ultima esposizione al fumo di sigaretta. I mediatori pro-infiammatori nel BAL sono stati misurati con il dosaggio Bio-Plex. I dati sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard della media. La significatività (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , è stato usato il test di comparazione Bonferroni tranne per i dati di IL-6 ai quali è stata applicata l'analisi Tukey) è stata determinata verso il gruppo controllo esposto ad aria. Viene mostrato l'insieme dei dati ottenuti da tre esperimenti indipendenti.

## **b) Valutazione dei livelli di Lipidi Idroperossidi (LPO) dopo esposizione al fumo di sigaretta**

Il fumo di sigaretta è una miscela complessa data da numerosi composti chimici, in cui sono presenti, in alte concentrazioni, radicali liberi e altri ossidanti. L'esposizione al fumo di sigaretta induce inoltre il rilascio di radicali dell'ossigeno da parte delle cellule infiammatorie che contribuisce all'aumento dello stress ossidativo (Mac Nee, 2000). In particolare, il principale bersaglio per l'attacco dei ROS è rappresentato

dai grassi polinsaturi e dagli acidi grassi delle membrane cellulari, con l'instaurazione di un processo di perossidazione lipidica che porta alla formazione di perossidi e aldeidi. Nel nostro studio abbiamo utilizzato i livelli polmonari dei Lipidi Idroperossidi (LPO) come misura indiretta dello stress ossidativo. Abbiamo osservato che l'esposizione al fumo di 10 sigarette per 4 giorni consecutivi, nei topi C57BL7/6J, induce un aumento dei livelli di LPO di circa 2 volte ( controllo:  $26,76 \pm 12,70 \times 10^5$  cellule/ml; fumo:  $68,06 \pm 17,69 \times 10^5$  cellule/ml) rispetto ai controlli (**Fig. 14**).

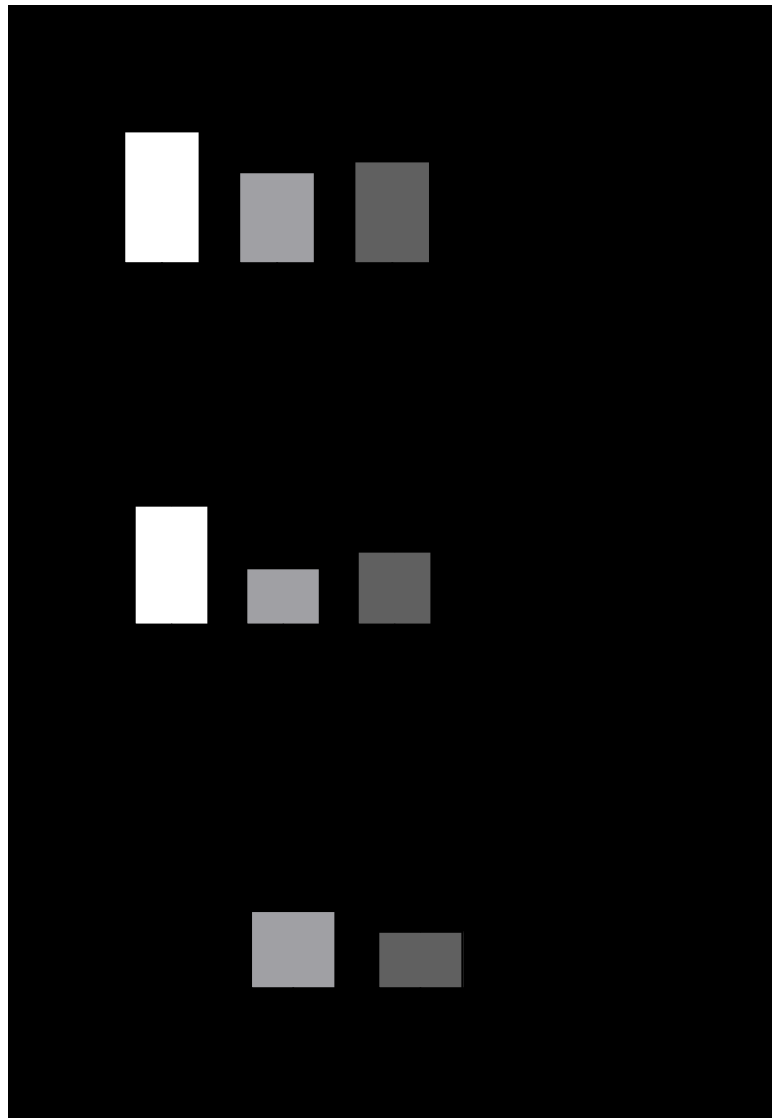


**Figura 14: Livelli di LPO e modulazione dello stress ossidativo dopo esposizione al fumo di sigaretta.** Contenuto di LPO nel tessuto polmonare. I topi C57BL/6J sono stati esposti per 4 giorni consecutivi al fumo di 10 sigarette al giorno e sacrificati 24 ore dopo l'ultima esposizione al fumo di sigaretta per il dosaggio dei LPO. Vengono mostrati i dati preliminari di un esperimento.

## 2) Studi d'intervento farmacologico nel modello di infiammazione polmonare indotta da fumo di sigaretta

### a) Trattamento con budesonide per os

Il trattamento orale dei topi C57BL7/6J con budesonide 0,3 e 3 mg/Kg un'ora prima dell'esposizione al fumo di sigaretta non ha indotto variazioni significative nel numero di cellule totali (controllo:  $3,58 \pm 0,55 \times 10^5$  cellule/ml; fumo:  $2,48 \pm 0,2 \times 10^5$  cellule/ml; budesonide 0,3 mg/Kg:  $2,77 \pm 0,26 \times 10^5$  cellule/ml; budesonide 3 mg/Kg:  $2,68 \pm 0,23 \times 10^5$  cellule/ml, **Fig.15A**), di macrofagi (controllo:  $3,58 \pm 0,55 \times 10^5$  cellule/ml,  $p < 0,05$  vs fumo; fumo:  $1,70 \pm 0,31 \times 10^5$  cellule/ml; budesonide 0,3 mg/Kg:  $2,2 \pm 0,30 \times 10^5$  cellule/ml; budesonide 3 mg/Kg:  $2,07 \pm 0,31 \times 10^5$  cellule/ml, **Fig.15B**) e di neutrofili (controllo:  $0,0 \pm 0,0 \times 10^5$  cellule/ml,  $p < 0,01$  vs fumo; fumo:  $0,77 \pm 0,191 \times 10^5$  cellule/ml; budesonide 0,3 mg/Kg:  $0,57 \pm 0,15 \times 10^5$  cellule/ml; budesonide 3 mg/Kg:  $0,61 \pm 0,15 \times 10^5$  cellule/ml, **Fig.15C**) nel BAL, rispetto ai topi trattati con solo veicolo. Non sono state osservate variazioni anche sui livelli delle citochine (IL-1 $\beta$ , Il-12 p40, IL-1 $\alpha$ , IL-6, G-CSF, GM-CSF, KC, MCP-1) nel BAL (**Fig. 16**).



**Figura 16: Effetti del trattamento con budesonide ( 0,3 - 3 mg/Kg) sul reclutamento delle cellule infiammatorie nel BAL indotto dal fumo di sigaretta.** A) cellule totali; B) macrofagi; C) neutrofili. Gli animali sono stati esposti per 4 giorni consecutivi al fumo di 10 sigarette al giorno e sacrificati 24 ore dopo l'ultima esposizione per la raccolta del BAL. La budesonide o il veicolo (metilcellulosa 1%/ PEG400, 95/5) sono stati somministrati oralmente una volta al giorno per 4 giorni consecutivi, un'ora prima l'esposizione al fumo di sigaretta. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard della media. La significatività (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , test di comparazione Bonferroni) è stata determinata verso il gruppo controllo esposto al fumo di sigaretta. Viene mostrato l'insieme dei dati ottenuti da due esperimenti indipendenti.

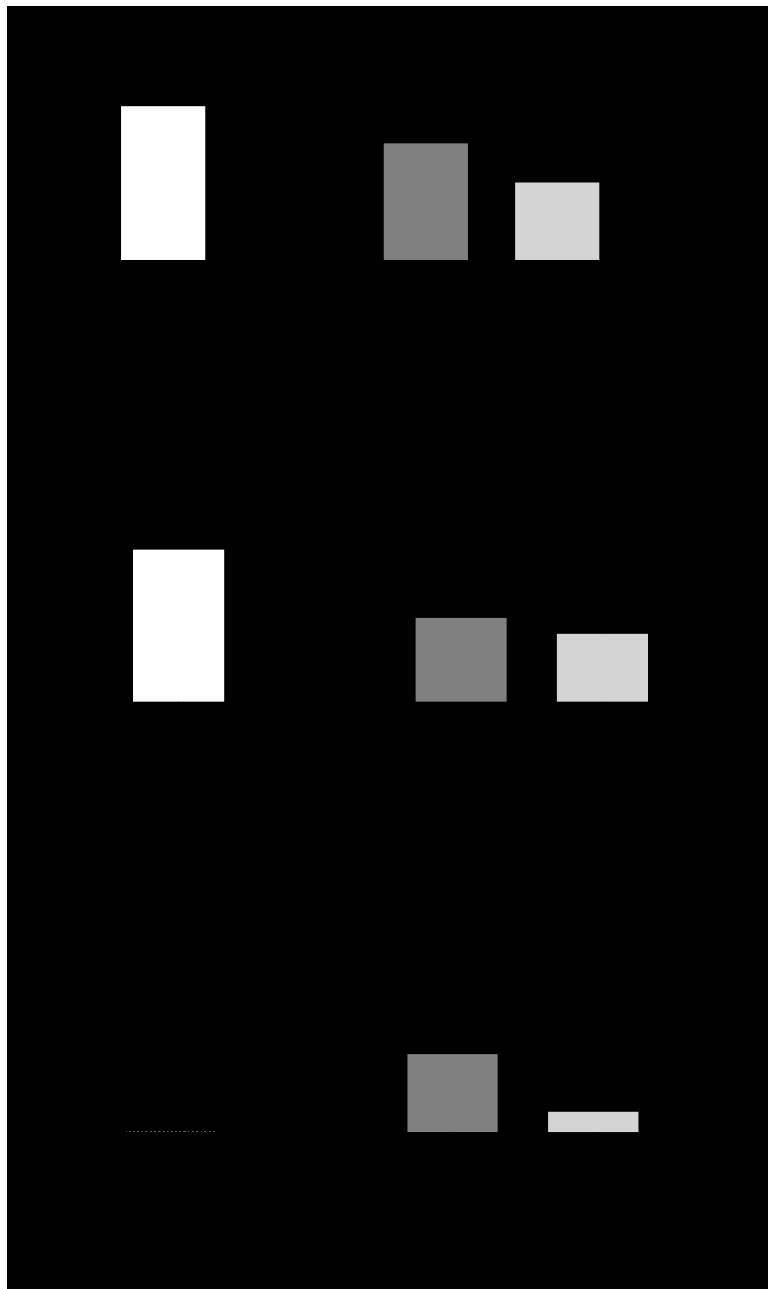
	CTR	FUMO	BUDESONIDE 0.3 mg/Kg	BUDESONIDE 3 mg/Kg
<b>IL-1b (pg/ml)</b>	33,2 ± 11,02	114,9 ± 17,4	126,0 ± 23,7	84,4 ± 15,8
<b>IL-12 p40 (pg/ml)</b>	117,7 ± 22,7	350,2 ± 43,7	369,1 ± 62,2	265,0 ± 35,25
<b>IL-1a (pg/ml)</b>	67,9 ± 9,5	89,2 ± 8,2	104,8 ± 5,7	82,61 ± 11,32
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	13,21 ± 4,7	36,20 ± 8,1	223,0 ± 4,2	31,3 ± 6,3
<b>G-CSF (pg/ml)</b>	76,9 ± 7,3	223,0 ± 41,2	199,9 ± 16,4	168,7 ± 20,2
<b>GM-CSF (pg/ml)</b>	84,7 ± 48,5	274,5 ± 33,0	306,4 ± 34,2	381,3 ± 68,06
<b>KC (pg/ml)</b>	323,4 ± 73,7	1554 ± 50,7	1618 ± 122,9	1481 ± 159,8
<b>MCP-1 (pg/ml)</b>	541,4 ± 100,5	624,2 ± 92,6	803,2 ± 76,7	769,6 ± 118,4

**Figura 16: Effetti del trattamento con budesonide (0,3 -3 mg/Kg) sui livelli di citochine e chemochine nel BAL indotti dal fumo di sigaretta.** IL-1 $\beta$ ; IL-12 p40; IL-1 $\alpha$ ; IL-6; GM-CSF; G-CSF; KC; MCP-1. Gli animali sono stati esposti per 4 giorni consecutivi al fumo di 10 sigarette al giorno e sacrificati 24 ore dopo l'ultima esposizione al fumo di sigaretta per la raccolta del BAL. La budesonide o il veicolo (metilcellulosa 1%/ PEG400, 95/5) sono stati somministrati oralmente una volta al giorno per 4 giorni consecutivi, un'ora prima l'esposizione al fumo di sigaretta. I mediatori pro-infiammatori nel BAL sono stati misurati con il dosaggio Bio-Plex. I dati sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard della media. La significatività (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , analisi della varianza ad una via, seguita dal test di comparazione di Dunnett) è stata determinata verso il gruppo controllo esposto al fumo di sigaretta. Viene mostrato l'insieme dei dati ottenuti da due esperimenti indipendenti.

Abbiamo voluto verificare la potenziale efficacia del trattamento orale con budesonide alle dosi utilizzate nel test del fumo in un modello d'infiammazione delle vie aeree ben conosciuto, il modello di neutrofilia da LPS. Contrariamente a quanto osservato nel modello del fumo di sigaretta, la neutrofilia nel modello di LPS risulta essere sensibile alla



budesonide in maniera dose dipendente. Infatti, abbiamo osservato una modesta riduzione dose-dipendente, indotta dal trattamento con budesonide (0,3-3 mg/Kg), nel numero di cellule totali e di macrofagi, e una marcata riduzione del numero di neutrofili (controllo:  $0,025 \pm 0,025 \times 10^5$  cellule/ml  $p < 0,05$  vs fumo; fumo:  $0,86 \pm 0,21 \times 10^5$  cellule/ml; budesonide 0,3 mg/Kg:  $0,57 \pm 0,29 \times 10^5$  cellule/ml, percentuale inibizione:  $30,61 \pm 36,99$  %; budesonide 3 mg/Kg:  $0,16 \pm 0,02 \times 10^5$  cellule/ml, percentuale inibizione  $78,68 \pm 2,87$  %) nel BAL (**Fig. 17**).

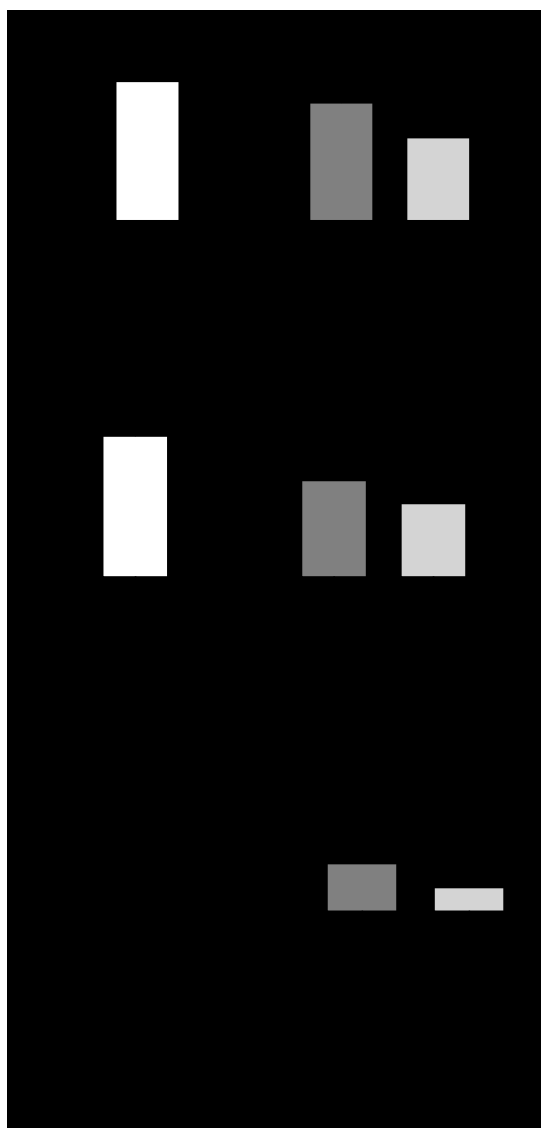


**Figura 17: Effetto dose-risposta della budesonide ( 0,3 - 3 mg/Kg) sul reclutamento delle cellule infiammatorie nel BAL indotto da LPS. A) cellule totali; B) macrofagi; C) neutrofili. Gli animali sono stati esposti all'aerosol di salina o alla soluzione di LPS (100 µg/ml in salina) per 40 minuti e sacrificati 24 ore dopo per la raccolta del BAL. La budesonide o il veicolo ( metilcellulosa 1%/ PEG400, 95/5) sono stati somministrati oralmente un'ora prima dell'esposizione a LPS. I dati sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard della media. La significatività (\*)**

p<0,05, analisi della varianza ad una via, seguita dal test di comparazione Dunnett) è stata determinata verso il gruppo controllo esposto al fumo di sigaretta.

## **b) Trattamento con roflumilast per os**

Il trattamento orale dei topi C57BL7/6J con roflumilast (1 e 5 mg/Kg) un'ora prima dell'esposizione al fumo di sigaretta ha indotto un'inibizione dose-dipendente sulla neutrofilia nel BAL (controllo:  $0,0 \pm 0,0 \times 10^5$  cellule/ml; fumo:  $0,91 \pm 0,20 \times 10^5$  cellule/ml; roflumilast 1 mg/Kg:  $0,44 \pm 0,09 \times 10^5$  cellule/ml, percentuale inibizione:  $49,53 \pm 11,30\%$ , p<0,05 vs fumo; roflumilast 5 mg/Kg:  $0,22 \pm 0,07 \times 10^5$  cellule/ml, percentuale inibizione  $80,42 \pm 5,6\%$ , p<0,01 vs fumo; **Fig.18C**), senza variazioni significative sul numero di cellule totali (controllo:  $2,99 \pm 0,40 \times 10^5$  cellule/ml; fumo:  $2,72 \pm 0,28 \times 10^5$  cellule/ml; roflumilast 1 mg/Kg:  $2,53 \pm 0,29 \times 10^5$  cellule/ml; roflumilast 5 mg/Kg:  $1,79 \pm 0,25 \times 10^5$  cellule/ml; **Fig.18A**) e di macrofagi nel BAL (controllo:  $2,99 \pm 0,40 \times 10^5$  cellule/ml; fumo:  $1,81 \pm 0,31 \times 10^5$  cellule/ml; roflumilast 1 mg/Kg:  $2,05 \pm 0,32 \times 10^5$  cellule/ml; roflumilast 5 mg/Kg:  $1,57 \pm 0,23 \times 10^5$  cellule/ml; **Fig.18B**).

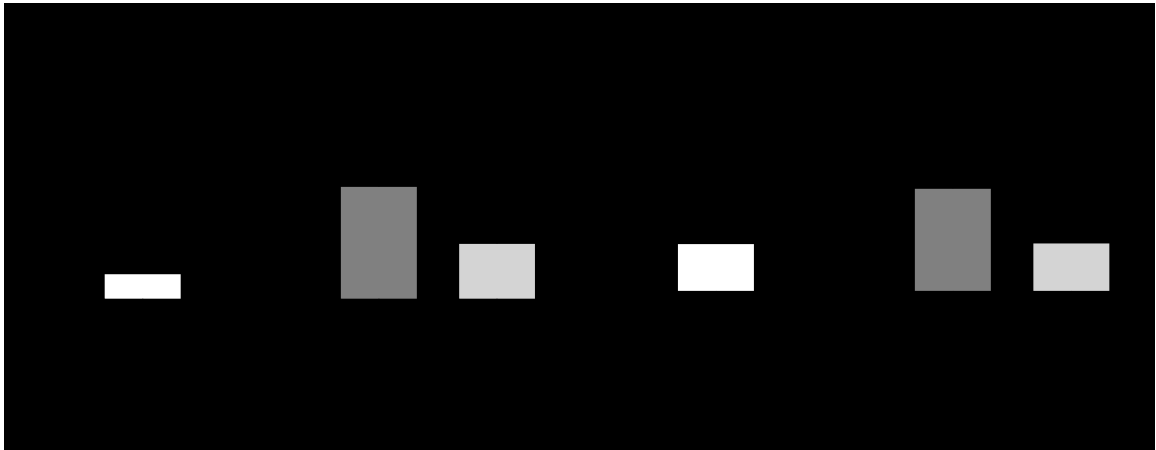


**Figura 18: Effetto dose -risposta di roflumilast ( 1 - 5 mg/Kg) sul reclutamento delle cellule infiammatorie nel BAL indotto dal fumo di sigaretta.** A) cellule totali; B) macrofagi; C) neutrofili. Gli animali sono stati esposti per 4 giorni consecutivi al fumo di 10 sigarette al giorno e sacrificati 24 ore dopo l'ultima esposizione per la raccolta del BAL. roflumilast o il veicolo (metilcellulosa 1%/PEG400, 95/5) sono stati somministrati oralmente una volta al giorno per 4 giorni consecutivi, un'ora prima l'esposizione al fumo di sigaretta. I dati sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard della media. La significatività (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , test di comparazione Bonferroni) è stata determinata verso il gruppo esposto al fumo di sigaretta. Viene mostrato l'insieme dei dati ottenuti da due esperimenti indipendenti.

Roflumilast alla dose di 5 mg/Kg ha indotto una riduzione significativa sui livelli delle citochine IL-1 $\beta$  (fumo: 125,2 $\pm$ 12,54 pg/ml; roflumilast 1 mg/Kg: 101.4  $\pm$ 15.14 pg/ml, percentuale inibizione 23,8 $\pm$ 17,78 %; roflumilast 5 mg/Kg: 51,02 $\pm$ 6,47 pg/ml, percentuale inibizione 75,77 $\pm$ 7,52 %, p<0,01 vs fumo) e IL-12 p40 (fumo: 390,0 $\pm$ 41,03 pg/ml; roflumilast 1 mg/Kg: 300,2  $\pm$ 21,13 pg/ml, percentuale inibizione 34,78 $\pm$ 8,18 %; roflumilast 5 mg/Kg: 143,6 $\pm$ 20,27 pg/ml, percentuale inibizione 95,42 $\pm$ 7,85 %, p<0,01 vs fumo), mentre non induce variazioni significative sui livelli delle citochine IL-6, G-CSF, GM-CSF, KC, MCP-1e MIP-1b nel BAL ( **Fig. 19**).

A)

	CTR	FUMO	ROFLUMILAST 1 mg/Kg	ROFLUMILAST 5 mg/Kg
<b>IL-1a (pg/ml)</b>	42,03 $\pm$ 13,7	121,6 $\pm$ 7,8	103,4 $\pm$ 14,9	100,5 $\pm$ 7,3
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	13,8 $\pm$ 6,9	60,0 $\pm$ 15,3	41,8 $\pm$ 3,3	46,2 $\pm$ 5,1
<b>G-CSF(pg/ml)</b>	66,4 $\pm$ 19,0	332,2 $\pm$ 72,1	274,2 $\pm$ 26,6	303,3 $\pm$ 33,2
<b>GM-CSF (pg/ml)</b>	42,8 $\pm$ 28,7	351,4 $\pm$ 42,1	282,8 $\pm$ 32,2	242,7 $\pm$ 23,4
<b>KC (pg/ml)</b>	434,6 $\pm$ 108,0	2361 $\pm$ 308,6	2064 $\pm$ 217,6	2491 $\pm$ 239,2
<b>MCP-1 (pg/ml)</b>	374,6 $\pm$ 110,0	1021 $\pm$ 118,2	775,0 $\pm$ 96,6	556,7 $\pm$ 40,9 (**)
<b>MIP-1<math>\beta</math> (pg/ml)</b>	51,8 $\pm$ 14,7	123,6 $\pm$ 9,3	81,1 $\pm$ 11,6	69,8 $\pm$ 9,1(*)
<b>IL-1b (pg/ml)</b>	42,75 $\pm$ 25,86 (**)	125,2 $\pm$ 12,54	101.4 $\pm$ 15.14	51,02 $\pm$ 6,47 (**)
<b>IL-12 p40 (pg/ml)</b>	141,3 $\pm$ 25,80 (**)	390,0 $\pm$ 41,03	300,2 $\pm$ 21,13	143,6 $\pm$ 20,27 (**)

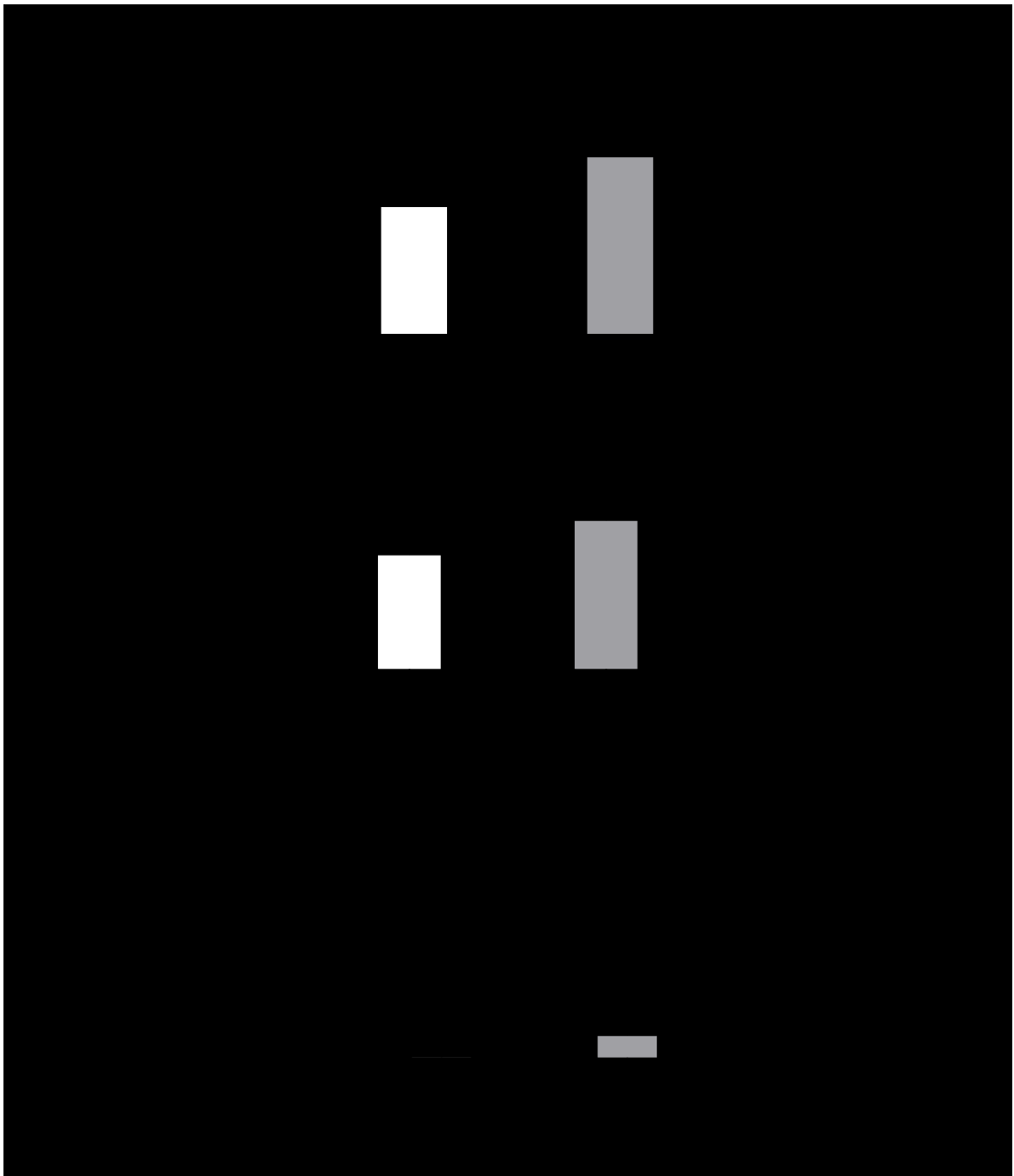


**Figura 19: Effetto dose risposta di roflumilast (1 - 5 mg/Kg) sui livelli di citochine e chemochine nel BAL indotti dal fumo di sigaretta.** A) IL-1a; IL-6; GM-CSF; G-CSF; KC; MCP-1; MIP-1b; B) IL-1 $\beta$ ; C) IL-12 p40;. Gli animali sono stati esposti per 4 giorni consecutivi al fumo di 10 sigarette al giorno e sacrificati 24 ore dopo l'ultima esposizione al fumo di sigaretta per la raccolta del BAL. Roflumilast o il veicolo (metilcellulosa 1%/ PEG400, 95/5) sono stati somministrati oralmente una volta al giorno per 4 giorni consecutivi, un'ora prima l'esposizione al fumo di sigaretta. I mediatori pro-infiammatori nel BAL sono stati misurati con il dosaggio Bio-Plex. I dati sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard della media. La significatività (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , analisi della varianza ad una via, seguita dal test di comparazione Dunnet) è stata determinata verso il gruppo controllo esposto al fumo di sigaretta. Viene mostrato l'insieme dei dati ottenuti da due esperimenti indipendenti.

### c) **Trattamento con GSK256066 (PDE4 inibitore inalatorio)**

Il trattamento con GSK256066 (10 mM), per via inalatoria, ogni giorno un'ora prima dell'esposizione al fumo di sigaretta, ha contrastato in maniera significativa la neutrofilia nel BAL (controllo:  $0,0 \pm 0,0 \times 10^5$  cellule/ml; fumo:  $0,10 \pm 0,09 \times 10^5$  cellule/ml; GSK256066 10 mM :  $0,44 \pm 0,03 \times 10^5$  cellule/ml, percentuale inibizione:  $85,23 \pm 4,76$ ,  $p < 0,01$  vs fumo; **Fig.20C**), senza variazioni significative nel numero di cellule totali (controllo:  $3,33 \pm 0,67 \times 10^5$  cellule/ml; fumo:  $4,5 \pm 0,54 \times 10^5$  cellule/ml; GSK256066 10 mM :  $4,62 \pm 0,78 \times 10^5$  cellule/ml; **Fig.20A**) e di macrofagi nel BAL (controllo:  $3,32 \pm 0,67 \times 10^5$  cellule/ml; fumo:  $3,68 \pm 0,58 \times 10^5$  cellule/ml; GSK256066 10 mM :  $4,31 \pm 0,82 \times 10^5$  cellule/ml; **Fig.20B**).

L'analisi dei livelli polmonari di GSK256066 effettuata tramite sistema LC-MS-MS dal Dipartimento di Farmacocinetica e Metabolismo di Chiesi Farmaceutici ha evidenziato come quantitativi limitati di composto ( $4.04 \pm 1.96$  nmol/g) fossero effettivamente presenti nel polmone dopo singola esposizione dell'animale all'aerosol.



**Figura 20: Effetto di GSK256066 (10 mM) somministrato per via aerosolica sul reclutamento delle cellule infiammatorie nel BAL indotto dal fumo di sigaretta.** A) cellule totali; B) macrofagi; C) neutrofili. Gli animali sono stati esposti per 4 giorni consecutivi al fumo di 10 sigarette al giorno e sacrificati 24 ore dopo l'ultima

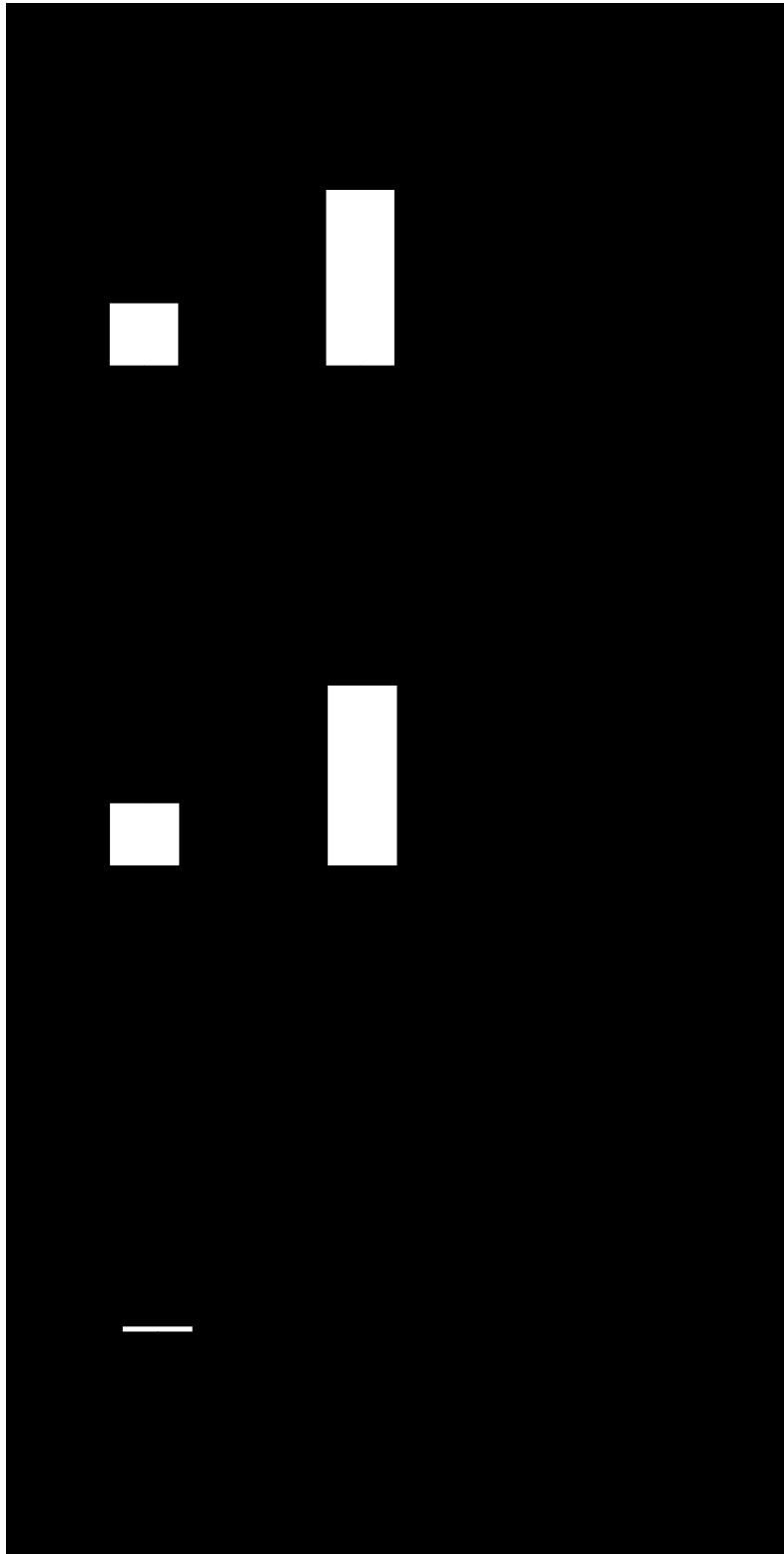


esposizione per la raccolta del BAL. GSK256066 o il veicolo (NaCl 0,9%, Polisorbato 0,2 % e Sorbitan Monolaurato 0,1 %) sono stati somministrati, per via inalatoria, un'ora prima dell'esposizione al fumo di sigaretta. I dati sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard della media. La significatività (\*\*  $p < 0,01$ , analisi della varianza ad una via, seguita dal test di comparazione Dunnet) è stata determinata verso il gruppo esposto al fumo di sigaretta. Viene mostrato l'insieme dei dati ottenuti da due esperimenti indipendenti.

#### **d) Effetto dell'inibizione costitutiva**

Il reclutamento di neutrofili determinato dall'esposizione al fumo di sigaretta nelle vie aeree di topi aventi una delezione genica dell'isoforma gamma di PI3K (kinase-dead) è risultato significativamente inferiore rispetto a quello riscontrato nei topi wild-type (Wild type aria:  $0,0 \pm 0,0 \times 10^5$  cellule/ml; Wild type fumo:  $0,83 \pm 0,18 \times 10^5$  cellule/ml; PI3K kinase dead aria:  $0,0 \pm 0,0 \times 10^5$  cellule/ml; PI3K kinase dead fumo:  $0,12 \pm 0,05 \times 10^5$  cellule/ml; **Fig. 21C**) .

Non si sono osservate variazioni significative sul numero di cellule totali (Wild type aria:  $2,20 \pm 0,21 \times 10^5$  cellule/ml; Wild type fumo:  $5,45 \pm 1,03 \times 10^5$  cellule/ml; PI3K kinase dead aria:  $6,00 \pm 2,33 \times 10^5$  cellule/ml; PI3K kinase dead fumo:  $3,03 \pm 0,05 \times 10^5$  cellule/ml; **Fig.21A**) e di macrofagi nel BAL (Wild type aria:  $2,15 \pm 0,20 \times 10^5$  cellule/ml; Wild type fumo:  $4,63 \pm 0,95 \times 10^5$  cellule/ml; PI3K kinase dead aria:  $6,0 \pm 2,33 \times 10^5$  cellule/ml; PI3K kinase dead fumo:  $2,91 \pm 0,41 \times 10^5$  cellule/ml; **Fig.21B**).



**Figura 21: Effetto del fumo di sigaretta sul reclutamento di cellule infiammatorie nel BAL in topi C57Bl/6J wild-type e in topi PI3K $\alpha$  kinase-dead.**

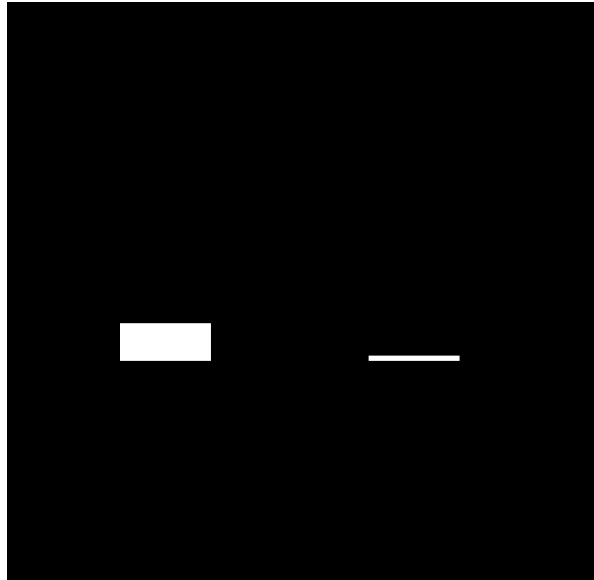
Gli animali sono stati esposti per 4 giorni consecutivi al fumo di 10 sigarette e sacrificati 24 ore dopo l'ultima esposizione al fumo di sigaretta. I dati sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard della media. La significatività (\*\* p<0,01, test di comparazione Bonferroni) è stata determinata verso il gruppo controllo esposto all'aria. Viene mostrato l'insieme dei dati ottenuti da due esperimenti indipendenti.

Nel BAL dei topi PI3K $\alpha$  kinase-dead è stata osservata una riduzione significativa dei livelli della citochina IL-12 p40, rispetto ai topi wild-type (Wild type aria: 53,74 $\pm$ 1,5 pg/ml; Wild type fumo: 303,1 $\pm$ 60,31pg/ml; PI3K kinase dead aria: 11,61 $\pm$ 0,0 pg/ml; PI3K kinase dead fumo: 18,53 $\pm$ 2,36 pg/ml, **Fig.22B**), senza variazioni significative sui livelli delle citochine IL-6, G-CSF, GM-CSF, KC e IL-9 indotte dal fumo di sigaretta (**Fig.22A**).

A)

	Wild type aria	Wild type fumo	PI3K $\alpha$ kinase dead aria	PI3K $\alpha$ kinase dead fumo
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	8,73 $\pm$ 3,86	6,44 $\pm$ 2,12	0,03 $\pm$ 0,0	4,11 $\pm$ 2,1
<b>GM-CSF(pg/ml)</b>	19,63 $\pm$ 0,0	16,66 $\pm$ 2,97	19,63 $\pm$ 0,0	37,10 $\pm$ 10,82
<b>G-CSF (pg/ml)</b>	7,23 $\pm$ 5,3	49,41 $\pm$ 7,69	9,74 $\pm$ 0,0	69,72 $\pm$ 13,21
<b>KC (pg/ml)</b>	73,12 $\pm$ 0,0	561,4 $\pm$ 119,8	73,12 $\pm$ 0,0	1945 $\pm$ 366,1
<b>IL-9 (pg/ml)</b>	160,1 $\pm$ 0,0	160,1 $\pm$ 0,0	160,1 $\pm$ 0,0	99,64 $\pm$ 22,79
<b>IL-12 p40 (pg/ml)</b>	53,74 $\pm$ 1,5	303,1 $\pm$ 60,3	11,61 $\pm$ 0,0	18,53 $\pm$ 2,36 (**)

**B)**



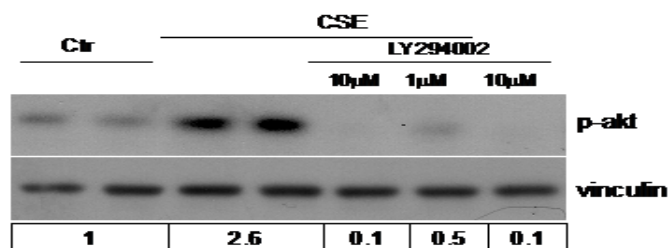
**Figura 22 : Effetto del fumo di sigaretta sui livelli di citochine e chemochine nel BAL in topi C57Bl/6J wild-type e in topi PI3k kinase-dead. A) IL-6; GM-CSF; G-CSF; KC; IL-9 B) IL-12 p40.** Gli animali sono stati esposti per 4 giorni consecutivi al fumo di 10 sigarette al giorno e sacrificati 24 ore dopo l'ultima esposizione al fumo di sigaretta per la raccolta del BAL. I mediatori pro-infiammatori nel BAL sono stati misurati con il dosaggio Bio-Plex. I dati sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard della media. La significatività (\*\*  $p < 0,01$ , test di comparazione di t Student) è stata determinata verso il gruppo controllo esposto al fumo di sigaretta. Viene mostrato l'insieme dei dati ottenuti da due esperimenti indipendenti

## a) Effetto d'inibitori di PI3Kδ in modelli di corticosteroido-resistenza indotta da stress ossidativo

### a) Effetti del trattamento con inibitori delle PI3Ks in modelli di stress ossidativo in vitro

Per dimostrare che lo stress ossidativo induce l'attivazione di PI3K, una linea di cellule muscolari lisce di bronco umane (ASMC) sono state stimulate con un estratto acquoso di fumo di sigaretta (CSE), pretrattate con un inibitore non selettivo di PI3K (LY294002) a diverse concentrazioni (1-10 μM) ed è stata fatta una valutazione della fosforilazione di Akt, come misura di attivazione di PI3K.

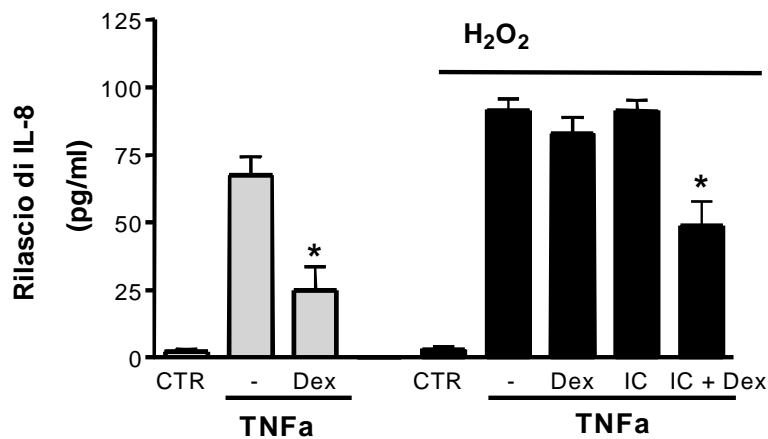
Il CSE induce una fosforilazione di Akt, che viene abolita dal pretrattamento con LY294002 (**Fig. 23**).



**Figura 23: Effetti del trattamento con LY294002 (1- 10  $\mu$ M) sulla fosforilazione di Akt indotta da un'estratto acquoso di fumo di sigaretta (CSE).** Le cellule BSMC sono state stimulate con CSE e pretrattate con LY294002 (1-10  $\mu$ M). Gli estratti cellulari sono stati sottoposti ad analisi di western blotting. Sotto ogni lane sono stati riportati i valori di densitometria quantitativa.

In esperimenti successivi, le cellule muscolari lisce di bronco umane sono state stimulate con TNF-alfa da solo o dopo pre-trattamento con perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ), per valutare l'impatto dello stress ossidativo sulla produzione di mediatori pro-infiammatori e sull'efficacia antiinfiammatoria dei glucocorticoidi.

É stato osservato che la stimolazione delle cellule ASMC con TNF-alfa da solo incrementa il rilascio d'interleuchina-8 (IL-8) che viene ridotta in modo significativo dal trattamento con il corticosteroide dexametasone. Al contrario, il pre-trattamento delle stesse cellule con  $H_2O_2$  determina un'insensibilità ai corticosteroidi. La responsività del sistema all'effetto antinfiammatorio dello steroide viene ripristinata associando un inibitore PI3Kdelta (IC87114) allo steroide (**Fig.24**).



**Figura 24: Effetti del trattamento con IC87114 e Dexametasone sul rilascio di interleuchina-8 (IL-8) indotto TNF-alfa in presenza di stress ossidativo.** La raccolta del surnatante e la misura del rilascio di IL-8 sono stati effettuati 4 ore dopo la stimolazione con TNF- $\alpha$ . I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard della media. La significatività (\*  $p < 0,05$ , analisi della varianza a una via, seguita dal test di comparazione Dunnet) è stata determinata verso il gruppo controllo stimolato solo con TNF- $\alpha$ .

**b) Effetti del trattamento combinato con IC87114 e budesonide nel modello corticosteroido resistente di esposizione acuta al fumo di sigaretta nel topo**

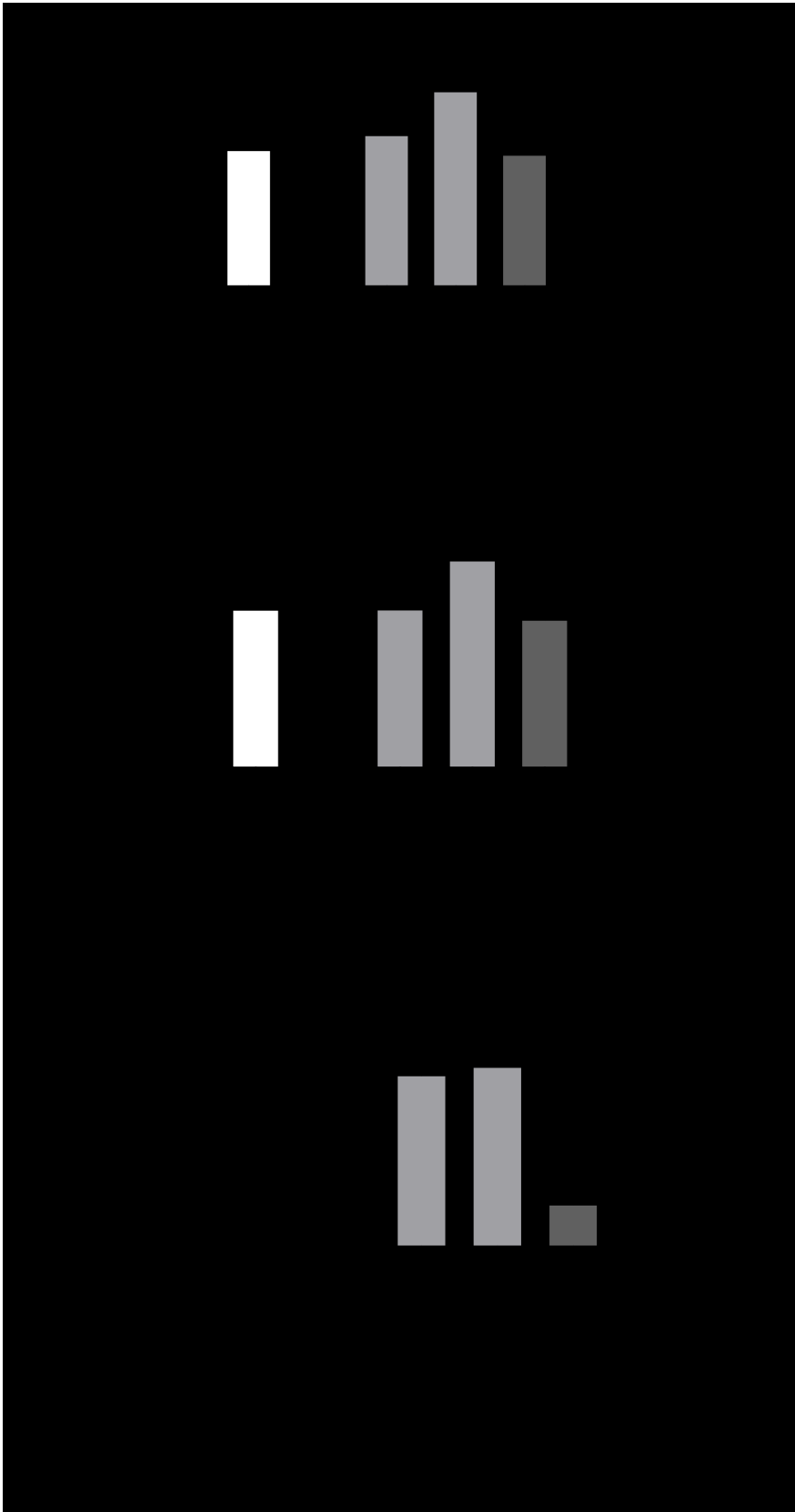
Il trattamento combinato dei topi C57BL/6J con il corticosteroide budesonide (1.5 mg/Kg) e con l'inibitore di PI3K $\delta$ , IC87114 (20mg/Kg), ha contrastato in modo significativo la neutrofilia nel BAL (controllo:  $0,0 \pm 0,0 \times 10^5$  cellule/ml; fumo:  $0,28 \pm 0,06 \times 10^5$  cellule/ml; IC87114 20 mg/Kg:  $0,45 \pm 0,11 \times 10^5$  cellule/ml; budesonide 1,5 mg/Kg:

$5,86\pm 0,72 \times 10^5$  cellule/ml; budesonide 1,5 mg/Kg+ IC87114 20 mg/Kg:  $0,11\pm 0,03 \times 10^5$  cellule/ml, percentuale inibizione:  $47,11\pm 15,49$ ,  $p < 0,05$  vs fumo; **Fig. 25C**), rispetto ai topi trattati solo con budesonide o con IC87114, a conferma di quanto osservato in vitro.

Non si osservano variazioni significative sul numero di cellule totali (controllo:  $4,10\pm 0,95 \times 10^5$  cellule/ml; fumo:  $3,98\pm 0,48 \times 10^5$  cellule/ml; IC87114 20 mg/Kg:  $4,55\pm 0,56 \times 10^5$  cellule/ml; budesonide 1,5 mg/Kg:  $5,86\pm 0,72 \times 10^5$  cellule/ml; budesonide 1,5 mg/Kg+ IC87114 20 mg/Kg:  $3,96\pm 0,59 \times 10^5$  cellule/ml; **Fig. 25A**), e di macrofagi nel BAL (controllo:  $4,09\pm 0,95 \times 10^5$  cellule/ml; fumo:  $3,69\pm 0,47 \times 10^5$  cellule/ml; IC87114 20 mg/Kg:  $4,09\pm 0,51 \times 10^5$  cellule/ml; budesonide 1,5 mg/Kg:  $5,34\pm 0,56 \times 10^5$  cellule/ml; budesonide 1,5 mg/Kg IC87114 20 mg/Kg:  $3,83\pm 0,59 \times 10^5$  cellule/ml; **Fig. 25A**).

Gli studi di farmacocinetica effettuati su IC87114, condotti tramite sistema LC-MS-MS presso il dipartimento di Biochimica e Farmacocinetica di Chiesi, hanno mostrato una velocità di assorbimento, di metabolismo e di eliminazione del composto molto rapida (poche ore dalla somministrazione). Una singola somministrazione giornaliera, quindi, non garantisce un adeguato raggiungimento e mantenimento di questo composto nei vari compartimenti tissutali. È stata necessaria, infatti, una somministrazione del farmaco in due dosi giornaliere (1 ora prima e 4 ore dopo l'esposizione al fumo di sigaretta) per raggiungere un effetto efficace del farmaco sulla riduzione della neutrofilia polmonare indotta dal fumo di sigaretta.





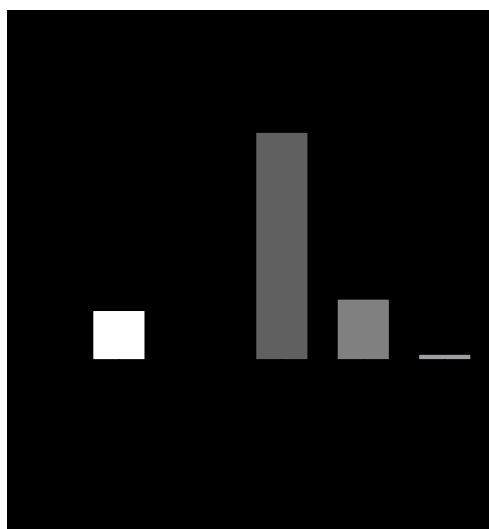
**Figura 25: Effetto del trattamento con IC87114 (20 mg/Kg), budesonide (1,5mg/Kg), IC87114 + budesonide sul reclutamento di cellule infiammatorie nel BAL indotto dal fumo di sigaretta.** A) cellule totali; B) macrofagi; C) neutrofili. Gli animali sono stati esposti per 4 giorni consecutivi al fumo di 10 sigarette, due volte al giorno, e sacrificati 24 ore dopo l'ultima esposizione per la raccolta del BAL. IC87114, budesonide o veicolo (metilcellulosa 1%/ PEG400, 95/5) sono stati somministrati per via orale un'ora prima e 4 ore dopo l'esposizione al fumo di sigaretta. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard della media. La significatività (\*  $p < 0,05$ , analisi della varianza ad una via, seguita dal test di comparazione Dunnett) è stata determinata verso il gruppo controllo esposto al fumo di sigaretta. Viene mostrato l'insieme dei dati ottenuti da due esperimenti indipendenti.

Nel BAL dei topi trattati con una combinazione di budesonide e IC87114 si è osservata una riduzione significativa dei livelli della citochina IL-12 p40 (fumo:  $108,2 \pm 14,43$  pg/ml; IC87114 20 mg/Kg:  $120,5 \pm 17,06$  pg/ml, budesonide 20 mg/Kg:  $32,84 \pm 5,88$  pg/ml, budesonide 1,5 mg/Kg+ IC87114 20 mg/Kg:  $3,90 \pm 0,58$  pg/ml, **Fig.26B**) rispetto al BAL dei topi esposti al fumo ai quali era stato somministrato il veicolo, mentre non si sono osservate variazioni significative sui livelli delle citochine G-CSF, MCP-1, KC indotte dal fumo di sigaretta (**Fig. 26A**).

A)

	CTR	FUMO	IC87114 20 mg/Kg	Budesonide 3 mg/Kg	Budesonide + IC87114
<b>G-CSF(pg/ml)</b>	9,40 ± 5,97	23,15 ± 2,61	30,32 ± 3,3	27,75 ± 3,51	39,31 ± 5,52
<b>KC (pg/ml)</b>	7,39 ± 0,93	192,9 ± 24,95	264,4 ± 42,48	355,4 ± 45,77	516,9± 130
<b>MCP-1 (pg/ml)</b>	139,8± 31,48	138,8 ± 13,72	146,2 ± 22,25	183,7 ± 40,9	206 ± 27,09
<b>IL-12 p40 (pg/ml)</b>	26,88±4,68 (**)	108,2±14,43	120,5 ±17,06	32,84±5,88 (**)	3,90±0,58 (**)

B)



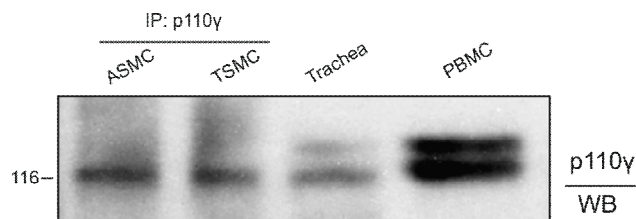
**Figura 26: Effetto del trattamento con IC87114 (20 mg/Kg), budesonide (1,5mg/Kg), IC87114 + budesonide sui livelli di citochine e chemochine nel BAL indotti dal fumo di sigaretta. A) G-CSF; KC; MCP-1 B) IL-12 p40;. Gli animali sono stati esposti per 4 giorni consecutivi al fumo di 10 sigarette al giorno e sacrificati 24 ore dopo l'ultima esposizione al fumo di sigaretta per la raccolta del**

BAL. IC87114, budesonide o il veicolo (metilcellulosa 1%/ PEG400, 95/5) sono stati somministrati oralmente due volte al giorno per 4 giorni consecutivi, un'ora prima e 4 ore dopo l'esposizione al fumo di sigaretta. I mediatori pro-infiammatori nel BAL sono stati misurati con il dosaggio Bio-Plex. I dati sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard della media. La significatività (\*\*  $p < 0,01$ , test di comparazione Bonferroni) è stata determinata verso il gruppo controllo esposto al fumo di sigaretta. Viene mostrato l'insieme dei dati ottenuti da due esperimenti indipendenti

#### **4) Ruolo di PI3K $\gamma$ nei meccanismi di contrazione e rilassamento del muscolo liscio delle vie aeree**

##### **a) Espressione di PI3K $\gamma$ nel muscolo liscio delle vie aeree**

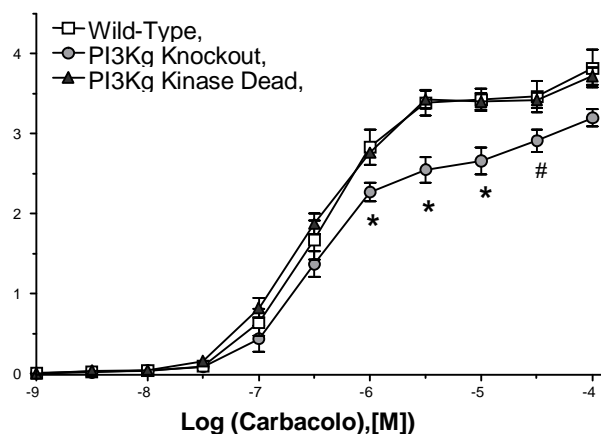
Per verificare l'espressione di PI3K $\gamma$  nel muscolo liscio delle vie aeree, sono state messe a confronto, attraverso analisi di western blotting, cellule muscolari lisce di bronco umane e cellule muscolari lisce di trachea murine con la trachea intera di topi wild-type e con una linea di cellule monucleari di sangue periferico (PBMC). È stato osservato che PI3K $\gamma$  è espressa nel muscolo liscio delle vie aeree. In particolare, è stato osservato che, a differenza di altri tessuti in cui sono espresse entrambe le forme di PI3K $\gamma$ , nel muscolo liscio è espressa una sola forma di PI3K $\gamma$ , che corrisponde alla forma a minore peso molecolare (**Fig. 27**). Le due forme di PI3K $\gamma$  sono entrambe eterodimeri e differiscono tra loro, da un punto di vista strutturale, per pochi nucleotidi nella porzione NH-terminale della subunità catalitica (rispettivamente 120 e 117 kDA) (Stephens L.R et al, 1997).



**Figura 27: Espressione di PI3K $\gamma$  nel muscolo liscio delle vie aeree.** Le cellule ASMC, TSMC, PBMC e le trachee di topi wild-type sono state lisate. Gli estratti cellulari sono stati sottoposti ad analisi di western blotting

### **b) Ruolo di PI3K $\gamma$ nei meccanismi di contrattilità del muscolo liscio delle vie aeree**

Per studiare il ruolo di PI3K $\gamma$  nei meccanismi di contrattilità del muscolo liscio delle vie aeree, le trachee di topi wild type, PI3K $\gamma$  knock out e kinase-dead sono state montate sul miografo, stimulate con carbacolo a diverse concentrazioni (da  $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M) ed è stata fatta una misura della tensione muscolare. È stato osservato che le trachee di topi PI3K $\gamma$  knock out mostrano una minore capacità di contrazione rispetto alle trachee di topi wildtype e PI3K $\gamma$  kinase-dead (**Fig.28**). Questo suggerisce che PI3K $\gamma$  è capace di regolare i meccanismi di contrattilità del muscolo liscio delle vie aeree attraverso un meccanismo che non dipende dalla sua attività chinasi, ovvero chinasi-indipendente.

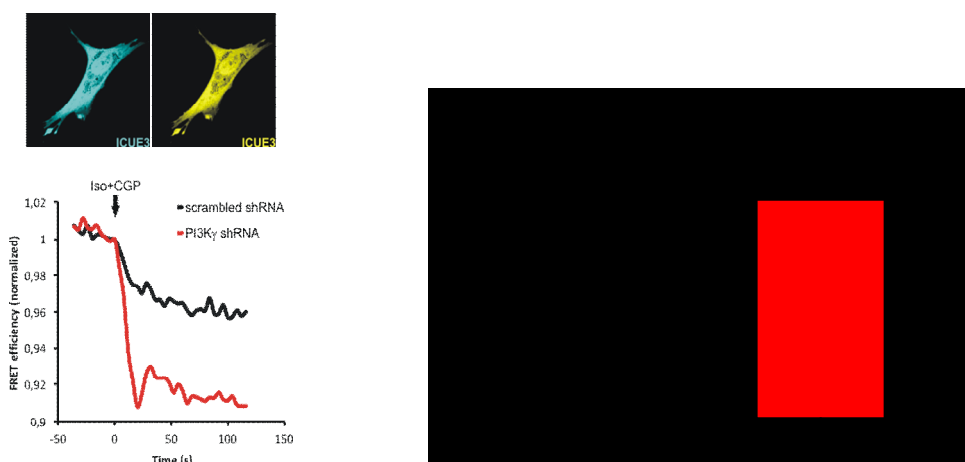


**Figura 28: Regolazione chinasi-indipendente dei meccanismi di contrazione e di rilassamento del muscolo liscio della trachea.** Le trachee di topi wildtype, PI3K $\gamma$  knock out e kinase-dead sono state montate sul miografo e stimulate con carbacolo a diverse concentrazioni (da  $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M). È stata fatta una misura della tensione muscolare. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard della media.

### c) Ruolo di PI3K $\gamma$ nel controllo del signaling di cAMP

Per studiare il ruolo di PI3K $\gamma$  nel controllo dei livelli di cAMP nel muscolo liscio delle vie aeree, cellule muscolari lisce di bronco umano (ASMC) sono state trasfettate con dei PI3K $\gamma$  shRNA o con dei scrambled shRNA, stimulate con isoproterenolo (100 nM) in presenza di CGP-20712A (100 nM), antagonista selettivo dei recettori  $\beta_1$ , in modo da attivare esclusivamente i recettori  $\beta_2$  e sottoposte ad analisi FRET, per quantificare i livelli intracellulari di cAMP. È stato osservato che nelle cellule trasfettate con i PI3K $\gamma$  shRNA ( $4,78 \pm 0,56\%$ ) si ha una

riduzione significativa del segnale di FRET, rispetto alle cellule trasfettate con i scrambled shRNA ( $8,616 \pm 1,369\%$ ). La riduzione del segnale di FRET è direttamente proporzionale a un aumento dei livelli di cAMP (**Fig.29**), che è ascrivibile ad una condizione di rilassamento del muscolo liscio delle vie aeree.



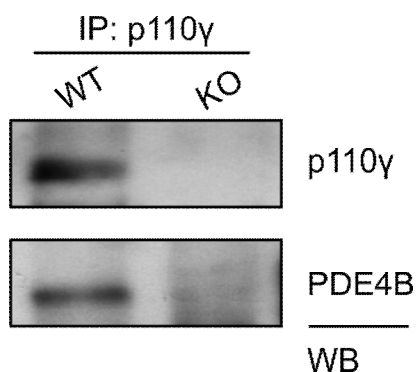
**Figura 29: PI3K $\gamma$  aumenta i livelli di cAMP nelle cellule ASMC.** Le cellule ASMC sono state trasfettate con i costrutti PI3K $\gamma$  shRNA, scrambled shRNA e ICUE3 e lisate 72 ore dopo la trasfezione, Sono state stimulate con isoproterenolo 100 nM e CGP-20712A 100 nM e sottoposte ad analisi FRET. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard della media. La significatività (\*\*  $p < 0,01$ , test di comparazione di t di Student) è stata determinata verso il gruppo di cellule trasfettate con gli scrambled shRNA. Viene mostrato l'insieme dei dati ottenuti da cinque esperimenti indipendenti

#### d) Ruolo di PI3K $\gamma$ nella regolazione della fosfodiesterasi 4B (PDE4B)

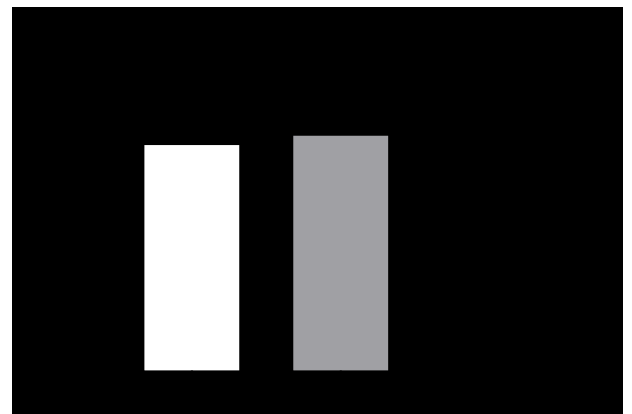
Per dimostrare che PI3K $\gamma$  è capace di modulare i livelli di cAMP nel muscolo liscio delle vie aeree attraverso un'interazione con la PDE4B e una regolazione della sua attività, sono stati fatti esperimenti di co-immunoprecipitazione e di western blotting per isolare il complesso delle 2 proteine, ed esperimenti di valutazione dell'attività fosfodiesterasica nelle trachee intere murine e in cellule muscolari lisce isolate dalle trachee di topi wild-type, PI3K $\gamma$  knock out e kinase-dead.

È stato osservato che PI3K $\gamma$  è capace di legare la PDE4B (**Fig.30A**) e di regolarne l'attività (**Fig.30B**): nelle trachee intere di topi PI3K $\gamma$  knock out ( $2287 \pm 223,6$  cmp/ip) l'attività PDE4 risulta significativamente inferiore rispetto a quella rilevata nelle trachee di topi wild type ( $4241 \pm 432,4$  cmp/ip) e PI3K $\gamma$  kinase-dead ( $4414 \pm 241,4$  cmp/ip).

A)



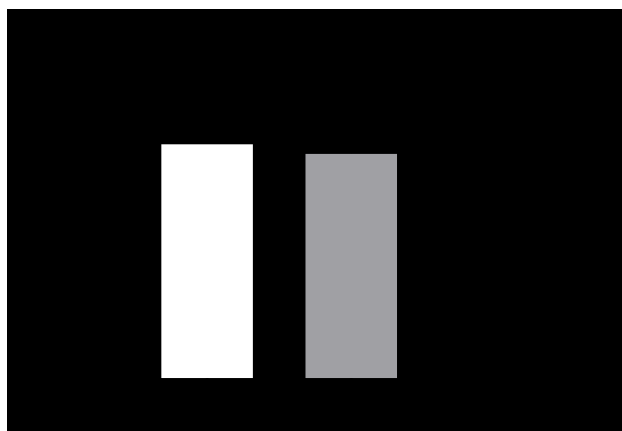
B)





**Figura 30: A) PI3K $\gamma$  lega PDE4B nelle trachee murine.** Le trachee intere di topi wildtype e PI3K $\gamma$  knock out sono state lisate, sottoposte a immunoprecipitazione e ad analisi di western blotting **B) PI3K $\gamma$  regola l'attività della PDE4B nelle trachee murine.** Le trachee intere di topi wildtype, PI3K $\gamma$  knock out e kinase-dead sono state lisate, sottoposte a immunoprecipitazione e a PDE assay. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard della media. La significatività (\*\*  $p < 0,01$ , analisi della varianza ad una via, seguita dal test di comparazione Dunnet) è stata determinata verso il gruppo di trachee wildtype. Viene mostrato l'insieme dei dati ottenuti da cinque esperimenti indipendenti.

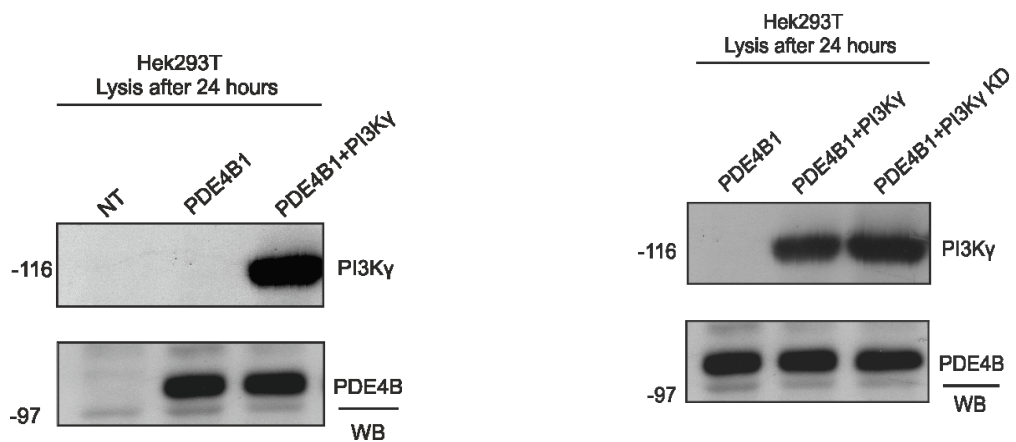
Esperimenti successivi hanno confermato che PI3K $\gamma$  è capace di regolare l'attività della fosfodiesterasi 4B (PDE4B): nelle cellule muscolari lisce della trachea di topi PI3K $\gamma$  knock out ( $14475 \pm 1548$  cmp/ip) l'attività PDE4 risulta significativamente inferiore rispetto a quella rilevata nelle trachee di topi wild type ( $20659 \pm 1365$  cmp/ip) e PI3K $\gamma$  kinase dead ( $19828 \pm 3068$  cmp/ip) (**Fig.31**).



**Figura 31: PI3K $\gamma$  regola l'attività della PDE4B nelle cellule muscolari lisce delle trachee murine.** Le cellule muscolari lisce delle trachee di topi wildtype, PI3K $\gamma$  knock out e kinase-dead sono state lisate, sottoposte a immunoprecipitazione e a valutazione dell'attività fosfodiesterasica. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard della media. La significatività (\*  $p < 0,05$ , test di comparazione Bonferroni) è stata determinata verso il gruppo di trachee wildtype. Viene mostrato l'insieme dei dati ottenuti da cinque esperimenti indipendenti.

Come conferma della formazione del complesso PI3K $\gamma$ /PDE4B sono stati fatti esperimenti di trasfezione e di attività PDE in cellule HEK293T, una linea di cellule embrionali di rene umano usate da molti anni in biologia molecolare, poiché facilmente trasfettabili. Queste cellule non presentano un'espressione endogena di PI3K $\gamma$  e della PDE4B, rappresentando pertanto un'ottima linea cellulare per esplorare meccanismi d'interazione tra queste due proteine. Le cellule HEK293T sono state trasfettate con le proteine PDE4B, PI3K $\gamma$  wild-type e kinase-dead. È stato osservato che l'attività PDE aumenta nelle cellule HEK293T cotrasfettate con PDE4B e PI3K $\gamma$  ( $133 \pm 6,187$  %) o cotrasfettate con PDE4B e PI3K $\gamma$  kinase-dead ( $138,4 \pm 42,64$ %), rispetto a quelle trasfettate solo con PDE4B ( $100 \pm 0,0$  %) (**Fig.32**).

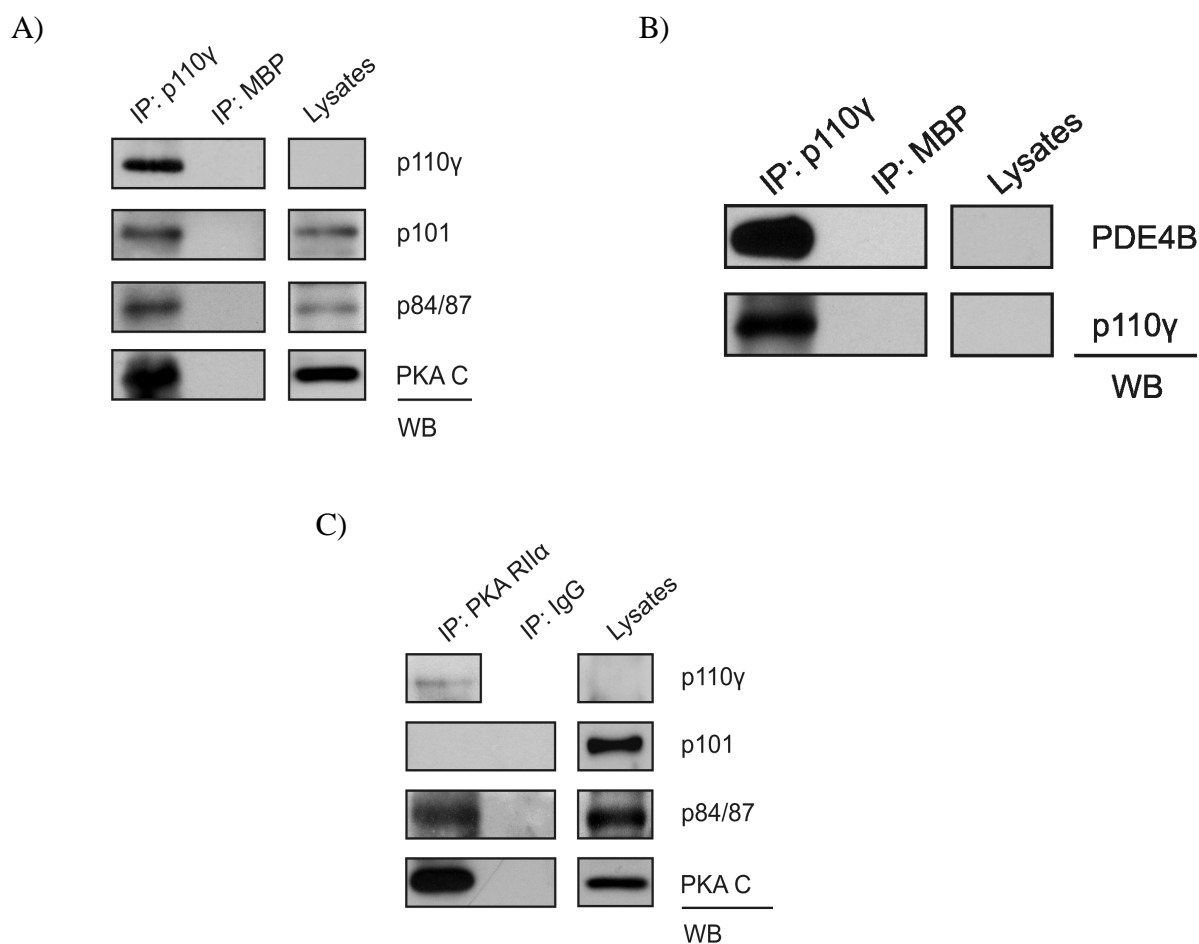




**Figura 32: PI3K $\gamma$  regola l'attività della PDE4B nelle cellule HEK293T.** Le cellule HEK293T sono state trasfettate con i costrutti PDE4B, PI3K $\gamma$  e PI3K $\gamma$  kinase-dead e lisate 24 ore dopo la trasfezione. Sono state sottoposte a immunoprecipitazione e ad attività fosfodiesterasica. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard della media. La significatività (\*\*  $p < 0,01$ , analisi della varianza a una via, seguita dal test di comparazione Dunnet) è stata determinata verso il gruppo di controllo. Viene mostrato l'insieme dei dati ottenuti da cinque esperimenti indipendenti.

Una volta confermato che PI3K $\gamma$  è capace di attivare PDE4B in maniera chinasi indipendente, sono stati fatti esperimenti di co-immunoprecipitazione e western blotting su cellule muscolari lisce di bronco umano (ASMC). È stato osservato che nel muscolo liscio delle vie aeree PI3K $\gamma$  è capace di legare in modo diretto la protein chinasi A (PKA) (**Fig.33A**) e la PDE4B (**Fig.33B**). È stato inoltre osservato che PI3K $\gamma$  lega la PKA tramite le sue subunità p110 $\gamma$  e p84/p87 (**Fig.33C**).

Questo suggerisce che, come a livello cardiaco (Perino *et al* 2011), anche nel muscolo liscio delle vie aeree, PI3K $\gamma$  partecipa alla formazione di un complesso responsabile della regolazione del signaling di cAMP.



**Figura 33: PI3K $\gamma$  lega, tramite la sua subunità p84/p87, PKA e PDE4B nelle cellule ASMC.** Le cellule ASMC state lisate, sottoposte a immunoprecipitazione e ad analisi di western blotting. A) Coimmunoprecipitazione di p110 $\gamma$  con p84/87 e PKA. B) Coimmunoprecipitazione di p110 $\gamma$  con PDE4B. C) Coimmunoprecipitazione di PKA con p84/p87 e p110 $\gamma$ .

## **5. Discussione e Conclusioni**

La BPCO è una patologia respiratoria cronica caratterizzata da un'ostruzione delle vie aeree che peggiora nel tempo e che ha una limitata reversibilità in seguito a trattamento con broncodilatatori. La sintomatologia nel paziente è caratterizzata da tosse, iperproduzione di muco, fame d'aria e frequenti esacerbazioni che portano a peggioramento della qualità della vita e a un rapido declino delle funzioni respiratorie. La BPCO è una delle maggiori cause di morbidità e mortalità in tutto il mondo con una prevalenza globale, in adulti di età superiore ai 40 anni, stimata intorno al 10% (Buist *et al*, 2007). Secondo valutazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità la BPCO sarà la terza causa di morte e la quinta causa di morbidità nel mondo entro il 2020.

La causa principale della BPCO è il fumo cronico di sigaretta: si stima che circa il 50% dei fumatori cronici sviluppano questa patologia, suggerendo che la suscettibilità genetica possa giocare un ruolo importante accanto a fattori ambientali. (Mannino *et al*, 2007). I fenomeni patologici a carico del polmone nella BPCO sono complessi ed eterogenei e comprendono infiammazione polmonare, rimodellamento delle piccole vie aeree, enfisema e iperproduzione di muco (Rabe *et al*, 2007). L'infiammazione nella BPCO è presente nelle piccole e grandi vie aeree e risulta essere critica per lo sviluppo e il decorso della patologia. La severità dell'infiammazione è, infatti, correlata alla severità della malattia misurata attraverso test spirometrici (Hogg *et al*, 2004).

Le terapie a oggi disponibili mirano alla riduzione dei sintomi mediante l'uso di broncodilatatori sia in monoterapia che in combinazione con corticosteroidi inalatori. La deludente efficacia antiinfiammatoria dei

corticosteroidi (da soli o in combinazione con  $\beta_2$  agonisti) nella BPCO (Barnes NC *et al*, 2006), in contrasto con quanto si verifica nell'asma, ha portato ad un notevole sforzo dell'industria farmaceutica e della comunità scientifica nella ricerca di nuovi antiinfiammatori per la BPCO. I PDE4 inibitori rappresentano, allo stato attuale, la terapia antiinfiammatoria innovativa in stato più avanzato di sviluppo clinico nella BPCO. L'aumento dei livelli di cAMP intracellulare può portare ad un ampio spettro di effetti cellulari antiinfiammatori e la PDE4 rappresenta l'isoforma predominante nelle cellule infiammatorie che partecipano alla patogenesi della BPCO (Grootendorst DC *et al*, 2007).

Roflumilast, un PDE4 inibitore sviluppato per la somministrazione orale, è entrato recentemente in commercio nei Paesi dell'Unione Europea. I quattro studi di fase III condotti in pazienti con BPCO da moderata a severa hanno dimostrato che roflumilast produce una significativa riduzione delle esacerbazioni anche nei pazienti già in terapia con beta 2 agonisti a lunga durata di azione ed è in grado di migliorare la funzionalità polmonare (misurata attraverso la valutazione della FEV1) in pazienti con BPCO (Calverley *et al*, 2009; Fabri *et al*, 2009). Roflumilast ha dimostrato avere un'efficace attività antiinfiammatoria *in vitro* su vari tipi di cellule infiammatorie rilevanti in BPCO e in asma, così come in vari modelli *in vivo* (Hatzelmann and Schudt, 2001; Bundschuh *et al*, 2001).

Molti dei nuovi antiinfiammatori attualmente in sviluppo clinico sono stati identificati attraverso studi effettuati in modelli animali, messi a punto al fine di mimare alcune caratteristiche della BPCO.

Dal momento che il fumo di sigaretta costituisce il principale agente eziologico responsabile dell'instaurarsi della malattia, l'utilizzo del fumo di tabacco per indurre infiammazione polmonare, cambiamenti nella struttura delle vie aeree e enfisema in modelli animali è aumentato drammaticamente negli ultimi anni con lo sviluppo di modelli acuti, subacuti e cronici in grado di ricapitolare aspetti diversi della patologia umana.

Il lavoro descritto in questa tesi, condotto presso il Dipartimento di Farmacologia della Chiesi Farmaceutici S.p.A, si è incentrato, nel primo e nel secondo anno di dottorato, sulla messa a punto e la caratterizzazione di un modello di infiammazione polmonare indotta dall'esposizione acuta al fumo di sigaretta nel topo, come strumento per la valutazione dell'efficacia di nuovi approcci antiinfiammatori per la BPCO (ad esempio l'inibizione della PDE4 o di PI3K).

Il modello sperimentale da noi allestito prevede l'esposizione al fumo di sigaretta di topi C57Bl/6J mediante un sistema d'inalazione "nose only". In questo tipo di sistema i topi vengono inseriti in appositi contenitori che isolano l'animale dall'ambiente circostante fatta eccezione per il naso: questi contenitori si affacciano all'interno di una camera di plexiglass che viene saturata con una miscela di aria e fumo di sigaretta in modo che gli animali siano esposti attraverso il naso all'atmosfera della camera. Le condizioni di esposizione al fumo mimano quelle del fumo attivo nell'uomo: il fumo che viene introdotto nella camera è, infatti, quello che passa attraverso il filtro della sigaretta e che



rappresenta la corrente primaria che investe l'apparato respiratorio umano in seguito all'atto del fumo volontario. Benché il sistema "nose-only" determini un certo grado di stress e variazioni nella profondità del respiro dell'animale, esso risulta abbastanza controllato e riproducibile: l'immobilizzazione del topo favorisce la standardizzazione dell'esposizione (i topi lasciati liberi in una gabbia ed esposti a fumo tendono a raggrupparsi e a nascondersi per evitare gli effetti irritanti del fumo stesso) e l'isolamento del corpo dell'animale limita la contaminazione del pelo e l'assunzione di composti potenzialmente tossici o di particolato attraverso ingestione.

Il cambiamento predominante osservato in risposta ad un'esposizione acuta (4 giorni) al fumo di sigaretta è un aumento nel numero di neutrofili e mediatori pro-infiammatori nel BAL. L'infiammazione indotta dal fumo di sigaretta è dose e tempo dipendente. La cinetica d'infiammazione vede il picco di neutrofili 24 ore dopo il quarto giorno di esposizione al fumo di sigaretta. L'infiltrazione dei neutrofili è accompagnata da un parallelo aumento di molte citochine della risposta immunitaria innata, ed è preceduta da un aumento della chemochina KC (analogo murino di IL-8): questo evento può rappresentare un importante meccanismo guida nella risposta acuta al fumo di sigaretta, come evidenziato anche da studi in vitro condotti presso il dipartimento di Farmacologia di Chiesi dove la stimolazione con estratto di fumo di sigaretta di cellule residenti polmonari (fibroblasti polmonari primari e linee epiteliali) o di linee macrofagiche determina rilascio di IL-8 (Facchinetti *et al*, 2007; Moretto *et al*, 2009).

Un quadro simile d'infiltrazione cellulare è stato riportato nel BAL e nell'espettorato di pazienti con BPCO (Lacoste *et al*, 1993). Il ruolo chiave giocato dall'IL-8 nell'orchestrare l'infiammazione indotta da fumo di sigaretta è testimoniato anche dal fatto che le cellule epiteliali di pazienti con BPCO rilasciano IL-8 in maggiore quantità rispetto ai fumatori sani o agli individui normali (Profita *et al*, 2003).

Nel nostro modello, la neutrofilia indotta dal fumo di sigaretta risulta sensibile al PDE4 inibitore orale roflumilast in modo dose-dipendente (49.53±11,30% di inibizione alla dose di 1 mg/Kg; 80.42±5.6 % di inibizione alla dose di 5 mg/Kg.). Roflumilast è stato testato alla dose di 1 mg/Kg e 5 mg/Kg sulla base dello studio pubblicato nel 2005 da *Martorana et al.*, in cui l'effetto antiinfiammatorio del farmaco è stato studiato in un modello di fumo sia acuto che cronico. Gli autori hanno mostrato che nel protocollo di esposizione acuta (3 giorni) al fumo di sigaretta, roflumilast inibisce in maniera parziale (-30%) ma significativa la neutrofilia nel BAL ad entrambe le dosi testate.

Nel nostro modello l'effetto inibitorio di roflumilast sui livelli di citochine nel BAL, misurate 24 ore dopo l'ultima esposizione al fumo di sigaretta, sembra essere limitato a IL-1 $\beta$  e a IL-12 p40: IL-1 $\beta$  è una delle principali citochine dell'immunità innata; IL-12 p40 è uno dei principali mediatori della risposta precoce dell'immunità innata contro i batteri intracellulari e un importante induttore dell'immunità cellula-mediata. La mancanza di un effetto su KC, il principale chemioattrattante dei neutrofili sovra espresso dopo esposizione al fumo di sigaretta nel topo, è coerente con le precedenti osservazioni ottenute con Cilomilast in un modello di fumo acuto (Leclerq *et al*, 2006). Il meccanismo preciso che

induce un'inibizione della produzione di citochine in seguito a livelli aumentati di cAMP non è ancora chiaro. Studi in vitro suggeriscono il coinvolgimento di NF- $\kappa$ B e di p38 MAPK: roflumilast riduce la produzione di TNF- $\alpha$  e di IL-1 $\beta$ , stimolata da LPS, nella linea cellulare di macrofagi murini RAW2647, mediante inibizione di NF- $\kappa$ B e p38 MAPK e mediante attivazione di JNK (Kwak *et al*, 2002). È stato dimostrato, inoltre, che i fattori coinvolti nell'aumento dei livelli di cAMP siano in grado di ridurre l'espressione dell'mRNA che codifica per IL-12 p40, e questo effetto probabilmente viene mediato dall'inibizione di p38 MAPK (Feng *et al*, 2002).

Lo sviluppo clinico dei PDE4 inibitori ha presentato alcuni ostacoli, soprattutto a causa degli effetti collaterali associati a questa classe di farmaci: tra i disturbi più evidenti si osservano quelli gastrointestinali, come nausea e diarrea. Per questo motivo lo sviluppo di PDE4 inibitori somministrabili per via inalatoria rappresenta il futuro di questa nuova importante classe di antiinfiammatori.

Nel nostro modello il trattamento con GSK256066 per via inalatoria ha contrastato in maniera significativa ( $85.23 \pm 4.75\%$  di inibizione alla dose 10 mM) la neutrofilia indotta dall'esposizione al fumo di sigaretta.

L'analisi dei livelli polmonari di questo farmaco effettuata tramite sistema LC-MS-MS dal Dipartimento di Farmacocinetica e Metabolismo di Chiesi Farmaceutici ha evidenziato come quantitativi limitati di composto ( $4.04 \pm 1.96$  nmol/g) fossero effettivamente presenti nel polmone dopo singola esposizione dell'animale all'aerosol. Questo conferma la potenza del composto e l'importanza della somministrazione per via inalatoria dei PDE4 inibitori come possibile terapia nei pazienti

con BPCO: quest'approccio coniugherebbe, infatti, elevata efficacia antiinfiammatoria locale con ridotti effetti collaterali a livello sistemico.

È noto che nella BPCO esiste uno sbilanciamento tra carica ossidante e difese antiossidanti e che questo sbilanciamento è importante nella patogenesi di questa malattia (MacNee, 2000). Molti studi mostrano che i leucociti isolati da pazienti con BPCO generano livelli elevati di anioni superossidi, associati a livelli aumentati di mediatori pro-infiammatori (Rahman, 2006). Uno sbilanciamento tra ossidanti e antiossidanti è stato osservato anche nei fumatori (Rahman, 2003), associato con una risposta infiammatoria del polmone. Esiste chiaramente un importante legame tra l'infiammazione indotta dal fumo di sigaretta e lo stress ossidativo: lo stress ossidativo sembra essere fondamentale nella risposta infiammatoria al fumo di sigaretta, mediante l'up-regolazione di fattori di trascrizione sensibili alle reazioni redox e, quindi, mediante l'espressione di geni pro-infiammatori. D'altra parte la stessa infiammazione induce stress ossidativo nei polmoni.

È stato recentemente proposto che la corticosteroido resistenza osservata nei pazienti con BPCO sia dovuta a una riduzione dell'attività dell'enzima HDAC2 nei polmoni di questi pazienti indotta da stress ossidativo (Ito *et al*, 2005). L'attività di HDAC2 è, infatti, fondamentale per lo svolgimento dell'attività antiinfiammatoria degli steroidi dopo legame con il loro recettore (Barnes, 2006). Il grado di diminuzione dell'attività di HDAC2 correla con la gravità della malattia.

Recenti studi sull'esposizione al fumo di sigaretta nel topo indicano che l'infiammazione acuta indotta in questi tipi di modelli è insensibile ai

corticosteroidi (Leclerq *et al*, 2006) e ciò costituisce un'ulteriore validazione della somiglianza tra l'infiammazione sperimentale indotta da fumo di sigaretta e quella osservata nei pazienti con BPCO. A supporto di queste osservazioni è stato dimostrato che nei modelli animali di esposizione al fumo si assiste a una riduzione dell'attività di HDAC2 (Marwick *et al*, 2004).

Nel nostro studio abbiamo osservato un aumento nel grado di perossidazione lipidica, noto indicatore di stress ossidativo nel tessuto polmonare, dopo esposizione acuta al fumo di sigaretta.

Abbiamo inoltre dimostrato che l'infiammazione neutrofilica indotta dal fumo di sigaretta è insensibile al corticosteroide budesonide fino alla dose di 3 mg/Kg che, invece risulta efficace nel ridurre la neutrofilia indotta dal lipopolisaccaride (LPS), il modello farmacodinamico di infiammazione polmonare più ampiamente utilizzato nell'industria farmaceutica. L'instillazione di LPS nel polmone degli animali, attraverso l'attivazione del Toll-like Receptor 4 (TLR4) espresso nei macrofagi, neutrofili, linfociti, cellule dendritiche ed epiteliali, induce un rapido e significativo aumento della neutrofilia nel BAL e nel tessuto polmonare accompagnato da aumento di un ampio spettro di chemochine e citochine pro-infiammatorie senza una componente ossidativa importante. A conferma del ruolo dello stress ossidativo nell'indurre la corticosteroido resistenza nei modelli animali d'infiammazione polmonare è stato messo a punto, nel dipartimento di Farmacologia di Chiesi, un modello nel topo di flogosi polmonare indotta da inalazione di ozono.. L'ozono è un gas ambientale ossidante altamente velenoso per gli esseri viventi con una componente ossidativa elevata. L'esposizione

all'ozono porta alla produzione di composti di ossidazione lipidica, come le aldeidi, perossido d'idrogeno e idroperossidi, componenti attive anche del fumo di sigaretta, contribuendo ad un danno polmonare attraverso un meccanismo apoptotico (Kirichenko *et al*, 1996). L'esposizione all'ozono è capace di indurre un reclutamento neutrofilico polmonare accompagnato dal rilascio di citochine e chemochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , MIP-2 e IL- $\beta$ ) (Cho *et al*, 2001). L'infiammazione neutrofilica indotta dall'esposizione all'ozono è stata dimostrata essere insensibile al trattamento con corticosteroidi (Nightingale *et al*, 2000, dati interni di Chiesi). Il modello di esposizione all'ozono, quindi, essendo caratterizzato da una componente ossidativa diretta e corticosteroido resistente presenta molte similitudini con il modello di esposizione al fumo di sigaretta.

Recenti studi hanno evidenziato il coinvolgimento della pathway fosfoinositolo-3-kinasi (PI3K)/Akt nella riduzione dell'attività di HDAC2 dovuta a stress ossidativo (Marwick JA *et al*, 2009). La PI3K sembra essere attivata in pazienti con BPCO o sotto condizioni di stress ossidativo ed esposizione al fumo di sigaretta. È stato osservato che i tessuti polmonari periferici e i macrofagi alveolari di pazienti con BPCO mostrano un'elevata attività del mRNA di PI3K $\delta$  (To *et al*, 2010).

Topi esposti al fumo di sigaretta inoltre mostrano nei tessuti polmonari periferici alti livelli di Akt fosforilata, marker diretto dell'attivazione di PI3K (To *et al*, 2010). Recenti studi hanno anche dimostrato che topi PI3K $\delta$  knockout non sviluppano una resistenza ai corticosteroidi dopo esposizione al fumo di sigaretta (Marwick JA *et al*, 2009).

I nostri studi condotti in vitro su una linea cellulare di bronco umana (BMSC) hanno dimostrato che il fumo di sigaretta incrementa la fosforilazione di Akt, che è un marker diretto dell'attivazione di PI3K.

I successivi esperimenti di associazione tra steroidi e inibitori di PI3K $\delta$ , condotti su cellule muscolari di bronco umane, hanno confermato che inibitori di questa isoforma di PI3K sono in grado di riattivare la responsività all'effetto antiinfiammatorio dei glucocorticoidi in situazioni di forte stress ossidativo. Quanto osservato in vitro è stato confermato anche nel nostro modello in vivo: nel nostro modello di esposizione acuta al fumo di sigaretta il trattamento con un inibitore dell'isoforma delta di PI3K (IC87114) in associazione con budesonide è capace di inibire il reclutamento neutrofilico indotto dal fumo di sigaretta, laddove il trattamento singolo con IC87114 o con budesonide non mostrano alcuna efficacia. Risultati analoghi sono stati ottenuti nei laboratori di Chiesi nel modello dell'infiammazione polmonare indotta da ozono.

L'interesse per le PI3Ks di classe I nell'infiammazione cronica non si limita solo alla loro capacità di ripristinare l'efficacia degli steroidi: le PI3Ks di classe I hanno un ruolo cruciale nell'espressione e nell'attivazione di mediatori infiammatori, nel reclutamento di cellule infiammatorie (neutrofili e macrofagi) e nel rimodellamento delle vie aeree (Takeda *et al*, 2010). Sono, infatti, coinvolte nell'espressione della metalloelastasi MMP-9, capace di degradare componenti della matrice extracellulare. Sembra che tra le PI3Ks di classe I sia l'isoforma gamma ad avere un ruolo importante nella regolazione dell'infiammazione e nei meccanismi di chemiotassi.

In modelli animali di esposizione al fumo di sigaretta, inibitori di questa isoforma sembrano capaci di determinare una ridotta chemiotassi di neutrofili e una riduzione dei livelli di citochine e chemochine indotte dal fumo di sigaretta (Ito *et al*, 2007).

Nel nostro studio è stato dimostrato che topi geneticamente modificati con inattivazione costitutiva dell'isoforma  $\gamma$  di PI3K (in questo modo viene mimata una condizione d'inibizione farmacologica) esposti al fumo di sigaretta presentano una riduzione significativa della neutrofilia indotta dal fumo.

Complessivamente le nostre indagini sperimentali suggeriscono che inibitori selettivi delle isoforme gamma e delta delle PI3Ks possono avere una rilevante attività antiinfiammatoria nella BPCO, per se e in associazione con gli steroidi.

Inibitori misti  $\gamma/\delta$  di PI3K potrebbero rappresentare un nuovo approccio terapeutico per la BPCO. L'inibizione sia dell'isoforma  $\gamma$  che dell'isoforma  $\delta$  potrebbe, da un lato, limitare il reclutamento dei leucociti (eosinofili, neutrofili, macrofagi e cellule T) al sito della lesione infiammatoria in risposta a chemochine e altri chemioattrattanti, dall'altro potrebbe ripristinare l'insensibilità ai corticosteroidi in presenza di infiammazione neutrofilica indotta da stress ossidativo. Allo stato attuale il numero d'industrie farmaceutiche che lavorano sulle PI3K come target per malattie respiratorie, come asma e BPCO, è molto limitato (fino a questo momento la pathway PI3K/Akt è stata principalmente studiata come target per patologie tumorali). Due PI3K inibitori disponibili in commercio, wortmannina e LY294002, hanno contribuito a capire il ruolo biologico delle PI3K nell'infiammazione

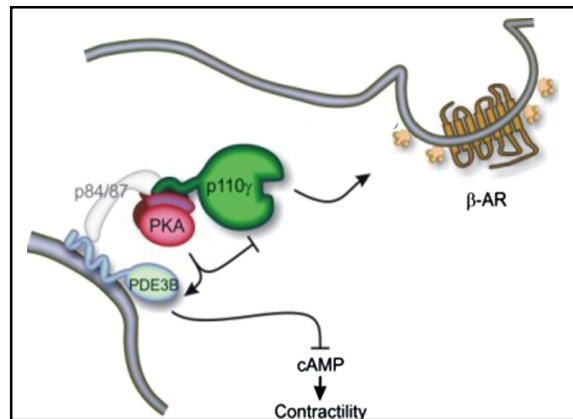


polmonare (Ward and Finan, 2003). Studi preclinici hanno dimostrato che questi PI3K inibitori sono in grado di ridurre l'infiammazione eosinofilia e l'iperresponsività delle vie aeree in un modello di asma murino (Lee *et al*, 2006). Questi due inibitori non sono selettivi per specifiche isoforme delle PI3Ks e presentano una bassa solubilità, una tossicità elevata e scarso assorbimento. Alcune industrie farmaceutiche stanno lavorando sullo sviluppo di nuovi PI3K inibitori non selettivi per patologie respiratorie, come l'asma, che risultino maggiormente stabili (un PI3K inibitore non selettivo, SF1126, sta per essere sottoposto a valutazione clinica). Allo stato attuale, in seguito agli studi effettuati sulle diverse isoforme di PI3K in modelli animali, alcune industrie farmaceutiche hanno inoltre attivato programmi di sviluppo d'inibitori selettivi per le isoforme gamma e delta di PI3K per il trattamento di asma e BPCO.

Nonostante le PI3Ks di classe I siano una famiglia di proteine maggiormente espresse nei leucociti e coinvolte nei processi infiammatori, è ormai noto che esse intervengono anche nella regolazione di meccanismi cellulari e molecolari non necessariamente legati alla flogosi. Recenti studi hanno evidenziato, infatti, il ruolo delle PI3Ks nel controllo della contrattilità del muscolo liscio delle vie aeree, attraverso una regolazione dei livelli di cAMP e delle fosfodiesterasi (Jiang H. *et al* 2012).

In particolare, sembra che l'isoforma gamma delle PI3Ks di classe I abbia un ruolo predominante nella modulazione del signaling di cAMP nelle cellule muscolari, attraverso un'interazione proteina-proteina con PDE di tipo 3 e di tipo 4 (Perino *et al*, 2011; Ghigo *et al*, 2012). Un

recente lavoro condotto presso il Dipartimento di Biotecnologie Molecolari dell'università degli studi di Torino (MBC), infatti, ha dimostrato che nelle cellule del miocardio, PI3K $\gamma$  è responsabile della formazione di un complesso nel quale si ha l'attivazione di una fosfodiesterasi di tipo 3. Questo complesso è costituito dalla subunità p84/p87 di PI3K $\gamma$ , dalla proteina PKA e dalla PDE3B. In questo complesso, PI3K $\gamma$  funge da proteina di ancoraggio alla PKA (AKAP), cioè è capace di legare direttamente la PKA che a sua volta promuove l'attivazione delle PDE3B con conseguente riduzione dei livelli di cAMP e aumento della contrattilità cardiaca (Perino *et al.* 2011) (Fig. 33).



**Figura 33: Ruolo scaffold di PI3K $\gamma$  nel signaling di cAMP.** PI3k $\gamma$  controlla l'attività PDE nel cuore, regolandone la contrattilità. In questo modo, PI3k $\gamma$  contribuisce alla compartimentalizzazione del signaling di cAMP, regolando le diverse fosfodiesterasi in distinti domini subcellulari.

Nel terzo anno di dottorato, il lavoro descritto in questa tesi, condotto presso il Dipartimento di Biotecnologie Molecolari dell'università di Torino (MBC), si è incentrato sulla valutazione del ruolo della PI3K $\gamma$  nel controllo dei meccanismi di contrattilità e rilassamento del muscolo liscio delle vie aeree: ci si è chiesto, infatti, se anche a livello della muscolatura liscia polmonare si assistesse a una regolazione PI3K-dipendente dei livelli di cAMP e delle PDEs come avviene a livello dei cardiomiociti. La nostra attenzione si è rivolta in questo caso alle PDE di tipo 4. Sembra, infatti, che questa famiglia di proteine sia quella maggiormente espressa nel muscolo liscio delle vie aeree. Studi di espressione delle PDE in cellule muscolari lisce delle vie aeree suggeriscono l'importante ruolo di queste proteine nel controllo dei livelli di cAMP (Rosseau *et al*, 1995) e del tono muscolare (Mehats *et al*, 2003) in queste cellule.

Gli esperimenti effettuati sulle trachee intere ottenute da topo wild type, PI3K $\gamma$  knock out e kinase-dead hanno dimostrato che PI3K è coinvolto nella modulazione della contrattilità del muscolo liscio delle vie aeree e che questa modulazione non dipende dall'attività chinasi di PI3K $\gamma$ , ma dallo scaffold della proteina stessa: ciò suggerisce l'importanza di possibili interazioni proteina-proteina nella regolazione fine di cascate di signaling coinvolte nella contrazione o nel tono di base del muscolo liscio. Gli esperimenti di co-immunoprecipitazione, western blotting e attività fosfodiesterasica su cellule muscolari lisce delle vie aeree umane e murine hanno dimostrato che nel muscolo liscio delle vie aeree PI3K $\gamma$  partecipa alla formazione di un complesso costituito dalla sua subunità p84/p87, dalla PDE4B e dalla PKA. In questo complesso, PI3K $\gamma$  sembra

avere la funzione di proteina di ancoraggio alla chinasi-A (AKAP), cioè sembra capace di legare in maniera diretta la PKA, promuovendo l'attivazione della PDE4B e una conseguente riduzione dei livelli di cAMP. L'utilizzo di trachee di topi PI3K $\gamma$  knock-out ha confermato che la mancanza dell'isoforma gamma delle PI3Ks non permette la formazione del complesso appena descritto: in questi preparati si osserva quindi una minore attivazione della PDE4B con conseguente aumento dei livelli di cAMP e del rilassamento del muscolo liscio delle vie aeree. Per comprovare l'esistenza dell'interazione di PI3K $\gamma$  con la PDE4B e la sua rilevanza in modelli in vitro e in vivo di broncospasmo e d'infiammazione polmonare, potrebbe essere importante sviluppare un peptide capace di impedire in modo selettivo il legame tra PI3K $\gamma$  e la PDE4B. In caso di un risultato positivo si aprirebbe la possibilità di sfruttare questa interazione come nuovo possibile bersaglio terapeutico per la BPCO. L'utilizzo di un peptide che manchi del sito di legame con la PKA potrebbe impedire un'attivazione della PDE4, aumentando in questo modo i livelli di cAMP e contribuendo a una condizione di rilassamento del muscolo liscio delle vie aeree in pazienti che in genere presentano una funzionalità polmonare compromessa caratterizzata da una elevata contrattilità del muscolo liscio bronchiale.

In conclusione, la messa a punto di un modello d'infiammazione polmonare indotta dal fumo di sigaretta in grado di mimare alcune caratteristiche dell'infiammazione osservata nella BPCO umana rappresenta un punto di partenza per approfondire i meccanismi cellulari e molecolari della fisiopatologia della BPCO. Il modello di fumo acuto

da noi sviluppato è insensibile ai corticosteroidi e pertanto mostra differenze e vantaggi significativi rispetto al modello tradizionale di neutrofilia delle vie aeree indotta da LPS.

Un vantaggio pratico del modello messo a punto è la sua breve durata rispetto ai modelli cronici realizzati in genere in un periodo di tempo che arriva fino a 6 mesi. Il modello di tipo acuto (4 giorni) è utile per la valutazione di composti in fase di lead optimization (fase iniziale di screening). In genere in questa fase iniziale di sviluppo di un farmaco non si hanno a disposizione grandi quantitativi di composto, per cui con un modello di breve durata si ha la possibilità di valutare le caratteristiche chimico-fisiche di un composto e la sua potenziale efficacia utilizzando quantità minori di composto rispetto a quelle necessarie per un modello che si protrae fino a 6 mesi. L'approccio acuto, benché non sia in grado di determinare effetti di rimodellamento o di indurre lesioni enfisematose, è stato dimostrato rappresentare un utile sistema predittivo per valutare l'effetto di composti sull'infiammazione indotta dal fumo (Morris *et al*, 2008; Martorana, 2005), anche se proprio per la sua breve durata non permette di valutare l'efficacia di composti antiinfiammatori somministrati secondo un regime terapeutico. L'efficacia di un composto in un modello acuto, infatti, non è un criterio sufficiente per garantire a un composto di progredire verso le fasi successive di sviluppo. È necessaria la messa a punto di modelli sub cronici (2 settimane) e cronici (fino a 6 mesi) capaci di mimare alcuni aspetti della BPCO che insorgono in genere in una fase avanzata della malattia (lesioni enfisematose, rimodellamento delle vie aeree). Con questi modelli è possibile somministrare il farmaco secondo un regime

terapeutico e valutare se il farmaco testato nel modello acuto sia capace di mantenere la propria attività anche in questi modelli che si avvicinano maggiormente alla patologia umana.

Gli studi effettuati sull'inibizione dell'isoforma gamma di PI3K (capace di ridurre il reclutamento dei leucociti al sito della lesione infiammatoria in risposta a chemochine e altri chemioattrattanti) e sull'inibizione dell'isoforma delta di PI3K (capace di ripristinare l'effetto antiinfiammatorio dei corticosteroidi in presenza di stress ossidativo) hanno messo in luce l'importanza di inibitori selettivi di queste due isoforme delle PI3Ks come potenziale approccio antiinfiammatorio per la BPCO.

Inoltre, gli studi effettuati sui meccanismi di contrattilità e rilassamento del muscolo liscio delle vie aeree hanno messo in luce il potenziale coinvolgimento di PI3K $\gamma$ , per mezzo della sua attività scaffold, nel controllo del tono della muscolatura liscia delle vie aeree.

## **6. Bibliografia**

**Azoulay-Dupuis E, Torres M, Soler P, Moreau J.** Pulmonary NO<sub>2</sub> toxicity in neonate and adult guinea pigs and rats. *Environment Res* 1983, 30: 322-329

**Barnes NC, Qiu YS, Pavord ID, Parker D, Davis PA, Zhu J, Johnson M, Thomson NC, Jeffery PK:** Anti-inflammatory effects of salmeterol/fluticasone propionate in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006, 173: 736-743

**Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA.** Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*, 2003; 22: 672-688.

**Barnes PJ.** Mediators of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmacol Rew* 56: 515-548, 2004

**Barnes PJ.** How Corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol* 2006, 148: 245-254

**Barnes PJ and Karin M (1997).** Nuclear factor  $\kappa$ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336: 1066-1071

**Bartalesi B, Cavarra E, Fineschi S, Lucatelli M, Lunghi B, Martorna PA and Lungarella G.** Different lung responses to cigarette smoke in two strain of mice sensitive to oxidants. *Eur Respir J* 25: 15-22, 2005

**Billigton CK, Ojo OO, Penn RB, Ito S:** cAMP regulation of airway smooth muscle function. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutic xxx* (2012), 1-9.

**Birrell MA, Wong S, Hardaker EL, Catley MC, McCluskie K, Collins M, Haj-Yahia S, Belvisi MG.** IkappaB kinase-2-independent and -dependent inflammation in airway disease models: relevance of IKK-2 inhibition to the clinic. *Mol Pharmacol* 2006; 69: 1791– 1800.

**Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, Menezes AM, Sullivan SD, Lee Ta, Weiss KB *et al.*** International variation in the prevalence of COPD ( the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet* 2007, 370: 741-750

**Bundschuh DS, Eltze M, Barsig J, Wollin L, Hatzelmann A, Beume R.** In vivo efficacy in airway disease models of roflumilast, a novel orally active PDE4 inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 280- 290, 2001

**Calverley PM, Calverley PM, Rabe KF, Goehring UM, Kristiansen S, Fabbri LM, Martinez FJ; M2-124 and M2-125 study groups:** Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials. *Lancet*. 2009 Aug 29;374(9691):685-94



**Cantley LC.** The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002 May 31;296(5573):1655-7.

**Cavarra E, Bertalesi B, Lucatelli M, Finesci S, Lunghi B, Gambelli F, Ortiz LA, Martorana PA and Lungarella G.** Effects of cigarette smoke in mice with different levels of alpha(1)-proteinase inhibitor and sensitivity to oxidants. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 886-890, 2001

**Cho HY, Zhang LY, Kleeberger SR.** Ozone-induced lung inflammation and hyperreactivity are mediated via tumor necrosis factor- receptors. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L537–L546, 2001.

**Chung A, Zay K, Shay S, Xie C, Shapiro SD, Hendricks R, Wright JL.** Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown requires both neutrophils and macrophage metalloelastase in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002, 27: 368-374

**Chung KF. and Adcock IM.** Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J* 2008; 31: 1334-1356

**Curnock AP, Logan MK Ward SG.** Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases. *Immunology*. 2002 Feb;105(2):125-36.

**DiPilato LM, Zhang J.** The role of membrane microdomains in shaping beta2-adrenergic receptor-mediated cAMP dynamics. *Mol Biosyst.* 2009;5:832-837.

**Engelstatter R, Wingertzahn M, Schmid-Wirlitsch C, et al 2005.** Roflumilast an oral, once-daily phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor, does not exhibit bronchodilatory activity. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 1: 159

**Fabbri LM et al.** Roflumilast improves lung function in patients with moderately severe chronic obstructive pulmonary disease treated with long acting bronchodilators. *The Lancet* 2009: 374, 695–703

**Facchinetti F, Amadei F, Geppetti P, Tarantini F, Di Serio C, Dragotto A, GigliPM, Catinella S, Civelli M, Patacchini R:** Alpha,beta-unsaturated aldehydes in cigarette smoke release inflammatory mediators from human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007 Nov;37(5):617-23

**Feng WG, Wang YB, Zhang JS, Wang XY, Chang ZL.** cAMP elevators inhibit LPS-induced IL-12 p40 expression by interfering with phosphorylation of p38 MAPK in murine peritoneal macrophages. *Cell Res* 12(5-6): 331-7, 2002

**Ferry G, Lochampt M, Pennel L, et al.** Activation of MMP-9 by neutrophil elastase in an in vivo model of acute lung injury. *FEBS Lett* 1997;402:111-115

**Franke, T.F. (2008).** Intracellular signaling by Akt: bound to be specific. *Sci Signal* 1, pe29.

**Ghigo A, Perino A, Mehel H, Zahradníková A Jr, Morello F, Leroy J, Nikolaev VO, Damilano F, Cimino J, De Luca E, Richter W, Westenbroek R, Catterall WA, Zhang J, Yan C, Conti M, Gomez AM, Vandecasteele G, Hirsch E, Fischmeister R:** Phosphoinositide 3-Kinase  $\gamma$  Protects Against Catecholamine-Induced Ventricular Arrhythmia Through Protein Kinase A-Mediated Regulation of Distinct Phosphodiesterases. *Circulation*, 2012,126(17):2073-83.

**Groneberg DA, Chung KF.** Models of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory research* 5:18, 2004

**Grootendorst DC, Gauw SA, Verhoosel RM, Sterk PJ, Hospers JJ, Bredenbroeker D, Bethke TD, Hiemstra PS, Rabe KF.** Reduction in sputum neutrophil and eosinophil numbers by the PDE4 inhibitor roflumilast in patients with COPD. *Thorax* 2007; 62: 1081–1087.

**Haddad J (2004).** Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signalling pathways: immuno-pharmacoredox conception of oxidative siege versus cell death commitment. *Int Immunopharmacol* 4: 475-493

**Hajiro T, Nishimura K, Tsukino M et al.** Stage of disease severity and factors that affect the health status of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2000; 94:841-846

**Hatzelmann A, Schudt C.** Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 267-279, 2001

**Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD.** Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 1997, 277: 2002-2004

**Hellerman GR, Nagy SB, Kong X, Lochev RF, and Mohapatra SS (2002).** Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respir Res* 3:22-28

**Hirsch, E., Katanaev, V.L., Garlanda, C., Azzolino, O., Pirola, L., Silengo, L., Sozzani, S., Mantovani, A., Altruda, F., and Wymann, M.P. (2000).** Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* 287, 1049-1053.

**Hogg JC, Utokaparch S, Yamada Y, Elliot WM, Buzatu L, and Cherniack RM (2004).** The nature of small airway obstruction in chronic pulmonary obstructive disease. *N Engl J Med*; 350: 2645-2653

**Huang Q, Liu D, Majewski P, Schulte LC, Korn JM, Young RA, Lander ES, and Hacohen N (2001).** The plasticity of dendritic cell response to pathogens and their components. *Science (Wash DC)* 294: 870-875

**Ito K, Lim S, Caramori G, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM.** Cigarette smoking reduced histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J* 2001; 18 (suppl): 1100-1102

**Ito K, Caramori G, Lim S, et al.** Expression and activity of histone deacetylase (HDACs) in human asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 392-396

**Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, Barczyk A, Hayashi S, Adcock IM, Hogg JC, Barnes PJ:** decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2005, 352: 1967-1976.

**Ito K, Caramori G, and Adcock IM.** Therapeutic Potential of Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitors in Inflammatory Respiratory Disease. *THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS*; Vol. 321, No. 1, 2007

**Kirichenko A, Li L, Morandi MT, Holian A.** 4-Hydroxy-2-nonenalprotein adducts and apoptosis in murine lung cells after acute ozone exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 141: 416–424, 1996.

**Kondo T, Tagami S, Yohioka A, Nishumura M, Kawakami Y.** Current smoking of elderly men reduces antioxidants in alveolar macrophages. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:178-181

**Kwak HJ, Park KM, Choi HE, Chung KS, Lim HJ, Park HY.** PDE4 inhibitor, roflumilast protects cardiomyocytes against NO-induced apoptosis via activation of PKA and Epac dual pathways. *Cell Signal.* 2008 May;20(5):803-14.

**Lacoste JY, Biusquete J, and Chanez P (1993).** Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 92: 537-548

**Lannan S, Donaldson K, Brown D, MacNee W.** Effects of cigarette smoke and its condensates on alveolar cell injury in vitro. *Am J Physiol* 1994; 266: L92-100

**Leclercq O, Lagente V, Planquois JM, Berthelie C, Artola M, Eicholtz T, Bertrand CP, Schmidlin F (2006).** Involvement of MMP-12 and phosphodiesterase type 4 in cigarette smoke-induced inflammation in mice. *Eur Respir J* 27:1102-1109

**Lee KS, Kim SR, Park SJ, Lee HK, Park HS, Min KH, Jin SM, Lee YC.** Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) reduces vascular endothelial growth factor expression in allergen-induced airway inflammation. *Mol Pharmacol.* 2006 Jun;69(6):1829-39

**MacNee W, Wiggs B, Berzberg AS, Hogg JC.** The effects of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs. *N Engl J Med* 1989; 321: 924-928

**MacNee W.** Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest* 117, 303-317, 2000

**Mannino DM, Buist AS.** Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 2007; 370: 765-773

**March TH, Barr EB, Finch GL, Hann FF, Hobbs CH, Menache MG and Nikula KJ.** Cigarette smoke exposure more evidence of emphysema in B6C3F1 mice than in F344 rats. *Toxicol Sci* 51: 289-299, 1999

**Martin-Chouly CA, Astier A, Jacob C, et al 2004.** Modulation of matrix metalloproteinase production from human lung fibroblasts by type 4 phosphodiesterase inhibitors. *Life Sci*, 7: 823-840

**Martorana PA, Beume R, Lucatelli M, Wollin L, and Lungarella G.** Roflumilast fully prevents emphysema in mice chronically exposed to cigarette smoke. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 848-852

**Marwick JA, Kirkham PA, Stevenson CS, DANAhay H, Giddings J, Butler K, Donaldson K, Mac Nee W, Rahman I:** Cigarette smoke alters chromatin remodelling and induces pro-inflammatory genes in rat lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004, 31: 633-642.

**Marwick JA, Caramori G, Stevenson CC, Casolari P, Jazrawi E, Barnes PJ, Ito K, Adcock IM, Kirkham PA, Papi A.** Inhibition of PI3Kdelta restores glucocorticoid function in smoking-induced airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 542-548

**Mata M, Sarria B, Buenestado A, et al. 2005.** Phosphodiesterase 4 inhibition decreases MUC5AC expression induced by epidermal growth factor in human airway epithelial cells. *Thorax*, 2: 144-152

**McGraw DW, Forbes SL, Kramer LA, Witte DP, Fortner CN, Paul CJ, and Liggett SB.** Transgenic Overexpression of  $\beta_2$ -Adrenergic Receptors in Airway Smooth Muscle Alters Myocyte Function and Ablates Bronchial Hyperreactivity. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*; Vol. 274, No. 45, Issue of November 5, pp. 32241-32247, 1999

**Medicherla S, Fitzgerald M, Spicer D, Woodman P, Ma JY, Kapoun AM, Chakravarty S, Dugar S, Protter AA, Higgins LS.** p38a selective MAP kinase inhibitor, SD-282, reduces inflammation in a sub-chronic model of tobacco smoke-induced airway inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 324: 921–929.

**Mehats C, Jin C, Wahlstrom J, Law E, Umetsu DT, and Conti M.** PDE4D plays a critical role in the control of airway smooth muscle contraction *FASEB J October 2003 17:1831-1841*

**Moretto N, Facchinetti F, Southworth T, Civelli M, Singh D, Patacchini R.** Alpha,beta-Unsaturated aldehydes contained in cigarette smoke elicit IL-8 release in pulmonary cells through mitogen-activated protein kinases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009 May;296(5):L839-48

**Morris A, Kinnear G, Wan WH, Wyss D, Bahra P, and Stevenson CS.** Comparison of cigarette smoke-induced acute inflammation in multiple strains of mice and the effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on these responses. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2008; 327: 851-862

**Nightingale JA, Rogers DF, Chung KF, Barnes PJ.** No effect of inhaled budesonide on the response to inhaled **ozone** in normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Feb;161(2 Pt 1):479-86.

**Jiang H, Xie Y, Abel PW, Toews ML, Townley RG, Casale TB, TuY, et al.** targeting phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  in airway smooth muscle cells to suppress interleukin-13-induced mouse airway hyperresponsiveness. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*; 342:305-311, 2012

**Okada Y, Watanabe S, Nakanishi I, et al.** Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases by neutrophil elastase and other serine proteinases. *FEBS Lett* 1988; 229:157-160

**Patrucco, E., Notte, A., Barberis, L., Selvetella, G., Maffei, A., Brancaccio, M., Marengo, S., Russo, G., Azzolino, O., Rybalkin, S.D., et al. (2004).** PI3K $\gamma$  modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* 118, 375-387.

**Pauluhn J.** Validation of an Improved Nose-only exposure System for Rodents. *Journal of applied Toxicology*, 14:55-62, 1994

**Perino A, Ghigo A, Ferrero E, Morello F, Santulli G, Baillie GS, Damilano F, Dunlop AJ, Pawson C, Walser R, Levi R, Altruda F, Silengo L, Langerberg LK, Neubauer G, Heymans S, Lembo G, Wymann MP, Wetzer R, Houslay MD, Iaccarino G, Scott JD, Hirsch E, et al.** Integrating cardiac PIP3 and cAMP signalling through a PKA anchoring function of p110 $\gamma$ ; *Mol Cell* 42 (1): 84-95, 2011

**Pettersen CA and Adler KB (2002).** Airways inflammation and COPD: epithelial neutrophil interactions. *Chest* 121 (Suppl): 142S-150S.

**Petty TL.** The History of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2006; 1(1): 3–1

**Postma DS, Renkema TEJ, Noordhoek JA, Faber H, Sluiter HJ, Kauffman H et al.** Association between nonspecific bronchial hyperreactivity and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes in chronic airflow obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 57-61

**Prieto A, Reyes E, Berstein ED, Martinez B, Monserrat J, Izquierdo JL, Callol L, De Lucas P, Alvarez-Sala R, Alvarez-sala JL, et al. (2001).** Defective natural killer and phagocytic activities in chronic obstructive pulmonary disease are restored by glycoprophosphopeptical (immunoferon). *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1578-1583

**Profita M, Chiapparra G, Mirabella F et al.** Effect of cilomilast (Ariflo) on TNF $\alpha$ , IL-8 and GM-CSF release by air way cells of patients with COPD. *Thorax* 58: 573-9, 2003

**Pryor WA and Stone K (1993).** Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate and peroxyxynitrite. *Ann NY Acad Sci* 686: 12-27

**Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Carverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, Van Weel C, et al.** Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 532-555, 2007

**Rahman I, Morrison D, Donaldson K, and MacNee W (1996).** Systemic oxidative stress in asthma, COPD and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 1055-1060

**Rahman I.** Oxidative stress, chromatin remodelling and gene transcription in inflammation and chronic lung disease. *J Biochem Mol Biol* 36: 95-109, 2003

**Rahman I and Adcock IM.** Cigarette smoke and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* 28: 219-242, 2006

**Renda T, Baraldo S, Pelaia G, Bazzan E, Turato G, Papi A, Maestrelli P, Maselli R, Vatrella A, Fabbri LM, Zuin R, Marsico SA, Sietta M.** Increased activation of p38 MAPK in COPD. *Eur Respir J* 2008; 31: 62–69.

**Retamales I, Elliot WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciruba FC, Rogers RM, Hayashi S, and Hogg JC (2001).** Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 469-473

**Rossi A, Khirami S, and Cazzola M.** Long-acting  $\beta$ 2-agonist (LABA) in chronic obstructive pulmonary disease: efficacy and safety. *International Journal of COPD* 2008; 3(4)

**Rousseau, E., Dostie, J., Taoudi-Benchekroun, M., Cadieux, A., Beaudry, C., Lugnier, C. (1995)** Specific cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors differently modulate contractile kinetics in airway smooth muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73,1784-1794

**Saetta M, Turato G, Facchini FM, et al.** Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156; 1633-1639.

**Selby C, Drost E, Lannan S, Wraith PK, MacNee W.** Neutrophil retention in the lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Respir Dis* 1991; 143: 1359-1364

**Scullion JE.** The development of anticholinergics in the management of COPD. *International Journal of COPD* 2007; 2:33-40

**Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton AM, et al.** Neutrophil elastase contributes to cigarette-smoke induced emphysema in mice. *Am J Pathol* 2003; 163:289-298

**Smith SJ, Fenwick PS, Nicholson AG, Kirschenbaum F, Finney-Hayward TK, Higgins LS, Giembycz MA, Barnes PJ, Donnelly LE.** Inhibitory effect of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors on cytokine release from human macrophages. *Br J Pharmacol* 2006; 149: 393–404.

**Stephens L.R, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, Smrcka AS, Thelen M, Cadwallader K, Tempst P and Hawkins PT.** The G $\beta$  $\gamma$  Sensitivity of a PI3K Is Dependent upon a Tightly Associated Adaptor, p101. *Cell*, Vol. 89, 105–114, April 4, 1997

**Tanino M, Betsuyaku T, Takeyabu K, Tanino Y, Yamaguchi E, Miyamoto K, and Nishimura M (2002).** Increase levels of interleukin-8 in BAL fluid from smokers susceptible to pulmonary emphysema. *Thorax* 57: 405-411

**Takeda M, Ito W, Tanabe M, Ueki S, Kihara J, Kato H, Tanigai T, Kayaba S, Sasaki T, Chihara Y.** The pathophysiological roles of PI3Ks and therapeutic potential of selective inhibitors in allergic inflammation. *Allergy Immunology* 2010; 152 (suppl 1); 90-95`

**Thompson WJ, Appleman MM.** Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases of rat tissues. *J Biol Chem.* 1971;246:3145-3150.

**Tomita K, Caramori G, Lim S, Ito K, Hanazawa T, Oates T, Chiselita I, Jazrawi E, Chung KF, Barbes PJ, et al. (2002).** Increase p21 Cip1/WAF1 and B cell lymphoma leukemia-xL expression and reduced apoptosis in alveolar macrophages from smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 166:724-731

**Ward S, Sotsios Y, Dowden J, Bruce I, Finan P.** Therapeutic potential of phosphoinositide 3-kinase inhibitors. *Chem Biol* 2003; 10: 207–213.

**Wendel DP, Taylor DG, Albertine KH, Keating MT, Li DY.** Impaired distal airway development in mice lacking elastin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000, 23: 320-326

**Wright JL and Chung A.** Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *Am Rev Respir Dis* 142:I422-I428, 1990

**Yao H, Edirisinghe I, Rajendrasozhan S, Yang s, Caito S, Adenuga D and Rahman I.** Cigarette smoke-mediate inflammatory and oxidative responses are strain dependent in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* June 294(6): L1174-86, 2008

**Zhai K, Hubert F, Nicolas V, Ji G, Fischmeister R, Leblais V.**  $\beta$ -Adrenergic cAMP signals are predominantly regulated by phosphodiesterase type 4 in cultured adult rat aortic smooth muscle cells. *PLoS One*. 2012;7(10): e47826

In fede

Anna Rita Pisano



