

Introduzione

Nei laboratori della Pneumologia della Facoltà di Medicina e Chirurgia di Palermo, da più di dieci anni si studiano gli effetti biologici dell'esercizio fisico e dell'allenamento sul sistema respiratorio in soggetti normali e affetti da patologie respiratorie come l'asma bronchiale.

Tali studi hanno evidenziato uno stato infiammatorio nelle vie aeree degli atleti, non associato a modificazioni di broncoreattività o sintomi respiratori. Questi dati sono stati ottenuti mediante studi non invasivi, che hanno utilizzato metodiche normalmente applicate ai pazienti con malattie respiratorie, quali l'induzione dell'espettorato mediante soluzione salina ipertonica per studiare la composizione cellulare delle vie aeree di conduzione, o lo studio dell'ossido nitrico esalato, usualmente utilizzato in soggetti asmatici come indicatore di flogosi bronchiale.

Il seguente lavoro ha lo scopo di comprendere gli effetti dell'esercizio fisico in atleti sottoposti ad un allenamento costante e ripetuto, valutando lo stato infiammatorio che si instaura a causa dell'esercizio e il ruolo dell'epitelio bronchiale sottoposto a diverse modificazioni di adattamento alla condizione infiammatoria. In particolare, è stata studiata la produzione di IL-8 in vitro delle cellule epiteliali bronchiali esposte a stimolo iperosmolare, e il potenziale ruolo delle MAP-kinasi nella flogosi delle vie aeree da esercizio fisico.

L'originalità degli studi in vitro risiede nella raccolta di campioni negli atleti non soltanto in condizioni di riposo, ma anche al termine dell'evento agonistico, e nelle 24 ore successive, al fine sia di studiare direttamente gli effetti dell'esercizio sulle cellule delle vie aeree, sia di valutare il grado di cronicità dell'infiammazione delle vie aeree generata dall'allenamento continuo.

Complessivamente, i risultati ottenuti sin ora, non indicano chiaramente che l'esercizio fisico intenso abituale può essere dannoso per la salute respiratoria. Piuttosto, le modifiche delle vie aeree possono rappresentare risposte di adattamento cronico all'iperventilazione da sforzo. Una migliore comprensione degli effetti dell'esercizio fisico sulle vie respiratorie avrà probabilmente un impatto clinico sulla medicina dello sport, e l'attuale approccio alla riabilitazione nelle malattie respiratorie basate sull'esercizio fisico.(6)

Questo studio è stato svolto in collaborazione con la Dott. Mirella Profita della sezione IBIM del CNR di Palermo, ed è stato la base per la stesura dell'Abstract dal titolo: "Similar cellular composition of induced sputum in Marathon and Half-Marathon runners" presentato all' **European Respiratory Society Annual Congress 2013**.

Capitolo I

Effetti dell' esercizio fisico negli atleti: sport e studi sperimentali a confronto

L'esercizio fisico è un modello per studiare la risposta del sistema cardio-respiratorio all'aumento delle richieste metaboliche, sia in condizioni fisiologiche che in pazienti con malattie cardiovascolari o polmonari. La classica descrizione degli effetti dell'esercizio fisico riguarda le variazioni di portata cardiaca e di ventilazione richieste per aumentare l'apporto di ossigeno ai muscoli scheletrici in attività. Negli ultimi anni lo studio dell'esercizio fisico si è svolto con un'approccio "biologico" volto ad analizzare le variazioni della componente cellulare delle vie aeree e il rilascio di mediatori a seguito dell'esercizio. È ormai noto che gli atleti che svolgono esercizi di endurance, come corridori o nuotatori, sono più suscettibili all'insorgenza di asma e allergie (10). Questi atleti presentano un quadro noto in letteratura come EIA (exercise-induced asthma) che si caratterizza per una lieve ostruzione delle vie aeree e sintomi quali tosse e dispnea (11). La riduzione della funzionalità polmonare che si verifica dopo l'esercizio fisico è invece definita EIB (exercise-induced bronchoconstriction).

Differenti sono le ipotesi che sono state avanzate per spiegare quali meccanismi si instaurino a causa dell'esercizio fisico negli atleti. Una di queste è l'ipotesi osmotica, secondo la quale l'iperventilazione promuoverebbe l'aumento dell'osmolarità del liquido di rivestimento delle vie aeree, con conseguente riduzione del volume cellulare dell'epitelio bronchiale. La regolazione del volume

cellulare a seguito della perdita di liquidi causerebbe rilascio di mediatori e reclutamento di cellule infiammatorie (3) (4) (5).

Altri studi hanno esaminato gli effetti del raffreddamento delle vie aeree causato dall'aumento della ventilazione. L'esercizio di endurance richiede un'aumento della ventilazione per venire incontro alle richieste di ossigeno da parte del muscolo scheletrico. Ciò comporta un'introduzione di aria umida e fredda nelle vie aeree con conseguente perdita di calore dalle mucose delle vie respiratorie. Questo meccanismo potrebbe causare un danno epiteliale e il richiamo di cellule e mediatori dell'infiammazione (12). Il raffreddamento delle vie aeree si riflette anche sulla stimolazione nervosa del circuito parasimpatico. Il sistema parasimpatico promuove la broncocostrizione attraverso la stimolazione del nervo vago, che svolge una duplice azione: da una parte causa vasocostrizione delle venule bronchiali che tende a conservare il calore, dall'altra a fine esercizio, comporta iperemia secondaria con congestione vascolare a livello bronchiale, edema e costrizione delle vie aeree (12). Si pensa che l'esercizio ripetuto di endurance determini una stimolazione continua del nervo vago che, come è noto, è responsabile della bradicardia a riposo negli atleti, e parallelamente causerebbe un aumento del tono della muscolatura bronchiale con conseguente broncospasmo (13). È importante sottolineare che il danno alle vie respiratorie causato dall'esercizio fisico si verifica sia in atleti asmatici, sia in atleti perfettamente sani (14), poiché di per sé, l'iperpnea da sforzo fisico causa l'aumento dei gradienti pressori dell'albero bronchiale con conseguente danno all'epitelio bronchiale (15). Infine, non deve essere trascurato il ruolo dei fattori ambientali, quali la temperatura e l'umidità dell'aria, la presenza di allergeni e inquinanti, così come la storia personale di ogni atleta, fattori di rischio e genetici

che potrebbero rendere maggiormente suscettibile l'individuo alle condizioni sopra esposte.

Capitolo II

Biologia delle vie aeree ed esercizio fisico

È ormai noto che l'esercizio di endurance causa infiammazione sistemica negli atleti (16). Uno studio del 1998 effettuato su 10 maratoneti, ha evidenziato nel plasma di questi soggetti, un aumento delle citochine pro- infiammatorie in particolare: $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 (17). Altri studi svolti su corridori, hanno evidenziato un aumento, nel sangue di questi soggetti, di PMN (18), e un aumento della concentrazione di elastasi, enzima rilasciato a seguito dell'attivazione e conseguente degranulazione dei PMN (19). Di importante rilevanza sono gli studi effettuati esaminando la composizione cellulare e la presenza di mediatori dell'espettorato indotto e nel liquido bronco-alveolare di atleti. Lo studio dell'espettorato indotto e del BALF ha mostrato un aumento di neutrofili ed eosinofili in nuotatori e sciatori di fondo (20) (21). Tale aumento potrebbe essere collegato al danno all'epitelio bronchiale, che soggetto a disidratazione a causa dell'iperventilazione da sforzo, può favorire sia il distacco di cellule epiteliali, che essere responsabile del rilascio di mediatori dell'infiammazione che richiamerebbero neutrofili nelle vie aeree (5). Uno studio del 2009, che prendeva in esame 64 atleti sani, 32 nuotatori e 32 sciatori, ha inoltre dimostrato che la conta dei neutrofili nell'espettorato indotto correlava con il numero di ore di allenamento per settimana. La conta degli eosinofili risultava in aumento nei nuotatori se paragonati al soggetto sano non atleta, ma se paragonata a soggetti asmatici il numero degli eosinofili era comunque più

basso, indicando quindi come le due condizioni siano comunque distinte. Infine, le cellule epiteliali bronchiali risultavano nettamente aumentate in entrambi i gruppi di atleti rispetto ai soggetti sani non allenati e rispetto ai soggetti con asma (22).

E' importante ricordare che il grado ed il tipo di infiammazione delle vie aeree cambia secondo lo sport praticato, probabilmente a causa della diversa esposizione ambientale durante l'attività fisica. Ad esempio, negli sciatori di fondo e più in generale negli atleti di sport invernali, un particolare quadro clinico, denominato "ski asthma" è di frequente riscontro clinico. In questi atleti, lo studio del liquido di lavaggio broncoalveolare (BALF) e delle biopsie bronchiali ha documentato un aumento delle cellule totali e della conta dei linfociti nel BALF, aggregati linfoidi ed un incremento delle cellule infiammatorie (linfociti T, macrofagi, eosinofili e neutrofili) nelle biopsie endobronchiali (23). Questo quadro è molto simile a quello documentato nei cani da slitta (40) descritto successivamente, e le condizioni ambientali (aria molto fredda e secca) sono compatibili con l'ipotesi di danno epiteliale da insufficiente condizionamento dell'aria inspirata durante esercizio. Nonostante il quadro clinico sia simile all'asma, negli sciatori di fondo con sintomi respiratori da sforzo non è stato documentato alcun effetto significativo della terapia con corticosteroidi per inalazione, né da un punto di vista clinico, né da quello della composizione cellulare del BALF (24).

Un altro modello per studiare gli effetti dell'esercizio fisico sono i nuotatori d'élite, nei quali la prevalenza dell'asma bronchiale è particolarmente alta a causa dell'esposizione ambientale al cloro delle piscine (25). Il cloro è fortemente irritante sulle mucose, e i nuotatori d'élite sono esposti per diverse

ore al giorno ad ambienti ricchi di cloro e poco ventilati (piscine coperte). Al fine di avvalorare l'ipotesi dell'azione nociva del cloro sulla mucosa respiratoria, bisogna citare due importanti studi: il primo, uno studio di follow-up per 5 anni, che ha evidenziato aumento dell'infiammazione delle vie aeree nei nuotatori d'élite che continuavano l'attività agonistica, mentre il gruppo che aveva interrotto l'attività agonistica mostrava riduzione della flogosi bronchiale (26); il secondo che mostrava come atleti amatoriali che si allenavano in piscina all'aperto ed esposti a basse concentrazioni di cloro nell'aria inspirata non mostravano aumento degli eosinofili, ma soltanto un modesto aumento dei PMN nell'espettorato indotto (27). Un altro studio interessante ha esaminato l'espettorato indotto raccolto in canottieri agonisti dopo uno sforzo sopra-massimale, durante il quale sono state registrate le variabili cardiorespiratorie. Il canottaggio è uno sport che coinvolge una grande massa muscolare e richiede una ventilazione molto elevata. Dopo sforzo "all-out" sui 1000 m al remoergometro, l'espettorato indotto mostrava aumento delle BEC (Figura 1), con un trend positivo rispetto alla ventilazione sotto sforzo (28).

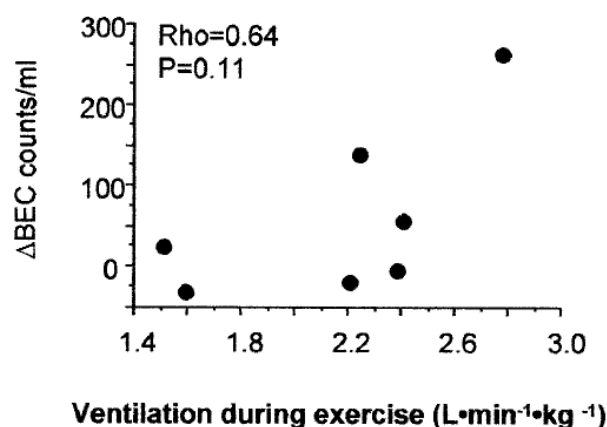


Figura 1. Nei canottieri agonisti dopo sforzo sopramassimale, è evidente un trend verso l'aumento delle BEC all'aumentare della ventilazione durante sforzo (Morici 2004).

Questi risultati sono in accordo con l'ipotesi che l'aumento della ventilazione sotto sforzo possa essere il fattore principale responsabile delle alterazioni delle BEC nelle vie aeree.

Attraverso i dati in letteratura, è quindi possibile affermare che gli atleti di sport di endurance presentano un aumento del numero di cellule infiammatorie, nel sangue periferico, nelle biopsie bronchiali, BALF o espettorato indotto. Un'aumentata conta di eosinofili e linfociti è stata registrata in nuotatori e sciatori, rispettivamente, suggerendo che fattori ambientali possono modulare questi tipi cellulari. Infine, i dati ottenuti nei canottieri suggeriscono una correlazione tra numero di BEC nell'espettorato ed entità dell'iperventilazione sotto sforzo.

Ulteriori studi sono necessari, tuttavia, per capire i meccanismi responsabili del controllo dell'attivazione infiammatoria, e per valutare le relazioni tra quantità/intensità dell'allenamento e cambiamenti morfo-funzionali nelle vie aeree. Va ricordato che questi studi hanno preso in esame gli atleti in condizioni di riposo, e non immediatamente dopo esercizio.

Capitolo III

Il modello “Maratona”: Studi Sperimentali

Una disciplina sportiva, tipicamente definita come uno sport “di endurance” è la maratona, una specialità tipicamente aerobica. I maratoneti infatti, per resistere allo sforzo di oltre due ore di gara, utilizzano il meccanismo aerobico per sintetizzare ATP, fonte di energia per il sistema muscolare.

Uno dei primi studi, effettuati in occasione della Maratona del 1998, è stato svolto dal gruppo di ricerca del laboratorio di Immunopatologia Polmonare dell’azienda ospedaliera “Ospedali Riuniti Villa Sofia-Cervello”. Tale studio è stato il primo a prendere in considerazione, come oggetto di studio, atleti amatoriali sani, non asmatici, allo scopo di studiare gli effetti biologici di una maratona. Inoltre questo lavoro ha, per la prima volta, messo in luce l’aumento cospicuo di PMN in atleti non asmatici immediatamente dopo la gara (1), in assenza di livelli significativi di inquinanti ambientali, poiché il traffico urbano era stato interrotto per l’intera giornata (figura 2). Al contrario, in soggetti normali sedentari, il processamento e la conta cellulare differenziale dell’espettorato indotto mostravano una predominanza di macrofagi, circa il 60%, e di neutrofili, circa il 35% (29).

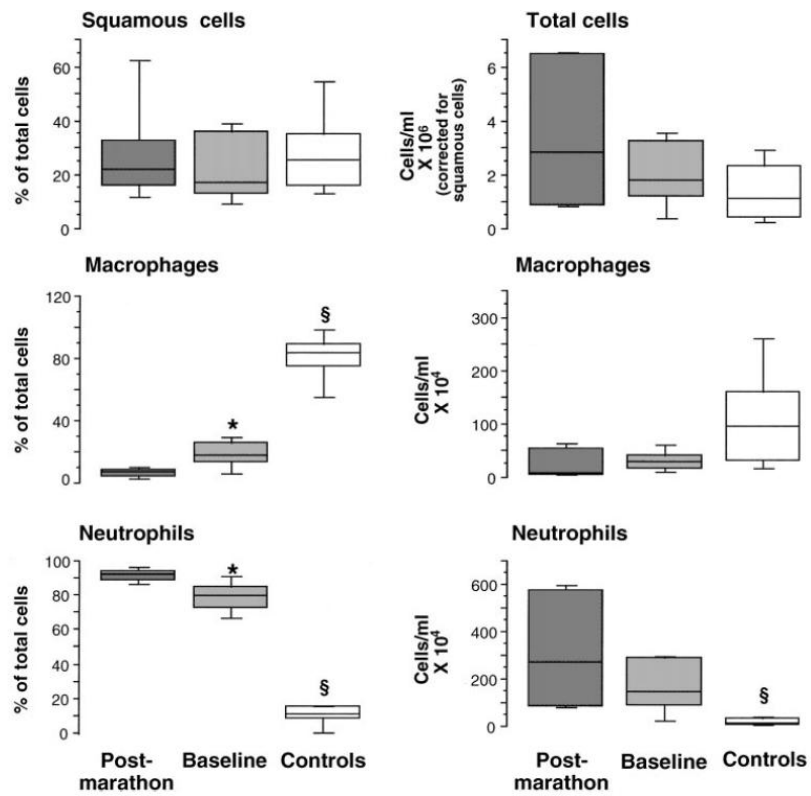


Figura 2. Composizione cellulare dell'espettorato indotto in maratoneti dopo la gara (post-marathon), a riposo (baseline), ed in un gruppo di controlli sedentari (Bonsignore 2001).

Inoltre in questo studio è stato utilizzato un noto marcatore di infiammazione delle vie aeree, NO esalato, che risultava aumentato rispetto ai livelli basali.

È importante sottolineare due ulteriori aspetti:

- la positività per la molecola di adesione CD11b/CD18, che indica attivazione dei PMN, era scarsa sia in condizione di riposo che dopo la gara, e ciò indicava che nonostante l'espettorato mostrasse un aumento di PMN sia in condizioni di riposo che dopo la gara, questi non avevano subito un'attivazione pro infiammatoria.
- L'elastasi, un enzima tipicamente rilasciato dai PMN attivi, non subiva alcuna variazione, rispetto ai livelli basali, nell'espettorato raccolto dopo la gara, confermando l'assenza di attivazione pro infiammatoria dei PMN nelle vie aeree degli atleti presi in esame.

Per comprendere al meglio l'assenza di attivazione dei PMN è stata avanzata l'ipotesi che la mancata positività per la molecola di adesione CD11b/CD18 sia dipendente dalla presenza del cortisolo, rilasciato a seguito dell'esercizio fisico. Effettivamente la presenza di cortisolo nel plasma correlava inversamente con CD11b/CD18 nell'espettorato indotto (figura 3)(1).

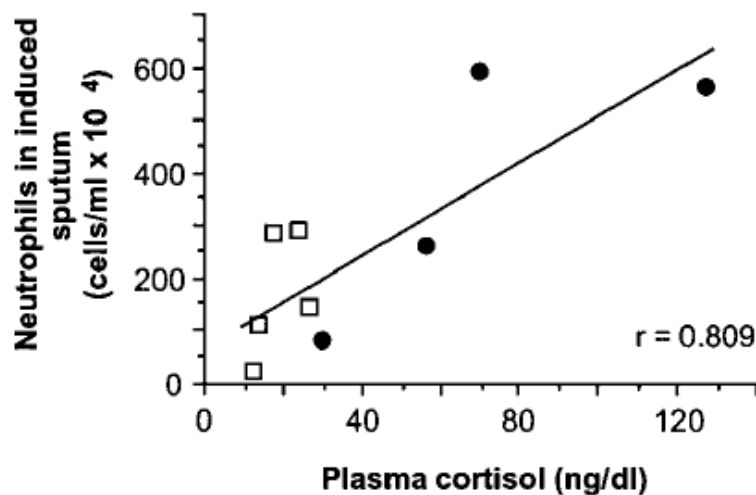


Figura 3. Il numero di PMN nell'espettorato indotto correla positivamente alla concentrazione di cortisolo plasmatico. I simboli indicano la condizione di riposo (quadrati vuoti) e il post-gara (cerchi pieni) (Bonsignore 2001).

Infine, controversa è l'interpretazione dell'aumento dell'NO esalato, poiché sebbene in letteratura sia considerato un marcatore di infiammazione (30)(31)(32), vi sono risultati che dimostrano un ruolo di NO nella modulazione dell'attività chemio tattica dei PMN (33), altri che invece dimostrano che l'NO sia un modulatore dell'attività del sistema non adrenergico non colinergico delle vie aeree, coinvolto nel broncospasmo (34).

Capitolo IV

La mezza Maratona: Studi Sperimentali

Diversi studi suggeriscono che l'infiammazione delle vie aeree, in atleti che praticano sport di endurance, mostra caratteristiche peculiari come l'aumento dei neutrofili (1) e delle BEC (28) nell'espettorato indotto. Al fine di comprendere al meglio tali dati, è stato ipotizzato che lo studio una mezza maratona, più breve rispetto alla maratona, ma comunque considerata uno sport di endurance, possa fornire dati utili sul decorso temporale delle modificazioni indotte dall'esercizio fisico. Per tale scopo è stata valutata la composizione cellulare e la presenza di mediatori dell'infiammazione come IL-8, conosciuto per l'azione di richiamo rivolta verso i neutrofili, nell'espettorato indotto di 15 atleti dilettanti prima e dopo la competizione (2). Sono stati raccolti i dati di tre differenti mezze maratone, svoltesi in tre differenti periodo dell'anno, Ottobre, Maggio e Novembre, e sono stati analizzati alcuni fattori ambientali, come la presenza di allergeni nell'aria o di inquinanti, al fine di comprendere se esiste un ruolo possibile di questi nei riguardi dell'infiammazione delle vie aeree indotta dall'esercizio. Sorprendentemente, l'espettorato indotto raccolto alla fine della gara non mostrava aumento di PMN, mentre era presente un sostanziale incremento delle BEC (fig 4) e circa il 25% di queste risultavano apoptotiche dopo la metodica TUNEL (fig 5). Inoltre i livelli di interleuchina 8 (IL-8) risultavano raddoppiati dopo una gara di Mezza maratona rispetto al basale e correlavano positivamente con la conta assoluta delle BEC (fig 6).

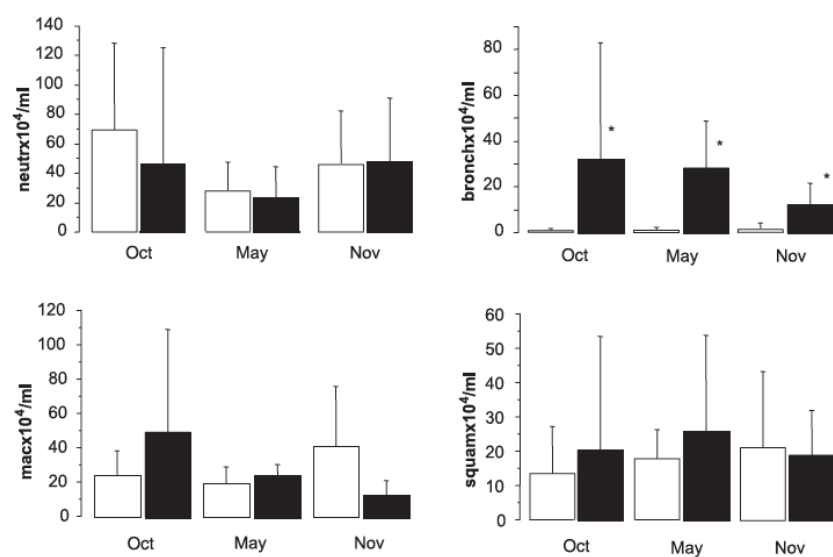


Figura 4. Conte cellulari dopo una gara di Mezza maratona. E' evidente l'aumento post-gara (colonne nere) delle BEC (Chimenti 2010).

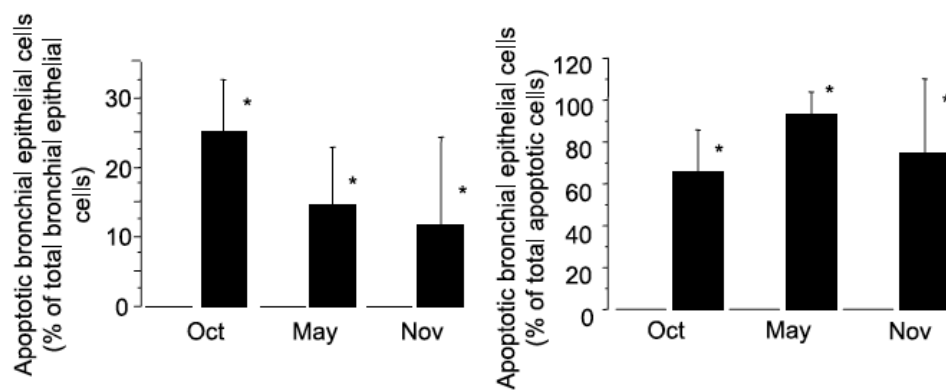


Figura 5. L'apoptosi delle cellule epiteliali bronchiali era praticamente assente in condizioni di riposo, mentre aumentava significativamente dopo ogni gara di Mezza maratona (Chimenti 2010).

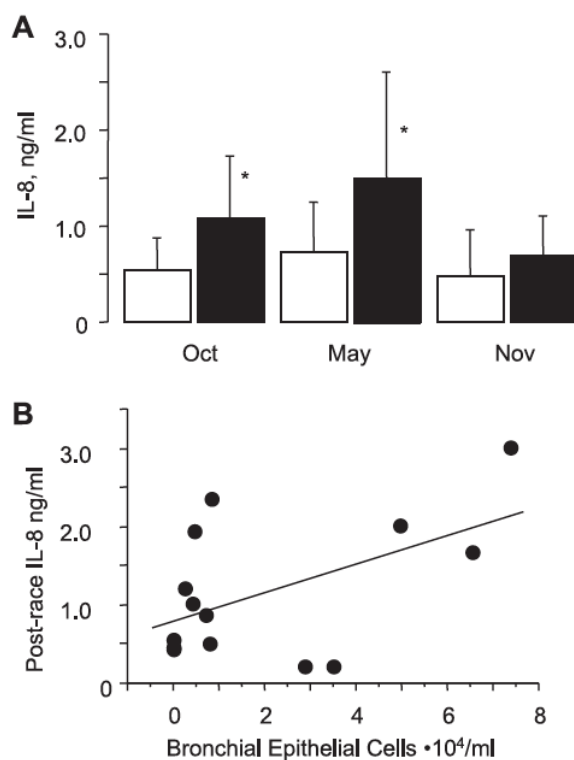


Figura 6. La concentrazione di IL-8 aumenta dopo la Mezza maratona (pannello A; condizioni di riposo: colonne bianche, post-gara: colonne nere) e correla con le conte delle BEC nell'espettorato (pannello B) (Chimenti 2010).

Questi dati suggerivano che l'esercizio di endurance causa danno all'epitelio bronchiale associato con l'aumento dell'apoptosi e della concentrazione di IL-8 nell'espettorato indotto (2). È possibile che la durata della gara di Mezza maratona non sia sufficiente perché l'afflusso di PMN possa essere documentato nell'espettorato indotto eseguito poco dopo la fine della gara. Va inoltre ricordato che:

- le BEC giocano un ruolo chiave nella risposta immunitaria a causa dell'azione di barriera che svolgono nei confronti di allergeni e inquinanti ambientali. Inoltre possono rilasciare mediatori dell'infiammazione che potenziano l'arrivo dei leucociti nelle vie aeree e tali eventi potrebbero influire sul differenziamento dell'epitelio bronchiale e sull'apoptosi delle cellule epiteliali (35)(36).

- In modelli animali, l'afflusso di neutrofili nelle vie aeree si verificava circa due ore dopo l'iperventilazione selettiva di un segmento polmonare con aria secca e umida (38). Dopo circa tre ore, le BEC erano assenti, con predominanza di neutrofili. Un altro studio su atleti umani documentava che l'espettorato indotto raccolto la mattina dopo una mezza maratona mostrava un lieve aumento dei neutrofili paragonato con la condizione di riposo e un decremento della concentrazione di IL-8 , suggerendo una transitoria attivazione infiammatoria indotta dall'esercizio (37).
- Uno studio eseguito da Denguezli e coll. ha esaminato l'espettorato indotto in condizioni basali in atleti corridori amatoriali durante un periodo di competizione rispetto a periodi di allenamento meno intenso. La concentrazione di IL-8 nelle vie aeree aumentava nel periodo di competizione, ma non sono state trovate correlazioni con la conta delle cellule dell'espettorato (39).

In conclusione questi risultati confermano che l'esercizio di endurance determina uno stato infiammatorio delle vie aeree, con il coinvolgimento in primo luogo dell'epitelio bronchiale, e conseguentemente il rilascio di mediatori dell'infiammazione che richiamano le cellule del sistema immune nelle vie respiratorie.

Capitolo V

L'ipotesi osmotica e il coinvolgimento dell'epitelio bronchiale: studi sperimentali

È noto che il meccanismo del danno osmotico all'epitelio delle vie aeree è rilevante nella patogenesi dell'infiammazione delle vie aeree negli atleti. Normalmente, durante l'inspirazione, il calore ed il vapore acqueo vengono trasferiti dalla mucosa delle vie aeree verso l'aria inspirata che viene riscaldata a temperatura corporea e completamente saturata di vapore d'acqua. Tale meccanismo potrebbe risultare deficitario durante esercizio, a causa degli elevati volumi di aria mobilizzati per far fronte alle aumentate richieste metaboliche da parte dei muscoli scheletrici.

Diversi studi dimostrano che l'iperventilazione durante l'esercizio causa un aumento dell'osmolarità dei liquidi di rivestimento delle vie aeree (3,6). Il liquido di rivestimento delle vie aeree, diventa iperosmolare e genera stimoli osmotici, per cui l'acqua esce dalle cellule vicine, con conseguente perdita del volume cellulare. La regolazione del volume cellulare, dopo la perdita d'acqua da parte della cellula, sarebbe la chiave degli eventi che comporta il rilascio dei mediatori dell'infiammazione, come IL-8, da parte delle cellule bronchiali (4,5). In più, è ormai noto il ruolo delle BEC non solo come barriera contro le sostanze irritanti ambientali, ma anche come modulatori della risposta immunitaria (7).

L'ipotesi osmotica è stata oggetto di indagine in differenti studi sperimentali, tramite modelli *in vitro* o *in vivo*, ed è ampiamente documentata attraverso studi su modelli animali. Nei primi studi, effettuati su cani anestetizzati sottoposti ad alti flussi d'aria in un segmento polmonare durante broncoscopia, l'iperventilazione con aria secca causava iperosmolarità della superficie di

rivestimento delle vie aeree (41) e broncocostrizione (42). Quando l'insufflazione di aria secca era ripetuta allo scopo di simulare l'esposizione cronica associata all'allenamento, si verificava danno epiteliale con perdita dell'epitelio ciliato, ed rimodellamento delle vie aeree con afflusso di eosinofili e di neutrofili, ed una maggiore concentrazione di peptidoleucotrieni nel lavaggio broncoalveolare (43). Un'ulteriore studio ha analizzato le broncoscopie di cani da slitta, dopo una competizione tra il Canada e l'Alaska. Tali broncoscopie mostravano la presenza di un danno epiteliale altamente significativo, confermando quindi i precedenti risultati. Altri esperimenti nei cavalli, sottoposti ad esercizio durante inalazione di aria fredda confermavano il verificarsi di danno epiteliale bronchiale (44).

Gli esperimenti sopracitati hanno esaminato le vie aeree in condizioni non fisiologiche in animali anestetizzati, o in condizioni estreme. Per verificare se l'allenamento di endurance in condizioni ambientali standard provochi danno epiteliale ed infiammazione nelle piccole vie aeree, sono stati studiati topi sedentari e sottoposti ad allenamento di endurance per 2, 4, o 6 settimane (45). L'allenamento per 45 giorni provoca un danno epiteliale progressivo, apoptosi, infiltrazione di cellule infiammatorie e proliferazione dell'epitelio bronchiale, indicando come l'allenamento ripetuto provochi un danno all'epitelio e, verosimilmente la riparazione dello stesso, come evidenziato dall'aumento dello spessore dell'epitelio bronchiale. L'analisi morfometrica ed immunoistochimica delle piccole vie aeree (lunghezza della membrana basale $\leq 1\text{mm}$) ha evidenziato cambiamenti progressivi delle BEC durante l'allenamento (45). Nei topi allenati, il danno epiteliale era associato con l'aumento dell'apoptosi delle BEC, confermando i dati ottenuti sugli atleti della mezza maratona (2). Inoltre non avendo trovato differenze significative tra i livelli di attivazione di NF- κ B, coinvolto

nella trascrizione dei geni pro-infiammatori, tra i topi allenati e quelli sedentari, l'apoptosi delle BEC risulta essere l'evento patogenetico principale del danno all'epitelio bronchiale e non solo un fattore secondario all'infiammazione (45) (48)(36). Inoltre nei topi allenati è stato osservato un aumentato infiltrato di leucociti nelle pareti e nel lume bronchiale senza evidenza di attivazione infiammatoria. Tale studio conferma i risultati, precedentemente ottenuti in un modello murino di asma bronchiale, nel quale è stato esaminato il ruolo dell'esercizio nella modulazione della risposta infiammatoria associata all'asma (46). L'esercizio fisico causava una diminuzione dell'attivazione di NF- κ B, con conseguente diminuzione della produzione di citochine pro infiammatorie e quindi un effetto di modulazione della risposta infiammatoria, suggerendo che le alterazioni evidenziate dopo allenamento potrebbero rappresentare una risposta di adattamento piuttosto che indicare un evento patologico nelle vie aeree degli atleti. Topi sensibilizzati all'ovalbumina e sottoposti ad allenamento di endurance, quindi, mostravano minore infiammazione rispetto ai controlli sedentari, confermando che l'esercizio fisico complessivamente esercita un effetto anti-infiammatorio sia in animali normali che asmatici.

Per quanto concerne il ruolo dell'apoptosi delle cellule epiteliali bronchiali indotta dall'iperosmolarità conseguente all'esercizio, un recente studio ha analizzato l'effetto dell'acqua di mare su colture di cellule epiteliali alveolari appartenenti alla linea A549. L'acqua di mare promuove l'apoptosi nelle A549 e questo è associato all'aumento dei livelli di espressione di Fas e Fas L, aumento del clivaggio della Caspasi 8 e aumento dei livelli della Caspasi 3. Questi risultati indicano che l'apoptosi siinstaura a seguito del danno epiteliale indotto dall'iperosmolarità del liquido di rivestimento delle vie aeree, e ciò contribuisce

ad aumentare l'effetto dei mediatori dell'infiammazione sull'integrità dell'epitelio alveolare (47).

Altri due importanti studi analizzano in vitro gli effetti dell'iperosmolarità sulle BEC in vitro. Colture di cellule epiteliali bronchiali appartenenti alla linea H292 sono state stimulate con soluzioni iperosmolari di NaCl e Mannitolo al fine di valutare due aspetti principali:

- Gli effetti dell'iperosmolarità sulla produzione di IL-8 e sul pathway di trasduzione del segnale legato alla cascata delle MAPK (8).
- Gli effetti di due corticosteroidi inalanti sull'iperosmolarità indotta e sulla produzione dell'IL-8 (9).

Questi studi sperimentali dimostrano che l'IL-8 viene prodotta in seguito alla stimolazione iperosmolare in modo dose-dipendente, così come l'attivazione delle MAPK p38 e JNK, la cui attivazione è conseguente allo stimolo iperosmolare (8). Inoltre a seguito del trattamento con i corticosteroidi, noti per la loro funzione di controllo dell'infiammazione e dell'iperresponsività delle vie aeree e quindi utilizzati nelle terapie asmatiche, la produzione di IL-8 osmolarità indotta diminuiva in modo dose dipendente (9).

In sintesi, gli studi sperimentali confermano la validità dell'ipotesi del danno dell'epitelio delle vie aeree da esposizione iperosmolare durante l'esercizio fisico. La dimostrazione in vitro della produzione di IL-8 da parte delle BEC sottoposte a stimolo iperosmolare conferma che l'IL-8 è il probabile stimolo chemiotattico che attira i PMN nelle vie aeree durante esercizio fisico.

Capitolo VI

Scopo del lavoro

Il lavoro sperimentale svolto per questa tesi ha seguito in parallelo, due protocolli di indagine:

- Uno studio in vivo, svolto attraverso il processamento dell'espettorato indotto di atleti amatoriali partecipanti ad una Maratona ed ad una Mezza Maratona, **allo scopo di caratterizzare la condizione delle vie aeree di atleti amatoriali in fase di riposo, al termine della gara e il giorno successivo alla gara.** Questi esperimenti sono stati condotti in occasione della maratona svoltasi a Palermo il 18 Novembre 2012.
- Uno studio in vitro, svolto stimolando colture di cellule epiteliali bronchiali appartenenti alla linea 16HBE con concentrazioni crescenti iperosmolari di NaCl (cloruro di Sodio) e Mannitolo, **allo scopo di valutare il rilascio di IL-8 e la produzione della MAPK ERK nella sua forma attiva fosforilata.** Gli studi precedenti hanno analizzato soltanto gli effetti di una singola esposizione, senza considerare che gli atleti si allenano regolarmente a brevi intervalli di tempo (usualmente ogni giorno).

Capitolo VII

Materiali e Metodi: studio in vivo

Atleti

In previsione dello studio, alcuni giorni prima della gara, svoltasi a Palermo il 18/11/2012, sono stati reclutati 11 atleti amatoriali divisi tra Mezza-Maratona (MM, n=6) e Maratona (M, n=5). Gli atleti sono stati informati dello scopo e del protocollo dello studio (analisi dell'espettorato indotto), ed hanno firmato il modulo di consenso informato prima dell'esecuzione degli esami. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico degli Ospedali Riuniti Villa Sofia-Cervello, sede dell'attività di ricerca.

Tutti i soggetti erano non fumatori e clinicamente sani, e non avevano avuto episodi infettivi delle vie aeree o altra malattia nelle tre settimane precedenti la gara. Inoltre nessun soggetto riferiva una diagnosi clinica di asma, sintomi simili all'asma o assunzione di corticosteroidi o antiinfiammatori non steroidei per qualunque motivo.

Gli atleti erano tutti corridori amatoriali con un'esperienza agonistica media di 13 ± 7 anni ed correvano 80 ± 20 km/settimana in un ambiente extraurbano (Parco La Favorita, Palermo).

In tutte le condizioni, gli atleti sono stati sottoposti all'esecuzione di tre esami: spirometria, prelievo venoso e induzione dell'espettorato. I dati sono stati raccolti:

- a) alcuni giorni prima della gara, dopo almeno 24 ore dall'ultimo allenamento;
- b) 2 ore circa dopo la gara di Maratona o Mezza-Maratona;
- c) la mattina successiva alla gara.

Spirometria

L'esame spirometrico è stato eseguito prima e dopo induzione dell'espettorato, secondo le indicazioni ATS-ERS (Miller 2005).

Prelievo venoso

Circa 12-13 cc di sangue venoso sono stati prelevati da una vena periferica in EDTA per l'esame emocromocitometrico. IL siero è stato conservato a -20°C per la successiva analisi dei markers di danno muscolare (LDH, CPK).

Induzione e processamento espettorato indotto

L'espettorato indotto è una tecnica che permette il recupero delle cellule dell'apparato respiratorio in modo non invasivo, consentendo il processamento della componente cellulare e la valutazione del tipo e dell'intensità dell'infiammazione nelle vie aeree. L'esame consiste nell'indurre la produzione di espettorato mediante l'inalazione di soluzione salina ipertonica al 5% .

L'espettorato è costituito da una componente fluida e una componente cellulare. Nella prima componente (surnatante) possiamo studiare i mediatori dell'infiammazione, mentre nella seconda (pellet) può essere analizzata la componente cellulare, costituita da cellule epiteliali bronchiali, macrofagi e cellule infiammatorie.

L'esame è eseguito in presenza di un medico. Effetti minori della soluzione salina ipertonica sono il sapore salato e, talvolta, la sensazione d'irritazione dell'orofaringe. Dopo risciacquo della cavità orale con soluzione fisiologica ed eliminazione delle secrezioni nasali per ridurre al minimo la

contaminazione salivare, il soggetto è esposto ad una soluzione salina ipertonica (5%) per aerosol per 20 min. L'aerosol è somministrato con un nebulizzatore ultrasonico (particelle media diametro 2,5 μ m, uscita 1 ml / min; Fisoneb, Fisons Italchimici Spa, Roma, Italia).

Il soggetto interrompe regolarmente la procedura per tossire e l'espettorato è raccolto in fiale sterili. Dopo la procedura, si esegue spirometria per documentare assenza di broncospasmo. Nei soggetti in cui si sviluppa broncocostrizione, si somministra un broncodilatatore per inalazione, e si ricontraolla la spirometria fino a risoluzione del broncospasmo.

L'espettorato degli atleti esaminati è stato processato secondo la tecnica dei "**plugs**" (49). L'espettorato raccolto in provette da 50 ml è stato versato su piastra di Petri per individuare i plugs (tappi di muco), che sono stati prelevati con una pinzetta ed inseriti in una provetta da 50 ml. Alla quantità di espettorato selezionato è stato aggiunto un uguale volume di DDT (mucolitico) (0,1 % in soluzione salina, Sigma, St. Louis, MO). Dopo l'omogenizzazione, il campione di espettorato è stato filtrato attraverso un filtrino in rete di nylon e successivamente centrifugato a 800 RPM per 10' per separare il surnatante dal pellet cellulare. Il surnatante è stato aspirato, aliquotato e congelato a -80°C per le successive analisi biochimiche.

Si è quindi effettuata la conta vitale diluendo 1:5 con **trypan blue**. Il **trypan blue** colora selettivamente le cellule morte, a causa della selettività della membrana cellulare. Le cellule vitali, con membrana intatta, non permettono la penetrazione del colorante nel citoplasma; al contrario nelle cellule morte questo penetra facilmente, rendendole distinguibili dalle vive con un'analisi al microscopio.

Per la conta cellulare, è stata utilizzata la **camera di Bürker**. Si contano le cellule vive, le morte e le totali, sia squamose che non, e si calcola la vitalità. Facendo il rapporto **cellule vive /cellule morte × 100** si è ottenuta la % di cellule vive, che deve essere non inferiore al 60% perché il campione sia accettabile dal punto di vista tecnico. Dopo la conta, è stato calcolato il numero di cellule rapportato agli ml di soluzione. Calcolata la concentrazione di cellule totali, sono stati preparati i vetrini per la **conta differenziale**.

La conta differenziale è eseguita mediante **colorazione Diff-Quick**, grazie alla quale si può distinguere al microscopio la morfologia delle differenti cellule:

- i **linfociti** hanno un nucleo che occupa gran parte del volume cellulare sono piccoli,tondeggianti e la colorazione è uniforme;
- i **neutrofili** hanno un nucleo bi-lobato;
- gli **eosinofili** sono caratterizzati da una colorazione rosa dovuta alla basicità del citoplasma, si presentano molto grandi e con nucleo eccentrico;
- i **macrofagi** presentano inclusioni citoplasmatiche e un nucleo periferico;
- **le cellule epiteliali bronchiali** sono ciliate, con nucleo basale.

I vetrini sono stati letti in duplicato, con conte di almeno 400 cellule/vetrino. La conta delle cellule squamose (indicative di contaminazione dal cavo orale) è stata sottratta dalla conta cellulare totale, e la conta differenziale espressa come percentuale corretta.

I campioni di espettorato sono stati considerati adeguati se il volume dell'espettorato era almeno 1 ml, con cellule squamose inferiori al 50% nella conta differenziale.

Capitolo VIII

Materiali e metodi: Studio in vitro

Al fine di simulare le sessioni giornaliere di allenamento negli atleti di endurance, sono stati valutati gli effetti della stimolazione iperosmolare ripetuta con NaCl e Mannitolo, sul rilascio di IL-8. In questi esperimenti, è stata usata una normale linea BEC (16HBE). Sono state piastrate 200.000 cellule in un pozzetto di una piastra da sei e queste sono state esposte alle seguenti stimolazioni iperosmolari: 320, 640, 960, 1280 mOsM di NaCl e Mannitolo per 40 minuti. Il protocollo di indagine è indicato in figura 7.

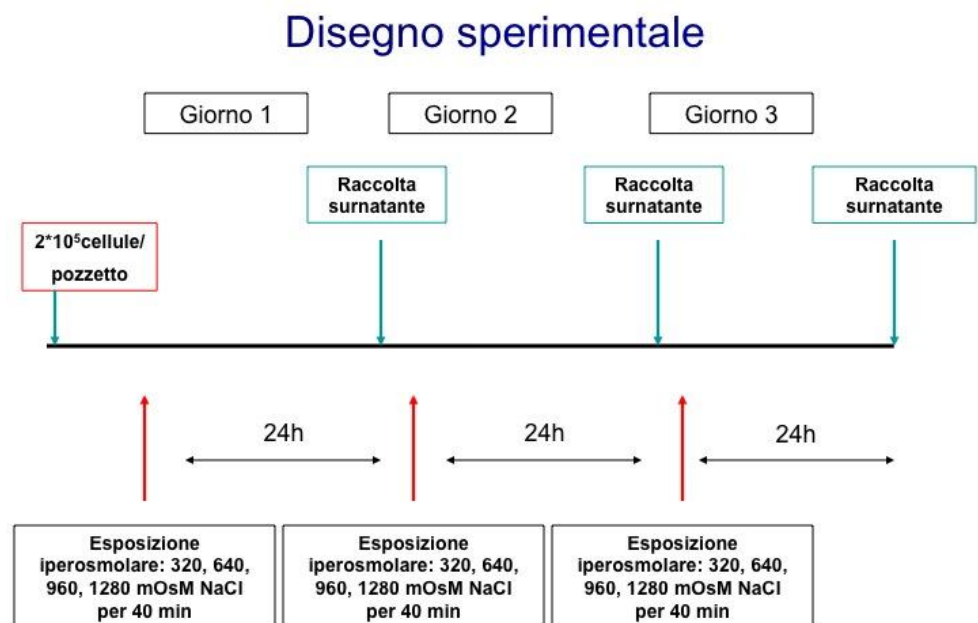


Figura 7. Protocollo sperimentale degli studi in vitro.

Dopo tale esposizione le cellule sono state risospese in terreno fresco e dopo 24 h e dopo 48 h sono state stimulate nuovamente. Il rilascio di IL-8 è stato misurato nel terreno di coltura a 24, 48 e 72 h tramite estrazione delle proteine totali mediante *tripsina*.

Per valutare il rilascio della forma attiva della MAPK p-ERK il protocollo d'indagine è stato diviso in due parti:

- inizialmente è stato stabilito il tempo ottimale per l'attivazione della MAPK. Quindi, le cellule sono state stimulate per 40 minuti alla concentrazione massima sia di NaCl che di Mannitolo (1280mOsM)
- dopo la stimolazione il terreno è stato aspirato, le cellule sono state risospese in terreno fresco, e le proteine sono state estratte a tempi differenti: T0, T10, T30, T60.

Stabilito il tempo di attivazione della MAPK dopo stimolazione, lo stesso protocollo utilizzato per valutare la produzione di IL-8 è stato applicato per analizzare la produzione di p-ERK.

Una volta ottenuti gli estratti proteici, questi sono stati dosati mediante l'utilizzo di un kit che utilizza come curva standard, a concentrazione nota, la proteina BSA (Bovin Serum Albumin), per rilevare la quantità di proteine ottenute dall'estrazione proteica. La quantità di IL-8 rilasciata dalle BEC è stata misurata mediante dosaggio immunoenzimatico (ELISA, R&D Systems).

La quantità di p-ERK rilasciata dalle BEC è stata valutata mediante metodica del Western Blotting.

Inoltre è stata valutata anche l'apoptosi cellulare dopo stimolazione con il saggio dell' Annexina V , che permette di rivelare attraverso fluorescenza la percentuale di cellule apoptotiche tramite citofluorimetria a flusso. Il protocollo di indagine è mostrato in figura 8.

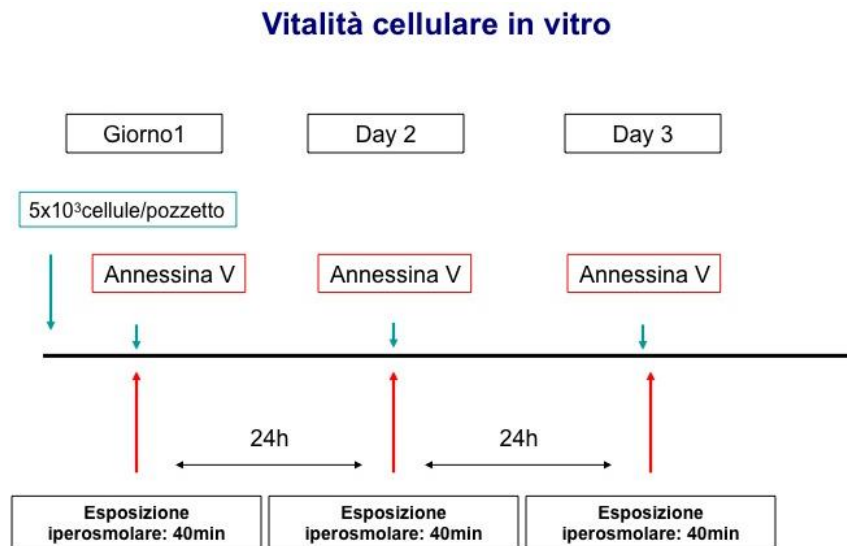


Figura 8. Protocollo sperimentale per lo studio dell'apoptosi cellulare nelle cellule 16-HBE mediante Annexina V in citofluorimetria.

Saggio ELISA

L'ELISA (Enzyme-linked ImmunoAssorbent Assay) è una metodica utilizzata per rilevare la presenza di una sostanza usando uno o più anticorpi ad uno dei quali è legato un enzima. Il kit da noi utilizzato per la rilevazione della quantità di IL-8 rilasciata dalle BEC, prevede l'utilizzo di una piastra da 96 pozzetti, al cui fondo è adeso l'anticorpo diretto contro la proteina di nostro interesse. Inserita la soluzione contenente la proteina d'interesse, nel nostro caso il terreno di coltura prelevato dalla coltura di BEC dopo la stimolazione, l'antigene legherà l'anticorpo sul fondo. Successivamente viene aggiunto al pozzetto un anticorpo

secondario coniugato ad un'enzima, che legherà il complesso antigene anticorpo. L'aggiunta del substrato enzimatico e la reazione di questo con il suo enzima specifico, svilupperà colore e l'intera piastra verrà letta allo spettrofotometro (ELISA MULTISKAN FC). L'intensità della colorazione è proporzionale alla concentrazione della proteina d'interesse (figura 9).

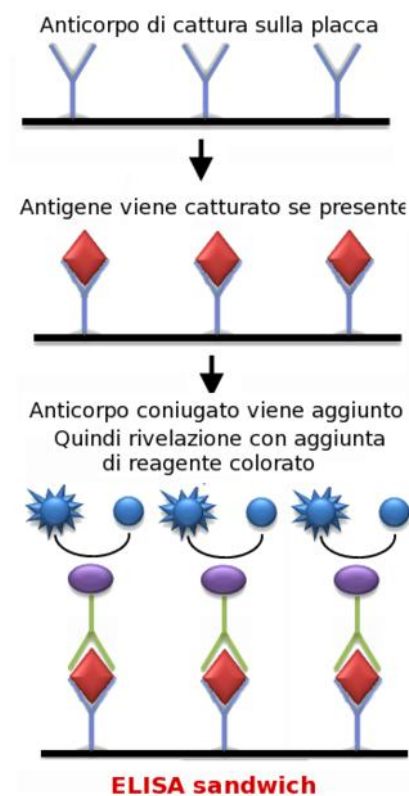


Figura 9: Schema delle fasi principali dell'ELISA test

Western Blotting

Questa metodica ci permette di quantizzare la presenza di una proteina specifica da una miscela di proteine, attraverso l'utilizzo di un anticorpo diretto contro la proteina d'interesse. Il saggio si compone di 4 fasi principali:

- *Elettroforesi in sds page*: la miscela proteica viene caricata in un gel di poliacrilammide e attraverso l'elettroforesi le proteine vengono separate sulla base del loro peso molecolare (figura 10)

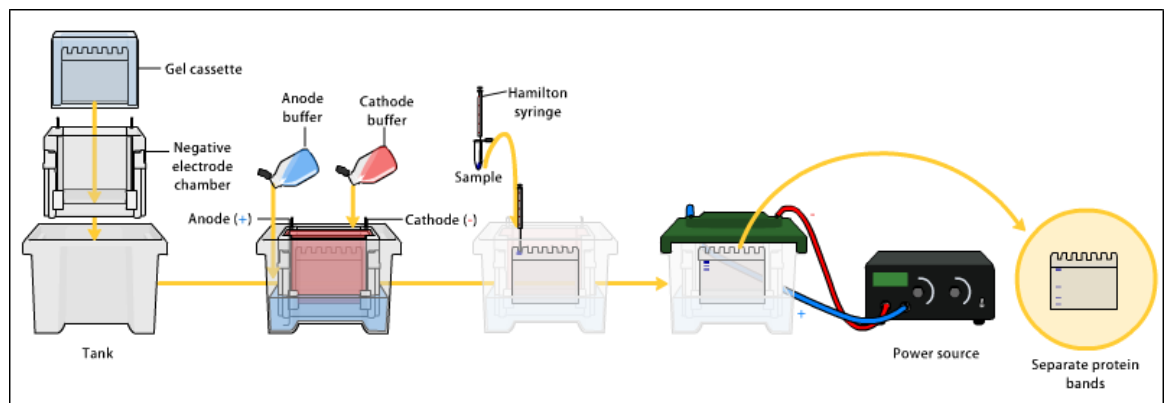


Figura 10: Prima fase del Western Blotting: Elettroforesi in SDS PAGE

- *Trasferimento*: il gel, contenente le proteine separate, è posto su una membrana di nitrocellulosa in modo che le proteine possano diffondere dal gel alla membrana. Si crea un *sandwich* formato, oltre al gel e alla membrana, da carta e spugnette imbevute dal *tampone di trasferimento*, che, una volta generata la corrente elettrica faciliterà il trasferimento. Il sandwich è inserito nei supporti specifici e in una cella elettroforetica attraversata da corrente (400mZ per 1h) (figura 11).

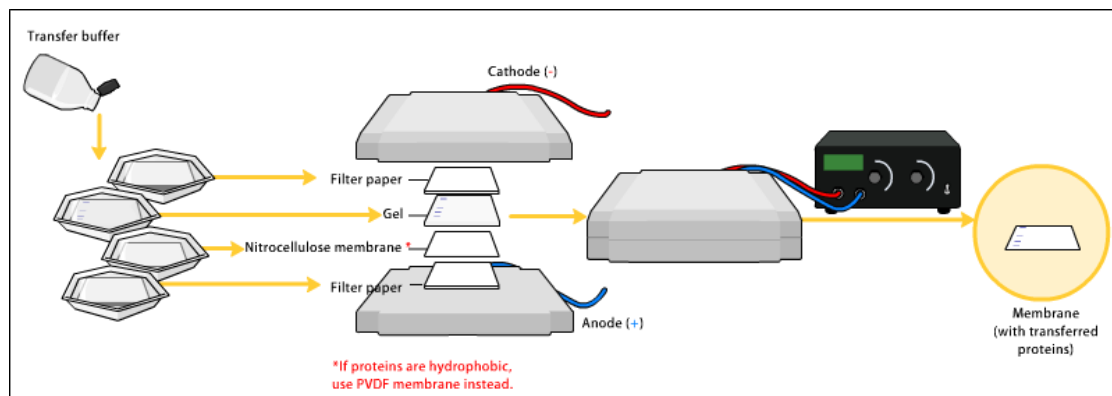


Figura 11: Seconda fase del Western Blotting: il trasferimento delle proteine sulla membrana di nitrocellulosa.

- *Bloccaggio e Rivelazione*: la membrana viene trasferita in una soluzione di BSA al 5% per fissare le proteine, per 1h, e successivamente viene messa ad incubare 1h con l'anticorpo primario specifico per la proteina d'interesse. A questo punto, dopo aver effettuato 3 lavaggi di 10 minuti, la membrana viene messa ad incubare con l'anticorpo secondario coniugato ad un enzima, per 1h. Dopo l'incubazione si procede con l'immissione del substrato chemiluminescente (kit ECL PLUS, Invitrogen), pipettato direttamente sulla membrana e lasciato incubare per 1 minuto al buio.
- *Sviluppo*: la membrana posta a contatto con una lastra fotografica la impressionerà, creando l'immagine delle bande relative alla proteina d'interesse. La lastra viene prima immersa nel liquido di fissaggio fotografico e poi in quello di sviluppo, per ottenere l'immagine delle bande della proteina (figura 12).

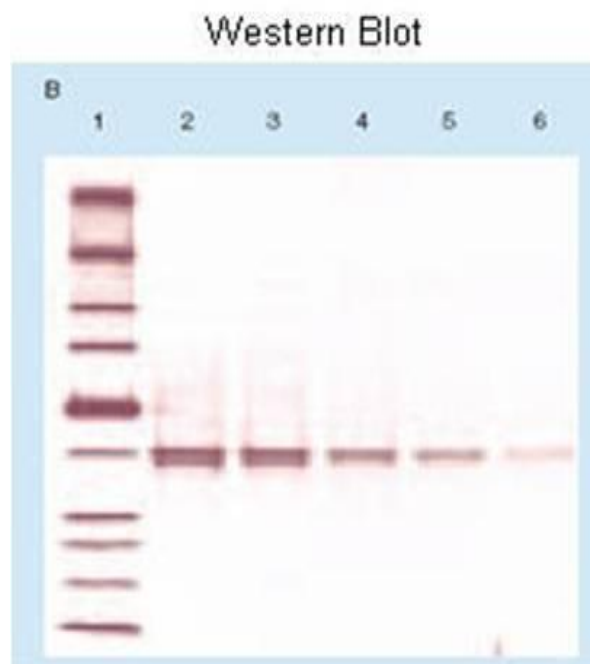


Figura 12: Esempio di lastra fotografica acquisita tramite scanner al pc.

La pellicola fotografica viene scannerizzata su pc, e le bande vengono quantizzate attraverso un programma di analisi densitometrica (ImageJ) (figura 13). I valori ottenuti vengono paragonati ai valori di una proteina costitutivamente espressa nelle cellule, la β -actina, per comprendere se la proteina d'interesse ha subito o meno una variazione quantitativa. Il rapporto tra il valore di β -actina ottenuto e i valori della proteina d'interesse, ci darà una stima della sua variazione quantitativa.

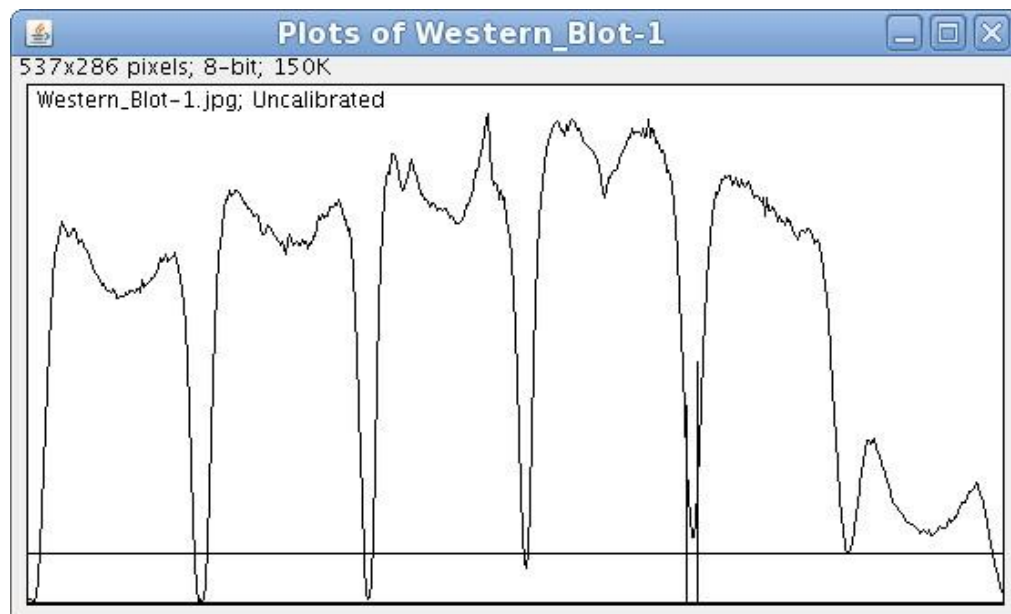


Figura 13: Esempio di bande proteiche lette al programma di analisi densitometrica ImageJ.

Saggio dell'Annexina V

In questo saggio si sfrutta la capacità dell'Annexina, proteina Calcio dipendente con forti proprietà anticoagulanti, di legarsi alla fosfatidilserina e dare così fluorescenza nel verde grazie al fluoroforo coniugato (FITC, fluoresceina-isotiocianato).

La fosfatidilserina (PS) è un fosfolipide che normalmente si trova nel lato interno della membrana cellulare. Durante l'apoptosi, invece, la PS viene esposta verso l'esterno e permette all'annexina V di legarsi ad essa. Ma tale legame può avvenire anche in assenza di apoptosi, poiché durante la necrosi si ha rottura della membrana plasmatica e l'annexina può legarsi alla PS penetrando tra i pori della membrana non più integra. Quindi viene aggiunto un altro fluoroforo che permetta di verificare l'integrità della membrana. A questo scopo si utilizza lo *ioduro di propidio*, un intercalante del DNA, che si intercala stechiometricamente e fluoresce nel rosso nel caso in cui la membrana cellulare non sia integra.

Le cellule che risultano negative sia all'annexina che allo ioduro di propidio sono cellule vive poiché la membrana integra e la fosfatidilserina ancora all'interno di questa non permettono ai fluorocromi di legarsi; le cellule positive all'annexina e negative allo ioduro di propidio sono cellule in fase precoce di apoptosi poiché presentano la traslocazione del fosfolipide; le cellule negative all'annexina e positive allo ioduro di propidio sono cellule necrotiche in quanto è presente solamente rottura della membrana plasmatica; le cellule positive all'annexina e positive allo ioduro di propidio sono invece cellule o in fase avanzata di apoptosi o cellule necrotiche.

- **Statistica esperimenti**

I dati sono espressi come medie e deviazione standard. L'analisi di varianza a 2 vie è stata usata per valutare gli effetti della diversa distanza di gara e dei diversi tempi sperimentali sulle cellule delle vie aeree ottenute mediante espettorato indotto. I dati tra i due gruppi di atleti sono stati paragonati mediante t-test per dati non appaiati.

Gli esperimenti sulle cellule epiteliali in vitro sono stati eseguiti in triplicato. Gli effetti dell'esposizione iperosmolare sul rilascio di IL-8 durante i 3 giorni dell'esperimento sono stati valutati mediante ANOVA a due vie (iperosmolarità e tempo di raccolta).

L'apoptosi delle BEC in vitro è stata misurata come percentuale sul totale di cellule nel campione. Le correlazioni tra variabili sono state analizzate mediante regressione lineare semplice. Per tutti i test, la significatività è stata a $p < 0.05$.

Capitolo IX

Risultati esperimenti in vivo

La gara di Maratona e Mezza maratona è iniziata alle ore 9,15 e il traffico urbano è stato interrotto per tutta la sua durata. Il percorso, in parte urbano, in parte extraurbano, consisteva di un anello di km 21.1 da percorrere una volta per gli atleti della Mezza maratona e due volte per gli atleti della Maratona (Figura 14). Tutti gli atleti hanno terminato regolarmente la gara, eccetto un soggetto che ha interrotto la Maratona al 27° km per problemi muscolari.



Figura 14: Percorso della Maratona di Palermo 2012

Dati clinici e funzionalità polmonare

La Tabella 1 riporta i dati antropometrici degli atleti. I due gruppi erano simili per età ed esperienza agonistica, mentre l'allenamento settimanale era significativamente maggiore nei maratoneti rispetto agli atleti della Mezza maratona.

Tabella 1. Dati antropometrici

	Mezza Maratona (n=6)	Maratona (n=5)
Età (anni)	44.3±10.2	45.0±3.2
Peso (kg)	75.7±12.0	65.8±6.2
Altezza (cm)	1.78±0.09	1.70±0.05
Esperienza agonistica (anni)	15.5±7.0	12.3±9.0
Allenamento settimanale (km)	60±20	99±23*
Tempo di gara (min)	101±18	218±35

* $p < 0.05$ t-test per dati non appaiati

La tabella 2 riporta i dati spirometrici a riposo, alla fine della gara, e il giorno dopo. Nessun soggetto ha riferito sintomi respiratori in condizioni di base o dopo la gara.

Tabella 2. Spirometria

	Mezza maratona	Maratona
FEV ₁ L		
Base	4.31 ± 1.04	4.03 ± 0.42
Gara	4.28 ± 0.96	3.99 ± 0.43
Post	4.21 ± 1.08	3.74 ± 0.31
FEV ₁ % teorico		
Base	111.3 ± 21.1	114.5 ± 9.3
Gara	110.3 ± 18.2	114.8 ± 7.3
Post	105.2 ± 18.5	107.8 ± 5.8
FVC L		
Base	5.23 ± 0.85	4.88 ± 0.56
Gara	5.33 ± 0.71	4.74 ± 0.47
Post	5.29 ± 0.97	4.69 ± 0.54
FVC % teorico		
Base	110.5 ± 15.8	114.0 ± 10.4
Gara	112.3 ± 10.5	111.8 ± 6.5
Post	108.2 ± 11.8	110.6 ± 7.9
FEV ₁ /FVC %		
Base	81.6 ± 7.1	82.7 ± 2.7
Gara	79.7 ± 9.0	84.2 ± 2.3
Post	78.9 ± 7.8	80.0 ± 3.6
FEV ₁ /FVC, % teorico		
Base	103.0 ± 7.6	104.5 ± 3.1
Gara	100.5 ± 10.0	106.6 ± 2.5
Post	99.2 ± 8.1	101.2 ± 4.8

L'esame della Tabella 2 evidenzia l'assenza di significative variazioni di funzione respiratoria dopo la gara, o tra i due gruppi di atleti. I valori medi suggeriscono un trend verso un lieve aumento del rapporto FEV₁/FVC alla fine della gara soltanto negli atleti che correvano la Maratona (variazione non significativa). Il giorno dopo la gara i valori spirometrici tendevano a ridursi, ma le variazioni non erano significative.

Espettorato indotto

L'esame dell'espettorato indotto ha mostrato dei dati interessanti. Il recupero dei plugs è stato significativamente maggiore negli atleti della Mezza maratona che in quelli della Maratona. La vitalità era >70% in tutti i campioni. I dati indicano assenza di differenze significative nella cellularità totale tra i due gruppi di atleti o tra le diverse condizioni sperimentali (figura 15).

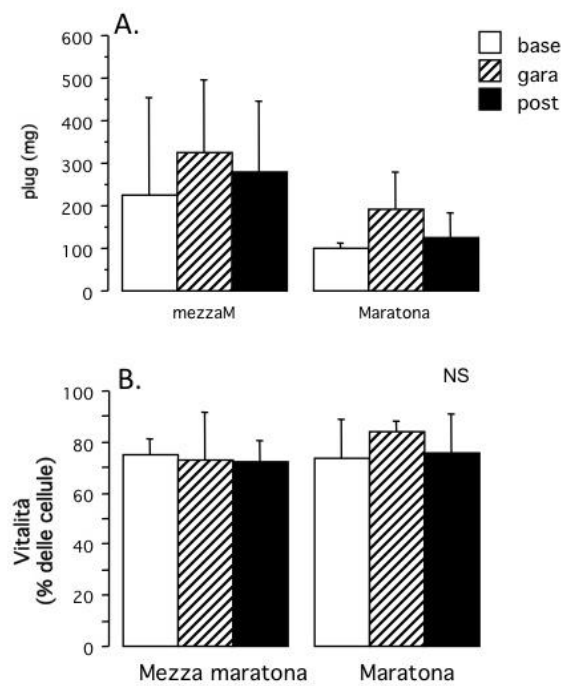


Figura 15 : il recupero dei plugs è stato quantitativamente maggiore negli atleti della Mezza maratona rispetto agli atleti della Maratona ($p < 0.05$). B: La vitalità delle cellule nei campioni era soddisfacente (>70%), senza significative differenze tra i due gruppi di atleti e o fra le condizioni sperimentali

La Figura 16 seguente mostra le variazioni delle conte cellulari totali nell'espettorato indotto nei due gruppi di atleti. L'analisi delle conte totali dei diversi tipi cellulari nell'espettorato indotto non ha evidenziato differenze significative tra condizioni sperimentali nei due gruppi di atleti (dati non riportati).

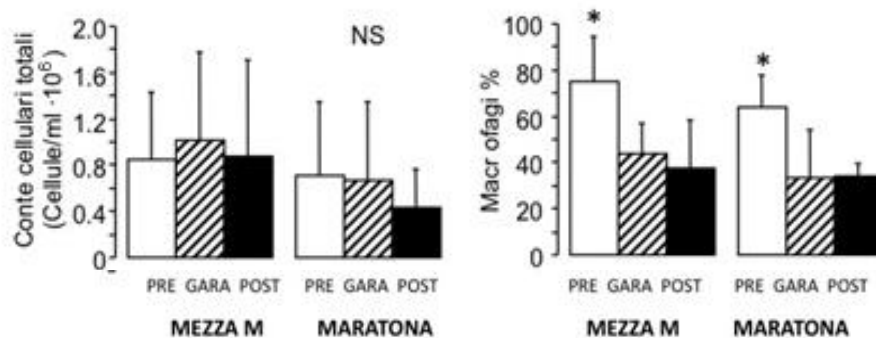


Figura 16. Conte totali delle cellule dell'espettorato indotto negli atleti di Mezza maratona (colonne a sinistra) e Maratona (colonne a destra). Il grafico riporta i dati ottenuti prima della gara (PRE), alla fine della gara (GARA) e il giorno successivo (POST). Analisi mediante ANOVA a 2 vie. * differenza significativa tra condizione (pre-gara-post); # differenza significativa tra gare (Mezza maratona-Maratona).

I grafici di seguito invece, mostrano le variazioni della componente cellulare in tutte le condizioni esaminate (Figura 17). Le BEC risultano aumentate subito dopo la gara, sia nella maratona che nella mezza maratona, per poi ritornare ai livelli base nel post gara. Per quanto riguarda i PMN si verifica, come atteso, un aumento dalla base rispetto alla gara in entrambe le condizioni, che persiste anche nel post gara. Diversamente, i macrofagi sembrano diminuire progressivamente nella mezza maratona, mentre i maratoneti mostrano una diminuzione subito dopo la gara, con un ritorno al valore base nel post. I linfociti non presentano modificazioni rilevanti nella mezza maratona, mentre aumentano progressivamente nei maratoneti. L'aumento delle conte

differenziali dei linfociti negli atleti del gruppo Maratona rispetto a quelli del gruppo Mezza maratona, senza differenze significative tra le differenti condizioni sperimentali, è un dato inatteso. Come negli studi precedenti, non abbiamo osservato variazioni significative nelle conte differenziali degli eosinofili.

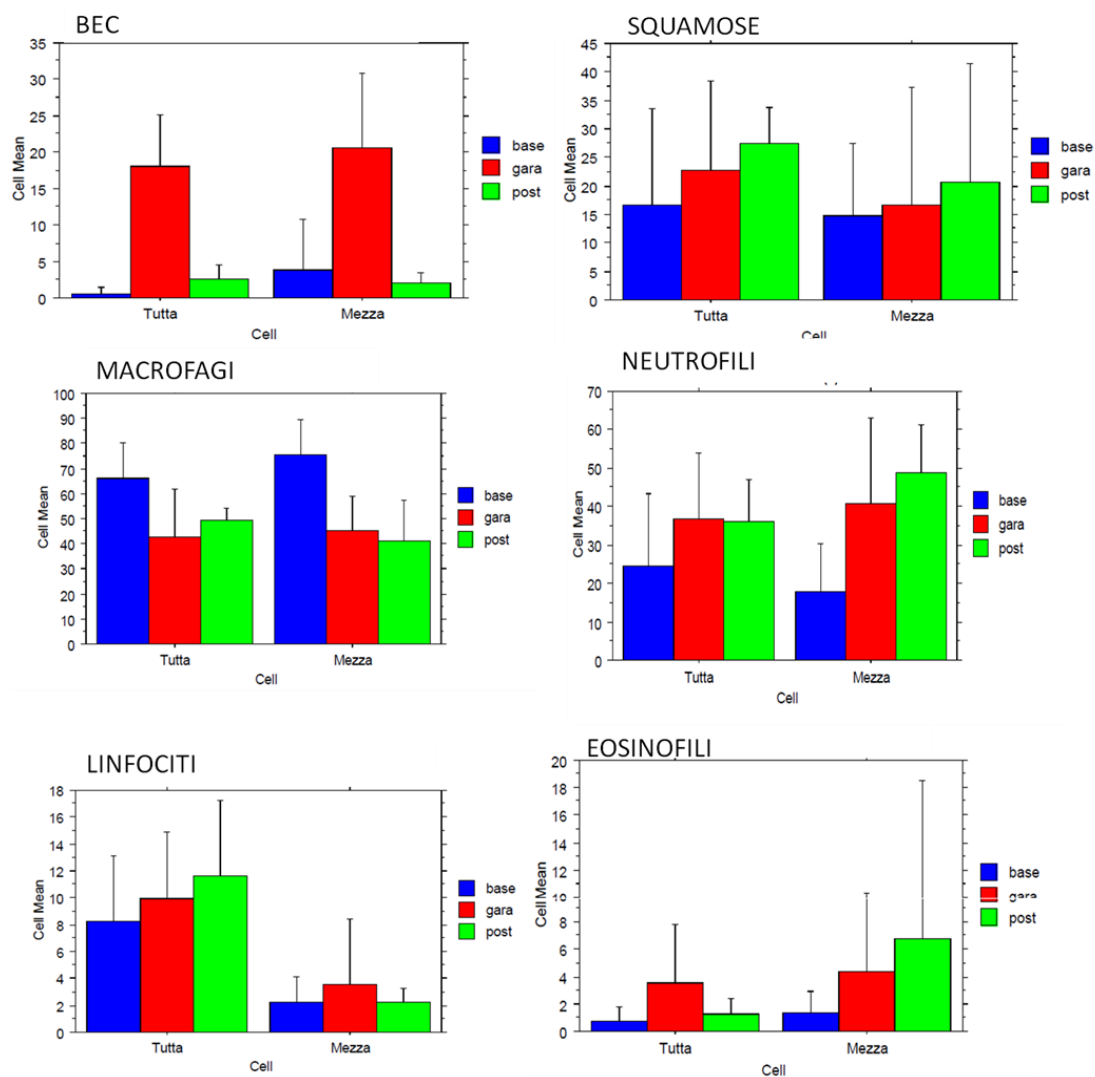


Figura 17 : I grafici mostrano le variazioni della componente cellulare dell'espettorato indotto. Analisi mediante ANOVA a 2 vie.

Esame emocrocitometrico

La Tabella 3 riporta i dati dell'esame emocromocitometrico nei due gruppi di atleti nelle diverse condizioni sperimentali. I dati evidenziano leucocitosi neutrofila alla fine della gara, più marcata negli atleti della Maratona che della Mezza maratona. I valori erano normali la mattina dopo la gara.

Tabella 3. Esame emocromocitometrico

	Mezza maratona	Maratona
Eritrociti •10 ⁶ /uL		
Base	4.85 ± 0.44*	4.49 ± 0.57*
Gara	4.88 ± 0.31	4.67 ± 0.39
Post	4.82 ± 0.39	4.40 ± 0.22
Piastrine •10 ³ /uL		
Base	210 ± 45	231 ± 68
Gara	227 ± 50	228 ± 53
Post	194 ± 39	206 ± 52
Leucociti •10 ⁴ /uL		
Base	5.45 ± 1.07*#	6.16 ± 3.50*#
Gara	12.36 ± 2.54	18.44 ± 3.81
Post	5.99 ± 1.75	7.65 ± 2.56
Neutrofili %		
Base	53.0 ± 6.8*#	59.7 ± 6.0*#
Gara	86.3 ± 3.1	90.6 ± 2.1
Post	55.3 ± 4.2	65.0 ± 6.9
Linfociti %		
Base	38.4 ± 7.5*#	31.9 ± 4.7*#
Gara	8.7 ± 3.1	4.2 ± 0.7
Post	36.2 ± 5.4	27.4 ± 4.9
Monociti %		
Base	5.5 ± 1.0	5.9 ± 1.1
Gara	4.0 ± 1.0	4.6 ± 1.6
Post	5.9 ± 2.2	5.9 ± 2.2
Eosinofili %		
Base	2.3 ± 1.9#	1.9 ± 0.2#
Gara	0.6 ± 0.5	0.3 ± 0.1
Post	1.27 ± 0.7	1.4 ± 0.5
Basofili %		
Base	0.7 ± 0.3	0.7 ± 0.4
Gara	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1
Post	1.0 ± 0.4	0.4 ± 0.2

* differenza significativa (p<0.05) tra i 2 gruppi di atleti, # differenza significativa tra condizioni (ANOVA a 2 vie)

L'analisi delle conte assolute dei PMN nel sangue periferico evidenzia una maggiore neutrofilia nei maratoneti rispetto agli atleti della Mezza maratona, con significative differenze tra i due gruppi di atleti e tra condizioni, oltre ad una significativa interazione tra gruppi e condizioni (Figura 17 A).

Una significativa correlazione era presente tra PMN nel sangue periferico e conte differenziali dei PMN nell'espettorato indotto soltanto nel gruppo di atleti della Maratona (figura 17 B)

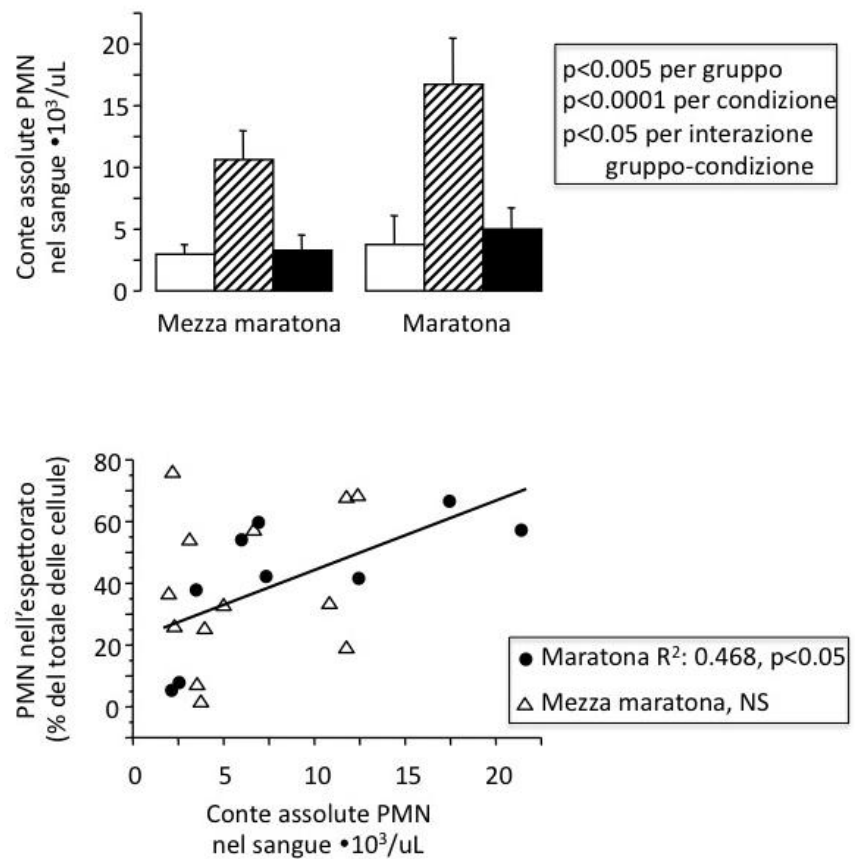


Figura 17 A: conte assolute dei PMN nel sangue periferico nei due gruppi di atleti. 17 B: la conta differenziale dei PMN nell'espettorato è significativamente correlata ai PMN del sangue periferico soltanto nei maratoneti.

Capitolo X

Risultati esperimenti in vitro

Al fine di simulare gli effetti dell'esercizio prolungato e ripetuto, colture cellulari di cellule epiteliali bronchiali, appartenenti alla linea 16HBE, sono state stimulate con concentrazioni crescenti iperosmolari di NaCl e Mannitolo, ed è stato valutato il rilascio di IL-8 nel terreno di coltura.

Le figure 18 e 19 mostrano il rilascio di IL-8 dopo stimolazione iperosmolare ripetuta con NaCl e Mannitolo. Durante il primo e secondo giorno di esposizione, era evidente un chiaro effetto dose-risposta, con maggiore rilascio di IL-8 in presenza di livelli di osmolarità più alti (960 e 1280 mOsm). Tuttavia la risposta si riduceva il 3° giorno, suggerendo che l'esposizione iperosmolare possa causare danno cellulare.

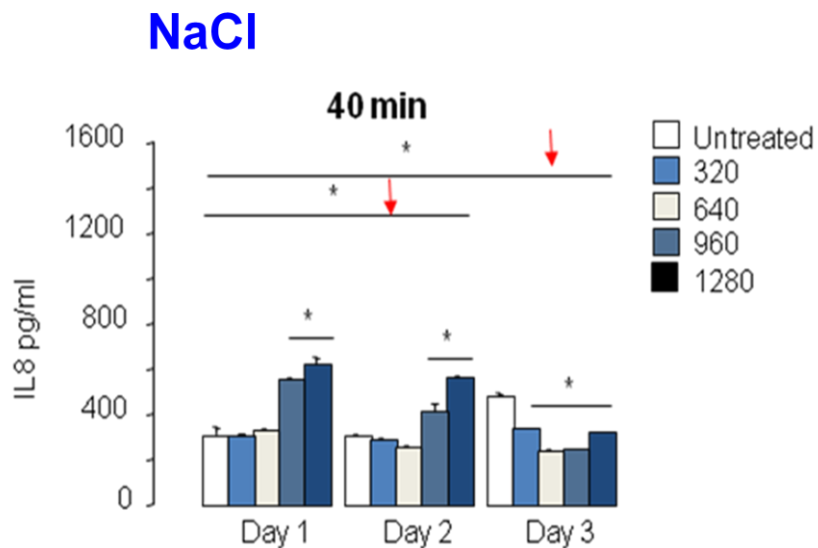


Figura 18 : Produzione di IL-8 dopo trattamento iperosmolare con NaCl. Gli asterischi indicano differenze tra i giorni di esposizione e tra differenti livelli di osmolarità nello stesso giorno (ANOVA a 2 vie, $p < 0.001$)

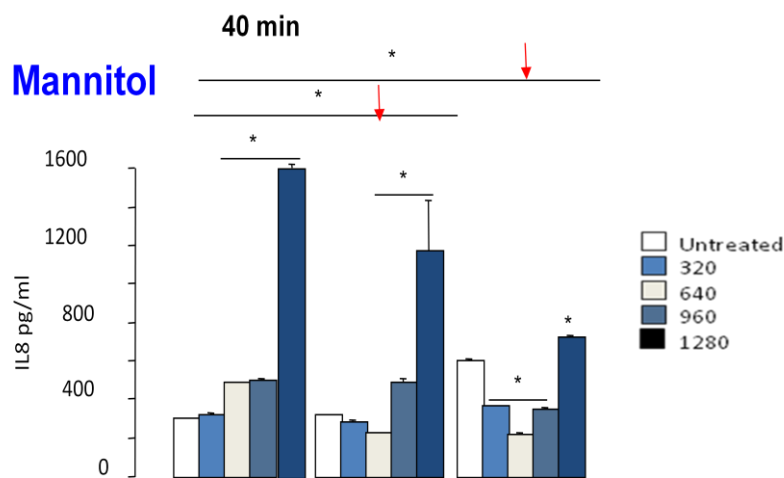
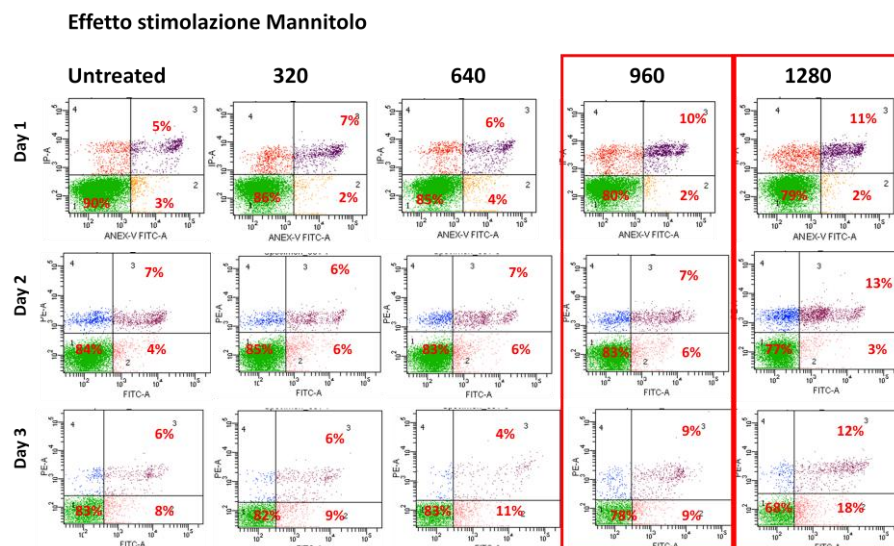


Figura 19 : Produzione di IL-8 dopo trattamento iperosmolare con Mannitolo. Gli asterischi indicano differenze tra i giorni di esposizione e tra differenti livelli di osmolarità nello stesso giorno (ANOVA a 2 vie, $p < 0.001$)

L'ipotesi di un'aumentata apoptosi cellulare è stata testata mediante test all'Annexina V-propidio ioduro in citofluorimetria. Le figure 20 e 21 mostrano come l'apoptosi delle cellule 16-HBE è evidente alle più alte esposizioni iperosmolari e aumenta dal 1° al 3° giorno di esposizione per 40 min.



Effetto stimolazione NaCl

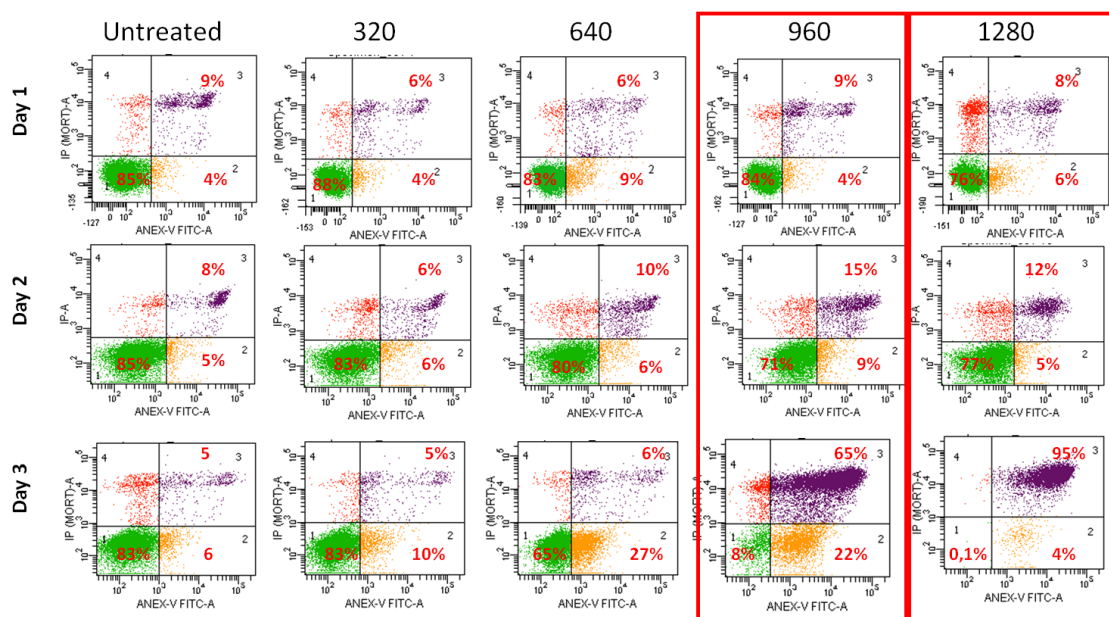


Figure 20-21: Apoptosi cellulare nelle cellule 16-HBE esposte a soluzioni di NaCl e Mannitolo iperosmolari mediante Annessina V in citofluorimetria. Il quadrante di colore verde indica le cellule vive, il colore arancio indica l'apoptosi precoce, il colore viola l'apoptosi tardiva, mentre i detriti cellulari sono colorati in rosso.

Successivamente, è stata analizzato il tempo di attivazione della MAPK p-ERK, dopo trattamento con soluzione iperosmolare (1280mosM) di Mannitolo/NaCl per 40 minuti. L'estrazione delle proteine è stata effettuata in 4 tempi differenti: T0,T10,T30,T60. A seguito del trattamento con il Mannitolo la produzione di p-ERK si verifica a 60 minuti dal trattamento (Figura 22).

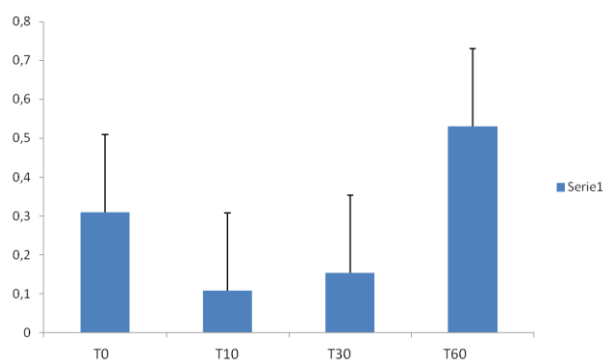


Figura 22 : Il grafico mostra che la maggiore produzione di p-ERK si verifica a 60 minuti dal trattamento con il Mannitolo.



Figura 23 : Lastra fotografica ottenuta mediante WB. La prima immagine mostra la banda relativa a p-ERK, l'altra è la β -actina, normalizzatore utilizzato per ricavare l'esatta concentrazione di p-ERK.

A seguito del trattamento con NaCl, la produzione di p-ERK risulta costante dal tempo zero ai successivi 30 minuti dal trattamento, per poi ridursi notevolmente a sessanta minuti (Figura 24)

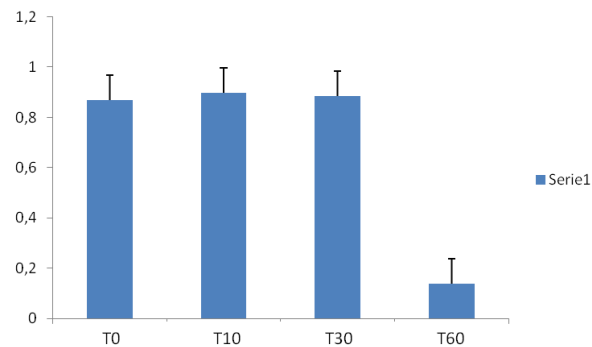


Fig 24: Grafico Tempo/Risposta per la produzione di p-ERK a seguito del trattamento con NaCl.

Fig 25: Lastra fotografica ottenuta mediante WB per p-ERK e per il normalizzatore β -actina.

Stabilito il tempo di attivazione di p-ERK, le 16HBE sono state stimulate con NaCl e con Mannitolo al fine di valutare la produzione della MAPK. Sia a 24h dal trattamento, che a 48h e a 72h, la produzione cresce all'aumentare dell'osmolarità del composto. In una visione globale però, nell'arco dei giorni la produzione si riduce notevolmente, come era già accaduto analizzando la produzione di IL-8 (Figura 26-27).

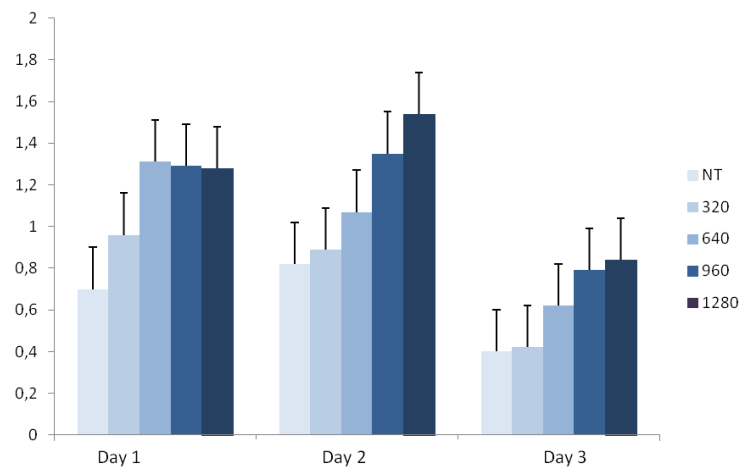


Figura 26 : Produzione di p-ERK nei tre giorni di stimolazione iperosmolare con NaCl

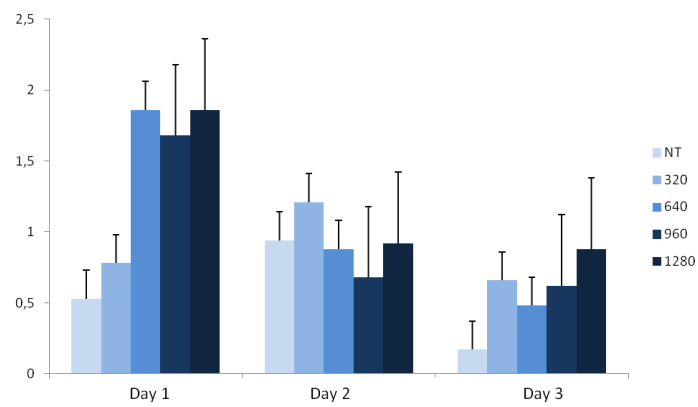


Figura 27 : Produzione di p-ERK nei tre giorni di stimolazione iperosmolare con Mannitolo

Capitolo XI

Discussione

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di caratterizzare gli effetti dell'esercizio fisico sulle cellule delle vie aeree, attraverso l'analisi dell'espettorato indotto di atleti che praticano sport di endurance, come la Maratona e la Mezza Maratona, e le variazioni temporali della composizione cellulare includendo nel periodo di osservazione il giorno dopo la gara. Inoltre allo scopo di definire lo stato infiammatorio delle vie aeree, indotto dall'esercizio fisico, sono stati effettuati degli esperimenti in vitro, che prevedevano la stimolazione della linea cellulare 16HBE, con concentrazioni crescenti e iperosmolari di NaCl e Mannitolo. A seguito della stimolazione, è stato valutato il rilascio dell'IL-8, interleuchina infiammatoria che richiama PMN, e la produzione della MAPK ERK, nella sua forma attiva fosforilata (p-ERK).

L'espettorato indotto, processato con la metodica dei plugs, ha mostrato risultati interessanti circa la composizione cellulare. In primo luogo è confermato che, come conseguenza dell'esercizio fisico intenso e prolungato, si verifica il richiamo di neutrofili, che risultano aumentati progressivamente dal pre-gara al post gara, in entrambi i gruppi. Ciò è confermato dagli esperimenti in vitro, infatti le BEC, in vitro, stimulate con NaCl e Mannitolo a concentrazioni iperosmolari crescenti, rilasciano IL-8 in modo dose dipendente, ed è noto che IL-8 è un fattore chemiotattico per i neutrofili. Inoltre l'analisi dell'espettorato indotto mostra, in entrambi i gruppi un aumento delle BEC subito dopo la gara, e una loro normalizzazione il giorno dopo la gara. Anche questo dato è confermato dagli esperimenti in vitro, che mostrano come la lesione delle BEC si autolimiti per

attivazione dell'apoptosi, con progressiva riduzione del rilascio di IL-8 a seguito di esposizioni iperosmolari ripetute.

È importante sottolineare che nei maratoneti abbiamo riscontrato una correlazione positiva tra PMN nel sangue circolante e conta differenziale dei PMN nell'espettorato. Questo dato è simile a quanto riportato in precedenza (1), e suggerisce la possibilità che almeno nella Maratona ci possa essere un effetto "sistemico" che si riflette nella composizione delle cellule delle vie aeree. In alternativa, il maggior volume di allenamento degli atleti della Maratona rispetto agli atleti della Mezza maratona potrebbe condizionare almeno in parte la correlazione tra neutrofilia nel circolo sistemico e nelle vie aeree. L'aumento dei PMN nelle vie aeree risultava persistente fino alla mattina dopo la gara in entrambi i gruppi di atleti, suggerendo un effetto prolungato dello stimolo chemiotattico, presumibilmente simile dopo le due gare.

Va ricordato che nel primo studio fatto sui maratoneti (1) non è stato riscontrato un aumento delle BECs nell'espettorato indotto raccolto dopo la gara. L'apparente contraddizione messa in evidenza dai nostri risultati, che mostrano invece un aumento delle BECs subito dopo la gara, è spiegabile nella differente metodica utilizzata per il processamento dell'espettorato indotto. Nel primo studio, infatti, era stata usata la tecnica di Fahy et al (51), che ha lo svantaggio della contaminazione dell'espettorato da parte di cellule provenienti dal cavo orale. La tecnica dei plugs, al contrario, isola le cellule intrappolate nei tappi di muco presenti nelle vie aeree, ed è molto più specifica rispetto alla tecnica di Fahy e collaboratori.

Un dato inatteso ma in linea con altri studi sperimentali precedentemente presi in esame, è stato l'aumento di linfociti nell'espettorato dei maratoneti. Il ruolo fisiologico dei linfociti nelle vie aeree potrebbe essere correlato all'attivazione di processi immuni specialmente in corso di allenamento intensivo come nel gruppo dei maratoneti. Risultati simili sono stati ottenuti negli sciatori di fondo studiati mediante biopsie bronchiali a riposo (23).

Per quanto riguarda gli esperimenti in vitro, il nostro studio differisce dal precedente studio di Hashimoto e coll (8) in diversi aspetti:

- è stata usata una linea cellulare di BEC normali, mentre Hashimoto e coll. hanno usato una linea derivata da cellule tumorali bronchiali;
- l'esposizione iperosmolare è stata prolungata (40 min), al contrario della breve durata (10 min) di esposizione usata nello studio di Hashimoto e coll.;
- lo studio di Hashimoto e coll. non prendeva in considerazione la possibilità che, oltre all'attivazione delle BEC con produzione di IL-8, potesse anche verificarsi danno epiteliale causato dall'esposizione iperosmolare.

I nostri risultati indicano che l'esposizione a sostanze iperosmolari, stimola le BEC a rilasciare IL-8 in modo dose dipendente, ma l'esposizione ripetuta determina una progressiva diminuzione del rilascio di IL-8 e in parallelo si verifica un aumento dell'apoptosi cellulare.

L'aumento dell'apoptosi cellulare è verosimilmente un meccanismo antiinfiammatorio di protezione operativo negli atleti.

Inoltre, lo studio della produzione della MAPK, p-ERK, ha mostrato delle variazioni significativamente correlabili con il rilascio di IL-8. Infatti la stimolazione iperosmolare determina l'attivazione e la produzione di p-ERK in modo dose dipendente e tale produzione risulta diminuire progressivamente nei tre giorni, come già riscontrato per IL-8, suggerendo quindi che ERK potrebbe avere un ruolo nell'attivazione infiammatoria delle BECs.

Gli esperimenti in vitro sulle BEC estendono i dati in vivo, dimostrando che l'effetto è particolarmente evidente quando l'esposizione iperosmolare prolungata per 40 min è ripetuta per diversi giorni. Pertanto, anche l'allenamento abituale potrebbe modulare la risposta delle BEC all'iperosmolarità indotta dall'insufficiente condizionamento dell'aria durante sforzo fisico.

Capitolo XII

Conclusioni

Lo studio sugli atleti ha confermato che l'esercizio di endurance causa distacco delle cellule epiteliali bronchiali e afflusso di neutrofili nelle vie aeree. La citologia dell'espettorato non ha evidenziato un effetto dose-risposta, con un quadro sostanzialmente sovrapponibile negli atleti della Mezza maratona e della Maratona. Abbiamo riscontrato differenze nella fase di recupero tra cellule epiteliali bronchiali che sono normali la mattina dopo la gara, e neutrofili che invece persistono aumentati rispetto alle condizioni di riposo, in entrambi i gruppi di atleti. La patogenesi di tali alterazioni è verosimilmente legata all'insufficiente condizionamento dell'aria inspirata durante l'iperventilazione da sforzo, con danno iperosmolare a livello delle cellule bronchiali e rilascio di IL-8, un fattore chemiotattico per i neutrofili. Per verificare tale ipotesi, sono stati eseguiti esperimenti in vitro su cellule epiteliali bronchiali esposte a soluzioni iperosmolari per 40 min per 3 giorni consecutivi. Tali esperimenti hanno evidenziato una progressiva riduzione del rilascio di IL-8 a seguito di esposizione iperosmolare da parte delle cellule epiteliali bronchiali, e il parallelo progressivo aumento dell'apoptosi cellulare. In conclusione, le cellule epiteliali bronchiali sono danneggiate dall'iperventilazione da sforzo negli atleti, ma l'attivazione dell'apoptosi sembra essere un efficiente meccanismo di controllo dell'infiammazione, senza particolari conseguenze a carico dell'apparato respiratorio degli atleti (assenza di sintomi o di alterazioni spirometriche).

BIBLIOGRAFIA

1. Bonsignore, M.R., Morici, G., Riccobono, L., Insalaco, G., Bonanno, A., Profita, M., Paternò, A., Mirabella, A., Vassalle, C. & Vignola. Airway inflammation in nonasthmatic amateur runners. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;. 281: L668-L676
2. Chimenti L, Morici G, Paternò A, Santagata R, Bonanno A, Profita M, Riccobono L, Bellia V, Bonsignore MR. Bronchial epithelial damage after a half-marathon in nonasthmatic amateur runners. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physio*. 2010; 298: L857-62.
3. Freed AN . Models and mechanism of exercise-induced asthma. *Eur Resp* 8:1770-85, 1995.
4. Anderson SD, Daviskas E. The mechanism of exercise-induced asthma is.... *J Allergy Clin Immunol* 106: 453-459, 2000
5. Anderson SD, Kippelen P. Airway injury as a mechanism for exercise-induced bronchoconstriction in elite athletes. *J Allergy Clin Immunol* 122: 225-235, 2008.
6. Bonsignore MR, Morici G, Vignola AM, Riccobono L, Bonanno A, Profita M, Abate P, Scichilone N, Amato G, Bellia V, Bonsignore G. Increased airway inflammatory cells in athletes: what do they mean? (Review) *Clin Exper Allergy* 33: 14-21, 2003.
7. Ramakrishna L, de Vries VC, Curotto de Lafaille MA. Cross-roads in the lung: immune cells and tissue interactions as determinants of allergic asthma. *Immunol Res*. 2012; 53: 213-28
8. Hashimoto, S., Matsumoto, K., Gon, Y., Nakayama, T., Takeshita, I. & Horie, T. Hyperosmolarity-induced interleukin-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 634-640
9. Hashimoto, S., Gon, Y., Matsumoto, K., Takeshita, I., Maruoka, S. & Horie, T. Inhalant corticosteroids inhibit hyperosmolarity-induced, and cooling and rewarming-induced interleukin-8 and RANTES production by human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1075-1080
10. Couto M, Silva D, Delgado L, Moreira A. Exercise and airway injury in athletes. *Acta Med Port*. 2013 Jan Feb;26(1):56-60. Epub 2013 Apr 24.

11. Schwartz LB, Delgado L, Craig T, Bonini S, Carlsen KH, Casale TB, Del Giacco S, Drobnic F, van Wijk RG, Ferrer M, Haahtela T, Henderson WR, Israel E, Lötval J, Moreira A, Papadopoulos NG, Randolph CC, Romano A, Weiler JM. Exercise-induced hypersensitivity syndromes in recreational and competitive athletes: a PRACTALL consensus report (what the general practitioner should know about sports and allergy). *Allergy*. 2008 Aug;63(8):953-61. Review.
12. Carlsen KH. The breathless adolescent asthmatic athlete. *Eur Respir J*. 2011 Sep;38(3):713-20. Review.
13. Moreira A, Delgado L, Carlsen KH. Exercise-induced asthma: why is it so frequent in Olympic athletes? *Expert Rev Respir Med*. 2011;5:1-3
14. Pascale Kippelen, Kenneth D Fitch, Sandra Doreen Anderson, Valerie Bougault, Louis-Philippe Boulet, Kenneth William Rundell, Malcolm Sue-Chu, Donald C McKenzie. Respiratory health of elite athletes – preventing airway injury: a critical review. *Br J Sports Med*. 2012 June 1; 46(7): 471–476.
15. Kippelen P, Anderson SD. Airway injury during high-level exercise. *Br J Sports Med* 2012 Published Online First: 12 January 2012 doi:10.1136/bjsports-2011-090819.
16. Shek PN, Shephard RJ. Physical exercise as a human model of limited inflammatory response. *Can J Physiol Pharmacol* 76:589-597,1998.
17. Ostrowski K, Rodhe T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Pro and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in human. *J Physiol* 515: 287-291, 1999.
18. Nieman DC. Immune response to heavy exertion. *J Appl Physiol* 82:1385-1394, 1997
19. Dufaux B, Order U. Plasma elastase, alpha-1 anti-trypsin, neopterin, tumor necrosis factor, and soluble interleukin-2receptor after prolonged exercise. *Int J Sport Med* 10: 434-438, 1989.
20. Helenius I, Ryttilä P, Sarna S, et al. Effect of continuing or finishing high-level sports on airway inflammation, bronchial hyperresponsiveness, and asthma: a 5-year prospective follow-up study of 42 highly trained swimmers. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 962–968.

21. Sue-Chu M, Larsson L, Moen T, Rennard SI, Bjermer L. Bronchoscopy and bronchoalveolar lavage findings in cross-country skiers with and without “ski asthma”. *Eur Respir J* 1999; 13: 626–632.
22. Bougault V, Turmel J, Bertrand M, Boulet LP. Asthma, airway inflammation and epithelial damage in swimmer and cold-air athletes. *Eur Respir J* 33:740-746, 2009
23. Karjalainen EM, Laitinen A, Sue-Chu M, Altraja A, Bjermer L, Laitinen LA. Evidence of airway inflammation and remodeling in ski athletes with and without bronchial hyperresponsiveness to methacholine. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161: 2086-91.
24. Sue-Chu, M., Karjalainen, E.M., Laitinen, A., Larsson, L., Laitinen, L.A. & Bjermer, Placebo-controlled study of inhaled budesonide on indices of airway inflammation in bronchoalveolar fluid and bronchial biopsies in cross-country skiers. *Respiration* 2000; 67: 417-425.
25. Florentin A, Hautemanière A, Hartemann P. Health effects of disinfection by-products in chlorinated swimming pools. *Int J Hyg Environ Health*. 2011; 214:461-9.
26. Helenius I., Ryttilä, P., Sarna, S., Lumme, A., Helenius, M., Remes, V., & Haahtela, T. Effect of continuing or finishing high-level sports on airway inflammation, bronchial hyperresponsiveness, and asthma: A 5-year prospective follow-up study of 42 highly trained swimmers. *J Allergy Clin Immunol*. 2002; 109: 962-968
27. Bonsignore MR, Morici G, Riccobono L, Profita M, Bonanno A, Paternò A, Di Giorgi R, Chimenti L, Abate P, Mirabella F, Maurizio Vignola A, Bonsignore G. Airway cells after swimming outdoors or in the sea in nonasthmatic athletes. *Med Sci Sports Exerc*. 2003; 35: 1146-52.
28. Morici, G., Bonsignore, M.R., Zangla, D., Riccobono, L., Profita, M., Bonanno, A., Paternò, A., Di Giorgi, R., Mirabella, F., Chimenti, L., Benigno, A., Vignola, A.M., Bellia, V., Amato, G. & Bonsignore, G. Airway cell composition at rest and after an all-out test in competitive rowers. *Med Sci Sports Exerc*. 2004; 36: 1723-1729

29. Belda J, Leigh R, Parameswaran K, O'Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161: 475-8.
30. Kharitonov SA, Rajakulasingam K, O'Connor B, Durham SR, and Barnes PJ. Nasal nitric oxide is increased in patients with asthma and allergic rhinitis and may be modulated by nasal glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol*. 1997; 99: 58–64.
31. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, and Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet*. 1994; 343: 133–135.
32. Lundberg JON and Weitzberg E. Nasal nitric oxide in man. *Thorax*. 1999; 54: 947–952.
33. Sato E, Simpson KL, Grisham MB, Koyama S, and Robbins RA. Inhibition of MIP1 alpha-induced human neutrophil and monocyte chemotactic activity by reactive oxygen and nitrogen metabolites. *J Lab Clin Med*. 2000; 135: 161–169.
34. Kesler BS, Mazzone SB, Canning CG. Nitric oxide-dependent modulation of smooth-muscle tone by airway parasympathetic nerves. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 165:481-8.
35. Jyonouchi H. Airway epithelium and apoptosis. *Apoptosis*. 1999 Dec;4(6):407-17.
36. Tesfaigzi Y. Roles of apoptosis in airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006 May;34(5):537-47. Epub 2006 Jan 26. Review.
37. Chimenti L, Morici G, Paterno A, Bonanno A, Vultaggio M, Bellia V, Bonsignore MR. Environmental conditions, air pollutants, and airway cells in runners: a longitudinal field study. *J Sports Sci*. 2009; 27 :925-35.
38. Davis MS, Schofield B, Freed AN. Repeated peripheral airway hyperpnea causes inflammation and remodeling in dogs. *Med Sci Sports Exerc*. 2003 Apr;35(4):608-16.
39. Denguezli M, Ben Chiekh I, Ben Saad H, Zaouali-Ajina M, Tabka Z, Abdelkrim Z. One-year endurance training: effects on lung function and airway inflammation. *J Sports Sci*. 2008; 26: 1351-9.

40. Davis MS, McKiernan B, McCullough S, Nelson S Jr, Mandsager RE, Willard M, Dorsey K. Racing Alaskan sled dogs as a model of "ski asthma". *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166: 878-82.
41. Freed, A.N. & Davis, M.S. Hyperventilation with dry air increases airway surface fluid osmolarity in canine peripheral airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1101-1107
42. Freed, A.N., Bromberger-Barnea, B. & Menkes, H.A. Dry air-induced constriction in lung periphery: a canine model of exercise-induced asthma. *J Appl Physiol* 1985; 59 : 1986-1990
43. Davis, M.S. & Freed, A.N. Repeated hyperventilation causes peripheral airways inflammation, hyper-reactivity, and impaired bronchodilation in dogs. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 785-789
44. Davis, M.S., Lockard, A.J., Marlin, D.J. & Freed, A.N. Airway cooling and mucosal injury during cold weather exercise. *Equine Vet J Suppl.* 2002; 34: 413-416
45. Chimenti, L., Morici, G., Paternò, A., Bonanno, A., Siena, L., Licciardi, A., Veca, M., Guccione, W., Macaluso, F., Bonsignore, G. & Bonsignore, M.R. Endurance training damages small airway epithelium in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 442-449
46. Pastva, A., Estell, K., Schoeb, T.R., Atkinson, T.P. & Schwiebert, L.M. Aerobic exercise attenuates airway inflammatory responses in a mouse model of atopic asthma. *J. Immunol* 2004; 172: 4520–4526
47. Han F, Luo Y, Li Y, Liu Z, Xu D, Jin F, Li Z. Seawater induces apoptosis in alveolar epithelial cells via the Fas/FasL-mediated pathway. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012 Jul 1;182(2-3):71-80.
48. Vignola AM, Chiappara G, Gagliardo R, Gjomarkaj M, Merendino A, Siena L, Bousquet J, Bonsignore G. Apoptosis and airway inflammation in asthma. *Apoptosis*. 2000 Nov;5(5):473-85. Review.
49. Efthimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, Kelly MM, Linden M, Louis R, Pizzichini MM, Pizzichini E, Ronchi C, Van Overvel F, Djukanović R. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. *Eur Respir J Suppl.* 2002; 37:19s-23s.

50. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, van der Grinten CP, Gustafsson P, Jensen R, Johnosn DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J; ATS/ERS Task Force. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005; 26: 319-338.
51. Fahy JV, Liu J, Wong H, and Boushey HA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1126–1131