

# Perspectives & Research

## Italian Research

### Studio multicentrico "Polonio in vivo"

#### Studio promosso dall'OSSFAD/ISS per lo studio del polonio nel polmone dei fumatori con tumore polmonare



*"Polonium in vivo". A multicentric study on polonium in the lungs of smokers with cancer supported by OSSFAD/ISS*

Vincenzo Zagà, Mattia Taroni, Massimo Esposito

#### Cancerogenicità delle radiazioni alfa

Il fumo di tabacco è una miscela eterogenea composta da una fase corpuscolata (5%) e una fase gassosa (95%). La prima è costituita da catrame (fase tar). Ci sono 0.3-3.3 miliardi di particelle per millilitro di fumo di sigaretta e oltre 4.000 composti [1, 2], tra cui più di 60 agenti con prove sufficienti di evidenza di cancerogenicità negli animali da laboratorio, 11 dei quali cancerogeni per l'uomo, secondo l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) [3,4].

Il fumo di ogni sigaretta contiene più di 500 miliardi di miliardi (500 trillions) di molecole cancerogene [5].

Fra i cancerogeni per l'uomo, presenti nel fumo di tabacco, ce n'è uno fortemente radioattivo: il Polonio 210 (Po-210).

Il Po-210 emette particelle alfa che hanno una bassa penetrazione ma un elevato potere ionizzante (LET). Infatti se sono emesse nelle vicinanze del DNA cellulare sono in grado di alterarlo, per azione diretta o indiretta mediata dalla radiolisi dell'acqua, e possono provocare sviluppo di lesioni cancerose. Il Po-210 è fortemente concentrato nelle foglie di tabacco ed è volatile alle temperature di una sigaretta accesa in fase di aspirazione (800-900°).

Secondo Holtzman [6] i composti inalati col fumo di tabacco, sia della fase gassosa che della fase corpuscolata, sono prontamente dispersi e ripuliti dai loro siti di deposizione nel polmone, attraverso la clearance muco-ciliare bronchiale del fumatore, che, nei primi tempi, è ancora abbastanza efficiente. Secondo le osservazioni sperimentali di Radford e Hunt [7], una parte del Polonio che in fase aspirativa passa alla fase gassosa, aderirebbe rapidamente e con forza alla superficie delle particelle corpuscolate del fumo,

penetrando così, con esse, in maniera più stabile e profonda nell'apparato broncopolmonare. Col fumo di tabacco viene anche inalato sotto forma insolubile il Piombo-210 (emivita 22 anni) precursore del Po-210 (emivita 138,38 giorni).

Pertanto le elevate concentrazioni di Polonio nel polmone dei fumatori si possono spiegare soprattutto attraverso l'accumulo di particelle insolubili di Piombo-210 (Pb-210), debolmente radioattivo alfa e beta, che poi nel tempo decade a Polonio-210, a forte emissione radioattiva alfa, grazie ad un sempre più progressivo rallentamento della clearance muco-ciliare che si ha col peggiorare del grado di BPCO.

La dose-radiazioni apportata dalle concentrazioni locali di Polonio sulla parete dell'epitelio bronchiale, dipende dalla frazione di particelle accumulate in queste aree e dal loro tempo di permanenza.

Holtzman [6] nelle sue ricerche ha dimostrato che le concentrazioni di Pb-210 sono maggiori nello scheletro e nei polmoni dei fumatori rispetto a quello dei non fumatori. Pertanto visto che il Polonio ha una emivita ( $T_{1/2}$ ) di 138,38 giorni ed il Piombo, che poi decade in Polonio, di 22 anni, è di conseguenza verosimile che un significativo rischio di cancro possa essere attribuito ad una cronica esposizione a bassi livelli di particelle insolubili alfa emittenti che, mentre apportano piccole dosi di radiazioni in toto, sono invece responsabili di dosi locali molto elevate in piccole aree tissutali soprattutto delle biforcazioni bronchiali (hot spots).

Tutto ciò viene facilitato in presenza di una marcata compromissione della clearance muco-ciliare spesso presente nei fumatori a causa della bronchite cronica [8-10],

nella quale, come peraltro ha dimostrato Auerbach [11], sono presenti lesioni metaplasiche dell'epitelio ciliato nel 100% dei forti fumatori [12, 13].

Il Po-210 diventa così più penetrante attraverso le zone disepitelizzate o scarsamente ciliate ove ristagna maggiormente il muco [7, 14].

Non sono un caso le relativamente recenti osservazioni clinico-epidemiologiche che i pazienti con BPCO, fumatori o ex fumatori, abbiano una maggior incidenza di neoplasia polmonare in maniera direttamente proporzionale alla gravità dello stadio della BPCO [15-17].

Martell stima che la dose cumulativa di radiazioni alfa a livello delle biforcazioni bronchiali del fumatore che muore di cancro polmonare è di circa 80 rads (1.600 ram), che è la dose sufficiente ad indurre trasformazione maligna da interazioni alfa con le cellule basali. Secondo Everett Coop dell'US Surgeon General, la potente radioattività presente nel tabacco è responsabile del 90% dei tumori tabacco-correlati.

Le particelle radioattive poi dall'apparato broncopolmonare si diffondono nell'organismo e raggiungono vari organi e tessuti attraverso la circolazione polmonare e sistemica, causando mutamenti nella struttura genetica cellulare e deviazioni dalle caratteristiche standard delle cellule, accelerandone l'invecchiamento e la morte. Nei fumatori vs non-fumatori, i livelli di Po-210 sono significativamente più elevati nel sangue (30%), [18], nelle urine (6 volte maggiore) [19], nel fegato, rene, cuore e nei muscoli scheletrici [20].

Le concentrazioni di Pb-210 e Po-210 nelle costole e nei tessuti alveolari polmonari sono risultate due volte più alte negli ex-fumatori che nei non fumatori, anche un anno dopo la cessazione del fumo [6].

Il Po-210, da solo, come iniziatore, ma anche come promotore in sinergia con una serie di sostanze mutagene e carcinogene non radioattive inalate col fumo di tabacco (idrocarburi aromatici, cadmio, N-Nitrosamine, etc.) [21], sembra essere il principale agente etiologico del tumore polmonare [22]. Infatti l'esposizione dei tessuti a radiazioni alfa, per lunghi periodi di tempo, può indurre cancro sia da solo che in sinergia con sostanze carcinogene non radioattive.

Vari studi sperimentali hanno dimostrato l'induzione di tumori in animali da esperimento dopo inalazioni di Po-210.

Kennedy et al, hanno indotto tumori polmonari, istologicamente simili ai carcinomi bronchiolo-alveolari (BAC) umani, nei criceti, dopo instillazioni intratracheali di 15 rad di polonio radioattivo, che corrispondono a un cinquantesimo della dose inalata da fumatori di due pacchetti al giorno per un periodo di 25 anni, riuscendo ad identificare le cellule d'origine di questi tumori nelle cellule bronchiolari di Clara [23].

È evidenza comune, suffragata da quella scientifica, che, dal punto di vista istologico, negli ultimi 40 anni, nel mondo occidentale, si è osservato il viraggio di istotipo del tumore polmonare da squamocellulare e indifferenziato a piccole cellule ad adenocarcinoma, in cui, in senso esten-

sivo, viene incluso il sottotipo carcinoma bronchiolo-alveolare (BAC).

Questo viraggio di istotipo, relativo e assoluto, è stato notato per la prima volta agli inizi degli anni '70 in occidente [24], ed è continuato ad essere osservato negli USA [25, 26] e nei Paesi Europei [27].

Per contro, vi è anche l'evidenza che il panorama degli istotipi del cancro polmonare in India, a differenza dei paesi occidentali, risulta ancora oggi praticamente immutato [28] rispetto ai primi anni '60 [29-32].

I fattori che hanno contribuito a questo viraggio nei paesi occidentali sono vari e molteplici, e forse non tutti conosciuti, comunque quasi tutti legati prevalentemente alla coltivazione con uso estensivo ed intensivo di fertilizzanti polifosfati che si è andata sviluppando dagli anni '60 ad oggi. Infatti non è un caso che, le sigarette indiane, che risentono di un'agricoltura povera, siano meno radioattive vs le occidentali di 10-15 volte, come riferito dagli scienziati del Bhabha Atomic Research Centre of India [33].

Per quanto riguarda il Meccanismo d'azione del Po-210, un recente studio di Prueitt et al. (Cambridge, MA-USA) [34] ha cercato di spiegare come le radiazioni alfa agiscono sul DNA. Le radiazioni ionizzanti, Po-210 compreso, attraverso un meccanismo di metilazione, inattiverebbero il gene oncosoppressore p16(INK4a). Questo gene "dormiente" lo si riscontra sia nei tumori polmonari di lavoratori non fumatori esposti a radiazioni in miniere di uranio, sia nei tumori polmonari di fumatori. Sembra che l'inattivazione di questo onco-soppressore possa avere un ruolo di primo piano nella cancerogenesi. Quanto grande sia questo ruolo rispetto alle altre sostanze cancerogene spetterà ad altri studi dimostrarlo.

## Razionale dello studio

Un fenomeno che da alcuni decenni si sta osservando nella clinica di tutti i giorni è quello dei tumori polmonari negli ex fumatori, in una percentuale al momento difficilmente quantizzabile. Di recente, Boffetta et al, su sette studi caso-controllo tra i fumatori abituali, ha riscontrato una odds ratio per il Carcinoma Bronchiolo-Alveolare (BAC) di 2.47 (95% confidence interval [CI] 2.08, 2.93), con un rischio aumentato in maniera lineare con la durata, la quantità fumata e il cumulo totale di fumo di sigarette, e persistente per lungo tempo, anche dopo aver smesso di fumare [35].

L'osservazione clinica dell'esistenza di un certo numero di pazienti deceduti per tumore polmonare nonostante avessero smesso di fumare molti anni prima costituisce una fascia "grigia" di pazienti morti per una patologia, quella tumorale, apparentemente non causale rispetto al tabagismo pregresso. Ciò rappresenta pertanto un interessante spunto di ricerca sul perché ciò succeda.

Nell'ottica speculativa di capire perché questi ex-fumatori, che hanno smesso anche da molti anni in assenza di un insulto sicuramente cancerogeno come il fumo, e al netto di altri fattori di rischio come amianto e radon, possano poi sviluppare tumore polmonare, è nato questo

studio di ricerca "Polonio in vivo". I due capisaldi etiologici e fisiopatologici su cui poggia questo studio sono:

a. la BPCO è un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di tumore polmonare ed è associato con il rischio di tumore polmonare da due a sei volte rispetto ai fumatori senza BPCO [36-40].

La riduzione del FEV1 è associata ad un aumento del rischio di incidenza di tumore polmonare anche indipendentemente dalla storia di fumo [39, 41].

Circa il 50% dei pazienti con neoplasia polmonare presenta BPCO, in linea con vari studi che mostrano che il tumore polmonare è una delle principali cause di morte in pazienti con BPCO [42].

Questo rischio sembra più elevato in pazienti con media-moderata BPCO che in quelli con più severa malattia [36, 40, 42-44].

Inoltre, il rischio solitamente persiste per almeno 20 anni dopo la cessazione del fumo [45].

b. Il rilievo della presenza di Polonio-210 (Po-210), emivita 138,38 giorni, e del suo precursore il Piombo-210 (Pb-210) che ha un'emivita 22 anni, nel fumo di tabacco.

La combinazione di questi due elementi (BPCO & Po-210/Pb-210) potrebbe rappresentare l'anello mancante per spiegare l'incidenza di tumori polmonari in ex forti fumatori che, a causa di un sempre più progressivo rallentamento della Clearance Muco-Ciliare tendono ad un accumulo di carica radioattiva [8, 17 46].

#### Obiettivi (End Points) dello studio:

- Valutare la presenza di radioattività da Po210 nell'apparato broncopolmonare di soggetti fumatori, ex fumatori e mai fumatori con diagnosi di tumore polmonare (End Point Primario).
- Valutare in tali pazienti presenza e grado di BPCO, secondo le Linee Guida GOLD (1° End Point Secondario).
- Determinare in tutti i pazienti il tasso di radioattività nelle urine (2° End Point Secondario).
- valutare lo status dell'oncosoppressore p16 (INK4a) (3° End Point Secondario).

#### Piano dello studio

Lo studio avrà come oggetto principale l'analisi spettrometrica condotta su campioni di Broncolavaggi (BL) prelevati in corso di esame broncoscopico diagnostico in pazienti consecutivamente arruolati e con diagnosi di tumore polmonare NSCLC (*Non Small Cell Lung Cancer*) presso i Centri sperimentatori, al fine di rilevare la presenza di Po-210/Pb-210 in 55 pazienti divisi in 3 bracci. A completamento dello studio, l'indagine di rilevazione della radioattività alfa sarà condotta anche sulle urine, mentre sui campioni citologici, risultati idonei per la quantità del prelievo citologico, sarà eseguito il test per l'oncosoppressore p16 (INK4a). Inoltre a tutti i pazienti sarà consegnato un kit di rilevazione radon che verrà posizionato nelle rispettive camere da letto per tre mesi.

**Braccio A:** in questo braccio saranno inseriti pazienti con tumore polmonare attualmente fumatori correnti o che abbiano smesso di fumare nell'ultimo mese in rapporto al recente cambiamento dello stato di salute (SMOKERS).

**Braccio B:** in questo braccio saranno inseriti pazienti con tumore polmonare ex fumatori che abbiano smesso di fumare da un numero, convenzionalmente stabilito, di almeno 5 anni (EX SMOKERS). Lo status di ex fumatore sarà confermato dalla misurazione del CO espirato.

**Braccio C:** di questo gruppo saranno inseriti pazienti con tumore polmonare mai fumatori e che non sono mai stati esposti in maniera continuativa al fumo passivo negli ultimi 15-20 anni. (NEVER SMOKERS).

### Caratteristiche per l'eleggibilità dei pazienti

#### Criteri di inclusione:

- Ambo i sessi dai 35 agli 85 anni.
- Accettazione di adesione scritta allo studio.
- I pazienti di tutti i bracci (A,B,C) devono avere una diagnosi di tumore polmonare NSLC:
  - Per il braccio A (fumatori) il paziente deve essere fumatore da almeno 20 anni.
  - Per il braccio B (ex fumatori) il paziente deve aver fumato per almeno 20 anni e deve aver smesso di fumare da almeno 5 anni prima del riscontro della diagnosi di tumore polmonare NSLC.
  - Per il braccio C (mai fumatori) il paziente non deve aver mai fumato (<100 sigarette/vita) e non deve essere stato sottoposto a fumo in famiglia da almeno 15 anni.

#### Criteri di esclusione:

- Fumatori di meno di 20 anni di fumo di tabacco (totale) per il gruppo A e B.
- Presenza di rischio lavorativo per amianto (Officine Grandi Riparazioni FS, muratori, cantieri navali, etc.)

### Soggetti ed Enti coinvolti nella sperimentazione

- Dr. Vincenzo Zagà (Società Italiana di Tabaccologia-SITAB, U.O. di Pneumotisiologia Territoriale e Coordinatore Centri Antifumo-AUSL di BO) responsabile dello studio.
- Broncologia-Osp. Maggiore AUSL di BO (dr. Marco Pattelli, dr. Rocco Trisolini, dr.ssa Daniela Paioli)
- Pneumologia Osp. Bellaria-AUSL di BO (dr. Daniele Grosso e dr. Flavio Fois)
- UOC Endoscopia Bronchiale e Diagnostica Interventistica - Centro per il Trattamento del Tabagismo AORN A. Cardarelli, Napoli (dr.ssa Paola Martucci e dr. Bruno del Prato)
- ISS- OSSFAD (dr. P. Zuccaro e dr.ssa R. Pacifici) - Roma
- ENEA di BO (dr. Paolo Bartolomei).
- U-Series Lab Srl - Bologna (dr. Massimo Esposito, dr. Mattia Taroni)

- Unità di Epidemiologia Ambientale Polmonare - Istituto di Fisiologia Clinica, CNR di Pisa (dr.ssa Sara Maio, dr. Giovanni Viegi).

## Conclusioni

Questo studio "Polonio in vivo" è reso possibile grazie alla sensibilità al problema della radioattività alfa del fumo di tabacco del past Director OSSFAD dr. Piergiorgio Zuccaro e del nuovo Direttore dr.ssa Roberta Pacifici. Questa ricerca fa seguito a quella effettuata nel 2011, sempre per con-

tell'OSSFAD e presentata in occasione del 31 maggio 2011, sulla radioattività alfa da Polonio 210 nelle 10 marche di sigarette più vendute in Italia.

La possibile ricaduta clinica di questo studio potrà essere sui fumatori ma soprattutto sugli ex fumatori al fine di impostare una valutazione sistematica della funzionalità respiratoria ed un conseguente approccio terapeutico teso a favorire il più possibile la "depurazione" broncopolmonare della eventuale carica radioattiva da Pb e Po-210. ■

## BIBLIOGRAFIA

- Robbins e Cotran. Le basi patologiche delle malattie. Elsevier Italia, Milano, ed. it. 2006; cap. 9: 419-421.
- Stewart B W and Kleihues P (eds) 2003 World cancer report 2003 (Lyon, France: International Agency for Research on Cancer): pp 21-28.
- International Agency for Research on Cancer. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans vol 83. Lyon, FR: IARC, 2004:53e119.
- Hecht SS. Research opportunities related to establishing standards for tobacco products under the family smoking prevention and tobacco control act. *Nicotine Tob Res*. Published Online First: 10 Jan 2011. doi:10.1093/ntr/ntq216.
- Hecht SS. More than 500 trillion molecules of strong carcinogens per cigarette: use in product labelling? *Tobacco Control* 2011;20:387. doi:10.1136/tc.2011.042853
- Holzman RB, Ilciewicz FH. Lead-210 and Polonium-210 in tissues of cigarette smokers. *Science*, 1966;153: 1259-1260
- Radford EP Jr, Hunt VR. Polonium-210, a volatile radioelement in cigarettes. *Science* 1964; 143: 247-249.
- Lourenco RV, Klimec MF, Borowski CJ. Deposition of 2 µ particles in the tracheobronchial tree of normal subjects - smokers and nonsmokers. *J Clin Invest* 1971; 50: 1411-1420.
- Lauenco RV, Levine H, Klick CJ, Klimek MF. Deposition and clearance of inhaled particles in chronic bronchitis. *J. Lab Clin Med* 1968; 72: 900.
- Bertoli L, Banfi F, Camicasa E, Lo Cicero S, Possa M, Magri G, Rizzato G. La clearance mucociliare, studiata con microsfere di albumina marcata, nella bronchite cronica e nel soggetto normale. *GIMT* 1984; vol. 38, n. 1: 43-47.
- Auerbach O, Stout AP, Hammond EG, Garfinkel L. Bronchial epithelium in former smokers. *New England J. Med.* 1962; 267: 119.
- Di Franza JR, Winters TH. Radioactivity in cigarette smoke. (Correspondence). *N Engl J Med* 1982; 307: 312-313.
- Little JB, MC Gandy RB, Kennedy AR. Interaction between polonium 210 alpha radiation, benzo (a) pyrene, and 0,9% NaCl solution instillations in the induction of experimental lung cancer. *Cancer Res*, 1978; 38:1928-35.
- Cohen BS, Harley NH, Tso TC. Clearance of polonium-210-enriched cigarette smoke from the rat trachea and lung. *Toxicol Appl Pharmacol*, Jun 1985; 79 (2): 314-322.)
- GOLD COPD. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) website. <http://www.goldcopd.org>. Accessed December 12, 2011.
- Rajewsky B, Stahlhofen W. Polonium-210 activity in the lungs of cigarette smokers. *Nature* 1966; 209: 1312-1313.
- Schwartz AG. Susceptibility to lung cancer and COPD may be genetically linked. *Am J Resp Crit Care Med* 2006; 173: 16-22.
- Shabana El , Abd Elaziz MA, Al-Arifi MN, Al-Dhawali AA, Al-Bokari MM-A. Evaluation of the contribution of smoking to total blood polonium-210 in Saudi population. *Applied Radiation and Isotopes* 52, 2000; 23-26.
- Eisler H. Polonium-210 and bladder cancer. *Science*. 1964;144: 952.
- Ferri ES and Baratta EJ. Polonium 210 in Tobacco, Cigarette Smoke, and Selected Human Organs. *Public Health Reports* February 1966; Vol. 81, No. 2: 121-127.
- Kilthau GF: Cancer risk in relation to radioactivity in tobacco. *Radiol. Technol.* 1996; 63 (3): 217-222. Martell, E.A. . Radiation dose at bronchial bifurcations of smokers from indoor exposure to radon progeny. *Proc Natl Acad Sci, USA*, March 1983; Vol. 80, 1285-1289.
- Travis CC, Etnier EL, Kirkscey KA. Carcinogenic Risk of Lead-210 and Polonium-210 in Tobacco Smoke. A selected, annotated bibliography. OAK RIDGE NATIONAL LABORATORY Oak Ridge, Tennessee 37830 (USA), May 1978.
- Kennedy AR, McGandy RB and Little JB. Histochemical, light and electron microscopic study of polonium-210 induced peripheral tumors in hamster lungs: Evidence implicating the Clara cell as the cell of origin. *European Journal of Cancer* (1965), November 1977; 13, 11: 1325-1340.
- Vincent RG, Pickren JW, Lane WW, Bross I, Takita H, Houten L, Gutierrez AC, Rzepka T. The changing histopathology of lung cancer: a review of 1682 cases. *Cancer* 1977;39: 1647-55.
- Anton-Culver H, Culver BD, Kurosaki T, Osann KE, Lee JB. Incidence of lung cancer by histological type from a population-based registry. *Cancer Res* 1988;48:6580-3.
- Wingo PA, Ries LA, Giovino GA, Miller DS, Rosenberg HM, Shopland DR, Thun MJ, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:675-90.
- Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP, Parkin DM. International lung cancer trends by histologic type: male: female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int J Cancer* 2005;117:294-9.
- Behera D, Balamugesh T. Lung Cancer in India. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 2004; 46 : 269-281.
- Viswanathan R, Gupta S, Iyer PVK. Incidence of primary lung cancer in India. *Thorax* 1962; 1: 73-76.
- Thippanna G, Venu K, Gopalkrishnaiah V, Reddy PNS, Sai Charan BG. A profile of lung cancer patients in Hyderabad. *J Indian Med Assoc* 1999; 97 : 357-59.
- Gupta D, Boffetta P, Gaborieau V, Jindal SK. Risk factors of lung cancer in Chandigarh, India. *Indian J Med Res* 2001; 113 : 142-50.
- Kashyap S, Mohapatra PR, Negi RS. Pattern of primary lung cancer among bidi smokers in North-Western Himalayan region of India. *Lung Cancer* 2003; 41(Suppl. 2) : S111.
- Singh DR e Nilehani WR. Measurement of polonium activity in Indian Tobacco. *Health Phys.* 1976 Oct; 31(4):393-4.
- Prueitt RL, Goodman JE, Valberg PA. Radionuclides in cigarettes may lead to carcinogenesis via p16(INK4a) inactivation. *J Environ Radioact.* 2009; vol 100, issue 2:157-161.
- Boffetta P, Jayaprakash V, Yang P, Asomaning K, Muscat JE, Schwartz AG, Zhang ZF, Le Marchand L, Cote ML, Stoddard SM, Morgenstern H, Hung RJ, Christiani DC. Tobacco smoking as a risk factor of bronchioloalveolar carcinoma of the lung: pooled analysis of seven case-control studies in the International Lung Cancer Consortium (ILCCO) Cancer Causes Control. 2010 Nov 12. (Epub ahead of print).
- de Torres JP, Bastarrika G, Wisniwesky JP, et al. Assessing the relationship between lung cancer risk and emphysema detected on low dose CT of chest. *Chest* 2007; 132: 1932-38.
- Mannino DM, Aguayo SM, Petty TL, et al. Low lung cancer function and incident lung cancer in the USA: data from the first National Health and Nutrition Examination Survey follow-up. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1475-80.
- Turner MC, Chen Y, Krewsky D, et al. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with lung cancer mortality in a prospective study of never smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 285-90.
- Wilson DO, Weissfeld JL, Balkan A, et al. Association of radiographic emphysema and airflow obstruction with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 738-44.
- Young RP, Hopkins RJ, Christmas T, et al. COPD prevalence is increased in lung cancer, independent of age, sex and smoking history. *Eur Respir J* 2009; 34: 380-86.
- Van den Eeden SK, Friedman GD. Forced expiratory volume (1 second) and lung cancer incidence and mortality. *Epidemiology.* 1992;3:253-7.
- Anthonissen NR, Skeans MA, Wise RA, et al. The effects of a smoking cessation intervention on 14.5 year mortality: a randomised clinical trial. *Ann Intern Med* 2005; 142: 233-39.
- de Torres JP, Marin JM, Casanova C, et al. Lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease - incidence and predicting factors. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 913-19.
- Skillrud DM, Offord KP, Miller RD. Higher risk of lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, matched, controlled study. *Ann Intern Med.* 1986;105:503-7.
- Spira A, Beane J, Shah V, et al. Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 10143-48.
- Lourenco, R.V. Distribution and clearance of aerosols. *Amer Rev Resp Dis* 1970; 101: 460.