

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA**

**SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E  
FARMACEUTICHE**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN  
MEDICINA E CHIRURGIA**



**TESI DI LAUREA**

***“IL-8 nell'asma: possibile ruolo della citochina nei diversi  
tipi di infiammazione”***

**RELATORE:**

*Prof. Diego Bagnasco*

**CORRELATRICE:**

*Dott.ssa Benedetta Bondi*

**CANDIDATA:**

*Greta Losacco*

Anno accademico 2025-2026



## SOMMARIO

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
1.1 ASMA: DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA .....	1
1.2 EZIOLOGIA .....	2
1.3 DIAGNOSI .....	8
1.4 TRATTAMENTO.....	11
<b>2. NETWORK INFIAMMATORIO DELL'ASMA E CITOCHINE</b>	<b>16</b>
2.1 IMMUNITA INNATA E ADATTATIVA.....	16
2.2 INFIAMMAZIONE T2.....	20
2.3 INFIAMMAZIONE NON T2 .....	24
2.2 L'ASMA NEUTROFILICA .....	28
<b>3 IL-8.....</b>	<b>29</b>
3.1 MECCANISMI DI SEGNALAZIONE DI IL-8.....	30
3.1 IL-8 NEI DIVERSI TIPI DI INFIAMMAZIONE .....	31
<b>4. OBIETTIVO DELLO STUDIO .....</b>	<b>34</b>
<b>5. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>34</b>
5.1 PAZIENTI E DISEGNO DELLO STUDIO.....	34
5.2 PURIFICAZIONE E ANALISI PRECLINICA .....	36
<b>6. RISULTATI .....</b>	<b>37</b>
<b>7. DISCUSSIONE .....</b>	<b>39</b>
<b>8. CONCLUSIONI.....</b>	<b>45</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>46</b>

# **1. INTRODUZIONE**

## **1.1 ASMA: DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA**

L'asma bronchiale è una malattia eterogenea caratterizzata dall'infiammazione cronica delle vie aeree. Presenta una sintomatologia variabile nell'intensità e nel tempo, definita da una limitazione del flusso aereo associata ad episodi di respiro sibilante, dispnea, tosse e sensazione di oppressione toracica<sup>1</sup>, giustificata da cambiamenti strutturali delle vie aeree, quali metaplasia delle cellule caliciformi, deposizione di proteine della matrice extracellulare e fibrosi, iperplasia e ipertrofia dei muscoli lisci bronchiali, e aumento dei fattori angiogenici. L'insieme di queste modificazioni contribuisce al rimodellamento, riducendo il calibro delle vie respiratorie e causando ostruzione del flusso aereo<sup>2</sup>.

La predisposizione di un individuo allo sviluppo dell'asma, o alla gravità della malattia, è probabilmente determinata dall'interazione tra fattori propri dell'ospite e l'ambiente. L'esposizione ambientale cumulativa può portare a una malattia persistente e progressiva con cambiamenti potenzialmente irreversibili della struttura e della funzione polmonare<sup>3</sup>. L'asma è una delle malattie croniche più comuni al mondo, colpisce tutte le età ma soprattutto l'infanzia, e rappresenta un importante problema di sanità pubblica per morbosità, mortalità e costi<sup>4</sup>. Le esacerbazioni dell'asma rappresentano un problema significativo, con una prevalenza più elevata nei bambini e negli anziani. La frequenza e la gravità delle esacerbazioni sono influenzate da fattori come il controllo della malattia, le infezioni virali, l'esposizione ad allergeni e lo stato socioeconomico<sup>5</sup>: le regioni ad alto reddito mostrano prevalenze elevate, ma mortalità più bassa, mentre le aree a basso reddito hanno tassi di mortalità più elevati. I principali fattori di rischio sono l'obesità, il fumo e gli agenti occupazionali, con l'obesità che rappresenta il contributo più importante a livello globale<sup>4</sup>.

La gestione efficace e la prevenzione sono fondamentali per ridurre l'impatto di questi episodi, che spesso portano a ricoveri e complicanze<sup>5</sup>.

La prevalenza di asma negli adulti a livello mondiale nel periodo 2015-2020 si attestava intorno al 4,4%, con valori più elevati nei bambini (7,6%) e negli adolescenti (10,5%).

In Italia, la prevalenza di asma varia significativamente a seconda delle aree geografiche e delle condizioni climatiche con aree a clima mediterraneo che mostrano prevalenze più elevate rispetto a quelle a clima subcontinentale: la prevalenza della malattia è risultata compresa tra l'8,1% (Pavia) e il 12,3% (Sassari); la prevalenza di sintomi asmatiformi

variava invece tra il 23,0% (Pavia) e il 27,8% (Sassari). Questi dati evidenziano come l'asma sia una condizione di grande impatto sia a livello globale che nazionale, con differenze significative legate a fattori ambientali e geografici<sup>6</sup>.

## **1.2 EZIOLOGIA**

I fattori eziologici dell'asma vedono un'interazione complessa tra fattori genetici, ambientali e dell'ospite. Tra i fattori ambientali, si includono inquinamento atmosferico, pollini, muffe e altri aeroallergeni, oltre alle condizioni meteorologiche. I fattori dell'ospite comprendono invece obesità, fattori nutrizionali, infezioni e sensibilizzazione allergica. La genetica gioca un ruolo importante attraverso loci di suscettibilità all'asma presenti in alcuni geni<sup>7</sup>.

### **Fattori ambientali**

#### ***Inquinamento atmosferico***

L'inquinamento atmosferico esterno ha quasi certamente un impatto globale significativo sull'asma sia nei bambini che negli adulti. Esposizioni a inquinanti come PM2.5, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, e SO<sub>2</sub> sono state associate a un aumento del rischio di insorgenza di asma e di esacerbazioni nei soggetti già affetti. Questi inquinanti possono causare infiammazione delle vie respiratorie, alterazioni della barriera epiteliale e risposte immunitarie innate e adattative, contribuendo così alla patogenesi dell'asma. La presenza di inquinamento atmosferico può anche aumentare la sensibilità alle allergie e aggravare le condizioni respiratorie, specialmente in soggetti geneticamente predisposti<sup>8</sup>. A livello mondiale, nel 2015, sono stati stimati dai 9 ai 23 milioni e dai 5 ai 10 milioni di accessi al pronto soccorso per esacerbazioni di asma attribuite rispettivamente all'ozono e al PM<sub>2,5</sub>. In un trial clinico con disegno crossover condotto dall'*Imperial College* di Londra, tra il 2003 e il 2005, è stato dimostrato come in soggetti asmatici l'esposizione ai fumi diesel può ridurre significativamente il Volume Espiratorio Massimo nel 1° secondo (FEV<sub>1</sub>), diretto indicatore di funzionalità respiratoria residua, specialmente nei soggetti con asma più severa, e quindi la correlazione tra concentrazioni di inquinanti e risposte fisiologiche e infiammatorie<sup>9</sup>.

Di grande interesse attuale sono anche le microplastiche (MP), ovvero frammenti di materiale plastico di dimensioni comprese tra i 5 millimetri e pochi micrometri, per la loro tendenza ad accumularsi sia nell'ambiente che nel corpo umano. Studi recenti hanno

infatti dimostrato la loro tendenza ad accumularsi in diversi distretti corporei quali polmoni, fegato, reni, intestino, sangue, placenta e latte materno<sup>10,11</sup>.

L'attenzione è rivolta alla loro presenza nel tratto respiratorio come potenziale causa di danno alla barriera epiteliale, la cui integrità è essenziale nel proteggere il tratto respiratorio da infezioni e infiammazioni croniche. Di particolare importanza è l'azione delle microparticelle sui principali componenti proteici giunzionali della barriera, il cui danneggiamento faciliterebbe l'ingresso di allergeni e agenti patogeni responsabili dell'infiammazione cronica. Inoltre, è stato riscontrato che l'infiammazione delle vie aeree viene aggravata dall'esposizione concomitante ad altre particelle microplastiche o allergeni, come gli acari della polvere<sup>9,12</sup>.

### ***Muffe e pollini***

Alcuni studi longitudinali hanno mostrato che la presenza di muffe e umidità negli ambienti può contribuire all'insorgenza di asma e a una maggiore sensibilità bronchiale, anche se non sempre si riscontra un'associazione diretta con la riduzione della funzione polmonare. Inoltre, l'esposizione a muffe in ambienti umidi può favorire riacutizzazioni e peggioramenti dei sintomi in soggetti già asmatici, con effetti potenzialmente più evidenti nelle donne, forse a causa di una maggiore suscettibilità o di un'esposizione più prolungata. Le muffe più coinvolte nell'esacerbazione dell'asma sono principalmente specie come *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Aspergillus fumigatus*. Queste muffe sono frequentemente trovate in ambienti indoor umidi e sono state associate a sintomi respiratori e asma, specialmente nei bambini<sup>13</sup>.

Anche l'esposizione ai pollini è associata a un aumento del rischio di esacerbazioni di asma, in particolare in soggetti giovani (<18 anni). Studi indicano che l'aumento delle concentrazioni di pollini, come quelli di betulla e graminacee, è correlato a un incremento delle visite in pronto soccorso e delle ospedalizzazioni per asma grave, con odds ratio che variano tra 1.02 e 1.19 per incrementi di pollini di 50-100 grains/m<sup>3</sup>, a seconda del tipo di polline e dell'età del soggetto<sup>14</sup>.

### ***Esposizione professionale***

Una quota rilevante di asma nell'adulto è legata al lavoro: alcuni studi stimano che circa il 15-20% dei casi di asma insorta in età adulta siano attribuibili a esposizione

professionali, e che oltre il 20% degli adulti con asma abbia un peggioramento dei sintomi a causa del lavoro<sup>15</sup>.

Le esposizioni a polveri, gas, fumi e altri agenti occupazionali sono riconosciute come fattori di rischio significativi per lo sviluppo e l'aggravamento dell'asma, si stima infatti che le riacutizzazioni legate al lavoro possano riscontrarsi nel 20–25% degli adulti lavoratori che soffrono di asma preesistente, sebbene sia spesso difficile dimostrare oggettivamente un peggioramento del controllo della malattia <sup>7,16</sup>.

Il numero e l'entità delle esacerbazioni sono influenzati dalla natura, dalla durata e dall'intensità dell'esposizione<sup>15</sup>.

Tra le sostanze che più sono coinvolte troviamo: polveri di legno come il cedro rosso occidentale, proteasi e alcalasi derivanti da *Bacillus subtilis*, polveri di animali, acari e polveri di stoccaggio, lattice naturale e polveri industriali come isocianati (es. toluene diisocianate) e coloranti reattivi<sup>17</sup>.

Per tentare di ovviare a questo problema, per esempio, il settore sanitario è riuscito a ridurre il rischio indotto dal lattice sostituendo i guanti in lattice di gomma naturale (NRL) con guanti in NRL senza polvere e a basso contenuto proteico. Questo approccio è efficace nella riduzione al minimo dell'esposizione ed evidenzia il vantaggio di identificare le persone a rischio di asma correlata all'attività lavorativa e di ridurre al minimo le esposizioni potenzialmente nocive<sup>7</sup>.

### ***Thunderstorm Asthma***

L'asma da temporale è definita come un fenomeno epidemico che si verifica durante o subito dopo un temporale, in cui le persone colpite manifestano sintomi asmatici quali affanno, sibilo respiratorio e tosse<sup>7</sup>.

Un numero crescente di prove dimostra il verificarsi di gravi epidemie di asma durante i temporali nella stagione pollinica, in diverse zone geografiche.

Durante i primi 20–30 minuti di un temporale, i pazienti affetti da allergie ai pollini possono inalare un'alta concentrazione di materiale allergenico disperso nell'atmosfera, che a sua volta può indurre reazioni asmatiche, spesso gravi. Anche i soggetti senza sintomi asmatici, ma affetti da rinite stagionale, possono sperimentare un attacco d'asma<sup>18</sup>.

Le principali ipotesi che spiegano l'associazione tra temporali e asma sostengono che i temporali possono concentrare i granuli di polline a livello del suolo, i quali, una volta

rotti dallo shock osmotico, rilasciano nell'atmosfera particelle allergeniche di dimensioni respirabili e sufficientemente piccole da penetrare nel tratto respiratorio inferiore e provocare un grave attacco d'asma nei soggetti sensibili<sup>7,18</sup>.

La carica elettrica e le forze elettrostatiche possono anche contribuire alla rottura dei pollini, aumentando il rischio di esposizione<sup>19</sup>.

Il 21 novembre 2016, Melbourne ha vissuto un'emergenza sanitaria legata al thunderstorm asthma che ha superato tutti gli eventi precedentemente segnalati (principalmente nel Regno Unito e in Australia). È stato infatti registrato un aumento di 4,3 volte del numero delle visite al pronto soccorso per sintomi di distress respiratorio acuto e 9 decessi nel successivo periodo di 10 giorni sono stati attribuiti all'asma come causa primaria. Questa statistica sulla mortalità era superiore del 50% rispetto a quanto previsto sulla base della media dello stesso periodo nei 3 anni precedenti.<sup>7</sup>

## **Fattori dell'ospite**

### ***Obesità e fattori nutrizionali***

L'obesità è un forte fattore di rischio per l'asma ad esordio in età adulta. Una meta-analisi di studi di corte (16 studi, >1,1 milioni di persone) mostra che per ogni variazione di +5 kg/m<sup>2</sup> di Indice di massa corporea (BMI) aumenta il rischio di asma del 32% e che a BMI di 25, 30, 35 e 40, i Rischi Relativi (RR) rispetto a un BMI di 20 sono rispettivamente 1.23, 1.69, 2.45 e 3.64, evidenziando che un BMI più elevato è correlato a un rischio maggiore di asma<sup>20</sup>.

Studi sulla relazione tra asma e obesità hanno permesso di individuarne due fenotipi distinti:

- Early-onset: fenotipo che si manifesta in bambini sotto i 12 anni, spesso con obesità che aggrava l'asma preesistente. In questo gruppo, l'asma è generalmente allergica, con una maggiore severità dell'ostruzione delle vie aeree, iperreattività bronchiale e infiammazione eosinofila;
- Late-onset: fenotipo che si sviluppa in età adulta, spesso come conseguenza dell'obesità. Questo tipo di asma è di solito non allergico, con sintomi pronunciati nonostante trattamenti con corticosteroidi inalatori e broncodilatatori a lunga durata. In questo fenotipo, l'infiammazione può essere neutrofila e più difficile da controllare<sup>21</sup>.

L'obesità favorisce uno stato infiammatorio sia sistemico che locale che coinvolge diverse vie e mediatori. In condizioni di obesità, l'accumulo di tessuto adiposo, soprattutto di tipo viscerale, attiva una risposta infiammatoria di basso grado chiamata "metainfiammazione", principalmente mediata da macrofagi M1 che secernono citochine pro-infiammatorie come IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . L'attivazione dell'inflammasoma NLRP3, stimolata da acidi grassi saturi come palmitato e cristalli di colesterolo, porta alla produzione di IL-1 $\beta$  attraverso la caspasi-1, amplificando la risposta infiammatoria.

Inoltre, l'infiammazione nelle vie aeree di soggetti obesi può essere caratterizzata da un predominio neutrofilo, con livelli elevati di IL-17A, coinvolto nel reclutamento di neutrofili e nell'iperreattività bronchiale. La produzione di citochine come IL-6 e IL-1 $\beta$ , insieme all'attivazione di cellule innate come ILC3, contribuisce a un quadro infiammatorio che può peggiorare l'asma e favorire l'iperreattività delle vie respiratorie<sup>21,22</sup>.

In aggiunta nel paziente obeso è spesso documentata la carenza di vitamina D, poiché la vitamina D sequestrata nel tessuto adiposo può ridurre la sua disponibilità bioattiva, influenzando la regolazione immunitaria e l'infiammazione. La carenza di vitamina D, quindi, può contribuire a uno stato infiammatorio cronico, favorendo l'attivazione di cellule immunitarie e la produzione di citochine pro-infiammatorie, che peggiorano la funzione polmonare e la severità dell'asma<sup>22</sup>.

Inoltre, l'obesità è associata a un fenotipo di asma più resistente ai corticosteroidi e caratterizzato da alterazioni della crescita delle vie aeree, come la disanapsi (condizione fisiologica o patologica caratterizzata da una sproporzione tra la crescita o le dimensioni del parenchima polmonare e quella delle vie aeree<sup>23</sup>), che può portare a un aumento della gravità delle crisi e a un uso più frequente di corticosteroidi orali<sup>24</sup>.

### ***Infezioni***

Lo sviluppo di infezioni severe delle basse vie respiratorie (LRIs), soprattutto di origine virale, durante l'infanzia è stato correlato con un maggiore rischio di insorgenza di asma. Le infezioni virali severe, in particolare quelle causate dal virus respiratorio sinciziale (RSV) e dai rinovirus, interagiscono con la sensibilizzazione atopica nel promuovere l'insorgenza di asma successiva, soprattutto se contratti nella finestra critica del primo anno di vita<sup>25</sup>.

Gli studi dimostrano che il respiro sibilante causato dai virus respiratorio (VR) nell'infanzia è associato a un rischio notevolmente più elevato di sviluppare l'asma nella tarda infanzia; alcuni risultati indicano infatti un'incidenza dell'asma fino al 70% tra i bambini che hanno manifestato respiro sibilante da VR in tenera età<sup>26</sup>.

Caratteristica molto importante è la gravità dell'infezione misurata sulla base di parametri clinici, ciò suggerisce una relazione dose-risposta in cui una maggiore gravità durante l'infezione iniziale può contribuire ad alterazioni a lungo termine delle vie aeree e a una riprogrammazione immunitaria, aumentando il rischio di asma<sup>27</sup>.

Alla base della problematica risulta esservi la capacità del virus di indurre un'alterazione nelle cellule T regolatori (T reg), che perdono temporaneamente la loro capacità di controllare la risposta immunitaria e assumono caratteristiche simili alle cellule Th2 effettrici. La perdita della funzione soppressiva delle T reg è associata a un aumento dell'espressione dei fattori di trascrizione GATA-3 e delle citochine Th2 come l'IL-13, nonché a un cambiamento nel fenotipo delle cellule T reg<sup>28</sup>.

Altro effetto favorente l'insorgenza dell'asma è la capacità del patogeno di indurre una disfunzione del recettore  $\beta$ 2-adrenergico sulle cellule muscolari lisce del tratto respiratorio inducendo il suo clivaggio da parte di proteosomi e diminuendo il numero di recettori esposti, andando così ad alterare il rilassamento della muscolatura stessa<sup>29</sup>.

### **Fattori genetici**

La combinazione e la possibile interazione tra molteplici fattori ambientali e il corredo genetico degli individui rendono l'asma una malattia realmente multifattoriale<sup>30</sup>. Gli studi sui gemelli suggeriscono che l'ereditabilità dell'asma possa raggiungere il 60–70%, il che implica che la comprensione delle basi genetiche dell'asma potrebbe svelare molti meccanismi patogeni<sup>31</sup>.

L'asma e le allergie condividono numerosi meccanismi genetici e biologici, entrambe le condizioni sono influenzate da varianti genetiche che modulano le risposte immunitarie, in particolare le vie associate alle citochine e ai recettori coinvolti nell'infiammazione e nella risposta allergica. Ad esempio, pathway come quella IL-33, IL-1RL1 e le vie Th2, che coinvolgono IL-4 e IL-5, sono implicate sia nell'asma che nelle allergie, favorendo eosinofilia e infiammazione di tipo 2. Varianti nel gene IL1RL1 sono associate a livelli più bassi di recettori solubili, suggerendo che individui con queste varianti potrebbero rispondere diversamente ai trattamenti anti-IL-33<sup>32</sup>.

Studi di espressione genica hanno evidenziato che i geni condivisi sono significativamente rappresentati in tessuti come pelle, polmoni, esofago e sangue, sottolineando il ruolo delle barriere epiteliali e delle risposte immunitarie locali<sup>33</sup>.

I meccanismi epigenetici sono definiti come cambiamenti ereditari nell'attività genica che sono indipendenti dalle alterazioni della sequenza di DNA sottostante<sup>34</sup>. Le modificazioni epigenetiche, come la metilazione del DNA, svolgono un ruolo significativo nello sviluppo dell'asma nei primi anni di vita, mediando cambiamenti nell'espressione genica che influenzano le risposte immunitarie e la funzione delle vie aeree. Queste modifiche possono influenzare i geni coinvolti nella differenziazione delle cellule T, come SMAD3, che è cruciale per la regolazione immunitaria<sup>35</sup>.

Anche le modifiche degli istoni influenzano la regolazione dei geni coinvolti nelle risposte immunitarie e nell'infiammazione. La riduzione di metilazione dell'istone 27 (H3K27me3), ad esempio, è stata osservata nelle cellule muscolari delle vie aeree di soggetti asmatici, suggerendo un ruolo nelle alterazioni strutturali e funzionali delle vie respiratorie<sup>36</sup>.

Il crescente interesse in questo campo è legato sia ai recenti progressi fatti nel campo dell'associazione genomica (GWAS), che hanno identificato numerose varianti di rischio, principalmente polimorfismi a singolo nucleotide (SNP)<sup>32</sup> che ad eventuali importanti implicazioni terapeutiche che permetterebbero di sviluppare trattamenti sempre più mirati<sup>36</sup>.

### **1.3 DIAGNOSI**

Sebbene l'asma sia molto diffusa, colpendo il 5–10% della popolazione, la diagnosi di asma negli adulti rimane una sfida nella pratica clinica, con conseguenti casi sia di sovradiagnosi che di sottodiagnosi<sup>37</sup>.

La diagnosi di asma si basa sull'identificazione di un caratteristico pattern sintomatologico (wheezing, fiato corto, costrizione toracica o tosse) associato ad una dimostrazione oggettiva della variabilità del flusso aereo espiratorio. Per una più corretta diagnosi gli elementi a sostegno dovrebbero essere documentati al momento della prima acuzie, preferibilmente prima di iniziare il trattamento con corticosteroidi inalatori (ICS), poiché la terapia riduce la variabilità e rende la diagnosi più difficile<sup>1</sup>.

La spirometria è considerata un test fondamentale nella diagnosi di asma negli adulti. Essa permette di valutare la presenza di ostruzione delle vie aeree attraverso il rapporto

tra FEV<sub>1</sub> e Capacità Vitale Forzata (FEV<sub>1</sub>/FVC), che se inferiore al limite inferiore di normalità (LLN) o z-score  $\leq -1.64$ , supporta la diagnosi di asma. Tuttavia, un risultato normale non esclude completamente la malattia, poiché l'asma può essere intermittente o variabile. Alla spirometria è associato il test di reversibilità che consiste nel somministrare un broncodilatatore (come il salbutamolo) e poi ripetere la spirometria per valutare un eventuale miglioramento significativo della funzione respiratoria. Un incremento del FEV<sub>1</sub> di almeno il 12% o di almeno 200 mL rispetto al valore basale è considerato positivo e supporta la diagnosi di asma<sup>37</sup>.

Quando si sospetta l'asma ma non è possibile eseguire una spirometria, o se questa risulta normale a causa della variabilità della malattia, il monitoraggio del PEF (Peak Expiratory Flow) è indicato per dimostrare l'eccessiva limitazione variabile del flusso aereo. Le misurazioni vanno effettuate due volte al giorno, mattina e sera, per un periodo di almeno due settimane, la diagnosi è supportata se si registra una variabilità diurna media  $>10\%$  negli adulti<sup>1,38</sup>.

L'asma grave di tipo 2 è spesso associata a un aumento dell'infiltrazione eosinofila, a livelli elevati di immunoglobulina E (IgE) sierica e a livelli elevati di ossido nitrico espirato frazionato (FeNO). Le ultime linee guida della European Respiratory Society (ERS) suggeriscono di misurare il FeNO nell'ambito dell'iter diagnostico negli adulti di età  $\geq 18$  anni dove valori elevati ( $>50$  ppb) sono associati a un'inflammatione eosinofila delle vie aeree e supportano la diagnosi. Tuttavia, un valore inferiore a 40 ppb non esclude la malattia, poiché la sensibilità e la specificità variano a seconda del cut-off scelto e delle condizioni cliniche del paziente. Un cut-off di 40 ppb offre un buon compromesso tra sensibilità e specificità, mentre a 53 ppb si ottiene una specificità elevata (circa 90%). La misurazione del FENO è influenzata da fattori quali il fumo e il trattamento con corticosteroidi, che possono ridurre i valori, per questo si consiglia di effettuare la misurazione lontano dalle assunzioni di broncodilatatori o ICS<sup>39</sup>.

Quando i risultati di spirometria e reversibilità sono incerti o negativi, ma sussiste ancora il forte sospetto clinico di malattia, è indicato eseguire un test di challenge bronchiale, utile per valutare la sensibilità delle vie respiratorie. Il test consiste nell'inspirare dosi gradualmente crescenti di metacolina o instamina, agenti che stimolano i recettori muscarinici delle vie aeree, provocando una contrazione dei muscoli bronchiali. La risposta viene misurata tramite la diminuzione del FEV<sub>1</sub>. Il test è particolarmente utile per

escludere l'asma in pazienti con sintomi respiratori incerti e per valutare la gravità dell'ipereattività bronchiale<sup>38</sup>.

La risposta al test si valuta con il Provocative Concentration 20 (PC20), ovvero la concentrazione di metacolina, o intsamina, necessaria per ottenere un calo del 20% della FEV1 e risulta essere indicativo di patologia quando il PC20 è inferiore a 8 mg/mL nei pazienti steroid-naive, inferiore a 16 mg/mL nei pazienti trattati cronicamente con steroidi inalanti<sup>37,38</sup>.

Il limite di questi test è che hanno un'elevata sensibilità, ma una ridotta specificità in quanto la positività non è obbligatoriamente dirimente per la patologia asmatica<sup>38,40</sup>.

IgE totali ed eosinofili ematici sono marcatori di infiammazione di tipo 2, frequenti nell'asma, ma non sono test diagnostici da soli. Aiutano a supportare la diagnosi (e soprattutto la fenotipizzazione) accanto a sintomi, spirometria, FeNO e test di provocazione<sup>38</sup>.

I biomarcatori nella diagnosi di asma possono coesistere o presentarsi indipendentemente, variando gradualmente tra T2 high e T2 low<sup>41</sup>.

L'infiammazione eosinofila è una caratteristica spesso riscontrata, ma non specifica, dell'asma, indipendentemente dallo stato atopico, e può contribuire all'esacerbazione dell'asma. Sebbene sia preferibile l'analisi del compartimento delle vie aeree tramite espettorato o lavaggio broncoalveolare, la misurazione della componente sistemica dell'infiammazione eosinofila tramite prelievo di sangue può rappresentare un'alternativa pratica (IgE >100 kU/L)<sup>42,43</sup>.

Global Initiative for Asthma (GINA) fornisce una guida dettagliata sull'uso, l'interpretazione e i fattori di confondimento dei biomarcatori, il documento si concentra su tre biomarcatori principali misurabili nella pratica clinica:

- FeNO (Frazione di ossido nitrico esalato): marker indiretto dell'infiammazione delle vie aeree mediata da IL-4 e IL-13;
- Eosinofili nel sangue (Blood Eosinophil Count - BEC): riflettono l'infiammazione sistemica e polmonare mediata principalmente da IL-5;
- Eosinofili nell'escreato (Sputum Eosinophils): ottenuti tramite escreato indotto, sono considerati un marker diretto dell'infiammazione eosinofila polmonare, sebbene l'esame sia meno accessibile nella pratica clinica routinaria<sup>1,44</sup>.

In merito all'analisi dei biomarker, negli ultimi anni diversi studi hanno introdotto la tecnica dell'esalato condensato (EBC) come strumento utile per la raccolta ed il

campionamento dei marker quali alterazioni dell'acidità, riduzione del magnesio, aumento del perossido di idrogeno (marcatore dello stress ossidativo), aumento dell'8-isoprostano (marcatore della perossidazione lipidica, con riduzioni post-steroidi), variazioni delle citochine (IL-2, citochine Th2, IL-6/IL-8), leucotrieni cisteinilici elevati e leucotriene B4 collegato alle piccole vie aeree, e proteasi correlate al rimodellamento come la MMP-9<sup>40</sup>.

L'EBC è un materiale biologico semplice da raccogliere, non invasivo ed economico che può consentire sia la caratterizzazione dello stato asmatico sia la valutazione dell'efficacia del trattamento<sup>45</sup>.

Nelle linee guida ERS e nelle indicazioni GINA non viene raccomandato per la gestione clinica quotidiana o la diagnosi standard dell'asma, viene invece definito come una promettente metodica di ricerca<sup>1,37</sup>.

#### **1.4 TRATTAMENTO**

Il management terapeutico dell'asma bronchiale nell'adulto e nell'adolescente ha subito una radicale evoluzione metodologica, superando dell'approccio basato sul broncodilatatore a breve durata d'azione (SABA) in monoterapia. Le evidenze clinico-epidemiologiche hanno dimostrato in modo inequivocabile che l'utilizzo isolato e al bisogno dei SABA non tratta la flogosi eosinofila e/o allergica sottostante, esponendo il paziente a un rischio significativamente incrementato di riacutizzazioni severe, rimodellamento strutturale delle vie aeree e mortalità asma-correlata.

L'attuale standard assistenziale codificato dalle linee guida internazionali fissa come principio cardine l'utilizzo della terapia antinfiammatoria con ICS come base del trattamento anche nelle manifestazioni sintomatologiche lievi o occasionali.

Prima di iniziare la terapia il paziente deve essere attentamente valutato al fine di definire lo stato di gravità della malattia e scegliere quindi l'approccio terapeutico più appropriato per il paziente e che ne garantisca la massima aderenza.

Una volta cominciato il trattamento il paziente deve essere seguito e rivalutato ad intervalli regolari, con prove di funzionalità respiratoria, valutazione delle comorbidità e dei fattori di rischio, per poter permettere un corretto mantenimento oppure, nel caso ne necessitasse, procedere con un adattamento a step-up (incremento della terapia) o step-down (riduzione della terapia).

Per quanto riguarda adulti ed adolescenti il trattamento dell'asma si basa l'utilizzo di due percorsi terapeutici (Tracks) che si differenziano tra loro per la tipologia di farmaco utilizzata per alleviare i sintomi al bisogno (Reliever).

Il Track 1 prevede come reliever l'utilizzo dell'associazione ICS-formeterolo a basse dosi assunto al bisogno, il Track 2 prevede l'utilizzo della combinazione ICS-SABA al bisogno, o se non fosse disponibile, solo SABA al bisogno.

Tale divisione è stata presentata per mostrare al clinico come intensificare (step-up) o ridurre la terapia (step-down) mantenendo come base del trattamento sempre lo stesso farmaco di sollievo per ogni livello di trattamento, e per dimostrare come ICS-formeterolo non dovrebbe essere usato come sollievo combinato ad una terapia con ICS-LABA che non contiene formeterolo, a causa della mancanza di evidenze sull'efficacia e sulla sicurezza.

Il Track 1 è l'approccio preferito raccomandato dalle GINA 2026 poiché il suo utilizzo, comparato con il regime di solo SABA come reliever, ha dimostrato una riduzione del rischio di riaccerbazioni severe e in aggiunta questo track risulta più semplice perché permette al paziente di fare la terapia, in qualsiasi step, con un singolo inalatore.

Il track 2 è scelto quando non è possibile percorrere la prima via o quando il paziente è già in terapia con il track 2 e mostra completa aderenza e completo controllo<sup>1</sup>.

Questo percorso risulta sconsigliato da GINA 2019, in quanto il trattamento con il solo SABA aumenta i rischi clinici, non solo i sintomi: è associato a maggiore rischio di morte correlata all'asma e di ricorso urgente all'assistenza sanitaria, anche in forme considerate "intermittenti". L'uso eccessivo di SABA è legato a peggioramento degli esiti: anche un sovrautilizzo risulta aumentare il rischio di esacerbazioni severe e di mortalità. Inoltre, l'uso regolare di SABA può causare down-regulation del recettore  $\beta_2$ , perdita della risposta broncodilatatrice, iperreattività e infiammazione<sup>44</sup>.

Sulla base della gravità del paziente il trattamento si articola in 5 steps per ogni track.

**Track 1:** l'approccio raccomandato dalle linee guida che prevede l'associazione di basse dosi di ICS-formeterolo come farmaco reliever per tutti gli step:

- **Step 1 e 2:** ICS-Formeterolo a basso dosaggio (es. budesonide/formeterolo 160/4.5  $\mu\text{g}$  o beclometasone/formeterolo 100/6  $\mu\text{g}$ ), 1 inalazione al momento del bisogno. In questi steps rientrano quei pazienti che non necessitano di una terapia di mantenimento, che hanno una sintomatologia diurna lieve intermittente (meno di due volte al mese) o persistente più di due volte al mese (ma non tutti i giorni),

sintomatologia notturna assente o meno di una volta a settimana, nessuna riacutizzazione nell'ultimo anno e FEV1 (VEMS) nei limiti di norma.

- **Step 3:** prevede una terapia di mantenimento regolare con ICS-formeterolo a basso dosaggio 1 inalazione la sera o due inalazioni al giorno (1 al mattino e 1 alla sera) e in aggiunta la terapia reliever con 1 inalazione dello stesso dispositivo di ICS-Formoterolo a basso dosaggio al momento del sintomo (Strategia SMART/MART), con 12 come tetto massimo di numero di inalazioni giornaliere.

In questa categoria rientrano soggetti che hanno una sintomatologia diurna per la maggior parte dei giorni, risvegli notturni almeno una volta a settimana, FEV1 che può iniziare a mostrare una lieve ostruzione o una parziale riduzione.

- **Step 4:** ICS-Formoterolo a medio dosaggio (es. 2 inalazioni due volte al giorno), terapia reliever con 1 inalazione di ICS-Formoterolo a basso dosaggio al bisogno.

Opzione add-on: se l'asma non è controllata si inserisce un antagonist muscarinico a lunga durata d'azione (LAMA) (Tiotropio, Glicopirronio o Umeclidinio), preferibilmente in un unico inalatore ICS-formeterolo-LAMA. Tale trattamento è raccomandato per pazienti che presentano sintomatologia costante diurna, risvegli notturni quasi tutte le notti e compromissione della funzionalità respiratoria (FEV1 < 60-70% del teorico) con ostruzione delle vie aeree evidente alla spirometria.

- **Step 5:** mantenimento con ottimizzazione della terapia inalatoria al massimo dosaggio (Tripla terapia: ICS ad alto dosaggio + LABA (broncodilatatori a lunga durata d'azione) + LAMA) con assunzione al bisogno di ICS-formeterolo a basso dosaggio.

Questo step prevede anche la possibilità di avvalersi di una strategia specialistica con invio a centro di terzo livello, fenotipizzazione tramite biomarcatori (FeNO, eosinofili ematici, IgE) e avvio di terapia biologica mirata. I corticosteroidi orali (OCS) a lungo termine sono indicati solo come ultima risorsa.

In quest'ultima categoria rientrano i soggetti con asma grave propriamente detta, ovvero coloro che non ottengono un controllo della malattia nonostante la completa aderenza alla terapia massimale.

**Track 2:** Questo percorso si basa sull'utilizzo del SABA (come salbutamolo) come farmaco di sollievo al bisogno. Richiede l'assunzione rigorosa e quotidiana di un farmaco di controllo (ICS) per evitare i rischi della broncodilatazione isolata.

- **Step 1:** nessuna terapia di mantenimento e come reliever SABA (salbutamolo 100-200 ) al bisogno, ma con l'obbligo tassativo di assumere nello stesso momento una dose di ICS a basso dosaggio (combinazione estemporanea in due inalatori separati).
- **Step 2:** mantenimento con ICS a basso dosaggio (fluticasone propionato 100-200 o beclometasone dipropionato 200-400) da assumere regolarmente tutti i giorni e SABA come reliever.
- **Step 3:** mantenimento con combinazione fissa ICS-LABA a basso dosaggio (fluticasone propionato/salmeterolo 100/50 µg o budesonide/formoterolo 160/4.5 µg a dose fissa), 1 inalazione due volte al giorno e SABA al bisogno come reliever.
- **Step 4:** mantenimento con combinazione fissa ICS-LABA a medio o alto dosaggio (fluticasone/salmeterolo 250/50 µg o 500/50 µg due volte al giorno) con SABA al bisogno.

Opzione add-on valutare l'aggiunta di un LAMA (preferibilmente in combinazione fissa preconstituita nello stesso device: ICS-LABA-LAMA).

- **Step 5:** mantenimento con triplice terapia inalatoria ad alto dosaggio (ICS alto dosaggio + LABA + LAMA), SABA al bisogno.

Anche in questo caso è possibile seguire una terapia specialistica come nella Track 1<sup>1</sup>.

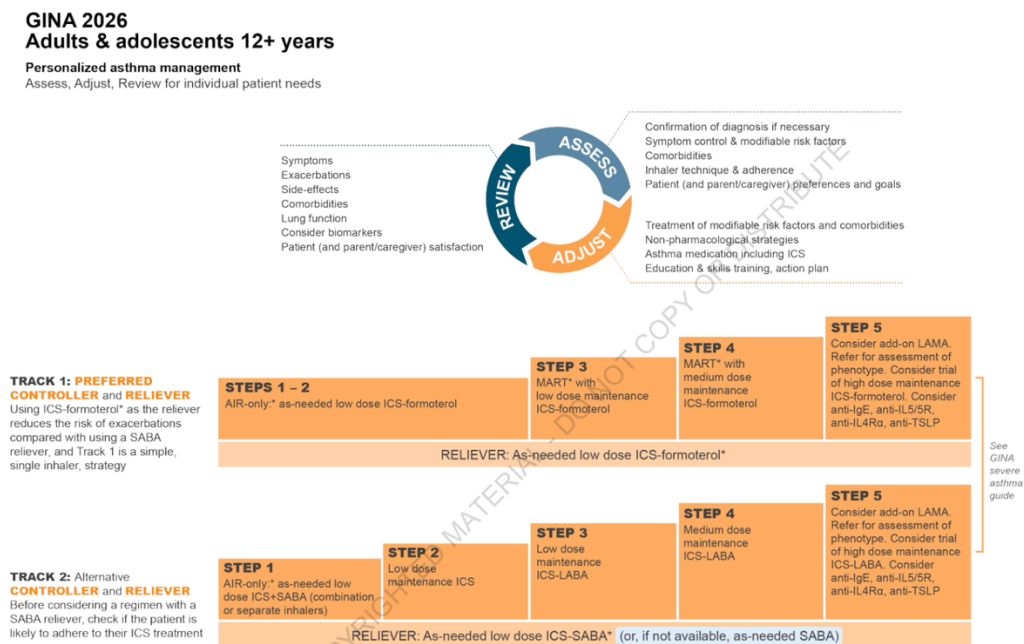


Figura 1: Strategie e step terapeutici secondo le linee guida GINA 2026<sup>1</sup>

All'interno dello Step 5 le linee guida GINA 2026 indicano i farmaci biologici come pilastro della terapia per i pazienti con asma non controllata, preferibili all'uso cronico dei corticosteroidi orali. I farmaci biologici non sono terapie di prima linea. Secondo il protocollo, un paziente è candidato a una terapia biologica add-on solo se risponde a precisi criteri quali diagnosi confermata di asma non controllata dalla terapia inalatoria massimale, verifica dei fattori confondenti e caratterizzazione fenotipica (obbligatorio eseguire la fenotipizzazione infiammatoria per la ricerca di biomarcatori relativi all'infiammazione di tipo 2)<sup>1</sup>.

I farmaci biologici di possibile utilizzo vengono suddivisi in base al bersaglio molecolare:

- **Anti Ig-E (Omalizumab):** utile quando prevale una risposta IgE-dipendente (tipicamente pazienti con profilo allergico/IgE elevata), in pazienti con fenotipo allergico e comorbidità allergiche perenni, anche supportate da skin prick test.
- **Anti IL-5 e anti IL-5-R $\alpha$  (Mepolizumab, Reslizumab, Benralizumab):** utile in pazienti con asma eosinofila grave, spesso caratterizzata da insorgenza in età adulta, rinosinusite cronica con poliposi nasale (CRSwNP) e frequenti riacutizzazioni. Sono risultati più funzionali in pazienti con ipereosinofilia (eo.  $\geq 150$  o  $\geq 300$  cellule/ $\mu$ L)
- **Anti IL-4R $\alpha$  (Dupilumab):** è un anticorpo monoclonale che inibisce sia la via dell'IL-4 che la via dell'IL-13, consigliato in pazienti con asma grave di Tipo 2, soprattutto in caso di co-presenza di dermatite atopica moderata-grave o rinosinusite cronica con poliposi nasale severa, con livelli elevati di eosinofili ematici ( $\geq 150$  cellule/ $\mu$ L) oppure valori di FeNO elevati ( $\geq 25$  ppb), o pazienti che necessitano di corticosteroidi orali (OCS) mantenuti a lungo termine.
- **Anti TSLP (Tezepelumab):** è un farmaco che presenta un meccanismo d'azione più "a monte" nella cascata infiammatoria andando a bloccare la linfopoietina stromale timica ed è risultato quindi attivo sia nella forma di asma T2 high che parzialmente anche nella T2 low.

Il paziente, a seguito dell'inizio della terapia biologica, deve essere rivalutato dopo almeno 4 mesi (per alcune molecole 6) per decidere se proseguire con la stessa terapia, interromperla o cambiarla<sup>1,46,47</sup>.

## 2. NETWORK INFIAMMATORIO DELL'ASMA E CITOCHINE

L'asma è oggi vista come una malattia eterogenea, sostenuta da reti complesse di citochine prodotte da cellule epiteliali, linfociti T, cellule innate e cellule strutturali delle vie aeree. Queste reti determinano i diversi endotipi (T2-high, T2-low, misti), la gravità, il rimodellamento e la risposta alle terapie<sup>24</sup>.

### 2.1 IMMUNITA INNATA E ADATTATIVA

L'asma è una malattia eterogenea in cui l'infiammazione bronchiale nasce da un dialogo continuo tra immunità innata (epitelio e le sue allarmine, ILC2, eosinofili, mastociti, macrofagi) e adattativa (linfociti T e B)<sup>48</sup>.

#### *Barriera epiteliale*

Contribuisce in modo centrale nella patogenesi dell'infiammazione che sta alla base dell'asma. Rappresenta una fase iniziale di risposta, innescata soprattutto dal sensing epiteliale: l'epitelio delle vie aeree è la prima barriera contro stimoli e microrganismi inalati e, quando viene danneggiato o alterato, avvia l'infiammazione e fenomeni funzionali tipici dell'asma<sup>48</sup>.

L'integrità della barriera epiteliale è un elemento fondamentale nella difesa del sistema da stimoli e microrganismi, il danno è uno dei *primum movens* della patogenesi asmatica. In passato le anomalie epiteliali erano intese solo come una conseguenza dell'infiammazione causata dalle cellule immunitarie, oggi è noto che l'epitelio risponde direttamente ai fattori di rischio ambientali ed è il principale iniziatore e orchestratore della cascata infiammatoria<sup>49</sup>.

Molti allergeni comuni (pollini, acari della polvere, insetti e funghi) contengono proteasi attive capaci di degradare direttamente le giunzioni serrate dell'epitelio, così come i virus, che distruggono direttamente le giunzioni e, allo stesso tempo, inibiscono i normali meccanismi di riparazione della barriera epiteliale<sup>49,50</sup>.

Si verifica una vera e propria rottura delle giunzioni serrate (*tight junctions*), questo danno di barriera attiva la risposta immunitaria, le cellule immunitarie rilasciano mediatori infiammatori come l'istamina e l'IL-13, che agiscono sulle cellule epiteliali riducendo la

produzione e l'espressione delle proteine necessarie a ricomporre le *tight junctions*, bloccando di fatto la loro riparazione.

Il persistente stato infiammatorio delle vie aeree e la continua esposizione a fattori di rischio ambientali stimolano le cellule epiteliali a modificare il proprio programma genetico. Le cellule vanno incontro ad una transizione epitelio-mesenchimale (EMT) perdendo la polarità cellulare e smettendo di produrre le molecole di adesione intercellulare. Si verifica quindi una marcata riduzione nell'espressione dell'E-caderina, costituente chiave delle giunzioni aderenti, la cui carenza destabilizza l'intero equilibrio dell'epitelio<sup>49,50</sup>.

Oltre alla funzione di pura barriera, l'epitelio respiratorio agisce da organo di senso immunologico attraverso il meccanismo del sensing. Una volta che l'epitelio riconosce il pericolo attraverso una serie di recettori (PRR-recettori per il riconoscimento del pattern), attiva una risposta immunitaria innata immediata rilasciando citochine specifiche chiamate allarmine, le principali sono IL-25, TSLP e IL-33<sup>51</sup>.

### ***IL-25***

L'IL-25 è una citochina della famiglia IL-17 (IL-17E), è presente nelle cellule epiteliali delle vie aeree come citochina preformata e stoccata nel citoplasma, così da poter essere rilasciata rapidamente quando la cellula è stimolata da trigger ambientali, inclusi gli allergeni. È stato dimostrato come i livelli dell'IL-25 risultano più alti nei soggetti asmatici rispetto al controllo e risulta ulteriormente aumentato a livello di mucosa e sottomucosa a seguito di challenge inalatorio con l'allergene<sup>51</sup>.

L'interazione dell'IL-25 con il proprio complesso recettoriale evoca una robusta produzione di citochine di tipo 2, espandendo lo spettro infiammatorio tramite la secrezione di IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13<sup>52</sup>.

IL-25 favorisce la sopravvivenza, il reclutamento e la migrazione degli eosinofili verso il sito di infiammazione e ne modula anche l'adesione endoteliale, amplificando l'infiammazione. Inoltre, è descritto che IL-25 regola l'espressione di molecole di adesione sugli eosinofili, spiegando in parte il meccanismo dell'eosinofilia nell'infiammazione allergica<sup>53</sup>.

Un'altra peculiarità patogenetica dell'IL-25 risiede nella sua capacità di interagire direttamente con i compartimenti strutturali polmonari: stimola in modo selettivo i fibroblasti residenti, promuovendo la loro transizione verso il fenotipo secernente dei

miofibroblasti e inducendo fibrosi tissutale. Al contempo, partecipa al reclutamento leucocitario attraverso la stimolazione e il rilascio di citochine pro-infiammatorie sistemiche quali IL-6 e IL-8<sup>51</sup>.

### ***IL-33***

L'IL-33 è una citochina della famiglia delle IL-1 immagazzinata nel nucleo delle cellule epiteliali e strutturali delle vie aeree e risulta particolarmente interessante per il suo pleiotropismo, ovvero la sua capacità di guidare sia un'inflammatione allergica (eosinofila) che una non allergica (neutrofilica)<sup>54</sup>.

l'IL-33 agisce (recettori ST2) come uno dei più potenti induttori della risposta immunitaria di tipo 2 (Th2/T2) stimolando direttamente sia le cellule linfoidi innate di tipo 2 (ILC2) sia i linfociti Th2. Questa attivazione induce una massiccia secrezione delle citochine effettrici IL-4, IL-5 e IL-13<sup>55</sup>.

L'IL-5 stimola direttamente la produzione, la maturazione e la sopravvivenza degli eosinofili nel midollo osseo e il loro reclutamento nei polmoni, determinando infiammazione eosinofila, iperproduzione di muco e iperreattività bronchiale<sup>54</sup>. Una volta raggiunti i tessuti bersaglio, la risposta specifica degli eosinofili all'IL-33 si traduce nella loro degranolazione e nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), alimentando il danno tissutale, l'iperreattività bronchiale e la fibrosi<sup>55</sup>.

L'IL-4 e l'IL-13 sono responsabili anche del richiamo di basofili, che promuovono la differenziazione dei fibroblasti in miofibroblasti<sup>55</sup>.

I mastociti, che esprimono alti livelli di ST2, vengono attivati direttamente dall'IL-33, amplificando la sintesi di citochine pro-allergiche<sup>56</sup>.

IL-33 può contribuire anche a un'inflammatione con componente non-T2, i neutrofili possiedono il recettore ST2 sulla propria superficie e, in seguito alla stimolazione diretta da parte dell'IL-33, rispondono migrando attivamente attraverso un processo di chemiotassi verso il sito dell'inflammatione<sup>55</sup>.

L'IL-33 favorisce l'attivazione di linfociti T (Th17) che producono IL-17, citochina fondamentale per stimolare il rilascio locale di fattori chemioattrattivi per i neutrofili. Questo meccanismo porta a un massiccio afflusso di neutrofili nelle vie aeree, associato clinicamente a fenotipi di asma più gravi e spesso resistenti alla terapia steroidea<sup>56</sup>.

Nell'asma (anche in contesti non T2 dominanti), IL-33 può amplificare l'ambiente infiammatorio favorendo mediatori che reclutano/attivano cellule, tra cui IL-8<sup>54</sup>.

## ***TSLP***

Il TSLP (thymic stromal lymphopoietin) è una citochina di origine epiteliale che promuove la patofisiologia dell'asma, inclusa l'airway hyperresponsiveness (AHR)<sup>57</sup>.

TSLP risulta avere effetti diversi a seconda del contesto immunologico e della fase di risposta, perché può agire su cellule effettrici tipo 2 (Th2/ILC2/eosinofili) ma anche su cellule regolatorie (T reg) che limitano l'infiammazione<sup>58</sup>.

Il TSLP agisce sulle cellule effettrici Th2 in modo proinfiammatorio promuovendone l'aumento numerico e stimolandole nella secrezione di massicce quantità di IL-5 e IL-13, responsabili del reclutamento degli eosinofili<sup>58</sup>.

Una recente novità risiede nella dimostrazione che la TSLP esercita un ruolo patologico cruciale che prescinde e va oltre la classica cascata infiammatoria eosinofilica. I ricercatori hanno scoperto che la TSLP presente nell'escreato (*sputum*) correla in modo significativo con l'iperreattività bronchiale al mannitolo (sostanza usata nei test di provocazione bronchiale) indipendentemente dai livelli di eosinofili e di FeNO. Questo suggerisce che la TSLP contribuisca all'AHR attraverso vie non-T2. TSLP può indurre l'AHR attraverso un effetto biologico diretto sulla muscolatura liscia delle vie aeree e sui mastociti, senza la necessità di attivare o reclutare l'infiltrato eosinofilico. Anche nei pazienti affetti da asma non-eosinofilico (*eosinophil-low* /non tipo 2), i livelli di TSLP nel siero rimangono significativamente più elevati rispetto ai controlli sani. A supporto dell'attività non tipo 2 della TSLP, dati clinici emersi dai trial sul blocco della TSLP tramite l'anticorpo monoclonale *Tezepelumab*, hanno dimostrato di ridurre significativamente le riacutizzazioni annuali, le visite urgenti e l'utilizzo di OCS, portando quindi ad un miglioramento della funzione respiratoria e della qualità di vita sia in profili ad alto tasso di eosinofili sia a basso tasso di eosinofili (asma non-T2), confermando l'importanza terapeutica del target anche al di fuori del profilo allergico/T2 standard<sup>57,59</sup>.

Il TSLP agisce anche in senso opposto come un freno molecolare contro l'infiammazione allergica: la citochina si lega direttamente alle cellule Treg mantenendole stabili e funzionali, la TSLP permette a queste cellule di limitare e reprimere l'eccessiva infiammazione allergica polmonare. Evidenze scientifiche hanno dimostrato come rimuovendo selettivamente i recettori del TSLP (TSLPR) dai Treg la loro funzione

difensiva risultasse difettosa e causasse un maggiore accumulo di risposta TH2/eosinofila<sup>58</sup>.

### ***ILC2***

Le ILC2 (group 2 innate lymphoid cells) sono localizzate in nicchie attorno ai branchpoint delle vie aeree e vengono attivate dalle allarmine IL-25, IL-33 e TSLP prodotte dall'epitelio in risposta a stimoli (es. allergeni)<sup>60,61</sup>.

Una volta attivate, le ILC2 producono quantità elevate di IL-5 e IL-13 sostenendo un programma immunitario di tipo 2 centrale nella patogenesi dell'asma<sup>60,62</sup>.

ILC2 possono generare citochine di tipo 2 anche senza segnali dai linfociti T o B, poiché possono indurre risposte di tipo 2 in modelli privi di T e B (Rag1<sup>-/-</sup>). Questo li rende un "motore" innato dell'infiammazione di tipo 2. Nelle evidenze cliniche, i numeri di ILC2 in sangue e sputo di pazienti con asma grave risultano più elevati rispetto ai casi lievi, suggerendo un contributo alla regolazione e al "drive" della risposta infiammatoria<sup>62</sup>.

Le ILC2 non restano sempre nello stesso programma trascrizionale/funzionale, ma possono deviare verso altri stati fenotipici diventando ibridi tra profili ILC1/ILC2 o ILC2/ILC3.

Con la deviazione ILC1-like possono produrre INF- $\gamma$  che agendo sui macrofagi porta alla produzione di segnali quali IL-12/IL-1 $\beta$ , spostando l'infiammazione sul versante non T2. Nelle deviazioni ILC3-like, indotte dalla presenza di IL-23 e TGF- $\beta$  prodotte da macrofagi e cellule dendritiche in seguito alla loro attivazione da parte delle allarmine, si registra una forte shift verso un fenotipo infiammatorio neutrofilico.

Queste plasticità comportano un cambio del tipo di infiammazione guidata dalle ILC2 in base alle citochine presenti nel microambiente<sup>60</sup>.

## **2.2 INFIAMMAZIONE T2**

Il profilo infiammatorio dell'asma grave non si configura come un'entità monolitica, bensì come il risultato dell'attivazione di molteplici pathway immunologici. Sebbene i meccanismi finora descritti rappresentino un nucleo biologico comune ed ubiquitario, condiviso sia dall'endotipo T2 sia da quello non-T2, esiste un pattern molecolare e cellulare strettamente specifico della via T2. Quest'ultimo è finemente orchestrato da un

set di mediatori infiammatori e citochine peculiari, responsabili delle caratteristiche clinico-fenotipiche tipiche di questa via<sup>63</sup>.

### ***IL-4, IL-5, IL-13***

IL-4, IL-5 e IL-13 sono centrali soprattutto nella risposta di tipo 2 (Th2-high asthma) e nel determinare sia l'infiammazione sia le modifiche funzionali/strutturali delle vie aeree<sup>64</sup>.

IL-4 è il principale induttore della differenziazione delle cellule T CD4+ verso un immunofenotipo TH2. È essenziale per la differenziazione delle cellule Th2, sopprime le funzioni delle cellule Treg e promuove l'adesione degli eosinofili ai vasi sanguigni aumentando l'espressione di vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)<sup>65</sup>.

IL-13 è responsabile di ipereattività bronchiale, metaplasia delle cellule caliciformi e produzione di mucine che aumentano la viscosità del muco e induce inducibile nitric oxide synthase (iNOS), che aumenta la frazione di FeNO. Inoltre promuove contrazione e proliferazione delle cellule della muscolatura liscia bronchiale e induce fibrosi subepiteliale<sup>64,65</sup>.

Insieme, IL-4 e IL-13 forniscono il primo segnale che induce il class switching a IgE nelle cellule B. Entrambe le citochine compromettono l'integrità fisica della barriera epiteliale danneggiando componenti proteiche delle tight junction, come claudine<sup>65</sup>.

Studi condotti su modello murino HDM (House Dust Mit) hanno dimostrato che bloccare insieme IL-4 e IL-13 con Dupilumab (anti-IL-4R $\alpha$ ) è necessario per ridurre in modo marcato l'infiltrazione di eosinofili attivati nel tessuto polmonare. Bloccare solo IL-4 oppure solo IL-13 produce invece solo un effetto parziale, perché i due segnali contribuiscono in modo complementare al reclutamento degli eosinofili a livello polmonare. Si è notato inoltre che la doppia inibizione previene pienamente l'infiltrazione senza interferire con la produzione e l'uscita degli eosinofili dal midollo<sup>66</sup>.

Legandosi specificamente alla subunità IL-4R $\alpha$ , il Dupilumab impedisce a IL-4 di interagire con il recettore di Tipo I e inibisce l'assemblaggio del recettore di Tipo II, agendo come un antagonista altamente efficace delle vie di segnalazione di IL-4 e IL-13<sup>65</sup>.

IL-5 promuove l'eosinofilo-poesi nel midollo mentre a livello polmonare aiuta l'attrazione degli eosinofili stessi nel sito d'infiammazione<sup>60</sup>.

Viene descritta come una citochina cruciale per il fenotipo eosinofilo, ha un'azione selettiva sugli eosinofili: oltre ad indurre differenziazione, sopravvivenza, attivazione e migrazione è responsabile della permanenza degli stessi nel polmone e dell'amplificazione dell'infiammazione. In questo modo diventa un driver biologico coerente con la visione dell'asma come malattia eterogenea.

IL-5 è sintetizzata e secreta non solo dagli eosinofili, ma anche da diverse popolazioni immunitarie tra cui cellule TH2, mastociti, progenitori di CD4+, NK e ILC2 immunitarie, tra cui cellule TH2, mastociti, progenitori CD34+, cellule NK T e ILC2, in modo particolarmente rilevante nel contesto TH2-high<sup>67,68</sup>.

### ***Compartimento granulocitario e fagocitico***

Gli eosinofili sono cellule chiave nell'asma sono spesso presenti nelle vie aeree degli asmatici atopici e il loro aumento si associa a caratteristiche di malattia e infiammazione. Una volta attivati possono contribuire in modi diversi all'infiammazione delle vie aeree<sup>69,70</sup>.

Gli eosinofili al loro interno hanno granuli contenenti proteine quali la proteina basica maggiore (MBP), la proteina cationica degli eosinofili (ECP), la neurotossina derivata dagli eosinofili (EDN) e la perossidasi eosinofila (EPO) che vengono rilasciate una volta attivati gli eosinofili. Queste proteine, in particolare la proteina basica maggiore, contribuiscono al danno delle vie aeree e all'iperreattività bronchiale, venendo considerati mediatori anche delle riacacerbazioni<sup>70</sup>.

La loro maturazione, attivazione e reclutamento dipendono fortemente da IL-5, in studi clinici è stato dimostrato come il blocco dell'IL-5 riduca drasticamente il numero di eosinofili nel sangue e nell'espettorato, anche se questo risultato non sempre correla con la clinica a dimostrazione del fatto che esistono altre vie responsabili<sup>70,71</sup>.

Possono essere associati a quadri in cui l'infiammazione eosinofila è sostenuta da percorsi non TH2, ad esempio legati alla via dell'IL-6.

Nell'asma, soprattutto nelle forme gravi, sono stati identificati sottogruppi caratterizzati da infiammazione neutrofila. Studi trascrittomici condotti sull'espettorato hanno dimostrato che questo tipo di infiammazione è associato all'attivazione di programmi molecolari distinti rispetto a quelli osservati nell'infiammazione di tipo 2<sup>69</sup>.

I neutrofili nell'asma sono importanti soprattutto nelle esacerbazioni acute e in alcune forme di asma persistente e non responsiva ai corticosteroidi, in queste forme si registra una quantità di neutrofili maggiore rispetto agli eosinofili<sup>70,71</sup>.

Al contrario studi su bambini con asma grave hanno osservato come alcune sottopopolazioni con neutrofili intraepiteliali avevano un controllo dei sintomi migliore e una FEV1 migliore pur usando dosi di ICS più basse<sup>69</sup>.

I neutrofili sono responsabili della patogenesi della malattia attraverso la produzione di mediatori lipidici, ROS e proteasi (mieloperossidasi e metalloproteinasi). Vengono attivati da diversi elementi quali per esempio IL-8 e TNF- $\alpha$  che attraggono e attivano i neutrofili e ne riducono l'apoptosi.

È stato inoltre notato come queste cellule, anche nei casi predominati da eosinofili, vengano reclutati prima (entro ~6 ore verso le ~24 ore di picco degli eosinofili) e risultino più numerosi nelle prime ore in pazienti sottoposti a challenge bronchiale<sup>70</sup>.

Per quanto riguarda i macrofagi, questi sono importanti nelle vie aeree non solo per la difesa ma anche per l'infiammazione nell'asma, sono infatti le cellule residenti preponderanti nelle basse vie aeree (>90%), contribuiscono alla difesa dell'ospite tramite fagocitosi, produzione di enzimi e ROS. Possono amplificare e organizzare la risposta infiammatoria producendo citochine (IL-1 e IL-6), mediatori lipidici e metalloproteinasi (MMP). Possono anche produrre citochine anti-infiammatorie come IL-10 e TGF- $\beta$  o funzionare da cellule presentanti l'antigene (APC)<sup>70,71</sup>.

Anche le mast cells sono un elemento chiave nella risposta allergica precoce dell'asma, si attivano entro pochi minuti dall'esposizione all'antigene, sulla loro superficie hanno IgE il cui legame con l'antigene ne stimola la degranolazione di potenti mediatori quali istamina, leucotrieni, prostaglandina D<sub>2</sub>, trombossano B<sub>2</sub> e fattore attivante le piastrine (PAF). Tutto questo porta a contrazione del muscolo liscio, edema ed aumento delle secrezioni mucose contribuendo all'ostruzione e ai sintomi acuti. Hanno anche un ruolo nelle fasi tardive contribuendo alla persistenza dell'infiammazione e alla *late phase response* rilasciando citochine come IL-4, IL-5 e IL-8, oltre che chemochine<sup>70,71</sup>.

### ***Linfociti***

I linfociti, soprattutto il subset Th2, hanno un ruolo importante come responsabili della secrezione di citochine quali IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Evidenze dimostrano come le loro

quantità siano considerevoli nel Lavaggio Broncoalveolare (BAL) di soggetti asmatici atopici, con ulteriore aumento a seguito dell'introduzione di un allergene<sup>70</sup>.

I linfociti T sono quindi responsabili dell'attivazione e del reclutamento di IgE, basofili, mastociti ed eosinofili e dell'aumento della secrezione di muco<sup>70,71</sup>.

Oltre alla componente Th2, in forme più severe di asma possono contribuire sottotipi T non-Th2, quali Th1 e CD8+, associati a fenotipi più aggressivi di malattia e con maggior danno tissutale<sup>71</sup>.

I linfociti B contribuiscono tramite la produzione di anticorpi IgE che innescano le risposte allergiche che caratterizzano molte forme di asma. Dopo l'attivazione dei circuiti immunitari di tipo 2 le B cells vanno incontro a switch isotipico verso le IgE grazie all'azione dell'IL-4. Le IgE si legano ai mastociti che alla riesposizione all'allergene rilasciano mediatori quali istamina e leucotrieni causando una risposta asmatica immediata<sup>62</sup>.

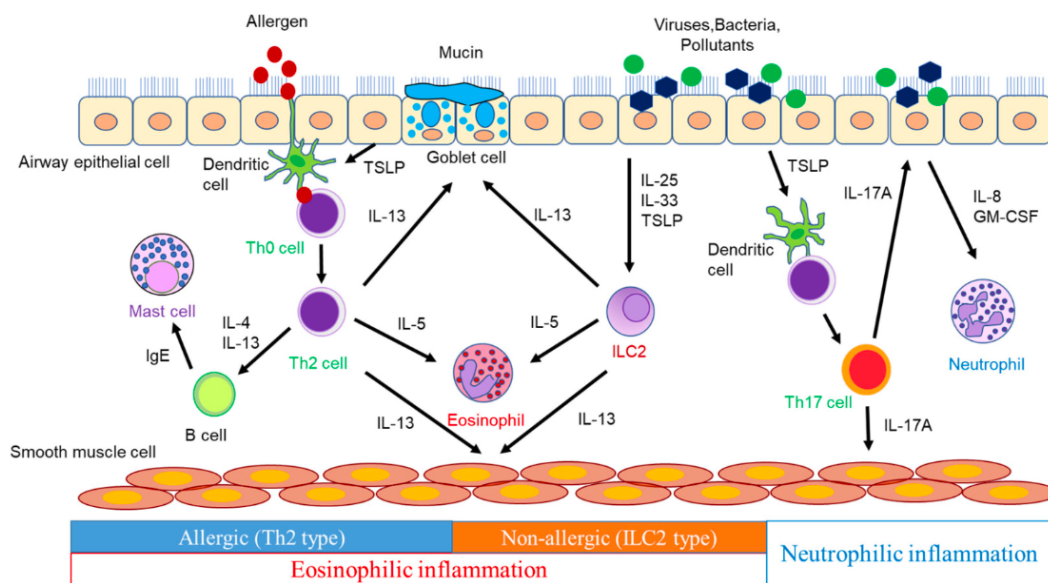


Figura 2: patogenesi dell'infiammazione delle vie aeree<sup>62</sup>

### 2.3 INFIAMMAZIONE NON T2

La definizione tradizionale di asma come malattia T2-high (Th2/eosinofili/IL-4/IL-5/IL-13) non spiega tutta la popolazione colpita, perché una quota molto ampia di pazienti, soprattutto con asma severa non atopica, rientra in una forma T2-low.

Per infiammazione T2-low si intende un'infiammazione non eosinofila, tipicamente neutrofila o pangranulocitica, caratterizzata da una maggiore resistenza agli steroidi e

da una maggiore correlazione con il fumo di sigaretta, obesità, esposizione lavorativa, e tipicamente ad insorgenza tardiva (oltre i 40 anni)<sup>64,72</sup>.

I meccanismi che regolano il reclutamento e la persistenza dei neutrofili nelle vie aeree non sono ancora stati pienamente definiti, evidenze scientifiche suggeriscono come possibile base biologica una via guidata da Th1 e/o Th17 con un possibile ruolo nello sbilanciamento Th17/Treg nella forma grave resistente agli steroidi<sup>72-74</sup>.

Dal punto di vista puramente patogenetico, non è ancora del tutto chiaro se questa resistenza agli steroidi sia causata dall'azione diretta dei granulociti reclutati nel tessuto o se sia indotta a monte dagli stessi meccanismi molecolari che ne orchestrano il richiamo. Le analisi trascrittomiche di campioni biotici delle vie aeree indicano che l'attivazione biologica di questo endotipo determina una forte sovraregolazione di specifiche mucine, di metalloproteasi (tra cui MMP9, collagenasi di tipo IV coinvolta nella neutrofilia indotta da CXCL8) e di un preciso network di chemochine<sup>73,75</sup>.

L'avvio della cascata patogenetica T2-low è legato all'impatto iniziale di insulti ambientali, stress ossidativo e stimoli microbici sulla mucosa respiratoria. La colonizzazione da parte di specifici agenti batterici (quali *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*) agisce da innesco biologico sulle cellule epiteliali bronchiali, inducendo una upregolazione dei *Toll-Like Receptors (TLR)*, in particolare di TLR2 e TLR4<sup>75,76</sup>.

L'attivazione del compartimento innato epiteliale determina lo spostamento dell'immunità adattativa verso un profilo misto Th1 e Th17.

I linfociti CD4+ Th17 seguono un programma differenziativo distinto e autonomo, questo pathway richiede la presenza di segnali precoci come l'IL-1 $\beta$  e l'IL-6 (prodotte dai macrofagi alveolari, dalle cellule dendritiche e dalle cellule epiteliali bronchiali) ed è stabilizzato dall'intervento dell'IL-23, fondamentale per la differenziazione verso il fenotipo Th17 e quindi per la produzione finale di IL-17<sup>77</sup>.

In questo contesto patogenetico, una fonte biologica cruciale di IL-17 è rappresentata anche dalle cellule linfoidi innate di tipo 3 (ILC3). In presenza di alti livelli di IL-1 $\beta$ , le ILC3 polmonari subiscono una forte stimolazione e sovraesprimono massivamente IL-17A, partecipando anche alla secrezione di GM-CSF, un fattore che sostiene la sopravvivenza e la proliferazione di macrofagi e granulociti nel tessuto<sup>76,77</sup>.

IL-17 rappresenta la principale citochina effettrice della risposta Th17 e, nelle sue isoforme A ed F, risulta significativamente aumentata nel BAL e nelle biopsie bronchiali

di pazienti con asma moderato-grave, correlando positivamente con la severità della malattia e con l'iperreattività delle vie aeree<sup>78,79</sup>.

L'IL-17A agisce direttamente sulle cellule epiteliali umane stimolando la metaplasia delle cellule caliciformi mucipare, aumenta l'espressione del gene MUC5AC e la produzione di muco. Inoltre, aumenta la proliferazione delle cellule muscolari lisce delle vie aeree (ASMC) incrementando direttamente la contrattilità e la resistenza bronchiale<sup>78</sup>.

IL-17 stimola l'infiltrazione dei neutrofili senza agire direttamente sulle cellule immunitarie, ma agendo sulle cellule strutturali residenti, come fibroblasti, cellule epiteliali ed endoteliali. Queste cellule secernono citochine pro-fibrotiche e chemoattrattori per i neutrofili come CXCL1 e CXCL8, responsabili dell'accumulo dei neutrofili nelle vie aeree<sup>79,80</sup>.

Tuttavia il ruolo di questa citochina non è univoco, alcuni studi mostrano come l'IL-17A possa amplificare l'infiammazione allergica mediata da Th2, mentre altri suggeriscono un effetto regolatorio con riduzione dell'eosinofilia e dell'iperreattività in particolari contesti sperimentali. Pertanto il ruolo di IL-17A sembra dipendere dal momento in cui viene espressa e dal contesto immunologico in cui agisce<sup>78</sup>.

L'IL-22 viene secreta in maniera sinergica all'IL-17 dalle cellule Th17, ma anche dalle cellule Th22. È una citochina con un'azione complessa e agisce principalmente sulle cellule epiteliali e sulle cellule muscolari lisce delle vie aeree, che esprimono il recettore IL-22R<sup>78</sup>.

Un aspetto centrale di questa citochina sta nel fatto che possiede un ruolo duale, ha sia proprietà proinfiammatorie sia proprietà antinfiammatorie. Alcuni modelli sperimentali mostrano che la sua assenza determina una riduzione dell'eosinofilia bronchiale, della produzione di IL-13, dell'iperreattività bronchiale e della secrezione di muco, suggerendo quindi un possibile ruolo proinfiammatorio. Tuttavia altri studi dimostrano che la neutralizzazione di IL-22 durante l'esposizione all'antigene aumenta l'infiammazione allergica, l'espressione di IL-13 e IL-25 e il reclutamento degli eosinofili, mentre la somministrazione di IL-22 ricombinante riduce tali fenomeni<sup>78</sup>.

Promuove anche la differenziazione dei miofibroblasti, la transizione epitelio-mesenchimale e la proliferazione delle cellule muscolari lisce bronchiali<sup>80</sup>.

C'è quindi un effetto infiammatorio sinergico tra IL-17 e IL-22 che amplifica drasticamente l'espressione di chemochine sia nell'epitelio che nella muscolatura liscia<sup>79,80</sup>.

Parallelamente al circuito Th17, l'endotipo T2-low è caratterizzato da un profilo immunologico sbilanciato verso la risposta Th1, contraddistinto dalla secrezione di IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ <sup>76,77</sup>.

Contrariamente a quello che era il vecchio modello per cui l'asse TNF- $\alpha$ /INF- $\gamma$  escludeva l'asse Th2, oggi si sa che le due vie agiscono in overlap, amplificando il danno tissutale, peggiorando l'iperreattività bronchiale e accelerando il rimodellamento strutturale delle vie aeree<sup>63</sup>.

TNF- $\alpha$  agisce in modo sinergico con le citochine della linea Th17 per potenziare in modo esponenziale la trascrizione e il rilascio di IL-8 da parte dei macrofagi e dell'epitelio<sup>75</sup>.

INF- $\gamma$  ha un ruolo interessante anche sui mastociti residenti nella mucosa bronchiale, tradizionalmente pensati come bersaglio esclusivo delle IgE e dell'immunità Th2. Il legame dell'IFN- $\gamma$  agli specifici recettori sui mastociti li stimola ad iperattivarsi, potenziando marcatamente il rilascio di istamina e di IL-13, citochina tipicamente Th2. Questo legame cross infiammatorio contribuisce direttamente all'aggravamento dell'iperreattività bronchiale<sup>77</sup>.

Insieme, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  alterano l'omeostasi cellulare della muscolatura liscia inducendo una upregolazione dell'enzima CD38, che aumenta la segnalazione ed il rilascio del calcio intracellulare, potenziando la contrattilità della muscolatura bronchiale e guidando l'iperreattività delle vie aeree<sup>64,75-77</sup>.

La stimolazione combinata di IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  induce l'epitelio a produrre alti livelli di chemochine quali CXCL9, CXCL10 e CXCL11. Questo gradiente chimico perpetua il reclutamento e la ritenzione dei linfociti T e delle cellule infiammatorie nel tessuto polmonare<sup>77</sup>.

I principali meccanismi patogenetici, quindi, convergono su anomalie intrinseche della muscolatura liscia delle vie aeree e su complessi processi infiammatori mediati dalla cooperazione tra IL-17 e IL-8. L'importanza di questa via è sottolineata dall'upregolazione tissutale di entrambi i recettori dell'IL-8, ovvero il tipo A (IL-8RA) e il tipo B (IL-8RB); in aggiunta l'espressione differenziale del gene per l'IL-8RA nei polmoni correla strettamente con una marcata infiammazione sistemica, che rende il tessuto respiratorio significativamente più incline a sviluppare un massivo infiltrato cellulare<sup>72</sup>.

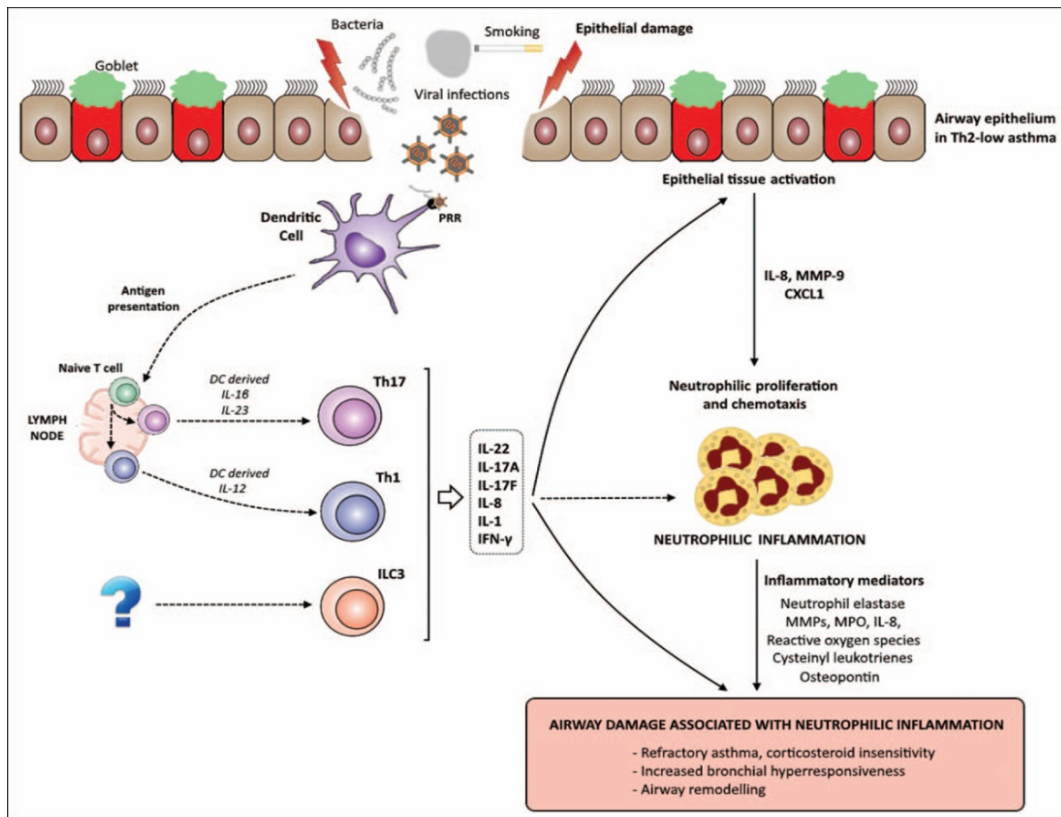


Figura 3: Schema delle possibili vie che portano all'infiammazione non eosinofila nell'asma T2-low<sup>72</sup>.

## 2.2 L'ASMA NEUTROFILICA

Il fenotipo neutrofilico rappresenta circa il 5–22% dei pazienti asmatici ed è spesso associato a malattia più grave<sup>75</sup>.

Come già accennato, l'asma neutrofilica è caratterizzata principalmente dall'elevata prevalenza di neutrofili nell'espettorato. Sebbene non vi sia ancora il consenso univoco sulla percentuale di neutrofili nell'espettorato che identifica un paziente affetto da uno sano, è ampiamente accettato un valore di neutrofili superiore al 60% o una conta di neutrofili  $\geq 5 \times 10^9/L$  in almeno due occasioni. I neutrofili nell'espettorato non sono solo un marcatore dell'endotipo, ma anche un marcatore prognostico perché un'alta percentuale di neutrofili nell'espettorato risulta essere inversamente proporzionale al rapporto tra FEV1/FVC e ai valori previsti del FEV1 pre e post-broncodilatatore<sup>76</sup>.

Questo tipo di malattia dal punto di vista infiammatorio è caratterizzato da un assetto T2-low, che di per sé non ha una definizione solida dal momento che tutti i biomarcatori utilizzati per l'infiammazione T2-high (FeNO, IL-4/IL-5/IL-13, IgE totali, eosinofili in sagnue/sputo) non hanno cut-off univoci e mostrano bassa concordanza e variabilità nel

tempo. Per questo ad oggi nella pratica clinica T2-low si identifica soprattutto per l'assenza di segnali di aumento di questi marker<sup>75</sup>.

Un biomarcatore ematico che potrebbe essere potenzialmente utilizzato per identificare i pazienti con asma neutrofilica è la proteina chitinasi-like YKL-40, sebbene esistano risultati contrastanti<sup>73</sup>.

In uno studio trasversale pubblicato sul *New England Journal of Medicine* sono state analizzate tre coorti indipendenti di pazienti asmatici e soggetti di controllo sani, nelle quali sono stati misurati i livelli sierici di YKL-40. I livelli di questa proteina sono risultati molto più alti nei pazienti con asma rispetto ai controlli sani in tutte le coorti esaminate. Nei pazienti con asma grave, la YKL-40 è fortemente espressa nelle cellule infiltranti il sottoepitelio, nell'epitelio bronchiale stesso e nel citoplasma dei macrofagi alveolari e dei neutrofili presenti nel BAL<sup>81</sup>.

È stata descritta anche un'associazione tra i livelli di YKL-40 e i livelli di eosinofili nel sangue di pazienti asmatici, evidenza del fatto che l'utilità del YKL-40 come biomarcatore per l'asma neutrofilica non è confermata<sup>73</sup>.

Un'altra proposta di biomarcatore sembrerebbe essere l'IL-8, surrogato fondamentale per la caratterizzazione dell'infiammazione a prevalenza neutrofila. In questa classe di pazienti le analisi biochimiche hanno registrato elevati livelli di questa citochina, i quali mostrano una correlazione lineare positiva sia con la conta assoluta dei neutrofili nel muco, sia con i fenomeni di colonizzazione microbica da parte di patogeni opportunisti. A conferma del network molecolare, nell'asma neutrofilica si registra un'upregolazione dei recettori chemochinici CXCR1 e CXCR2 nell'espettorato, validando il ruolo centrale dell'asse dell'IL-8 nel direzionare la flogosi e il reclutamento cellulare<sup>72</sup>.

### **3 IL-8**

Nell'asma bronchiale la distinzione tra infiammazione T2 e non-T2 rappresenta oggi uno dei principali criteri interpretativi della malattia, sia sul piano biologico sia su quello terapeutico. L'infiammazione T2 è sostenuta soprattutto da linfociti Th2 e da ILC2, con produzione di IL-4, IL-5 e IL-13, attivazione eosinofilica, switch isotipico verso IgE, aumento del FeNO, ipersecrezione mucosa e rimodellamento epiteliale<sup>64</sup>.

L'asma non-T2, invece, comprende fenotipi più spesso neutrofilici o paucigranulocitici, nei quali assumono maggiore importanza IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 e chemochine.

Tuttavia, questa classificazione non deve essere intesa in modo rigidamente dicotomico: soprattutto nell'asma grave e nelle riacutizzazioni possono coesistere meccanismi T2 e non-T2<sup>76</sup>.

In questo scenario IL-8, denominata anche CXCL8, assume un ruolo particolarmente interessante, poiché può comportarsi come mediatore trasversale tra infiammazione eosinofila, mastocitaria e neutrofila<sup>82</sup>.

### **3.1 MECCANISMI DI SEGNALAZIONE DI IL-8**

IL-8 è una chemochina prodotta da numerose cellule delle vie aeree, tra cui epitelio bronchiale, macrofagi, cellule muscolari lisce, fibroblasti e mastociti. La sua azione principale si esercita attraverso i recettori CXCR1 e CXCR2, espressi soprattutto sui neutrofili, promuovendone chemiotassi, attivazione, degranolazione e rilascio di enzimi proteolitici e specie reattive dell'ossigeno<sup>82</sup>.

Oltre che sui neutrofili, questi recettori sono espressi, seppur a livelli inferiori, anche dalle cellule strutturali del polmone, tra cui le cellule endoteliali e le cellule epiteliali bronchiali umane<sup>83</sup>.

Questi due recettori non possiedono però le stesse caratteristiche di risposta al legame con IL-8; l'affinità e la concentrazione del ligando, la cinetica del recettore e le funzioni effettrici indotte non sono sovrapponibili. Il recettore CXCR2 ha una maggiore affinità per IL-8 rispetto al CXCR1 e di conseguenza viene attivato e rimosso dalla superficie cellulare a concentrazioni di interleuchina minori, di contro per la medesima risposta biologica mediata da CXCR1 sono necessarie concentrazioni biologiche di IL-8 10 volte superiori. Questa differenza fa sì che i neutrofili inizialmente rispondano tramite CXCR2 a gradienti di chemochine distanti dal sito infiammatorio, mentre CXCR1 si attiva solo quando le concentrazioni nel sito sono alte. Anche la cinetica dei due recettori non è uguale, entrambi i recettori in seguito ad attivazione vanno incontro ad un periodo di refrattarietà, ma CXCR2 ha una cinetica lenta, nei primi 5-10 minuti di stimolazione ne viene internalizzato il 95% e solo il 35% torna ad essere ri-espresso dopo 90 minuti. CXCR1 si comporta in maniera opposta, nello stesso arco temporale di 5-10 minuti ne viene internalizzato solo il 10% e il recupero totale (100% di ri-espressione sulla superficie) si ha entro i 90 minuti. A causa di questa stabilità sulla superficie cellulare,

CXCR1 rimane il recettore dominante per questa segnalazione nelle infiammazioni acute o sistemiche dove l'espressione di CXCR2 risulta dimezzata<sup>83,84</sup>.

### **3.1 IL-8 NEI DIVERSI TIPI DI INFIAMMAZIONE**

L'asse dell'IL-8 è emerso quindi essere una via fondamentale nel direzionare la flogosi e il reclutamento cellulare nella malattia asmatica<sup>72</sup>.

L'IL-8 è identificata come uno dei principali fattori chemiotattici indotti dal pathway Th17 come risposta innata e aspecifica a fattori ambientali (inquinamento, fumo, colonizzazioni batteriche) mediata dai TLR<sup>76</sup>.

IL-17A, prodotta da cellule Th17 e da altre popolazioni immunitarie, è in grado di indurre l'espressione di IL-8 e quindi il richiamo di neutrofili nelle vie aeree. Nei pazienti asmatici, l'espressione di IL-17A e IL-8 nell'espettorato risulta aumentata e correlata con l'infiltrato granulocitico, suggerendo un legame tra risposta T cellulare e infiammazione neutrofilica<sup>85</sup>.

Inoltre, IL-17 potenzia il rilascio di IL-8 da parte delle cellule muscolari lisce bronchiali, soprattutto in presenza di IL-1 $\beta$ , attraverso vie di segnalazione come MAPK, PI3K, NF- $\kappa$ B e AP-1. Questo aspetto è rilevante perché cambia il ruolo di IL-8 da semplice marcatore cellulare a mediatore della comunicazione tra cellule immunitarie e cellule strutturali delle vie aeree<sup>86</sup>.

Studi su espettorato indotto hanno dimostrato che i pazienti con asma persistente non eosinofilo presentano un aumento dei neutrofili e livelli più elevati di IL-8 rispetto ai soggetti con asma eosinofilo e rispetto ai controlli, suggerendo un ruolo centrale dell'asse IL-8-neutrofilo nei fenotipi non-T2<sup>82,87</sup>.

Il ruolo di IL-8, tuttavia, non si esaurisce nell'asma T2-low. Un punto cruciale è che IL-8 può essere prodotta, oltre che dall'epitelio, anche dai mastociti, cellule profondamente coinvolte nell'infiammazione allergica T2. I mastociti esprimono Fc $\epsilon$ RI, rispondono all'attivazione IgE-mediata e contribuiscono alla broncocostrizione, alla secrezione di mediatori lipidici e al rimodellamento bronchiale. Studi sperimentali hanno dimostrato che i mastociti umani producono IL-8 biologicamente attiva e che l'attivazione del recettore A2B induce secrezione di IL-8 nei mastociti umani, con implicazioni dirette sulla malattia asmatica<sup>88</sup>.

Studi hanno evidenziato come l'interazione tra mastociti e cellule epiteliali bronchiali aumenti il rilascio di IL-6, CXCL1 e CXCL8, mentre i mastociti polmonari umani

possono modulare le cellule muscolari lisce bronchiali inducendo, tra le altre risposte, produzione di CXCL8<sup>89</sup>.

Questo suggerisce che IL-8 possa originare anche all'interno di un microambiente T2 mastocita-dipendente e quindi introdurre o amplificare una componente neutrofilica.

In questa prospettiva IL-8 può essere considerata un possibile “ponte” tra infiammazione T2 e non-T2. Da un lato, infatti, essa è fortemente associata al reclutamento neutrofilico e quindi ai fenotipi non-T2; dall'altro, può essere prodotta o indotta da cellule tipiche dell'infiammazione allergica, come mastociti ed epitelio attivato<sup>82</sup>.

Un ulteriore stimolo nella sua produzione lo abbiamo da parte della trombina, i livelli di trombina nel soggetto asmatico sono significativamente più alti rispetto ai soggetti sani. Il danno continuo alle cellule epiteliali polmonari, causato da allergeni o stimoli ambientali, porta a un rilascio localizzato di questa proteina. Oltre al suo noto ruolo nella coagulazione del sangue, la trombina agisce come un potente stimolatore dell'infiammazione allergica e dell'iperreattività bronchiale. Quando viene rilasciata, si lega a specifici recettori (PAR1/4) presenti sulle cellule epiteliali del polmone. Questa attivazione recettoriale induce le cellule a secernere diversi mediatori dell'infiammazione, tra cui IL-8, IL-6 e la prostaglandina E<sub>2</sub>. Le prostaglandine hanno un doppio effetto: il loro eccesso può stimolare le terminazioni nervose sensoriali nei polmoni, aumentando la sensibilità delle vie aeree, favorendo il riflesso della tosse e contribuendo alla percezione di costrizione toracica; parallelamente hanno la capacità di agire come broncodilatatore naturale inibendo anche il rilascio di mediatori da parte dei mastociti. Tuttavia, quando il suo aumento è inserito nella cascata distruttiva della trombina e del danno epiteliale cronico, l'effetto complessivo contribuisce ad alimentare il network di segnali che sostiene l'infiammazione e la progressione della malattia<sup>90</sup>.

Uno studio ha osservato come durante e riacutizzazioni asmatiche acute nei bambini, il processo infiammatorio delle vie aeree non è puramente eosinofilo, ma è eterogeneo e caratterizzato da un'importante infiltrazione e attivazione simultanea sia di eosinofili che di neutrofili, oltre alla presenza di mastociti<sup>91</sup>. Questo pattern misto è supportato da elevati livelli di citochine e marcatori di attivazione specifici per entrambe le linee cellulari durante l'esacerbazione: l'attivazione e il reclutamento dei neutrofili sono accompagnati da alti livelli di IL-8 e di mieloperossidasi (MPO). L'attivazione degli eosinofili è, invece, supportata da alti livelli di IL-5 e della proteina cationica degli eosinofili (ECP). Questo dato si inserisce nel concetto di “mixed granulocytic asthma”,

in cui eosinofili e neutrofili risultano contemporaneamente aumentati nell'espettorato, con un profilo infiammatorio più complesso e spesso associato a maggiore severità clinica<sup>91</sup>.

La presenza di IL-8 può avere anche importanti implicazioni terapeutiche, in particolare nella steroideresistenza. Nei pazienti con asma acuto severo sono stati osservati livelli aumentati di IL-8 nelle secrezioni bronchiali, correlati al numero di neutrofili e alla durata della ventilazione meccanica nei pazienti intubati. Inoltre, l'asma corticosteroido-resistente è associata a una maggiore espressione di geni pro-infiammatori nei campioni broncoalveolari, tra cui IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e altre chemochine CXCR<sup>92,93</sup>.

I neutrofili dei pazienti con asma steroideo-resistente mostrano una ridotta sensibilità all'azione antinfiammatoria dei glucocorticoidi, suggerendo che la persistenza di un'inflammazione neutrofilica possa contribuire alla scarsa risposta agli ICS. In parallelo, è stato dimostrato che mediatori rilasciati da mastociti polmonari umani attivati tramite Fc $\epsilon$ RI possono ridurre la responsività corticosteroidica delle cellule muscolari lisce bronchiali. Ne deriva che, anche in pazienti con asma grave T2, la componente IL-8-neutrofili-mastociti potrebbe contribuire alla quota di infiammazione non completamente controllata dai corticosteroidi inalatori<sup>94</sup>.

Uno studio ha analizzato 48 citochine e chemochine presenti nel BAL di soggetti con asma non controllata, confrontandole con quelle rilevate in pazienti con asma controllata e in soggetti sani. I pazienti asmatici hanno mostrato percentuali significativamente più elevate di eosinofili e neutrofili, nonché livelli persistentemente aumentati di 14 citochine specifiche, tra cui l'IL-8. Gli unici marcatori infiammatori in grado di distinguere l'asma controllata da quella non controllata sono risultati i livelli di neutrofili e di IL-8, entrambi significativamente più elevati nei pazienti non controllati. Inoltre, è stata osservata una correlazione inversa tra questi parametri e il FEV1: all'aumentare dei livelli di neutrofili e di IL-8, la funzionalità polmonare tendeva a peggiorare<sup>95</sup>.

In conclusione, IL-8 rappresenta una chemochina chiave dell'inflammazione neutrofilica nell'asma, ma il suo significato biologico non può essere limitato alla categoria T2-low. La sua produzione da parte dei mastociti e la sua induzione attraverso l'interazione mastocita-epitelio-muscolo liscio indicano che essa può nascere anche in un contesto T2. Una volta prodotta, IL-8 favorisce il reclutamento neutrofilico, amplifica il danno epiteliale e può contribuire a un'inflammazione meno sensibile agli steroidi. Considerarla come possibile mediatore "ponte" tra infiammazione T2 e non-T2 permette quindi di

interpretare meglio l'asma grave come un continuum dinamico, nel quale eosinofili, mastociti, neutrofili, cellule strutturali bronchiali e citochine interagiscono in modo variabile, influenzando severità clinica e risposta agli ICS<sup>96</sup>.

## **4. OBIETTIVO DELLO STUDIO**

L'obiettivo principale di questo studio pilota prospettico osservazionale monocentrico, proof of concept, è valutare il ruolo dell'IL-8 (CXCL8), una chemochina tradizionalmente associata all'infiammazione neutrofilica e ai meccanismi immunitari non-T2, in pazienti affetti da asma grave caratterizzato da una chiara infiammazione di tipo 2.

In questo contesto, particolare attenzione sarà rivolta all'IL-8 quale possibile biomarcatore di attività infiammatoria residua e di severità di malattia. Obiettivo secondario dello studio è valutare, mediante metodica non invasiva, gli effetti del trattamento con anti-TSLP (Tezepelumab) sugli outcome clinici e sui livelli di IL-8. Lo studio si propone inoltre di esplorare se la modulazione di tale biomarcatore possa riflettere l'efficacia biologica del trattamento e fornire informazioni utili per il monitoraggio dei diversi fenotipi infiammatori presenti nell'asma grave.

## **5. MATERIALI E METODI**

### **5.1 PAZIENTI E DISEGNO DELLO STUDIO**

Sono stati raccolti e analizzati i dati di 2 pazienti asmatici adulti (età >18 anni), con diagnosi di asma grave di tipo 2 diagnosticata secondo i criteri definiti dalle linee guida GINA 2026.

#### **Criteri di arruolamento**

Per tale studio sono stati selezionati pazienti:

- 1) facenti parte del Severe Asthma Network Italy (SANI) che avessero firmato il consenso informato per la metodica dell'EBC.
- 2) con diagnosi di asma grave T2-high, sensibilizzati entrambi da un allergene perenne, che fossero naive per terapie biologiche precedenti e con indicazione all'avvio della terapia biologica con anti-TSLP.
- 3) che fossero in grado di effettuare in maniera corretta la raccolta dell'EBC prima e dopo la somministrazione del farmaco.

Entrambi i pazienti sono stati sottoposti alla raccolta dell'EBC, effettuata respirando a volume corrente all'interno di un boccaglio, escludendo la via nasale, per un tempo massimo di 15 minuti, fino al raggiungimento di 75 L di espirato.

La raccolta è avvenuta in due momenti differenti: prima dell'avvio del trattamento farmacologico (T0) e dopo tre mesi di trattamento (T3), per ciascun campione è stato effettuato un pannello multiplex per la ricerca di 105 citochine e marcatori infiammatori. Il condensato dell'espirato è stato raccolto mediante sistema TURBO DECCS e VOLMET 20.



Figura 4: Turbo DECCS e Volmet 20

Entrambe i pazienti soddisfacevano i criteri di asma grave con le caratteristiche riportate in Tabella 1.

Paziente	Eta	Diagnosi	FeNO bronchiale	Eosinofili	Biologico / progressi
Paz. 1	45 anni	Asma grave	119 ppb	370 cell/microlitro	Tezepelumab / nessuna
Paz. 2	22 anni	Asma grave	92 ppb	448 cell/microlitro	Tezepelumab / nessuna

Tabella 1: Caratteristiche dei pazienti arruolati

Dopo la raccolta il campione è stato aliquotato e conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Il workflow ha previsto un passaggio di ultracentrifugazione a 10.000 giri per 10 minuti e l'impiego di aliquote operative da 100 microlitri.

Paziente	T0 L esp.	T0 condensato	T3 L esp.	T3 condensato	Variazione
Paz. 1	75 L	1000 microlitri	75 L	500 microlitri	-500 microlitri
Paz. 2	75 L	360 microlitri	75 L	650 microlitri	+290 microlitri

Tabella 2: Dati di raccolta dell'EBC

La resa del condensato varia tra i pazienti e i tempi di raccolta, questo elemento deve essere considerato come potenziale fonte di variabilità pre-analitica.

## 5.2 PURIFICAZIONE E ANALISI PRECLINICA



Figura 5: RNA/DNA/Protein Purification Plus kit

La purificazione del campione è stata impostata con RNA/DNA/Protein Purification Plus Kit, che consente l'isolamento sequenziale dell'RNA totale e miRNA, DNA genomico e proteine da un singolo campione, senza splitting del materiale biologico. Il metodo si basa su cromatografia su colonna spin e matrice resinosa.

La fase analitica comprendeva la quantificazione di acidi nucleici e proteine tramite NanoDrop e BCA assay, separazione proteica con SDS-PAGE, eventuale Western Blot, immunodosaggi ELISA e profilazione mediante Proteome Profiler Array Human XL Cytokines Kit (Bio-Techne/R&D Systems). La documentazione e l'analisi dei segnali sono state associate a sistema UVITEC per imaging molecolare, chemiluminescenza e fluorescenza.

La spettrometria di massa MALDI-TOF è utilizzata come tecnica per misurare il peso molecolare delle macromolecole e supportarne l'identificazione in base al rapporto massa/carica.

L'analisi proteomica è stata finalizzata alla valutazione comparativa di 105 biomarcatori proteici presenti nell'esalato condensato, con l'obiettivo di caratterizzare il profilo infiammatorio delle pazienti e di monitorarne le variazioni in seguito al trattamento biologico. I campioni raccolti al basale T0 e a T3 dall'inizio della terapia con anti-TSLP hanno consentito di identificare il pattern infiammatorio iniziale delle due pazienti, entrambe caratterizzate da un fenotipo T2-high, nonché di valutare le modificazioni indotte dal trattamento. Il confronto tra i due time-point ha permesso di evidenziare differenti dinamiche di risposta biologica, con variazioni nell'espressione di mediatori coinvolti nei pathway infiammatori di tipo T2, neutrofilico e Th17.

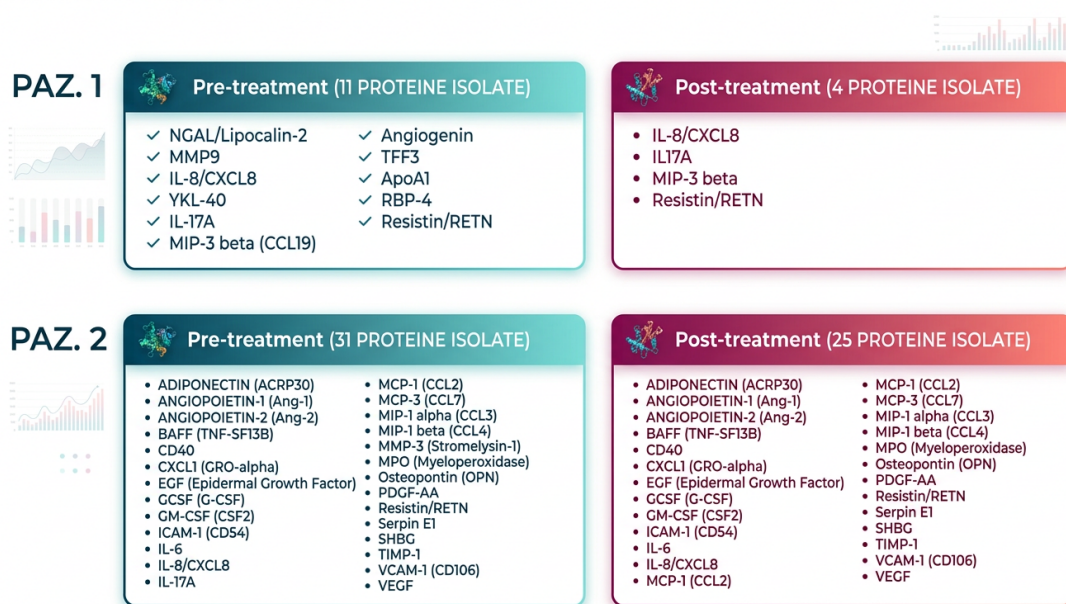


Figura 6: Assetto citochinico/proteomico dei due pazienti pre e post trattamento

## 6. RISULTATI

Per il presente studio sono stati reclutati due pazienti adulti, entrambe di sesso femminile, affetti da asma grave di tipo 2, diagnosticato secondo i criteri definiti dalle linee guida GINA 2026 e iscritti al registro nazionale dell'asma grave (SANI). Entrambi i pazienti sono stati sottoposti alla raccolta EBC in due differenti momenti temporali: prima dell'inizio del trattamento con biologico anti-TSLP Tezepelumab (T0) e dopo tre mesi di terapia (T3).

I campioni ottenuti sono stati successivamente analizzati mediante un pannello multiplex comprendente 105 citochine e mediatori infiammatori, al fine di valutare le variazioni del profilo molecolare associate al trattamento.

L'analisi proteomica ha evidenziato come, nonostante caratteristiche cliniche inizialmente simili, le due pazienti abbiano mostrato una risposta biologica profondamente diversa al trattamento. Un dato interessante riguarda il comportamento dell'asse IL-17A–IL-8, che sembra rappresentare un possibile meccanismo di infiammazione residua dopo il blocco della TSLP.

Nella paziente 1 osserviamo come al basale erano presenti elevati livelli di 11 biomarcatori associati all'infiammazione neutrofilica proteolitica, tra cui NGAL/Lipocalina-2, MMP-9, YKL-40, Angiogenina e IL-8. Dopo tre mesi di trattamento con Tezepelumab questi marker si sono ridotti da 11 a 4.

In particolare, l'IL-8 passa da circa 381 unità a 296, mostrando una riduzione significativa. Parallelamente scompaiono completamente NGAL e MMP-9, che rappresentano uno dei complessi proteolitici maggiormente implicati nel danno tissutale e nel rimodellamento bronchiale (Figura 7).

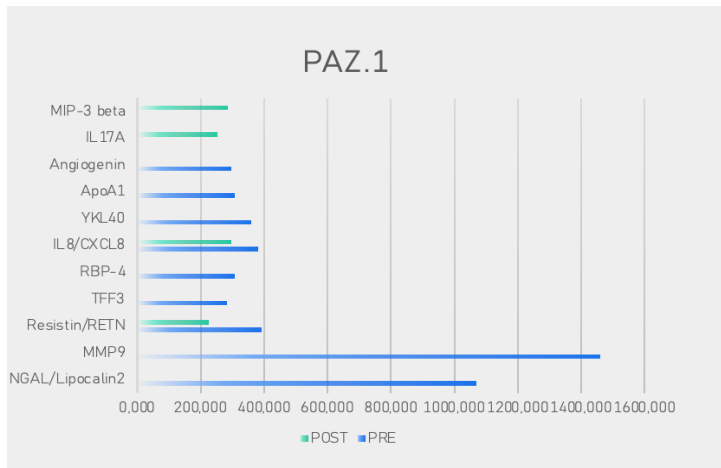


Figura 7: Pattern citochinico pre e post trattamento Paziente 1

Tuttavia, nonostante la soppressione dell'asse neutrofilico più distruttivo, emerge ex novo l'espressione di IL-17A e MIP-3 $\beta$ , assenti al basale. Questo suggerisce che il blocco della TSLP sia stato efficace nel ridurre l'infiammazione epiteliale "upstream" e la componente neutrofilica proteolitica, ma che persista una quota di infiammazione sostenuta dal pathway Th17.

Pertanto, l'IL-8 in questa paziente può essere interpretata come un biomarcatore residuo di attività infiammatoria, notevolmente attenuato ma non completamente soppresso.

La paziente 2 presenta invece un comportamento differente.

Già al basale mostrava un profilo caratterizzato da elevati livelli di IL-17A, MIP-3 $\beta$  e IL-8, indicativo di una forte attivazione dell'asse Th17-neutrofilico.

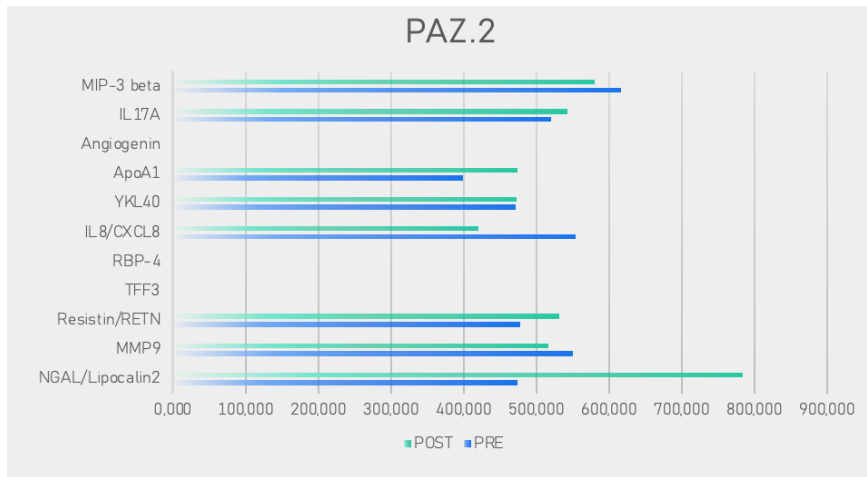


Figura 8: Pattern citochinico pre e post trattamento Paziente 2

Dopo tre mesi di trattamento si osserva una riduzione del profilo citochinico da 31 a 25, con decremento solo parziale dell'IL-8, che passa da circa 553 a 420, mentre IL-17A rimane elevata e alcuni marker infiammatori, come NGAL e Resistina, aumentano addirittura rispetto al basale (Figura 8).

Questo dato suggerisce che, nonostante il blocco della TSLP abbia probabilmente ridotto parte della stimolazione epiteliale iniziale, il circuito infiammatorio Th17 sia ormai autosufficiente e continui ad alimentare la produzione di chemochine come IL-8.

In altre parole, l'IL-8 continua a funzionare come segnale di richiamo per neutrofili, cellule dendritiche e altre cellule immunitarie, contribuendo al mantenimento dell'infiammazione cronica delle vie aeree.

## 7. DISCUSSIONE

Questa analisi preliminare, condotta su due pazienti asmatici con profilo T2-high, suggerisce come il profilo citochinico dell'EBC possa fornire informazioni complementari rispetto ai soli biomarcatori sistemici o funzionali. I due casi mostrano traiettorie divergenti a seguito della somministrazione di anti-TSLP Tezepelumab: nel primo paziente abbiamo una riduzione dell'assetto neutrofilico, mentre nel secondo paziente persiste un pattern infiammatorio più alto.

Tezepelumab è un anticorpo monoclonale diretto contro il TSLP, una citochina epiteliale posta a monte delle vie infiammatorie dell'asma. Diversi studi supportano l'efficacia del farmaco nell'asma non controllato e nell'asma grave, mostrando una riduzione delle riacutizzazioni e benefici clinici in popolazioni eterogenee. In questi contesti l'EBC può aiutare a esplorare se la risposta clinica si accompagna a modifiche locali del microambiente infiammatorio delle vie aeree<sup>46</sup>.

La persistenza di IL-8 dopo il trattamento, pur in presenza di una sua riduzione relativa, rappresenta un dato biologicamente interessante perché sposta l'interpretazione da una semplice dicotomia presente/assente a una lettura dinamica della risposta infiammatoria. IL-8 è una chemochina centrale nel reclutamento, nell'attivazione e nel mantenimento del traffico neutrofilico nelle vie aeree. In un contesto di asma grave, una riduzione del segnale può indicare attenuazione del drive chemotattico neutrofilico; il mancato azzeramento, tuttavia, suggerisce che una quota del microambiente bronchiale rimanga ancora capace di sostenere il richiamo cellulare, l'amplificazione citochinica o la risposta epiteliale allo stress. Nel caso specifico, la riduzione di IL-8 non va quindi interpretata come fallimento terapeutico. Può indicare una risposta parziale con mantenimento fisiologico della chemiotassi neutrofilica, su una via infiammatoria che non è esclusivamente T2 e che può sopravvivere anche quando una terapia a monte, come il blocco di TSLP, riduce parte dell'attivazione epiteliale e immunitaria<sup>84</sup>.

Questa distinzione è importante per l'EBC. Il condensato dell'espriato è una matrice non invasiva, utile per intercettare segnali locali delle vie aeree, ma è anche sensibile a diluizione, resa del campione, contaminazione e variabilità pre-analitica.

Dal punto di vista fisiopatologico, IL-8 sembra essere adatta a funzionare come "ponte" tra infiammazione e struttura bronchiale. Non è solo un marcatore di presenza neutrofilica, può essere prodotta da epitelio bronchiale, macrofagi, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce bronchiali, ed è regolata da vie intracellulari come MAPK, NF-κB e segnali indotti da stress, acidosi o citochine. La sua riduzione parziale potrebbe quindi indicare l'attenuazione di una rete, non spegnimento completo di una singola sorgente<sup>91</sup>.

Una prima ipotesi interpretativa potrebbe essere che Tezepelumab abbia ridotto il segnale infiammatorio epiteliale a monte, con conseguente diminuzione del richiamo neutrofilico mediato da IL-8, ma che una quota di produzione locale sia mantenuta da cellule

strutturali già attivate, in particolare muscolatura liscia bronchiale e compartimento mesenchimale. In questa lettura, IL-8 residua non rappresenta solo l'inflammatione che resta, ma anche memoria biologica del rimodellamento.

Il ruolo della muscolatura liscia bronchiale è centrale nella discussione perchè questa componente non è più considerata soltanto un effettore meccanico della broncocostrizione. Le cellule muscolari lisce bronchiali possono produrre citochine e chemochine, rispondere a stimoli infiammatori e partecipare al rimodellamento attraverso proliferazione, migrazione, secrezione di fattori pro-angiogenici e interazione con epitelio e matrice extracellulare. Studi sperimentali hanno mostrato che le vie MAPK regolano l'espressione genica citochinica nei miociti delle vie aeree e che le cellule muscolari lisce umane possono produrre IL-8 in risposta a stimoli infiammatori o microambientali.

Questo punto consente una lettura più sottile della riduzione non completa di IL-8. Se IL-8 fosse esclusivamente un indicatore di neutrofili, la sua persistenza post-trattamento sarebbe interpretata quasi soltanto come inflammatione neutrofilica residua. Se invece IL-8 è anche un prodotto o un amplificatore del compartimento strutturale, allora la sua persistenza può segnalare che il rimodellamento bronchiale mantiene una certa autonomia rispetto alla soppressione dell'inflammatione epiteliale iniziale. Questo significherebbe che l'inflammatione può diminuire più rapidamente rispetto alla riorganizzazione del tessuto bronchiale.

La letteratura supporta questa possibilità. La muscolatura liscia bronchiale di soggetti asmatici può favorire l'angiogenesi attraverso un'aumentata secrezione di chemochine, inclusa IL-8. Inoltre, segnali derivati dall'epitelio bronchiale, inclusi IL-8 e RANTES, sono stati associati a proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce, due fenomeni chiave nel rimodellamento. Questi dati rendono plausibile che un'IL-8 residua dopo trattamento rifletta non solo persistenza di cellule infiammatorie, ma anche una comunicazione epitelio-mesenchimale ancora attiva<sup>49,50</sup>.

Il collegamento con il rimodellamento è particolarmente rilevante nel Paziente 1, dove la riduzione di NGAL/Lipocalin-2, MMP9 e YKL-40 suggerisce attenuazione della firma rimodellante. Tuttavia, la persistenza di IL-8 impedisce di parlare di normalizzazione completa. Si potrebbe ipotizzare che il trattamento abbia ridotto la componente più

distruttiva e proteolitica, ma lasciato una soglia di segnale chemotattico sufficiente a mantenere un microambiente di basso grado.

Nel Paziente 2, in cui il profilo complessivo dei mediatori resta più ampio, la riduzione parziale di IL-8 avrebbe un significato ancora diverso: potrebbe indicare che la via IL-8-dipendente si attenua, ma viene compensata da altre vie citochiniche o stromali, con persistenza del fenotipo infiammatorio. In questa situazione, IL-8 potrebbe non essere il principale driver residuo, ma solo una parte di una rete più grande, alimentata da IL-17A, MIP-3 $\beta$ /CCL19, Resistin/RETN e marker di rimodellamento.

Una seconda ipotesi è che IL-8 si riduca per effetto del trattamento o della diminuzione della risposta infiammatoria complessiva, ma non si azzeri perchè la muscolatura liscia bronchiale, una volta attivata, continua a produrre o rispondere a segnali chemochinici in maniera relativamente indipendente. Questo scenario sarebbe coerente con un paziente in miglioramento biologico, ma non ancora in remissione molecolare completa.

La riduzione non completa di IL-8 deve essere letta insieme alle altre molecole rilevate, perchè il valore interpretativo non sta nel singolo biomarcatore ma nella coerenza del pattern. Nel Paziente 1, il passaggio da 11 a 4 proteine isolate indica una riduzione globale del segnale, ma il pannello residuo mostra come vi sia una rimanenza di una componente chemotattica e immunitaria capace di collegare asse Th17, reclutamento cellulare e persistenza infiammatoria.

IL-17A ha un ruolo rilevante nell'interpretazione. Le vie dell'IL-17 sono associate a forme severe di asma, infiammazione neutrofilica, ridotta sensibilità agli steroidi e amplificazione di chemochine neutrofile<sup>79</sup>. In presenza di IL-17A residua, una IL-8 ancora rilevabile può essere vista come effetto a valle o come partner funzionale di una risposta Th17 non completamente soppressa. In altri termini, IL-17A potrebbe mantenere una pressione trascrizionale su IL-8 anche quando altri marker si sono ridotti.

MIP-3 $\beta$ /CCL19 aggiunge un ulteriore livello interpretativo. CCL19 è più legata all'organizzazione del traffico linfocitario e alla compartimentalizzazione immunitaria che al semplice richiamo neutrofilico. La coesistenza di IL-8 e CCL19 potrebbe indicare che, dopo trattamento, non resta soltanto un'infiammazione acuta, ma una nicchia immunitaria strutturata, capace di mantenere traffico cellulare e interazione tra

compartimento adattativo e innato. Questa affermazione si limita ad essere una speculazione, ma aiuterebbe a spiegare perchè IL-8 possa ridursi senza sparire: il segnale neutrofilico si attenua, mentre resta un ambiente permissivo al mantenimento immunitario.

Resistin/RETN può essere interpretata come marcatore di attivazione infiammatoria metabolico-innata. La sua persistenza, insieme a IL-8, suggerisce una possibile componente macrophage/neutrophil-like o comunque una risposta innata non completamente risolta. In assenza di valori quantitativi assoluti non si può stabilire una relazione causale, ma il binomio IL-8 + Resistin è coerente con un residuo infiammatorio a bassa intensità, potenzialmente indipendente dall'asse T2 classico.

La scomparsa relativa di NGAL/Lipocalin-2 e MMP9 nel Paziente 1 è un dato rilevante perchè queste molecole sono compatibili con un asse neutrofilico-proteolitico. NGAL può interagire con MMP9 stabilizzandone l'attività e contribuendo alla persistenza del danno proteolitico. Se IL-8 diminuisce ma resta rilevabile, mentre MMP9 e NGAL non sono più rilevati, si può ipotizzare una transizione da infiammazione neutrofilica attiva e tessuto-distruttiva verso uno stato residuo di sorveglianza chemotattica. In termini clinico-biologici, sarebbe una risposta favorevole, ma incompleta<sup>95</sup>.

YKL-40, quando presente, è interpretato come segnale di rimodellamento, fibrosi, attivazione mesenchimale e alterazione della funzione respiratoria<sup>73</sup>. La sua riduzione nel Paziente 1 rafforza l'idea che la componente strutturale più attiva possa essersi attenuata. Tuttavia, poichè IL-8 può essere connessa alla muscolatura liscia bronchiale e all'angiogenesi, la sua persistenza suggerisce che non tutti gli aspetti del rimodellamento siano necessariamente spenti allo stesso ritmo. La biologia del tessuto bronchiale potrebbe avere una cinetica più lenta rispetto alla caduta dei marker infiammatori più labili.

Una terza ipotesi potrebbe essere legata al fatto che IL-8 residua sia un segnale di rimodellamento in raffreddamento, dove abbiamo il pattern proteolitico in diminuzione, ma con la persistenza di una quota di segnale di IL-8 legata alle cellule strutturali, alla riparazione tissutale, all'angiogenesi o alla risposta allo stress meccanico. Questa ipotesi sarebbe quindi interpretabile come una fase intermedia della risposta biologica.

Lo studio effettuato presenta certamente delle limitazioni e la prima è la temporalità: tre mesi potrebbero essere sufficienti per ridurre l'infiammazione epiteliale e alcune proteine legate al danno, ma non altrettanto sufficienti per cancellare i segnali prodotti dal compartimento strutturale. Come detto precedentemente IL-8 ha una produzione sostenuta anche dalla muscolatura liscia bronchiale, fibroblasti, epitelio e cellule residenti innate e la sua persistenza potrebbe essere interpretata come un segnale di inerzia tissutale. Per questo una rivalutazione a sei o 12 mesi potrebbe permettere di distinguere tra un'IL-8 residua transitoria e una firma persistente di rimodellamento.

Seconda considerazione riguarda la casistica ridotta, sulla quale non è stato possibile effettuare un'analisi statistica inferenziale necessaria. Tuttavia, questo lavoro si configura come uno studio Proof of Concept: nonostante il piccolo campione, è stato comunque di grande interesse riscontrare variazioni così nette e coerenti nei pazienti analizzati.

## 8. CONCLUSIONI

I risultati emersi dal presente studio pilota, condotto secondo un approccio Proof of Concept, evidenziano dati di grande interesse biologico e clinico riguardo all'impiego dell'esalato condensato nel monitoraggio molecolare dei pazienti con asma grave in terapia con Tezepelumab.

Il dato centrale della ricerca è rappresentato dalla riduzione parziale, ma non dal completo azzeramento, dei livelli di IL-8/CXCL8 a tre mesi dall'inizio del trattamento biologico. Questa persistenza non deve essere interpretata come un fallimento terapeutico, bensì come espressione di una complessa dinamica fisiopatologica. Da un lato, il mantenimento di un segnale di IL-8 suggerisce la preservazione del ruolo fisiologico di difesa immunitaria e chemiotassi dei neutrofili nelle vie aeree. Dall'altro, inquadrando il marcatore all'interno dei due diversi profili biologici analizzati, emergono due importanti conclusioni:

- 1) nel Paziente 1 la persistenza di IL-8 si inserisce in un contesto di netta riduzione globale dei mediatori (passati da 11 a 4), con la scomparsa della firma proteolitica e tissutale più distruttiva (MMP9, NGAL e YKL-40). In questo caso, IL-8 configura in un quadro di “raffreddamento”, in cui l'attenuazione dell'infiammazione acuta precede la normalizzazione strutturale del tessuto bronchiale.
- 2) nel Paziente 2 la riduzione parziale di IL-8 avviene all'interno di un network infiammatorio che rimane più ampio e attivo. Qui, la via IL8-dipendente sembra essere solo un pezzo di una rete alternativa e complessa (alimentata da assi citochinici non-T2), suggerendo una risposta molecolare più incompleta e una parziale autonomia del compartimento strutturale.

In conclusione, l'analisi proteomica dell'EBC si è dimostrata uno strumento promettente per intercettare la risposta biologica locale. Nonostante i limiti legati alla casistica esigua, lo studio dimostra che marcatori come IL-8 non agiscono come indicatori dicotomici (risposta/non risposta), ma come indici di intensità della risposta biologica. Questi risultati aprono vaste prospettive di ricerca e pongono le basi per futuri studi longitudinali su scala più ampia, mirati a standardizzare il workflow metodologico e a integrare l'EBC nei protocolli di deep phenotyping.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Global Initiative for Asthma - Global Initiative for Asthma - GINA. <https://ginasthma.org/>.
2. Varricchi, G. *et al.* Biologics and airway remodeling in severe asthma. *Allergy* **77**, 3538–3552 (2022).
3. Carr, T. F. & Bleecker, E. Asthma heterogeneity and severity. *World Allergy Organization Journal* **9**, 41 (2016).
4. Song, P. *et al.* Global, regional, and national prevalence of asthma in 2019: A systematic analysis and modelling study. *J. Glob. Health* **12**, (2022).
5. Ramsahai, J. M., Hansbro, P. M. & Wark, P. A. B. CONCISE CLINICAL REVIEW Mechanisms and Management of Asthma Exacerbations. <https://doi.org/10.1164/rccm.201810-1931CI> (2019) doi:10.1164/rccm.201810-1931CI.
6. Adattamento GINA Italia 2025 – GINASMA. <https://ginasma.it/adattamento-gina-italia-2025/>.
7. Dharmage, S. C., Perret, J. L. & Custovic, A. Epidemiology of asthma in children and adults. *Front. Pediatr.* **7**, 452197 (2019).
8. Agache, I. *et al.* The impact of outdoor pollution and extreme temperatures on asthma-related outcomes: A systematic review for the EAACI guidelines on environmental science for allergic diseases and asthma. *Allergy* **79**, 1725–1760 (2024).
9. McCreanor, J. *et al.* Respiratory Effects of Exposure to Diesel Traffic in Persons with Asthma. *New England Journal of Medicine* **357**, 2348–2358 (2007).
10. Ziani, K. *et al.* Microplastics: A Real Global Threat for Environment and Food Safety: A State of the Art Review. *Nutrients* 2023, Vol. 15, Page 617 **15**, 617 (2023).
11. Devi, A. E. ; ; *et al.* The Plastic Within: Microplastics Invading Human Organs and Bodily Fluids Systems. *Environments* 2023, Vol. 10, Page 194 **10**, 194 (2023).
12. Wang, Q. *et al.* Polystyrene nanoplastics aggravate house dust mite induced allergic airway inflammation through EGFR/ERK-dependent lung epithelial barrier dysfunction. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **298**, (2025).
13. Caillaud, D. *et al.* Indoor mould exposure, asthma and rhinitis: findings from systematic reviews and recent longitudinal studies. *European Respiratory Review* **27**, (2018).
14. Annesi-Maesano, I. *et al.* Is exposure to pollen a risk factor for moderate and severe asthma exacerbations? *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* **78**, 2121–2147 (2023).
15. Coureau, E., Fontana, L., Lamouroux, C., Pélissier, C. & Charbotel, B. Is Isocyanate Exposure and Occupational Asthma Still a Major Occupational Health Concern? Systematic Literature Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **18**, (2021).
16. Henneberger, P. K. *et al.* An Official American Thoracic Society Statement: Work-Exacerbated Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 368–378 (2011).
17. Baur, X. & Bakehe, P. Allergens causing occupational asthma: An evidence-based evaluation of the literature. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **87**, 339–363 (2014).

18. D'Amato, G. *et al.* Thunderstorm-related asthma: what happens and why. *Clinical & Experimental Allergy* **46**, 390–396 (2016).
19. Taylor, P. E. & Jonsson, H. Thunderstorm asthma. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **4**, 409–413 (2004).
20. Parasuraman, G. *et al.* The association between body mass index, abdominal fatness, and weight change and the risk of adult asthma: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Scientific Reports* **2023 13:1** **13**, 7745- (2023).
21. Bantulà, M., Roca-Ferrer, J., Arismendi, E. & Picado, C. Asthma and Obesity: Two Diseases on the Rise and Bridged by Inflammation. *Journal of Clinical Medicine* **2021, Vol. 10, Page 169** **10**, 169 (2021).
22. Tashiro, H. & Shore, S. A. Obesity and severe asthma. *Allergology International* **68**, 135–142 (2019).
23. Characterising airway obstructive, dysanaptic and PRISm phenotypes of prematurity-associated lung disease. <https://www.aiponet.it/editoria/lung-update/fisiopatologia-respiratoria-ed-esercizio-fisico/3286-characterising-airway-obstructive-dysanaptic-and-prism-phenotypes-of-prematurity-associated-lung-disease.html>.
24. Bush, A. Pathophysiological mechanisms of asthma. *Front. Pediatr.* **7**, 446532 (2019).
25. Kusel, M. M. H. *et al.* Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **119**, 1105–1110 (2007).
26. Kotaniemi-Syrjänen, A. *et al.* Rhinovirus-induced wheezing in infancy - The first sign of childhood asthma? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **111**, 66–71 (2003).
27. Rosas-Salazar, C. *et al.* Respiratory syncytial virus infection during infancy and asthma during childhood in the USA (INSPIRE): a population-based, prospective birth cohort study. *The Lancet* **401**, 1669–1680 (2023).
28. Krishnamoorthy, N. *et al.* Early infection with respiratory syncytial virus impairs regulatory T cell function and increases susceptibility to allergic asthma. *Nat. Med.* **18**, 1525 (2012).
29. Harford, T. J. *et al.* Respiratory syncytial virus induces  $\beta$ 2-adrenergic receptor dysfunction in human airway smooth muscle cells. *Sci. Signal.* **14**, (2021).
30. journal, S. T.-E. clinical respiratory & 2015, undefined. Genetics of asthma: an introduction for the clinician. *Taylor & FrancisSF ThomsenEuropean clinical respiratory journal, 2015•Taylor & Francis* **2**, 24643 (2015).
31. Duffy, D. L., Martin, N. G., Battistutta, D., Hopper, J. L. & Mathews, J. D. Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. *Am. Rev. Respir. Dis.* **142**, 1351–1358 (1990).
32. El-Husseini, Z. W., Gosens, R., Dekker, F. & Koppelman, G. H. The genetics of asthma and the promise of genomics-guided drug target discovery. *Lancet Respir. Med.* **8**, 1045–1056 (2020).
33. A genome-wide cross-trait analysis from UK Biobank highlights the shared genetic architecture of asthma and allergic diseases | Nature Genetics. <https://www.nature.com/articles/s41588-018-0121-0>.
34. Jaenisch, R. & Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **33 Suppl**, 245–254 (2003).

35. Kabesch, M. & Tost, J. Recent findings in the genetics and epigenetics of asthma and allergy. *Seminars in Immunopathology 2020 42:1* **42**, 43–60 (2020).
36. Ntontsi, P., Photiades, A., Zervas, E., Xanthou, G. & Samitas, K. Genetics and Epigenetics in Asthma. *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 2412* **22**, 2412 (2021).
37. Louis, R. *et al.* European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of asthma in adults. *European Respiratory Journal* **60**, (2022).
38. Coates, A. L. *et al.* ERS technical standard on bronchial challenge testing: general considerations and performance of methacholine challenge tests. *European Respiratory Journal* **49**, 1601526 (2017).
39. Menzies-Gow, A., Mansur, A. H. & Brightling, C. E. Clinical utility of fractional exhaled nitric oxide in severe asthma management. *European Respiratory Journal* **55**, (2020).
40. Turkeli, A. *et al.* IL-5, IL-8 and MMP -9 levels in exhaled breath condensate of atopic and nonatopic asthmatic children. *Respir. Med.* **109**, 680–688 (2015).
41. D’Aiuto, V. *et al.* Eosinophil-Driven vs. Eosinophil-Associated Severe Asthma: Practical Implications for Target Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **26**, (2025).
42. Kaur, R. & Chupp, G. Phenotypes and endotypes of adult asthma: Moving toward precision medicine. *J. Allergy Clin. Immunol.* **144**, 1–12 (2019).
43. Nakagome, K. & Nagata, M. Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma Exacerbation. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
44. Reddel, H. K. *et al.* Global Initiative for Asthma Strategy 2021 Executive Summary and Rationale for Key Changes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **205**, 17–35 (2022).
45. Połomska, J., Bar, K. & Sozańska, B. Exhaled Breath Condensate—A Non-Invasive Approach for Diagnostic Methods in Asthma. *Journal of Clinical Medicine 2021, Vol. 10, Page 2697* **10**, 2697 (2021).
46. D’amato, M. *et al.* Biologic Therapy in Severe Asthma: A Phenotype-Driven and Targeted Approach. *J. Clin. Med.* **14**, (2025).
47. Lipworth, B. J., Greig, R., Chan, R., Kuo, C. R. W. & Jackson, C. Head-To-Head Comparison of Biologic Efficacy in Asthma: What Have We Learned? *Allergy* **80**, 1226–1241 (2025).
48. Boonpiyathad, T., Sözen, Z. C., Satitsuksanoa, P. & Akdis, C. A. Immunologic mechanisms in asthma. *Semin. Immunol.* **46**, 101333 (2019).
49. Russell, R. J. *et al.* The airway epithelium: an orchestrator of inflammation, a key structural barrier and a therapeutic target in severe asthma. *European Respiratory Journal* **63**, 2301397 (2024).
50. Pat, Y. *et al.* Recent advances in the epithelial barrier theory. *Int. Immunol.* **36**, 211–222 (2024).
51. Whetstone, C. E., Ranjbar, M., Omer, H., Cusack, R. P. & Gauvreau, G. M. The Role of Airway Epithelial Cell Alarmins in Asthma. *Cells 2022, Vol. 11, Page 1105* **11**, 1105 (2022).
52. Duchesne, M., Okoye, I. & Lacy, P. Epithelial cell alarmin cytokines: Frontline mediators of the asthma inflammatory response. *Front. Immunol.* **13**, (2022).
53. Hansi, R. K., Ranjbar, M., Whetstone, C. E. & Gauvreau, G. M. Regulation of Airway Epithelial-Derived Alarmins in Asthma: Perspectives for Therapeutic Targets. *Biomedicines* **12**, (2024).

54. Saikumar Jayalatha, A. K., Hesse, L., Ketelaar, M. E., Koppelman, G. H. & Nawijn, M. C. The central role of IL-33/IL-1RL1 pathway in asthma: From pathogenesis to intervention. *Pharmacol. Ther.* **225**, 107847 (2021).
55. Gabryelska, A., Kuna, P., Antczak, A., Białasiewicz, P. & Panek, M. IL-33 Mediated Inflammation in Chronic Respiratory Diseases-Understanding the Role of the Member of IL-1 Superfamily. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
56. Cayrol, C. & Girard, J. P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol. Rev.* **281**, 154–168 (2018).
57. Munkholm Andreasson, L. *et al.* Airway hyperresponsiveness correlates with airway TSLP in asthma independent of eosinophilic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **153**, 988-997.e11 (2024).
58. Gurram, R. K. *et al.* TSLP acts on regulatory T cells to maintain their identity and limit allergic inflammation. *Sci. Immunol.* **10**, 73 (2025).
59. Pelaia, C. *et al.* Key role of thymic stromal lymphopoietin as a molecular target for biologic treatment of severe asthma. *Frontiers in Allergy* **6**, 1671353 (2025).
60. Cain, J., Hurrell, B. & Akbari, O. The Expanding Role of ILC2s in Allergic Airways Disease. *Allergy* **81**, 11–23 (2026).
61. Lv, K. *et al.* Extracellular vesicles derived from lung M2 macrophages enhance group 2 innate lymphoid cells function in allergic airway inflammation. *Exp. Mol. Med.* **57**, 1202–1215 (2025).
62. Matsuyama, T. *et al.* The Functional Role of Group 2 Innate Lymphoid Cells in Asthma. *Biomolecules* **13**, (2023).
63. Gauthier, M., Sagar, |, Kale, L. & Ray, A. T1-T2 Interplay in the Complex Immune Landscape of Severe Asthma. *Immunol. Rev.* **330**, 70011 (2025).
64. Habib, N., Pasha, M. A. & Tang, D. D. Current Understanding of Asthma Pathogenesis and Biomarkers. *Cells* **11**, (2022).
65. Pelaia, C. *et al.* Interleukins 4 and 13 in Asthma: Key Pathophysiologic Cytokines and Druggable Molecular Targets. *Front. Pharmacol.* **13**, (2022).
66. Le Floc’h, A. *et al.* Dual blockade of IL-4 and IL-13 with dupilumab, an IL-4R $\alpha$  antibody, is required to broadly inhibit type 2 inflammation. *Allergy* **75**, 1188–1204 (2020).
67. Bagnasco, D. *et al.* Anti-Interleukin 5 (IL-5) and IL-5Ra biological drugs: Efficacy, safety, and future perspectives in severe eosinophilic asthma. *Front. Med. (Lausanne)*. **4**, 228290 (2017).
68. AbuJabal, R., Ramakrishnan, R. K., Bajbouj, K. & Hamid, Q. Role of IL-5 in asthma and airway remodelling. *Clin. Exp. Allergy* **54**, 538–549 (2024).
69. Bush, A. Pathophysiological mechanisms of asthma. *Front. Pediatr.* **7**, 446532 (2019).
70. Jarjour, N. N. & Kelly, E. A. B. Pathogenesis of asthma. *Med. Clin. North Am.* **86**, 925–936 (2002).
71. Holgate, S. T. Pathogenesis of asthma. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 872–897 (2008).
72. Samitas, K., Zervas, E. & Gaga, M. T2-low asthma: Current approach to diagnosis and therapy. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **23**, 48–55 (2017).
73. Robinson, D. *et al.* Revisiting Type 2-high and Type 2-low airway inflammation in asthma: current knowledge and therapeutic implications. *Clinical and Experimental Allergy* **47**, 161–175 (2017).
74. Kuruvilla, M. E., Lee, F. E. H. & Lee, G. B. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **56**, 219–233 (2019).

75. Kyriakopoulos, C., Gogali, A., Bartziokas, K. & Kostikas, K. Identification and treatment of T2-low asthma in the era of biologics. *ERJ Open Res.* **7**, (2021).
76. Peri, F. *et al.* T2-Low Asthma: A Discussed but Still Orphan Disease. *Biomedicines* **11**, (2023).
77. Luo, W., Hu, J., Xu, W. & Dong, J. Distinct spatial and temporal roles for Th1, Th2, and Th17 cells in asthma. *Front. Immunol.* **13**, 974066 (2022).
78. Newcomb, D. C. & Peebles, R. S. Th17-mediated inflammation in asthma. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 755–760 (2013).
79. Xie, Y., Abel, P. W., Casale, T. B. & Tu, Y. T H 17 cells and corticosteroid insensitivity in severe asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **149**, 467–479 (2022).
80. Margelidon-Cozzolino, V., Tscopoulos, A., Chenivesse, C. & de Nadai, P. Role of Th17 Cytokines in Airway Remodeling in Asthma and Therapy Perspectives. *Frontiers in Allergy* **3**, 806391 (2022).
81. Chupp, G. L. *et al.* A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2016–2027 (2007).
82. Gibson, P. G., Simpson, J. L. & Saltos, N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* **119**, 1329–1336 (2001).
83. Toya, S. *et al.* A narrative review of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 and their role in acute respiratory distress syndrome. *Eur. Respir. Rev.* **33**, (2024).
84. Pease, J. E. & Sabroe, I. The role of interleukin-8 and its receptors in inflammatory lung disease: implications for therapy. *Am. J. Respir. Med.* **1**, 19–25 (2002).
85. Bullens, D. M. A. *et al.* IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir. Res.* **7**, (2006).
86. Dragon, S. *et al.* IL-17 enhances IL-1beta-mediated CXCL-8 release from human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **292**, (2007).
87. Simpson, J. L., Scott, R., Boyle, M. J. & Gibson, P. G. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology* **11**, 54–61 (2006).
88. Feoktistov, I. & Biaggioni, I. Adenosine A2b receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma. *J. Clin. Invest.* **96**, 1979–1986 (1995).
89. Cao, J. *et al.* Bronchial epithelial cells release IL-6, CXCL1 and CXCL8 upon mast cell interaction. *Cytokine* **56**, 823–831 (2011).
90. Cheng, W. H. *et al.* Serine/threonine kinase 33 mediates thrombin-induced interleukin-8 release from human lung epithelial cells in severe asthma. *Respir. Res.* **26**, (2025).
91. Norzila, M. Z., Fakes, K., Henry, R. L., Simpson, J. & Gibson, P. G. Interleukin-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 769–774 (2000).
92. Ordoñez, C. L., Shaughnessy, T. E., Matthay, M. A. & Fahy, J. V. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 1185–1190 (2000).

93. Goleva, E. *et al.* Corticosteroid-resistant asthma is associated with classical antimicrobial activation of airway macrophages. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**, (2008).
94. Wang, M. *et al.* Impaired anti-inflammatory action of glucocorticoid in neutrophil from patients with steroid-resistant asthma. *Respir. Res.* **17**, (2016).
95. Hosoki, K. *et al.* Analysis of a Panel of 48 Cytokines in BAL Fluids Specifically Identifies IL-8 Levels as the Only Cytokine that Distinguishes Controlled Asthma from Uncontrolled Asthma, and Correlates Inversely with FEV1. *PLoS One* **10**, (2015).
96. Alzahrani, A. *et al.* Human Lung Mast Cells Impair Corticosteroid Responsiveness in Human Airway Smooth Muscle Cells. *Frontiers in allergy* **2**, (2021).