



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

**Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche
CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA**

Tesi di Laurea

**“Studio dell’esalato condensato (EBC) come
metodica innovativa per la caratterizzazione
proteomica delle vie aeree nell’asma grave”**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Diego Bagnasco

Candidata:

Federica Galeano

CORRELATRICE:

Chiar.ma Dott.ssa Benedetta Bondi

Matricola:

4812304

Anno accademico 2025-2026

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE	4
1.1 DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA	4
1.2 EZIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO	5
1.3 PATOGENESI	11
1.4 FENOTIPI CLINICI DELL'ASMA E ENDOTIPI	15
1.5 DIAGNOSI.....	18
1.6 TRATTAMENTO	22
1.7 ASMA SEVERO	26
1.8 FOLLOW-UP	31
2. NUOVI METODI DIAGNOSTICI: ESALATO CONDENSATO (EBC)	33
ApoA1	35
TFF3	35
YKL40.....	38
3. MATERIALI E METODI	40
3.1 PAZIENTI E DISEGNO DI STUDIO	40
3.2 MISURAZIONI SPIROMETRICHE, DELL'OSSIDO NITRICO ESALATO E DELL'ESALATO CONDENSATO	41
4. RISULTATI	43
5. DISCUSSIONE	49
6. CONCLUSIONI.....	52
7. BIBLIOGRAFIA	53

1. INTRODUZIONE

1.1 DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA

L'asma è una malattia eterogenea caratterizzata da un'inflammatione cronica delle vie aeree¹. Si presenta con sintomi respiratori quali dispnea, respiro sibilante, senso di costrizione toracica e tosse, che variano nel tempo e per intensità, insieme a una limitazione variabile del flusso d'aria espiratorio (che può divenire persistente nel corso della malattia). Queste variazioni sono spesso scatenate da fattori quali l'esercizio fisico, l'esposizione ad allergeni o sostanze irritanti, cambiamenti meteorologici o infezioni respiratorie, soprattutto virali.

I sintomi e la limitazione del flusso d'aria possono risolversi spontaneamente o in risposta a farmaci, talvolta possono essere assenti per settimane o mesi consecutivi².

Inoltre, i pazienti possono manifestare episodi di riacutizzazione (esacerbazioni) d'asma che possono, in alcuni casi, metterne anche a rischio la vita e rappresentare un carico significativo per i pazienti. La maggior parte dei decessi per asma si verifica nei paesi a basso e medio reddito.

L'asma, oltre ad essere caratterizzata da un'inflammatione cronica delle vie aeree, è associata a un'iperreattività delle stesse a stimoli diretti o indiretti: queste caratteristiche tendono a persistere anche quando i sintomi sono assenti o la funzione polmonare è normale, ma possono normalizzarsi con il trattamento¹.

L'asma colpisce circa 260 milioni di persone a livello mondiale, facendo riferimento ai dati epidemiologici del 2021; la prevalenza dei sintomi rimane ancora del 6-7% negli adulti e 10% in bambini e adolescenti³.

L'asma non è distribuita uniformemente a livello globale, ma mostra variazioni di prevalenza basate su fattori geografici e socio-economici e, sebbene sia una condizione potenzialmente gestibile dal punto di vista farmacologico, causa ancora oltre 450.000 decessi all'anno, la maggior parte dei quali avviene in paesi a basso e medio reddito a causa di diagnosi tardive o scarso accesso ai farmaci².

La prevalenza è in aumento, in particolare nelle aree in via di urbanizzazione, a causa dei cambiamenti nello stile di vita e nell'esposizione ad allergeni e inquinanti ambientali.

In Italia, l'asma colpisce circa 5-6.6% della popolazione, raggiungendo anche il 10% nei bambini⁴.

L'impatto economico è rilevante, sia come spesa farmaceutica, sia soprattutto per i costi indiretti, valutabili in termini di giornate di lavoro o di scuola perse. L'asma rappresenta l'1% dei DALYs (*Disability-Adjusted Life Years*, in italiano, anni di vita aggiustati per disabilità) globali persi⁵. Inoltre, nonostante la disponibilità di terapie efficaci, il controllo ottimale della malattia viene raggiunto solo nel 44-61% dei pazienti⁶.

1.2 EZIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO

L'asma bronchiale è una patologia eterogenea che deriva da una complessa interazione fra predisposizione genetica e influenza ambientale. Le caratteristiche intrinseche di questa condizione patologica consentono molteplici possibilità di modulazione. In particolare, l'interazione con l'ambiente può modificare le modalità con cui si esprime l'ampia variabilità genetica alla base della patologia.⁷

La conseguenza di queste intricate relazioni tra geni ed ambiente rende ragione della notevole variabilità della prevalenza e delle caratteristiche individuali di questa malattia, soprattutto in termini di differente fenotipo, maggiore o minore severità, storia naturale di malattia e risposta alla terapia.

Esistono diversi fattori di rischio per la comparsa di asma bronchiale e possono essere distinti in due categorie: individuali, che predispongono il soggetto che li possiede allo sviluppo della patologia, ed ambientali, che influenzano la possibilità che essa si manifesti nelle persone predisposte.

Alcuni dei fattori predisponenti la patologia sono anche definiti fattori scatenanti, ovvero elementi che peggiorano i sintomi in un soggetto con asma già diagnosticata, causando una crisi asmatica o una riacutizzazione, o sono responsabili della permanenza dei sintomi⁸.

Tra i fattori individuali vi sono:

Familiarità allergica (Fa) e fattori genetici

La familiarità è presente nel 64% dei soggetti allergici e nel 31% dei non allergici¹.

Fino ai 20 anni la prevalenza di multimorbilità allergica è più alta nei soggetti con Fa (maggiormente di sesso maschile) e potrebbe essere guidata da una sensibilizzazione IgE più frequente agli allergeni inalanti.

L'ambiente in utero sembra contribuire allo sviluppo di allergie nei neonati in quanto si è scoperto che aumentando i livelli di IgE nel siero materno aumentano anche i livelli di IgE nel sangue del cordone ombelicale. Molti polimorfismi genetici si sono dimostrati associati alla comparsa di asma; in particolare, alcune varianti alleliche di geni coinvolti nella differenziazione dei linfociti T, nella funzione di barriera o nella sensibilizzazione, sembrano aumentare la suscettibilità allo sviluppo di allergie. Il background genetico dell'individuo condiziona la risposta ai fattori fisici e ambientali che possono favorire la comparsa o l'esacerbazione dei segni e dei sintomi dell'asma. Pertanto, nella patogenesi della malattia intervengono sia fattori ereditari sia meccanismi epigenetici⁸.

Una novità risiede nella scoperta della cellula di *Hillock*, un tipo di cellula epiteliale che esprime marcatori associati alla differenziazione squamosa, all'adesione cellulare e all'immunomodulazione: si è visto come i geni dell'asma ad esordio infantile siano espressi più fortemente nelle cellule lungo la traiettoria di differenziazione da *Hillock* a squamoso¹. I pazienti con asma presentano un numero considerevolmente aumentato di cellule Hillock-like con fenotipo pro-infiammatorio, ma un numero ridotto di cellule ciliate: questo è stato evidenziato tramite l'analisi dell'espressione genica differenziale (DGE) su cellule epiteliali delle vie aeree (AEC) ottenute tramite spazzolamento; l'analisi del destino cellulare ha evidenziato come vi sia un continuo differenziamento delle AEC indicando perdita di cellule epiteliali mature e una continua riparazione epiteliale in vivo. Questo porta a concludere come le cellule di Hillock svolgano un ruolo fondamentale nel guidare l'infiammazione e il rimodellamento delle vie aeree nell'asma⁹.

Negli individui geneticamente suscettibili si assiste, nei primi anni di vita, a una risposta della parete delle vie aeree caratterizzata da rimodellamento, ma non da infiammazione (T2), che precede l'asma¹.

Pre-asma

Si definisce pre-asma uno stato in cui il soggetto presenta una lieve e intermittente condizione di infiammazione/ipersensibilità delle vie aeree inferiori che non è sufficiente a causare sintomi, ma che potrebbe essere in grado di progredire verso l'asma vera e propria. Sono state proposte tre fasi di sviluppo dell'asma: 1) Suscettibilità genetica-

individuale; 2) Pre-asma (disfunzione epiteliale, differenziazione da Hillock a squamoso ma in assenza di infiammazione di tipo T2); 3) Asma persistente (fase caratterizzata principalmente da infiammazione T2-high, ma anche da T2-low). Questa ipotesi di sviluppo permette di avere una possibilità di prevenzione mediante l'identificazione dei soggetti più a rischio di asma, in modo da intercettarli nello stato di pre-asma, nonché di intervento terapeutico precoce (Immunoterapia specifica, Dupilumab in eczema atopico)¹⁰.

Atopia

L'atopia viene definita come un'esagerata risposta immune verso costituenti ambientali innocui. Sebbene non esistano criteri certi per definire l'atopia, elevati livelli sierici di IgE e la positività agli Skin Prick Test risultano associati a un maggior rischio di asma, senza però costituire una regola assoluta. Una simile associazione è stata osservata anche nella dermatite atopica. Più studiata è l'associazione tra rinosinopatia allergica, il numero degli eosinofili ematici e rischio di sviluppo di asma. Si può dire che l'atopia sia determinante nell'asma ad insorgenza precoce (prima dei 12 anni di età) e in alcune tipologie di asma professionale¹¹.

Genere

L'asma è più frequente nei maschi in età pediatrica e nelle femmine in età adulta¹².

Obesità

I soggetti obesi presentano maggiore incidenza e gravità dell'asma e mostrano un maggior declino del VEMS (Volume Espiratorio Massimo nel primo secondo), se asmatici. Inoltre, vi è correlazione tra indice di adiposità viscerale (VAI) ed asma negli adulti, nonché tra disposizione distrettuale del tessuto adiposo (braccia, gambe, tronco, giro vita) ed asma. Infine, si assiste a un miglioramento dei sintomi con adeguati stili di vita¹³. I meccanismi con cui l'obesità può indurre asma sono relativi a fattori genetici, alterazioni della meccanica respiratoria e della pressione diastolica, comorbidità, come il reflusso gastroesofageo, effetto pro-infiammatorio di alcune citochine (leptina, adiponectina), associazione con biomarcatori ematici (conta leucocitaria, apolipoproteina A, cistatina C, urati, albuminemia), stile di vita (sedentarietà) ed alimentazione¹³.

Microbiota

I microrganismi intestinali e i loro prodotti metabolici partecipano direttamente o indirettamente all'insorgenza e allo sviluppo dell'asma. Esiste un'asse intestino-polmone e sulla base di questo il microbiota intestinale può influenzare insorgenza e progressione dell'asma allergico attraverso la modulazione dell'immunità adattativa e di conseguenza regolando la risposta immunitaria all'asma e l'infiammazione delle vie aeree. Il microbiota intestinale può svolgere un ruolo cruciale nella differenziazione e omeostasi delle cellule Th17/Treg, implicate nella patogenesi dell'asma, sia attraverso la modulazione diretta di recettori o citochine, sia attraverso percorsi indiretti del metabolismo energetico. Uno squilibrio della composizione microbica o disbiosi è associato all'insorgenza durante l'infanzia e l'adolescenza di respiro sibilante e asma atopico. Inoltre, una maggiore diversità alfa di batteri come *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* e *Roseburia* sembra dimostrare un ruolo protettivo per lo sviluppo di asma bronchiale¹⁴.

Invece fra i fattori ambientali è possibile citare:

Allergeni¹⁵

- **Domestici:** acari della polvere e epitelio di animale (cane e gatto, conigli, criceti...), animali "infestanti" come scarafaggi, topi, ratti, miceti (in particolare alternaria ed aspergillo).
- **Degli ambienti esterni:** piante erbacee (graminacee, urticacee, composite, ecc.) ed arboree (oleacee, betulacee, ecc.), altri animali (cavallo, bovini ecc.), miceti (alternaria e aspergillo, quest'ultimo è in grado di produrre materiali allergenici e tossici sulle vie aeree, nonché di riprodursi direttamente nei seni paranasali e negli spazi polmonari alimentando fenomeni infettivi, reattivi ed di ridotta funzione).
- **Dell'ambiente Lavorativo:** l'asma correlato ad allergeni e ambiente lavorativo (WRA) comprende sia l'Asma Professionale (OA, a sua volta suddiviso in asma professionale da agenti sensibilizzanti e asma professionale da irritanti) sia l'asma esacerbato/aggravato dall'ambiente lavorativo (WEA). L'esposizione lavorativa è causa del 17% di tutte le cause di asma dell'adulto. In soggetti geneticamente suscettibili, l'esposizione a detersivi comporta una disfunzione della barriera

epiteliale, disbiosi microbica e rilascio di allarmine, promuovendo la sensibilizzazione allergica e il rimodellamento epiteliale.

- **Inquinamento¹:**

Indoor: radon (da materiale di costruzione), amianto (materiale coibente), VOCs, piombo (incendi), CO, CO₂, NO₂, NO, VOCs (arredi), PM (fumi di cottura), detersivi (VOCs).

Atmosferico: inquinanti gassosi (CO, SO₂, originati da combustione industriale, traffico veicolare, in particolare del diesel), eruzioni vulcaniche, NO₂ (da acque termali, VOCs, reazioni fotochimiche), Particolato (traffico veicolare, PM₁₀, PM_{2,5}), Nanoparticelle.

L'induzione dell'asma da parte di inquinanti avviene tramite meccanismi diretti di interazione con l'epitelio dell'albero bronchiale, generazione di stress ossidativo, danno alle ciglia con compromissione della scala muco-ciliare, interazione con cellule dendritiche o cellule linfoidi innate di tipo 2 (ILC-2) e linfociti T-helper 2 (Th2) o 17 (Th17); inoltre vi sono meccanismi indiretti come cambiamenti epigenetici, modifiche nel microbioma respiratorio o interazioni di inquinanti con altri agenti antigenici¹.

Variazioni climatiche

Possono potenziare l'effetto di allergeni e inquinanti atmosferici, sia nell'induzione dell'asma sia nello scatenamento di crisi asmatiche. Esempi di variazioni climatiche sono: aumento dei gas-serra che portano a temperature più elevate, prolungamento delle stagioni dei pollini, aumento delle tempeste e dell'umidità che porta all'esposizione ad acari della polvere e muffe, cambiamenti nell'intervallo di temperatura diurna¹⁶.

Fumo attivo e passivo (da sigarette, sigarette elettroniche, sigari e droghe)

L'abitudine tabagica è presente in circa il 20% dei pazienti asmatici ed aumenta il rischio di asma nei soggetti con rinite. Gli "*α7 nicotinic acetylcholine receptors (α7nAChRs)*" giocano un ruolo chiave nell'indurre danno sulle vie aeree, la nicotina induce danno rompendo i mitocondri della muscolatura liscia bronchiale. Questi recettori sono espressi su molteplici tipologie di cellule del sistema immunitario, inclusi eosinofili, macrofagi e cellule epiteliali delle vie aeree. In particolare il fumo attiva questi recettori, si aprono i canali ionici che aumentano il calcio intracellulare, portando a contrazione diretta della

muscolatura liscia delle vie aeree. Questo porta a definire come tali recettori possano rappresentare un potenziale target terapeutico, in quanto il loro blocco potrebbe alleviare l'iperreattività bronchiale¹⁷.

La dose cumulativa di fumo (Brinkman index -BI) correla con la caduta del picco di flusso espiratorio (PEF). L'uso di e-sigarette è in grado di peggiorare i sintomi dell'asma e non determina alcuna riduzione dell'abitudine al fumo di normali sigarette^{8,18}.

Alimentazione e Farmaci

È dimostrata l'associazione tra alcune tipologie di alimentazione comuni nella società occidentale e maggior frequenza di atopia e/o asma, o il deficit di micronutrienti minerali e vitamina D¹⁹. Anche l'utilizzo di antibiotici e antipiretici in età infantile ha dimostrato di avere un'influenza sulla maggiore suscettibilità di sviluppo all'asma bronchiale. Anche la TOS (terapia ormonale sostitutiva) quando assunta in età perimenopausale aumenta il rischio di asma.

Infezioni virali

Nella primissima infanzia, le infezioni virali (soprattutto da *rhinovirus*, RV, e *virus respiratorio sinciziale*, RSV) sono state associate ad un aumentato rischio di sviluppo di asma e respiro sibilante. Oltre a RV e VRS, i virus frequentemente interessati sono quelli dell'influenza A e B, enterovirus, adenovirus, coronavirus. Esistono interazioni complesse tra virus e risposta immune dell'ospite: i RV attivano i recettori di riconoscimento dei pattern (PRR) sulle cellule epiteliali respiratorie, attivano una risposta immunitaria innata caratterizzata dal rilascio di citochine pro-infiammatorie, chemochine e IFN di tipo I. Le citochine chiave sono IL6, IL8 e TNF α , le quali determinano l'infiammazione delle vie aeree e l'iperreattività bronchiale. Inoltre, la colonizzazione neonatale dell'ipofaringe da *S. Pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. Catarrhalis*, (o la combinazione dei tre) è associata ad un aumentato rischio di precoce sviluppo di asma o sibili respiratori ricorrenti. La vaccinazione con *Mycobacterium Bovis* (BCG) contro la tubercolosi nei primi anni di vita ha un ruolo protettivo, riducendo del 23% il rischio di sviluppare asma²⁰.

OSA (apnee costruttive nel sonno)

Condividono caratteristiche quali ostruzione delle vie aeree, scarsa qualità del sonno e bassa qualità della vita. Sono spesso presenti come comorbidità: percentuali variabili fra 36,39-62,60% di pazienti asmatici presentano anche disturbi ostruttivi del sonno. Gli asmatici, inoltre, presentano un rischio 2,64 volte più alto di presentare OSA rispetto ai non asmatici e con un rischio fino a 9 volte nei casi di asma difficile da controllare. Il principale impatto dell'OSA sull'asma è l'attivazione dell'infiammazione sistemica, il rilascio di citochine e mediatori proinfiammatori (TNF- α , IL-6, VEGF, pentano, 8-isoprostano, PCR, leptina, MMP-9). La presenza di OSA, proprio per i meccanismi di amplificazione dell'infiammazione, rende i pazienti asmatici più suscettibili a crisi gravi²¹.

Disturbi dell'umore e di ansia

La prevalenza di disturbi d'ansia e depressivi è più elevata tra i pazienti asmatici e in particolare in quelli gravemente colpiti rispetto alla popolazione generale. È stato dimostrato che la presenza di sintomi psichiatrici e psicologici è associata a forme più gravi di asma, con una maggiore compromissione funzionale e un peggiore controllo della malattia. Da una prospettiva neurobiologica, è stato ipotizzato che un'infiammazione sistemica possa collegare queste condizioni, poiché le citochine regolano una varietà di processi nel sistema nervoso centrale (SNC) inclusa la neurotrasmissione²².

1.3 PATOGENESI

L'asma è una malattia infiammatoria cronica delle vie aeree caratterizzata da:

- Episodi ricorrenti di dispnea, tosse, respiro sibilante e senso di costrizione toracica;
- Ostruzione bronchiale (solitamente reversibile spontaneamente o dopo trattamento farmacologico) ed iperreattività bronchiale;
- Infiltrazione di cellule infiammatorie, rilascio di mediatori e rimodellamento strutturale delle vie aeree.

Infiammazione delle vie aeree

L'infiammazione delle vie aeree è riconosciuta come un fattore patogenetico centrale nell'asma, caratterizzata dall'infiltrazione da parte di eosinofili, linfociti, mastociti e neutrofilo nella sottomucosa delle vie aeree. Questa infiammazione accentua l'ostruzione bronchiale promuovendo l'edema e l'ipertrofia mucosale, la secrezione di muco e l'iperreattività delle vie aeree, predisponendo alle riacutizzazioni.²³

Il danno epiteliale rappresenta il *primus movens* patogenetico dell'asma. Le cellule epiteliali, una volta esposte a diverse *noxae patogene* (allergeni, agenti microbici, fumo di sigarette, particolato atmosferico), rilasciano mediatori noti come allarmine (TSLP, IL-33 e IL-25). Queste molecole attivano le cellule dendritiche, i linfociti Th naïve (Th0) e le cellule linfoidi innate di tipo 2 (ILC2), avviando una cascata infiammatoria di tipo 2 (Asma T2 o T2 high)^{2,24}.

TSLP stimola le cellule dendritiche, i mastociti, gli eosinofili e i macrofagi, favorendo il rilascio di citochine di tipo 2, mediatori pro-fibrotici, come TGF- β , e pro-angiogenici, come VEGF-A. Inoltre, TSLP contribuisce alla transizione epitelio-mesenchimale (EMT), amplificando la fibrosi subepiteliale²⁵.

I biomarcatori dell'infiammazione di tipo 2, utilizzati nella pratica clinica, includono gli eosinofili nel sangue e nelle vie aeree (valutati attraverso analisi dell'espettorato e/o espettorato indotto), guidati principalmente da IL-5, e la frazione di ossido nitrico esalato (FeNO), indotta da IL-13². Nell'asma allergico, le IgE occupano un ruolo centrale: le risposte infiammatorie sono mediate da IgE allergene-specifiche legate ai mastociti, che vengono attivati dalla riesposizione all'allergene e determinano il rilascio di leucotrieni e altri mediatori che amplificano la risposta infiammatoria.

L'IL-33 induce i fibroblasti polmonari alla sintesi di collagene e fibronectina-1, contribuendo ai processi di rimodellamento delle vie aeree e alla comparsa di fibrosi subepiteliale e peribronchiale. Le alarmins attivano inoltre i linfociti Th17, favorendo l'infiammazione neutrofila, e possono interagire direttamente con le cellule strutturali dell'apparato respiratorio, partecipando alla patogenesi delle forme di asma non T2.²⁶

Ostruzione bronchiale

L'ostruzione bronchiale variabile è una caratteristica cardinale dell'asma, dovuta a broncocostrizione, infiammazione mucosale e secrezioni endoluminali, che determinano un aumento delle resistenze al flusso aereo e del lavoro respiratorio². Questa ostruzione

varia nel tempo (minuti e giorni) e può essere completamente reversibile con broncodilatatori, sebbene nelle forme più gravi o di lunga durata possa diventare fissa o solo parzialmente reversibile².

Nell'asma, la muscolatura liscia delle vie aeree è ipertrofica e iperplastica, caratteristiche che determinano ipercontrattilità con tendenza al broncospasmo². L'iperreattività bronchiale deriva dall'aumentata sensibilità ai mediatori broncocostrittori rilasciati principalmente da mastociti ed eosinofili. I mastociti rilasciano mediatori broncocostrittori come istamina e leucotrieni, mentre il tono parasimpatico colinergico aumentato (tipico dell'asma notturno) causa contrazione della muscolatura liscia, aumentata produzione di muco e maggiore ostruzione².

L'infiammazione, come detto precedentemente, accentua l'ostruzione promuovendo l'infiltrazione e l'edema mucosale, la secrezione di muco, guidata dalle citochine epiteliali (allarmine) che attivano cellule Th2 e ILC2, e l'iperreattività delle vie aeree.

L'ostruzione bronchiale si può riscontrare a livello delle grandi vie aeree, con conseguente limitazione al flusso espiratorio, riduzione del FEV1 e del rapporto FEV1/VC, nonché a livello delle piccole vie aeree, causando alterazione della distribuzione della ventilazione intrapolmonare, degli indici di disomogeneità della ventilazione e delle resistenze oscillometriche (indici di interessamento delle piccole vie aeree) con successive alterazioni dello scambio gassoso (ipossiemia normo- o ipocapnica)²³.

Rimodellamento strutturale

Il rimodellamento strutturale contribuisce all'ostruzione del flusso aereo attraverso una combinazione di diversi fattori: flogosi cronica con infiltrazione della mucosa bronchiale di cellule immunitarie (linfociti, cellule linfoidi innate, eosinofili, macrofagi, mastociti, neutrofilo), danno epiteliale, con desquamazione (*shedding*) delle cellule epiteliali bronchiali ed iperplasia/metaplasia delle cellule caliciformi mucipare, accumulo di secrezioni (*mucus plugs*) nel lume bronchiale, fibrosi subepiteliale, con ispessimento della membrana basale reticolare (RBM), ipertrofia ed iperplasia della muscolatura liscia delle vie aeree (ASM) e alterazioni dei vasi della parete bronchiale, con angiogenesi ed ectasia dei vasi²⁷. Il rimodellamento può essere parzialmente reversibile con trattamento antinfiammatorio, ma spesso richiede terapia a lungo termine. Nelle forme gravi, questi

cambiamenti strutturali possono sovrapporsi ai fenotipi infiammatori, contribuendo all'ostruzione persistente e alla riduzione della compliance delle vie aeree²⁷.

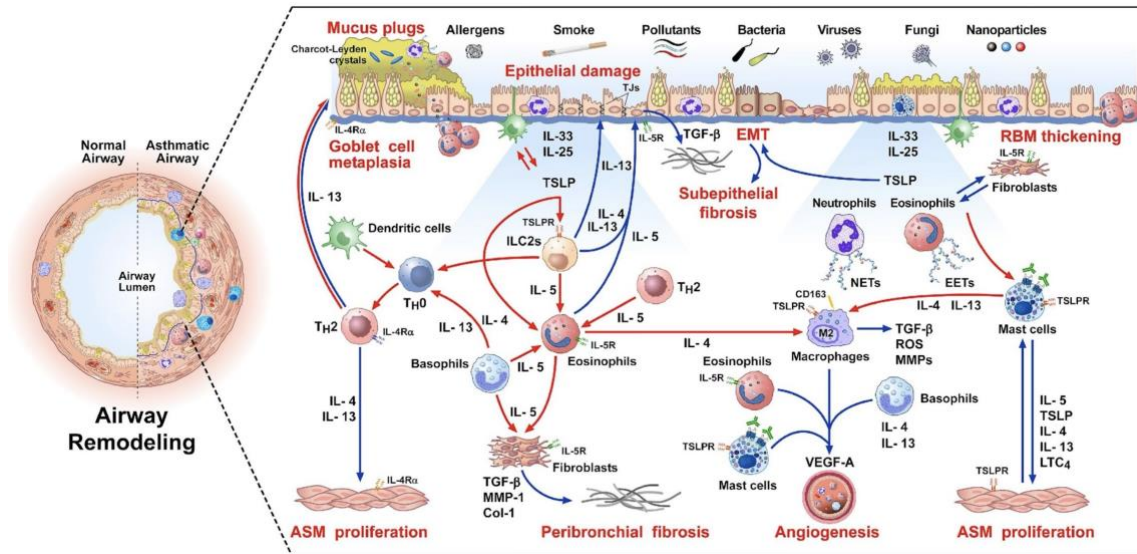


Figura 1: Flogosi e rimodellamento delle vie aeree nell'asma bronchiale. ASM, airway smooth muscle; Col-1, collagen-1; EMT, epithelial-mesenchymal transition; IL, interleukin; IL-5R, interleukin-5 receptor; ILC2, innate lymphoid cell type 2; LTC4, leukotriene C4; MMP, matrix metalloproteinase; RBM, reticular basement thickening.

Iperattività bronchiale

Consiste in un'esaltata risposta broncostrittiva delle vie aeree a stimoli non specifici (agenti broncostrittori come metacolina) e specifici (allergeni, sensibilizzanti professionali, esercizio fisico). Può essere dimostrato nelle fasi intercritiche dell'asma e con FEV1 nella norma, presentando variazioni nel tempo, che si verificano sia spontaneamente sia per effetto della terapia. È indagabile con test diretti (metacolina, più sensibile ma meno specifico) o indiretti (mannitolo, aria fredda, nebbia, soluzioni ipertoniche, adenosina, più specifico ma meno sensibile)¹.

I fattori che contribuiscono alla condizione di iperreattività bronchiale possono essere distinti in persistenti e variabili, i quali sono correlati e interdipendenti. I fattori persistenti sono principalmente rappresentati da alterazioni strutturali delle vie aeree, come ispessimento della membrana subepiteliale, ipertrofia della muscolatura liscia, deposizione di matrice extracellulare e alterazioni vascolari. I fattori variabili sono sostanzialmente eventi infiammatori associati all'esposizione a fattori ambientali quali allergeni, agenti occupazionali e infezioni respiratorie¹.

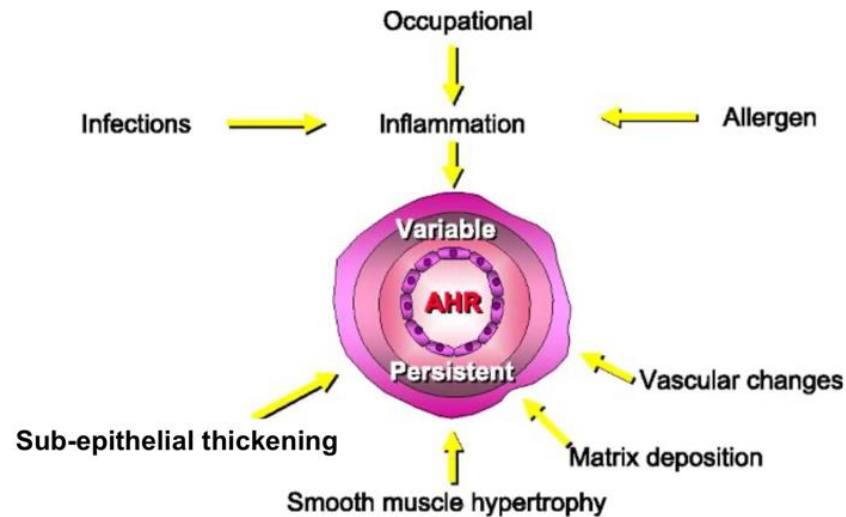


Figura 2: Schema di patogenesi dell'ostruzione bronchiale. Fattori responsabili delle componenti variabili e persistenti dell'iperreattività bronchiale.

1.4 FENOTIPI CLINICI DELL'ASMA E ENDOTIPI

Il fenotipo e l'endotipo sono due concetti fondamentali utilizzati per descrivere l'asma bronchiale: il fenotipo descrive l'insieme delle caratteristiche osservabili esternamente (sintomi, gravità dell'attacco, risposta ai farmaci), mentre l'endotipo identifica i meccanismi molecolari e cellulari che provocano la malattia.

L'asma è una malattia eterogenea caratterizzata da diversi fenotipi clinici riconoscibili in base a caratteristiche demografiche, cliniche e fisiopatologiche. La classificazione fenotipica è particolarmente utile nell'asma grave, dove sono disponibili trattamenti fenotipo-guidati²⁸. I fenotipi rappresentano una diversa rappresentazione clinica e sulla base di questo si possono identificare diversi sottotipi di malattia, come mostrato nell'immagine sottostante²⁹.

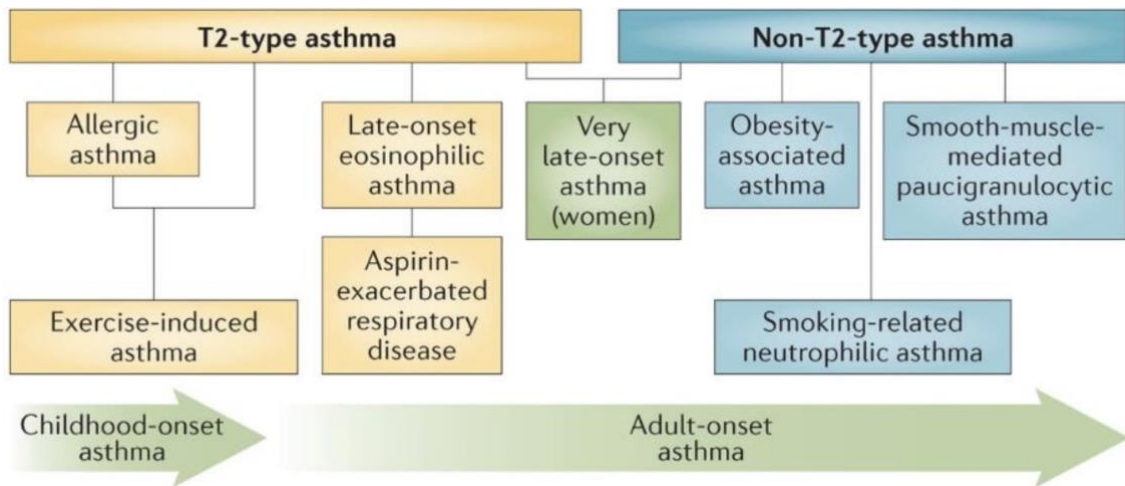


Figura 3: Fenotipi ed endotipi asmatici

Fenotipi differenti possono condividere gli stessi meccanismi patogenetici e, per questo motivo, essere raggruppati all'interno di un medesimo endotipo. Nell'asma, gli endotipi principali sono rappresentati dalle forme T2 e non T2, definite anche rispettivamente T2-high e T2-low. Il termine endotipo si riferisce pertanto al meccanismo biologico e patogenetico sottostante alla malattia. Tale classificazione consente di identificare diversi sottogruppi di pazienti sulla base dei processi infiammatori che determinano l'insorgenza, la progressione e il mantenimento della patologia.³⁰

Si possono quindi identificare quattro categorie di endotipi asmatici sulla base della citologia effettuata su espettorato indotto o su BAL:

- Asma allergico eosinofilo (gli eosinofili nel BAL superano il 3-5% delle cellule totali, rispetto a <1% nei sani): in cui gli allergeni vengono fagocitati e processati dalle cellule dendritiche sulla cui superficie vengono esposti i peptidi antigenici successivamente presentati ai linfociti T helper naïve (Th0). Si ottiene così la conseguente differenziazione e attivazione delle cellule Th2 allergene-specifiche con produzione di IL-4 e IL-13, che promuovono la sintesi di immunoglobuline E (IgE) da parte dei linfociti B. Le IgE interagiscono con i recettori localizzati su numerose cellule, soprattutto mastociti, che, una volta esposti nuovamente allo stesso allergene, rilasciano mediatori chimici preformati, neoformati e citochine. Le cellule Th2 rilasciano anche IL-5 che induce la maturazione, attivazione e sopravvivenza degli eosinofili, che a loro volta rilasciano numerosi mediatori, tra cui TGF- β , proteine cationiche e specie reattive dell'ossigeno (ROS),

contribuendo al danno tissutale, alla fibrosi e al peggioramento dell'infiammazione cronica. IL-4, inoltre, determina l'espressione della molecola di adesione VCAM1 da parte delle cellule endoteliali e contribuisce in questo modo al reclutamento degli eosinofili; inoltre, promuove la proliferazione dell'ASM (airway smooth muscle), aumentando la sintesi di actina e collagene e potenziando il rilascio di TGF- β dall'epitelio bronchiale. IL-13, invece, è implicata nella patogenesi del rimodellamento strutturale delle vie aeree, favorendo la metaplasia delle cellule caliciformi e stimolando la produzione di muco, portando in questo modo alla formazione di mucus plugs. Inoltre, potenzia il rilascio di TGF- β e di metalloproteinasi della matrice (MMP), favorendo la fibrosi subepiteliale¹.

- Asma eosinofilo non-allergico: in questa forma di asma le ILC2 producono preferenzialmente IL-5, responsabile dell'infiammazione eosinofila, e IL-13, che contribuisce a diversi aspetti del rimodellamento strutturale delle vie aeree e induce l'espressione dell'ossido nitrico sintasi da parte dell'epitelio delle vie aeree, promuovendo la produzione di ossido nitrico¹.
- Asma neutrofilico: in cui le allarmine, prodotte dall'epitelio, attivano indirettamente i linfociti Th17, i quali rilasciano citochine (principalmente IL-17A) che attivano l'epitelio e inducono di conseguenza il rilascio di chemochine come CXCL-8 che a sua volta inducono il reclutamento dei neutrofili¹.
- Asma paucigranulocitico: in questa forma di asma, mediatori, quali la TSLP, interagiscono direttamente con cellule strutturali quali fibroblasti e cellule muscolari lisce inducendo fenomeni di rimodellamento strutturale¹.

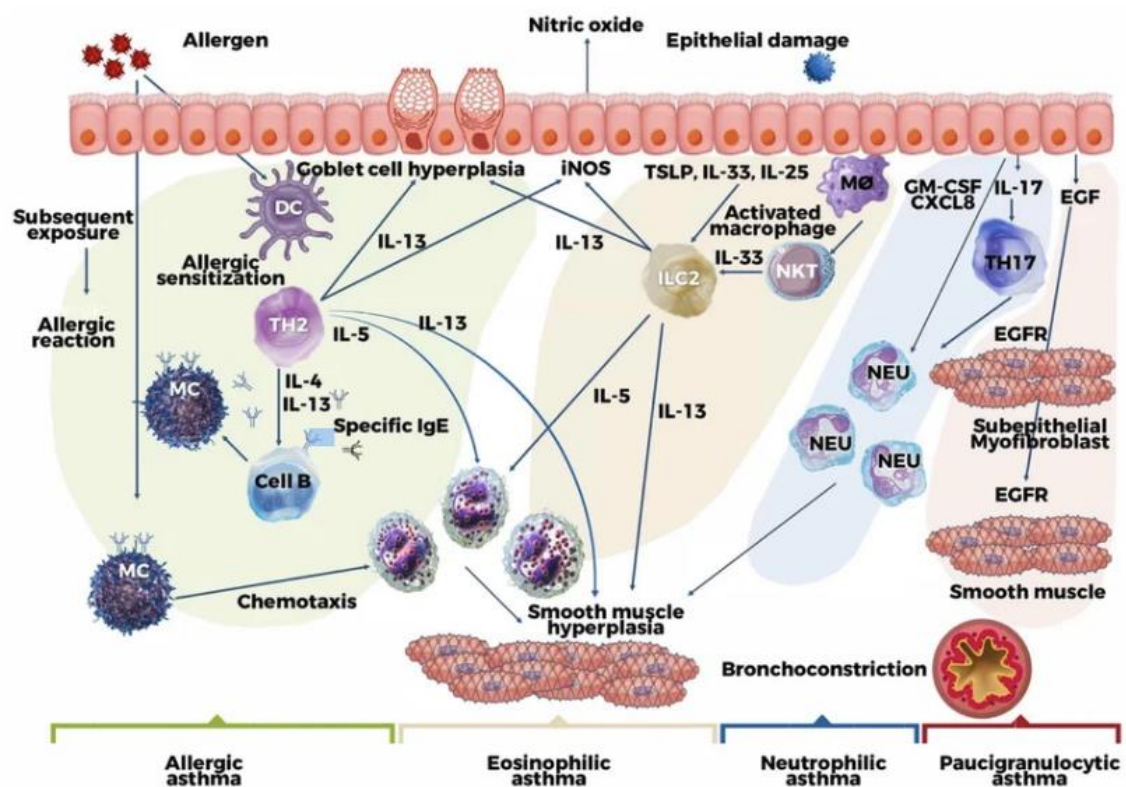


Figura 4: Meccanismi molecolari negli endotipi asmatici

1.5 DIAGNOSI

La diagnosi di asma si basa sulla storia di sintomi respiratori tipici associata alla dimostrazione di ostruzione bronchiale variabile acutamente e/o nel tempo. Sarebbe auspicabile che la diagnosi venisse fatta prima di iniziare la terapia con corticosteroidi inalatori poiché questo potrebbe rendere più difficile la dimostrazione dell'ostruzione bronchiale variabile¹.

La registrazione dei sintomi è fondamentale anche per valutare il controllo clinico della malattia: esistono infatti questionari quali il test di controllo dell'asma (ACT, asthma control test), il più semplice e con buona correlazione con il giudizio clinico e il questionario di controllo dell'asma (ACQ, Asthma control Questionnaire).

Quindi, dopo aver condotto un'accurata anamnesi sulle caratteristiche cliniche del paziente, segue la valutazione della funzionalità respiratoria con prove di funzionalità respiratoria (PFR), che rappresentano il gold standard per l'identificazione della broncoostruzione e quindi per effettuare la diagnosi di asma³¹.

Spirometria

La spirometria viene eseguita utilizzando uno strumento chiamato spirometro, in grado di rilevare il volume d'aria che viene inspirato e quello che viene espirato e l'intensità del flusso di respiro. È una procedura semplice e non invasiva. Durante l'esame, il personale sanitario chiederà al paziente di effettuare una serie di manovre respiratorie attraverso un boccaglio mantenuto tra i denti e le labbra e collegato allo spirometro con il naso tappato. Esistono diverse tipologie di spirometria e di conseguenza diverse tipologie di manovre effettuabili³².

Nella spirometria semplice viene chiesto al paziente di effettuare dei respiri tranquilli, dopodiché deve inspirare forzatamente fino al raggiungimento della capacità polmonare totale (TLC). Dopo chiara indicazione del personale sanitario, il paziente effettuerà un'espirazione forzata e lo spirometro misurerà la capacità vitale forzata (FVC), rilevabile fino al raggiungimento del volume residuo (VR, non mobilizzabile) del paziente. Verrà inoltre misurato il FEV1 (chiamato anche VEMS), ovvero il volume espirato nel primo secondo di espirazione forzata³².

Esistono dei criteri di validità della prova che permettono di considerare accettabile il test: inspirazione massimale, inizio esplosivo dell'espirazione e svuotamento completo dei polmoni, con una durata di espirazione di 6 secondi per gli adulti e 3 secondi per i bambini.

Il rapporto FEV1/FVC è definito indice di Tiffenau ed è necessario per effettuare la diagnosi di ostruzione e quindi di identificare un soggetto asmatico: si assisterà a una riduzione del FEV1 e di tale rapporto; nei casi più gravi è possibile riscontrare un aumento del VR e una riduzione della FVC (in genere in misura minore della FEV1). In particolare, per effettuare una diagnosi di asma, bisogna osservare una riduzione dell'indice di Tiffenau al di sotto dei limiti inferiori di normalità (<LLN), e questa è stata una novità all'interno delle nuove linee guida ATS del 2021 rispetto alle precedenti linee guida del 2005: in queste ultime si utilizzava il valore fisso di riduzione dell'indice di Tiffenau al di sotto di 0.7, ma questo presentava il rischio di una sottostima nei giovani adulti e di una sovrastima negli anziani di circa il 20%; quindi le linee guida ATS del 2021 hanno proposto di esprimere il grado di ostruzione come rapporto FEV1/FVC che deve risultare inferiore al quinto percentile del valore normale (LLN = 5th percentile e ULN = 95th percentile). Di conseguenza si utilizza per tutte le misure lo Z-score, che definisce la

gravità della compromissione polmonare, suddividendola in lieve se Z-score da -1.65 a -2.5, moderata se da -2.51 a -4.0, severa se <-4.1 .

Oltre alla dimostrazione dell'ostruzione bronchiale, la diagnosi di asma richiede la documentazione della sua reversibilità. Tale caratteristica viene valutata mediante il test di broncodilatazione, che consiste nella somministrazione di 400 µg di salbutamolo (SABA), generalmente erogati in quattro dosi successive da 100 µg ciascuna. Trascorsi circa 15 minuti dalla somministrazione, si esegue una nuova spirometria. Il test è considerato positivo in presenza di un incremento del FEV1 superiore al 10% del valore predetto associato ad un aumento di almeno 200 mL rispetto al valore basale. La dimostrazione della reversibilità dell'ostruzione bronchiale rappresenta un elemento fondamentale per la diagnosi di asma e per la diagnosi differenziale rispetto ad altre patologie ostruttive delle vie aeree, in particolare con la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO). La variabilità dell'ostruzione bronchiale si valuta con la misurazione del picco di flusso espiratorio (PEF). Esistono misuratori portatili che consentono di rilevare tale valore tramite misurazioni mattutine e serali. Una variabilità giornaliera diurna media pari al 10% o 20% misurata 2 volte al giorno per 2 settimane conferma la diagnosi di asma³².

In caso di spirometria basale nella norma, non è possibile escludere diagnosi di asma, dal momento che, come detto precedentemente, nelle fasi intercritiche di malattia, il paziente può essere completamente asintomatico e presentare dei valori spirometrici normali. In questo caso si deve eseguire il test di provocazione bronchiale al fine di rendere evidente l'iperreattività dei bronchi, ovvero una risposta eccessiva delle vie aeree a certi inalanti o stimoli fisici. Il test più diffuso è quello con la metacolina, analogo sintetico dell'acetilcolina che si lega ai recettori muscarinici M3, inducendo broncocostrizione. Il test si considera positivo se si rivela un calo della FEV1 superiore al 20% rispetto al valore basale dopo somministrazione di dose crescenti di metacolina^{1,32}.

Ossido Nitrico Esalato (FeNO)

La quantificazione del FeNO è correlata al grado di infiammazione bronchiale. È un biomarcatore dell'infiammazione di tipo 2 (eosinofila) delle vie aeree³³. Nell'asma, le cellule infiammatorie e l'epitelio presentano un aumento dell'iNOS, che dà luogo a un aumento del NO nell'aria espirata. Non si tratta di un test diagnostico, ma di un esame

che può supportare la diagnosi di asma, utile soprattutto ai fini di feno-endotipizzazione del paziente e al monitoraggio dell'aderenza alla terapia.

Il FeNO test è un test molto semplice: viene chiesto al paziente di inspirare profondamente e poi di espirare attraverso un boccaglio collegato a un misuratore per circa 10 secondi, in modo lento e costante.

I valori soglia raccomandati per adulti e adolescenti sono³⁴:

- < 25 ppb: inconsistente con infiammazione di tipo 2, suggerisce diagnosi diversa dall'asma (o asma non-eosinofila, o uso di corticosteroidi);
- 25-50 ppb: valori intermedi, difficili da interpretare, possono indicare parziale aderenza o controllo inadeguato della terapia;
- > 50 ppb: consistente con infiammazione di tipo 2 elevata, supporta la diagnosi di asma e predice risposta ai corticosteroidi.

Un'altra considerazione interessante da fare è che un FeNO elevato in un paziente in terapia con corticosteroidi inalatori dovrebbe far considerare scarsa aderenza terapeutica o la necessità di aumentare il dosaggio ed indica un aumentato rischio di andare incontro a riacutizzazione³⁵.

Fase dell'Iter	Parametro / Test Clinico	Criterio Diagnostico ATS 2021	Significato Clinico e Note
1. Identificazione dell'Ostruzione	Rapporto FEV1/FVC	Inferiore al limite inferiore della norma (LLN, calcolato tramite equazioni di riferimento GLI basate sul Z-score < -1,64).	Sostituisce il vecchio criterio fisso dello 0,70 (70%) per evitare sovra-diagnosi negli anziani e sotto-diagnosi nei giovani.
2. Valutazione della Gravità	Valore di FEV1 espresso in Z-score	Lieve: Z-score -1,65 a -2,5 Moderata: Z-score -2,51 to -4,0 Grave: Z-score < -4,1	La classificazione della gravità non si basa più sulla percentuale del teorico FEV1% ma esclusivamente sui valori di deviazione standard (Z-score).
3. Test di Reversibilità (BDR)	Risposta al Broncodilatatore (FEV1 o FVC)	Incremento > 10% rispetto al valore teorico del volume predetto.	Criterio più restrittivo rispetto al 2005 (che richiedeva il >12% e >200ml sul valore basale). Questo evita che variazioni minime in pazienti con basali molto bassi risultino falsamente positive.
4. Categoria Non Specifica	Volumi Polmonari e FEV1/FVC	Rapporto FEV1/FVC normale, ma FEV1 e FVC ridotti (entrambi sotto il LLN) con Volume Residuo/TLC nella norma.	Nuova categoria diagnostica formale introdotta nel 2021 per identificare pattern prima erroneamente classificati o ambigui.
5. Monitoraggio dell'Infiammazione	Frazionale dell'Ossido Nitrico Esalato (FeNO)	< 25 ppb: Infiammazione eosinofila improbabile. > 50 ppb: Infiammazione eosinofila altamente probabile.	Linea guida ATS 2021 specifica per l'asma: utile per guidare la terapia corticosteroidica a lungo termine contro il rimodellamento delle vie aeree.

Figura 5: Iter Diagnostico e Interpretativo (Linee Guida ATS/ERS 2021).

Esami ematochimici e imaging

L'emogasanalisi arteriosa rappresenta un ottimo strumento per la definizione dello stato di ossigenazione, soprattutto durante una crisi asmatica. In corso di crisi sarà presente ipossiemia (PaO₂ < 60 mmHg) ed alcalosi respiratoria da iperventilazione (PaCO₂ < 35 mmHg). L'esaurimento della muscolatura respiratoria o un'ostruzione più grave potrebbero dare origine a normocapnia o ipercapnia e in quest'ultimo caso spesso si

osserva acidosi mista, da una parte acidosi respiratoria ipercapnica e dall'altra metabolica da iperlattatemia conseguente all'esaurimento muscolare.

I test di atopia come gli skin prick test (SPT) o test di determinazione delle IgE totali sieriche (PRIST) servono ad identificare l'eventuale agente scatenante e l'allergene a cui sono sensibilizzati, ma non hanno alcuna utilità ai fini della diagnosi di asma bronchiale, ma supportano la natura allergica della malattia.

La radiografia del torace è poco utile nel periodo intercrisi risultando in genere nella norma. Nella fase acuta mostra dati di iperinsufflazione e potrebbe essere utile per escludere processi concomitanti, altre cause di dispnea, o possibili complicanze (pneumotorace o pneumomediastino)¹.

1.6 TRATTAMENTO

Prima di intraprendere un trattamento per asma, è importante confermare la diagnosi e definire la gravità dei sintomi poiché da questo deriva un diverso approccio dal punto di vista terapeutico.

La terapia dell'asma consiste in un approccio dinamico caratterizzato da un ciclo continuo di valutazione, aggiustamento e revisione: come già detto, bisogna confermare la diagnosi se necessario, definire il controllo dei sintomi e i fattori di rischio modificabili, accertarsi di comorbidità presenti, della tecnica inalatoria utilizzata dal paziente e dell'aderenza, nonché cercare di ascoltare le preferenze del paziente. In seguito è necessario controllare i fattori di rischio modificabili e trattare le comorbidità, attuare strategie non farmacologiche per passare poi ai farmaci per il trattamento dell'asma, senza dimenticare l'educazione e la trasmissione delle competenze al paziente. Bisogna rivedere sintomi, riacutizzazioni, effetti collaterali, funzionalità polmonare, comorbidità, soddisfazione del paziente. Tutto questo è volto a definire una gestione il più personalizzata possibile dell'asma del paziente¹.

Gli obiettivi del trattamento consistono nella riduzione o nella risoluzione della sintomatologia, al fine di minimizzarne l'impatto sulla qualità di vita del paziente; nel mantenimento di una funzionalità polmonare normale o quanto più possibile prossima alla normalità; nella prevenzione delle riacutizzazioni o, qualora queste si verificano, nella riduzione della loro durata e gravità; nonché nella minimizzazione degli effetti collaterali associati alla terapia farmacologica.

I farmaci inalatori in uso in pratica clinica possono essere suddivisi in controller (agiscono a questo livello poiché riducono l'infiammazione sottostante costituendo il mantenimento in cronico della terapia asmatica) e reliever (agiscono in caso di riacutizzazione offrendo un supporto sintomatico di salvataggio)¹.

La crisi asmatica consiste in un episodio acuto o subacuto caratterizzato da un aumento di uno o più sintomi tipici (dispnea, tosse, sibili, oppressione toracica) accompagnati da una riduzione del flusso espiratorio, valutabile con PEF o FEV1. La gravità può essere classificata in lieve, moderata o grave sulla base di dati clinici, Emogasanalisi arteriosa o valutazione del PEF: un quadro grave presenta dispnea a riposo, utilizzo dei muscoli accessori che presentano movimenti paradossi, all'auscultazione toracica scomparsa di sibili e silenzio auscultatorio, frequenza respiratoria >30/min e cardiaca > 120 bpm, PEF < 60% del teorico e < 150L/min in valore assoluto rispetto al teorico, PaCO₂ > 45 mmHg e PaO₂ < 60 mmHg, SatO₂ < 90%¹.

Il trattamento di prima scelta per una crisi asmatica consiste in un β₂-adrenergico ad azione breve durata d'azione per via inalatoria (SABA, short acting β₂-agonist) che va ad aggiungersi ai corticosteroidi sistemici se la crisi è moderata o grave. In quest'ultimo caso possono essere utili anche gli anticolinergici. Dopo 20-30 minuti si deve rivalutare il PEF ed eventualmente somministrare nuovamente un SABA. Nelle crisi asmatiche gravi non responsive a tali terapie, le linee guida supportano l'utilizzo di solfato di magnesio come terapia di salvataggio per il suo effetto broncodilatatore e antiinfiammatorio³⁶.

L'asma cronico può essere suddiviso in base alla gravità in intermittente, persistente lieve, persistente moderato e persistente grave: i dati utilizzati sono il numero di crisi, le crisi notturne, il FEV1 basale, la variabilità del PEF e altri dati, ad esempio, nell'asma considerabile persistente grave le crisi sono continue, le crisi notturne giornaliere, il FEV1 basale è < 60%, la variabilità del PEF è > 30% e attività fisica e sonno sono gravemente limitati²³.

Il livello di controllo della patologia bronchiale viene periodicamente rivalutato sulla base di specifici indicatori clinici e funzionali, quali la frequenza dei sintomi diurni e notturni (compresi i risvegli), la limitazione delle attività quotidiane, la necessità di farmaci al bisogno (*terapia di salvataggio*), i parametri spirometrici (o) e l'occorrenza di riacutizzazioni. In funzione di tali criteri, il quadro clinico del paziente viene classificato in tre distinte categorie gestionali:

- **Controllato:** rappresenta la condizione di stabilità clinica ottimale. In questa fase, l'obiettivo terapeutico consiste nel mantenimento dello schema posologico in atto, valutando nel tempo una progressiva riduzione dei dosaggi (*step-down*).
- **Parzialmente controllato:** denota il persistere di una sintomatologia residua. Tale stato impone il mantenimento della terapia di base o, qualora necessario, un incremento posologico (*step-up*), da titolare accuratamente in base al profilo di tollerabilità del paziente.
- **Scarsamente controllato:** individua una condizione di instabilità clinica che richiede un tempestivo potenziamento del regime terapeutico (pari a uno o due step prognostici) al fine di raggiungere il controllo di malattia.

La gestione farmacologica si configura pertanto come un approccio dinamico e flessibile, basato su strategie di *step-up* e *step-down*. Questo modello d'intervento mira a identificare la minima dose efficace di farmaco, bilanciando la massima efficacia terapeutica con la riduzione del rischio di effetti avversi a lungo termine.

Numerosi studi confermano come sia sconsigliato il solo utilizzo di SABA (es. salbutamolo) come farmaco al bisogno poiché questo riduce la compliance del paziente al trattamento cronico secondo il modello degli step a causa di un “falso senso di sicurezza”.

Le linee guida GINA 2025 propongono due percorsi terapeutici differenti per il trattamento dell'asma¹:

Percorso 1: da preferire secondo le linee guida, caratterizzato da farmaci di controllo e al bisogno. Il documento internazionale GINA individua tale percorso come preferenziale per la maggiore efficacia di questa strategia sulla prevenzione delle riacutizzazioni gravi e con sostanziale parità rispetto al percorso 2 sulla gestione dei sintomi quotidiani. L'uso di basse dosi di ICS-formoterolo (LABA, long acting β 2-agonist) come terapia di sollievo è la base di un regime più semplice e riduce il rischio di riacutizzazioni rispetto all'utilizzo del solo SABA. Il formoterolo, pur essendo un LABA, ha una notevole rapidità di azione e dell'insorgenza dell'effetto broncodilatatore. Nel primo percorso gli step sono così organizzati:

- Step 1 e 2: nel primo caso rientrano pazienti che presentano sintomi meno di due volte al mese, nel secondo caso invece due o più volte al mese, ma non giornalieri. Si tratta, dunque, di pazienti affetti da forme di asma lieve con sintomi occasionali

e basso rischio futuro di avere riacutizzazioni; il trattamento consiste in ICS-formoterolo a basse dosi al bisogno; quindi, non presenta una terapia di mantenimento basale. Come ICS nella pratica clinica si tende ad utilizzare il Budesonide o in alternativa il Beclometasone Dipropionato.

- Step 3: asma moderato in cui il paziente presenta sintomi per la maggior parte dei giorni o risvegli dovuti ad asma una o più volte a settimana, con presenza di rischio futuro per riacutizzazioni. Il trattamento consiste in basse dosi di ICS-formoterolo di mantenimento. La stessa terapia, dunque, può essere utilizzata come terapia al bisogno e si parlerà quindi di MART (Maintenance and Reliever Therapy) o SMART (Single Maintenance And Reliever Therapy).
- Step 4: asma moderato-grave con sintomi giornalieri, risvegli notturni dovuti ad asma che si verificano una o più volte a settimana e funzione polmonare che risulta ridotta; si attuerà una terapia di mantenimento con ICS a media dose – formoterolo.

Step 5: asma grave non controllata. Oltre alla somministrazione di alte dosi di ICS-formoterolo di mantenimento, è possibile associare un LAMA (Long-Acting Muscarinic Antagonists), sia in unica formulazione o in formulazioni separate da ICS-formoterolo- Risulta fondamentale eseguire una precisa fenotipizzazione del paziente per un'eventuale aggiunta di farmaco biologico, come un anti-IgE, anti-IL5/5R, anti-IL4R, anti-TSLP, per migliorare il controllo di malattia e ridurre il rischio di riacutizzazione.

Percorso 2: percorso alternativo caratterizzato sempre dall'utilizzo di farmaci di controllo e al bisogno. È importante valutare l'aderenza del paziente rispetto a un trattamento di controllo quotidiano prima di considerare l'aggiunta di un SABA. La terapia al bisogno consiste in SABA o ICS-SABA, mentre la terapia di mantenimento è sempre ICS-LABA.

- Step 1: consiste nel trattamento con ICS ogni qualvolta si ricorra a SABA, quindi una terapia unicamente al bisogno.
- Step 2: terapia di mantenimento con ICS a bassa dose;
- Step 3: terapia di mantenimento con ICS a bassa dose – formoterolo;
- Step 4: terapia di mantenimento con ICS a medio o alto dosaggio-LABA;
- Step 5: Corrispondente all'omonimo step nel percorso 1.

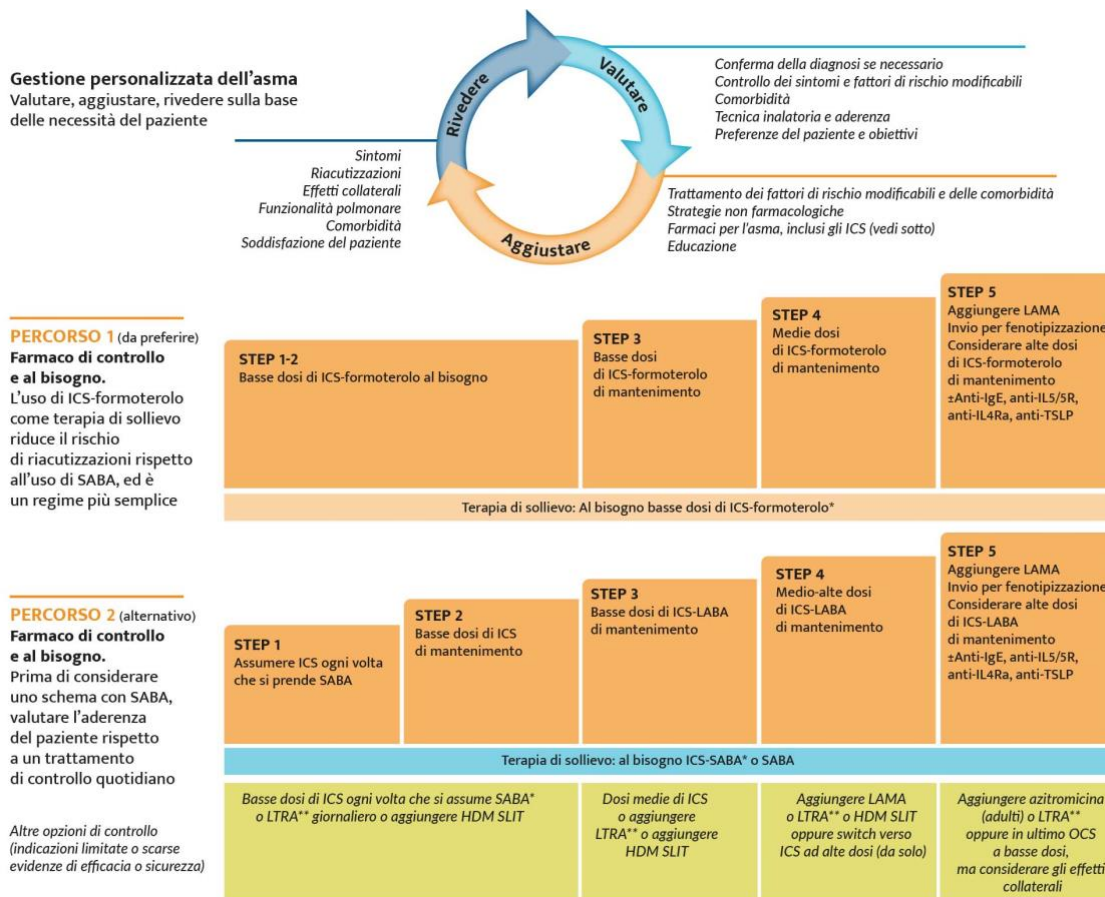


Figura 6: GINA 2025, approcci terapeutici per pazienti asmatici con età maggiore di 11 anni

1.7 ASMA SEVERO

L'asma severo è definito come asma che rimane non controllata nonostante l'aderenza a un trattamento ottimizzato con corticosteroidi inalatori (ICS) ad alte dosi in combinazione con uno o più farmaci di controllo (in genere beta-agonisti a lunga durata d'azione LABA, LAMA, anti-leucotrieni) e la gestione dei fattori contributivi, oppure che peggiora quando il trattamento ad alte dosi viene ridotto¹. Si tratta di una definizione retrospettiva che identifica l'asma relativamente refrattaria alla terapia inalatoria ad alte dosi.

La prevalenza dell'asma grave è stimata intorno al 5% di tutti i soggetti asmatici. Questi pazienti, tuttavia, consumano oltre il 50% delle risorse sanitarie dedicate all'asma.

L'asma grave ha un forte impatto sulla qualità di vita dei pazienti asmatici, specie nei giovani ed adolescenti, ed è responsabile di sintomi continui, gravi riacutizzazioni e frequenti ospedalizzazioni¹.

Molte condizioni possono spiegare il mancato controllo dell'asma nonostante la prescrizione di una terapia adeguata e dovrebbero essere accuratamente valutate e gestite prima di definire la presenza di asma grave:

- Scarsa aderenza e non corretto uso degli inalatori;
- Assenza di una diagnosi corretta di asma (sintomi simil-asmatici senza dimostrazione delle alterazioni funzionali dell'asma);
- Persistenza di fattori di rischio per riacutizzazioni (fumo, esposizione lavorativa, allergeni);
- Presenza di comorbidità non adeguatamente trattate (rinosinusite con/senza polipi, obesità, RGE, patologie psichiatriche), spesso determinanti maggiori delle riacutizzazioni.

Il trattamento iniziale prevede l'ottimizzazione della terapia inalatoria secondo STEP 4-5 di trattamento e quindi: l'aggiunta ad alte dosi di ICS di uno o più farmaci per il controllo (LABA, tiotropio o altri LAMA inclusi nelle triplici terapie inalatorie o antileucotrienici come Montelukast, soprattutto nei pazienti con rinite allergica e asma da sforzo).

Nei pazienti che presentano frequenti riacutizzazioni, l'ottimizzazione del regime terapeutico prevede l'impiego di combinazioni ad alto dosaggio di corticosteroidi inalatori e formoterolo (ICS/formoterolo), da somministrare sia come terapia di mantenimento sia al bisogno. In alternativa, trova indicazione dell'introduzione delle triplici terapie in associazione preconstituita (ICS/LABA/LAMA). Parallelamente all'intervento farmacologico, risulta fondamentale implementare i programmi di educazione terapeutica del paziente, dotandolo di un piano d'azione scritto e personalizzato per la gestione tempestiva delle acuzie.

Dopo un periodo di 3-6 mesi è necessario valutare il risultato ottenuto ed eventualmente ripetere tutti gli step precedenti. Solo a questo punto, se l'asma non è controllato, il paziente può essere definito affetto da asma grave e candidato a terapie aggiuntive.

Nei pazienti che rimangono non controllati nonostante l'ottimizzazione della gestione dell'asma, è necessario chiarire quale sia il fenotipo clinico e l'endotipo di malattia, procedendo con adeguata fenotipizzazione (sulla base della storia clinica, delle comorbidità e dei fattori di rischio) ed endotipizzazione (sulla base del tipo di infiammazione bronchiale). In questo modo è possibile distinguere:

- Asma di tipo 2 (allergico e non allergico con eosinofilia) caratterizzato da eosinofilia ematica e/o aumento del FeNO, eosinofilia nell'espettorato spontaneo o indotto;
- Asma non di tipo 2 (neutrofilico e paucigranulocitario) caratterizzato dall'assenza di biomarcatori di tipo 2, con o senza neutrofilia nell'espettorato.

Nel paziente con asma grave, la valutazione dei biomarkers di infiammazione di tipo 2 dovrebbe essere eseguita varie volte a distanza di settimane o mesi, almeno 10-15 giorni di distanza dalla sospensione degli OCS, questo per la certezza dell'endotipizzazione.

Inoltre, nei pazienti con biomarcatori suggestivi di asma tipo 2, bisognerebbe programmare indagini aggiuntive ricordando come possano coesistere altre malattie guidate dall'infiammazione di tipo 2: esofagite eosinofila, dermatite atopica, rinosinusite cronica con poliposi nasale, rinite allergica, allergie alimentari, vasculite.

Le indagini aggiuntive, quindi, comprendono valutazione allergologica completa, valutazione ORL (endoscopia, eventuale TC maxillo-facciale), TC torace, questionari validati per indagare interessamento cutaneo ed esofageo, esame citologico dello striscio nasale, valutazione dermatologica, analisi per escludere EGPA (granulomatosi eosinofila con poliangerite) o ABPA (aspergillosi broncopolmonare allergica).

Nei pazienti con asma non di tipo 2, invece, bisognerebbe includere analisi dell'espettorato per confermare l'assenza di eosinofilia e TC torace per escludere possibile presenza di bronchiectasie.

Infine, nel paziente che rimane ancora non controllato o che richiede frequentemente o continuamente l'uso dei OCS, considerare l'uso di farmaci biologici come¹ Anti-IgE (Omalizumab), Anti-IL5 (Mepolizumab), Anti-IL5R (Benralizumab), Anti-IL4R α e Anti-IL13 (Dupilumab) nell'asma T2 e Anti-TSLP (Tezepelumab) sia nell'asma T2 sia in quella non T2.

La scelta della terapia biologica deve basarsi su un'attenta valutazione di diversi fattori: dai criteri di rimborsabilità locale alla presenza di comorbilità di tipo 2, fino ai predittori di risposta, al costo, alla frequenza di somministrazione e alle preferenze del paziente. Quando un paziente è idoneo a più opzioni, è fondamentale effettuare una comparazione

diretta tra i diversi biologici per individuare la soluzione più adeguata.

Nome	Bersaglio	Criteri prescrittivi criteri di idoneità locali per il rimborso	Fattori prognostici di risposta alla terapia	Indicazioni per il trattamento anche di altre patologie:
Omalizumab	IgE circolanti	Sensibilizzazione ad allergeni perenni IgE sieriche: 30-1500 UI/ml	Asma ad insorgenza precoce Asma indotta da allergeni	Orticaria cronica spontanea (approvato e rimborsato) Poliposi Nasale (approvato e rimborsato) Allergia Alimentare (approvato e in attesa di rimborso AIFA)
Mepolizumab	IL-5 circolante	Eosinofili ematici: > 150 cell/ul, e nell'ultimo anno > 300 cell/ul	Asma ad insorgenza tardiva Poliposi nasale	Poliposi Nasale, EGPA da >6 anni, HES (approvate e rimborsate AIFA) BPCO (uno studio fase III, negativo, altri in corso)
Benralizumab	Recettore cellulare di IL-5	Eosinofili ematici: ≥ 300 cell/ul	Asma ad insorgenza tardiva Poliposi nasale Utilizzo di OCS Ostruzione fissa delle vie aeree >2 riacutizz/anno precedente	Poliposi Nasale (Studio fase III) EGPA (Indicazione approvata da EMA) HES-sindrome ipereosinoflica (studio fase III) BPCO (uno studio fase III in corso)
Dupilumab	Recettore il4-Rα: Inibisce la trasduzione del segnale IL-4/IL-13	Eosinofili ematici ≥ 150 cell/ul e/o FeNO ≥ 25 ppb	Asma di Tipo 2 ad insorgenza precoce o tardiva Asma OCS dipendente	Rinosinusite cronica con poliposi nasale ≥18 anni (approvato e rimborsato) Dermatite atopica ≥6 mesi (approvato e rimborsato) Prurigo Nodularis ≥18 anni (approvato e rimborsato) Esofagite Eosinofila ≥ 1 anno (approvato e rimborsato) e dai ≥ 12 anni (approvato e rimborsato) BPCO ≥ 18 anni (approvato e in attesa di rimborso AIFA)
Tezepelumab	TSLP	≥2 esacerbazioni di asma nei 12 mesi precedenti	Esacerbazioni di malattia Asma grave allergico ed eosinofilo Poliposi nasale	Rinosinusite cronica con poliposi nasale (Studio Fase III) Esofagite Eosinofila (Studio di Fase III)

Figura 7: Farmaci biologici di utilizzo nell'asma grave e relative caratteristiche

Tutti i biologici attualmente disponibili in Italia hanno mostrato aspetti comuni in popolazioni differenti, ma tutte definite come affette da asma grave: capacità di ridurre in maniera rilevante le riacutizzazioni gravi e le ospedalizzazioni per asma, possibilità di ridurre considerevolmente (ed in gran parte interrompere completamente) il ricorso ad OCS o l'utilizzo di tali farmaci in cronico, elevato profilo di sicurezza, conseguente netto miglioramento della qualità della vita dei pazienti³⁷.

Tezepelumab e remissione clinica

In particolare, il Tezepelumab è un anticorpo monoclonale umano (IgG2λ) che ha la funzione di bloccare la linfopoietina stromale timica (TSLP), bloccandone l'interazione con il suo recettore eterodimerico. Questa citochina viene rilasciata dalle cellule epiteliali bronchiali in risposta ad allergeni, virus, inquinanti atmosferici, avviando il pathway infiammatorio a valle³⁸.

Grazie alla sua azione, Tezepelumab riesce a migliorare la funzione polmonare, ridurre gli eosinofili localizzati a livello sottomucoso e a livello ematico e i biomarcatori determinanti il rimodellamento delle vie aeree (ovvero le metalloproteasi MMP10 e MMP3) in molti pazienti affetti da asma grave non controllato³⁹. In generale riduce il tasso annuale di riacutizzazioni sia in pazienti con bassi livelli di biomarcatori T2 anche see con effetto maggiore se sono presenti alti livelli di tali marcatori (T2 high)^{40,41}.

Quindi, poiché TSLP viene rilasciata in seguito a stimoli diversi (allergeni e non), questo suggerisce l'esistenza di meccanismi allergici e non allergici attraverso i quali Tezepelumab possa normalizzare l'infiammazione locale, indipendentemente dalla conta degli eosinofili e delle IgE totali⁴¹. Tezepelumab rappresenta la prima terapia biologica con evidenza di efficacia in soggetti senza marcatori T2 elevati⁴².

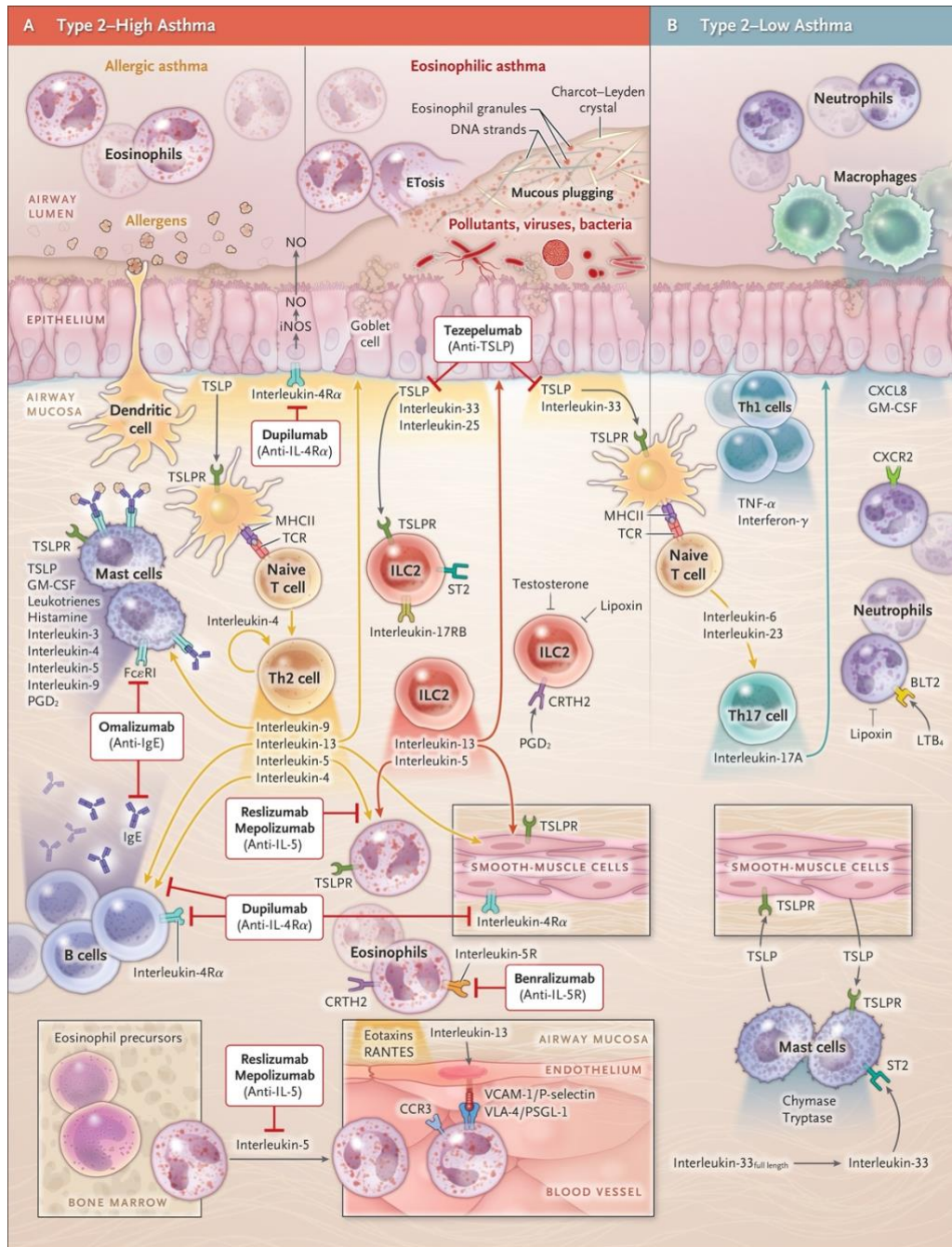


Figura 8: Funzionamento dei farmaci biologici attualmente in commercio per l'asma grave.

Altro concetto importante da definire con l'avvento della terapia biologica è quello di remissione, che ha una valenza più ampia del semplice controllo e viene sviluppata

nell'ambito dell'asma grave. Con questo obiettivo terapeutico si è passati ad una visione d'insieme rispetto al passato, considerando simultaneamente diversi outcomes clinici: riduzione delle riacutizzazioni, dello steroide sistemico, miglioramento della qualità della vita e riduzione della sintomatologia. Può essere raggiunto da circa il 20-30% dei pazienti trattati con biologici⁴³, con percentuali diverse a seconda del farmaco utilizzato.

La definizione di remissione clinica include i seguenti criteri: assenza di sintomi asmatici significativi (valutati con strumenti come ACT o ACQ), assenza di riacutizzazioni per un periodo tipicamente di 12 mesi, assenza di uso di OCS di mantenimento, funzionalità polmonare stabile o migliorata (FEV1 sopra il limite inferiore della norma o $\geq 80\%$ del predetto)⁴⁴. È importante specificare come non vi sia un completo accordo sulla definizione di remissione clinica, in particolare la versione da noi utilizzata è quella proposta da SANI⁴⁵.

Oltre ai criteri clinici, la remissione completa o fisiopatologica include la normalizzazione dell'iperreattività bronchiale e/o dei marcatori infiammatori.

In una metanalisi si può osservare come peggiore FEV1, sintomi più gravi, durata di malattia più lunga e uso di OCS siano associati a tassi di remissione minori, mentre obesità e depressione rappresentano due importanti barriere extra-polmonari al raggiungimento di tale risultato⁴⁶.

Inoltre, vi è una probabilità significativamente aumentata di raggiungere la remissione con terapia biologica in pazienti con biomarcatori T2 elevati (T2 high)⁴⁷.

1.8 FOLLOW-UP

Dopo aver avviato una terapia è importante rivedere il paziente, dopo due o quattro settimane da una riacutizzazione, dopo uno o due mesi dall'inizio della terapia, dopo sei mesi in pazienti già in trattamento.

Bisogna sempre valutare l'aderenza alla terapia e la tecnica di utilizzo degli inalatori, nonché il raggiungimento del controllo dei sintomi tramite questionari (come ACT o ACQ). È importante valutare la presenza del rischio futuro di riacutizzazioni e l'eventuale sviluppo di ostruzione bronchiale non più reversibile in maniera completa.

È possibile valutare l'immunoterapia allergene-specifica in pazienti che presentano determinate caratteristiche come asma controllato eventualmente associato a rinite, storia clinica suggestiva per specifici allergeni; essa andrà nel caso ad aggiungersi alla terapia

farmacologica se necessario e, essendo un intervento terapeutico indirizzato sul meccanismo patogenetico dell'asma, potrebbe potenzialmente modificare la storia naturale della malattia.

2. NUOVI METODI DIAGNOSTICI: ESALATO CONDENSATO (EBC)

L'esalato condensato (EBC) è un metodo non invasivo utilizzato per campionare le vie aeree e si ottiene raffreddando l'aria espirata e raccogliendo la condensazione risultante⁴⁸. Rappresenta un utile strumento per valutare l'infiammazione e lo stress ossidativo nelle malattie respiratorie.

L'EBC si forma dirigendo il respiro esalato attraverso un dispositivo di raffreddamento, che ha la funzione di condensare il vapore acqueo e le sostanze volatili e non volatili presenti nell'aria espirata⁴⁹. Il vapore acqueo condensato rappresenta il componente principale (>99% del volume), mentre una piccola frazione deriva da goccioline respiratorie contenenti molecole non volatili sia idrofile che idrofobiche. Durante la respirazione a volume corrente, vengono liberate particelle di aerosol con diametro medio di 0,3 µm che trasportano sostanze dal fluido di rivestimento delle vie aeree⁴⁹.

Il test dura generalmente 10 minuti, tempo sufficiente per ottenere 1-2 mL di campione ed è ben tollerato dai pazienti. I dispositivi disponibili non raccolgono tutto il vapore esalato, ma circa il 40% di quanto viene estratto. La respirazione all'interno del boccaglio avverrà a volume corrente (TV) con clip nasale e trappola per saliva. La temperatura viene definita e controllata durante la condensazione e il condensatore è costituito da superfici inerti⁴⁹.

Una volta raccolto, l'esalato condensato contiene numerosi mediatori dell'infiammazione e dello stress ossidativo: molecole piccole come adenosina, ammoniaca, perossido di idrogeno, isoprostani, leucotrieni, prostanoidi, ossidi di azoto, proteine e peptidi, come ad esempio citochine (IL-6, IL-1β, IL-8) e chemochine. Altri parametri evidenziabili sono il pH (che cambia nelle malattie respiratorie), acidi nucleici, lipidi/eicosanoidi, hs-CRP (proteina C reattiva ad alta sensibilità).

Le concentrazioni di questi mediatori sono influenzate dalle malattie polmonari e modulate dagli interventi terapeutici. I biomarcatori IL-6, IL-1β, IL-8 e hs-CRP sono caratteristici delle malattie respiratorie e possono essere rilevati con piattaforme elettrochimiche multiplex con sensibilità nell'ordine dei picogrammi/mL⁵⁰.

Lo strumento presenta un numero elevato di vantaggi: non è invasivo, può essere ripetuto più volte con brevi intervalli, è utilizzabile a tutte le età, è piuttosto versatile come setting

di attuazione, non altera la funzione respiratoria e non influenza l'inflammation delle vie aeree durante la raccolta, i dispositivi sono facilmente trasportabili⁵¹.

Purtroppo esistono anche alcuni svantaggi che ad ora portano ad utilizzare l'EBC solo come strumento di ricerca e non ancora nella pratica clinica quotidiana⁵²: l'EBC presenta gradi incerti e variabili di diluizione; quindi, non fornisce valutazioni precise delle concentrazioni individuali dei soluti nel fluido di rivestimento delle vie aeree. Manca un fattore standardizzato di diluizione per confrontare i soggetti⁵³; la standardizzazione manca anche nella procedura per la raccolta e l'analisi; non esistono valori normali stabiliti per la maggior parte dei biomarcatori⁵². I composti all'interno dell'esalato condensato sono contenuti a concentrazioni picomolari e quindi richiedono metodi analitici altamente sensibili potendo risultare sotto il limite di rilevazione anche in questo caso^{54,55}. Gli studi hanno dimostrato che le caratteristiche misurabili nell'EBC differiscono significativamente tra pazienti sani e pazienti affetti da condizioni patologiche come asma, BPCO, sindrome da distress respiratorio acuto, malattie occupazionali, fibrosi cistica e COVID-19⁵⁶. Tuttavia, nessuno dei parametri studiati finora soddisfa tutti i requisiti per un biomarcatore clinico: riproducibilità, valori normali, informazioni sul processo infiammatorio sottostante e risposta al trattamento.

Uno degli strumenti da noi utilizzati è il modello TURBO 23 GOLD (Transportable Unit for Research of Biomarkers Obtained ovvero Unità Trasportabile per la Ricerca di Biomarcatori Ottenuti). È un dispositivo di raffreddamento termoelettrico autonomo (grazie all'effetto Peltier) per il raffreddamento della provetta, è portatile e necessita di un collegamento a rete elettrica per funzionare (oppure può essere collegato a una speciale batteria al litio dedicata)⁵⁷.

Assumendo costanti le condizioni operative del condensatore, il volume espirato nell'unità di tempo (ovvero il volume minuto) è stato identificato come il fattore più importante per il volume di esalato condensato raccolto. Alla luce di ciò, il volume dell'espirato, il volume di condensa raccolta e il tempo di campionamento devono essere correlati per valutare l'efficacia della raccolta dell'EBC. Questo ha portato alla nascita di un piccolo strumento di misura, denominato VOLMET 20, atto a misurare il volume totale di aria espirata durante una sessione di raccolta dell'EBC. Il VOLMET 20 viene posizionato sui circuiti di raccolta monouso e permette di impostare sul display un valore numerico (espresso in litri, ad es. nel nostro caso abbiamo impostato un volume di 20L) che rappresenta il valore soglia da raggiungere. Tale valore è uguale per tutti i soggetti

monitorati e indipendente dal tempo necessario per raggiungerlo; ciò consente la normalizzazione dei campioni raccolti da soggetti diversi, uniformando il volume di aria espirata come termine di riferimento⁵⁸.

Per la ricerca riguardo l'asma bronchiale, questa metodica viene utilizzata per analizzare proteine e mediatori infiammatori locali che permettano di comprendere meglio endotipo e fenotipo dei pazienti asmatici gravi, con l'obiettivo di identificare dei nuovi marcatori e biomarkers più precisi ed eventualmente utilizzabili come target di terapia.

Di seguito sono state analizzate tre proteine identificate all'interno dell'EBC dei pazienti asmatici.

ApoA1

ApoA1 è un'apolipoproteina, principale componente delle HDL (lipoproteine ad alta densità). L'ApoA1 ha un ruolo chiave nel trasporto inverso del colesterolo, ovvero il meccanismo attraverso cui il colesterolo in eccesso viene rimosso dai tessuti periferici per essere trasportato al fegato per l'escrezione⁵⁹.

La struttura ad alfa-elica anfipatica della lipoproteina è funzionale a conferirle flessibilità e adattabilità conformazionale, permettendole in questo modo di interagire efficacemente con le membrane cellulari⁶⁰.

Il meccanismo d'azione di ApoA1 consiste nel legare le membrane cellulari e successivamente promuovere il movimento di fosfolipidi e colesterolo verso la superficie esterna della cellula⁶¹. A questo punto queste sostanze si combineranno con ApoA1 per formare le HDL. Inoltre, l'attivazione della lecitina-colesterolo aciltransferasi media la reazione di esterificazione del colesterolo, la quale permette la completa integrazione del colesterolo all'interno delle HDL e il successivo trasporto nel flusso sanguigno⁶².

Molto significativo è il legame tra ApoA1 e il trasportatore ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) nella parete vascolare, dove accetta colesterolo libero.

Oltre al trasporto di colesterolo, ApoA1 possiede proprietà pleiotropiche, ovvero ha capacità anti-infiammatorie, anti-aterogene, anti-apoptotiche e anti-trombotiche: questo spiega le caratteristiche cardioprotettive delle HDL⁶³.

ApoA1 svolge anche un ruolo protettivo nell'asma, grazie a meccanismi anti-infiammatori, immunomodulatori e di riparazione epiteliale; quindi, livelli elevati di ApoA1 nel liquido di lavaggio broncoalveolare hanno correlazioni positive con il FEV1

e una minore ostruzione delle vie aeree⁶⁴. Il rapporto ApoA1/ABCA1, precedentemente citato, ha la capacità di attenuare la funzione di cellule dell'immunità adattativa come le APC e, in modelli murini, ha dimostrato di essere in grado di ridurre l'infiammazione neutrofilica delle vie aeree sopprimendo la produzione di fattore stimolante le colonie granulocitarie (G-CSF)⁶⁵.

Nell'ambito dell'infiammazione allergica, attraverso la produzione di lipossina A4 (LXA4), promuove la risoluzione ripristinando le giunzioni strette (tight junctions) dell'epitelio bronchiale danneggiate dagli allergeni. Si può quindi osservare come il trattamento con ApoA1 riduca i livelli polmonari di citochine pro-infiammatorie come IL33, IL25 e TSLP⁶⁶.

Quanto definito porta ad affermare come peptidi mimetici di ApoA1 rappresentino una strategia terapeutica promettente per l'asma grave non controllato, sia che si tratti di asma T2-low, sia per l'asma neutrofilico resistente ai corticosteroidi. In studi preliminari si è visto come abbiano ridotto l'infiammazione eosinofila e neutrofila, l'iperreattività bronchiale, la metaplasia delle cellule mucipare e il rimodellamento delle vie aeree^{67,68}.

TFF3

La famiglia dei fattori trifoglio comprende tre fattori, di cui TFF3 (Trefoil factor 3) rappresenta il fattore intestinale. Essi condividono un motivo strutturale da cui deriva il nome, ovvero il dominio "trifoglio", caratterizzato da una sequenza di circa quaranta amminoacidi dove sei residui di cistina permettono di formare tre ponti disolfuro intracatena, dando origine a tre loop che conferiscono tale conformazione⁶⁹.

I fattori appartenenti a questa famiglia sono resistenti alle proteasi e, una volta secrete dal tratto gastrointestinale, presentano attività di protezione e riparazione delle mucose⁶⁹.

TFF3 è costituito da un singolo dominio TFF e un singolo dominio libero di cisteina. Differentemente dagli altri due componenti della famiglia (TFF1, TFF2) è ampiamente secreto dalla maggior parte degli epitelii mucosi del nostro organismo e dalle loro ghiandole. TFF3 quindi è un peptide mucoso-associato secreto dalle cellule caliciformi e dalle cellule mucose delle ghiandole sottomucose⁷⁰. È espresso anche nelle vie aeree dove svolge attività coinvolte in riparazione dell'epitelio, differenziazione cellulare e rimodellamento delle vie aeree stesse⁷¹.

Esistono studi che riportano come i livelli di TFF1 e TFF3 siano più elevati nel tessuto nasale di pazienti con CRSwNP (rinosinusite cronica con polipi nasali), mentre solo TFF3 aumentava nella versione di rinosinusite cronica senza polipi nasali⁷². La rimozione chirurgica dei polipi in trattamento con corticosteroidi era associata a un'inversione dell'espressione di mRNA di TFF1 e TFF3. L'importanza biologica di questo è ancora da chiarire ma è a molti noto come la rinosinusite cronica e l'asma condividano una patogenesi comune basata sull'infiammazione cronica di tipo 2 (TH2) a livello delle vie aeree. Oltre a ciò, l'accumulo di eosinofili è una caratteristica chiave in entrambe le condizioni, come anche la disfunzione della barriera epiteliale e il rimodellamento tissutale.

Quello che accade in vivo è che TFF3 forma eterodimeri con FCGBP (IgG-Fc-binding protein), nonché può legare DMBT1, le quali sono proteine coinvolte nell'immunità innata mucosale⁷³.

Attraverso una via dipendente dal recettore EGF ha un ruolo nella differenziazione delle cellule ciliate e protezione nella rigenerazione cellulare: si è visto come non venga modificato il numero di cellule caliciformi ma piuttosto TFF3 esogeno aumenta l'espressione di FOXJ1 (fattore di ciliogenesi) e di β -tubulina⁷⁴.

Diverse linee di evidenza definiscono LINGO2 (leucine-rich repeat and immunoglobulin-like domain-containing NoGo) e LINGO3 come recettori di TFF3 e TFF2 rispettivamente. TFF3 interagisce con LINGO2 per invertire in modo competitivo il legame LINGO2-EGFR, migliorando in questo modo la proliferazione e rigenerazione cellulare⁷².

Le cellule caliciformi sono cellule secretorie non ciliate, sensibili al danno da naftalene e hanno una funzione di cellula staminale che in vitro rigenera le cellule dell'epitelio polmonare. In seguito al danno da naftalene, TFF1 e TFF3 sono molto espressi nelle cellule caliciformi in degenerazione e questo avviene all'interno delle giunzioni del dotto bronco alveolare che sono una nicchia di cellule staminali. L'espressione di TFF potrebbe favorire la riparazione al danno.

Questo però porta anche a dire come una rigenerazione incontrollata potrebbe portare a cancro: in particolare l'immunoreattività del TFF3 si riscontra nell'adenocarcinoma (ma non nel carcinoma squamoso) ed è necessaria per mantenere il fenotipo di adenocarcinoma. La combinazione di nuovi farmaci inibitori di TFF3 e della chinasi MEK1/2 è stata in grado di sopprimere la crescita dell'adenocarcinoma⁷².

Il contributo alla patogenesi dell'asma in processi di infiammazione, rimodellamento e funzione muscolare si ha attraverso la via PI3K/AKT1, modulando geni come AGR2 (Anterior Gradient 2), che codifica per una proteina disolfuro isomerasi che svolge un ruolo chiave nel ripiegamento delle proteine, nella secrezione delle mucine (come la MUC2) e nel mantenimento della barriera mucosa intestinale e respiratoria. Vi è una correlazione con risposte di tipo TH2 con aumento di macrofagi M2 e mastociti⁷⁵. Modula l'infiammazione cronica regolando la secrezione di IL-6 e IL-8 indotta da TNF α , con vie di segnalazione coinvolgenti PKC e ERK1/2, in aggiunta forma complessi con MUC5B e MUC5AC, mucine coinvolte nella difesa antimicrobica mucosale e nella viscoelasticità del muco, favorendo ipersecrezione e ostruzione delle vie aeree⁷⁶.

Dopo quanto detto, TFF3 potrebbe rappresentare un potenziale target terapeutico per regolare rimodellamento delle vie aeree e infiammazione in patologie croniche delle vie aeree⁷⁷.

YKL40

YKL40 (chitinase 3-like protein 1) è una proteina chitinasi-simile che si trova in concentrazioni molto elevate nei soggetti asmatici in maniera correlata alla gravità dell'asma, all'infiammazione e al rimodellamento delle vie aeree⁷⁸. In particolare, vi è una correlazione positiva dei livelli di YKL40 con lo spessore della membrana subepiteliale, marker fondamentale per il rimodellamento delle vie aeree⁷⁹.

YKL40, attraverso l'attivazione di vie di segnalazione FAK (focal adhesion kinase) e MAPK (mitogen-activated protein kinase), promuove il rimodellamento delle vie aeree: determina la proliferazione e la migrazione di cellule muscolari lisce, la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e la fibrosi subepiteliale, che portano ad un aumento della massa muscolare liscia e quindi aumento della forza broncocostrittrice⁷⁸. Ulteriore proliferazione e migrazione di cellule muscolari lisce avviene poiché YKL40, tramite vie MAPK (JNK ed ERK) e NF- κ B, induce l'espressione di IL8 dall'epitelio bronchiale⁸⁰.

I livelli sierici di YKL40 sono correlati in maniera positiva più che altro con l'asma non eosinofilo, quindi con l'asma neutrofilico e paucigranulocitario⁸¹: vi è un legame proporzionale con i neutrofili ematici, IL-1 β nell'espettorato e IL-6 plasmatico, mentre tale legame è inversamente proporzionale con IgE sieriche e eosinofili ematici⁸².

Inoltre, si è visto tramite una metanalisi come livelli basali di YKL40 correlino con esacerbazioni moderate-gravi e in generale valori elevati siano associati molto frequentemente ad una malattia caratterizzata da diverse riacutizzazioni e non da stabilità del quadro clinico⁸³. In aggiunta vi è un legame inversamente proporzionale con la risposta ai trattamenti convenzionali⁸².

Livelli sierici elevati di YKL40 possono essere dovuti a un polimorfismo del promotore del gene CHI3L1 che codifica per la proteina, in particolare a causa di una sostituzione di una citosina con una guanina in posizione 131. Questo porta anche ad avere un aumentato rischio di asma, iperreattività bronchiale e ridotta funzione respiratoria⁸⁴.

Purtroppo, la bassa specificità di YKL40 rappresenta un limite nel suo utilizzo nella diagnosi isolata, in quanto livelli elevati si riscontrano anche in BPCO, malattie infettive e autoimmuni e neoplasie. Pertanto, l'unica utilità attuale risiede nella fenotipizzazione in associazione con altri biomarcatori⁸⁵.

3. MATERIALI E METODI

3.1 PAZIENTI E DISEGNO DI STUDIO

È stato condotto uno studio osservazionale prospettico. Sono stati raccolti e analizzati i dati di due pazienti asmatiche adulte (età > 18 anni) trattate in comunità, afferenti alla clinica di malattie respiratorie ed allergologia dell'IRCCS Azienda Ospedaliera Metropolitana (AOM), per asma grave.

Criteri di inclusione:

Sono stati reclutati

- 1) Pazienti con un'asma grave, ovvero una forma di asma bronchiale cronica che rimane non controllata nonostante l'utilizzo di terapie inalatorie ad alte dosi (corticosteroidi + altri farmaci) o che peggiora quando si riducono tali dosi;
- 2) Pazienti che presentassero i criteri di prescrivibilità dell'anti-TSLP per il trattamento dell'asma grave, come da scheda tecnica del farmaco⁸⁶.
- 3) Pazienti che non avessero ricevuto altri farmaci biologici per il trattamento dell'asma grave.

Criteri di esclusione:

Sono stati esclusi tutti i pazienti che non rientravano nelle suddette categorie.

Durante la prima visita sono stati raccolti i dati demografici, le caratteristiche cliniche, la terapia inalatoria in atto e il controllo dell'asma, in base alle linee guida GINA.

Secondo le linee guida GINA (Global Initiative for Asthma), l'asma si definisce controllata, parzialmente controllata o non controllata in base alla frequenza dei sintomi, alle limitazioni nelle attività, ai risvegli notturni e all'uso di farmaci al bisogno. L'asma viene definita non controllata quando sono presenti tre o più sintomi diurni più di due volte a settimana, risvegli notturni dovuti all'asma, presenza di qualsiasi difficoltà nello svolgere le attività quotidiane, uso di farmaci al bisogno per più di due volte a settimana.

Al baseline sono state effettuate le seguenti indagini: emocromo, per la valutazione della conta eosinofila periferica, il titolo di IgE, il FeNO e l'esalato condensato. Tali indagini sono state ripetute a 3 mesi, dopo l'avvio del farmaco biologico.

3.2 MISURAZIONI SPIROMETRICHE, DELL'OSSIDO NITRICO ESALATO E DELL'ESALATO CONDENSATO

Durante la visita al baseline, entrambe le pazienti sono state sottoposte alla misurazione di ossido nitrico esalato frazionato (FeNO), spirometria semplice ed esalato condensato (EBC). La spirometria è stata eseguita in triplicato, in conformità con le linee guida della European Respiratory Society⁸⁷, utilizzando uno spirometro Vyntus PNEUMO-PC (VyAire Medical, Chicago, III). Il FeNO bronchiale e alveolare è stato eseguito utilizzando HypAir FeNO (Medi-Soft, Sorinnes, Belgio), a una velocità di flusso standard di 50 ml/s per il FeNO bronchiale e a flussi progressivi di 50 ml/s, 100 ml/s e 150 ml/s per il FeNO alveolare, secondo le linee guida del produttore e dell'American Thoracic Society⁸⁸.

Per quanto riguarda l'esalato condensato è stato utilizzato TURBO 23 GOLD (Transportable Unit for Research of Biomarkers Obtained ovvero Unità Trasportabile per la Ricerca di Biomarcatori Ottenuti) a cui è stato collegato VOLMET 20. Tale strumento permette di calcolare con precisione il volume totale dell'aria espirata durante una seduta di raccolta respiratoria e consente di impostare un valore soglia personalizzabile sul display, rendendo i campioni uniformi indipendentemente dal tempo impiegato per raggiungere il target. Il paziente deve respirare all'interno del boccaglio a volume corrente (VC) con clip nasale e trappola per saliva; l'EBC si forma dirigendo il respiro esalato attraverso un dispositivo di raffreddamento con la funzione di condensare il vapore acqueo e le sostanze volatili e non volatili presenti nell'aria espirata. Tale misurazione viene effettuata fino al raggiungimento di 20 L di esalato, respirando a VC, con un tempo massimo per ciascuna misurazione di circa 15 minuti. In media, queste impostazioni permettono di raccogliere 520 microlitri di esalato (con valori che oscillano tra un minimo di 60 microlitri e un massimo di 1180 microlitri). Tale materiale viene successivamente ultracentrifugato per 10 minuti e stoccato all'interno di congelatori, impostati a -70°C, in campioni di 100 microlitri. Successivamente si procede alla purificazione del campione tramite RNA/DNA/Protein Purification Plus Kit. Questo kit offre un metodo rapido per l'isolamento e la purificazione di RNA totale, DNA e proteine in sequenza da un singolo campione di esalato. Il kit utilizza due colonne: la prima per la purificazione del gDNA e la seconda per la purificazione dell'RNA, avvalendosi delle colonne di resina Norgen (ideali per il legame di RNA di tutte le dimensioni, compresi i miRNA).

Anche le proteine vengono purificate sulla seconda colonna dopo l'eluizione dell'RNA. Le proteine vengono eluite in tampone e sono pronte per l'applicazione a valle senza necessità di ulteriori operazioni di purificazione. Le proteine possono essere quantificate direttamente, utilizzate in western blot, ELISA, spettrometria di massa o proteome profile.

L'acquisizione dei biomarkers all'EBC è avvenuta tramite Human XL Cytokines Array Kit (Bio-Techne/R&D system), per la determinazione parallela dei livelli relativi di citochine umane. L'analisi dei dati è stata fatta con UVITEC Ltd, un sistema avanzato per l'imaging molecolare, specializzato nella documentazione di gel e nell'analisi di chemiluminescenza e fluorescenza per la ricerca in genomica e proteomica.

4. RISULTATI

Sono stati analizzati i dati di due pazienti in trattamento con Tezepelumab.

È stata fatta un'analisi descrittiva delle caratteristiche demografiche e cliniche delle pazienti, comprendenti i valori spirometrici, la conta eosinofila periferica, il FeNO bronchiale e alveolare, sia al basale, sia dopo tre mesi. Inoltre, sono stati eseguiti prelievi di esalato condensato per definire i livelli dei diversi marcatori all'interno di esso: sono stati analizzati principalmente ApoA1, TFF3, YKL40, la cui misura è stata effettuata al basale e dopo terapia con il farmaco biologico Tezepelumab.

Le caratteristiche macroscopiche delle due pazienti sono presentate nella tabella / sottostante: come si può notare, sono due pazienti molto simili dal punto di vista fenotipico in quanto si tratta di due pazienti donne, asmatiche e con i tipici marcatori asmatici (FeNO, eosinofili, IgE).

Parametro	Paziente 1	Paziente 2
Dati anagrafici e terapia		
Età	45 anni	22 anni
Sesso / Etnia	F / sud-americana	F / caucasica
Fumo	Ex fumatrice dal 2024; 1 pack/year	Non fumatrice; 0 pack/year
BMI	22,21 kg/m ²	20,42 kg/m ²
Comorbidità principali	Poliposi nasale	Psoriasi
Biologico in corso	Tezepelumab 210 mg ogni 4 settimane; inizio 10/07/2025	Tezepelumab 210 mg ogni 4 settimane; inizio 12/11/2025
Allergie/sensibilizzazioni	SPT positivo, polisensibilizzazione; acari, cane, gatto, betulla, parietaria, graminacee, olivo; RAF a Brufen e aspirina	SPT positivo, polisensibilizzazione; acari, cane, gatto, graminacee, parietaria, LTP, noce; alimenti riferiti; RAF a ibuprofene
Terapia inalatoria e farmaci associati	Beclometasone/formoterolo/ Glicopirronio Bromuro 172/5/9, 2 puff x 2; Ebastina; Arinit	Beclometasone/formoterolo/ glicopirronio bromuro 172/5/9, 2 puff x 2; glicopirronio; montelukast 10 mg; ebastina; Brusonex
Biomarcatori ematici/infiammatori		
Eosinofili basali	350 cell/mcL; 7,1%	450 cell/mcL; 5,6%
IgE totali	Non riportate nel campo estratto	723
FeNO bronchiale	119 ppb al basale; 38 ppb al primo follow-up; 11 ppb al controllo successivo	55 ppb al basale; 48 ppb al follow-up

FeNO alveolare	5,15 ppb al basale; 6,41 ppb al primo follow-up; 3,4 ppb al controllo successivo	53,2 ppb al basale
Spirometria		
FEV1 basale	2,14 L; 84,0% predetto	3,07 L; 83,9% predetto
FVC basale	3,17 L; 101,0% predetto	3,59 L; 85,3% predetto
Indice di Tiffeneau basale	67,7%	85,5%
FEV1 follow-up	2,65 L; 103,0% predetto; successivamente 2,86 L; 120,0% predetto	3,93 L; 108,0% predetto
FVC follow-up	3,33 L; 106,0% predetto; successivamente 3,47 L; 120,0% predetto	4,51 L; 107,0% predetto
Indice di Tiffeneau follow-up	79,5%; successivamente 82,0%	87,0%
Questionari e controllo clinico		
ACT	15 al basale; 14 al follow-up	18 al basale; 17 al follow-up
ACQ5	13 al basale; 11 al follow-up	9 al basale; 9 al follow-up
CCPP	14 al basale; 9 al follow-up	3 al basale; 6 al follow-up
RAPP	Non compilato al basale; 24 al follow-up	21 al basale; 20 al follow-up
AQLQ, media item 1-7	4,09 al basale; 4,66 al follow-up	5,25 al basale; 5,09 al follow-up
SAQ, media item 1-7	5,12 al basale; 6,00 al follow-up	4,69 al basale; 4,00 al follow-up
SAQ Global Score	90/90/55 al basale; 85/70/45 al follow-up	65/75/45 al basale; 60/65/20 al follow-up
TAI, totale item disponibili	52 al basale; 54 al follow-up	51 al basale; 54 al follow-up
Survey patient remodelling, media item 1-5	2,50 al basale; 2,33 al follow-up	2,53 al basale; 4,10 al follow-up
SNOT-22	59 al basale; 65 al follow-up	55 al basale; 58 al follow-up
Riacutizzazioni/accessi	4 riacutizzazioni e 4 accessi in PS nel blocco controllo; successivamente nota: 0 riacutizzazioni	Nel campo controllo risultano 0 OCS nei 12 mesi; dato riacutizzazioni non compilato nel blocco estratto

Tabella 1: Caratteristiche cliniche e demografiche paziente 1 e paziente 2

Nel confronto tra le due pazienti trattate con tezepelumab emergono differenze rilevanti nonostante la comune diagnosi di asma grave e la presenza di sensibilizzazione allergica. La paziente 2 presenta un profilo clinico caratterizzato da giovane età, assenza di abitudine tabagica, BMI nella norma, polisensibilizzazione allergica ed elevati biomarcatori di infiammazione di tipo 2, con eosinofili pari a 450 cell/mcL e IgE totali

pari a 723. La spirometria basale mostra valori globalmente conservati, con FEV1 dell'83,9% del predetto e indice di Tiffeneau dell'85,5%; al controllo si osserva un incremento del FEV1 al 108% del predetto, ma il FeNO bronchiale rimane elevato, riducendosi solo da 55 a 48 ppb. La paziente 1 presenta invece poliposi nasale, pregressa esposizione tabagica e reazione a FANS; al basale mostra una maggiore componente ostruttiva, con indice di Tiffeneau del 67,7%, e un FeNO bronchiale molto elevato, pari a 119 ppb. Dopo il trattamento, il paziente 1 evidenzia una risposta più netta sul piano funzionale e infiammatorio, con incremento progressivo del FEV1 fino al 120% del predetto e riduzione del FeNO bronchiale fino a 11 ppb. I questionari confermano una diversa espressione clinica: la paziente 2 presenta un ACT lievemente migliore al basale ma persistenza di sintomi e peggioramento della percezione legata al remodelling, mentre la paziente 1 mostra una qualità di vita inizialmente più compromessa ma un miglioramento più evidente negli indici SAQ e nei parametri funzionali. Questi dati suggeriscono che pazienti apparentemente simili per diagnosi e indicazione terapeutica possano presentare traiettorie cliniche differenti, rendendo utile integrare parametri spirometrici, FeNO, biomarcatori ematici e questionari nella valutazione longitudinale della risposta al biologico.

L'analisi dell'esalato condensato (EBC) nelle due pazienti ha permesso di evidenziare modifiche del profilo proteomico locale dopo tre mesi di trattamento con tezepelumab, confermando il ruolo di questa metodica come strumento non invasivo per lo studio dell'infiammazione bronchiale nell'asma grave. In entrambe le pazienti la raccolta dell'EBC è stata eseguita con volume espirato standardizzato a 75 L, consentendo un confronto tra il campione pre-trattamento e quello post-trattamento. È possibile analizzare i dati relativi all'EBC nella *tabella 2*

PAZIENTE 1	PAZIENTE 2
EBC: <u>Pre-treatment (T0)</u> Sample ID= A1 L espirato= 75 microL condensato raccolto= 1000	EBC: <u>Pre-treatment (T0)</u> Sample ID= A11 L espirato= 75 microL condensato raccolto= 360
<u>Post-treatment (T3)</u> Sample ID= A5	<u>Post-treatment (T3)</u> Sample ID= A26

L espirato= 75 microL condensato raccolto= 500	L espirato= 75 microL condensato raccolto= 650
---	---

PAZIENTE 1		PAZIENTE 2	
Pre-trattamento 11 proteine isolate	Post-trattamento 4 proteine isolate	Pre-trattamento 31 proteine isolate	Post-trattamento 25 proteine isolate
NGAL / Lipocalin-2 MMP9 IL-8 / CXCL8 YKL-40 IL-17A MIP-3 β (CCL19) Angiogenin TFF3 ApoA1 RBP-4 Resistin / RETN	IL-8 / CXCL8 IL17A MIP-3 beta Resistin/RETN	ADIPONECTIN (ACRP30) APOLIPOPROTEIN A-1 (ApoA1) ANGIOPOIETIN-2 (Ang-2) BAFF (TNFSF13B) CD30 (TNFRSF8) CD40L YKL40 Dkk-1 (Dickkopf-1) EGF (Epidermal Growth Factor) CD147 (EMMPRIN) CD105 (Endoglin) FGF-19 GDF-15 (MIC-1) GMCSF (CSF2) IL5 IL-8 (CXCL8) IL17A IL27 IL31 IL32 IL33 NGAL/Lipocalin2 CCL19 (MIP-3beta) MMP-9 MPO (Myeloperoxidase) Osteopontin (OPN) PDGF-AB/BB Resistin/RETN CXCL12 Serpine E1 SHOBG (ABP)	ADIPONECTIN (ACRP30) APOLIPOPROTEIN A-1 (ApoA1) ANGIOPOIETIN-2 (Ang-2) BAFF (TNFSF13B) CD30 (TNFRSF8) CD40L YKL40 Dkk-1 (Dickkopf-1) EGF (Epidermal Growth Factor) CD147 (EMMPRIN) CD105 (Endoglin) FGF-19 GMCSF (CSF2) IL5 IL-8 (CXCL8) IL17A NGAL/Lipocalin2 CCL19 (MIP-3beta) MMP-9 MPO (Myeloperoxidase) Osteopontin (OPN) Resistin/RETN CXCL12 Serpine E1 SHOBG (ABP)

Tabella 2: Caratteristiche endotipiche paziente 1 e paziente 2.

Nella prima paziente, il campione basale era identificato come A1, con 1000 μ L di condensato raccolto, mentre il campione post-trattamento era identificato come A5, con 500 μ L di condensato. Dal punto di vista proteomico si è osservata una riduzione marcata delle proteine rilevate, da 11 a 4. In particolare, dopo terapia non risultavano più rilevabili diversi marcatori legati a danno epiteliale, infiammazione neutrofilica e rimodellamento bronchiale, tra cui NGAL/Lipocalin-2, MMP9, YKL-40, ApoA1, TFF3, RBP-4 e Angiogenina. La persistenza di IL-8/CXCL8, IL-17A, MIP-3 β /CCL19 e Resistin/RETN suggerisce tuttavia la permanenza di una quota residua di attivazione infiammatoria, verosimilmente collegata all'asse neutrofilico/Th17.

Nella seconda paziente, il campione basale era identificato come A11, con 360 μ L di condensato raccolto, mentre il campione post-trattamento era identificato come A26, con 650 μ L. In questo caso il profilo EBC è risultato più complesso già al basale e si è

mantenuto più articolato anche dopo trattamento, con riduzione delle proteine isolate da 31 a 25. La persistenza di mediatori quali NGAL/Lipocalin-2, YKL-40, ApoA1, IL-17A, MIP-3β/CCL19, Resistin/RETN, MMP9 e IL-8/CXCL8 indica una risposta solo parziale sul piano molecolare, con mantenimento di segnali associati a infiammazione neutrofilica, attivazione epiteliale e rimodellamento bronchiale.

È possibile osservare in maniera più visiva le diminuzioni delle proteine nelle due pazienti dopo il trattamento rispettivamente nelle tabelle 3 e 4.

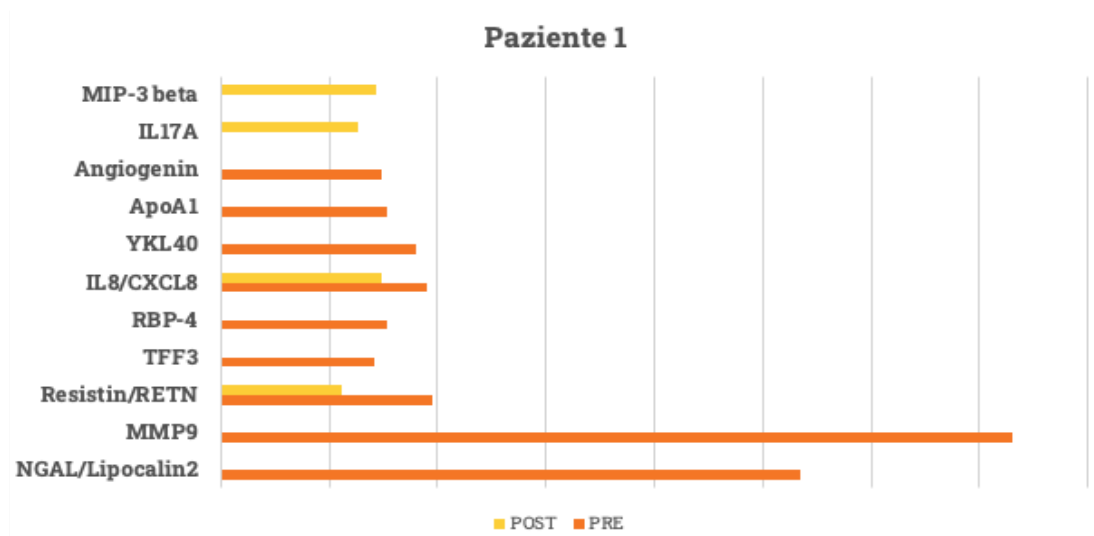


Tabella 3 Proteine nell'EBC paziente 1

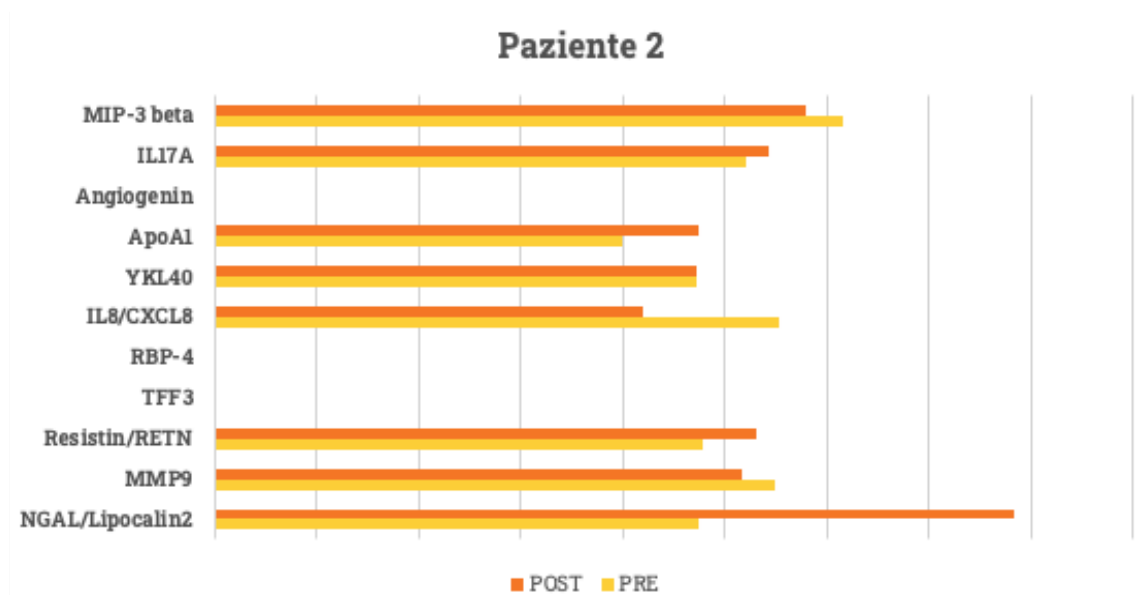


Tabella 4 Proteine nell'EBC paziente 2

Nel complesso, le due pazienti mostrano una risposta differente al trattamento biologico. La prima presenta una riduzione più evidente del carico proteico rilevato nell'EBC, compatibile con una maggiore attenuazione dell'attività infiammatoria locale. La seconda, invece, mantiene un network biomolecolare più ampio, suggerendo una maggiore persistenza dei meccanismi infiammatori e strutturali alla base della malattia.

5. DISCUSSIONE

In questo studio, condotto su pazienti con asma grave, abbiamo voluto valutare l'utilizzo dell'EBC come nuova metodica di diagnosi dell'asma.

Come è possibile notare dalle tabelle soprastanti, nonostante le due pazienti siano particolarmente simili dal punto di vista fenotipico e quindi presentino valori dei marcatori tipici dell'asma paragonabili, l'EBC ha permesso di evidenziare la notevole differenza riguardo ai meccanismi molecolari alla base dell'asma nelle due pazienti: la paziente 2 presenta una complessità notevole derivante dall'azione di un numero maggiore di proteine con funzione infiammatoria, di rimodellamento, di attivazione dell'epitelio bronchiale con produzione di muco e fattori fibrotici.

Nella paziente 1, il trattamento è risultato associato a una marcata riduzione di diversi marker di infiammazione neutrofila a carattere proteolitico, tra cui NGAL/Lipocalina-2, MMP9, YKL40, TFF3, RBP-4, ApoA1 e Angiogenina, che risultano non rilevabili dopo la terapia. L'attività infiammatoria residua è caratterizzata da livelli moderati di RESISTIN/RETN e IL8/CXCL8, insieme alla comparsa di IL17A e MIP3 β , suggerendo uno shift verso una forma infiammatoria correlata al pathway TH17.

Al contrario, la paziente 2 mostra un'espressione persistente e complessivamente aumentata di diversi mediatori infiammatori dopo il trattamento, tra cui NGAL/Lipocalina-2, Resistin/RETN, YKL40, ApoA1, IL-17A e MIP3 β , mentre MMP9 e IL-8/CXCL8 evidenziano solo una riduzione parziale. Questo pattern indica una attivazione sostenuta di vie infiammatorie mediate da Th17 e chemochine, coerente con un fenotipo infiammatorio persistente a guida immunitaria.

Nel complesso, è possibile evidenziare risposte molecolari distinte al trattamento tra i due pazienti: la paziente 1 mostra una soppressione della forma neutrofila proteolitica, mentre la paziente 2 mantiene un profilo infiammatorio dominante di tipo Th17-chemochinico.

Questa differenza è coerente con il razionale biologico di tezepelumab, anticorpo monoclonale anti-TSLP. TSLP è una citochina epiteliale "upstream", coinvolta nell'attivazione di più assi infiammatori; gli studi clinici hanno mostrato che il blocco di TSLP può ridurre le riacutizzazioni nell'asma grave non controllato, anche in sottogruppi con diverso profilo di biomarcatori ^{89,90}. Tuttavia, la persistenza di marcatori quali IL-8/CXCL8, IL-17A e MMP9 può indicare che alcuni circuiti infiammatori non-T2 o strutturali rimangano attivi nonostante il trattamento.

L'EBC ha permesso quindi di evidenziare una realtà più variegata e complessa alla base della genesi dell'asma poiché la paziente 1 presenta un tipo di asma severa TH2 con anche una componente neutrofilica proteolitica e questo succede perché vi è attivazione epiteliale a causa di citochine epiteliali come TSLP e IL33, che attivano sia i TH2 che i neutrofili; è presente anche muco e IL13 che favoriscono infezioni, colonizzazioni e attivazione dei neutrofili; inoltre gli steroidi possono paradossalmente aumentare i neutrofili. Nella paziente 1, le proteasi chiave sono MMP9 che degrada la matrice cellulare, l'elastasi neutrofila che distrugge l'elastina, la MPO (mieloperossidasi che causa stress ossidativo), NGAL/Lipocalin2 che stabilizza MMP9 (NGAL + MMP9 è un complesso altamente distruttivo). Tutto questo si ripercuote sulle vie aeree causando danno strutturale a livello dell'epitelio, perdita dell'integrità di barriera, rimodellamento bronchiale e quindi inspessimento di parete, fibrosi, rigidità bronchiale, ipersecrezione di muco con conseguente ostruzione delle vie aeree, ridotta risposta agli steroidi. Clinicamente questo significa che una paziente con questo pattern presenta una malattia più grave, più riacutizzazioni e rimodellamento, risposta incompleta ai biologici TH2. L'infiammazione neutrofila proteolitica è quindi distruttiva, steroide-resistente, spesso sottovalutata ed è quindi uno dei principali driver di progressione e severità dell'asma. L'utilizzo del Tezepelumab ha permesso di bloccare l'infiammazione epiteliale upstream, di ridurre anche l'asse neutrofilico, anche se non sempre controlla l'asse TH17 e l'infiammazione cronica persistente.

Andando ad analizzare l'assetto proteomico micromolecolare alla base della genesi dell'asma nella paziente 2, questo presenta un profilo infiammatorio dominante di tipo TH17 chemochinico, vengono quindi prodotte citochine come TH17 e si assiste all'attivazione di chemochine che reclutano neutrofili e cellule immunitarie adattative. Le cellule TH17 producono IL17A che attiva fortemente l'epitelio bronchiale, stimola l'epitelio inducendo la produzione di chemochine, tra cui le principali sono IL8/CXCL8 che richiama i neutrofili, CCL18 (MIP3 β) che richiama cellule T e cellule dendritiche, CXCL12 che regola il traffico immunitario. Tutto questo comporta nelle vie aeree infiammazione persistente con continua attivazione immunitaria che non si spegne facilmente, reclutamento multiplo di cellule tra cui neutrofili con la via di IL8, linfociti T con la via di CCL9 e cellule dendritiche, rimodellamento bronchiale e quindi attivazione epiteliale e produzione di fattori fibrotici come YKL40 e OPN), nonché, punto chiave in questo pattern, steroide-resistenza associata a IL17, che conduce anche a infiammazione

cronica refrattaria. Clinicamente questo significa che una paziente con questo profilo presenta una malattia più grave, più riacutizzazioni, infiammazione persistente e risposta incompleta ai biologici. Il messaggio chiave è che il profilo TH17 chemochinico è persistente, steroideo-resistente, immune-driven, meno responsivo ai biologici attuali. L'utilizzo del Tezepelumab ha permesso di bloccare l'infiammazione epiteliale (TSLP), di ridurre alcuni segnali upstream, anche se non sempre controlla l'asse TH17 e il reclutamento chemochinico.

Un'osservazione rilevante riguarda YKL-40. Questo marcatore è stato associato in letteratura alla gravità dell'asma, alla riduzione del FEV1 e al rimodellamento bronchiale, in particolare allo spessore della membrana basale subepiteliale⁹¹. La sua scomparsa nella prima paziente e la persistenza nella seconda rafforzano l'ipotesi che l'EBC possa distinguere pazienti con diversa quota di rimodellamento residuo. Analogamente, la persistenza di MMP9 nella seconda paziente può essere interpretata come segnale di attività proteolitica e rimodellamento della matrice extracellulare.

Per monitorare l'efficacia di Tezepelumab (anticorpo monoclonale anti-TSLP) possiamo focalizzarci su pochi biomarcatori chiave ma biologicamente coerenti con il pathway TSLP e con i fenotipi che emergono anche dai dati.

TSLP è un master upstream cytokine; quindi, l'effetto del farmaco si riflette su più assi: Th2, Th17, neutrofilico ed epiteliale. Tra i biomarcatori primari è possibile utilizzare IL8/CXCL8, MMP9, YKL40 (CHI3L1): quest'ultimo è marker di rimodellamento bronchiale associato ad asma severa e sensibile alla riduzione dell'attivazione epiteliale. È possibile usare anche biomarcatori immunologici secondari che servono per capire il fenotipo immunologico residuo, come IL17A, MIP3β/CCL19, Resistin. Infine, anche biomarcatori epiteliali che sono indicatori della risposta dell'epitelio bronchiale, ad esempio NGAL/Lipocalin2 e TFF3, che è marker di riparazione mucosale.

6. CONCLUSIONI

L'EBC è una metodica già validata per altre patologie respiratorie come polmoniti, BPCO, malattie polmonari interstiziali. Sicuramente il campo in cui viene maggiormente utilizzato al momento è quello della ricerca nonostante i vantaggi di applicazione nella pratica clinica siano numerosi: è una metodica non invasiva che può essere ripetuta più volte con brevi intervalli, è utilizzabile a tutte le età, è piuttosto versatile come setting di attuazione, non altera la funzione respiratoria e non influenza l'infiammazione delle vie aeree durante la raccolta, i dispositivi sono facilmente trasportabili. Tutte queste caratteristiche lo rendono uno strumento molto valido per poter diagnosticare un processo di riacutizzazione asmatica piuttosto che valutare l'andamento in cronico durante il follow-up di tale patologia.

7. BIBLIOGRAFIA

1. 2025 GINA Strategy Report - Global Initiative for Asthma - GINA. <https://ginasthma.org/2025-gina-strategy-report/>.
2. Porsbjerg, C., Melén, E., Lehtimäki, L. & Shaw, D. Asthma. *Lancet* **401**, 858–873 (2023).
3. Oh, J. *et al.* Global, regional, and national burden of asthma and atopic dermatitis, 1990-2021, and projections to 2050: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Respir. Med.* **13**, 425–446 (2025).
4. Cura Di, A. *et al.* EPIDEMIOLOGIA ED IMPATTO SOCIO-ECONOMICO DELL'ASMA Aggiornamento 2024.
5. Nurmagambetov, T., Kuwahara, R. & Garbe, P. The Economic Burden of Asthma in the United States, 2008-2013. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **15**, 348–356 (2018).
6. Davitte, J. *et al.* Asthma control among treated US asthma patients in Practice Fusion's electronic medical record research database. *NPJ Prim. Care Respir. Med.* **33**, (2023).
7. Mims, J. W. Asthma: definitions and pathophysiology. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **5 Suppl 1**, S2–S6 (2015).
8. Koppelman, G. H. *et al.* Genetic and environmental risk factors for asthma: towards prevention. *Lancet Respir. Med.* **13**, 1011–1025 (2025).
9. Nawijn, M. C. *et al.* The Asthma Cell Atlas Identifies a Critical Role for Hillock-like Bronchial Epithelial Cells in Asthma. https://academic.oup.com/ajrccm/article/209/Supplement_1/A4911/8476040.
10. Melén, E. *et al.* Asthma Inception: Epidemiologic Risk Factors and Natural History Across the Life Course. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **210**, 737–754 (2024).
11. Jayasooriya, S. M. *et al.* Asthma: epidemiology, risk factors, and opportunities for prevention and treatment. *Lancet Respir. Med.* **13**, 725–738 (2025).
12. Chowdhury, N. U., Guntur, V. P., Newcomb, D. C. & Wechsler, M. E. Sex and gender in asthma. *Eur. Respir. Rev.* **30**, (2021).
13. Riemann, S., Matthys, I., Maes, T., Lapauw, B. & Brusselle, G. Obesity and asthma: obesity causes and aggravates asthma across the entire type-2 inflammation spectrum. *Eur. Respir. J.* 2502687 (2026) doi:10.1183/13993003.02687-2025.
14. Porsbjerg, C., Melén, E., Lehtimäki, L. & Shaw, D. Asthma. *Lancet* **401**, 858–873 (2023).
15. Burbank, A. J. *et al.* Environmental Justice and Allergic Disease: A Work Group Report of the AAAAI Environmental Exposure and Respiratory Health Committee and the Diversity, Equity and Inclusion Committee. *J. Allergy Clin. Immunol.* **151**, 656 (2022).
16. Rida, J. *et al.* Meteorological factors and climate change impact on asthma: a systematic review of epidemiological evidence. *J. Asthma* **61**, 1601–1610 (2024).
17. Borkar, N. A. *et al.* Nicotinic receptors in airway disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **326**, L149–L163 (2024).
18. Wills, T. A., Soneji, S. S., Choi, K., Jaspers, I. & Tam, E. K. E-cigarette use and respiratory disorders: an integrative review of converging evidence from epidemiological and laboratory studies. *Eur. Respir. J.* **57**, (2021).

19. Williams, E. J., Berthon, B. S., Stoodley, I., Williams, L. M. & Wood, L. G. Nutrition in Asthma. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **43**, 646–661 (2022).
20. Pittet, L. F. *et al.* Neonatal BCG vaccination to prevent asthma: Results from the MIS BAIR randomized controlled trial. *Pediatr. Allergy Immunol.* **36**, (2025).
21. Wang, R. *et al.* Asthma and obstructive sleep apnoea in adults and children - an up-to-date review. *Sleep Med. Rev.* **61**, (2022).
22. Chen, Y. *et al.* Association of depression, anxiety with asthma outcomes and allergic comorbidities: results from the National Health Interview Survey. *J. Affect. Disord.* **389**, (2025).
23. McCracken, J. L., Veeranki, S. P., Ameredes, B. T. & Calhoun, W. J. Diagnosis and Management of Asthma in Adults: A Review. *JAMA* **318**, 279–290 (2017).
24. Israel, E., Wechsler, M. E., Jackson, D. J. & Moore, W. C. Anti-cytokine biologics for asthma in adults. *Lancet* **406**, 2282–2294 (2025).
25. Gauvreau, G. M., Sehmi, R., Ambrose, C. S. & Griffiths, J. M. Thymic stromal lymphopoietin: its role and potential as a therapeutic target in asthma. *Expert Opin. Ther. Targets* **24**, 777–792 (2020).
26. Naz, S., Wajid, A., Malik, M. N. & Tipu, M. K. Insights on inflammatory pathways and their cross-talk: a comprehensive review on asthma. *Mol. Biol. Rep.* **53**, (2025).
27. Biologics and airway remodeling in asthma: early, late, and potential preventive effects. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/all.16382>.
28. Gonzalez-Uribe, V., Romero-Tapia, S. J. & Castro-Rodriguez, J. A. Clinical Medicine Asthma Phenotypes in the Era of Personalized Medicine. *J. Clin. Med.* **2023** **12**, 6207 (2023).
29. Holgate, S. T. *et al.* Asthma. *Nature Reviews Disease Primers* **2015** **1:1** **1**, 15025- (2015).
30. Bagnasco, D. *et al.* Evolving phenotypes to endotypes: is precision medicine achievable in asthma? *Expert Rev. Respir. Med.* **14**, 163–172 (2020).
31. Louis, R. *et al.* European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of asthma in adults. *European Respiratory Journal* **60**, (2022).
32. Stanojevic, S. *et al.* ERS/ATS technical standard on interpretive strategies for routine lung function tests. *Eur. Respir. J.* **60**, (2022).
33. Loewenthal, L. & Menzies-Gow, A. FeNO in Asthma. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **43**, 635–645 (2022).
34. Cloutier, M. M. *et al.* 2020 Focused Updates to the Asthma Management Guidelines: A Report from the National Asthma Education and Prevention Program Coordinating Committee Expert Panel Working Group. *J. Allergy Clin. Immunol.* **146**, 1217 (2020).
35. Cloutier, M. M. *et al.* Managing Asthma in Adolescents and Adults: 2020 Asthma Guideline Update From the National Asthma Education and Prevention Program. *JAMA* **324**, 2301–2317 (2020).
36. Rovsing, A. H., Savran, O. & Ulrik, C. S. Magnesium sulfate treatment for acute severe asthma in adults-a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in allergy* **4**, (2023).
37. Xiao, Q., Xue, B., Huang, Y. & Wang, M. Effectiveness of biologics for patients with severe asthma: study protocol for an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *BMJ Open* **15**, e096874 (2025).
38. Brusselle, G. G. & Koppelman, G. H. Biologic Therapies for Severe Asthma. *New England Journal of Medicine* **386**, 157–171 (2022).

39. Diver, S. *et al.* Effect of tezepelumab on airway inflammatory cells, remodelling, and hyperresponsiveness in patients with moderate-to-severe uncontrolled asthma (CASCADE): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Respir. Med.* **9**, 1299–1312 (2021).
40. Miralles-López, J. C. *et al.* Positioning of Tezepelumab in Severe Asthma. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **34**, 1–11 (2024).
41. Menzies-Gow, A. *et al.* Tezepelumab in Adults and Adolescents with Severe, Uncontrolled Asthma. *New England Journal of Medicine* **384**, 1800–1809 (2021).
42. Israel, E., Wechsler, M. E., Jackson, D. J. & Moore, W. C. Anti-cytokine biologics for asthma in adults. *Lancet* **406**, 2282–2294 (2025).
43. Hansen, S. *et al.* Clinical Response and Remission in Patients With Severe Asthma Treated With Biologic Therapies. *Chest* **165**, 253–266 (2024).
44. Menzies-Gow, A. *et al.* An expert consensus framework for asthma remission as a treatment goal. *J. Allergy Clin. Immunol.* **145**, 757–765 (2020).
45. Canonica, G. W. *et al.* SANI clinical remission definition: a useful tool in severe asthma management. *J. Asthma* **61**, 1593–1600 (2024).
46. Shackelford, A., Heaney, L. G., Redmond, C., McDowell, P. J. & Busby, J. Clinical remission attainment, definitions, and correlates among patients with severe asthma treated with biologics: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir. Med.* **13**, 23–34 (2025).
47. McDowell, P. J. *et al.* Clinical remission in severe asthma with biologic therapy: an analysis from the UK Severe Asthma Registry. *Eur. Respir. J.* **62**, (2023).
48. Patsiris, S., Exarchos, T. & Vlamos, P. Exhaled Breath Condensate (EBC): Is It a Viable Source of Biomarkers for Lung Diseases? *Adv. Exp. Med. Biol.* **1195**, 13–18 (2020).
49. Horváth, I. *et al.* Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur. Respir. J.* **26**, 523–548 (2005).
50. Bhide, A., Eldeeb, M. A., Pali, M., Muthukumar, S. & Prasad, S. MEASURE: Multiplex Exhaled Breath Condensate - Scanning Using Rapid Electro-Analytics. *ACS Sens.* **8**, 3408–3416 (2023).
51. Hunt, J. Exhaled breath condensate: An evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **110**, 28–34 (2002).
52. Loukides, S., Kontogianni, K., Hillas, G. & Horvath, I. Exhaled breath condensate in asthma: from bench to bedside. *Curr. Med. Chem.* **18**, 1432–1443 (2011).
53. Liang, Y., Yeligar, S. M. & Brown, L. A. S. Exhaled breath condensate: a promising source for biomarkers of lung disease. *ScientificWorldJournal.* **2012**, (2012).
54. Yoo, E. J., Kim, J. S., Stransky, S., Spivack, S. & Sidoli, S. Advances in proteomics methods for the analysis of exhaled breath condensate. *Mass Spectrom. Rev.* **43**, 713–722 (2024).
55. Hemmendinger, M., Sauvain, J. J., Hopf, N. B., Suárez, G. & Guseva Canu, I. Challenges in Quantifying 8-OHdG and 8-Isoprostane in Exhaled Breath Condensate. *Antioxidants (Basel)* **11**, (2022).
56. Malerba, M., Purghè, B., Ragnoli, B., Manfredi, M. & Baldanzi, G. Molecular profiling of exhaled breath condensate in respiratory diseases. *Ann. Med.* **57**, (2025).

57. Turbo 23 Gold cooler device for EBC | Medivac. <https://www.medivac.it/turbo-23-gold-cooler-device-for-ebc/>.
58. Volmet 20 Volumetric Device in EBC | Medivac. <https://www.medivac.it/volmet-20-volumetric-device-in-ebc/>.
59. Bhale, A. S. & Venkataraman, K. Leveraging knowledge of HDLs major protein ApoA1: Structure, function, mutations, and potential therapeutics. *Biomed. Pharmacother.* **154**, (2022).
60. Phillips, M. C. New insights into the determination of HDL structure by apolipoproteins: Thematic review series: high density lipoprotein structure, function, and metabolism. *J. Lipid Res.* **54**, 2034–2048 (2013).
61. APOA1 gene: MedlinePlus Genetics. <https://medlineplus.gov/genetics/gene/apoa1/>.
62. Ansell, B. J., Watson, K. E., Fogelman, A. M., Navab, M. & Fonarow, G. C. High-density lipoprotein function recent advances. *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, 1792–1798 (2005).
63. van der Vorst, E. P. C. High-Density Lipoproteins and Apolipoprotein A1. *Subcell. Biochem.* **94**, 399–420 (2020).
64. Barochia, A. V. *et al.* Serum apolipoprotein A-I and large high-density lipoprotein particles are positively correlated with FEV1 in atopic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **191**, 990–1000 (2015).
65. Yao, X., Gordon, E. M., Barochia, A. V., Remaley, A. T. & Levine, S. J. The A's Have It: Developing Apolipoprotein A-I Mimetic Peptides Into a Novel Treatment for Asthma. *Chest* **150**, 283–288 (2016).
66. Park, S. W. *et al.* Apolipoprotein A1 potentiates lipoxin A4 synthesis and recovery of allergen-induced disrupted tight junctions in the airway epithelium. *Clin. Exp. Allergy* **43**, 914–927 (2013).
67. Yao, X., Gordon, E. M., Barochia, A. V., Remaley, A. T. & Levine, S. J. The A's Have It: Developing Apolipoprotein A-I Mimetic Peptides Into a Novel Treatment for Asthma. *Chest* **150**, 283–288 (2016).
68. Yao, X., Gordon, E. M., Figueroa, D. M., Barochia, A. V. & Levine, S. J. Emerging Roles of Apolipoprotein E and Apolipoprotein A-I in the Pathogenesis and Treatment of Lung Disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **55**, 159–169 (2016).
69. Aihara, E., Engevik, K. A. & Montrose, M. H. Trefoil Factor Peptides and Gastrointestinal Function. *Annu. Rev. Physiol.* **79**, 357–380 (2017).
70. Yang, Y., Lin, Z., Lin, Q., Bei, W. & Guo, J. Pathological and therapeutic roles of bioactive peptide trefoil factor 3 in diverse diseases: recent progress and perspective. *Cell Death & Disease* **2022 13:1** **13**, 62- (2022).
71. Hoffmann, W. TFF (trefoil factor family) peptides and their potential roles for differentiation processes during airway remodeling. *Curr. Med. Chem.* **14**, 2716–2719 (2007).
72. Rossi, H. L. *et al.* TRANSLATIONAL REVIEW Trefoil Factor Family: A Troika for Lung Repair and Regeneration. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2021-0373TR> (2022) doi:10.1165/rcmb.2021-0373TR.
73. Hoffmann, W. Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and their Different Roles in the Mucosal Innate Immune Defense and More: An Update. *Curr. Med. Chem.* **28**, 7387–7399 (2021).

74. LeSimple, P. *et al.* Trefoil factor family 3 peptide promotes human airway epithelial ciliated cell differentiation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **36**, 296–303 (2007).
75. Gong, R., Wang, Z., Tan, G. & Huang, Y. Bioinformatics analysis revealed underlying molecular mechanisms associated with asthma severity and identified GABAergic related pathway as a potential therapy for Th2-high endotype asthma. *Heliyon* **10**, (2024).
76. Weste, J. *et al.* Different Molecular Forms of TFF3 in the Human Respiratory Tract: Heterodimerization with IgG Fc Binding Protein (FCGBP) and Proteolytic Cleavage in Bronchial Secretions. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).
77. Yang, Y., Lin, Z., Lin, Q., Bei, W. & Guo, J. Pathological and therapeutic roles of bioactive peptide trefoil factor 3 in diverse diseases: recent progress and perspective. *Cell Death Dis.* **13**, (2022).
78. Sun, Y. *et al.* YKL-40 mediates airway remodeling in asthma via activating FAK and MAPK signaling pathway. *Cell Cycle* **19**, 1378–1390 (2020).
79. Chupp, G. L. *et al.* A Chitinase-like Protein in the Lung and Circulation of Patients with Severe Asthma. *New England Journal of Medicine* **357**, 2016–2027 (2007).
80. Tang, H. *et al.* YKL-40 induces IL-8 expression from bronchial epithelium via MAPK (JNK and ERK) and NF- κ B pathways, causing bronchial smooth muscle proliferation and migration. *J. Immunol.* **190**, 438–446 (2013).
81. Specjalski, K., Romantowski, J. & Niedoszytko, M. YKL-40 as a possible marker of neutrophilic asthma. *Front. Med. (Lausanne)*. **10**, (2023).
82. Liu, L. *et al.* Chitinase-like protein YKL-40 correlates with inflammatory phenotypes, anti-asthma responsiveness and future exacerbations. *Respir. Res.* **20**, (2019).
83. Pan, R. *et al.* Diagnostic value of YKL-40 for patients with asthma: A meta-analysis. *Allergy Asthma Proc.* **42**, E167–E173 (2021).
84. Ober, C. *et al.* Effect of Variation in CHI3L1 on Serum YKL-40 Level, Risk of Asthma, and Lung Function. *New England Journal of Medicine* **358**, 1682–1691 (2008).
85. Jin, Y. *et al.* Association between YKL-40 and asthma: a systematic meta-analysis. *Sleep Breath.* **26**, 1011–1022 (2022).
86. *ALLEGATO I RIASSUNTO DELLE CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO.*
87. Graham, B. L. *et al.* Standardization of Spirometry 2019 Update. An Official American Thoracic Society and European Respiratory Society Technical Statement. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **200**, E70–E88 (2019).
88. Dweik, R. A. *et al.* An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FeNO) for Clinical Applications. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 602 (2011).
89. Menzies-Gow, A. *et al.* Tezepelumab in Adults and Adolescents with Severe, Uncontrolled Asthma. *N. Engl. J. Med.* **384**, 1800–1809 (2021).
90. Corren, J. *et al.* Tezepelumab in Adults with Uncontrolled Asthma. *N. Engl. J. Med.* **377**, 936–946 (2017).

8. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il dottor Diego Bagnasco e la dottoressa Benedetta Bondi per il supporto di questi ultimi mesi nella stesura della tesi. È stato un progetto molto interessante, spero possa essere utile nella pratica clinica futura.