

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
MEDICINA E CHIRURGIA



TESI DI LAUREA

***“Modulazione dell’amfiregulina durante terapia anti-IL-5
nell’asma eosinofilico grave”***

RELATORE:

Chiar.mo Prof. Diego Bagnasco

CANDIDATA:

Adamo Fiorella

CORRELATRICE:

Chiar.ma Dott.ssa Benedetta Bondi

Anno accademico 2025-2026

*Alle mie nonne,
che con il loro amore
mi hanno insegnato il
valore della cura*

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
1.1 Asma e asma grave	5
1.2 Fenotipi ed endotipi dell'asma	6
1.3. L'asse il-5/eosinofilo nell'asma grave.....	9
<i>1.3.1 Funzione effettrice, priming eosinofilo e remodeling</i>	<i>10</i>
<i>1.3.2 Pleiotropia dell'il-5 e razionale terapeutico.....</i>	<i>13</i>
<i>1.3.3 Oltre l'infiammazione: verso la riparazione tissutale</i>	<i>13</i>
1.4 Amfiredulina: ruolo fisiologico, produzione e implicazioni nell'apparato respiratorio	14
1.5 YKL-40.....	18
1.6 Trattamento dell'asma e asma grave	19
<i>1.6.1 Terapia biologica.....</i>	<i>21</i>
<i>1.6.2 Mepolizumab.....</i>	<i>22</i>
2. OBIETTIVI DELLO STUDIO	26
3. MATERIALI E METODI	27
3.1 Disegno dello studio.....	27
3.2 Parametri clinici, funzionali e laboratoristici	28
3.3 Determinazione biomarcatori sierici	29
3.4. Analisi statistica.....	30
4. RISULTATI	31
4.1 Caratteristiche della popolazione al basale.....	31
4.2 Risposta clinica e funzionale al trattamento	32
4.3 Variazione dei livelli sierici di areg e ykl-40	34
4.4 Correlazioni tra biomarcatori e parametri funzionali.....	35
4.5 Analisi post hoc dei pattern di risposta dei biomarcatori.....	36

5. DISCUSSIONE	37
6. CONCLUSIONI.....	43
7. BIBLIOGRAFIA	45
8. RINGRAZIAMENTI	50

1. INTRODUZIONE

1.1 ASMA E ASMA GRAVE

L'asma è una patologia respiratoria cronica caratterizzata da un'elevata eterogeneità clinica e da una prevalenza variabile nei diversi Paesi, generalmente stimata tra l'1% e il 29% della popolazione.¹

Secondo la Global Initiative for Asthma (GINA), essa è definita dalla presenza di una storia di sintomi respiratori ricorrenti, quali respiro sibilante, dispnea, senso di costrizione toracica e tosse, associati a una limitazione variabile del flusso aereo espiratorio. Tale limitazione è generalmente reversibile, spontaneamente o in seguito a trattamento farmacologico.

L'eterogeneità dell'asma si riflette anche nella diversa gravità della malattia e nella variabilità della risposta al trattamento. Sebbene nella maggior parte dei pazienti una terapia adeguata consenta di ottenere un buon controllo clinico, una quota minoritaria presenta una forma persistente e di più difficile gestione. La definizione operativa di asma grave può variare parzialmente in relazione ai criteri adottati dalle diverse linee guida internazionali, pur basandosi su principi ampiamente condivisi.

Secondo la Global Initiative for Asthma (GINA), l'asma grave costituisce un sottogruppo dell'asma difficile da trattare. È definita come una forma di malattia che rimane non controllata nonostante una buona aderenza a un trattamento ottimizzato con corticosteroidi inalatori ad alte dosi associati a un beta2-agonista a lunga durata d'azione (ICS-LABA), dopo la correzione dei principali fattori contribuenti, oppure che peggiora quando il trattamento ad alte dosi viene ridotto. Prima di formulare la diagnosi di asma grave è pertanto necessario confermare la diagnosi di asma e ricercare eventuali fattori modificabili, tra cui una tecnica inalatoria inadeguata, una scarsa aderenza terapeutica, l'esposizione al fumo e la presenza di comorbidità.¹

Una definizione sostanzialmente concordante, sebbene formulata in modo differente, è stata proposta dalla European Respiratory Society e dall'American Thoracic Society (ERS/ATS). Secondo le linee guida ERS/ATS, dopo la conferma della diagnosi e il trattamento delle eventuali comorbidità, viene definita grave l'asma che richiede corticosteroidi inalatori ad alte dosi associati a un secondo farmaco di controllo e/o corticosteroidi sistemici per evitare che diventi non controllata, oppure che rimane non controllata nonostante tale terapia.²

Pur presentando alcune differenze nella formulazione e nei criteri operativi, entrambe le definizioni sottolineano che la gravità dell'asma non deve essere determinata esclusivamente dall'intensità dei sintomi o dal livello di controllo osservato in un dato momento. Essa deve essere valutata dopo la conferma diagnostica, l'ottimizzazione del trattamento e la correzione, per quanto possibile, dei principali fattori responsabili del mancato controllo.

Sebbene interessi soltanto una minoranza della popolazione asmatica, l'asma grave determina una quota rilevante della morbidità e dell'utilizzo complessivo delle risorse sanitarie associate alla malattia, in particolare per la maggiore frequenza di riacutizzazioni e ospedalizzazioni e per l'esposizione cumulativa ai corticosteroidi sistemici. Inoltre, recenti dati longitudinali indicano che essa è associata a un rischio di mortalità significativamente superiore rispetto alle forme lievi o moderate.^{1,2}

Sebbene rappresenti una minoranza della popolazione asmatica — stimata tra il 3,7% e circa l'8% dei pazienti con asma, a seconda della definizione e della metodologia impiegate — l'asma grave è responsabile di una quota sproporzionata della morbidità complessiva della malattia, per la frequenza delle riacutizzazioni, l'elevato utilizzo di risorse sanitarie e l'aumentato rischio di mortalità ad essa associati.^{1,3}

1. 2 FENOTIPI ED ENDOTIPI DELL'ASMA

Come già evidenziato, l'asma rappresenta una patologia caratterizzata da una notevole eterogeneità nella presentazione clinica, nella storia naturale, nei meccanismi fisiopatologici e nella risposta al trattamento. Tale variabilità ha progressivamente portato al superamento della concezione dell'asma come singola entità patologica, favorendo invece l'identificazione di differenti sottogruppi di pazienti caratterizzati da specifiche peculiarità cliniche e biologiche^{4,5}

Per meglio descrivere questa eterogeneità è stato introdotto il concetto di **fenotipo**, con il quale si identifica l'insieme delle caratteristiche osservabili derivanti dall'interazione tra il patrimonio genetico dell'individuo e i fattori ambientali. Nell'ambito dell'asma, la caratterizzazione fenotipica prende in considerazione differenti elementi, quali l'età di insorgenza della malattia, la presenza di allergia, le comorbidità, i fattori scatenanti, la frequenza delle riacutizzazioni, la funzione respiratoria e le caratteristiche dell'infiammazione delle vie aeree.

Sulla base di tali caratteristiche sono stati descritti diversi fenotipi clinici, tra cui l'asma allergico ad esordio precoce, l'asma eosinofilico ad esordio tardivo, l'asma associato all'obesità e l'asma associato al fumo di sigaretta. Tali categorie non devono tuttavia essere considerate entità rigidamente separate, poiché nello stesso paziente possono coesistere caratteristiche appartenenti a fenotipi differenti e queste possono inoltre modificarsi nel corso della malattia.^{4,5}

La sola classificazione fenotipica non consente, ciononostante, di identificare necessariamente il meccanismo biologico responsabile delle manifestazioni cliniche osservate. Per tale motivo è stato introdotto il concetto di **endotipo**, definito come un sottotipo di una determinata condizione patologica caratterizzato da uno specifico meccanismo fisiopatologico.⁶ L'identificazione degli endotipi consente quindi di approfondire le basi molecolari e cellulari della malattia e assume particolare rilevanza nell'ambito della medicina di precisione, poiché permette di individuare specifici bersagli terapeutici^{4,6}

Sulla base dei principali meccanismi immuno-infiammatori coinvolti, vengono attualmente riconosciuti due grandi profili endotipici: l'asma caratterizzato da infiammazione di tipo 2, o T2-high, e l'asma caratterizzato da una ridotta o assente espressione dei marcatori dell'infiammazione di tipo 2, indicato come T2-low o non-T2.^{5,7}

L'infiammazione di tipo 2 è sostenuta dall'interazione tra la risposta immunitaria adattativa e quella innata. I linfociti T helper di tipo 2 (Th2) e le cellule linfoidi innate di tipo 2 (ILC2) rappresentano importanti sorgenti di citochine di tipo 2, tra cui IL-4, IL-5 e IL-13. Inoltre, in risposta ad allergeni, virus, batteri e altri stimoli irritativi, l'epitelio bronchiale può rilasciare le cosiddette *alarmins*, tra cui IL-25, IL-33 e thymic stromal lymphopoietin (TSLP), capaci di amplificare ulteriormente la risposta immunitaria di tipo 2.¹

Dal punto di vista clinico e biologico, la presenza di un'infiammazione di tipo 2 è frequentemente associata a un incremento degli eosinofili nel sangue periferico e/o nell'espettorato, a un aumento della frazione esalata di ossido nitrico (FeNO) e, in alcuni pazienti, alla presenza di atopia e incremento delle IgE. Tali parametri rivestono particolare importanza nella caratterizzazione dei pazienti affetti da asma grave e nell'orientare la scelta delle terapie biologiche.^{1,4}

All'interno dell'asma T2-high possono essere riconosciuti differenti fenotipi, tra cui l'asma allergico a esordio precoce, l'asma eosinofilico a esordio tardivo e la malattia respiratoria esacerbata dall'aspirina (AERD). In particolare, l'asma eosinofilico rappresenta un fenotipo di grande interesse nell'ambito dell'asma grave ed è caratterizzato dalla presenza e dall'attivazione degli eosinofili nelle vie aeree.^{5,8} Esso può associarsi a frequenti riacutizzazioni e a comorbidità quali la rinosinusite cronica con poliposi nasale (CRSwNP), la dermatite atopica e la malattia respiratoria esacerbata dall'aspirina.⁸

L'asma T2-low, al contrario, costituisce un gruppo maggiormente eterogeneo e meno definito dal punto di vista molecolare. Può essere associato a un'inflammation prevalentemente neutrofilica oppure a un pattern paucigranulocitico e presenta attualmente una minore disponibilità di biomarcatori validati e di terapie biologiche specificamente dirette contro i meccanismi coinvolti. Tra i mediatori proposti nella sua patogenesi sono state descritte citochine correlate all'attivazione neutrofilica, quali IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17 e IL-23, sebbene i meccanismi alla base di questo endotipo rimangano meno chiaramente definiti rispetto all'asma T2-high.⁷

Parallelamente alla classificazione endotipica, l'analisi della cellularità dell'espettorato indotto consente di distinguere quattro principali fenotipi infiammatori delle vie aeree: eosinofilico, neutrofilico, misto granulocitico e paucigranulocitico. Tale classificazione, basata sulla prevalenza delle diverse popolazioni cellulari presenti nelle vie aeree, non deve tuttavia essere considerata perfettamente sovrapponibile alla distinzione tra T2-high e T2-low, poiché il pattern cellulare rappresenta soltanto una delle manifestazioni dei complessi meccanismi molecolari sottostanti.^{5,7}

La progressiva caratterizzazione dei differenti endotipi ha inoltre determinato una crescente attenzione verso l'impiego di biomarcatori, ossia parametri biologici misurabili in grado di fornire informazioni sui processi patologici sottostanti e, in alcuni casi, di contribuire alla previsione della risposta terapeutica. Nell'asma, i biomarcatori maggiormente impiegati nella pratica clinica per la valutazione dell'inflammation di tipo 2 comprendono la conta degli eosinofili nel sangue periferico, la FeNO, le IgE totali e specifiche e la documentazione della sensibilizzazione allergica. Nessuno di questi biomarcatori, è in grado singolarmente di identificare in maniera completa il meccanismo patologico responsabile dell'asma, rendendo necessaria la loro interpretazione integrata con le caratteristiche cliniche del paziente.^{1,4}

Nell'ambito dell'asma eosinofilo grave, particolare rilevanza assume l'interleuchina 5 (IL-5), una delle principali citochine coinvolte nella biologia degli eosinofili e nella risposta infiammatoria di tipo 2. La crescente comprensione dell'asse IL-5/eosinofilo ha permesso lo sviluppo di terapie biologiche mirate contro IL-5 o il suo recettore, contribuendo in maniera sostanziale all'evoluzione dell'approccio terapeutico all'asma eosinofilo grave.⁸

1.3. L'ASSE IL-5/EOSINOFILO NELL'ASMA GRAVE

L'asma è una malattia eterogenea delle vie aeree, nella quale l'ostruzione bronchiale deriva dall'interazione tra alterazioni funzionali e processi infiammatori. La riduzione del calibro delle vie aeree è sostenuta dalla contrazione della muscolatura liscia, dall'edema della parete e dall'accumulo di secrezioni mucose; a questi fenomeni si associa l'iperresponsività bronchiale, espressione dell'aumentata tendenza delle vie aeree a restringersi in risposta a differenti stimoli. Nelle forme persistenti possono inoltre svilupparsi modificazioni strutturali della parete bronchiale, complessivamente definite *airway remodeling*, comprendenti metaplasia delle cellule caliciformi, deposizione subepiteliale di collagene, iperplasia della muscolatura liscia e incremento della vascolarizzazione.⁹

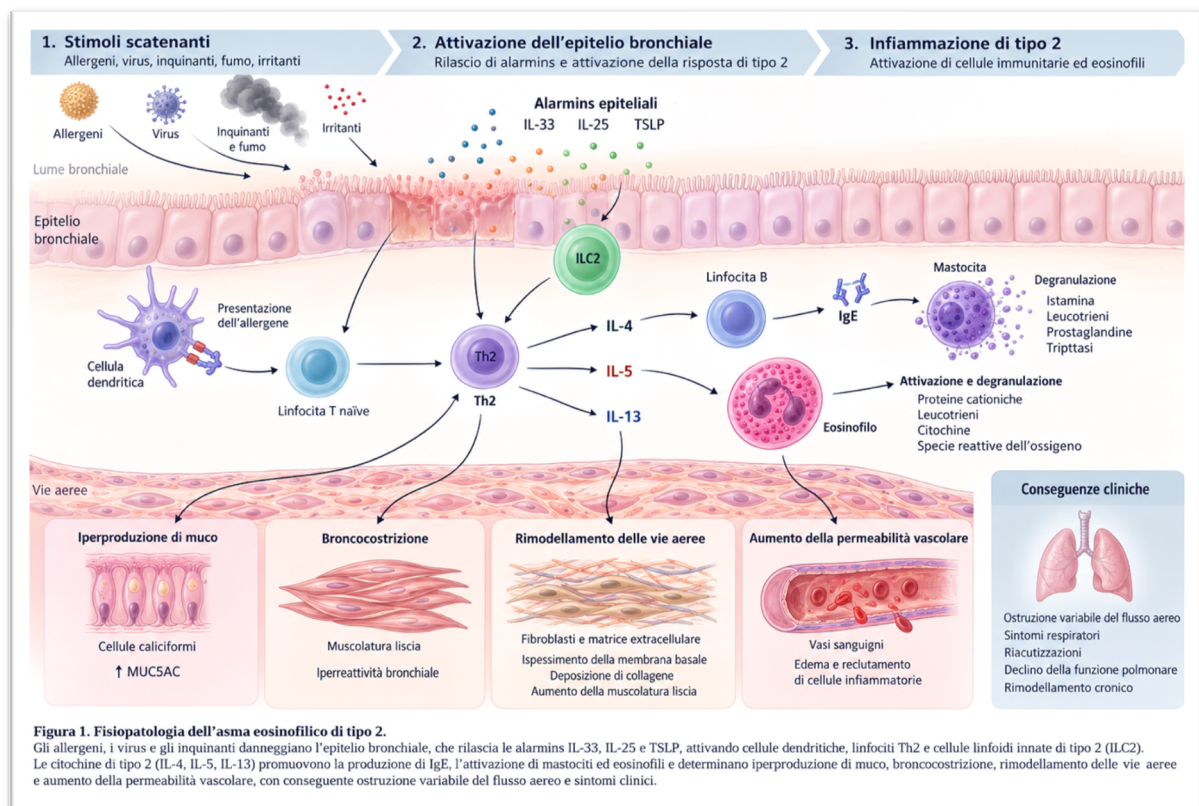


Figura 1- principali meccanismi della risposta infiammatoria di tipo 2 nell'asma eosinofilo

La marcata variabilità clinica dell'asma riflette la presenza di differenti meccanismi patogenetici sottostanti. Tra gli endotipi maggiormente caratterizzati vi è quello associato a infiammazione di tipo 2 (T2-high), frequentemente accompagnato da eosinofilia delle vie aeree e del sangue periferico. La risposta T2 coinvolge principalmente le citochine IL-4, IL-5 e IL-13, che svolgono funzioni differenti ma complementari: IL-4 partecipa in particolare alla risposta allergica e alla produzione di IgE, IL-13 contribuisce alla metaplasia delle cellule caliciformi e all'iperresponsività bronchiale, mentre IL-5 presenta una relazione particolarmente stretta con la componente eosinofila dell'infiammazione. L'esistenza di endotipi non T2 conferma, tuttavia, che l'asse IL-5–eosinofilo rappresenta un meccanismo fondamentale di una parte dell'asma, e non una spiegazione universale dell'intera malattia.^{8,9}

1.3.1 FUNZIONE EFFETTRICE, PRIMING EOSINOFILICO E REMODELING

Un ruolo importante nell'avvio della risposta T2 è esercitato dall'epitelio bronchiale, che costituisce non soltanto una barriera fisica, ma anche una componente attiva dell'immunità delle vie aeree. Allergeni, agenti infettivi, inquinanti e altri stimoli possono indurre le cellule epiteliali a liberare mediatori quali IL-25, IL-33 e thymic stromal lymphopoietin (TSLP). Queste citochine favoriscono l'attivazione della risposta adattativa di tipo 2, attraverso le cellule dendritiche e i linfociti T helper 2 (Th2), e contemporaneamente stimolano le **cellule linfoidi innate di tipo 2 (ILC2)**. Th2 e ILC2 rappresentano le principali sorgenti cellulari di IL-5 nell'asma, sebbene la produzione di questa citochina sia stata descritta anche da mastociti, cellule natural killer (NKT) e dagli stessi eosinofili.^{9,10}

In questa rete di interazioni, l'IL-5 ha un ruolo centrale soprattutto per il suo stretto rapporto con la biologia dell'eosinofilo. La sua rilevanza dipende dalla capacità di intervenire in numerose fasi della biologia dell'eosinofilo: promuove infatti la differenziazione e la maturazione dei progenitori eosinofili, ne favorisce la proliferazione e la mobilitazione dal midollo osseo e, nelle cellule mature, ne sostiene la migrazione, l'attivazione e la sopravvivenza. Per questo motivo l'IL-5 non determina semplicemente un incremento numerico degli eosinofili, ma contribuisce anche al mantenimento del loro potenziale funzionale all'interno della risposta infiammatoria.^{11,12}

L'eosinofiloipoiesi avviene principalmente nel midollo osseo, dove l'IL-5 favorisce la differenziazione terminale dei progenitori e la successiva disponibilità di eosinofili maturi nel circolo periferico. Nell'asma è stata tuttavia descritta anche una possibile eosinofiloipoiesi locale, o *in situ eosinophilopoiesis*, a livello della mucosa bronchiale, nella quale progenitori

ematopoietici CD34⁺ possono maturare localmente sotto l'influenza di citochine eosinofilo-poietiche. Questo fenomeno suggerisce che l'infiltrazione eosinofila delle vie aeree possa essere sostenuta non esclusivamente dal reclutamento di cellule mature dal circolo, ma anche da meccanismi locali di differenziazione.¹⁰

Il reclutamento degli eosinofili nelle vie aeree è ulteriormente favorito dalla cooperazione dell'IL-5 con chemochine eosinofilo-selettive, in particolare le eotassine. Una volta raggiunto il compartimento bronchiale, l'IL-5 ne prolunga la permanenza attraverso l'inibizione dell'apoptosi e ne facilita l'adesione e la migrazione nella matrice extracellulare. Nella review di *Pelaia et al.* vengono inoltre riportate maggiori concentrazioni di IL-5 ed eotassine nell'espettorato di pazienti durante le riacutizzazioni e una relazione inversa tra livelli di IL-5 nell'espettorato e quota di eosinofili apoptotici, elementi che sostengono il ruolo della citochina nel mantenimento dell'infiltrato eosinofilo.¹⁰

Gli effetti dell'IL-5 sono mediati dal recettore dell'IL-5 (IL-5R), costituito da una subunità α specifica, IL-5R α , e da una catena β comune, condivisa con i recettori per IL-3 e GM-CSF. Il legame della citochina determina la formazione del complesso recettoriale funzionale e l'attivazione di diverse vie intracellulari, tra cui JAK/STAT, PI3K, ERK e p38 MAPK, coinvolte nella regolazione della proliferazione, sopravvivenza, migrazione e attivazione eosinofila. La via NF- κ B contribuisce inoltre all'espressione di segnali anti-apoptotici e pro-infiammatori.¹¹

Una volta reclutati nel tessuto bronchiale, gli eosinofili non rappresentano soltanto un biomarker dell'infiammazione T2, ma assumono una vera funzione effettrice. L'attivazione eosinofila determina il rilascio di un ampio spettro di mediatori, comprendenti citochine, chemochine, fattori di crescita, derivati lipidici e proteine granulari. Tra queste ultime figurano la major basic protein (MBP), l'eosinophil cationic protein (ECP) e l'eosinophil-derived neurotoxin (EDN); in particolare, MBP ed ECP possiedono attività citotossica e possono contribuire al danno delle cellule e dei tessuti delle vie aeree.¹³

Il significato patogenetico dell'eosinofilo non sembra tuttavia dipendere esclusivamente dalla sua numerosità. Già gli studi sperimentali più datati avevano mostrato come una riduzione dell'eosinofilia non fosse necessariamente accompagnata da una riduzione proporzionale dell'iperresponsività bronchiale, suggerendo che anche lo stato di attivazione dell'eosinofilo e la quantità e il tipo di mediatori rilasciati siano biologicamente rilevanti. Questo

concetto è importante perché impedisce di identificare semplicisticamente “numero di eosinofili” e con “attività patogenetica degli eosinofili”.^{9,13}

Un aspetto emerso più recentemente riguarda il cosiddetto priming eosinofilico. *Luo et al.* In uno studio del 2024, hanno esaminato eosinofili provenienti da pazienti con asma eosinofilico grave, confrontandone differenti caratteristiche funzionali prima e dopo antagonismo dell’IL-5 con mepolizumab. Gli eosinofili dei pazienti con asma eosinofilico mostravano una maggiore capacità migratoria e una maggiore risposta a stimoli quali IL-5, eotassina-1 e PGD₂; dopo trattamento con mepolizumab tali risposte risultavano attenuate, insieme a marker di attivazione e degranulazione. Gli autori interpretano questi dati indicando IL-5 come un importante fattore di *priming*, capace cioè di aumentare la predisposizione dell’eosinofilo a rispondere a ulteriori stimoli.¹⁴

Si tratta comunque di dati meccanicistici recenti, che richiedono ulteriori conferme prima di poter essere generalizzati. Lo studio di *Luo et al.* utilizza infatti gruppi relativamente contenuti e una numerosità variabile a seconda dell’analisi eseguita: ad esempio, per il rapporto tra eosinofili nell’espettorato e nel sangue sono stati analizzati 14 pazienti con asma eosinofilico e 9 con asma non eosinofilico, mentre diversi esperimenti funzionali sono stati condotti su sottogruppi di circa 6–16 campioni; il confronto pre/post mepolizumab è stato inoltre effettuato dopo un mese dalla prima somministrazione di 100 mg. Tali caratteristiche non riducono l’interesse biologico del lavoro, ma suggeriscono prudenza nell’estendere i risultati a tutti i pazienti con asma eosinofilico grave.¹⁴

Anche l’ipotesi di un coinvolgimento dell’IL-5 nei processi strutturali delle vie aeree va interpretata con la stessa cautela. Dati sperimentali e clinici precedenti hanno associato l’asse IL-5–eosinofilo al remodeling bronchiale, e *Pelaia et al.* Riportano, infatti, che il blocco dell’IL-5 è stato associato a una riduzione della deposizione di alcune componenti della matrice extracellulare, quali procollagene III, tenascina e lumican.¹¹ Più recentemente, *Luo et al.* hanno osservato, dopo antagonismo dell’IL-5, modificazioni trascrizionali negli eosinofili riguardanti il pathway del TGF- β , con riduzione dell’espressione di componenti quali SMAD2 e SMAD3; trattandosi di un singolo studio meccanicistico, questi risultati suggeriscono un possibile collegamento tra IL-5, funzione profibrotica dell’eosinofilo e remodeling, ma richiedono ulteriori conferme.¹⁴

1.3.2 PLEIOTROPIA DELL'IL-5 E RAZIONALE TERAPEUTICO

Parallelamente, una recente revisione ha proposto una visione dell'IL-5 più ampia rispetto al tradizionale modello esclusivamente eosinofilo-centrico. *Buchheit et al.* riportano evidenze di effetti diretti o indiretti dell'IL-5 su diverse popolazioni cellulari, tra cui cellule epiteliali, mastociti, basofili, ILC2 e fibroblasti. Gli stessi autori sottolineano, tuttavia, come per molti degli effetti osservati in vivo non sia ancora possibile distinguere con certezza quelli attribuibili a un'azione diretta dell'IL-5 su queste cellule da quelli secondari alla modulazione dell'infiammazione eosinofila. È quindi più corretto considerare questa possibile pleiotropia dell'IL-5 come un ambito emergente di ricerca, piuttosto che come un meccanismo definitivamente acquisito.¹²

L'insieme di questi dati colloca l'asse IL-5–eosinofilo tra i meccanismi centrali della patogenesi dell'asma eosinofilo grave. L'IL-5 regola la disponibilità, la sopravvivenza, la migrazione e l'attività funzionale degli eosinofili, mentre queste cellule, una volta attivate nelle vie aeree, contribuiscono al mantenimento dell'infiammazione attraverso il rilascio di mediatori citotossici e pro-infiammatori. La rilevanza di tale asse è ulteriormente sostenuta dall'efficacia clinica del suo blocco: nei pazienti con asma grave selezionati per eosinofilia sistemica e frequenti riacutizzazioni, il trattamento con mepolizumab è stato associato a una riduzione di circa il 50% della frequenza delle riacutizzazioni; nello studio SIRIUS è stata inoltre documentata una riduzione mediana del 50% della dose di corticosteroidi orali. Questi risultati costituiscono un importante collegamento tra il ruolo biologico dell'IL-5 e la sua rilevanza terapeutica, che verrà approfondita nella sezione dedicata.^{9,10}

1.3.3 OLTRE L'INFIAMMAZIONE: VERSO LA RIPARAZIONE TISSUTALE

Accanto ai circuiti che sostengono l'infiammazione, alcuni elementi della risposta T2 sembrano partecipare anche ai processi di riparazione tissutale. In particolare, le ILC2, oltre a produrre IL-5 e IL-13, sono in grado di secernere amfiredulina (AREG), alla quale è stato attribuito un ruolo nella riparazione del tessuto polmonare dopo un danno. Tale osservazione introduce un ulteriore livello di complessità nella risposta di tipo 2, suggerendo un possibile collegamento tra infiammazione e meccanismi riparativi delle vie aeree. Il ruolo dell'amfiredulina e il suo possibile significato nell'asma saranno approfonditi separatamente nel paragrafo successivo.⁹

1.4 AMFIREGULINA: RUOLO FISILOGICO, PRODUZIONE E IMPLICAZIONI NELL'APPARATO RESPIRATORIO

L'amfiregulina (*amphiregulin*, AREG) è un fattore di crescita appartenente alla famiglia dell'*epidermal growth factor* (EGF) e rappresenta uno dei ligandi dell'*epidermal growth factor receptor* (EGFR). Viene sintetizzata come precursore associato alla membrana cellulare e può successivamente essere rilasciata mediante clivaggio proteolitico. Attraverso il legame con EGFR, AREG è in grado di modulare processi quali proliferazione e differenziamento cellulare, assumendo un ruolo particolarmente rilevante nel mantenimento dell'integrità dei tessuti e nei meccanismi di riparazione conseguenti a danno o infiammazione. La sua attività biologica dipende tuttavia dal contesto cellulare e tissutale, potendo contribuire sia alla rigenerazione fisiologica sia, in condizioni di stimolazione persistente, a fenomeni di riparazione aberrante e fibrosi.¹⁵

La produzione di AREG non è limitata alle cellule strutturali. Oltre a essere costitutivamente espressa da diversi tipi di cellule epiteliali e mesenchimali, può essere prodotta da numerose popolazioni del sistema immunitario, soprattutto nell'ambito delle risposte di tipo 2. Tra queste sono stati descritti mastociti, basofili, eosinofili, cellule linfoide innate di tipo 2 (ILC2), cellule dendritiche, linfociti T CD4⁺ attivati e specifiche sottopopolazioni di linfociti T regolatori¹⁵. Questa molteplicità di sorgenti cellulari suggerisce che AREG rappresenti un importante elemento di comunicazione tra compartimento immunitario e compartimento strutturale, consentendo alla risposta immune di influenzare direttamente i processi di omeostasi e riparazione tissutale.

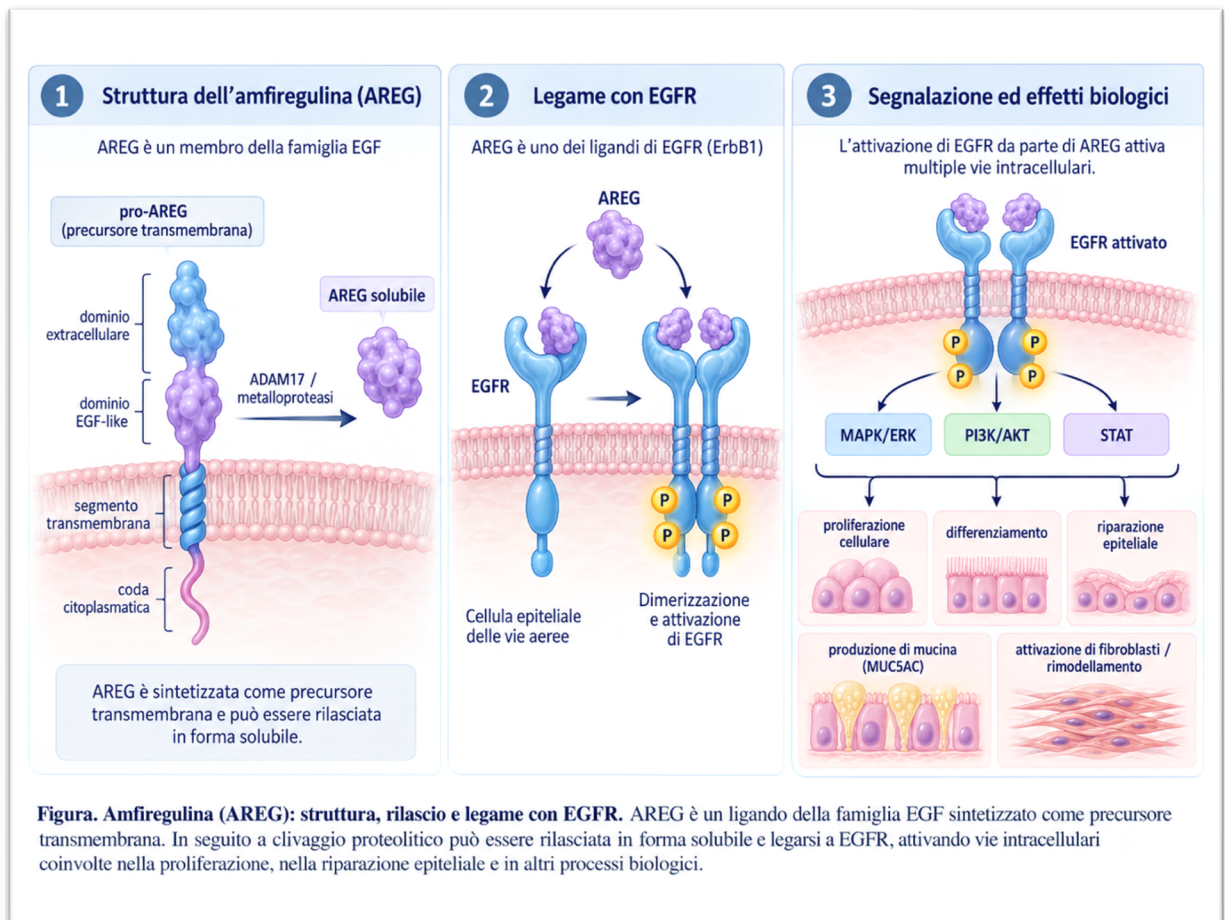


Figura 2- struttura, rilascio e interazione dell'amfiregulina (areg) con il recettore EGFR.

A livello dell'apparato respiratorio, la funzione fisiologica di AREG è stata evidenziata in modo particolare nei processi di riparazione conseguenti a danno epiteliale. In un modello murino di infezione influenzale, *Monticelli et al.* hanno identificato una popolazione di cellule linfoidi innate residenti nel polmone caratterizzata da elevata espressione di AREG. La deplezione di tali cellule determinava perdita dell'integrità dell'epitelio delle vie aeree, compromissione della funzione polmonare e alterazione dei processi riparativi; la somministrazione di AREG ai topi depleti era invece in grado di ripristinare l'integrità epiteliale e favorire il recupero tissutale.¹⁶ Questi risultati hanno quindi contribuito a definire AREG come un importante mediatore tissue-protective, coinvolto nel ripristino dell'omeostasi polmonare dopo un danno acuto.

Il ruolo rigenerativo di AREG è stato ulteriormente caratterizzato da *Kaiser et al.* In seguito a infezione influenzale, le cellule T regolatorie polmonari produttrici di AREG vengono reclutate nelle aree interessate dal danno e interagiscono con una popolazione di cellule

mesenchimali Coll14a1⁺EGFR⁺ responsiva ad AREG. La segnalazione EGFR a livello di questo compartimento mesenchimale contribuisce alla corretta organizzazione della nicchia rigenerativa alveolare e sostiene la proliferazione e il differenziamento delle cellule epiteliali alveolari di tipo II (AT2); l'alterazione della segnalazione EGFR nelle cellule mesenchimali si associa infatti ad una compromissione della proliferazione delle AT2 e del normale rimodellamento polmonare dopo la risoluzione dell'infezione.¹⁷ AREG sembra pertanto inserirsi in un circuito immunitario–mesenchimale–epiteliale coinvolto nella rigenerazione del tessuto polmonare.

Nel contesto dell'asma, tuttavia, la persistenza di segnali normalmente deputati alla riparazione può contribuire ad alterazioni strutturali delle vie aeree. Un'importante fonte di AREG è rappresentata dai mastociti. *Okumura et al.* hanno dimostrato che l'aggregazione del recettore ad alta affinità per le IgE (FcεRI) induce nei mastociti umani la produzione e la secrezione di AREG. In un modello cellulare epiteliale delle vie aeree, AREG aumentava l'espressione dei geni delle mucine MUC5AC; inoltre, nelle biopsie bronchiali dei pazienti con asma, l'espressione di AREG nei mastociti risultava aumentata rispetto ai controlli e correleva significativamente con l'entità dell'iperplasia delle cellule caliciformi¹⁸. Tali osservazioni suggeriscono pertanto un possibile coinvolgimento di AREG nella regolazione dell'ipersecrezione mucosa caratteristica della malattia asmatica.

Anche il compartimento mesenchimale costituisce un bersaglio della segnalazione mediata da AREG. *Wang et al.* hanno osservato che il cross-linking delle IgE nei mastociti umani induce un marcato incremento dell'espressione di AREG, seguito dalla secrezione della proteina; AREG è stata inoltre identificata nei mastociti polmonari di pazienti con asma. In esperimenti *in vitro*, la molecola si è dimostrata capace di promuovere la proliferazione di fibroblasti polmonari umani primari e di aumentare in tali cellule l'espressione di *c-fos*, gene coinvolto nella risposta proliferativa.¹⁹ Questi dati suggeriscono che, nel contesto di un'inflammation persistente, il rilascio locale di AREG possa contribuire all'interazione tra cellule immunitarie e fibroblasti e inserirsi nei processi di rimodellamento delle vie aeree.

Particolarmente rilevante nell'asma eosinofilo è il rapporto tra AREG, IL-5 ed eosinofili. Tale relazione non sembra configurarsi come un semplice asse lineare nel quale IL-5 determini direttamente la produzione di AREG, ma piuttosto come l'interazione tra differenti componenti della risposta immunitaria di tipo 2. Le cellule linfoide innate polmonari descritte da *Monticelli et al.*, ad esempio, sono in grado di produrre elevate quantità di IL-5 e IL-13

in risposta alla stimolazione da parte di IL-33 e, parallelamente, presentano un'elevata espressione di AREG, attraverso la quale contribuiscono alla riparazione dell'epitelio respiratorio.¹⁶ Gli stessi autori sottolineano come le funzioni riparative mediate da AREG non siano semplicemente sovrapponibili a quelle delle citochine di tipo 2, suggerendo la presenza di circuiti biologici distinti ma interconnessi.

Un altro elemento utile a comprendere il rapporto tra AREG ed eosinofili deriva dall'eterogeneità dei linfociti Th2 memory patogenici (Tpath2). *Hirahara et al.*, riprendendo i dati sperimentali di *Morimoto et al.*, descrivono infatti sottopopolazioni Th2 memory fenotipicamente e funzionalmente distinte: alcune caratterizzate da un'elevata produzione di IL-5, e una specifica sottopopolazione Tpath2 produttrice di AREG, coinvolta nella risposta fibrotica. L'AREG prodotta da quest'ultima popolazione può agire attraverso EGFR sugli eosinofili, riprogrammandoli verso uno stato infiammatorio caratterizzato da aumentata produzione di osteopontina, componente non collagenica della matrice extracellulare coinvolta nei processi fibrotici. IL-5 e AREG sembrano quindi agire attraverso circuiti cellulari distinti, ma capaci di cooperare nella risposta eosinoflica e nei processi fibrotici.²⁰

Il significato biologico di AREG risulta dunque fortemente dipendente dal contesto in cui la molecola agisce. In condizioni di danno acuto contribuisce al mantenimento dell'integrità epiteliale e alla rigenerazione polmonare, mentre nell'ambito di un'inflammatione allergica persistente può agire su cellule epiteliali, cellule mesenchimali, fibroblasti ed eosinofili, partecipando a circuiti associati all'ipersecrezione mucosa e al rimodellamento tissutale¹⁵⁻²⁰ Il rapporto con IL-5 sembra pertanto configurarsi soprattutto come una cooperazione tra differenti componenti della risposta di tipo 2, piuttosto che come una relazione causale diretta tra IL-5 e AREG.

1.5 YKL-40

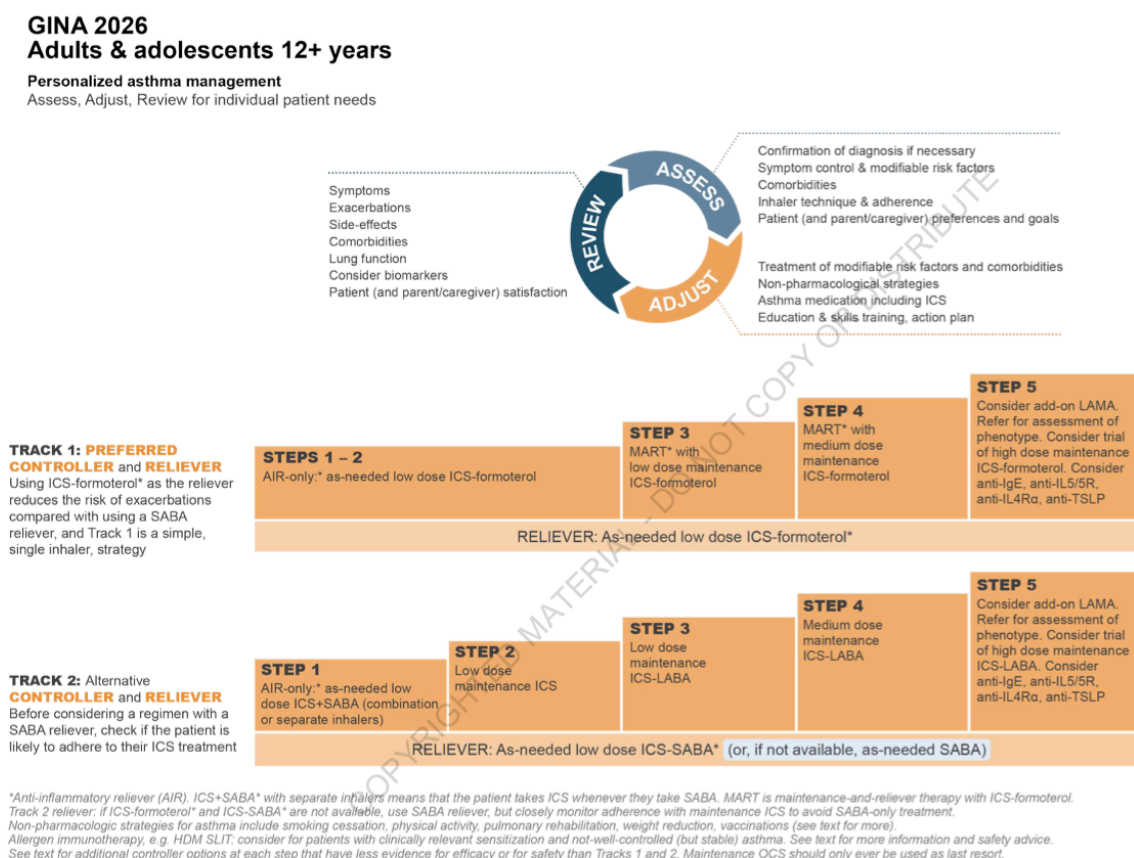
Un ulteriore mediatore di interesse nell'ambito dei processi infiammatori e strutturali delle vie aeree è YKL-40, glicoproteina appartenente alla famiglia delle chitinasi-like e codificata dal gene *CHI3L1*. Nell'asma, livelli aumentati di YKL-40 sono stati associati a una maggiore severità di malattia, alla compromissione della funzione respiratoria e a diversi aspetti del rimodellamento delle vie aeree.²¹ Anche nell'ambito più ampio della letteratura sul rimodellamento epiteliale nell'asma, YKL-40 viene annoverata tra le glicoproteine la cui espressione elevata correla con la severità di malattia, con il rimodellamento delle vie aeree e un aumentato spessore della membrana basale reticolare, sebbene la sua precisa funzione biologica non sia ancora del tutto chiarita.²² In particolare, nei pazienti con asma grave, concentrazioni circolanti più elevate di YKL-40 sono state correlate ad alterazioni morfologiche delle vie aeree e a un maggiore declino longitudinale del FEV₁.²³ Oltre al suo possibile ruolo come biomarcatore, alcune evidenze sperimentali suggeriscono un coinvolgimento diretto di YKL-40 nei processi di rimodellamento, attraverso effetti sulla proliferazione e migrazione della muscolatura liscia bronchiale, sulla transizione epitelio-mesenchimale e sulla fibrosi subepiteliale, con il coinvolgimento delle vie di segnalazione FAK e MAPK.²⁴

Di particolare interesse è inoltre il rapporto tra YKL-40 e la risposta dell'epitelio bronchiale. È stato infatti dimostrato che lo stress meccanico associato alla broncocostrizione può aumentare l'espressione di *CHI3L1* e la secrezione di YKL-40 da parte delle cellule epiteliali bronchiali, attraverso meccanismi in parte dipendenti dalla via EGFR–MEK/ERK.²⁵ Ulteriori studi hanno mostrato come *CHI3L1* possa attivare, attraverso il complesso IL-13R α 2–TMEM219, segnali intracellulari comprendenti MAPK/ERK e indurre la produzione epiteliale di HB-EGF, un ligando della famiglia dell'epidermal growth factor.²⁶ Coerentemente con questo quadro, dati più recenti ottenuti in un diverso contesto patologico hanno mostrato che *CHI3L1* è in grado non solo di autoindurre la propria espressione, ma anche di alimentare un circuito di attivazione di EGFR e dei suoi ligandi, rafforzando l'ipotesi di uno stretto legame funzionale tra questa proteina e la segnalazione EGFR-dipendente.²⁷

1.6 TRATTAMENTO DELL'ASMA E ASMA GRAVE

Il trattamento dell'asma persegue tre obiettivi principali: il controllo dei sintomi, la prevenzione delle riacutizzazioni e del declino della funzionalità respiratoria, e la minimizzazione degli effetti avversi legati alla terapia. Le linee guida GINA propongono un approccio a gradini (step-up), che viene modulato in base al livello di controllo raggiunto dal paziente e al suo profilo di rischio individuale.

La terapia di fondo dell'asma si basa sui corticosteroidi inalatori (ICS), ai quali possono essere associati broncodilatatori β_2 -agonisti a lunga durata d'azione (LABA) quando il controllo clinico lo richiede. Negli adulti e negli adolescenti, l'approccio attualmente preferito prevede spesso l'impiego della combinazione ICS-formoterolo: nei quadri più lievi può essere utilizzata al bisogno, mentre nei livelli terapeutici successivi viene impiegata sia come terapia di mantenimento sia come trattamento al bisogno, secondo la strategia MART (Maintenance and Reliever Therapy).¹



*AIR: Anti-inflammatory reliever; Ig: immunoglobulin; ICS: inhaled corticosteroids; HDM: house dust mite; IL: interleukin; LABA: long-acting β_2 -agonist; LA antagonist; MART: maintenance-and-reliever therapy with ICS-formoterol; OCS: oral corticosteroid; SABA: short-acting β_2 -agonist; SLIT: sublingual immunotherapy. For initial asthma treatment, see Box 4-4 (p.81) and Box 4-5 (p.82). For low, medium and high ICS doses, see Box 4-2 (p.77). For Track 1

Figura 3- step terapeutici secondo linee guida GINA 2026

Quando, nonostante una terapia inalatoria adeguata, il controllo dell'asma non viene raggiunto, il primo passo non è intensificare il trattamento, ma capirne le ragioni: va verificata la tecnica inalatoria, l'aderenza terapeutica, l'eventuale esposizione a fattori aggravanti e la presenza di comorbidità non ancora gestite. Solo a questo punto, se necessario, si può considerare l'aggiunta di ulteriori farmaci, come gli antagonisti muscarinici a lunga durata d'azione (LAMA). L'uso prolungato di corticosteroidi orali, invece, andrebbe evitato il più possibile, dato il peso non trascurabile degli effetti avversi legati alla loro esposizione cumulativa.¹

È nei pazienti con asma grave, quelli che restano non controllati anche dopo aver ottimizzato la terapia inalatoria ad alte dosi, che la caratterizzazione del fenotipo e dell'endotipo infiammatorio diventa decisiva per orientare la scelta terapeutica. È proprio in questo contesto che, quando il fenotipo lo consente, trovano spazio le **terapie biologiche**, mirate verso specifici pathway infiammatori: IgE, IL-5 e il suo recettore, IL-4/IL-13, TSLP.¹

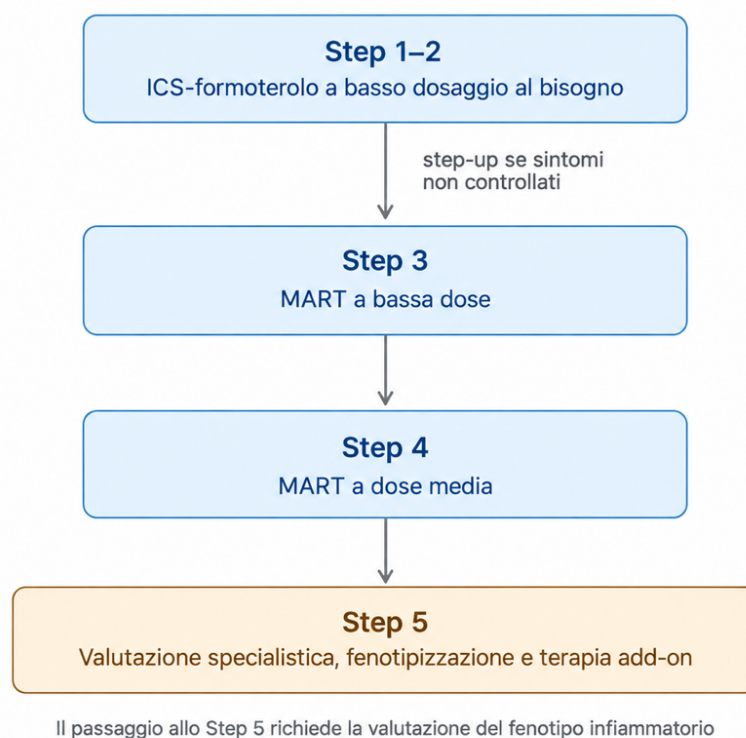


Figura 4- approccio terapeutico stepwise nell'asma secondo le raccomandazioni GINA

1.6.1 TERAPIA BIOLOGICA

Negli ultimi anni, l'introduzione delle terapie biologiche ha profondamente modificato l'approccio terapeutico all'asma grave, consentendo di affiancare alla terapia farmacologica convenzionale strategie selettivamente dirette contro specifici mediatori coinvolti nella patogenesi della malattia. Nei pazienti con asma grave non controllato nonostante un trattamento ottimizzato con corticosteroidi inalatori ad alte dosi associati a β 2-agonisti a lunga durata d'azione (ICS-LABA), dopo aver verificato l'aderenza terapeutica, la corretta tecnica inalatoria e la presenza di eventuali fattori contribuenti modificabili, può essere presa in considerazione una terapia biologica *add-on*. La scelta del trattamento viene orientata dalla caratterizzazione clinica e biologica del paziente, tenendo conto del fenotipo infiammatorio, dei biomarcatori disponibili, della storia di riacutizzazioni e delle eventuali comorbidità associate. Le attuali strategie biologiche comprendono anticorpi diretti contro IgE, IL-4R α , IL-5/IL-5R α e TSLP, riflettendo la progressiva applicazione dei principi della medicina di precisione al trattamento dell'asma grave.^{1,28}

Nell'ambito dell'asma eosinofilico grave, particolare rilevanza assume il blocco dell'asse IL-5/IL-5R, in considerazione del ruolo centrale esercitato dall'IL-5 nella biologia dell'eosinofilo, precedentemente descritto. Le strategie terapeutiche dirette contro tale pathway possono agire neutralizzando direttamente la citochina oppure interferendo con il suo recettore. Mepolizumab e reslizumab sono anticorpi monoclonali diretti contro IL-5, mentre benralizumab riconosce la subunità α del recettore dell'IL-5 (IL-5R α); più recentemente si è aggiunto depemokimab, anticorpo anti-IL-5 a lunga durata d'azione. Secondo Global Initiative for Asthma (GINA), l'eleggibilità alla terapia anti-IL-5/IL-5R α è generalmente associata alla presenza di riacutizzazioni severe nell'anno precedente e a un'elevata conta eosinofila ematica, secondo valori soglia definiti dal farmaco e dal contesto regolatorio. Nei trial randomizzati considerati dalle linee guida, tali strategie hanno determinato complessivamente una riduzione di circa il 47–54% delle riacutizzazioni severe, confermando la rilevanza terapeutica di questo pathway nei pazienti adeguatamente selezionati.¹

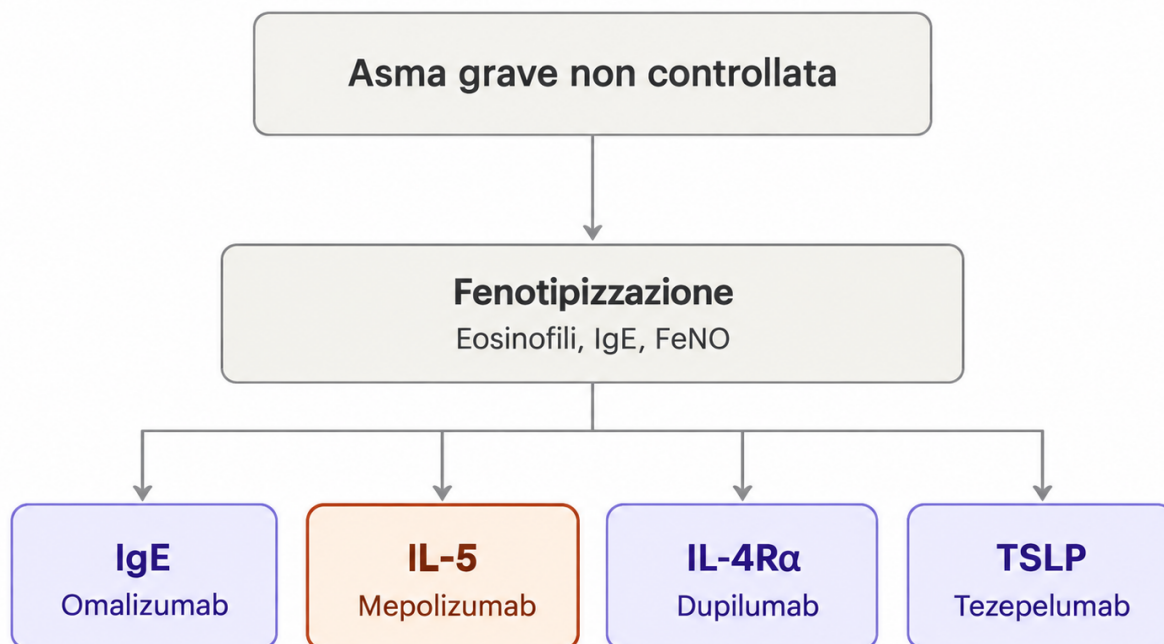


Figura 5- principali target delle terapie biologiche nell'asma grave dopo caratterizzazione fenotipica

1.6.2 MEPOLIZUMAB

Tra i farmaci diretti contro questo asse, particolare attenzione è rivolta a mepolizumab, anticorpo monoclonale umanizzato IgG1κ che si lega selettivamente all'IL-5 e ne impedisce l'interazione con IL-5Rα, interferendo così con uno dei principali segnali responsabili della maturazione, sopravvivenza e attivazione degli eosinofili.²⁹ Nell'adulto con asma eosinofilico grave, mepolizumab viene somministrato alla dose di 100 mg per via sottocutanea ogni quattro settimane.¹ Il razionale farmacologico del blocco di IL-5 era stato documentato già negli studi preclinici: *Hart et al.* (2001) mostrarono, in primati non umani, che mepolizumab era in grado di determinare una marcata e prolungata riduzione degli eosinofili circolanti e di attenuarne il reclutamento a livello delle vie aeree, fornendo una delle basi sperimentali per il successivo sviluppo clinico del farmaco.³⁰

Le prime evidenze cliniche realmente significative su mepolizumab sono emerse quando il farmaco è stato studiato in pazienti selezionati per la presenza di un'inflammatione eosinofilica persistente. In uno dei primi studi condotti in pazienti con asma eosinofilico refrattario, il trattamento con mepolizumab determinò una significativa riduzione delle riacutizzazioni severe rispetto al placebo, accompagnata da una marcata diminuzione degli eosinofili nel sangue periferico e nell'espettorato. Nello stesso studio non furono invece osservate differenze significative per FEV₁ o iperresponsività bronchiale, suggerendo che l'effetto

dell'antagonismo dell'IL-5 fosse particolarmente evidente sulla componente eosinofila e sul rischio di riacutizzazione piuttosto che in termini di funzionalità respiratoria.³¹

Nello stesso periodo, uno studio condotto in pazienti con asma prednisone-dipendente ed eosinofilia persistente dell'espettorato dimostrò che mepolizumab consentiva una significativa riduzione degli eosinofili e della dose di prednisone, mantenendo al contempo il controllo della malattia.³² Nel loro insieme, gli studi di Haldar e Nair contribuirono quindi a evidenziare l'importanza della corretta selezione fenotipica dei pazienti e a consolidare il ruolo dell'eosinofilia come elemento fondamentale nell'identificazione dei soggetti maggiormente suscettibili di beneficiare dell'inibizione dell'IL-5.

L'efficacia clinica di mepolizumab è stata successivamente confermata nello studio di fase III MENSA, condotto su 576 pazienti con riacutizzazioni ricorrenti ed evidenza di infiammazione eosinofila, nonostante il trattamento con alte dosi di corticosteroidi inalatori. Rispetto al placebo, mepolizumab ha determinato una riduzione del tasso di riacutizzazioni del 47% con la formulazione endovenosa e del 53% con la formulazione sottocutanea da 100 mg; il trattamento si è inoltre associato a un miglioramento della funzione respiratoria, del controllo dell'asma e della qualità di vita.³³ Tali risultati hanno confermato che la marcata riduzione della componente eosinofila indotta dal blocco dell'IL-5, può tradursi in benefici clinicamente rilevanti, in particolare in termini di prevenzione delle riacutizzazioni.

Un altro beneficio clinicamente rilevante di mepolizumab riguarda la possibilità di ridurre l'esposizione prolungata ai corticosteroidi sistemici. Nello studio SIRIUS, condotto in pazienti con asma eosinofilo grave dipendenti da glucocorticoidi orali, mepolizumab consentì una riduzione mediana del 50% della dose di corticosteroidi orale. Nonostante la diminuzione dell'esposizione corticosteroidica, il trattamento si associò anche a una riduzione del 32% del tasso annualizzato di riacutizzazioni e a un miglioramento del controllo dei sintomi³⁴. Tale effetto *steroid-sparing* assume particolare rilevanza considerando l'importante burden di effetti avversi associato all'impiego prolungato dei corticosteroidi sistemici.

Alle evidenze provenienti dagli studi clinici randomizzati si sono successivamente affiancati i dati derivanti dalla pratica clinica real-world. Nel 2018 *Bagnasco et al.* hanno analizzato le caratteristiche di 65 pazienti trattati con mepolizumab presso sei centri di asma grave dell'Italia nord-occidentale, confrontandole con quelle delle popolazioni incluse nei principali trial regolatori. I pazienti trattati real word presentavano una conta eosinofila basale media di 653 cellule/ μ L, superiore a quella riportata nelle popolazioni dei principali studi

registrativi, evidenziando come i soggetti trattati nella pratica clinica possano presentare una marcata espressione del fenotipo eosinofilo ³⁵. L'efficacia di mepolizumab nel contesto real-world è stata successivamente valutata dallo stesso gruppo in una più ampia coorte multicentrica italiana comprendente 138 pazienti trattati per almeno 12 mesi. Dopo un anno di terapia, la frequenza media delle riacutizzazioni si era ridotta da 3,8 a 0,7 episodi per anno, mentre la conta eosinofila ematica media era diminuita da 822 a 117 cellule/ μ L. Parallelamente, la percentuale di pazienti dipendenti da corticosteroidi sistemici era passata dall'80% al 28% e la dose media giornaliera di prednisone da 10,1 a 2,0 mg, confermando anche nella pratica clinica un significativo beneficio del trattamento sulla malattia e sull'esposizione corticosteroidea.³⁶

Questi risultati risultano coerenti con l'efficacia documentata nei trial randomizzati, pur non essendo direttamente confrontabili con essi. Nello studio MENSA, ad esempio, mepolizumab 100 mg per via sottocutanea aveva determinato una riduzione del 53% del tasso di riacutizzazioni rispetto al placebo, ³³ mentre nello studio real-world italiano la riduzione delle riacutizzazioni era calcolata rispetto alla situazione clinica precedente al trattamento. Le differenze nel disegno degli studi e nelle caratteristiche delle popolazioni non consentono quindi di concludere che l'efficacia sia maggiore nel contesto real-world; mostrano piuttosto come i benefici osservati nei trial possano essere confermati anche in una popolazione più eterogenea e rappresentativa della pratica clinica.

Accanto agli effetti clinici e alla riduzione dell'eosinofilia, studi più recenti hanno iniziato a valutare se il trattamento con mepolizumab possa associarsi anche a modificazioni strutturali delle vie aeree. Più recentemente, lo studio multicentrico MESILICO ha indagato gli effetti di mepolizumab sulle modificazioni strutturali delle vie aeree mediante broncoscopia e biopsia bronchiale prima e dopo il trattamento. Dopo 12 mesi di terapia sono stati osservati un miglioramento della funzione respiratoria e del controllo dell'asma e una riduzione delle riacutizzazioni; nei 34 pazienti per i quali erano disponibili biopsie bronchiali appaiate è stata inoltre documentata una significativa riduzione dello spessore della membrana sub-basale, dell'area e dello spessore della muscolatura liscia bronchiale, del danno epiteliale e dell'infiltrazione eosinofila tissutale.³⁷ La riduzione dello spessore della muscolatura liscia correlava inoltre con la diminuzione degli eosinofili localizzati nella sottomucosa. Questi risultati suggeriscono che gli effetti biologici dell'antagonismo dell'IL-5 possano estendersi oltre la sola riduzione dell'eosinofilia periferica e associarsi anche a modificazioni di alcuni processi coinvolti nel remodeling delle vie aeree; trattandosi tuttavia di evidenze

relativamente recenti e provenienti da popolazioni selezionate, il loro significato necessita di ulteriori conferme.

Nel complesso, le evidenze disponibili consolidano quindi il ruolo di mepolizumab nel trattamento dell'asma eosinofilo grave, documentandone la capacità di ridurre l'eosinofilia e la frequenza delle riacutizzazioni e, nei pazienti corticosteroide-dipendenti, di diminuire la necessità di glucocorticoidi sistemici³¹⁻³⁴. Parallelamente, i dati più recenti suggeriscono che l'inibizione dell'asse IL-5–eosinofilo possa associarsi a modificazioni biologiche e strutturali più ampie rispetto alla sola riduzione quantitativa degli eosinofili^{28,37}. Rimangono ancora non completamente definiti gli effetti del trattamento sui mediatori coinvolti nell'interazione tra infiammazione eosinofila, risposta epiteliale e processi di riparazione tissutale. In questo contesto assume particolare interesse l'amfìregulina, mediatore coinvolto nei processi di risposta al danno e riparazione delle vie aeree e prodotto da differenti popolazioni cellulari. Poiché mepolizumab non agisce direttamente su AREG, la valutazione della sua modulazione durante la terapia anti-IL-5 può contribuire a esplorare aspetti della risposta biologica che vanno oltre la sola soppressione dell'eosinofilia.

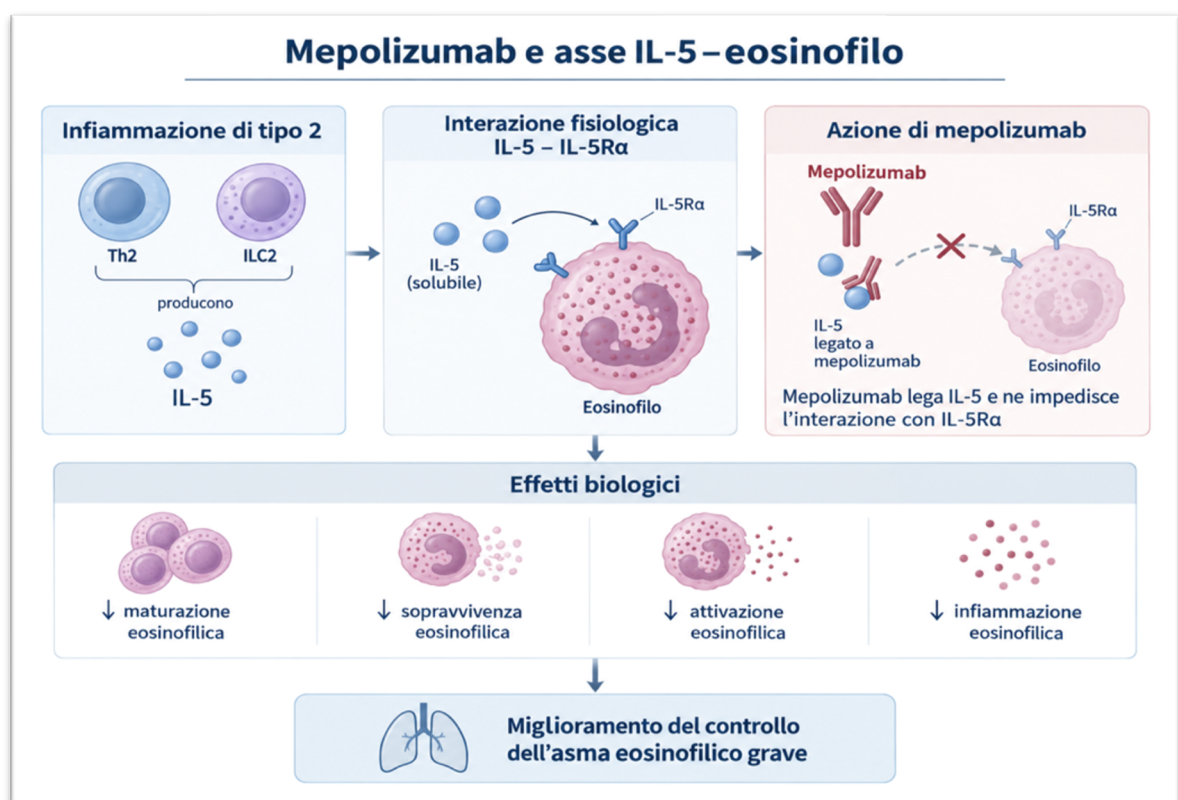


Figura 6–meccanismo d'azione di mepolizumab sull'asse il-5–eosinofilo

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il principale obiettivo del presente studio è stato valutare la modulazione dei livelli sierici di amfiredulina (AREG) durante il trattamento con mepolizumab in pazienti affetti da asma eosinofilo grave, confrontando le concentrazioni del biomarcatore rilevate prima dell'inizio della terapia (T0) e dopo 12 mesi di trattamento (T12).

Accanto a tale obiettivo principale, sono state condotte alcune analisi esplorative volte a contestualizzare la variazione dell'AREG nell'ambito della risposta complessiva al blocco dell'IL-5. In particolare, sono state valutate le modificazioni dei principali parametri clinici, funzionali e infiammatori della malattia e le eventuali associazioni tra la variazione dell'AREG e le modificazioni dei principali parametri spirometrici, con particolare riferimento a FEV₁ e FVC.

È stato inoltre analizzato l'andamento dei livelli sierici di YKL-40 (CHI3L1), biomarcatore associato a processi infiammatori e di rimodellamento delle vie aeree, ed esplorata la relazione tra le variazioni di YKL-40 e quelle dell'amfiredulina nel corso del trattamento. Tale analisi nasce dall'ipotesi che i due biomarcatori possano riflettere aspetti differenti ma biologicamente interconnessi della risposta epiteliale e tissutale durante il blocco dell'IL-5. In particolare, AREG e YKL-40 sono stati ricondotti a pathway che convergono a livello della segnalazione epiteliale correlata alla famiglia dell'EGFR. Tale associazione deve tuttavia essere interpretata esclusivamente in termini esplorativi e non implica l'esistenza di una relazione causale diretta tra i due mediatori.

3. MATERIALI E METODI

3.1 DISEGNO DELLO STUDIO

Il presente studio è uno studio osservazionale multicentrico condotto in un contesto di pratica clinica reale, volto a valutare la modulazione dei livelli sierici di amfiredulina (AREG) durante il trattamento con mepolizumab in pazienti affetti da asma grave eosinofila.

Lo studio ha coinvolto i centri specialistici per il trattamento dell'asma grave dell'Università di Genova e dell'Università di Verona. I pazienti sono stati valutati longitudinalmente in due momenti: al momento dell'inizio del trattamento con mepolizumab (T0) e dopo 12 mesi di terapia (T12). Il disegno appaiato dello studio ha consentito di confrontare, per ciascun paziente, i parametri rilevati prima e dopo il trattamento, utilizzando quindi ogni soggetto come controllo di sé stesso.

Lo studio è stato condotto nell'ambito del registro SANI (Severe Asthma Network Italy), network nazionale dedicato alla raccolta sistematica di dati clinici relativi ai pazienti con asma grave³⁸, in conformità ai principi della Dichiarazione di Helsinki³⁹ e previa approvazione del Comitato Etico. Tutti i partecipanti avevano fornito consenso informato scritto all'inclusione nel registro e all'utilizzo dei dati anonimizzati a fini di ricerca.

Sono stati inclusi complessivamente 19 pazienti adulti affetti da asma grave eosinofila, seguiti presso i due centri partecipanti allo studio. La diagnosi di asma grave era stata posta secondo i criteri delle linee guida GINA e tutti i pazienti risultavano candidati al trattamento con terapia biologica al momento della valutazione basale.

Tutti i soggetti hanno ricevuto mepolizumab alla dose di 100 mg per via sottocutanea ogni quattro settimane, in aggiunta alla terapia inalatoria di mantenimento. Per l'inclusione nell'analisi era richiesta la disponibilità delle valutazioni cliniche e dei campioni sierici sia al basale sia dopo 12 mesi di trattamento.

La popolazione comprendeva 10 donne e 9 uomini, con età media di $57,8 \pm 6,5$ anni.

3.2 PARAMETRI CLINICI, FUNZIONALI E LABORATORISTICI

Per ciascun paziente sono stati raccolti al basale e dopo 12 mesi di trattamento i principali parametri clinici, funzionali e laboratoristici utilizzati per valutare l'andamento della malattia.

In particolare, sono stati considerati:

- conta assoluta degli eosinofili nel sangue periferico;
- frazione di ossido nitrico esalato (FeNO);
- punteggio dell'Asthma Control Test (ACT);
- numero annuale di riacutizzazioni;
- dose giornaliera di corticosteroidi orali di mantenimento (OCS);
- parametri spirometrici: FEV₁, FVC e rapporto FEV₁/FVC;
- livelli sierici di amfiredulina (AREG).
- Livelli sierici YKL40

Le riacutizzazioni sono state definite secondo i criteri GINA. La spirometria è stata eseguita in tre manovre consecutive, in conformità con le linee guida della Società Respiratoria Europea,⁴⁰ utilizzando uno spirometro Medi-Soft (Medi-Soft, Sorinnes, Belgio). Entrambe le misurazioni del FeNO (bronchiale e alveolare) sono state eseguite utilizzando HypAir FeNO (Medi-Soft, Belgio, Sorinnes) a una portata standard di 50 ml/s per il FeNO bronchiale e a portate crescenti 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 Society.⁴¹ Per quanto riguarda il FeNO, un valore relativo alla valutazione a 12 mesi di un paziente non risultava disponibile; l'analisi di tale parametro è stata pertanto condotta su 18 pazienti.

Parametro	Unità/scala	T0	T12
Eosinofili ematici	cellule/ μ L	✓	✓
FEV ₁	% del predetto	✓	✓
FVC	% del predetto	✓	✓
FEV ₁ /FVC	%	✓	✓
FeNO	ppb	✓	✓
Corticosteroidi orali	mg/die	✓	✓
Riacutizzazioni	eventi/anno	✓	✓
ACT	punteggio	✓	✓
AREG sierica	pg/mL	✓	✓
YKL40 sierica	ng/mL	✓	✓

Tabella 1- parametri valutati durante lo studio

3.3 DETERMINAZIONE BIOMARCATORI SIERICI

I livelli sierici di amfìregulina (AREG) e YKL-40 sono stati determinati su campioni di sangue periferico raccolti al momento dell'inizio del trattamento con mepolizumab e dopo 12 mesi di terapia. Dopo la centrifugazione, il siero è stato suddiviso in aliquote e conservato a -80°C fino al momento dell'analisi.

La concentrazione sierica di AREG è stata determinata mediante saggio immunoenzimatico quantitativo sandwich ELISA, utilizzando il kit *Quantikine Human Amphiregulin Immunoassay* (DAR00, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Con la stessa metodica sono stati misurati i livelli sierici di YKL-40, utilizzando il kit *Quantikine Human Chitinase 3-like 1 Immunoassay* (DC3L10, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Tutte le determinazioni sono state eseguite secondo le istruzioni del produttore.

Ogni campione è stato analizzato in duplicato e le concentrazioni sieriche sono state espresse in pg/mL per AREG e in ng/mL per YKL-40.

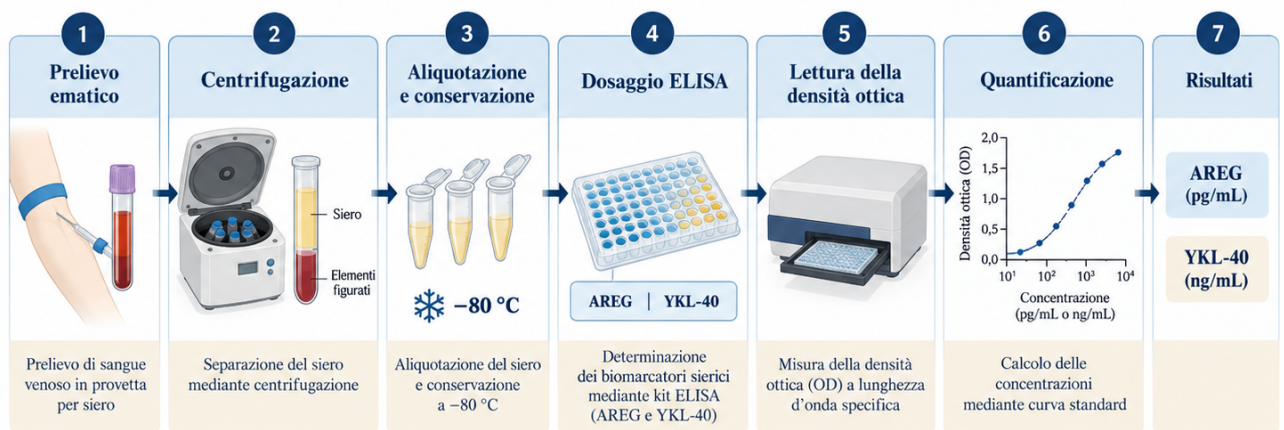


Figura 7-schema del processo di determinazione dei biomarcatori sierici AREG e YKL-40.

3.4. ANALISI STATISTICA

Per ciascun paziente sono stati confrontati i principali parametri clinici, funzionali e laboratoristici rilevati all'inizio del trattamento con mepolizumab (T0) e dopo 12 mesi di terapia (T12). Le variabili quantitative sono state descritte prevalentemente mediante mediana e intervallo interquartile (IQR), ad eccezione dell'età, espressa come media e deviazione standard. Le variabili quantitative sono state riportate come frequenze assolute e percentuali. I livelli sierici di amfiredulina e i parametri clinici rilevati prima del trattamento e dopo 12 mesi di mepolizumab sono stati confrontati mediante test di Wilcoxon per dati appaiati, utilizzando un test esatto a due code.

Particolare attenzione è stata riservata all'andamento dei livelli sierici di amfiredulina. Per ciascun paziente, la variazione rispetto al basale è stata calcolata come differenza tra il valore misurato dopo 12 mesi e quello registrato prima dell'inizio della terapia. Le relazioni tra le variazioni dei biomarcatori e quelle di FEV₁ e FVC sono state analizzate mediante il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman. Ulteriori analisi esplorative hanno riguardato le associazioni tra i livelli basali dei biomarcatori e i parametri clinici e funzionali, nonché la relazione tra il valore basale di YKL-40 e la successiva variazione di AREG.

Nell'analisi incentrata sull'AREG sono state esplorate, nei due gruppi, le variazioni della dose giornaliera di corticosteroidi orali di mantenimento e del numero annualizzato di ricutizzazioni. I confronti tra gruppi indipendenti sono stati effettuati mediante test esatto di Mann–Whitney a due code. Il livello di significatività statistica è stato fissato a $p < 0,05$ e le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando i software GraphPad Pris ® e Jamovi ®.

4. RISULTATI

4.1 CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE AL BASALE

Lo studio ha incluso complessivamente 19 pazienti adulti affetti da asma grave eosinofila, di cui 10 donne (52,6%) e 9 uomini, con un'età media di $57,8 \pm 6,5$ anni. Per tutti i partecipanti erano disponibili le valutazioni cliniche, funzionali e dei biomarcatori sierici sia al basale (T0) sia dopo 12 mesi di trattamento con mepolizumab (T12). Per un solo paziente non era disponibile il valore di FeNO a T12; il confronto longitudinale relativo a questo parametro è stato pertanto effettuato su 18 soggetti.

Al momento della valutazione basale, la conta mediana degli eosinofili nel sangue periferico era pari a 640 cellule/ μ L (con range 350-1080 cellule/ μ L), mentre il numero mediano di riacutizzazioni registrate nell'anno precedente era pari a 3. La dose giornaliera mediana di corticosteroidi orali di mantenimento era di 12,5 mg/die e il punteggio mediano dell'Asthma Control Test era pari a 19, quindi una patologia, che secondo le GINA risulta non controllata. Il valore mediano di amfiregulina era di 13,59 pg/mL con range 12,05–16,35 pg/mL, mentre il valore mediano di YKL-40 era di 50,69 ng/mL con range (40,88-58,21 ng/mL).

Le caratteristiche basali della popolazione sono riportate nella *Tabella 2*.

Caratteristica	Valore
Pazienti, n	19
Sesso femminile, n (%)	10 (52,6%)
Età, anni, media $\pm$ DS	$57,8 \pm 6,5$
Eosinofili ematici, cellule/μL	640 (350–1080)
FEV₁, % del predetto	81 (51–90)
FVC, % del predetto	96 (69,5–104)
FEV₁/FVC, %	75,0 (67,8–80,5)
FeNO, ppb	67,0 (43,5–86,8)
OCS di mantenimento, mg/die	12,5 (5,6–15,0)
Riacutizzazioni, eventi/anno	3 (2–4)
ACT, punteggio	19 (15,5–22)
AREG, pg/mL	13,59 (12,05–16,35)
YKL-40, ng/mL	50,69 (40,88–58,21)

Tabella 2- caratteristiche basali della popolazione studiata

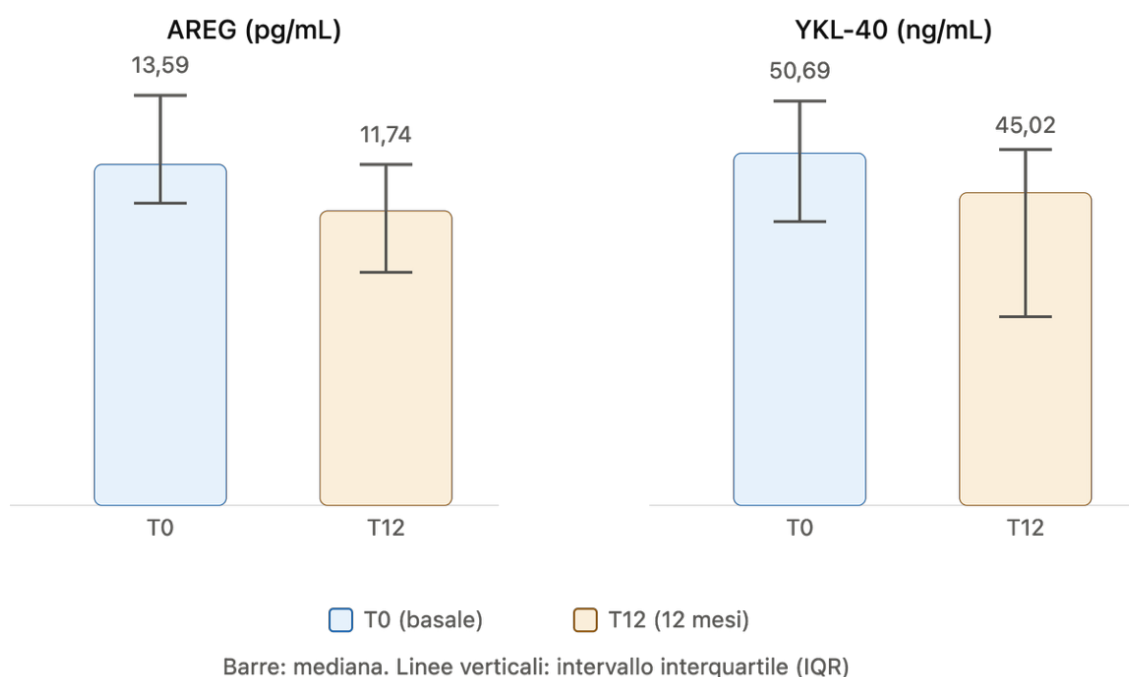


Figura 8-livelli sierici di areg e ykl-40 al basale (t0) e dopo 12 mesi di trattamento (t12).

4.2 RISPOSTA CLINICA E FUNZIONALE AL TRATTAMENTO

Dopo 12 mesi di trattamento con mepolizumab è stata osservata una riduzione significativa della conta degli eosinofili nel sangue periferico, passata da una mediana di 640 cellule/ μ L a 90 cellule/ μ L, con una variazione mediana di 590 cellule/ μ L (IC 95%: da 850 a 280; $p < 0,001$).

La dose giornaliera mediana di corticosteroidi orali di mantenimento si è ridotta da 12,5 mg/die a 0 mg/die, con una variazione mediana di 10,0 mg/die (IC 95%: da 12,5 a 5,0; $p < 0,001$). Anche il numero annualizzato di riacutizzazioni è diminuito significativamente, passando da una mediana di 3 eventi/anno a 0 eventi/anno, con una variazione mediana di 2 eventi/anno (IC 95%: da 3 a 1; $p < 0,001$).

Parallelamente, il punteggio ACT è aumentato da una mediana di 19 a 24, passando quindi ad una forma controllata di malattia, con una variazione mediana di 4 punti (IC 95%: da 2 a 6; $p < 0,001$).

Per quanto riguarda, invece, la funzionalità respiratoria, il valore mediano di FeNO si è ridotto da 67,0 ppb a 37,1 ppb, con una variazione mediana di 8,1 ppb (IC 95%: da 44,5 a 1,2;

$p = 0,027$). Le analisi sono state condotte sui casi disponibili, senza imputazione dei dati mancanti; per il confronto longitudinale del FeNO erano disponibili 18 coppie di osservazioni.

Un incremento significativo è stato rilevato anche per il rapporto FEV₁/FVC, passato dal 75,0% all'86,0% del predetto teorico con una variazione mediana di 6,5 punti percentuali (IC 95%: da 4,8 a 14,0; $p < 0,001$).

Il FEV₁ è aumentato da una mediana dell'81,0% all'85,0% del valore predetto, con una variazione mediana di 4,0 punti percentuali; tale differenza non ha tuttavia raggiunto la significatività statistica (IC 95%: da -3,0 a 21,0; $p = 0,136$). La FVC mediana è risultata pari al 96,0% del predetto sia a T0 sia a T12, con una variazione mediana di 3,0 punti percentuali, anch'essa non statisticamente significativa (IC 95%: da 8,0 a 15,0; $p = 0,702$). Tali risultati sono espressi in *tabella 3*.

Parametro	n	T0 mediana (IQR)	T12 mediana (IQR)	Variazione mediana (IC 95%)	p
Eosinofili, cellule/ μ L	19	640 (350–1080)	90 (70–115)	-590 (da -850 a -280)	< 0,001
FEV ₁ , % del predetto	19	81,0 (51,0–90,0)	85,0 (63,0–93,5)	4,0 (da -3,0 a 21,0)	0,136
FVC, % del predetto	19	96,0 (69,5–104,0)	96,0 (85,5–105,5)	-3,0 (da -8,0 a 15,0)	0,702
FEV ₁ /FVC, %	19	75,0 (67,8–80,5)	86,0 (76,7–90,0)	6,5 (da 4,8 a 14,0)	< 0,001
FeNO, ppb	18	67,0 (43,5–86,8)	37,1 (24,4–76,2)	-8,1 (da -44,5 a -1,2)	0,027
OCS, mg/die	19	12,5 (5,6–15,0)	0,0 (0,0–0,0)	-10,0 (da -12,5 a -5,0)	< 0,001
Riacutizzazioni, eventi/anno	19	3,0 (2,0–4,0)	0,0 (0,0–1,0)	-2,0 (da -3,0 a -1,0)	< 0,001
ACT, punteggio	19	19,0 (15,5–22,0)	24,0 (21,5–25,0)	4,0 (da 2,0 a 6,0)	< 0,001

Tabella 3-variazione dei parametri clinici e funzionali dopo 12 mesi di trattamento con mepolizumab

4.3 VARIAZIONE DEI LIVELLI SIERICI DI AREG E YKL-40

Dopo 12 mesi di trattamento con mepolizumab è stata osservata una riduzione significativa dei livelli sierici di amfiregulina. La concentrazione mediana di AREG è passata da 13,59 pg/mL al basale a 11,74 pg/mL a T12, con una variazione mediana di 3,07 pg/mL (IC 95%: da 4,30 a 1,23; $p = 0,002$). Una riduzione dei livelli sierici di AREG è stata rilevata in 16 dei 19 pazienti inclusi nello studio, corrispondenti all'84,2% del campione.

Anche i livelli sierici di YKL-40 si sono ridotti significativamente nel corso del trattamento, passando da una mediana di 50,69 ng/mL a T0 a 45,02 ng/mL a T12. La variazione mediana è risultata pari a 8,19 ng/mL (IC 95%: da -17,19 a -0,99; $p = 0,036$). La riduzione di YKL-40 è stata osservata in 14 pazienti su 19, pari al 73,7% del campione. Per entrambi i biomarcatori, la riduzione ha raggiunto la significatività statistica, tali risultati sono mostrati in *tabella 4*.

Biomarcatore	n	T0 mediana (IQR)	T12 mediana (IQR)	Variazione mediana (IC 95%)	r rango-biserial	p
AREG, pg/mL	19	13,59 (12,05–16,35)	11,74 (9,29–13,59)	-3,07 (da -4,30 a -1,23)	-0,76	0,002
YKL-40, ng/mL	19	50,69 (40,88–58,21)	45,02 (27,16–51,23)	-8,19 (da -17,19 a -0,99)	-0,55	0,036

Tabella 4-variazione dei livelli sierici di AREG e YKL40-40 dopo 12 mesi di trattamento con mepolizumab

4.4 CORRELAZIONI TRA BIOMARCATORI E PARAMETRI FUNZIONALI

Le variazioni dei livelli sierici di AREG e YKL-40 hanno mostrato una correlazione positiva di moderata entità ($\rho = 0,47$; $p = 0,046$). Poiché le variazioni sono state calcolate come T12 – T0, tale associazione indica che le modificazioni dei due biomarcatori tendevano a presentare una direzione concordante.

Non sono state invece osservate correlazioni statisticamente significative tra la variazione di AREG e le modificazioni dei parametri spirometrici. In particolare, la correlazione tra Δ AREG e Δ FEV₁ è risultata pari a $\rho = -0,033$ ($p = 0,895$), mentre quella tra Δ AREG e Δ FVC è risultata pari a $\rho = 0,053$ ($p = 0,828$).

Anche le correlazioni tra la variazione di YKL-40 e i parametri spirometrici non hanno raggiunto la significatività statistica. Il coefficiente di correlazione è risultato pari a $\rho = -0,256$ per l'associazione tra Δ YKL-40 e Δ FEV₁ ($p = 0,291$) e a $\rho = -0,281$ per l'associazione tra Δ YKL-40 e Δ FVC ($p = 0,244$).

Variazione funzionale	Variazione del biomarcatore	n	ρ di Spearman	p
Δ FEV ₁	Δ AREG	19	-0,033	0,895
Δ FEV ₁	Δ YKL-40	19	-0,256	0,291
Δ FVC	Δ AREG	19	0,053	0,828
Δ FVC	Δ YKL-40	19	-0,281	0,244
Δ AREG	Δ YKL-40	19	0,47	0,046

Tabella 5-correlazioni esplorative tra le variazioni dei biomarcatori e quelle dei parametri di funzionalità respiratoria

Nelle ulteriori analisi esplorative, livelli basali più elevati di YKL-40 sono risultati associati a una successiva maggiore riduzione di AREG ($\rho = -0,64$; $p = 0,003$). Non sono state rilevate altre associazioni statisticamente significative tra i valori basali di AREG o YKL-40 e FEV₁, FVC, rapporto FEV₁/FVC, FeNO, dose di OCS, numero di riacutizzazioni o conta degli eosinofili nel sangue periferico.

4.5 ANALISI POST HOC DEI PATTERN DI RISPOSTA DEI BIOMARCATORI

Nell'analisi post hoc, 16 pazienti sono stati classificati come soggetti con riduzione di AREG e 3 come soggetti senza riduzione. Nei pazienti con riduzione di AREG, la dose giornaliera di corticosteroidi orali di mantenimento ha mostrato una variazione mediana di $-11,25$ mg/die, rispetto a $-5,00$ mg/die nei pazienti senza riduzione. La differenza tra i due gruppi non ha raggiunto la significatività statistica ($p = 0,070$).

La variazione mediana del numero annualizzato di riacutizzazioni è risultata pari a $-2,5$ eventi/anno nei pazienti con riduzione di AREG e a $+1,0$ evento/anno nei pazienti senza riduzione. Anche in questo caso la differenza non è risultata statisticamente significativa ($p = 0,152$).

Per YKL-40, 14 pazienti sono stati classificati come soggetti con riduzione e 5 come soggetti senza riduzione. La variazione mediana della FVC è risultata pari a $+8$ punti percentuali nei pazienti con riduzione di YKL-40 e a -6 punti percentuali nei pazienti senza riduzione; la differenza non ha raggiunto la significatività statistica ($p = 0,125$). Tali riduzioni sono state espresse e rappresentate in *tabella 6*.

Classificazione	Parametro analizzato	Riduzione del biomarcatore	Nessuna riduzione	p esatto
Riduzione di AREG	Δ OCS, mg/die	$-11,25$	$-5,00$	0,070
Riduzione di AREG	Δ Riacutizzazioni, eventi/anno	$-2,5$	$+1,0$	0,152
Riduzione di YKL-40	Δ FVC, punti percentuali	$+8$	-6	0,125

Tabella 6-variazioni cliniche e funzionali secondo la risposta post hoc dei biomarcatori

5. DISCUSSIONE

Il principale risultato del presente studio è rappresentato dalla significativa riduzione dei livelli sierici di amfiregulina (AREG) dopo 12 mesi di trattamento con mepolizumab nei pazienti affetti da asma eosinofilico grave. Nel campione analizzato, la concentrazione mediana di AREG è diminuita da 13,59 pg/mL al basale a 11,74 pg/mL dopo un anno di terapia, con una variazione mediana pari a 3,07 pg/mL con un valore di $p = 0,002$. Un andamento in diminuzione è stato osservato in 16 dei 19 pazienti inclusi, pari all'84,2% del campione. Nel campione studiato, pertanto, la riduzione dell'amfiregulina si è accompagnata alla risposta clinica e biologica osservata durante il trattamento con mepolizumab. Questo risultato assume particolare interesse alla luce della complessa biologia di AREG. L'amfiregulina è un ligando dell'epidermal growth factor receptor (EGFR) coinvolto nell'omeostasi tissutale, nella risposta al danno e nei processi riparativi. La sua attività è tuttavia strettamente dipendente dal contesto: una segnalazione transitoria può favorire il ripristino dell'integrità tissutale, mentre una stimolazione persistente o disregolata può contribuire a fenomeni di ipersecrezione mucosa, proliferazione mesenchimale e fibrosi.^{15,18-20} La diminuzione osservata nel presente studio non può quindi essere interpretata semplicemente come espressione di una riduzione del rimodellamento, ma può essere considerata compatibile con una modificazione dei circuiti di danno e riparazione nel corso del controllo della malattia.

La possibilità che AREG venga regolata dinamicamente nell'asma è sostenuta da precedenti osservazioni. *Enomoto et al.* hanno documentato un aumento dell'amfiregulina nell'espettorato durante le riacutizzazioni asmatiche e hanno mostrato come una stimolazione protratta dei circuiti correlati a EGFR possa associarsi a modificazioni dell'epitelio delle vie aeree e della produzione mucosa.⁴² In questo contesto, la riduzione di AREG osservata nel nostro campione, parallelamente alla marcata diminuzione delle riacutizzazioni, potrebbe inserirsi in un quadro di minore attivazione persistente dei processi di danno-riparazione, pur senza permettere di stabilire una relazione diretta tra i due fenomeni.

Anche lo studio di *Hachim et al.* supporta l'interesse dell'amfiregulina nell'asma, avendo valutato l'espressione e le concentrazioni in differenti compartimenti biologici, tra cui sangue, saliva ed epitelio bronchiale.⁴³ Tale osservazione rafforza il razionale della valutazione periferica di AREG, ma deve essere distinta dall'approccio adottato nel presente lavoro. Mentre *Hachim et al.* hanno analizzato soprattutto associazioni tra livelli del

biomarcatore e caratteristiche dell'asma, il nostro studio considera la variazione intraindividuale di AREG durante una terapia biologica specifica. I livelli assoluti del biomarcatore e la loro modificazione nel tempo potrebbero quindi fornire informazioni biologiche non necessariamente sovrapponibili.

Particolarmente rilevante per l'interpretazione dei nostri risultati è il rapporto tra AREG, IL-5 ed eosinofili. *Morimoto et al.* hanno descritto sottopopolazioni di cellule Th2 memory patogeniche funzionalmente distinte, alcune caratterizzate da elevata produzione di IL-5 e altre produttrici di AREG. Nel loro modello sperimentale, la segnalazione AREG-EGFR era in grado di modificare il fenotipo funzionale degli eosinofili, favorendo la produzione di osteopontina, mentre le popolazioni Th2 produttrici di IL-5 e quelle produttrici di AREG cooperavano nell'ambito della risposta fibrotica delle vie aeree.^{20,44}

Questi dati suggeriscono che IL-5 e AREG non debbano essere considerate componenti di un unico asse lineare. La neutralizzazione dell'IL-5 non implica infatti necessariamente una riduzione diretta dell'amfiredulina. È più plausibile che i due mediatori appartengano a circuiti biologici distinti ma interconnessi, nei quali il controllo dell'infiammazione eosinofila può modificare il microambiente in cui AREG viene prodotta e svolge le proprie funzioni.

Mepolizumab agisce selettivamente sull'IL-5 e interferisce principalmente con maturazione, la sopravvivenza e l'attività funzionale degli eosinofili.²⁹ Studi più recenti hanno tuttavia contribuito a superare una visione esclusivamente quantitativa dell'effetto anti-IL-5. *Luo et al.* hanno mostrato come l'IL-5 contribuisca al *priming* eosinofilo e come, dopo trattamento con mepolizumab, risultino attenuate diverse caratteristiche funzionali degli eosinofili, comprese migrazione, attivazione e degranulazione.¹⁴ Analogamente, *Fricker et al.* hanno riportato effetti differenti del trattamento sulle diverse popolazioni eosinofile, con una maggiore deplezione degli eosinofili a fenotipo infiammatorio e la persistenza di una quota di eosinofili con caratteristiche omeostatiche.⁴⁵ Queste evidenze suggeriscono che gli effetti biologici del blocco dell'IL-5 non si esauriscano nella sola riduzione numerica degli eosinofili, ma possano accompagnarsi a modificazioni del loro stato funzionale e delle interazioni con il tessuto delle vie aeree.

Nel nostro studio, la riduzione di AREG si è verificata in un contesto di marcata risposta clinica e infiammatoria al mepolizumab. Dopo 12 mesi, la conta mediana degli eosinofili periferici si è ridotta da 640 a 90 cellule/ μ L, la dose mediana di corticosteroidi orali di

mantenimento da 12,5 a 0 mg/die e il numero mediano di riacutizzazioni da 3 a 0 eventi/anno. Parallelamente, il punteggio ACT è aumentato da 19 a 24. Tali risultati sono coerenti con quanto riportato nei principali studi clinici e nelle esperienze real-world, che hanno documentato l'efficacia del mepolizumab soprattutto in termini di riduzione delle riacutizzazioni, dell'eosinofilia e dell'esposizione ai corticosteroidi ^{31–35,46}

La riduzione di AREG va quindi letta insieme alla risposta clinica e infiammatoria osservata nello stesso periodo. I dati non permettono di attribuire ad AREG un ruolo nel determinare il beneficio clinico, ma indicano che la sua variazione si verifica parallelamente a un evidente miglioramento clinico e infiammatorio. Ciò rende interessante la valutazione di AREG come possibile indicatore di processi biologici che accompagnano il controllo dell'asse IL-5–eosinofilo e che non sono descritti dalla sola conta eosinofila.

Un possibile collegamento con modificazioni più ampie delle vie aeree è suggerito anche dalle recenti evidenze sul rimodellamento bronchiale. Nello studio MESILICO, dopo 12 mesi di mepolizumab sono state osservate riduzioni dello spessore della membrana sub-basale, dell'area e dello spessore della muscolatura liscia bronchiale, del danno epiteliale e dell'infiltrazione eosinofila tissutale.³⁷ Questi dati rendono biologicamente plausibile che il controllo dell'asse IL-5–eosinofilo possa associarsi a effetti tissutali più ampi.

La funzione respiratoria ha mostrato un andamento più articolato. Il rapporto FEV₁/FVC è migliorato significativamente, passando dal 75% all'86%, mentre l'aumento del FEV₁ dall'81% all'85% del valore predetto non ha raggiunto la significatività statistica e la FVC è rimasta sostanzialmente invariata. Inoltre, la variazione di AREG non è risultata associata né a quella del FEV₁ ($p = -0,033$; $p = 0,895$) né a quella della FVC ($p = 0,053$; $p = 0,828$).

Nel presente campione non emerge quindi una relazione evidente tra variazione dell'amfi-regulina e modificazioni di FEV₁ e FVC. Tale assenza di associazione deve essere interpretata con cautela, considerando la ridotta numerosità campionaria e la conseguente limitata capacità di rilevare correlazioni di minore entità. Non è pertanto possibile concludere che AREG rappresenti un dominio biologico indipendente dalla funzione respiratoria; i dati mostrano semplicemente che, nell'arco dei 12 mesi considerati, le rispettive variazioni non presentano una relazione significativa. Questo risultato può differire da precedenti osservazioni trasversali, nelle quali i livelli di AREG sono stati messi in relazione con alcune

caratteristiche cliniche e funzionali dell'asma, anche in ragione delle differenze nel disegno dello studio e nella popolazione analizzata.⁴³

Nel corso del trattamento è stata osservata anche una significativa riduzione del FeNO, passato da una mediana di 67,0 a 37,1 ppb. Il FeNO riflette prevalentemente circuiti dell'infiammazione di tipo 2 mediati da IL-4 e IL-13, più che dall'asse IL-5–eosinofilo.^{1,9} La sua diminuzione segnala quindi la concomitante variazione di un ulteriore indicatore dell'infiammazione di tipo 2, ma non può essere attribuita direttamente al blocco dell'IL-5. Fattori clinici e terapeutici concomitanti possono infatti contribuire alla sua variabilità. Un risultato secondario di interesse riguarda YKL-40, i cui livelli sierici sono diminuiti da 50,69 a 45,02 ng/mL dopo 12 mesi di trattamento, con una riduzione osservata in 14 dei 19 pazienti. YKL-40 è stato associato alla severità dell'asma, alla funzione respiratoria e ad alcuni aspetti del rimodellamento delle vie aeree, pur non rappresentando un biomarcatore specifico dell'infiammazione di tipo 2.^{21,23}

Nel presente lavoro, tuttavia, YKL-40 riveste un ruolo complementare rispetto ad AREG. Le variazioni dei due biomarcatori hanno mostrato una correlazione positiva moderata ($\rho = 0,47$; $p = 0,046$). Tale correlazione nominale rappresenta un segnale esplorativo e non una dimostrazione dell'esistenza di un pathway condiviso. Una possibile convergenza biologica è suggerita dal coinvolgimento della segnalazione EGFR-MEK/ERK sia nei circuiti mediati da AREG sia in alcuni meccanismi associati alla produzione di YKL-40 da parte dell'epitelio bronchiale.^{15,25} Tuttavia, la ridotta numerosità del campione, il valore di p prossimo alla soglia convenzionale e l'assenza di correzione per confronti multipli impongono di considerare questo risultato come generatore di ipotesi.

Anche l'associazione tra livelli basali più elevati di YKL-40 e una successiva maggiore riduzione di AREG ($\rho = -0,64$; $p = 0,003$) deve essere interpretata nello stesso contesto esplorativo. Poiché ΔAREG è stato definito come $T12 - T0$, valori più negativi corrispondono a una maggiore riduzione del biomarcatore. Il significato biologico dell'associazione non è attualmente definito e il risultato necessita di conferma in popolazioni indipendenti. Non può inoltre essere escluso che, in un campione di dimensioni così contenute, l'entità della correlazione risenta della distribuzione dei valori o dell'influenza di singole osservazioni.

Le analisi post hoc hanno evidenziato differenze numeriche potenzialmente interessanti anche per alcuni outcome clinici. Nei pazienti con riduzione di AREG, la diminuzione

mediana della dose di corticosteroidi orali è risultata pari a $-11,25$ mg/die, rispetto a $-5,00$ mg/die nei soggetti senza riduzione; analogamente, le riacutizzazioni sono diminuite di $-2,5$ eventi/anno nel primo gruppo rispetto a $+1,0$ evento/anno nel secondo. Nessuna delle differenze ha tuttavia raggiunto la significatività statistica e il gruppo senza riduzione di AREG comprendeva soltanto tre soggetti. Questi risultati non supportano quindi, allo stato attuale, un utilizzo predittivo dell'amfiregulina.

È importante, però, distinguere tra un biomcatore che cambia durante la risposta al trattamento e uno capace di prevederla. Il presente studio documenta una riduzione di AREG nel corso di 12 mesi di trattamento in una popolazione che, nello stesso periodo, mostra un marcato miglioramento clinico e infiammatorio. Non consente invece di stabilire se i livelli basali del biomcatore, o una sua modificazione precoce, siano in grado di anticipare il successivo beneficio terapeutico. AREG può quindi essere considerata, allo stato attuale, un potenziale biomcatore associato alla risposta biologica al trattamento, la cui rilevanza clinica deve ancora essere definita. Va considerato anche il fatto che nel nostro studio AREG è stata misurata nel siero. AREG può essere prodotta da differenti popolazioni cellulari, comprese cellule epiteliali e mesenchimali, mastociti, basofili, eosinofili, ILC2 e linfociti T.¹⁵ La misurazione sierica non permette pertanto di identificare quale compartimento contribuisca maggiormente alla variazione osservata né di stabilire se le modificazioni periferiche riflettano direttamente quanto avviene nella mucosa bronchiale. Questo aspetto assume particolare rilievo per una molecola il cui significato biologico dipende dalla sorgente cellulare, dal tessuto bersaglio e dal contesto infiammatorio.

Questi risultati vanno comunque interpretati tenendo conto di alcuni limiti dello studio. La ridotta numerosità campionaria limita la potenza delle analisi di correlazione e, soprattutto, dei confronti tra sottogruppi. La natura osservazionale e l'assenza di un gruppo di controllo non consentono inoltre di distinguere con certezza il contributo specifico del mepolizumab da quello di altre modificazioni cliniche e terapeutiche intervenute durante il follow-up. In particolare, la marcata riduzione dell'esposizione ai corticosteroidi orali rappresenta un importante risultato clinico, ma costituisce contemporaneamente una modifica terapeutica potenzialmente in grado di influenzare il profilo biologico.

La disponibilità di soli due momenti di valutazione, T0 e T12, consente inoltre di descrivere la variazione complessiva di AREG, ma non di ricostruirne la cinetica. Non è possibile stabilire se la diminuzione avvenga precocemente dopo l'avvio della terapia, proceda

gradualmente o presenti fluttuazioni nel corso dell'anno. La determinazione esclusivamente sierica impedisce inoltre una valutazione diretta del compartimento bronchiale. Infine, il numero delle analisi esplorative effettuate rispetto alla dimensione del campione richiede particolare prudenza nell'interpretazione dei p value nominali, soprattutto quando prossimi alla soglia convenzionale di significatività.

Pur considerando tali limitazioni, alcuni aspetti metodologici rafforzano l'interpretabilità dei risultati. Il disegno longitudinale appaiato consente di confrontare ciascun paziente con sé stesso prima e dopo il trattamento, riducendo l'influenza della variabilità interindividuale. Tutti i 19 pazienti disponevano inoltre di campioni sierici appaiati per AREG e YKL-40 a T0 e T12. La contemporanea disponibilità di parametri clinici, funzionali e infiammatori permette infine di collocare la variazione dell'amfiredulina nel contesto della risposta complessiva al trattamento, anziché considerarla come un dato isolato.

Nel complesso, la riduzione di AREG rappresenta il dato centrale del presente lavoro. Il risultato si inserisce in una letteratura che attribuisce all'amfiredulina un ruolo di interfaccia tra risposta immunitaria, danno tissutale e processi di riparazione e rimodellamento delle vie aeree^{15,20,43,44}. La sua diminuzione durante il trattamento con mepolizumab, osservata nella maggior parte dei pazienti parallelamente alla soppressione dell'eosinofilia e al miglioramento clinico, identifica un possibile segnale biologico associato al controllo dell'asse IL-5–eosinofilo. Il significato clinico di tale modulazione rimane tuttavia da definire.

Studi prospettici su popolazioni più numerose saranno necessari per confermare la riproducibilità di queste osservazioni. Campionamenti seriali potrebbero consentire di definire la cinetica dell'AREG e il suo rapporto temporale con la soppressione eosinofila, la riduzione delle riacutizzazioni e la diminuzione dell'esposizione ai corticosteroidi. L'integrazione delle determinazioni sieriche con campioni ottenuti direttamente dalle vie aeree e con indicatori strutturali potrebbe inoltre chiarire le sorgenti cellulari del biomarcatore e il suo eventuale rapporto con i processi di danno-riparazione e rimodellamento. Il confronto tra differenti classi di farmaci biologici potrebbe infine contribuire a stabilire se la modulazione di AREG sia specificamente associata al blocco dell'asse IL-5–eosinofilo oppure rappresenti un fenomeno più generale della risposta al controllo dell'infiammazione di tipo 2 grave.

6. CONCLUSIONI

Il presente studio ha documentato una significativa riduzione dei livelli sierici di amfiregulina (AREG) dopo 12 mesi di trattamento con mepolizumab in pazienti affetti da asma eosinofilo grave. La concentrazione mediana è diminuita da 13,59 a 11,74 pg/mL, con una variazione mediana pari a -3,07 pg/mL; un andamento in diminuzione è stato osservato in 16 dei 19 pazienti inclusi. Questi dati rispondono all'obiettivo principale della tesi, documentando una modificazione significativa dei livelli circolanti di AREG nel corso della terapia anti-IL-5.

La riduzione dell'amfiregulina si è verificata parallelamente a una marcata risposta clinica e infiammatoria, caratterizzata dalla diminuzione dell'eosinofilia periferica, delle riacutizzazioni e dell'impiego di corticosteroidi orali, insieme al miglioramento del controllo dell'asma. Poiché AREG non rappresenta un bersaglio diretto del mepolizumab, la variazione osservata potrebbe essere compatibile con modificazioni biologiche conseguenti al controllo dell'infiammazione eosinofila e del microambiente delle vie aeree. Tuttavia, la misurazione sierica non consente di identificare la sorgente cellulare dell'AREG né di stabilire quali popolazioni cellulari o compartimenti tissutali contribuiscano maggiormente alla variazione osservata.

Nel presente campione non sono emerse associazioni significative tra la variazione di AREG e le modificazioni di FEV₁ e FVC. Questo dato indica che l'andamento dell'amfiregulina non ha mostrato una relazione evidente con la risposta spirometrica; tuttavia, la ridotta numerosità campionaria limita la potenza statistica dello studio e non consente di escludere associazioni di minore entità. Analogamente, le differenze numeriche osservate nella riduzione dei corticosteroidi orali e delle riacutizzazioni tra pazienti con e senza diminuzione di AREG non hanno raggiunto la significatività statistica e non permettono di attribuire al biomarcatore un valore predittivo della risposta clinica.

La contemporanea riduzione di YKL-40 e la correlazione moderata osservata tra le variazioni dei due biomarcatori rappresentano un ulteriore elemento di interesse. Questi risultati sono compatibili con una modificazione parallela di circuiti biologici distinti ma almeno in parte interconnessi. Tale associazione rimane tuttavia esplorativa e non dimostra né un rapporto causale né un'interazione molecolare diretta tra AREG e YKL-40.

Nel nostro campione, la riduzione dell'amfiredulina si è accompagnata al miglioramento clinico e biologico osservato durante il trattamento con mepolizumab, ma i risultati non consentono, allo stato attuale, di definirne il significato clinico o il valore predittivo. Questi risultati rendono AREG un biomcatore di potenziale interesse per descrivere la risposta biologica al trattamento anti-IL-5, anche se il suo significato clinico deve ancora essere definito.

La ridotta numerosità campionaria, la natura osservazionale dello studio, l'assenza di un gruppo di controllo, la disponibilità di soli due momenti di valutazione e la misurazione esclusivamente sierica rappresentano i principali limiti del presente lavoro. Studi su popolazioni più ampie, con più misurazioni nel corso del trattamento, potranno chiarire meglio quando AREG inizia a modificarsi e come questa variazione si relazioni alla risposta clinica e biologica. Il confronto con differenti terapie biologiche potrebbe inoltre contribuire a stabilire se la variazione dell'amfiredulina sia specificamente associata al blocco dell'asse IL-5-eosinofilo e quale possa essere il suo ruolo nella caratterizzazione della risposta biologica nell'asma eosinofilo grave.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2026. Updated May 2026
2. Chung Wenzel Brozek Bush Castro Sterk Adcock Bateman Bel Bleecker Boulet Brightling Chaney Dahlen Djukanovic Frey Gaga Gibson Hamid Jajour Mauad Sorkness Teague. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *European Respiratory Journal*. 2014 Feb;43(2):343–73.
3. Hansen S, von Bülow A, Cooper A, Sandin P, Ernstsson O, Ulrik CS, et al. From mild-to-moderate to severe asthma: Risk factors and patient profiles from the NORDSTAR cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2026 Sep 1. doi:10.1093/ajrccm/aamag242 PubMed PMID: 42133832.
4. Taunk ST, Cardet JC, Ledford DK. Clinical implications of asthma endotypes and phenotypes. *Allergy Asthma Proc*. 2022 Sep 25;45(5):375–82. doi:10.2500/aap.2022.43.220047 PubMed PMID: 36065106.
5. Grunwell JR, Fitzpatrick AM. Asthma Phenotypes and Biomarkers. *Respiratory care*. 2025. p. 649–74. doi:10.1089/respcare.12352 PubMed PMID: 40013975.
6. Lötval J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjerrmer L, Casale TB, Custovic A, et al. Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011 Feb;127(2):355–60. doi:10.1016/j.jaci.2010.11.037 PubMed PMID: 21281866.
7. Quoc QL, Choi Y, Hur GY, Park HS. New targets for type 2-low asthma. *Korean Journal of Internal Medicine*. Korean Association of Internal Medicine; 2024. p. 215–27. doi:10.3904/kjim.2023.299 PubMed PMID: 38317271.
8. Porpodis K, Tsiouprou I, Apostolopoulos A, Ntontsi P, Fouka E, Papakosta D, et al. Eosinophilic Asthma, Phenotypes-Endotypes and Current Biomarkers of Choice. *Journal of Personalized Medicine*. MDPI; 2022. doi:10.3390/jpm12071093
9. Lambrecht BN, Hammad H, Fahy J V. The Cytokines of Asthma. *Immunity*. Cell Press; 2019. p. 975–91. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.018 PubMed PMID: 30995510.
10. Pelaia C, Paoletti G, Puggioni F, Racca F, Pelaia G, Canonica GW, et al. Interleukin-5 in the Pathophysiology of Severe Asthma. *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A.; 2019. doi:10.3389/fphys.2019.01514 PubMed PMID: 31920718.

11. Pelaia C, Paoletti G, Puggioni F, Racca F, Pelaia G, Canonica GW, et al. Interleukin-5 in the Pathophysiology of Severe Asthma. *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A.; 2019. doi:10.3389/fphys.2019.01514 PubMed PMID: 31920718.
12. Buchheit KM, Shaw D, Chupp G, Lehtimäki L, Heffler E, Finney-Hayward T, et al. Interleukin-5 as a pleiotropic cytokine orchestrating airway type 2 inflammation: Effects on and beyond eosinophils. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. John Wiley and Sons Inc; 2024. p. 2662–79. doi:10.1111/all.16303 PubMed PMID: 39359069.
13. Greenfeder S, Umland SP, Cuss FM, Chapman RW, Egan RW. Th2 cytokines and asthma. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. *Respiratory Research*. 2001;2(2):71–79. doi: 10.1186/rr41. PMID: 11686868.
14. Luo J, Chen W, Liu W, Jiang S, Ye Y, Shrimanker R, et al. IL-5 antagonism reverses priming and activation of eosinophils in severe eosinophilic asthma. *Mucosal Immunol*. 2024 Aug 1;17(4):524–36. doi:10.1016/j.mucimm.2024.03.005 PubMed PMID: 38493955.
15. Zaiss DMW, Gause WC, Osborne LC, Artis D. Emerging functions of amphiregulin in orchestrating immunity, inflammation, and tissue repair. *Immunity*. Cell Press; 2015. p. 216–26. doi:10.1016/j.immuni.2015.01.020 PubMed PMID: 25692699.
16. Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, Alenghat T, Ziegler CGK, Doering TA, et al. Innate lymphoid cells promote lung tissue homeostasis following acute influenza virus infection HHS Public Access. *Nat Immunol*. 2011;12(11):1045–54. doi:10.1031/ni.2131
17. Kaiser KA, Loffredo LF, de los Santos-Alexis K, Ringham OR, Arpaia N. Regulation of the alveolar regenerative niche by amphiregulin-producing regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2023 Mar 6;220(3). doi:10.1084/jem.20221462 PubMed PMID: 36534084.
18. Okumura S, Sagara H, Fukuda T, Saito H, Okayama Y. FcεRI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005;115(2):272–9. doi:10.1016/j.jaci.2004.10.004 PubMed PMID: 15696081.
19. Wang SW, Oh CK, Cho SH, Hu G, Martin R, Demissie-Sanders S, et al. Amphiregulin expression in human mast cells and its effect on the primary human lung fibroblasts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005;115(2):287–94. doi:10.1016/j.jaci.2004.11.037

20. Hirahara K, Shinoda K, Morimoto Y, Kiuchi M, Aoki A, Kumagai J, et al. Immune cell-epithelial/mesenchymal interaction contributing to allergic airway inflammation associated pathology. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019. doi:10.3389/fimmu.2019.00570 PubMed PMID: 30972065.
21. Specjalski K, Romantowski J, Niedoszytko M. YKL-40 as a possible marker of neutrophilic asthma. *Frontiers in Medicine*. Frontiers Media S.A.; 2023. doi:10.3389/fmed.2023.1115938
22. Varricchi G, Brightling CE, Grainge C, Lambrecht BN, Chanez P. Airway remodelling in asthma and the epithelium: on the edge of a new era. *European Respiratory Journal*. European Respiratory Society; 2024. doi:10.1183/13993003.01619-2023 PubMed PMID: 38609094.
23. Kimura H, Shimizu K, Tanabe N, Makita H, Taniguchi N, Kimura H, et al. Further evidence for association of YKL-40 with severe asthma airway remodeling. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 2022 Jun 1;128(6):682-688.e5. doi:10.1016/j.anai.2022.03.016 PubMed PMID: 35342020.
24. Sun Y, Shi Z, Liu B, Li X, Li G, Yang F, et al. YKL-40 mediates airway remodeling in asthma via activating FAK and MAPK signaling pathway. *Cell Cycle*. 2020 Jun 2;19(11):1378–90. doi:10.1080/15384101.2020.1750811 PubMed PMID: 32286145.
25. Park JA, Drazen JM, Tschumperlin DJ. The chitinase-like protein YKL-40 is secreted by airway epithelial cells at base line and in response to compressive mechanical stress. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 Sep 24;285(39):29817–25. doi:10.1074/jbc.M110.103416 PubMed PMID: 20650887.
26. Lee CM, He CH, Nour AM, Zhou Y, Ma B, Park JW, et al. IL-13R α 2 uses TMEM219 in chitinase 3-like-1-induced signalling and effector responses. *Nat Commun*. 2016 Sep 15;7. doi:10.1038/ncomms12752 PubMed PMID: 27629921.
27. Kamle S, Ma B, Schor G, Bailey M, Pham B, Cho I, et al. Chitinase 3-like-1 (CHI3L1) in the Pathogenesis of Epidermal Growth Factor Receptor Mutant Non-Small Cell Lung Cancer [Internet]. 2023. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.09.21.558861> doi:10.1101/2023.09.21.558861
28. Ma J, Ma Q, Yang J, Liang P, Zhou J, Ma J, et al. The clinical and pathological histology efficacy of biological therapy for severe asthma with a phenotype of type 2 inflammation - systematic review. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media SA; 2025. doi:10.3389/fimmu.2025.1531986 PubMed PMID: 40303400.

29. Varricchi G, Bagnasco D, Ferrando M, Puggioni F, Passalacqua G, Canonica GW. Mepolizumab in the management of severe eosinophilic asthma in adults: Current evidence and practical experience. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. SAGE Publications Ltd; 2017. p. 40–5. doi:10.1177/1753465816673303 PubMed PMID: 27856823.
30. Hart TK, Sellers TS, Maleeff BE, Eustis S, Schwartz LW, Bugelski PJ, et al. Preclinical efficacy and safety of mepolizumab (SB-240563), a humanized monoclonal antibody to IL-5, in cynomolgus monkeys. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2001;108(2):250–7. doi:10.1067/mai.2001.116576 PubMed PMID: 11496242.
31. Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, et al. Mepolizumab and Exacerbations of Refractory Eosinophilic Asthma. *New England Journal of Medicine*. 2009 Mar 5;360(10):973–84. doi:10.1056/nejmoa0808991 PubMed PMID: 19264686.
32. Nair P, Pizzichini MMM, Kjarsgaard M, Inman MD, Efthimiadis A, Pizzichini E, et al. Mepolizumab for Prednisone-Dependent Asthma with Sputum Eosinophilia A bs tr ac t.
33. Ortega HG, Liu MC, Pavord ID, Brusselle GG, FitzGerald JM, Chetta A, et al. Mepolizumab Treatment in Patients with Severe Eosinophilic Asthma. *New England Journal of Medicine*. 2014 Sep 25;371(13):1198–207. doi:10.1056/nejmoa1403290 PubMed PMID: 25199059.
34. Bel EH, Wenzel SE, Thompson PJ, Prazma CM, Keene ON, Yancey SW, et al. Oral Glucocorticoid-Sparing Effect of Mepolizumab in Eosinophilic Asthma. *New England Journal of Medicine*. 2014 Sep 25;371(13):1189–97. doi:10.1056/nejmoa1403291 PubMed PMID: 25199060.
35. Bagnasco D, Milanese M, Rolla G, Lombardi C, Bucca C, Heffler E, et al. The North-Western Italian experience with anti IL-5 therapy amd comparison with regulatory trials. *World Allergy Organization Journal*. 2018 Dec 6;11(1). doi:10.1186/s40413-018-0210-7
36. Bagnasco Caminati Menzella Milanese Rolla Lombardi Bucca Heffler Paoletti Testino Manfredi Caruso Guida Senna Bonavia Riccio Canonica Passalacqua. One year of mepolizumab. Efficacy and safety in real-life in Italy. *Pulm Pharmacol Ther*. 2019 Oct;58:101836.
37. Domvri K, Tsiouprou I, Bakakos P, Steiropoulos P, Katsoulis K, Kostikas K, et al. Effect of mepolizumab in airway remodeling in patients with late-onset severe asthma with an eosinophilic phenotype. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2025 Feb 1;155(2):425–35. doi:10.1016/j.jaci.2024.10.024 PubMed PMID: 39521278.

38. Senna G, Guerriero M, Paggiaro PL, Blasi F, Caminati M, Heffler E, et al. SANI-Severe Asthma Network in Italy: A way forward to monitor severe asthma. *Clinical and Molecular Allergy*. 2017 Apr 10;15(1). doi:10.1186/s12948-017-0065-4
39. Handbook of WMA Policies World Medical Association | WMA DECLARATION OF HELSINKI-ETHICAL PRINCIPLES FOR MEDICAL RESEARCH INVOLVING HUMAN SUBJECTS.
40. Graham BL, Steenbruggen I, Barjaktarevic IZ, Cooper BG, Hall GL, Hallstrand TS, et al. Standardization of spirometry 2019 update an official American Thoracic Society and European Respiratory Society technical statement. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. American Thoracic Society; 2019. p. E70–88. doi:10.1164/rccm.201908-1590ST PubMed PMID: 31613151.
41. Dweik Boggs Erzurum Irvin Leigh Lundberg Olin Plummer Taylor. An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Sep 1;184(5):602–15.
42. Enomoto Y, Orihara K, Takamasu T, Matsuda A, Gon Y, Saito H, et al. Tissue remodeling induced by hypersecreted epidermal growth factor and amphiregulin in the airway after an acute asthma attack. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009;124(5). doi:10.1016/j.jaci.2009.08.044 PubMed PMID: 19895983.
43. Hachim MY, Elemam NM, Ramakrishnan RK, Salameh L, Olivenstein R, Hachim IY, et al. Blood and Salivary Amphiregulin Levels as Biomarkers for Asthma. *Front Med (Lausanne)*. 2020 Oct 29;7. doi:10.3389/fmed.2020.561866
44. Morimoto Y, Hirahara K, Kiuchi M, Wada T, Ichikawa T, Kanno T, et al. Amphiregulin-Producing Pathogenic Memory T Helper 2 Cells Instruct Eosinophils to Secrete Osteopontin and Facilitate Airway Fibrosis. *Immunity*. 2018 Jul 17;49(1):134-150.e6. doi:10.1016/j.immuni.2018.04.023 PubMed PMID: 29958800.
45. Fricker M, Harrington J, Hiles SA, Gibson PG. Mepolizumab depletes inflammatory but preserves homeostatic eosinophils in severe asthma. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2024 Nov 1;79(11):3118–28. doi:10.1111/all.16267 PubMed PMID: 39115364.
46. Li H, Zhang Q, Wang J, Gao S, Li C, Wang J, et al. Real-world Effectiveness of Mepolizumab in Severe Eosinophilic Asthma: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Ther*. 2021 Jun 1;43(6):e192–208. doi:10.1016/j.clinthera.2021.03.023 PubMed PMID: 33962763.

8. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il mio relatore, il Prof. Bagnasco, per avermi coinvolta con naturalezza e per avermi sempre fatta sentire accolta e parte di un team.

Un grazie sincero alla mia correlatrice, la Dott.ssa Benedetta Bondi, per la disponibilità, l'aiuto concreto e il supporto, anche morale, durante questo percorso.