

# Le piccole vie aeree

## AZIONE E REAZIONE, DAL DANNO AL RIMODELLAMENTO

rapporto al peggioramento della limitazione del flusso aereo<sup>3</sup>. In realtà, i corticosteroidi possono defosforilare ed inattivare la MAPK p38 attraverso l'induzione della trascrizione di una specifica fosfatasi delle MAPK, denominata MKP-1 ("MAPK phosphatase-1"). Purtroppo, però, in condizioni di intenso stress ossidativo la MAPK p38 iperattivata fosforila il recettore dei glucocorticoidi inibendone così la migrazione dal citoplasma al nucleo della cellula, fenomeno essenziale per l'attuazione degli effetti biologici e farmacologici di questi ormoni. Pertanto, una eccessiva attività della MAPK p38 contribuisce alla diminuzione della risposta terapeutica ai corticosteroidi, che si manifesta in molti pazienti affetti da BPCO.

In base a tali considerazioni, è evidente che l'approfondimento delle conoscenze relative ai biomeccanismi cellulari e molecolari della BPCO può delineare lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche finalizzate alla riduzione dello stress ossidativo, al ripristino dell'attività delle HDAC e della sensibilità ai corticosteroidi, ed all'inibizione della PI3K $\alpha$  e della MAPK p38<sup>4</sup>. Ciò potrà quindi contribuire a migliorare il trattamento di questa malattia, con l'auspicio che i progressi della ricerca clinica e di base si traducano presto in significativi miglioramenti della qualità di vita e della sopravvivenza dei pazienti con BPCO.

### Bibliografia

1. Barnes PJ. *Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease*. Clin Chest Med 2014; 35:71-86.
2. Ito K, Hanazawa T, Tomita K, et al. *Oxidative stress reduces histone deacetylase 2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine nitration*. Biochem Biophys Res Comm 2004; 315:240-5.
3. Renda T, Baraldo S, Pelaia G, et al. *Increased activation of p38 MAPK in COPD*. Eur Respir J 2008; 31:62-9.
4. Barnes PJ. *New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease*. Nat Rev Drug Discov 2013; 12:543-59.

## Fenotipi dell'asma bronchiale

Recentemente è stato sottolineato che l'asma "non è una singola malattia ma piuttosto una serie di diverse e complesse malattie, con ampie aree di sovrapposizione, o fenotipi, ognuno definito da una particolare interazione tra predisposizione genetica e fattori ambientali"<sup>1,2</sup>. Sally Wenzel, in una revisione del 2014, afferma che "il termine asma è destinato a diventare obsoleto e verrà sostituito da vari termini che indicheranno in modo più specifico il meccanismo patogenetico associato alla malattia"<sup>3,4</sup>.

La sostituzione del termine asma con termini che possano indicare degli specifici fenotipi caratterizzati da un particolare meccanismo patogenetico (endotipi) è però ancora molto lunga e complessa e le tappe necessarie si possono così sintetizzare: A) individuazione dei fenotipi clinici, B) individuazione dei fenotipi molecolari, C) definizione degli endotipi.

### A) Fenotipi clinici

La cosiddetta fenotipizzazione clinica parte dall'individuazione di una caratteristica clinico-funzionale-biologica ritenuta caratterizzante e particolarmente importante in un certo gruppo di pazienti. Utilizza pertanto una definizione a priori con un approccio di tipo top down che prende avvio da un'ipotesi candidato basata su osservazioni cliniche. I fenotipi clinici più comunemente individuati sono riportati nella Tabella 1<sup>1-4</sup>.

L'approccio clinico basato sull'ipotesi candidato presenta però degli importanti limiti dovuti al fatto che i diversi fenotipi sono basati su modelli a priori (scelta di esperti) e sull'osservazione clinica che enfatizza un solo aspetto dell'asma, anche se ritenuto prevalente; inoltre esistono ampie aree di sovrapposizione che generano incertezza circa la classificazione dei pazienti. Ad esempio un asmatico ASA sensibile può essere classificato come tale oppure compreso nel fenotipo dell'asma ad insorgenza tardiva, o di quella eosinofila, o con ostruzione non reversibile o non allergica (intrinseca). Recentemente, proprio per superare la soggettività di questo approccio,

**Adriano Vaghi**  
**Noemi Grassi**  
**Francesco Bini**

UO Pneumologia  
AO Salvini Garbagnate  
Milanese (MI)

Fenotipi clinici o fisiopatologici	Fenotipi correlati ai fattori di scatenamento	Fenotipi infiammatori
Definita in relazione alla gravità: asma severo vs lieve	Intolleranti ai FANS: aspirino sensibili	Eosinofila
Ad elevato rischio di riacutizzazione	Sensibile agli allergeni ambientali: asma estrinseco	Neutrofila
Con ostruzione non reversibile ( <i>chronic restriction, fixed airflow limitation</i> )	Asma occupazionale	Pauci-granulocitaria
Associata ad ostruzione delle piccole vie aeree	Asma mestruale	Mista
Resistente al trattamento: cortico-resistente	Asma da esercizio	
Definita in base all'età di insorgenza		

**TABELLA 1**  
*Classificazione dei fenotipi*

è stata adottata una metodologia matematico-statistica che non presuppone ipotesi a priori: l'analisi dei gruppi o *cluster analysis*. L'analisi dei gruppi, contrariamente al metodo osservazionale-clinico, utilizza un modello esplorativo non supervisionato (quindi bottom up e non top down) e varie tecniche di analisi multivariata con l'obiettivo, partendo da un collettivo multidimensionato, di assegnare i singoli elementi in gruppi (*clusters*) non definiti a priori, formando degli insiemi omogenei in modo che gli oggetti nello stesso *cluster* siano più simili tra loro rispetto a quelli di un altro *cluster*.

Utilizzando questo approccio analitico e 16 variabili cliniche ad un gruppo di 184 pazienti affetti da asma moderato-grave, Haldar e coll. <sup>5</sup> hanno individuato 4 *cluster*: a) asma atopico ad esordio precoce; b) asma ad esordio tardivo in donne obese con flogosi neutrofila; c) asma ad esordio precoce, atopico grave; d) asma ad esordio tardivo e flogosi eosinofila. Moore e coll. <sup>6</sup> hanno invece utilizzato 34 variabili cliniche ma non marcatori di flogosi ed hanno distinto in 728 pazienti della coorte dello studio SARP (*Severe Asthma Research Program*) 5 *cluster*: a) asma lieve atopico; b) asma lieve-moderato atopico; c) asma non atopico insorto tardivamente in donne obese; d) asma grave atopico; e) asma grave con ostruzione non reversibile.

È comunque evidente una certa eterogeneità tra i *cluster* individuati nei diversi studi; inoltre ai fini di un loro più esteso impiego nella pratica clinica è necessario rispondere ai seguenti quesiti: 1) i *cluster* sono stabili nel tempo?; 2) i risultati sono riproducibili se lo stesso metodo di analisi è applicato ad in altre popolazioni di pazienti; 3) i *cluster* hanno validità clinico-prognostica?; 4) quanto è rilevante il metodo statistico utilizzato e la scelta delle variabili per definire i *cluster* fenotipici? Per quanto riguarda il primo punto Boudier e coll. <sup>7</sup> hanno osservato, studiando due coorti di pazienti a distanza di 10 anni, che la probabilità di un paziente di rimanere stabilmente in un gruppo è elevata e varia tra 54 e 88%. Secondo Newby e coll. <sup>8</sup> invece la probabilità, dopo 3 anni, che ha un paziente di rimanere nello stesso *cluster* è più bassa e stimabile attorno al 52%. Per quanto riguarda gli altri quesiti Kuhlen e coll. <sup>9</sup> hanno dimostrato che l'algoritmo utilizzato nello studio di Moore e coll. <sup>6</sup> (coorte SARP) può essere utilizzato in diversi contesti e in diversi gruppi di pazienti della stessa popolazione (Stati Uniti) ottenendo risultati riproducibili ed in parte sovrapponibili mentre Bourdin e coll. <sup>10</sup> in un recente lavoro, pur confermando la stabilità dei *cluster*, non hanno trovato una correlazione tra i diversi *cluster* ed il rischio di futuro (rischio di incorrere in riacutizzazioni). I dubbi maggiori relativi all'approccio dell'analisi dei gruppi riguardano la metodologia statistico-matematica. Infatti Prosperi e coll. <sup>11</sup> hanno osservato che l'utilizzo di differenti metodi statistici, *exploratory factor analysis* (EFA) e *hierarchical clustering* (HC), e la scelta di diverse variabili clinico-fisiopatologiche e biologiche condiziona l'individuazione di differenti *cluster* fenotipici.

I limiti dell'impiego dell'analisi dei gruppi sono quindi principalmente dovuti alla possibilità di utilizzarla in tutti i pazienti ed alla sua validità clinica. Inoltre la metodologia non è completamente indipendente da valutazioni a priori come il numero e la scelta dei parametri che sono utilizzati per effettuare l'analisi dei gruppi e non sempre è possibile identificare una connessione tra il fenotipo così individuato ed uno specifico meccanismo fisiopatologico e biologico.

# Le piccole vie aeree

## AZIONE E REAZIONE, DAL DANNO AL RIMODELLAMENTO

### B) Fenotipi molecolari

Nel 2008 Woodruff e coll. hanno per primi identificato i "fenotipi molecolari" dell'asma in 42 pazienti affetti da asma e 24 controlli<sup>12</sup>. Mediante lo studio del profilo dell'espressione genica, effettuata con la tecnica dei *microarray*, delle cellule dell'epitelio bronchiale ottenute con *brushing* broncoscopico, gli autori hanno osservato che in circa il 50% dei soggetti asmatici sono iperespressi i marker dell'infiammazione TH2, che dipendono in gran parte dall'attivazione indotta dalla IL13 quali: la periostina (POSTN), il regolatore dei canali del cloro 1 (CLCA1) e l'inibitore della serpina (SERPINEB2). Questo fenomeno non è osservabile nei soggetti normali e nel restante 50% degli asmatici che quindi non presentano una flogosi di tipo TH2 (asmatici non TH2).

L'attivazione TH2/IL13 è associata a: flogosi eosinofila (aumento eosinofili nel sangue e nel BAL), atopia, ispessimento della membrana basale ed elevati livelli di IgE e di iperreattività bronchiale. Ancora più importante gli asmatici TH2/IL13 sono quelli che rispondono positivamente alla terapia steroidea confermando i risultati di precedenti lavori in cui si dimostrava un'associazione tra asma eosinofilo e risposta agli steroidi.

Pertanto numerose evidenze confermano l'esistenza di almeno due differenti fenotipi molecolari dell'asma: il primo caratterizzato da un pattern TH2, solitamente associato a flogosi eosinofila; il secondo, più eterogeneo, costituito da un pattern non TH2 solitamente non eosinofilo (neutrofilico, misto o paucigranulocitario). Per una correlazione tra fenotipi clinici e molecolari (TH2 o non TH2) vedi Tabella 2.

### C) Endotipi

Gli endotipi sono definibili come "distinte entità patologiche definite da uno specifico processo fisiopatologico complesso"<sup>3,4</sup> (Tabella 2).

Endotipi	Asma lieve esordio precoce atopico	Asma grave-moderato esordio precoce	Asma eosinofilo esordio tardivo	Asma molto grave	Asma da esercizio	Asma in donne obese esordio tardivo	Asma paucigranulocitaria
Meccanismo molecolare	TH2 cortico responsiva IL4/IL13	TH2 trattamento steroideo persistente IL4/IL13	TH2 IL5 e IL13?	TH2 (TH1?) Cortico dipendente Autoimmunità flogosi mista neutrofili + eosinofili IL 4-5-13	TH2? Mastociti IL9 leucotrieni	Non TH2 ADMA? neutrofila?	Non TH2 scarsamente responsiva agli steroidi neutrofilica paucigranulocitaria non infiammatoria?

TABELLA 2

Endotipi dell'asma (da Wenzel 2013, mod.<sup>3</sup>)

La scoperta che sottogruppi di soggetti asmatici possono trarre vantaggio da uno specifico trattamento, ad esempio dall'uso degli steroidi nell'asma eosinofilo o di particolari farmaci biologici (anti citochine) si è rivelato uno strumento utile per confermare l'esistenza di meccanismi patogenetici specifici operanti nei singoli endotipi dell'asma<sup>13</sup>.

I farmaci biologici anti IL4/IL13, Anrukinzumab (IMA-683 - 026) e Lebrikizumab che bloccano il recettore per IL13, Pitakinra che blocca il recettore IL4R/IL13Ra1 e lega competitivamente IL4Ra, Tralokinumab (CAT 354) monoclonale IgG che neutralizza la IL13, hanno dimostrato, negli studi in acuto, di poter prevenire la risposta allergica immediata e ritardata, confermando così l'importanza del ruolo di queste due citochine nella patogenesi dell'infiammazione allergica nei soggetti atopici. Al contrario negli studi cronici effettuati in pazienti non controllati con medie dosi di ICS (moderata-grave), i suddetti monoclonali si sono dimostrati poco efficaci, rispetto al placebo, nel migliorare la funzione respiratoria e nel ridurre le riacutizzazioni<sup>14,15</sup>.

Effettuando però apposite analisi post hoc o pre specificate per sottogruppi è stato dimostrato che questi farmaci possono agire selettivamente nei pazienti in cui è presente una flogosi di tipo TH2. Infatti i soggetti in cui sono individuabili elevati livelli di marcatori TH2/IL13, quindi elevati livelli di periostina, eosinofilia ematica o nell'espettorato, elevati livelli FeNO o di IL13 nell'espettorato

o che presentano singolo polimorfismo per IL4, hanno una miglior risposta terapeutica in termini di aumento della funzione respiratoria e/o riduzione delle riacutizzazioni rispetto agli asmatici senza marcatori di tipo TH2. È quindi ipotizzabile che i cluster clinici di asmatici identificabili come asma ad esordio precoce atopico (lieve) e asma grave-moderato ad esordio precoce possano essere quelli in cui il meccanismo patogenetico sia sostenuto in modo sostanziale dalla IL4/IL13 e possano trovare maggior vantaggio dall'impiego di queste anti citochine, dimostrando così l'esistenza di un possibile specifico endotipo. In modo analogo il sottogruppo di pazienti asmatici che ha dimostrato di rispondere meglio alle terapia con anti IL5, Mepolizumab e Reslizumab <sup>14,16</sup> è quello caratterizzato da un'elevata eosinofilia (ematica o nell'espettorato), elevati livelli di FeNO e poliposi nasale <sup>14,16</sup>. In questi soggetti, ma non nella popolazione generale di asmatici, i farmaci biologici anti IL5 hanno dimostrato di ridurre le riacutizzazioni, le visite in pronto soccorso ed i ricoveri. Mepolizumab e Reslizumab non sono però efficaci nel prevenire la risposta allergica immediata e ritardata. La frequente dissociazione tra atopia e fenotipo molecolare TH2 è anche una delle caratteristiche cliniche dei soggetti identificati nell'analisi dei cluster come quelli affetti da "asma eosinofilo ad esordio tardivo e poliposi nasale", come abbiamo precedentemente discusso, per la contemporanea attivazione di diversi meccanismi responsabili dell'aumento della IL5. Il possibile fenotipo molecolare TH2 identifica pertanto un gruppo eterogeneo di asmatici. Infatti in questo contesto i soggetti affetti da "asma molto grave" presentano una complessa risposta immunologica di tipo TH2 ma in cui risulta importante anche l'attivazione dell'immunità innata (dei linfociti ILC2: group 2 innate lymphoid cells o dei nuociti) e acquisita di tipo Th1 e Th17 come possibile espressione di una componente autoimmune che spiega la relativa corticoresistenza <sup>4</sup>. Per quanto riguarda i possibili endotipi non TH2 come l'asma ad insorgenza tardiva negli obesi, l'asma non TH2 paucigranulocitario (lieve-moderato), manca ancora una chiara definizione dei meccanismi molecolari <sup>4</sup>.

## Conclusioni

Le evidenze presentate dimostrano che l'asma è di fatto una malattia eterogenea ed il riconoscimento dei suoi specifici endotipi diventa sempre più importante per poter effettuare un approccio farmacologico differenziato e personalizzato sia nel caso in cui si utilizzi la terapia farmacologica tradizionale che i nuovi farmaci biologici. Si tratta però di un campo in continua evoluzione e la proposta dei nuovi fenotipi-endotipi muta continuamente con l'affinarsi delle tecniche di indagine. In futuro i progressi della genomica e dei pattern delle modificazioni epigenetiche, così come i nuovi biomarcatori, vedi ad esempio l'utilizzo della metabolomica e del naso artificiale, consentiranno di individuare in modo sempre più efficace i diversi fenotipi e di pianificare in modo più preciso prognosi e terapia.

## Bibliografia

1. Borish L, Culp JA. *Asthma: a syndrome composed of heterogeneous diseases*. Ann Allergy Asthma Immunol 2008; 101:1-9.
2. Bradding P, Green R. *Subclinical phenotypes of asthma*. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2010; 10:54-9.
3. Wenzel SE. *Complex phenotypes in asthma: current definition*. Pulm Pharmacol Ther 2013; 26: 710-5.
4. Ray A, Oriss TB, Wenzel SE. *Emerging molecular phenotypes of asthma*. Am J Physiol Lung Cell Mol 2014; doi: 10.1152/ajplung.00070.2014.
5. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, et al. *Cluster analysis and clinical asthma phenotypes*. Am J Respir Crit Care Med 2008; 178:218-24.
6. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, et al. *National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Identification of Asthma Phenotypes using Cluster Analysis in the Severe Asthma Research Program*. Am J Respir Crit Care Med 2010; 181:316-23.
7. Boudier A, Curjoric I, Basagana X, et al. *Ten-year follow-up of cluster-based asthma phenotypes in adults*. Am J Respir Crit Care Med 2013; 188:550-60.
8. Newby C, Heaney LG, Menzies-Gow A, et al. *Statistical cluster analysis of the British Thoracic Society Severe Refractory Asthma Registry: Clinical Outcomes and Phenotype Stability*. Plos ONE (7): e102987.
9. Kuhlen JL, Wahlquist AE, Nietert PJ, Bains SN. *Identification of Asthma Phenotypes in a Tertiary Care Medical Center*. Am J Med Sci 2014; 348:480-5.

# Le piccole vie aeree

## AZIONE E REAZIONE, DAL DANNO AL RIMODELLAMENTO

10. Bourdin A, Molinari N, Vachier I, et al. *Prognostic value of cluster analysis of severe asthma phenotypes*. J Allergy Clin Immunol 2014; pii: S0091-6749(14)00664-2.
11. Prosperi MC, Sahiner UM, Belgrave D, et al. *Challenges in identify asthma subgroups using unsupervised statistical learning techniques*. Am J Respir Crit Care Med 2013; 188:1303-12.
12. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, et al. *T-helper type 2-driven inflammations defines major subphenotypes of asthma*. Am J Respir Crit Care Med 2009; 180:388-95.
13. Agache IO. *From phenotypes to endotypes to asthma treatment*. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2013; 13:249-56.
14. Baines K, Simpson J, Wood LG, et al. *Sputum gene expression signature of 6 biomarkers discriminates asthma inflammatory phenotypes*. J Allergy Clin Immunol 2014; 133:997-1007.
15. Kau AL, Korenblat PE. *Anti-interleukin 4 and 13 for asthma treatment in the era of endotypes*. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2014; 14:570-5.
16. Pavrod ID, Korn S, Howarth P, et al. *Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre double blind placebo controlled trial*. Lancet 2012; 380:651-9.

## Piccole vie aeree e scarso controllo dell'asma

Molti studi condotti negli ultimi dieci anni hanno evidenziato che, nella "real life", una significativa proporzione dei pazienti asmatici, nonostante una terapia di fondo apparentemente adeguata, non raggiunge un soddisfacente controllo della malattia.

In un recente studio cross-sectional, Demoly e collaboratori (Figura 1) <sup>1</sup> hanno valutato il livello di controllo dell'asma e l'utilizzo di risorse sanitarie (visite mediche) in un lasso di tempo di 5 anni (2006-2010), riscontrando che, nonostante un trattamento di fondo, più del 50% di tutti gli asmatici risultavano non ben controllati (54% nel 2010, 57% nel 2008, e 55% nel 2006); gli autori hanno inoltre osservato che il peggioramento del controllo dell'asma si associava ad un significativo incremento di utilizzo delle risorse sanitarie negli ultimi 6 mesi di osservazione. Dati assai simili erano stati evidenziati in Asia da Lai e coll. <sup>2</sup>: il 51% dei pazienti asiatici riferiva sintomi quotidiani e solo il 34% dei pazienti con asma severo riferiva un controllo buono/ottimale. In uno studio più recente, Price e coll. <sup>3</sup> hanno preso in considerazione il controllo dell'asma in 8000 pazienti di 11 paesi Europei; il livello di controllo si conferma basso, con il 45% dei partecipanti allo studio che risulta non controllato; le riacutizzazioni appaiono assai comuni, con il 44% dei pazienti che segnalano il ricorso ad un ciclo con steroidi per os negli ultimi 12 mesi, il 24% che accede a PS ed il 12% che riferisce un ricovero per asma. Anche in pazienti con diagnosi del MMG di asma lieve, in regolare terapia con steroidi inalatori, il livello di controllo dell'asma non risulta ottimale: Caminati e coll. <sup>4</sup> hanno infatti recentemente valutato 950 asmatici mediante ACT, riscontrando uno scarso controllo nel 35% dei pazienti; negli ultimi 12 mesi il 18% riferiva la necessità di una visita specialistica, il 5,3% un accesso al PS ed il 4,5% una ospedalizzazione per asma. E' ovvio che negli studi "real life", una ridotta aderenza dei pazienti verso la terapia prescritta <sup>5</sup>, il non corretto utilizzo dei devices <sup>6</sup> ed un non ottimale controllo delle comorbidità <sup>7</sup>, rappresentano fattori di importanza cruciale nello scarso controllo.

Negli ultimi anni è stata però avanzata l'ipotesi che, nel mancato controllo dell'asma, giochi un ruolo assai importante anche la presenza di uno "small airways phenotype": tale fenotipo appare caratterizzato dalla persistenza di infiammazione/disfunzione delle piccole vie aeree, non ben controllata dalle terapie convenzionali, anche per l'impossibilità della maggior parte delle terapie inalatorie utilizzate nella pratica clinica di raggiungere le regioni più distali dell'apparato respiratorio <sup>8,9</sup>. In un recente lavoro <sup>10</sup>, il gruppo scozzese di Lipworth, utilizzando la metodica dell'oscillometria ad impulsi, ha evidenziato la presenza di una disfunzione a carico delle piccole vie aeree in circa i 2/3 dei pazienti studiati, nonostante la terapia di fondo (ICS e ICS/LABA) "convenzionale" (non extrafine). Inoltre Perez e collaboratori <sup>11</sup> nel 2013 hanno dimostrato la presenza di una disfunzione delle piccole vie aeree, mediante misure di pletismografia corporea in circa il 50% di pazienti con asma moderato-severo in terapia con ICS/LABA e normale FEV<sub>1</sub>.

### Disfunzione/infiammazione delle piccole vie e controllo dell'asma

Molti studi hanno indagato la correlazione tra controllo dell'asma e piccole vie aeree. Takeda e collaboratori <sup>12</sup>, utilizzando l'oscillometria ad impulsi, hanno valutato 65 pazienti con asma

### Marcello Cottini

Specialista Allergologia  
e Immunologia Clinica,  
Specialista Malattie  
dell'Apparato Respiratorio,  
Bergamo