

PNEUMOLOGIA PEDIATRICA

DOCUMENTO INTERSOCIETARIO AAITO/AIPO/SIMRI ASMA GRAVE: DALL'INFANZIA ALL'ETÀ ADULTA

L'epidemiologia dell'asma grave
e l'utilità di un registro

Fenotipi ed endotipi di asma grave nell'età adulta

Inquadramento diagnostico e diagnosi differenziale
nel bambino con asma grave

I fattori di rischio nell'asma grave

I biomarker nell'asma grave

Asma grave e ACOS: differenze e similitudini

Near fatal asthma: prevenzione e trattamento

Terapia dell'asma grave in età pediatrica e nuove
prospettive

Terapia dell'asma grave in età adulta e nuove
prospettive

Il bambino con asma grave diventa adulto: il problema
della Transizione



INDICE

Prefazione

Venerino Poletti Giorgio Piacentini Antonino Musarra,
Stefano Gasparini Renato Cutrera, Maria Beatrice Bilò

3

L'epidemiologia dell'asma grave e l'utilità di un registro

Franca Rusconi, Emanuela di Palmo, Renato Cutrera,
Antonio Di Marco, Gennaro D'Amato, Megon Bresciani

4

Fenotipi ed endotipi di asma grave nell'età adulta

Adriano Vaghi, Fausto De Michele

15

Inquadramento diagnostico e diagnosi differenziale nel bambino con asma grave

Valeria Caldarelli, Giorgio Piacentini

31

I fattori di rischio nell'asma grave

Roberto Battista Polillo, Megon Bresciani, Gennaro D'Amato

39

I biomarker nell'asma grave

Mark Gjemarkaj

44

Asma grave e ACOS: differenze e similitudini

Adriano Vaghi, Andrea Rossi, Gennaro D'Amato

52

Near fatal asthma: prevenzione e trattamento

Gennaro D'Amato, Raffaele Scala, Adriano Vaghi,
Maria D'Amato

70

Terapia dell'asma grave in età pediatrica e nuove prospettive

Francesca Santamaria, Silvia Montella

88

Terapia dell'asma grave in età adulta e nuove prospettive

Leonardo Antonicelli, Claudio Micheletto, Stefano
Gasparini

101

Il bambino con asma grave diventa adulto: il problema della Transizione

Renato Cutrera, Nicola Ullmann, Federica Porcaro,
Valentina Negro, Antonio Di Marco

108

Pneumologia Pediatria

Volume 18, n. 69 - marzo 2018

Direttore Responsabile

Francesca Santamaria (Napoli)

Direzione Scientifica

Stefania La Grutta (Palermo)
Nicola Ullmann (Roma)

Segreteria Scientifica

Silvia Montella (Napoli)

Comitato Editoriale

Angelo Barbato (Padova)
Filippo Bernardi (Bologna)
Alfredo Boccaccino (Misurina)
Attilio L. Boner (Verona)
Mario Canciani (Udine)
Carlo Capristo (Napoli)
Fabio Cardinale (Bari)
Salvatore Cazzato (Bologna)
Renato Cutrera (Roma)
Fernando M. de Benedictis (Ancona)
Fulvio Esposito (Napoli)
Mario La Rosa (Catania)
Massimo Landi (Torino)
Gianluigi Marseglia (Pavia)
Fabio Midulla (Roma)
Luigi Nespoli (Varese)
Giorgio L. Piacentini (Verona)
Giovanni A. Rossi (Genova)
Giancarlo Tancredi (Roma)
Marcello Verini (Chieti)

Editore

Giannini Editore
Via Cisterna dell' Olio 6b
80134 Napoli
e-mail: editore@gianninispa.it
www.giannineditore.it

Coordinamento Editoriale

Center Comunicazioni e Congressi Srl
e-mail: info@centercongressi.com
Napoli

Realizzazione Editoriale e Stampa

Officine Grafiche F. Giannini & Figli
SpA
Napoli

© Copyright 2018 by SIMRI
Finito di stampare nel mese di marzo 2018

Fenotipi ed endotipi di asma grave nell'età adulta. Asma grave e ACOS: differenze e similitudini

Severe asthma and ACOS: similarities and differences

Adriano Vaghi¹, Fausto De Michele²

¹ UOC Pneumologia, ASST Rhodense, Garbagnate Milanese (MI)

² UOC Pneumologia 1 e Fisiopatologia Respiratoria, A.O.R.N. "A. Cardarelli", Napoli

Corrispondenza: Adriano Vaghi email: avaghi@asst-rhodense.it

Riassunto: L'ACOS (*Asthma COPD Overlap Syndrome*) e l'asma grave sono due condizioni patologiche eterogenee, nelle quali convergono diversi fenotipi o endotipi di asma e BPCO, sotto un'unica definizione ombrello di tipo clinico-fisiopatologico. La definizione di asma grave è basata sulla persistenza di uno scarso controllo della malattia nei pazienti asmatici che assumono alte dosi di steroidi inalatori e per via sistemica, mentre l'ACOS viene generalmente definita come "condizione patologica ostruttiva bronchiale in cui si sovrappongono caratteristiche flogistiche, fisiopatologiche e cliniche dell'asma e della BPCO". Attualmente l'ACOS non può essere distinta dall'asma grave in base ad un sola prova spirometrica che evidenzia un danno ostruttivo non reversibile ($FEV_1/FVC < LLN$), poiché un pattern spirometrico ostruttivo può essere presente in entrambe le condizioni patologiche. Pertanto, una corretta diagnosi differenziale necessita di una contestualizzazione della spirometria nell'ambito della storia clinico-funzionale e della risposta alla terapia e del paziente, particolarmente agli steroidi. La presenza di enfisema, dimostrabile da una evidente compromissione della diffusione alveolo-capillare o alla TC del torace, porta ad una diagnosi di *overlap* asma-BPCO (ACOS), mentre al momento non sono disponibili per l'utilizzo clinico *marker* infiammatori che possano differenziare l'ACOS dall'asma grave. Per poter trarre conclusioni definitive sulle differenze e similitudini tra ACOS, asma e BPCO, sono necessari ulteriori studi prospettici che arruolino pazienti con ostruzione bronchiale, comunemente esclusi dagli studi relativi all'asma e alla BPCO. Questi pazienti infatti mostrano caratteristiche "non tipiche" ma, nella vita reale, sono una parte significativa dei soggetti broncostruiti.

Parole chiave: Asma, Asma grave, ACOS, BPCO, Fenotipo, Endotipo

Summary: Both ACOS (*Asthma COPD Overlap Syndrome*) and severe asthma are heterogeneous pathological conditions, in which numerous phenotypes or endotypes of asthma and COPD can be kept together, under a single clinico-pathophysiological umbrella definition. The definition of severe asthma is based on the persistence of poor disease control in asthmatic patients, who take high doses of inhaled and systemic steroids, while ACOS is generally termed as "bronchial obstructive pathological condition overlapping inflammatory, pathophysiological and clinical features typical of asthma and COPD". ACOS can't be actually differentiated from severe asthma by using a single spirometric test showing a non-reversible obstructive bronchial disease ($FEV_1/FVC < LLN$), because an obstructive spirometric pattern can be present in the two pathological conditions. Therefore, a correct differential diagnosis needs a contextualization of spirometry in consideration of the clinico-functional history and of the response to therapy, particularly to steroid. The presence of emphysema, which can be shown by impaired capillary alveolar diffusion or by chest TC, leads to an overlap diagnosis of asthma and COPD (ACOS), while currently no inflammatory markers, which may differentiate ACOS from severe asthma, are available for clinical use. In order to draw definitive conclusions about the differences and similarities among ACOS, asthma and COPD, further prospective studies, enrolling patients with bronchial obstruction, commonly excluded from asthma and COPD studies, are needed. These patients, in fact, show "not-typical" characteristics but, in real life, they share a significant part of subjects with obstructive bronchial pathology.

Key words: Asthma, Severe asthma, ACOS, COPD, Phenotype; Endotype

FENOTIPI DELL'ASMA BRONCHIALE GRAVE

Recentemente è stato sottolineato che l'asma è un termine generico, una diagnosi ombrello, che comprende individui con caratteristiche estremamente diverse tra loro per cui "l'asma non è da intendersi come una singola malattia ma piuttosto come una serie di diverse e complesse malattie o fenotipi ognuno definito da una particolare interazione tra predisposizione genetica e fattori ambientali" (1, 2). Pertanto, "il termine generico asma è destinato a diventare obsoleto e verrà sostituito da varie denominazioni che indicheranno in modo più specifico particolari gruppi di soggetti asmatici ed il meccanismo patogenetico associato alla malattia" (3, 4). Queste osservazioni sono state recepite nelle ultime versioni del documento GINA che definisce l'asma come "una malattia eterogenea" (5).

L'interesse per la definizione di specifici fenotipi o meglio endotipi, *cluster* fenotipici identificati da marcatori comuni e che condividono lo stesso meccanismo etiopatogenetico, ha ricevuto recentemente nuovo impulso dagli studi di biologia molecolare, dalle scienze "omiche" e dalla dimostrazione dell'esistenza di gruppi di soggetti "asmatici" che rispondono in modo selettivo alla terapia steroidea, ai nuovi farmaci biologici (anti IgE e anticitochine).

La sostituzione del termine generico di asma con termini che possano indicare specifici fenotipi o endotipi sarà un processo ancora molto lungo e complesso e le tappe metodologiche di questo percorso, iniziato alcuni decenni or sono, possono essere così sintetizzate (3, 4):

- a) individuazione dei *fenotipi clinici o clinico-biochimici-infiammatori*, ad esempio: asma allergico ad esordio precoce, asma con frequenti riacutizzazioni, asma con ostruzione non reversibile;
- b) individuazione dei *fenotipi molecolari*: fenotipi che si differenziano, utilizzando le tecniche "omiche" (genomica, proteomica, ecc.) per diversi pattern di espressione genetico-molecolare a livello cellulare, ad esempio identificazione di un processo infiammatorio associato a citochine di tipo Th2 o Th1 ed i relativi quadri clinici;
- c) definizione degli *endotipi*: distinte entità patologiche identificate da uno specifico processo fisiopatologico complesso confermato dall'identificazione di specifici *markers* e di una risposta positiva alla *targeted therapy*.

FENOTIPI CLINICI O CLINICO-BIOCHIMICI-INFIAMMATORI

La cosiddetta fenotipizzazione clinica parte dall'individuazione di una caratteristica clinica-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 basate su osservazioni cliniche.

Recentemente, proprio per superare la soggettività di questo approccio, è stata adottata una metodologia matematico-statistica che non presuppone ipotesi a priori: l'analisi dei gruppi o *cluster analysis* (1, 2). I fenotipi più rilevanti tra quelli clinico-fisiopatologici sono: l'asma grave e l'asma lieve, l'asma ad insorgenza precoce-infantile e quella ad insorgenza nell'età adulta, l'asma scatenata dall'esercizio fisico, dai farmaci anti infiammatori non steroidei, tra i fenotipi infiammatori, l'asma eosinofila, quella eosinofila e paucigranulocitaria (1, 3, 4).

Numerosi studi multicentrici (ENFUMOSA - *The European Network for Understanding Mechanisms of Severe Asthma*, TENOR - *The Epidemiological and Natural History of Asthma: Outcomes and treatment Regiments*, SARP - *Severe Asthma Research Program*) (5) hanno cercato di individuare le caratteristiche ed i meccanismi patogenetici dell'asma grave.

Di fatto questi studi hanno dimostrato che l'asma grave, così come l'asma, è una condizione eterogenea e sono individuabili diversi sotto fenotipi tra cui: l'asma caratterizzata da frequenti riacutizzazioni, l'asma steroideo resistente, l'asma con ostruzione non reversibile, l'asma con prevalente danno localizzato nelle piccole vie aeree, l'asma eosinofila e neutrofila (1-3).

L'identificazione dei fenotipi infiammatori viene solitamente effettuata utilizzando la cellularità prevalente presente nell'espettorato indotto.

Un valore di eosinofili nell'espettorato che supera 1,9-3% con una presenza di neutrofil inferiori al 40-70% identifica l'asma come eosinofila; un valore di eosinofili inferiore al 1,9-3% e una presenza di neutrofil superiore al 40-76% definisce l'asma a prevalenza neutrofila; un valore di eosinofili inferiore al 1,9-3% e una presenza di neutrofil inferiore al 40-76% identifica l'asma paucigranulocitaria (6-8).

Globalmente la prevalenza del fenotipo eosinofilo è di circa il 40%, di quello neutrofilo è di circa il 20%, di quello paucigranulocitario del 30% mentre le forme miste sono presenti nell'8% dei casi. È comunque importante sottolineare che i dati ottenuti nei diversi lavori vanno parametrati rispetto ai valori di riferimento utilizzati (6-8).

L'approccio clinico basato sull'ipotesi candidato, adottata negli studi citati, presenta tuttavia importanti limiti dovuti al fatto che i fenotipi individuati sono basati su modelli a priori (scelta di esperti con metodologia *top down*) e sull'osservazione clinica che enfatizza un solo aspetto dell'asma anche se ritenuto prevalente; inoltre esistono ampie aree di sovrapposizione tra fenotipi che rendono poco utile questo approccio metodologico.

Ad esempio un paziente ASA sensibile può essere classificato come tale oppure compreso nei fenotipi dell'asma ad insorgenza tardiva, di quella eosinofila, con ostruzione non reversibile o non allergica (intrinseca) (1, 4).

FENOTIPI CLINICI: CLASSIFICAZIONE MEDIANTE ANALISI DEI GRUPPI

L'analisi dei gruppi (*cluster analysis*), contrariamente al metodo osservazionale-clinico, utilizza un modello esplorativo non supervisionato (*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 (*cluster*) 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*.

Gli algoritmi di *clustering* raggruppano gli elementi sulla base della loro distanza reciproca (similarità/dissimilarità) a partire dalle variabili introdotte nell'analisi, quindi l'appartenenza o meno ad un insieme dipende da quanto l'elemento preso in esame è distante dall'insieme stesso. Graficamente i risultati possono essere espressi mediante un dendrogramma che sintetizza i *cluster* così ottenuti. Gli studi di analisi dei gruppi possono essere effettuati utilizzando solo variabili clinico-fisiopatologiche o integrandoli con marcatori biologici (1, 4).

Nella tabella 1 sono sintetizzati i risultati dei principali studi.

Tab. 1. Sintesi dei principali lavori sulla fenotipizzazione dell'asma che utilizzano la cluster analysis.							
Studio	Caratteristiche dello studio	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6
Haldar e coll. (2008) Coorte Leichesther (9)	16 variabili cell. espettorato 184 pazienti: asma moderata-grave	Esordio precoce atopici	Esordio tardivo donne obese flogosi neutrofila (Neut: 49% esp.)	Esordio precoce atopici, asma grave (Eos: 4,2% esp.)	Esordio tardivo maschi sintomi (-) flogosi eosinofila (Eos: 8,4% esp.)		
Moore e coll. (2010) Coorte SAPS (10)	34 variabili 728 pazienti: asma lieve-grave	Asma lieve atopici	Asma lieve-moderata atopici	Esordio tardivo donne obese spesso non atopiche riacutizzazioni (+)	Asma grave atopici	Asma grave ostruzione non reversibile	

Wu e coll. (2014) Coorte SAPS (12)	112 variabili cell BAL e sierica 378 pz asma lieve-grave	Controlli 2 pz con asma lieve	Insorgenza precoce asma lieve, sintomi (-) non ostruzione, Eos > cluster 1	Donne ispaniche sintomi (+) visite mediche (+) non ostruzione scarsa flogosi	Donne (75%), 54% SA elevato BMI sintomi (++) ostruite con reversibilità, scarsa flogosi	Asma grave 87% esordio tardivo (> 30a) atopia (+/-) poliposi nasale sinusite uso steroidi orali (++) ostruiti (+) Eos (++)	Asma grave 100%, esordio precoce ostruiti ricoveri (++) FeNO (++) Eos (++) steroidi (++)
Moore e coll. (2014) Coorte SAPS (11)	50 variabili cell. espettorato 423 pz Asma lieve-grave	Asma lieve-moderata non ostruzione paucigranulocitario	Asma lieve-moderata non ostruzione paucigranulocitario eosinofilo (+)	Esordio tardivo Asma grave Ostruzione (+) BMI (++) Sintomi (++) Steroidi sistemici (+) Neutrofilia (+)	Asma grave Ostruzione (++) Sintomi (++) Steroidi sistemici (+) Neutrofilia o mista		
Hinks e coll. (2016) Coorte Southampton e Portsmouth (14)	103 variabili marker flogosici e YKL-40, MMP cell. espettorato 194 pz: asma grave	A) Asma a lieve giovani paucigranulocitico periostina (-)	(B) anziani malattia sinusonasale periostina (++) MMP3 (++)	(C) BMI (++) periostina (-) MMP8 (++) neutrofilia	(E) Esordio precoce, EOS (++) periostina (++) FeNO (++) IL5 espet (++) corticoresistenza	(F) Eos (++) Neut (+) periostina (++) ostruzione (++) ECP (++) poliposi nasale depressione	(H) Neut (++) ostruzione (++) periostina (-) ACQ (-)
Lefaudeaux e coll. (2017) Coorte U-BIOPRED (13)	8 variabili e cell espettorato supernatante espettorato 266 pz asma lieve-grave fumatori o ex fumatori	lieve-moderata atopia (84%) Eos (+/-) espett	Esordio tardivo asma grave storia di fumo sovrappeso (41% BMI > 30) ostruzione grave (FEV ₁ 58%) Eos (++) espet, e circolanti atopia (+/-) steroid dip (+), IL16(+)	simili al cluster 2 ma non fumatori	Donne obese (BMI 40) asma grave non controllata riacutizzazioni (++) scarsamente ostruite 73% atopiche uso SABA a.b.(++)		
Amelik e coll. (2013) Coorte Olandese (17)	12 variabili cell espet 200 pz (25-75 y) esordio > 18 y fem (61%), non atopici (55%)	Asma grave Eos (++) espett e circ. ostruiti (+) sintomi (+/-) stroid dip (+)	Donne obese Eos (-) espet. Sintomi (++) risorse sanitarie (++)	Lieve moderata buon controllo funzione resp. normale			
Newby e coll. (2014) Coorte BTS (22)	10 variabili eos. sist 349 pz	Esordio precoce Atopici	Esordio tardivo Obesi Sintomi (+/-)	Asma lieve funzione resp normale	Esordio tardivo Eos (++)	Ostruzione non reversibile	

Loza e coll. (2016) C o o r t e ADEPT C o o r t e U-BIOPRED (21)	9 variabili 148 pz FBS, brusching cell. espet.	Lieve funzione resp normale Esordio precoce Flogosi (+/-) Infamm. Th2	Moderata BHR (++) Ostruzione (+) Infiam. Th2 Eosinofilia (++) Atopia (++) FENO (++)	Moderata/grave Ostruzione non reversibile (++) Neutrofilia (++) Atopia (-) FENO (-)	Asma grave BHR (+) Ostruz (++) Sintomi(++) Neut (++) eos (+) Atopia (-)		
Choi e coll (2017) Coorte SARP e altre (15)	20 variabili 248 pz FBS, brusching cell. espet.	Esordio precoce Asma lieve Ostruzione reversibile TAC: normale struttura vie aeree	Asma moderata e grave Ostruzione (+) Scarsa infiammazione Sintomi difficili da controllare TAC: riduzione lume bronchiale riduzione deformabilità polmonare	Asma grave Donne obese Ostruzione reversibile Iperreattività (63% con PC20 < 1 mg/ml) Linfopenia Neutrofilia (+) Difficile controllo Steroido dip (30%) TAC: ispessimento parete bronchiale, non riduzione lume bronchiale, moderata riduzione deformabilità polmonare	Asma grave esordio tardivo uomini prevalenti ostruzione (++) Neutrofilia esp. (++) Sintomi difficili da controllare Steroido dip (30%) TAC: riduzione lume bronchiale significativa riduzione deformabilità polmonare air trapping (++) (33% con PC20 < 1 mg/ml)		

Legenda: (-) assente; (+) lieve; moderato/elevato (++); MMP: metalloproteasi; YKL-40: chitinase; BMI: Body mass index; Neut: neutrofilia; Eos: eosinofilia.

I due lavori che per primi hanno utilizzato con successo questa metodica analitica innovativa nello studio della fenotipizzazione dell'asma grave sono quelli di Haldar et al. (9) e di Moore et al. (10). Haldar et al. (9) hanno applicato la *cluster analysis* a un gruppo di 184 pazienti con asma grave prendendo in considerazione 16 variabili tra cui: età, età di insorgenza dell'asma, controllo dei sintomi, atopia, reattività bronchiale, FEV₁, e come marcatori flogistici il FeNO (frazione ossido nitrico espirato) e la cellularità dell'espettorato indotto ed hanno individuato 4 cluster di pazienti, mentre studiando le caratteristiche clinico-fisiopatologiche di 728 soggetti della coorte dello studio SARP (*Severe Asthma Research Program*) Moore et al. (10) hanno descritto 5 *cluster* fenotipici (Tabella 1). Gli Autori hanno inoltre osservato che l'utilizzo di tre sole variabili (FEV₁ pre e post-broncodilatatore ed età di insorgenza) consente di classificare correttamente i pazienti nei 5 *cluster* e la scelta delle suddette variabili rende conto dell'80% della corretta assegnazione ad un certo *cluster*. Due successivi studi (11, 12), sempre effettuati arruolando i pazienti nella coorte SARP, oltre alle variabili clinico-fisiopatologiche hanno preso in considerazione per l'analisi dei gruppi diversi marcatori infiammatori sistemici (11, 12), presenti nell'espettorato (11) o nel BAL (12).

Nello studio di Wu et al. (12) l'analisi dei gruppi è stata effettuata utilizzando una metodologia non supervisionata ed il calcolo di apprendimento automatico (*learning machine*); sono stati così individuati 6 *cluster* di pazienti. I pazienti tradizionalmente definibili come affetti da asma grave sono distribuiti tra i *cluster* 3 e 6. Il *cluster* 4 identifica i pazienti con asma ad in-

sorgenza in età infantile caratterizzati da una infiammazione eosinofila e una ridotta funzione respiratoria.

Il *cluster 5* è costituito per la maggior parte da soggetti con asma grave (> 87%) insorta in età giovanile adulta (> 30 anni) caratterizzata da spiccata eosinofilia nel BAL e circolante, rino sinusite e poliposi nasale, uso di steroidi orali, un basso valore di FEV₁ e uno scarso numero di cutipositività. Nel *cluster 6* sono presenti solo pazienti affetti da asma grave ad esordio precoce che sono caratterizzati da frequenti ricoveri, elevati livelli di FeNO, eosinofili circolanti e nel BAL malgrado impiego di steroidi sistemici, mentre il *cluster 4* è costituito in prevalenza da donne (75%) di cui circa il 50% con asma grave e un elevato BMI, frequenti sintomi, familiarità per asma e ostruzione lieve e reversibile, livelli medio-bassi di flogosi e di FeNO.

I risultati dello studio e l'applicazione della metodologia della *learning machine* confermano ed ampliano i risultati dei precedenti studi.

Viene ulteriormente dimostrata la correazione tra eosinofilia cortico-resistente e gravità dell'asma ma non si evince dallo studio un significativo ruolo giocato dai neurofilii nell'asma grave.

I lavori più recenti hanno utilizzato tecniche di proteomica e metabolomica (13,14) con la finalità di individuare non solo distinti *cluster* clinici o infiammatori, ma per poter differenziare i fenotipi dell'asma secondo la presenza di complessi network di mediatori e meccanismi etiopatogenetici, quindi indirizzare la ricerca verso l'individuazione di ipotesi endotipiche.

Lefaudeux et al. (13) hanno effettuato l'analisi dei gruppi in 266 pazienti con asma grave della coorte U-BIOPRED (*Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Diseases Outcomes*): la novità dello studio è che comprende sia pazienti fumatori, sia ex fumatori.

Sono stati così individuati 4 *cluster* di cui tre costituiti da pazienti con asma grave (*cluster 2-3-4*) ed uno da pazienti con asma lieve-moderata (*cluster 1*).

In due *cluster* con asma grave è presente ostruzione cronica (*cluster 2-3*). IL16 (*lymphocyte chemoattractant factor*) è l'unico mediatore presente nell'espettorato che differenzia l'asma grave da quella lieve moderata. IL16 è espressa dalle cellule epiteliali degli asmatici in particolare dopo bronco-ostruzione indotta da istamina ed allergeni.

Il *cluster 2* presenta i più elevati livelli di CXCL7 e GM-CSF che possono riflettere l'esposizione al fumo. Hincks et al. (14) hanno studiato 194 pazienti con asma grave (coorte Southampton e Portsmouth) e 21 controlli: la *cluster analysis* è stata condotta su 103 parametri clinici e *marker* infiammatori misurati sia sul siero che nell'espettorato indotto; la relazione tra i singoli *marker* è stata ricostruita utilizzando un network bayesiano.

I *cluster* individuati utilizzando l'analisi topologica replicabili nelle due coorti sono risultati 6 (tabella 1) di cui il *cluster H* è costituito da pazienti con grave ostruzione e neutrofilia e quello E da asma ad esordio precoce con flogosi di tipo Th2, eosinofilia e corticoresistenza.

L'analisi bayesiana, applicata al network dei mediatori, mette in evidenza due principali fenotipi infiammatori: eosinofilo e neutrofilo ed un terzo misto.

La IL5 è elevata nei soggetti con flogosi eosinofila e non correla con IL13. IL13 correla invece con le caratteristiche dell'asma allergica ma non partecipa ad un network infiammatorio complesso.

I bassi livelli di IL13 in presenza di IL5 si possono spiegare con la relativa corticoresistenza della IL5 rispetto alla IL13. Nelle forme eosinofile IL5 correla con ECP (proteina cationica eosinofila), inoltre le MPB (proteine basiche maggiori) prodotte dagli eosinofili possono aumentare la produzione di IL8 dall'epitelio e questo può spiegare la presenza di forme miste.

Le MMP (metalloproteasi) sono associate all'infiammazione neutrofila e sono disregolate nei pazienti obesi, correlano con IL5 ma non con IL13; la MMP8 infatti inibisce il recettore per IL13. A sua volta i livelli sierici della YKL-40 (chitinase) aumentano con il grado di ostruzione bronchiale in quanto la chitina favorisce la proliferazione delle fibrocellule muscolari lisce, la produzione di IL8 e la flogosi neutrofila.

Lo studio sottolinea l'importanza del fenotipo neutrofilo e misto nell'asma e utilizza per confermare questi fenotipi infiammatori, non solo la presenza dei neutrofili nell'espettorato, ma anche quella di nuovi marcatori biochimici come la chitina e le metalloproteasi ed inoltre propone nuove possibili relazioni tra IL5 e flogosi neutrofila.

Un nuovo approccio alla fenotipizzazione dell'asma è stato recentemente proposto da Choi et al. (15) utilizzando le caratteristiche delle vie aeree descrivibili con TAC del torace (57 variabili analizzate mediante PCA: *Principal Component Analysis*).

Le correlazioni tra clinica e *imaging* possono offrire nuove opportunità per individuare e testare diversi approcci terapeutici come ad esempio la termoplastica.

I pazienti dei gruppi in cui sono presenti alterazioni delle vie aeree alla TAC (*cluster 2-3-4*) sono quelli con asma grave. I pazienti compresi nel *cluster 3* sono caratterizzati dal punto di vista fisiopatologico da una elevata reversibilità bronchiale, iperreattività (63% con PC20 < 1 mg/ml) e dal punto di vista dell'*imaging* da un aumento di spessore della parete bronchiale, verosimilmente correlato a processi di rimodellamento.

Il gruppo 4 presenta *air trapping*, che evidenzia compromissione delle piccole vie aeree, ostruzione non reversibile e flogosi neutrofila (definita come presenza di neutrofilo > 50% nell'espettorato) nel 78% dei pazienti. Il lavoro conferma la relazione tra neutrofilia e ostruzione non reversibile osservata anche da altri Autori, in particolare negli studi che utilizzano la metodologia dell'espettorato indotto (9,11,14,15) ma non in quelli che utilizzano il BAL o le biopsie bronchiali (12). I neutrofilo infatti costituiscono una parte significativa delle cellule recuperate nell'espettorato nei soggetti normali e quale sia il valore di neutrofilo da considerarsi patologico è ancora oggetto di dibattito in quanto la loro presenza nell'espettorato è condizionata da numerose variabili ambientali come le infezioni e l'uso degli steroidi. Verosimilmente la neutrofilia nell'espettorato come unico indicatore non è da considerarsi il marcatore ottimale per definire "l'asma neutrofila", in particolare quando non si adotta un valore di cut-off sufficientemente specifico, ad esempio > 76% (16).

Elementi comuni tra i cluster individuati nei diversi studi

Considerando complessivamente i risultati dei precedenti lavori (tabelle 1 e 2), malgrado l'esistenza di una notevole eterogeneità tra i diversi *cluster* conseguente anche alle diverse coorti studiate e ai metodi utilizzati, sono evidenziabili alcuni elementi di similarità e sovrapposizione per cui è possibile descrivere, ovviamente con un discreto margine di approssimazione, *cluster* o gruppi fenotipici comuni ai diversi studi che possono essere così descritti (tabella 2): (a) asma lieve-moderata, atopica, ad insorgenza infantile, prevalentemente paucigranulocitaria; (b) asma moderata-grave atopica, ad insorgenza solitamente infantile, spesso associata ad ostruzione, con flogosi eosinofila solitamente steroido responsiva; (c) asma ad esordio tardivo, eosinofila o mista, spesso associata a poliposi nasale, rinosinusite, ASA sensibilità ed ostruzione; l'eosinofila può essere corticoresistente; (d) asma in soggetti obesi, spesso di sesso femminile, solitamente ad esordio tardivo e non atopica; (e) asma grave con ostruzione non reversibile prevalente neutrofila o mista.

Nell'ambito di questo ultimo gruppo di pazienti, Wenzel et al. (1) hanno identificato un sottogruppo con asma molto grave ad esordio o aggravamento che si verifica in età adulta, con frequenti riacutizzazioni, cortico dipendenza, familiarità o storia personale per patologie autoimmuni ed anatomopatologicamente caratterizzato da patologia delle piccole vie aeree e granulomi interstiziali non necrotizzanti. Si conferma l'utilità di considerare come parametri importanti, al fine di definire i *cluster*, l'età di insorgenza dell'asma, la gravità, la presenza o meno di ostruzione, l'atopia e possibilmente il tipo di flogosi prevalente. Dobbiamo sottolineare però che esiste una continuità e una sovrapposizione tra i vari fenotipi infiammatori: ad esempio la flogosi neutrofila, eosinofila e paucigranulocitaria è presente in tutti i *cluster* identificati da Moore (11) anche se si verifica in ogni *cluster* la netta prevalenza di un particolare tipo di infiammazione.

È di comune riscontro il *cluster* costituito da soggetti obesi (spesso si tratta di donne con asma ad esordio nell'età adulta) sintomatici con frequenti riacutizzazioni e impiego di steroidi sistemici. Alcuni Autori hanno associato questo fenotipo all'infiammazione neutrofila (9,14,17) altri paucigranulocitaria (12) o eosinofila (11,13). Nei soggetti obesi che diventano asmatici in età adulta è verosimile un coinvolgimento di meccanismi dell'immunità innata connessi alla produzione di citochine da parte dei macrofagi (M1) e degli adipociti (IL1, TNF α , IL6, IL8) ed all'attivazione di cellule linfoide ILC3, mentre nei soggetti ad insorgenza precoce che diven-

tano obesi nel corso della vita è più verosimile la permanenza di un pattern infiammatorio di tipo Th2, eosinofilo, che può eventualmente complicarsi con la sovrapposizione della risposta immunitaria innata (18,19).

Tab. 2. Sintesi relativa ai più importanti fenotipi dell'asma.					
Cluster	Esordio precoce Lieve Atopica Sintomi intermittenti stagionali paucigranulocitaria	Esordio precoce Moderata-grave Atopica (++) ostruzione (+) spesso reversibile Eos (+)	Esordio tardivo Grave Spesso poliposi nasale e rino- sinusite possibile ASA s Atopia (+/-) Ostruzione (+) Eos (++)	Esordio tardivo Obesi Prevalenza donne sintomi (++) Neutrofila o Neut + Eos Atopia (+/-)	Esordio tardivo peggioramento in età adulta Asma grave Ostruzione (++) non reversibile Atopia (+/-) Neut + Eos o Neutrofila
Haldar (2008)(9)	1	3	4	2	2?
Moore (2010)(10)	1-2	4	3 ?	3?	5
Moore (2014)(11)	1 (A); 2 (B)	---	---	3 (C)	4 (D)
Wu (2014) (12)	1;2;3	6	5	4	---
Hinks (2016) (14)	1 (A)	4 (E)	5 (F)	3 (C)	6 (H)
Lefaudeux (2017) (13)	1	3	3/2	4	2/3
Newby (2014) (22)	1/3	----	4	2	5
Amelink (2014) (17)	3	----	1	2	---
Kim (2013)	1 (A)?	3 (C)	4 (D)	-----	2 (B)
Choi (2017) (15)	1	2?	2?	3	4
Loza (2016) (21)	1	2/4	2/4	-----	3
Meccanismi patogenetici	<u>Th2</u> : marcatori trascrittomici Th2 dimostrabili nel 50% dei casi	<u>Th2</u> Biomarcatori: FeNO, eosinofili, IgE soppressi dalla terapia steroidea (corticosenesibili)	<u>Infiar. tipo Th2</u> Elevati livelli di FeNO eosinofilia polmonare, spesso corticoresistente <u>non Th2</u> : possibile ma non dimostrata	<u>non Th2</u> Marcatori metabolici stress ossidativo IL6 possibile linfociti ILC3	<u>Infiar. tipo Th2</u> FeNO e eosinofili, basse IgE corticoresistenti <u>non Th2</u> : Th1 e Th17 possibili forme miste: Th2 e Th1/Th17

VALIDITÀ METODOLOGICA E CLINICA DEGLI STUDI CHE UTILIZZANO L'ANALISI DEI GRUPPI

Al fine di una validazione clinica dei risultati dell'analisi dei gruppi è necessario valutare la solidità dal punto di vista clinico e prognostico dei *cluster* individuati che pertanto devono 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 altre popolazioni di pazienti? 3) 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 et al. (20) 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%.

Ad analoghi risultati è giunto lo studio di Loza et al. (21).

La transizione tra fenotipi è più frequente tra i fenotipi non allergici che tra quelli allergici in quanto quest'ultimi sono meno definiti. I risultati inoltre dimostrano una buona stabilità dello stato allergico nel tempo. Secondo Newby et al. (22) invece la probabilità, dopo 3 anni, di un paziente di rimanere nello stesso *cluster* è più bassa e stimabile attorno al 52%.

In particolare si è osservato che solo il 25% dei pazienti presenti nei *cluster* con asma grave atopica e asma eosinofila rimane nello stesso *cluster* ed a seguito dell'incremento e dell'ottimizzazione della terapia steroidea orale una significativa quota di questi pazienti converge verso il *cluster* costituito dalle donne obese con asma a esordio tardivo, che è il gruppo caratterizzato da una maggior stabilità (71%). Per quanto riguarda gli altri quesiti, Kuhlen et al. (23) hanno dimostrato che l'algoritmo utilizzato nello studio di Moore et al. (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 et al. (24) 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).

Le criticità maggiori di questo approccio metodologico dipendono dalla metodologia statistico matematica utilizzata, infatti Prosperi et al. (25) hanno osservato che l'utilizzo di differenti metodi statistici (EFA: *exploratory factor analysis* e HC: *hierarchical clustering*) e la scelta di diverse variabili clinico-fisiopatologiche e biologiche condizionano l'individuazione di differenti *cluster* fenotipici. Limiti dell'impiego dell'analisi dei gruppi sono quindi principalmente la generalizzazione e l'utilità clinica (24). Inoltre la metodologia non è completamente indipendente da valutazioni a priori come il numero e la scelta dei parametri che sono utilizzati per l'analisi dei gruppi e non esiste sempre una connessione tra il *cluster* fenotipico così individuato ed uno specifico meccanismo fisiopatologico e biologico che sta alla base dei gruppi fenotipici identificati.

FENOTIPI MOLECOLARI

Le tecniche di "fenotipizzazione molecolare" che utilizzano un approccio "omico", in particolare quello genomico, e l'impiego di metodi di analisi non supervisionati consentono di individuare dei *marker* correlati ai diversi pattern infiammatori dell'asma molto più stabili e ripetibili rispetto alla caratterizzazione effettuata tramite l'espettorato indotto o il BAL.

Inoltre permettono di mettere in evidenza, o per lo meno di ipotizzare in modo circostanziato, i complessi network biologici che sono sottostanti ai processi etiopatogenetici dei diversi fenotipi.

La comprensione dei meccanismi infiammatori dell'asma è notevolmente progredita negli ultimi 20 anni ed in questo contesto l'epitelio bronchiale ha assunto un ruolo preminente come primo bersaglio degli agenti ambientali che provocano danni all'apparato respiratorio (batteri, inquinanti, allergeni, ecc.) e come elementi cellulari capaci di trasdurre ed innescare (*gate keeper*) la risposta immunitaria innata ed acquisita.

Per cui è stato ricercato nello stato di attivazione genica delle cellule epiteliali, effettuato mediante gli studi di fenotipizzazione trascrittomico, il paradigma della risposta infiammatoria nell'asma. Nel 2009 Woodruff et al. (26) hanno per primi identificato i "fenotipi molecolari" dell'asma mediante lo studio del profilo dell'espressione genica delle cellule dell'epitelio bronchiale ottenute con *brushing* bronchiale. Gli Autori, utilizzando la tecnica di *microarray* e della trascrizione polimerasica inversa, hanno dimostrato che in circa il 50% dei soggetti asmatici sono iperespressi i *marker* genici dell'infiammazione di tipo Th2, che dipendono dall'attivazione indotta dalla IL4-13 quali: la periostina (POSTN), il regolatore dei canali del cloro 1 (CLCA1) e l'inibitore della serpina (SERPINEB2); questo fenomeno non è osservabile nei normali e nel restante 50% degli asmatici (non Th2). Nei pazienti in cui è dimostrabile un'aumentata espressione Th2/IL13, ma non in quelli con bassa espressione Th2/IL13, è presente una significativa eosinofilia, nel BAL e circolante, atopia, un aumento delle IgE e della iperreattività bronchiale ed un ispessimento della membrana basale. Ancora più importante è che gli asmatici con flogosi Th2/IL13 sono quelli che traggono il maggior vantaggio dalla terapia steroidea confermando i risultati dei precedenti lavori che hanno dimostrato un'associazione tra asma eosinofila e risposta agli steroidi.

La novità dell'approccio metodologico di Woodruff et al. (26) consiste nell'individuare il "fenotipo Th2" non effettuando una misura diretta delle citochine Th2 nell'espettorato, determinazione spesso difficile e variabile, ma identificando l'espressione di alcuni geni utilizzati come marcatori della infiammazione Th2 (fenotipizzazione trascrittomico).

La metodica del *brushing* necessaria per ottenere campioni di cellule epiteliali è complessa ed invasiva pertanto Peters et al. (27) hanno valutato la possibilità di effettuare la fenotipizzazione molecolare delle cellule epiteliali provenienti dall'espettorato indotto. Anche in questo caso, in alternativa alla determinazione diretta delle IL4, IL5 e IL13 o dei relativi RNA, è stata utilizzata l'espressione dei geni correlati alla risposta Th2 come nello studio di Woodruff et al. (26).

La prevalenza della risposta di tipo Th2 nella coorte è del 70% rispetto al 50% del lavoro di Woodruff et al. ma in questo caso sono stati studiati pazienti più gravi. Inoltre è stato osservato che il segnale Th2 correla con la gravità dell'ostruzione e lo scarso controllo della sintomatologia. Nei pazienti con endotipo Th2 è inoltre up regolata l'espressione genica dell'eotassina e della triptasi mastocitaria. Anche Baines et al. (28) si sono proposti di descrivere i fenotipi dell'asma a livello trascrizionale decodificando il profilo dell'espressione genica delle cellule ottenute con l'espettorato indotto. A tal fine è stata utilizzata la metodica GWSA (*whole-genome gene expression microarrays*) e l'analisi dei risultati e la definizione dei *cluster* è stata effettuata con metodi analitici non supervisionati. Gli Autori hanno così individuato 3 fenotipi genomici che correlano con i seguenti quadri clinici: (a) basso valore di FEV₁, eosinofilia nell'espettorato, aumento del FeNO, sintomatici; (b) basso FEV₁, elevata neutrofilia nell'espettorato; (c) elevata presenza di macrofagi e caratteristiche dell'espettorato simili a quelle dei pazienti sani, FEV₁ nella norma. La differenza nell'espressione genica tra *cluster* è correlata a geni che regolano la risposta immune. I geni che governano la risposta IL1, TNFα e NFκB sono sovra espressi nel *cluster* (b) così come nel *cluster* (a), sono sovra espressi quelli correlati alla risposta immunitaria di tipo Th2.

In un successivo studio del 2014 gli stessi autori (28) hanno indagato, sempre utilizzando tecniche di GWSA, la possibilità di identificare dei *marker* genetici che possano predire i diversi fenotipi infiammatori dell'asma: eosinofilo, neutrofilo e paucigranulocitario.

Sono stati individuati 23 geni, sia negli studi di progettazione sia di validazione, che sono diversamente espressi nei diversi fenotipi infiammatori di cui 6 possono essere utilizzati come *marker* fenotipici. Tre sono iperespressi nei pazienti con flogosi eosinofila [Charcot-Leydon crystal protein (CLC); carboxypeptidase A3 (CPA3); deoxyribonuclease I-like 3 (DNASE1L3)] e sono correlati con l'attivazione mastocitaria, eosinofila e con i meccanismi di controllo dell'apoptosi epiteliale. I restanti tre [IL-1b (IL1B), alkaline phosphatase, tissue non-specific isozyme (ALPL), chemokine (C-X-C motif) receptor 2 (CXCR2)] sono implicati nell'espressione del sistema inflammasoma e della flogosi neutrofila (AUC 91%).

Un importante risultato dello studio è che i *marker* genomici correlati alla flogosi tipo Th2 sono più sensibili degli eosinofili nell'espettorato nell'identificare i soggetti responsivi agli ICS. Il FeNO è un importante marcatore di flogosi nell'asma ed è prodotto in gran parte dalle cellule dell'epitelio bronchiale a seguito dell'induzione dell'enzima nitrossido sintetasi inducibile (i NOS2) che è modulata dalla flogosi di tipo Th2.

Modena et al. (29) hanno indagato, utilizzando delle metodiche genomiche complesse ed innovative, se sono individuabili nelle cellule dell'epitelio bronchiale dei *cluster* di espressione genica correlati alla produzione del FeNO. L'analisi dei gruppi ha consentito di individuare 5 gruppi SCs (*Subject Clusters*). I *cluster* 2-3-5 sono caratterizzati da elevati livelli di FeNO e sono prevalentemente costituiti da pazienti con asma grave con elevati livelli di IgE e di eosinofili circolanti e nel BAL. Al contrario i *cluster* SCs 1 e 4 con basso FeNO sono costituiti dai soggetti normali (*cluster* 1) o con asma lieve-moderata, in gran parte atopici ma con bassi valori di IgE e di eosinofili. Successivamente gli Autori hanno confrontato il profilo trascrizionale dei 5 SCs utilizzando la *gene set analysis* e l'analisi di arricchimento genico (GSEA: *gene set enrichment analysis*) individuando così 8 *cluster* genici (GC). Nel *cluster* GC8 sono presenti i geni che regolano le funzioni dei mastociti (TPSAB1 e CPA3) ed i due maggior SCs presenti sono quelli caratterizzati da più elevati valori di FeNO e di BHR con l'asma insorta in età giovanile e frequenti riacutizzazioni. Il lavoro dimostra che sebbene il FeNO sia genericamente correlato all'asma eosinofila ed alla flogosi di tipo Th2, i sistemi biologici che ne regolano la produzione sono assai più complessi di quelli fino ad ora noti ed in particolare sono individuabili almeno tre network genomici e citochinici diversamente espressi e correlabili alla sua regolazione.

Recentemente sono stati pubblicati due interessanti lavori a partire dalla coorte BIOPRED che hanno descritto con metodi bioinformatici il profilo trascrittomico delle cellule presenti nelle vie aeree al fine di descrivere i fenotipi molecolari dell'asma.

Nel primo lavoro Kuo et al. (30) hanno studiano il profilo trascrittomico derivato dalle biopsie bronchiali e delle cellule epiteliali ottenute con il *brushing* in 107 soggetti, con asma moderata-grave. L'analisi genomica è stata effettuata utilizzando un nuovo metodo di bioinformatica, la GSVA (*gene set variation analysis*), una variante del metodo GSEA, che impiega una tecnica di calcolo non supervisionata per individuare i geni che risultano sovra o sotto attivati raggruppandoli in diversi *cluster*. Utilizzando 9 liste di geni e applicando l'analisi genica GVSA a campioni di *brushing* epiteliale (99 pazienti) sono stati identificati 4 *cluster* fenotipici.

Il gruppo 1 e 3 sono caratterizzati da un'elevata espressione delle citochine di tipo Th2, da eosinofilia e da una scarsa risposta ai cortisonici (corticoresistenza). Il gruppo 1 ha il più elevato numero di eosinofili nella sottomucosa, elevati livelli di FeNO, frequenti riacutizzazioni e uso di steroidi orali. I *cluster* 2 e 4 non sono eosinofili.

Questo studio conferma che l'infiammazione eosinofila è correlata con la risposta infiammatoria di tipo Th2 e persiste nei pazienti con asma grave, malgrado le elevate dosi di steroidi somministrate. Inoltre la stessa espressione genica di tipo Th2 è riscontrabile sia a livello dell'epitelio che delle biopsie bronchiali, quindi in un'eterogenea popolazione di cellule (fibroblasti, cellule muscolari, ecc.). Nel secondo lavoro Kuo et al. (31) indagano i fenotipi molecolari dell'asma analizzando l'espressione genetica dell'espettorato indotto, eosinofilo verso non eosinofilo.

L'analisi ha consentito di identificare tre *cluster* trascrittomici TACs (*transcriptome associated cluster*):

- TAC1 è caratterizzato dalla espressione genica dei recettori per IL3R, IL33R, CCR3 (CCR11) e il TSLPR;
- TAC2 è caratterizzato dalla presenza dei geni che codificano il sistema inflammasoma, l'IN-FY1', il TNF α ed i DAMPs (*damage-associated molecular patterns*);
- TAC3 è caratterizzato dai geni che regolano il metabolismo ossidativo dei mitocondri, il processo di ubiquitinizzazione e la senescenza cellulare.

Il TAC1 mostra la più elevata concentrazione di geni che governano la risposta infiammatoria Th2/IL13 e quella innata di tipo ILC2 (*group 2 innate lymphoid cells*). In questo *cluster* sono compresi i soggetti con la maggior percentuale di eosinofili nell'espettorato e di FeNO, sono pazienti con asma grave con frequenti riacutizzazioni, ostruzione bronchiale e corticodipendenza. Nel TAC2 sono presenti i soggetti con il più elevato livello di neutrofilia nell'espettorato, proteina C reattiva (PCR) ed eczema. L'espettorato dei soggetti nel TAC3 è solitamente paucigranulocitario o con uno scarso numero di eosinofili, la funzione respiratoria è normale.

La periostina ed il FeNO non sono statisticamente differenti tra i tre TACs.

Il pattern eosinofilo è presente sia nelle forme lievi (TAC3) che in quelle gravi (TAC1) ma è verosimilmente sostenuto da meccanismi diversi. Nei due studi sono presenti elementi di criticità conseguenti alla selezione a priori delle liste geniche utilizzate per l'analisi GSVa ed al fatto che queste non differenziano efficacemente la risposta immunitaria innata acquisita. Inoltre i risultati non sono stratificati tra fumatori e non fumatori.

Quali sono le informazioni più importanti che possiamo ottenere dagli studi che utilizzano metodologie trascrittomiche?

I marcatori trascrittomici identificati nei lavori analizzati sono sostanzialmente riconducibili a due principali pattern: asma ad elevata espressione Th2 (50-70%) e a bassa espressione Th2 (non Th2). Rispetto al primo lavoro di Woodruff et al. (26) è emerso che i *cluster* fenotipici in cui prevale la flogosi eosinofila sono sostenuti da almeno due diversi meccanismi: il primo riconducibile all'immunità Th2 acquisita che ha come citochine effettrici la IL4-13 e la IL5 prodotte dai linfociti Th2; il secondo dovuto all'attivazione dell'immunità innata e dei linfociti ILC2 (*group 2 innate lymphoid cells*) che producono in prevalenza IL5 ed in minor misura IL4 e 13 che sono regolati dalla IL33 e TSLP di derivazione epiteliale (31-33). Il pattern eosinofilo sostenuto dai linfociti ILC2 si associa ad un'aumentata produzione di IL5 che è in questo caso in gran parte corticoresistente, come dimostrato dalla individuazione di *cluster* di pazienti con asma grave in cui permane una elevata eosinofilia ed elevati di FeNO, malgrado l'assunzione di significative dosi di steroidi orali (corticoresistenza) (31, 34). Recentemente Smith et al. (35) hanno descritto un aumento dei linfociti ILC2 nell'asma grave corticodipendente.

Anche l'analisi bayesiana del network infiammatorio dell'asma grave condotta da Hinks et al. dimostra che la IL5 è aumentata nei soggetti con flogosi eosinofila ma non correla con l'IL13 che invece è associata alle caratteristiche dell'asma allergica.

Ovviamente la risposta infiammatoria innata di tipo Th2 e quella Th2 acquisita possono essere diversamente ma contemporaneamente presenti nello stesso soggetto, ma la relativa prevalenza della risposta ILC2 può condizionare una tendenza alla corticoresistenza e viceversa e quindi può rappresentare uno dei fattori determinanti la gravità dell'asma.

Nella risposta immunitaria innata giocano un ruolo importante anche i mastociti come dimostrato dalla decodificazione trascrittomica di diversi lavori (28,29).

I *cluster* trascrittomici non Th2 sono più eterogenei ed esprimono geni che governano la risposta: IL1, IL-1b (IL1B), TNFa, NFkB, INFg, delle chemochine (CXCR2), dei DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) e dei geni implicati nell'espressione del sistema infiammatorio e della flogosi neutrofila (27,28,30,31). Recentemente è stato ipotizzato che un aumento della produzione di INFγ ed una riduzione di SLP (*secretory leukocyte protease inhibitor*) possono favorire lo sviluppo di asma non Th2 di tipo neutrofilo (36).

Per ulteriori approfondimenti si rimanda allo specifico capitolo su asma grave e ACOS.

È pertanto ipotizzabile una correlazione tra i due pattern molecolari fondamentali Th2 e non Th2 ed i principali fenotipi clinici individuati con l'analisi dei gruppi precedentemente descritti che è sintetizzata nella Tabella 2 (1, 2). L'integrazione dei dati ottenibili mediante l'analisi dei *cluster* clinico-biochimico-infiammatorio-genomici e dei relativi biomarcatori hanno consentito di effettuare un notevole progresso nell'individuazione dei diversi endotipi dell'asma.

Una definitiva conferma relativamente alla loro validità clinica è quella di poter dimostrare che farmaci che agiscono su bersagli specifici *targeted therapy* sono efficaci solo in particolari

endotipi, dimostrando così la presenza di una specifica alterazione patologica o meccanismo etiopatogenetico in quel particolare gruppo di soggetti (terapie personalizzate).

ENDOTIPI

Gli endotipi sono definibili come “distinte entità patologiche caratterizzate da uno specifico processo fisiopatologico complesso” (37-39).

La scoperta che sottogruppi di soggetti asmatici possono trarre vantaggio da uno specifico trattamento, ad esempio dall'uso degli steroidi nell'asma eosinofila 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 (40).

La terapia dell'asma grave con farmaci biologici è trattata in uno specifico capitolo di questo documento (Capitolo 9).

In questo contesto ne accenneremo solo come conferma della validità dell'ipotesi endotipica. I farmaci biologici anti IL4/IL13 [Anrukizumab (IMA-683 - 026) e Lebrikizumab che bloccano il recettore per IL-13, Pitrakinra che blocca il recettore IL4R/IL13Ra1 e lega competitivamente IL4Ra, Tralokinumab (CAT 354) monoclonale IgG che neutralizza IL-13] 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 asmatici (39, 40). Al contrario, negli gli 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 (39, 40). Effettuando però delle analisi post hoc o pre specificate per sottogruppi è stato dimostrato che i farmaci biologici anti IL4/IL13 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 di FeNO o di IL13 nell'espettorato o che presentano singoli polimorfismi per IL4, hanno una miglior risposta terapeutica in termini di aumento della funzione respiratoria e/o riduzione delle riacutizzazioni rispetto agli asmatici in cui mancano i marcatori di tipo Th2 (39,40).

Il primo studio prospettico contro placebo è stato effettuato con Dupilumab, anticorpo anti IL-4R α nei pazienti con asma grave non controllata e biomarkers Th2 (aumento degli eosinofili ≥ 300 cells/ μ L o nell'espettorato ≥ 3 %).

Il trattamento con Dupilumab ha consentito di ridurre la terapia stroidea nell'87% dei pazienti rispetto al placebo e si è osservato un miglioramento della spirometria concomitante ad una riduzione del FeNO, delle IgE e dell'eotassina (41).

È quindi ipotizzabile che i *cluster* clinici di asmatici identificabili come asma ad esordio precoce atopica (lieve-moderata) e asma grave atopica ad esordio precoce possano essere quelli in cui il meccanismo patogenetico sia sostenuto in modo sostanziale dalla IL4/IL13 e possano trovare maggior vantaggio, quelli più gravi, dall'impiego con queste anti citochine oltre che, ovviamente, dai monoclonali anti IgE, dimostrando così in modo definitivo l'esistenza di un possibile specifico endotipo. In modo analogo il sottogruppo di pazienti asmatici che ha dimostrato di rispondere meglio alla terapia con anti IL5, Mepolizumab, Reslizumab e Benralizumab (40-43), è quello caratterizzato da un'elevata eosinofilia (ematica o nell'espettorato), elevati livelli di FeNO, poliposi nasale e possibile ASA sensibilità (40,41).

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 e i ricoveri (42).

Recentemente Bleecker et al. (43) hanno dimostrato che il Reslizumab riduce, nei pazienti con asma grave ed un livello di eosinofili ≥ 300 cells/ μ L circolanti, la frequenza delle riacutizzazioni e migliora i sintomi e la funzione respiratoria. 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 affetti da “asma eosinofila ad esordio tardivo e poliposi nasale”, come abbiamo precedentemente discusso, per la contemporanea attivazione di diversi meccanismi responsabili dell'aumento di IL5, come l'attivazione di linfociti ILC2, scarsamente reponsivi alla terapia steroidea (35) o la presenza di superantigeni batterici e micotici che possono stimolare in modo aspecifico i linfociti Th2. In questo endotipo possono giocare un ruolo positivo anche gli anti IL4/13 per l'effetto sinergico che hanno tra loro IL3 e 5 nel determinare l'attivazione della flogosi Th2 (39-41). Gli anti IL5 potrebbero avere un ruolo terapeutico anche nei pazienti con asma molto grave con flogosi mista neutrofila-eosinofila in cui il network immunologico in gioco è molto complesso e coinvolge oltre alle citochine Th2 i linfociti Th1 e Th17 (1-3).

L'efficacia della *targeted therapy* (anti IL5 e anti IL4/13) conferma perciò ulteriormente l'esistenza di un fenotipo infiammatorio Th2 i cui casi più gravi sono caratterizzati da corticoresistenza conseguente all'attivazione di una risposta Th2 non classica e/o alla presenza di difetto della trasduzione del messaggio soppressivo degli steroidi (deficit recettoriale dei cortisonici, stress ossidativo) ed al coinvolgimento di numerose cellule dell'immunità innata (ILC2, NKT, mastociti, eosinofili, cellule epiteliali, fenotipo secretorio delle fibrocellule muscolari lisce).

Sono necessari ulteriori studi per individuare il gruppo di pazienti in cui esiste una indicazione specifica per l'impiego degli anti IL5 o di anti IL4/13.

Per quanto riguarda i possibili endotipi non Th2 non disponiamo ancora di una chiara definizione dei meccanismi etiopatogenetici prevalenti e di possibili terapie mirate, per cui la stessa definizione dei relativi endotipi, dimostrati dall'efficacia della risposta ad una *targeted therapy*, è attualmente incompleta (40-42).

CONCLUSIONE

In conclusione le evidenze presentate dimostrano che l'asma è una malattia eterogenea ed il riconoscimento dei suoi specifici endotipi diventa sempre più importante per poter effettuare un approccio farmacologico differenziato e personalizzato (*precision medicine*), sia nel caso in cui si utilizzi la terapia farmacologica tradizionale che i nuovi farmaci biologici.

In futuro i progressi delle scienze “omiche” così come di nuovi biomarcatori, vedi ad esempio l'utilizzo della proteomica, 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) Wenzel SE. *Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches*. Nat Med 2012; 18: 716-725.
- (2) Chung KF, Adcock I. *Clinical phenotypes of asthma should link up with disease mechanisms*. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2015; 15: 56-62.
- (3) Gauthier M, Ray A, Wenzel SE. *Evolving concepts of asthma*. Am J Respir Crit Care Med 2015; 192: 660-668.
- (4) Ray A, Oriss TB, Wenzel SE. *Emerging molecular phenotypes of asthma*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2015; 308: 130-140.
- (5) *Global strategy for asthma management and prevention (2016 update)*. www.ginasthma.org.
- (6) Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL. *International ERS/ ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma*. Eur Respir J 2014; 43: 343-373.
- (7) Panettieri RA. *Neutrophilic and pauci-immune phenotypes in severe asthma*. Immunol Allergy Clin N Am 2016; 36: 569-579.

- (8) Aleman F, Lim HF, Nair P. *Eosinophilic endotype of asthma*. *Immunol Allergy Clin N Am* 2016; 36: 559-568.
- (9) Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, et al. *Cluster analysis and clinical asthma phenotypes*. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 218-224.
- (10) Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, et al. *Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program*. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 315-323.
- (11) Moore WC, Hastie AT, Li X, et al. *Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis*. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133: 1557-1563.
- (12) Wu W, Bleecker E, Moore WC, et al. *Unsupervised phenotyping of Severe Asthma Research Program participants using expanded lung data*. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133: 1280-1288.
- (13) Lefaudeux D, De Meulder B, Loza, M, et al. *U-BIOPRED clinical adult asthma clusters linked to a subset of sputum omics*. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 139: 1797-1807.
- (14) Hinks TS, Brown T, Lau LC, et al. *Multidimensional endotyping in patients with severe asthma reveals inflammatory heterogeneity in matrix metalloproteinases and chitinase 3-like protein 1*. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138: 61-75.
- (15) Choi S, Hoffman E, Wenzel SE, et al. *Quantitative computed tomographic imaging-based clustering differentiates asthmatic subgroups with distinctive clinical phenotypes*. *J Allergy Clin Immunol* 2017; doi: 10.1016/j.jaci.2016.11.053. [Epub ahead of print].
- (16) Schleich FN, Manise M, Sele J, et al. *Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: predicting factors for eosinophilic vs. neutrophilic inflammation*. *BMC Pulmon Med* 2013; 13: 11.
- (17) Amelink M, de Nijs SB, de Groot JC, et al. *Three phenotypes of adult-onset asthma*. *Allergy* 2013; 68: 674-680.
- (18) Peters MC, McGrath KW, Howkins G, et al.. *Plasma interleukin-6 concentrations, metabolic dysfunction and asthma severity: a across sectional analysis of two cohorts*. *Lancet Respir Med* 2016; 4: 574-584.
- (19) Kim HY, Lee HJ, Chang IE, et al. *IL-17 producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity*. *Nat Med* 2014; 20: 54-61.
- (20) Boudier A, Curjuric I, Basagan X, et al. *Ten-year follow-up of cluster-based asthma phenotypes in adults. A pooled analysis of three cohorts*. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188: 550-560.
- (21) Loza M, Djukanovic R, Chung FK, et al. *Validated and longitudinally stable asthma phenotypes based on cluster analysis of the ADEPT study*. *Respir Res* 2016; 17: 165.
- (22) Newby C, Heaney L, Menzies-Gow A, et al. *Statistical cluster analysis of the British Thoracic Society Severe refractory Asthma Registry: clinical outcomes and phenotype stability*. *PLoS ONE* 2014; 9: doi: 10.1371/journal.pone.0102987.
- (23) Kuhlen JL, Wahlquist AE, Nietert P, et al. *Identification of asthma phenotypes in a tertiary care medical center*. *Am J Med Sci* 2014; 348: 480-485.
- (24) Bourdin A, Molinari M, Vachier I, et al. *Prognostic value of cluster analysis of severe asthma phenotypes*. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134: 1043-1050.
- (25) Prospero M, Sahiner S, Belgrave D, et al. *Challenges in identifying asthma subgroups using unsupervised statistical learning techniques*. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:1303-12.
- (26) Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, et al. *T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma*. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 388-395.
- (27) Peters MC, Mekonnen ZK, Yuan S, et al. *Measures of gene expression in sputum cells can identify TH2-high and TH2-low subtypes of asthma*. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133: 388-394.
- (28) Baines KJ, Simpson JL, Wood LG, et al. *Transcriptional phenotypes of asthma defined by gene expression profiling of induced sputum samples*. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 153-160.

- (29) Modena BD, Tedrow JR, Milosevic J, et al. *Gene expression in relation to exhaled nitric oxide identifies novel asthma phenotypes with unique biomolecular pathways.* Am J Respir Crit Care Med 2014; 190: 1363-1372.
- (30) Kuo CS, Pavlidis S, Loza M, et al. *A transcriptome-driven analysis of epithelial brushings and bronchial biopsies to define asthma phenotypes in U-BIOPRED.* Am J Respir Crit Care Med 2017; 195: 443-455.
- (31) Kuo CS, Pavlidis S, Loza M, et al. *T-helper cell type 2 (Th2) and non-Th2 molecular phenotypes of asthma using sputum transcriptomics in U-BIOPRED.* Eur Respir J 2017;49 doi: 10.1183/13993003.02135-2016. Print 2017 Feb.
- (32) Lloyd CM, Saglani S. *Epithelial cytokines and pulmonary allergic inflammation.* Curr Opin Immunol 2015; 34: 52-58.
- (33) van Rijt L, von Richthofen H, van Ree R. *Type 2 innate lymphoid cells: at the cross-roads in allergic asthma.* Semin Immunopathol 2016; 38: 483-496.
- (34) Vercelli D, Gozdz J, von Mutius E. *Innate lymphoid cells in asthma: when innate immunity comes in a Th2 flavor.* Curr Opin Allergy Clin Immunol 2014; 14: 29-34.
- (35) Smith SG, Chen R, Kjarsgaard M, et al. *Increased numbers of activated group 2 innate lymphoid cells in the airways of patients with severe asthma and persistent airway eosinophilia.* J Allergy Clin Immunol 2016; 137: 75-86.
- (36) Raundhal M, Morse C, Khare A, et al. *High IFN- γ and low SLPI mark severe asthma in mice and humans.* J Clin Invest 2015; 125: 3037-3050.
- (37) Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, et al. *Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome.* J Allergy Clin Immunol 2011; 127: 355-360.
- (38) Skloot GA. *Asthma phenotypes and endotypes: a personalized approach to treatment.* Curr Opin Pulm Med 2016; 22: 3-9.
- (39) Chung KF. *Asthma phenotyping: a necessity for improved therapeutic precision and new targeted therapies.* Intern Med 2016; 279: 192-204.
- (40) Fajt ML, Wenzel SE. *Development of new therapies for severe asthma.* Allergy Asthma Immunol Res 2017; 9: 3-14.
- (41) Wenzel S, Castro M, Corren J, et al. *Dupilumab efficacy and safety in adults with uncontrolled persistent asthma despite use of medium-to-high-dose inhaled corticosteroids plus a long-acting β 2 agonist: a randomised double-blind placebo-controlled pivotal phase 2b dose-ranging trial.* Lancet 2016; 388: 31-44.
- (42) Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, et al. *Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma.* N Engl J Med 2015; 373: 877-883.
- (43) Bleecker ER, FitzGerald JM, Chane P, et al. *Efficacy and safety of benralizumab for patients with severe asthma uncontrolled with high-dosage inhaled corticosteroids and long-acting β 2-agonists (SIROCCO): a randomised, multicentre, placebo-controlled phase 3 trial.* Lancet 2016; 388: 2115-2127.