

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

**DOTTORATO DI RICERCA
IN FISIOPATOLOGIA RESPIRATORIA SPERIMENTALE
XX CICLO**

**RIMODELLAMENTO E INFIAMMAZIONE
DELLE VIE AEREE NEI BAMBINI CON ASMA
BRONCHIALE: EVENTI PRECOCI NELLA
STORIA NATURALE DELLA MALATTIA**

**COORDINATORE: CH.MO PROF. DARIO OLIVIERI
RELATORE: CH.MA PROF. MARINA SAETTA**

DOTTORANDA: DOTT. MARIA ELENA ZANIN

ANNO ACCADEMICO 2006-2007

INDICE

RIASSUNTO	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUZIONE	5
DEFINIZIONE.....	5
EPIDEMIOLOGIA	7
FATTORI DI RISCHIO.....	10
Fattori di rischio individuali.....	10
Fattori di rischio ambientali	14
Fattori scatenanti	17
DIAGNOSI.....	18
Clinica.....	18
Prove di funzionalità respiratoria.....	18
Altri esami strumentali.....	19
ANATOMIA PATOLOGICA.....	21
Anatomia patologica dell’asma nell’adulto.....	21
<i>Inflammatione delle vie aeree.....</i>	<i>21</i>
<i>Alterazioni strutturali delle vie aeree</i>	<i>29</i>
Anatomia patologica dell’asma nel bambino	32
STORIA NATURALE	36
Respiro sibilante transitorio precoce	37
Respiro sibilante non-atopico.....	38
Respiro sibilante atopico o asma “classico”	39
STUDIO I Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma	41
SCOPO DELLO STUDIO.....	43
MATERIALI E METODI	44
Soggetti	44
Broncoscopia.....	45
Processazione ed analisi delle biopsie bronchiali.....	46
Analisi statistica	49
RISULTATI	50
Dati clinici	50

Dati istologici.....	52
DISCUSSIONE	58
CONCLUSIONE	64
STUDIO II Non-atopic wheezing children have the airway pathology of “classic” asthma.....	65
SCOPO DELLO STUDIO.....	67
MATERIALI E METODI.....	69
Soggetti	69
Processazione ed analisi delle biopsie bronchiali.....	70
Analisi statistica	71
RISULTATI	72
Dati clinici	72
Dati istologici.....	73
DISCUSSIONE	80
CONCLUSIONE	85
BIBLIOGRAFIA	87
PUBBLICAZIONI DURANTE IL CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA...	105
APPENDICE	107

RIASSUNTO

Lo scopo di questa tesi è di verificare se le alterazioni anatomo-patologiche caratteristiche dell'asma nell'adulto siano già presenti nelle vie aeree di bambini con respiro sibilante e se differiscano tra bambini atopici e non-atopici. Un recente studio epidemiologico, infatti, ha dimostrato che il 90% dei bambini non-atopici con respiro sibilante in età prescolare, perde i sintomi entro la pubertà. Al contrario, i bambini atopici con respiro sibilante sono predisposti a mantenere i sintomi, sviluppando asma "classico".

L'analisi di biopsie bronchiali eseguita in questa tesi ha rivelato che ispessimento della membrana basale, desquamazione epiteliale, eosinofilia e angiogenesi sono già presenti nei bambini con respiro sibilante e, sorprendentemente, tutte queste alterazioni sono simili nei bambini non-atopici e atopici. Anche l'espressione di IL-4 e IL-5 è aumentata nei due gruppi di bambini con respiro sibilante.

In conclusione, i risultati di questa tesi dimostrano che le alterazioni strutturali e infiammatorie delle vie aeree caratteristiche dell'asma compaiono precocemente nella storia naturale della malattia. Inoltre, nei bambini, i sintomi di respiro sibilante sono associati a tali alterazioni indipendentemente dalla presenza di atopia. Sulla base del loro quadro anatomopatologico, dunque, anche i bambini con respiro sibilante non-atopici dovrebbero essere considerati veri asmatici.

ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the pathological changes in bronchial biopsies of asthmatic children and verify whether these alterations are present in both atopic and non-atopic wheezing children. A recent study showed that 90% of children with repeated wheeze in the preschool period, but who do not develop atopic sensitization, lose their symptoms at school age. By contrast, children with repeated wheeze who also become sensitized to allergens are prone to a chronic course of asthma.

Results show that in asthmatic children, epithelial loss, basement membrane thickness, number of vessels and number of eosinophils in subepithelial tissue, were increased compared to controls. Surprisingly, all these histopathological features are similar in atopic and non-atopic wheezing children. Finally, in both non-atopic and atopic wheezing children, expression of IL-4 and IL-5 was increased.

This study leads to the hypothesis that pathological changes occur early in the natural history of asthma. Moreover, the results show that structural changes and Th-2 inflammation characteristic of asthma are present in non-atopic wheezing children suggesting that when characteristic symptoms are present in children, they are associated with the histopathological features of asthma regardless of the presence of atopy.

INTRODUZIONE

I più recenti studi epidemiologici sia a livello nazionale che europeo dimostrano che l'asma, ancora oggi, rappresenta un problema sanitario rilevante in tutti i paesi industrializzati. L'asma può colpire soggetti di tutte le età, può essere anche estremamente grave e a volte persino fatale. La prevalenza della malattia sta aumentando ovunque, soprattutto tra i bambini. L'asma costituisce un notevole onere, non solo in termini economici di costi sanitari, ma anche in termini di perdita di produttività e di riduzione della partecipazione alla vita sociale da parte di chi ne soffre. Nonostante i notevoli progressi scientifici, molteplici aspetti dell'asma bronchiale sono tuttora poco conosciuti [1].

DEFINIZIONE

Secondo le più recenti linee guida del gruppo di lavoro GINA (Global Initiative for Asthma), che opera in collaborazione con l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), l'asma bronchiale è *“una malattia infiammatoria cronica delle vie aeree, in cui svolgono un ruolo molteplici cellule ed elementi cellulari. L'infiammazione cronica è associata ad iperreattività bronchiale, episodi ricorrenti di respiro sibilante, dispnea, senso di costrizione toracica e tosse, in particolare di notte o nelle prime ore del mattino. Questi episodi sono generalmente associati a broncocostrizione, reversibile spontaneamente o dopo trattamento”* [1]. La definizione di asma ha subito notevoli modificazioni negli ultimi anni. In passato la malattia veniva definita esclusivamente sulla base della broncocostrizione e dell'iperreattività bronchiale senza considerare i meccanismi patogenetici responsabili della malattia, anche perché questi erano poco conosciuti. Il recente sviluppo di tecniche per la raccolta, l'analisi e la processazione di biopsie bronchiali, lavaggio broncoalveolare ed espettorato indotto, ha aumentato notevolmente le conoscenze sulla patogenesi della malattia e consolidato il concetto che l'infiammazione

delle vie aeree rappresenta il motore patogenetico dell'asma. Nelle definizioni più recenti, infatti, le alterazioni cliniche e funzionali sono considerate una conseguenza dell'infiammazione con importanti risvolti nell'approccio diagnostico e terapeutico della malattia.

Dal punto di vista clinico l'asma si manifesta come una malattia episodica, in cui fasi acute (riacutizzazioni) si possono alternare con periodi sintomatologicamente silenti. Gli attacchi d'asma sono di solito brevi (minuti/ore) e al termine di ognuno il paziente risulta sul piano clinico apparentemente guarito. L'asma può manifestarsi anche in forma più grave, con attacchi gravi e frequenti. In questi casi i sintomi possono persistere anche tra un attacco e l'altro. Infine, in un numero molto ridotto di casi, l'asma può ancora oggi risultare fatale.

Le linee guida hanno proposto una classificazione della malattia in quattro livelli di gravità definiti prendendo in considerazione i dati clinici, funzionali e terapeutici: intensità e frequenza dei sintomi; funzionalità respiratoria, compreso il monitoraggio del picco di flusso (*Tabella 1*). L'inserimento del paziente in un determinato livello di gravità è molto importante in quanto ne condiziona il relativo trattamento.

Tabella 1. Classificazione di gravità secondo le linee guida GINA

LIVELLO	SINTOMI	EPISODI NOTTURNI	FUNZIONALITA' RESPIRATORIA
1 INTERMITTENTE	Sintomi intermittenti, <1 volta/settimana. Brevi riacutizzazioni.	≤ 2 volte/mese	FEV ₁ ≥ 80% del predetto Variabilità del PEF < 20%
2 LIEVE/ PERSISTENTE	Sintomi intermittenti, >1 volta/settimana ma <1 volta/die.	> 2 volte/mese	FEV ₁ ≥ 80% del predetto Variabilità del PEF tra 20 e 30%
3 MODERATO/ PERSISTENTE	Sintomi quotidiani, le riacutizzazioni possono interferire con vita quotidiana e sonno.	> 1 volta/settimana	FEV ₁ tra 60 e 80% del predetto Variabilità del PEF >30%
4 GRAVE/ PERSISTENTE	Sintomi continui, riacutizzazioni frequenti ed attività fisica limitata	frequenti	FEV ₁ ≤ 60% del predetto Variabilità del PEF >30%

Su base eziologica l'asma bronchiale può essere distinto in asma atopico o estrinseco ed asma non-atopico o intrinseco. Nell'asma atopico sono generalmente compresi tutti i casi di asma che si verificano in soggetti atopici. L'asma indotto da cause non identificate in pazienti non-atopici viene definito intrinseco o non-atopico. I pazienti con asma intrinseco risultano negativi ai prick test e non hanno una storia clinica o familiare di atopia, hanno normali concentrazioni sieriche di IgE e non c'è evidenza di specifici anticorpi IgE diretti contro i comuni allergeni. Questa forma d'asma è frequentemente associata a poliposi nasale e sensibilità all'aspirina, spesso è preceduta da una storia di infezione respiratoria virale e colpisce prevalentemente il sesso femminile, in età avanzata. L'asma intrinseco rispetto all'asma atopico presenta una maggiore reattività alla metacolina [2] ed un più rapido declino della funzione polmonare [3].

EPIDEMIOLOGIA

L'asma è una delle patologie croniche più diffuse: si stima che affligga 300 milioni di persone in tutto il mondo e si presume che, globalmente, nel 2025, 400 milioni di persone soffriranno di questa patologia.

L'asma è diffusa in tutti i Paesi, indipendentemente dal livello di sviluppo, ma varia in modo considerevole da nazione a nazione e può mostrare variazioni anche all'interno della stessa nazione [4] (*Figura 1*).

Nonostante le centinaia di articoli su prevalenza e mortalità per asma in popolazioni anche molto diverse, la mancanza di una definizione universale di asma rende difficoltoso il paragone tra prevalenze riportate nelle diverse parti del mondo. Comunque, l'uso recente di metodi standardizzati per misurare la prevalenza di asma e di malattie accompagnate da respiro sibilante in bambini [5] ed adulti [6] ha facilitato tali confronti sia a livello regionale che internazionale. Ad esempio alcuni dati tratti dall'International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) hanno permesso il confronto tra diverse popolazioni di iperresponsività delle vie aeree, funzionalità respiratoria, variabilità del

picco di flusso e atopia nei bambini [5]. Anche l'European Community Respiratory Health Study (ECRHS) [7] ha consentito di confrontare in popolazioni diverse l'iperresponsività delle vie aeree, l'atopia ed i sintomi di asma negli adulti. Poiché dai dati attuali non è emersa una definizione epidemiologica di asma, questionari, prove di iperresponsività delle vie aeree e documentazioni di possibili fattori eziologici, compreso lo stato di atopia, continuano ad essere considerati componenti importanti degli studi epidemiologici sull'asma.

La variazione geografica, confermata anche dalla distribuzione dell'atopia e della reattività bronchiale, è simile per bambini e adulti.

Nei paesi in via di sviluppo, l'incidenza della patologia varia significativamente. In India si stimano circa 15-20 milioni di pazienti, con un'incidenza tra il 10 e il 15% nei bambini tra i 5 e gli 11 anni. In Brasile, Costa Rica, Panama, Peru e Uruguay, l'incidenza dei sintomi nei bambini varia dal 20 al 30%. Le statistiche degli ultimi decenni hanno riportato un aumento del numero di pazienti asmatici in tutti i paesi, con la maggior prevalenza rilevata in Australia, Nuova Zelanda e Inghilterra [4] (Figura 1).

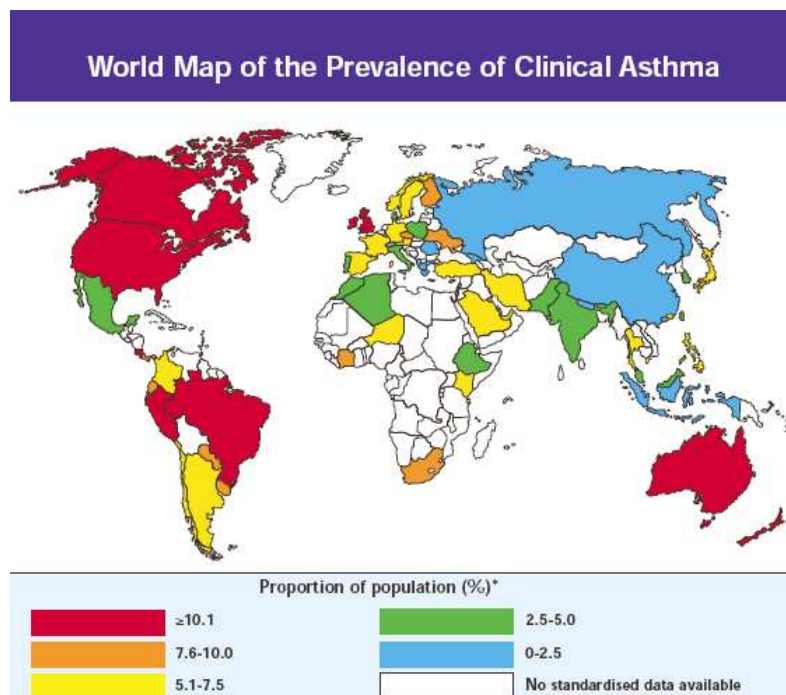


Figura 1. Prevalenza mondiale dell'asma bronchiale (Global Burden for Asthma report 2004, developed for GINA).

Attualmente la prevalenza di asma si è stabilizzata in molte nazioni (Inghilterra, Italia, Svizzera, Australia, Messico) grazie a un miglioramento dei trattamenti antiasmatici e al raggiungimento di un plateau dovuto al fatto che le modificazioni ambientali hanno indotto lo sviluppo della patologia in tutti i soggetti predisposti.

In Italia la prevalenza di asma è più bassa rispetto a quella di molte altre nazioni, soprattutto dei paesi anglosassoni, sia negli adulti che nei bambini.

L'asma ha un impatto socioeconomico molto rilevante. Gli oneri sociali ed i costi per i sistemi di sanità, sia pubblica che privata, sono infatti consistenti. Attualmente si stima che nei paesi industrializzati tale patologia incida dell'1-2% sulla spesa sanitaria complessiva. I costi sono spesso imputabili ad un mancato controllo della malattia e ad un uso improprio delle risorse diagnostiche e terapeutiche: studi epidemiologici in bambini ed adulti indicano che l'asma è sottodiagnosticato e conseguentemente trattato in maniera non adeguata [8]. Questo è attribuibile in parte alla natura non specifica dei sintomi di asma, che spesso indirizza il medico verso diagnosi differenti, soprattutto nei bambini, nei quali frequentemente l'asma viene diagnosticato come una variante di bronchite [9] e di conseguenza trattato in modo inadeguato o inefficace con cicli di antibiotici e trattamenti antitussigeni. La mancata diagnosi di asma è attribuibile anche alla natura transitoria dei sintomi che consente ai pazienti di tollerare a lungo i sintomi respiratori episodici prima di rivolgersi al medico.

Le strategie tese a migliorare il controllo dell'asma possono comportare un guadagno socioeconomico, in termini di frequenza scolastica maggiore, minori assenze dal lavoro e, di conseguenza, minori oneri sulle famiglie. I dati su incidenza, gravità, ospedalizzazione e mortalità per asma sono necessari per permettere a tutti i paesi una migliore pianificazione dell'intervento sanitario. Per rendere possibile una razionalizzazione dal punto di vista sia sanitario che economico è auspicabile investire su tipologie di assistenza che riducano significativamente ricoveri e trattamenti d'emergenza per riacutizzazioni a favore dell'assistenza di base e specialistica territoriale integrata [10].

FATTORI DI RISCHIO

I fattori di rischio dell'asma bronchiale si possono distinguere in fattori costituzionali o individuali, che predispongono gli individui allo sviluppo di asma e fattori ambientali, che influenzano la suscettibilità all'insorgenza dell'asma in individui predisposti [11].

I meccanismi attraverso cui questi fattori influenzano lo sviluppo e l'espressione dell'asma sono complessi ed interagiscono tra loro. Numerosi studi hanno evidenziato che il periodo della vita in cui essi intervengono riveste notevole importanza [12,13].

FATTORI DI RISCHIO INDIVIDUALI

I fattori di rischio individuali sono principalmente rappresentati da: predisposizione genetica, atopia, iperreattività bronchiale, sesso e razza.

Predisposizione genetica

Numerosi studi hanno evidenziato un incremento della prevalenza dell'asma tra i familiari dei soggetti asmatici.

Alcuni studi su gemelli omozigoti, con patrimonio genetico identico, hanno osservato un'elevata concordanza per asma, eczema e febbre da fieno. Questi studi hanno però dimostrato che i fattori genetici sono coinvolti nello sviluppo dell'asma nel 35-70 % dei casi [14]. Questa ampia variabilità è dovuta al fatto che le manifestazioni cliniche dell'asma (fenotipo) sono il risultato dell'interazione del corredo genetico dell'individuo (genotipo), con l'ambiente con cui l'individuo viene a contatto [1]. Come evidenziato in *Figura 2*, nonostante i recenti progressi in campo genetico, il genotipo specifico dell'asma non è ancora noto. L'asma è una patologia complessa in cui molti geni e numerose interazioni gene-gene contribuiscono alla sua suscettibilità. Fino ad ora sono state identificate diverse regioni cromosomiali e loci che mostrano un linkage o un'associazione con fenotipi asmatici ed asma-like. Questi geni sono localizzati in regioni particolari dei cromosomi 2, 5, 7, 11, 12 e 13. Recentemente, sul cromosoma 20p13 è stato identificato un nuovo gene,

ADAM33, che sembra avere un ruolo molto importante nello sviluppo di asma. Questo gene codifica per una proteina (costituita da un'associazione tra una disintegrina e una metalloproteasi) che sembra essere attivamente coinvolta nel rimodellamento delle vie aeree [15].

Inoltre studi di famiglie e analisi di associazione caso-controllo hanno identificato numerose regioni cromosomiche associate con l'atopia e l'iperreattività bronchiale. Ad esempio, la tendenza a produrre un elevato livello sierico di IgE totali è co-ereditata con l'iperreattività bronchiale ed i geni coinvolti sono situati in un locus sul braccio lungo del cromosoma 5 [16]. Oltre ai geni predisponenti all'atopia ed all'iperreattività bronchiale, nella patogenesi dell'asma sono implicati anche geni responsabili della produzione di mediatori dell'infiammazione e dei determinanti del rapporto tra risposta immunitaria Th1 e Th2. In aggiunta a geni che predispongono all'asma ce ne sono anche altri che sono associati alla risposta al trattamento medico. Per esempio, variazioni nel gene codificante il recettore beta-adrenergico sono state collegate a differenze nella risposta dei pazienti alla terapia con β_2 -agonisti [17]. Altri geni sono implicati nella risposta ai glucocorticoidi [18] e agli anti-leucotrienici [19].

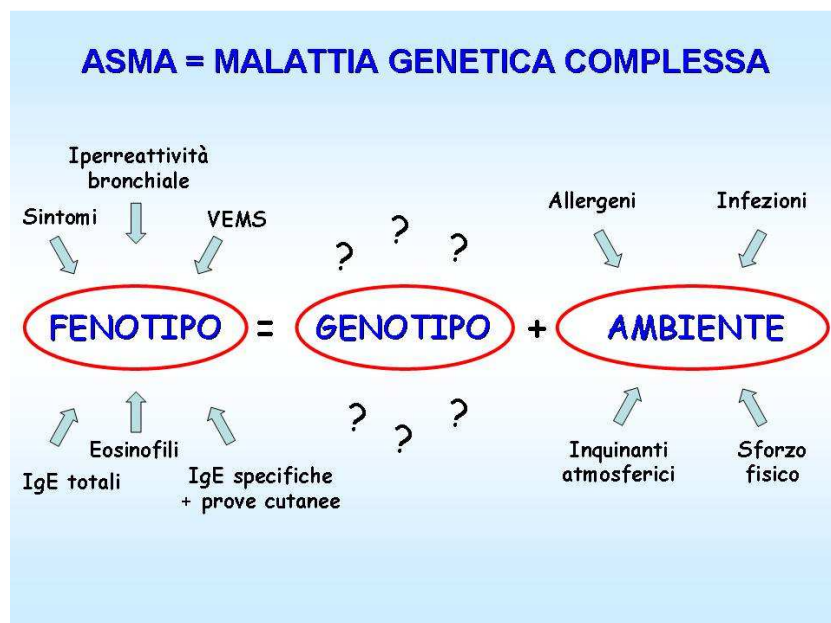


Figura 2. Fattori di rischio per asma bronchiale. Modificata da GINA (Update 2006) [1].

Atopia

Questa condizione consiste nella produzione di una quantità eccessiva di anticorpi IgE (diretti verso gli epitopi espressi sui comuni allergeni ambientali quali acari della polvere, proteine animali, pollini e funghi) in risposta ad uno stimolo antigenico. L'atopia è documentata dalla positività dei test cutanei per i comuni allergeni (prick test) o dal dosaggio dei livelli sierici delle IgE sia totali (PRIST test) che specifiche per determinati antigeni (RAST test). L'atopia colpisce dal 30 al 50% della popolazione generale nei Paesi sviluppati ed è un importante fattore di rischio per lo sviluppo dell'asma [20]. Pearce e collaboratori hanno mostrato che la proporzione di casi di asma attribuibile all'atopia varia dal 25 al 63% (media 38%) nei bambini, e dall'8 al 55% (media 37%) negli adulti [21]. Esiste una possibile associazione tra sensibilizzazione allergica ed asma in relazione all'età: la maggior parte dei bambini che diventano sensibili agli allergeni inalatori nei primi tre anni di vita svilupperà successivamente la malattia, mentre i bambini che divengono sensibili dopo gli 8-10 anni presentano un rischio di manifestare l'asma del tutto simile rispetto a quello dei bambini non sensibilizzati [22].

Iperreattività bronchiale (BHR)

Un altro importante fattore di rischio individuale è l'iperreattività bronchiale, definita come un'esagerata broncostruzione in risposta a stimoli aspecifici. Questo significa che le vie aeree tendono a chiudersi troppo e troppo facilmente in risposta a numerosi stimoli che non hanno effetto nei soggetti normali. Anche se l'iperreattività bronchiale è presente nel 19-62 % dei soggetti senza sintomi respiratori [23], è stato dimostrato che nei soggetti con iperreattività bronchiale l'incidenza di asma è aumentata [24]. Studi longitudinali hanno dimostrato che una BHR persistente nella prima infanzia è associata ad una progressiva riduzione nel calibro delle vie aeree e al manifestarsi di sintomi di asma dovuti probabilmente ad un'anomala crescita delle vie aeree che risulta in un ridotto livello di FEV₁/FVC [25,26].

Inoltre, uno studio ha dimostrato che il rischio di respiro sibilante ed asma ricorrente nell'età adulta è correlato alla gravità della BHR nell'infanzia [27].

Sesso

Un altro dei fattori individuali che influenzano l'insorgenza di asma è il sesso. Nella prima infanzia i maschi presentano una maggiore prevalenza di asma rispetto alle femmine probabilmente a causa del calibro minore delle vie aeree, dell'aumentato tono della muscolatura liscia tracheobronchiale e di più alte concentrazioni sieriche di IgE [28]. Tali modificazioni li predispongono ad una più facile ostruzione in risposta a vari stimoli broncocostrittori. Un'ulteriore conferma di tale teoria deriva dal fatto che la differenza nella prevalenza della malattia tra i due sessi scompare dopo i 10 anni, epoca nella quale, probabilmente a causa dell'aumento della dimensioni del torace, che si verifica nei maschi durante la pubertà, il rapporto diametro/lunghezza dei bronchioli diventa uguale in entrambi i sessi [29]. Inoltre, uno studio recente ha dimostrato che, mentre l'iperreattività bronchiale, la bassa funzionalità polmonare e la storia personale e familiare di atopia condizionano l'insorgenza di respiro sibilante sia nei maschi che nelle femmine, il fumo prenatale e l'atopia condizionano in modo particolare lo sviluppo di respiro sibilante nei maschi, mentre un body mass index superiore alla norma condiziona di più l'insorgenza della malattia nelle femmine [30].

Razza/etnia

È stato osservato che la prevalenza di asma nei soggetti di razza nera è più elevata rispetto a quelli di razza bianca. Tuttavia è anche possibile che questa differenza sia dovuta a fattori socio-economici ed ambientali piuttosto che ad una predisposizione genetica [31].

FATTORI DI RISCHIO AMBIENTALI

I fattori di rischio ambientali sono in grado di determinare l'insorgenza di asma nei soggetti predisposti. Questi fattori di rischio sono rappresentati da: allergeni, infezioni delle vie respiratorie, inquinamento atmosferico, sensibilizzanti di origine professionale, fattori socio-economici ed obesità.

Allergeni

Diversi studi hanno sottolineato la presenza di una relazione tra l'esposizione allergenica e la prevalenza dell'asma ed hanno documentato il miglioramento dell'asma alla cessazione dell'esposizione agli allergeni [32,33]. Negli ambienti interni gli allergeni presenti sono acari domestici, allergeni animali e funghi. Sono presenti soprattutto nei paesi industrializzati, dove le case sono riscaldate, condizionate e umidificate fornendo un habitat ideale per la loro crescita. Nell'ambiente esterno i più comuni allergeni capaci di scatenare l'asma in persone sensibilizzate sono i pollini e i funghi.

Infezioni delle vie respiratorie

Il ruolo delle infezioni respiratorie nello sviluppo della patologia asmatica è complesso. Esse infatti possono esercitare molteplici effetti:

1. scatenare riacutizzazioni;
2. influenzare la suscettibilità all'insorgenza dell'asma;
3. svolgere un ruolo protettivo nei confronti dello sviluppo della malattia.

Numerose evidenze epidemiologiche mostrano che le infezioni virali sono causa di riacutizzazione asmatica sia negli adulti che nei bambini. Molti virus sono stati associati con l'esordio sia di allergie che della sintomatologia asmatica nell'infanzia, tra questi ad esempio vi è il virus respiratorio sinciziale (RSV), responsabile di circa il 50% delle patologie che comportano respiro sibilante e dell'80% delle bronchioliti [34,35]. D'altra parte, è stato osservato che alcune infezioni respiratorie, contratte nei primissimi anni di età (incluso il morbillo e talvolta persino il virus

respiratorio sinciziale), possono proteggere dallo sviluppo di asma [36-38]. Infatti, è stato riscontrato che in soggetti fortemente esposti a microbi orofecali ed alimentari le malattie respiratorie da causa allergica sono meno frequenti. È stato riscontrato anche che alcuni fattori come l'elevata numerosità familiare e la frequentazione di asili infantili, pur esponendo ad un maggiore rischio di infezioni, sono altresì associate ad una minore incidenza di asma bronchiale. Queste considerazioni hanno condotto alla nascita dell' "hygiene hypothesis", fondata sul riscontro che il miglioramento delle condizioni igieniche e la ridotta diffusione di comuni infezioni sono strettamente associati ad un incremento della prevalenza di atopia e asma nei Paesi sviluppati [39]. Pertanto questa teoria suggerisce che l'esposizione alle infezioni in età precoce influenzi lo sviluppo del sistema immunitario nel bambino verso un "non-allergic pathway", portando ad un ridotto rischio di asma e di altre malattie allergiche [39]. Tale ipotesi è tuttora oggetto di studio.

Inquinamento atmosferico

Pur essendo necessarie ulteriori ricerche, alcuni studi epidemiologici suggeriscono che l'inquinamento può contribuire alla comparsa dell'asma [1]. L'inquinamento atmosferico è definito come un accumulo di sostanze irritanti ad una concentrazione tale da divenire dannoso per l'uomo, gli animali o le piante. Vi contribuiscono gli inquinanti esterni che sono lo smog industriale determinato da anidride solforosa e lo smog fotochimico costituito da ozono e ossidi di azoto. Vi sono poi gli inquinanti interni dovuti alla combustione di metano e legna, per il riscaldamento o per la cucina, e agli isolanti usati nella costruzione degli edifici.

Sensibilizzanti di origine professionale

Oltre 300 sostanze presenti sul luogo di lavoro possono essere responsabili dell'insorgenza di un tipo particolare di asma: l'asma professionale [40]. Questi agenti comprendono sostanze a basso peso molecolare, quali gli isocianati (irritanti che possono alterare la reattività

bronchiale), sostanze immunogene quali i sali di platino, e prodotti biologici complessi, di derivazione vegetale o animale, che stimolano la produzione di IgE.

Fattori socio-economici

È stato osservato che nelle società occidentali caratterizzate da un alto tenore di vita, l'incidenza di malattie allergiche ed asma infantile è aumentata. Questa osservazione sta alla base dell'ipotesi igienista, secondo la quale elevate condizioni socioeconomiche rappresentano un fattore di rischio per l'asma. A favore di questa ipotesi, alcuni studi hanno suggerito che l'aumentata prevalenza di asma negli ultimi anni sia imputabile all'eccessivo controllo delle infezioni (dovuta a igiene, immunizzazioni di massa e antibiotici), alla prolungata esposizione ad allergeni domestici (per uno stile di vita che predilige attività in casa piuttosto che all'aperto), e ad uno stile di vita sedentario [41].

Obesità

L'obesità è un fattore di rischio per respiro sibilante ed asma che sta assumendo grande importanza considerando l'aumento del peso corporeo medio dei bambini negli ultimi anni. Camargo in uno studio ha dimostrato che la prevalenza di respiro sibilante è del 13% nei quintili di BMI più elevati e del 7% nei quintili inferiori [42].

Altri fattori di rischio

Accanto a questi fattori di rischio già comunemente accettati, negli ultimi anni sono state evidenziate altre condizioni correlate allo sviluppo di asma: l'assunzione di vitamina E da parte della madre atopica durante la gravidanza sembra essere correlata negativamente con lo sviluppo precoce di respiro sibilante ed eczema nel neonato [43]; disturbi di panico e ansietà infantile sembrano suggerire lo sviluppo successivo di asma [44]; la frequenza di assunzione di acetaminofene sembra essere positivamente correlata con il numero di nuove diagnosi di asma

suggerendo che l'uso passato di analgesici possa essere responsabile in parte dell'aumentata prevalenza della malattia [45]. Esiste una certa sovrapposizione tra fattori ambientali che influenzano la suscettibilità a sviluppare asma e fattori scatenanti che inducono riacutizzazioni nei pazienti già asmatici: per esempio, gli allergeni ed i sensibilizzanti professionali appartengono ad entrambe le categorie.

FATTORI SCATENANTI

Fattori scatenanti la crisi asmatica sono: fumo di sigaretta; variazioni climatiche; emozioni intense e stress che possono provocare iperventilazione ed ipocapnia, con conseguente restringimento delle vie aeree [46]; alcuni alimenti, conservanti alimentari e farmaci (aspirina, mezzi di contrasto e FANS); infezioni delle alte vie respiratorie che aumentano la reattività immune delle basse vie aeree, con rilascio di citochine proinfiammatorie e mediatori infiammatori [47]. Anche l'esercizio fisico costituisce un frequente fattore scatenante le riacutizzazioni asmatiche di breve durata nei bambini e nei giovani [48]. L'ostruzione delle vie aeree indotta dallo sforzo è determinata dalle alterazioni della mucosa bronchiale indotte dall'iperventilazione, dal raffreddamento, dal riscaldamento, dall'eccitazione dei recettori di stiramento e dalle alterazioni dell'osmolarità del fluido che riveste la mucosa delle vie aeree.

Un importante fattore scatenante è il transito per via retrograda di materiale gastrico nell'esofago che, per effetto di un'incontinenza cardiaca, caratteristica del reflusso gastro-esofageo, può riacutizzare l'asma attraverso due distinti meccanismi: irritando la mucosa esofagea con conseguente stimolazione vagale che provoca una risposta riflessa di broncostruzione; oppure il materiale refluito può risalire l'esofago ed essere aspirato in minima quantità nell'albero respiratorio, dando luogo ad una risposta irritativa.

DIAGNOSI

CLINICA

Per far diagnosi di asma è cruciale la raccolta dell'anamnesi del paziente con la descrizione della sintomatologia tipica.

La storia clinica dell'asma è caratterizzata da episodi di peggioramento della sintomatologia asmatica che si presentano con frequenza e gravità variabili. Le riacutizzazioni asmatiche o "crisi asmatiche" vengono definite come episodi caratterizzati da sintomi quali tosse, respiro sibilante, senso di costrizione al torace e dispnea, che possono presentarsi singolarmente o associati. Molto spesso i sintomi compaiono o si aggravano nelle ore notturne o nelle prime ore del mattino.

La comparsa di questi episodi è generalmente dovuta all'esposizione a uno stimolo scatenante (infezioni virali, allergeni, polveri, agenti irritanti, modificazioni di temperatura dell'aria inalata), al mancato controllo farmacologico della patologia o a una combinazione dei due fattori.

Tali "riacutizzazioni" rappresentano una delle cause principali che spingono il paziente a rivolgersi al medico di base e/o al pronto soccorso e possono essere causa di ospedalizzazione per asma.

PROVE DI FUNZIONALITÀ RESPIRATORIA

In presenza di un'anamnesi compatibile, la conferma diagnostica di asma è essenzialmente funzionale e si basa sull'obiettivazione dell'ostruzione bronchiale reversibile. La spirometria consente la valutazione quantitativa dei volumi polmonari e quindi permette di determinare il livello di gravità dell'ostruzione bronchiale e il grado di reversibilità della stessa, attraverso la misura della risposta all'uso di farmaci broncodilatatori. I parametri da valutare nella prova spirometria sono: il volume espiratorio massimo al primo secondo (FEV_1), la capacità vitale forzata (FVC) o massima quantità d'aria che può essere inspirata a partire dalla condizione di massimo svuotamento e il rapporto FEV_1/FVC (indice di Tiffenau).

Le misure vanno eseguite prima e dopo l'inalazione di broncodilatatore a breve durata d'azione. L'ostruzione bronchiale sarà indicata da: $FEV_1 < 80\%$ del teorico e $FEV_1/FVC < 70\%$. L'ostruzione sarà considerata reversibile se il FEV_1 aumenta di almeno il 12% dopo inalazione di un β_2 agonista a breve durata d'azione. L'episodicità e quindi la variabilità della patologia asmatica impone però che l'inquadramento funzionale comprenda anche il monitoraggio delle variazioni del grado di ostruzione bronchiale: per questo si procede alla misura periodica del picco di flusso espiratorio, PEF. Tale misura è piuttosto semplice e va ripetuta in diversi momenti della giornata.

Come ulteriore procedura diagnostica, viene eseguito il test di provocazione bronchiale; esso ha il compito di valutare l'iperreattività bronchiale ovvero la capacità delle vie aeree di reagire con una riduzione di calibro se vengono esposte a stimoli fisici oppure chimici. Il test consiste nella misura del FEV_1 prima e dopo somministrazione di dosi crescenti di stimoli broncocostrittori (generalmente metacolina). Tanto minore è la dose dello stimolo broncocostrittore in grado di causare la riduzione del FEV_1 del 20%, tanto maggiore sarà il grado di iperreattività bronchiale.

ALTRI ESAMI STRUMENTALI

Per la diagnosi sono utili altri esami strumentali quali: test allergologici indirizzati ad identificare l'esistenza di una sensibilizzazione ad un allergene, conta degli eosinofili ematici, emogasanalisi, elettrocardiogramma, visita ORL e Rx torace.

Le indagini allergologiche comprendono: la somministrazione di estratti allergenici diversi su scarificazioni cutanee (prick test), la valutazione radioimmunologica nel siero delle IgE totali (PRIST) e delle IgE specifiche per i diversi allergeni (RAST). Il PRIST, che nell'adulto risulta poco sensibile, trova indicazioni soprattutto in età pediatrica. Il RAST, invece, fornisce buoni risultati; tuttavia il costo elevato ne impedisce l'uso estensivo, per esempio, per valutare gruppi diversi di allergeni.

La diagnosi di asma nei bambini può rappresentare un difficile problema, soprattutto perché sibili e tosse episodici costituiscono i sintomi più frequenti delle patologie infantili, in particolare per i bambini al di sotto dei tre anni. Nei bambini, la diagnosi di asma si basa sulla presenza dei sintomi di sibili, dispnea e tosse (in particolare di notte e nelle prime ore del mattino). La misurazione della funzionalità respiratoria non è raccomandata perché richiede una attrezzatura complessa ed è difficile da eseguire.

Le linee guida suggeriscono che, il modo migliore per ottenere informazioni sulla presenza dei sintomi di asma nei bambini, è quello di sottoporre un questionario ai genitori indagando sulla frequenza di episodi di tosse, sibili, fischi o difficoltà respiratoria [49].

ANATOMIA PATOLOGICA

ANATOMIA PATOLOGICA DELL'ASMA NELL'ADULTO

INFIAMMAZIONE DELLE VIE AEREE

Come precedentemente descritto, l'asma è una malattia infiammatoria cronica delle vie aeree, che coinvolge molteplici cellule infiammatorie e mediatori che conducono a caratteristiche modificazioni fisiopatologiche.

Il processo infiammatorio presente nelle vie aeree dei soggetti con asma è caratterizzato da un'infiltrazione di eosinofili, mastociti e linfociti T associata ad alterazioni strutturali delle vie aeree che comprendono desquamazione epiteliale, ispessimento della membrana basale sottoepiteliale e aumento della vascolarizzazione della parete [50-52] (*Figura 3*). Tuttavia i meccanismi precisi attraverso i quali il processo infiammatorio determina l'iperreattività bronchiale e i sintomi di asma non sono ancora del tutto noti ed il rapporto tra la gravità dell'asma e l'intensità dell'infiammazione non è chiaramente stabilito. È interessante sottolineare che nonostante nell'asma i sintomi siano episodici, l'infiammazione delle vie aeree ha carattere persistente.

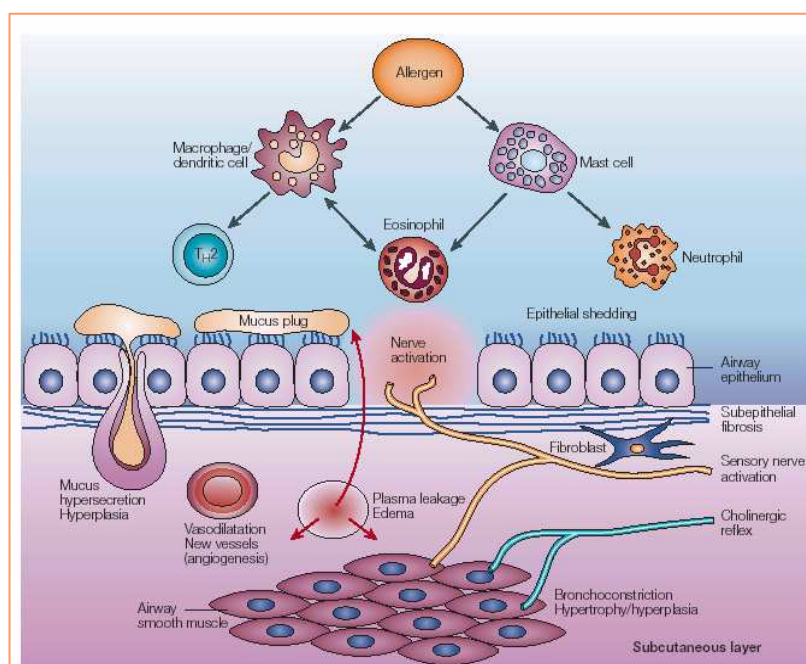


Figura 3. Fisiopatologia dell'asma. Modificata da Nat Rev Drug Discov 2004;10:831-44. [52].

Cellule Infiammatorie

Gli elementi cellulari principalmente coinvolti nell'infiammazione delle vie aeree nell'asma sono eosinofili, mastociti e linfociti T.

Gli eosinofili sono il tipo cellulare più caratteristico dell'infiammazione nell'asma. Essi sono presenti in numero aumentato nelle vie aeree, rilasciano proteine basiche che possono danneggiare le cellule epiteliali e fattori di crescita, svolgendo un ruolo nel rimodellamento delle vie aeree [53]. Il processo infiammatorio nell'asma lieve è caratterizzato oltre che da eosinofilia anche da un aumento dei mastociti in particolare nel muscolo liscio [54]. Questi due tipi cellulari non sono solo aumentati di numero, ma sono anche attivati.

I mastociti possono essere attivati da allergeni, mediante i recettori ad alta affinità per le IgE, o da stimoli osmotici. I mastociti attivati mostrano segni di degranolazione, come è stato dimostrato da analisi ultrastrutturali al microscopio elettronico, che hanno evidenziato la presenza di granuli vacuolati. Recentemente è stato osservato che il numero di mastociti degranulati è maggiore nelle vie aeree centrali rispetto a quelle periferiche. Questo suggerisce che i mastociti delle vie aeree centrali, che per prime entrano in contatto con gli allergeni, siano maggiormente attivati dallo stimolo inalatorio [55]. I mastociti e gli eosinofili attivati giocano un ruolo importante nel processo infiammatorio perché nei loro granuli contengono mediatori proinfiammatori in grado non solo di determinare danni tessutali, ma anche di interagire con altri tipi di cellule. I mastociti attivati, infatti, rilasciano mediatori broncocostrittori (istamina, cisteinil-leucotriene, prostaglandina D₂); essi contengono prevalentemente triptasi e possono esprimere le interleuchine IL-4, IL-5, IL-6 e il tumor necrosis factor (TNF- α) [56]. Gli eosinofili sono in grado di produrre e rilasciare IL-3, IL-4 e granulocyte - macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) [57].

Un ruolo chiave nel modulare l'interazione tra le diverse cellule infiammatorie nell'asma viene svolto dai linfociti T che producono numerose citochine in grado di agire su altri tipi cellulari.

Oltre ad eosinofili, mastociti e linfociti T, altri tipi cellulari possono svolgere un ruolo nell'infiammazione cronica caratteristica dell'asma.

Le cellule dendritiche legano gli antigeni alla superficie delle vie aeree, migrano ai linfonodi regionali, dove interagiscono con i linfociti T regolatori e stimolano la produzione di cellule Th2 da parte di linfociti T nativi [58].

I macrofagi che sono aumentati di numero nelle vie aeree di soggetti asmatici possono rilasciare mediatori infiammatori e citochine che amplificano la risposta infiammatoria [59].

I neutrofili rivestono un ruolo importante nell'asma, in particolare in alcuni fenotipi. Essi sono l'elemento cellulare centrale nell'asma grave [60]. Tuttavia il ruolo fisiopatologico di queste cellule è tuttora incerto: potrebbero svolgere un ruolo patogenetico nell'aggravamento dell'asma o potrebbero essere dei semplici marcatori di gravità. Infine è possibile che il loro aumento nell'asma grave sia indotto dalla terapia corticosteroidica [61].

Nella patogenesi dell'asma sono coinvolte anche le cellule strutturali delle vie aeree (cellule epiteliali, cellule del muscolo liscio, cellule endoteliali, fibroblasti e miofibroblasti), in quanto in grado di produrre mediatori infiammatori e contribuire alla persistenza dell'infiammazione. In particolare, le cellule epiteliali svolgono un ruolo importante nell'asma perchè sono direttamente a contatto con l'ambiente esterno. Infatti, i virus e gli inquinanti aerei interagiscono con le cellule epiteliali. In risposta a questi stimoli esse esprimono molteplici proteine infiammatorie e rilasciano citochine, chemochine e mediatori lipidici.

I fibroblasti e miofibroblasti producono componenti del tessuto connettivo coinvolti nel rimodellamento delle vie aeree, quali collagene e proteoglicani.

Anche i nervi delle vie aeree sono coinvolti; le fibre colinergiche possono essere attivate da fattori scatenanti di tipo riflesso nelle vie aeree, determinando broncostruzione e secrezione di muco. Le fibre sensitive, che possono essere sensibilizzate da stimoli infiammatori, provocano modificazioni riflesse e sintomi quali tosse e senso di oppressione toracica, e possono a loro volta rilasciare neuropeptidi pro infiammatori [62].

Mediatori infiammatori

Sebbene i mediatori coinvolti in questi processi di rimodellamento strutturale a carico della parete bronchiale non siano ancora noti, le citochine, le chemochine e i fattori di crescita sembrano giocare un ruolo importante. Queste proteine possono essere prodotte nelle vie aeree da un'ampia gamma di cellule, sia infiammatorie che residenti, quali mastociti, linfociti, eosinofili, basofili, cellule epiteliali, cellule dendritiche e cellule muscolari lisce. Non è ancora chiaro come le citochine intervengano nel determinare la transizione da una risposta infiammatoria acuta ad una persistente cronica, fino alla comparsa delle alterazioni strutturali. Esaminare quest'aspetto sarà fondamentale per sviluppare cure più mirate e più efficaci.

Il processo infiammatorio cronico delle vie aeree caratteristico dell'asma riconosce due momenti patogenetici importanti: la sensibilizzazione a un allergene inalatorio che induce lo sviluppo preferenziale delle cellule T helper antigene-specifiche di tipo II (Th2) e l'estendersi dell'infiammazione Th2-mediata alle basse vie respiratorie. È noto che i linfociti T, in base al tipo di citochine prodotte, si dividono in linfociti di tipo 1 e linfociti di tipo 2. I linfociti di tipo 1 producono l'interferone γ (IFN- γ), che ha un ruolo cruciale nell'attivazione dei macrofagi e nella risposta alle infezioni virali e batteriche. I linfociti Th2 rilasciano citochine specifiche, quali le interleuchine -4, -5, -9, -13 e il GM-CSF (*Figura 4*). In particolare, l'interleuchina 4 (IL-4) e l'interleuchina 5 (IL-5) sono coinvolte nella risposta IgE mediata e nell'eosinofilia, caratteristiche delle malattie allergiche [63]. Mentre nel soggetto normale c'è un equilibrio tra i linfociti T di tipo 1 e di tipo 2, nei soggetti asmatici vi è una prevalenza delle cellule di tipo 2.

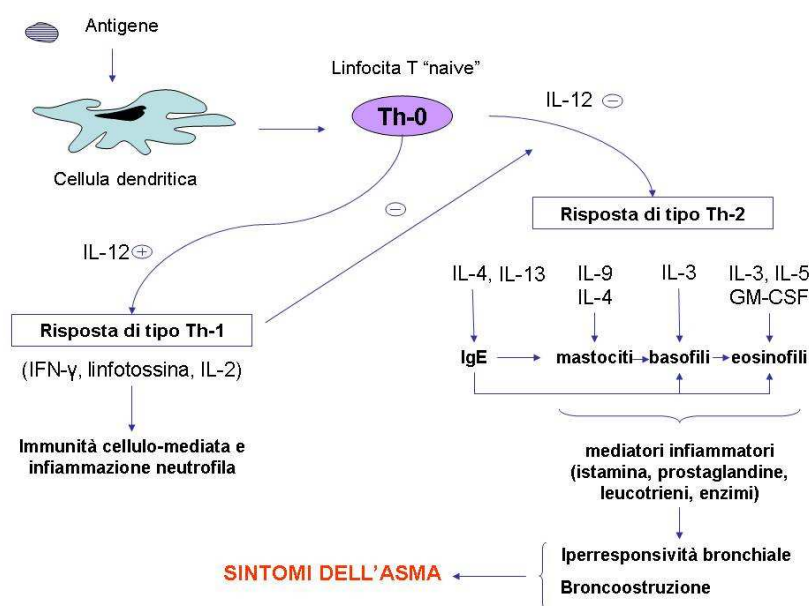


Figura 4. Prevalenza della risposta Th2 nell'asma bronchiale. Modificata da GINA Workshop Report. Global strategy for asthma management and prevention.[1].

Le citochine orchestrano la risposta infiammatoria nell'asma e ne determinano la gravità. Modelli animali suggeriscono che la produzione di citochine derivate dalla linea cellulare Th2 sia implicata nell'aumento della reattività bronchiale, più degli eosinofili e della sintesi di IgE [64].

L'IL-4 è la principale citochina coinvolta nella patogenesi delle risposte allergiche. Essa esercita la sua attività biologica attraverso il legame col suo recettore IL-4R, un eterodimero espresso sulla superficie di numerosi tipi cellulari. L'espressione della catena alfa del recettore è aumentata nell'epitelio e nella sottomucosa delle vie aeree negli asmatici [65]. In origine l'IL-4 è stata identificata come un fattore stimolante la crescita delle cellule B. Inoltre è stato dimostrato che l'IL-4 aumenta la capacità di presentazione dell'antigene da parte delle cellule B stimolando l'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II, del cluster di differenziazione CD40, delle IgM di superficie e dei recettori a bassa affinità per le IgE [66]. L'IL-4, inoltre, ha un ruolo cruciale nello sviluppo delle cellule infiammatorie Th2, nella degranolazione dei

mastociti, nell'induzione diretta della sintesi delle IgE e indiretta tramite uno switch isotipico a partire dalle IgM [67].

Un'inappropriata sintesi di IgE promossa dall'IL-4 è caratteristica dell'asma atopico ma può essere osservata anche nell'asma non-atopico. L'aumentata espressione dell'IL-4 induce un aumento della sintesi di IgE locale contro antigeni non noti che potrebbero essere di origine virale o autoanticorpi. Questi antigeni potrebbero presumibilmente attivare i mastociti, come nell'asma atopico, inducendo il rilascio di mediatori infiammatori responsabili del broncospasmo. Invece l'attivazione antigene-specifica delle cellule Th2 con la conseguente produzione di citochine e chemochine sarebbe responsabile del danno cronico della mucosa bronchiale (Figura 5).

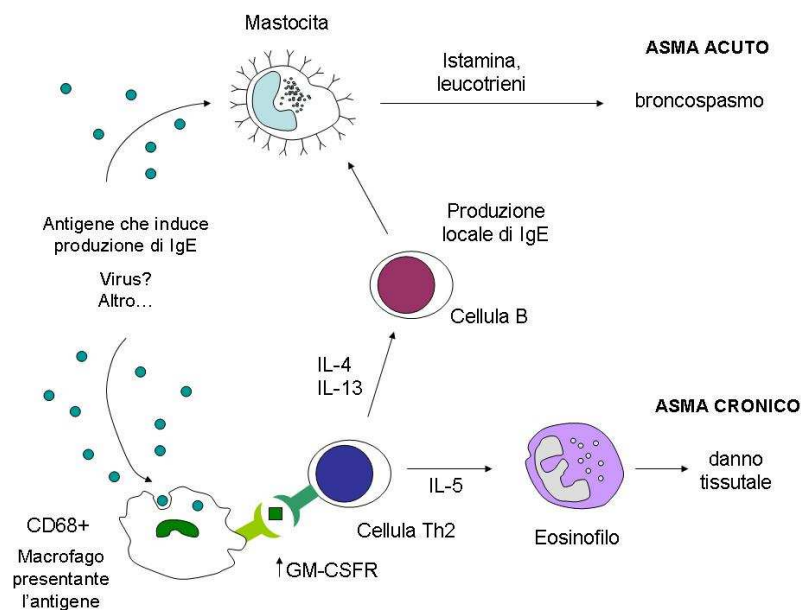


Figura 5. L'interleuchina 4 e la sintesi di IgE. Modificata da *Immunol Today* 1999;20:528-33. [68].

È stato dimostrato che l'IL-4 stimola le cellule mucosecerneti e i fibroblasti implicati nella patogenesi del rimodellamento delle vie aeree caratteristico dell'asma [69,70]. Inoltre l'IL-4 gioca un ruolo importante nell'indurre l'espressione di molecole di adesione sulle cellule endoteliali,

favorendo un processo chiave delle reazioni allergiche ossia l'aumentata adesione sull'endotelio di cellule T, eosinofili, basofili e monociti [71].

Anche l'IL-13 è aumentata nelle vie aeree dei pazienti asmatici e svolge un'attività biologica molto simile a quella dell'IL-4 [72]. Questo si riflette nella struttura dei loro recettori: la via di trasduzione del segnale è comune a entrambi i recettori. Molti tipi cellulari rispondono in modo simile sia all'IL-4 che all'IL-13 [70]. A causa di questa ridondanza, è difficile stabilire con certezza l'esatto ruolo delle due citochine nei cambiamenti indotti dagli allergeni nelle vie aeree. L'iperespressione di IL-13 nel polmone induce infiammazione, ipersecrezione di muco, fibrosi subepiteliale e produzione di eotassina e ciò supporta l'ipotesi che l'IL-13 sia un importante mediatore patogenetico dell'asma allergico. È stato ipotizzato e illustrato in molti studi su modelli animali in vivo che, anche se l'IL-4 è cruciale per l'iniziale sviluppo in senso Th2 durante la sensibilizzazione primaria, l'IL-13 svolga un ruolo importante durante l'esposizione secondaria agli antigeni inalatori [73].

L'IL-5 sembra essere, invece, la citochina primariamente coinvolta nella produzione, differenziazione, maturazione e attivazione degli eosinofili, la cellula effettrice chiave nella patogenesi dell'infiammazione allergica [74]. È stato osservato che la somministrazione di IL-5 induce eosinofilia in molti modelli animali in vivo [75]. Inoltre, è stato dimostrato che l'inalazione di IL-5 aumenta la percentuale di eosinofili nello sputo indotto e aumenta l'iperreattività delle vie aeree nei pazienti asmatici [76]. Infine, l'espressione dell'IL-5 come RNA messaggero e come proteina è aumentata nella mucosa delle vie aeree dei pazienti asmatici. Tra le citochine che influenzano la reattività bronchiale vi è l'IL-9 [77].

L'IL-9 è una citochina effettrice prodotta allo stadio finale della risposta mediata dalle cellule Th2. Inoltre l'IL-9 gioca un ruolo centrale nell'iperplasia delle cellule mucipare, nella produzione e nella differenziazione dei mastociti mentre ha meno effetti sullo sviluppo degli eosinofili, delle cellule T e della risposta immunoglobulinica [78]. È

comunque ancora da chiarire il ruolo dell'IL-9 nella regolazione dell'infiammazione allergica delle vie aeree.

In sintesi, complessi giochi di ruolo tra citochine costituiscono la nuova frontiera per comprendere i meccanismi patogenetici nell'asma.

Altri mediatori dell'infiammazione

Citochine chiave includono IL-1 β e TNF- α , che amplificano la risposta infiammatoria, e GM-CSF, che prolunga la sopravvivenza degli eosinofili nelle vie aeree.

Le chemochine sono importanti nel reclutamento di cellule infiammatorie nelle vie aeree e sono principalmente espresse nelle cellule epiteliali [79].

L'eotassina è selettiva per gli eosinofili, mentre le TARC (thymus and activation chemokines) e le chemochine derivate dai macrofagi (MDC) reclutano preferenzialmente le cellule infiammatorie della linea Th2.

I cisteinil-leucotrieni sono potenti broncocostrittori e mediatori proinfiammatori principalmente derivati da mastociti ed eosinofili. Sono gli unici mediatori la cui inibizione è stata associata con un miglioramento della funzionalità polmonare e dei sintomi di asma [80].

L'istamina è rilasciata dai mastociti e contribuisce alla broncoostruzione ed alla risposta infiammatoria.

L'ossido nitrico (NO) è un potente vasodilatatore prodotto principalmente dall'azione dell'ossido nitrico-sintasi inducibile nelle cellule epiteliali delle vie aeree. La misurazione dell'ossido nitrico esalato è sempre più utilizzata per valutare l'efficacia del trattamento anti-asmatico, dal momento che l'ossido nitrico è associato alla presenza di infiammazione nell'asma [81].

La prostaglandina D2 è un bronco-costrittore prodotto principalmente dai mastociti ed è coinvolto nel reclutamento delle cellule Th2 nelle vie aeree.

ALTERAZIONI STRUTTURALI DELLE VIE AEREE

Come riportato precedentemente, il processo infiammatorio nell'asma è associato a "rimodellamento" delle vie aeree. Questo termine indica l'insieme delle alterazioni strutturali della parete delle vie aeree che comprendono: l'ispessimento della membrana basale sottoepiteliale, la desquamazione epiteliale, la formazione di nuovi vasi o neoangiogenesi e l'ipertrofia del muscolo liscio.

La principale caratteristica del rimodellamento è l'ispessimento e l'aumento della densità della lamina reticolare della membrana basale per deposizione di fibre collagene di tipo I, III, tenascina e fibronectina da parte dei miofibroblasti attivati [82]. L'aumento dello spessore della membrana basale sembra essere positivamente correlato all'iperresponsività bronchiale, alla frequenza di attacchi d'asma e al numero di fibroblasti e miofibroblasti adiacenti ad essa [83]. L'ispessimento della membrana basale potrebbe essere una conseguenza del danno epiteliale cui corrisponde una prolungata e continua riparazione che implica la produzione di eccessive quantità di fattori di crescita che inducono i fibroblasti a proliferare e deporre fibre collagene. Anche la matrice interstiziale è coinvolta nel processo di rimodellamento. Nei soggetti asmatici è stata dimostrata la presenza di fibre elastiche anomale, frammentate o assenti, che suggeriscono la presenza di un anomalo processo elastolitico [82].

La desquamazione epiteliale, che è caratterizzata dal distacco delle cellule colonnari dalle cellule basali, potrebbe essere dovuta alla distruzione di strutture di adesione intercellulari come desmosomi e giunzioni strette [84]. La desquamazione epiteliale potrebbe essere causata anche dall'aumento dell'apoptosi delle cellule epiteliali. L'epitelio può essere riparato e sostituito con una mucosa pluristratificata non più ciliata ma costituita da cellule poligonali coperte da un sottile strato di cellule squamose (metaplasia squamosa). Queste modificazioni possono essere associate ad un'iperplasia delle cellule caliciformi mucipare e ad un aumento di volume delle ghiandole della mucosa bronchiale [85]. Questi

aspetti sono responsabili dell'ipersecrezione di muco caratteristica dell'asma bronchiale.

Numerosi sono ormai gli studi che hanno evidenziato anche un aumento della vascolarizzazione nelle vie aeree di soggetti adulti con asma lieve [86-89]. Uno studio pionieristico di Kuwano e collaboratori ha dimostrato un aumento del numero dei vasi nelle vie aeree periferiche mentre studi più recenti hanno riportato che un'aumentata vascolarizzazione è presente anche nelle vie aeree prossimali dei pazienti con asma lieve. I meccanismi responsabili dell'angiogenesi non sono ancora completamente noti. Un'ipotesi possibile è che l'angiogenesi sia mediata dai mastociti poiché essi producono fattori come istamina ed eparina che possono svolgere un ruolo proangiogenetico. È stato dimostrato che alcuni fattori di crescita tra i quali il VEGF, l'FGF e l'angiogenina sono positivamente correlati all'angiogenesi nell'asma bronchiale [90]. Infine, uno studio recente, ha analizzato la chemochina SDF1 (stromal derived factor 1) che sembra avere un ruolo chiave nella formazione di nuovi vasi [91]. Sebbene il significato funzionale delle alterazioni vascolari nell'asma non sia ancora completamente chiaro, è ipotizzabile che tali alterazioni abbiano un ruolo nell'iperreattività bronchiale. È stato dimostrato che un aumento del numero di vasi può contribuire all'ispessimento della parete delle vie aeree, causando un notevole restringimento del lume bronchiale quando avviene la contrazione del muscolo liscio. Le alterazioni vascolari possono contribuire alla broncostruzione anche in modo indiretto: l'edema associato alla proliferazione dei vasi può contribuire sia al restringimento delle vie aeree che al danno subepiteliale tipico dell'asma [92].

Un'altra caratteristica dell'asma è la proliferazione delle cellule muscolari lisce con conseguente aumento della componente muscolare. È stato dimostrato che la percentuale di parete bronchiale occupata da muscolo liscio è raddoppiata nei soggetti con asma moderato rispetto ai soggetti di controllo non-asmatici, con un aumento volumetrico percentuale dal 50 all'83% [93]. Inoltre nei soggetti con asma grave si

osserva una riduzione della distanza tra muscolo liscio e membrana basale. Questo suggerisce che le cellule muscolari lisce presenti normalmente in profondità nella sottomucosa possano differenziarsi e migrare [94]. Questo può avvenire attraverso numerosi meccanismi: ipertrofia, iperplasia e migrazione dei miociti e loro differenziazione in fibromiocytes e miofibroblasti. In particolare in risposta allo stimolo antigenico le fibrocellule muscolari lisce migrano nella sottomucosa e formano nuovo muscolo di fenotipo e funzione anomala. Questo processo è paragonabile alla migrazione delle cellule muscolari lisce nell'ateroma nel processo di formazione della placca aterosclerotica [82].

Il ruolo reciproco del processo infiammatorio cronico e del rimodellamento delle vie aeree nella patogenesi delle alterazioni anatomostretturali nell'asma resta tuttora da chiarire. Secondo un'ipotesi molto accreditata il processo infiammatorio cronico sarebbe responsabile dello sviluppo delle alterazioni strutturali delle vie aeree che caratterizzano l'asma. Tuttavia, alcuni studi hanno suggerito che il rimodellamento strutturale delle vie aeree non sia la conseguenza dell'infiammazione cronica, ma svolga di per sé un ruolo fondamentale nella patogenesi dell'asma bronchiale. Il gruppo di ricerca di Holgate ha, infatti, ipotizzato che un'alterazione della interazione tra cellule epiteliali danneggiate e cellule mesenchimali indifferenziate (epithelial mesenchymal trophic unit – EMTU) svolga un ruolo fondamentale nella patogenesi dell'asma. Le numerose citochine proinfiammatorie prodotte dalle cellule epiteliali in risposta al danno tissutale potrebbero, infatti, sia perpetuare il processo infiammatorio, sia innescare un processo di proliferazione e differenziazione delle cellule mesenchimali verso cellule miofibroblastiche che condurrebbe ad un'aumentata deposizione di matrice extracellulare e di tessuto muscolare. L'interazione tra cellule epiteliali e cellule mesenchimali sarebbe quindi fondamentale nella patogenesi dell'asma e potrebbe spiegare sia l'infiammazione cronica che il rimodellamento strutturale associato alla malattia. Questa ipotesi potrebbe chiarire perché l'utilizzo di farmaci antinfiammatori, che consente il controllo dei sintomi

della malattia e migliora notevolmente la qualità di vita dei pazienti asmatici, non sia però in grado di “guarire l’asma” [95,96].

In sintesi, il quadro anatomico-patologico dell’asma nell’adulto è caratterizzato da un processo infiammatorio eosinofilo associato ad un rimodellamento strutturale che comprende ispessimento della membrana basale, desquamazione epiteliale, aumentata vascolarizzazione della parete e alterazioni del muscolo liscio.

ANATOMIA PATOLOGICA DELL’ASMA NEL BAMBINO

Recenti studi hanno dimostrato che le alterazioni anatomopatologiche caratteristiche dell’asma nell’adulto sono presenti anche nei bambini con asma bronchiale. Nelle vie aeree dei bambini asmatici si riscontrano infatti:

- ispessimento della membrana basale
- infiltrazione eosinofila
- desquamazione epiteliale
- angiogenesi

Ispessimento della membrana basale

L’ispessimento della membrana basale è una caratteristica fondamentale dell’asma, descritta da lungo tempo nell’adulto e riscontrata recentemente anche nei bambini asmatici.

I primi studi condotti su biopsie bronchiali [97,98] hanno descritto la presenza di ispessimento della membrana sottoepiteliale in bambini asmatici. In questi studi, tuttavia, l’analisi è stata eseguita in modo qualitativo e non quantitativo e non sono stati inclusi bambini di controllo non-asmatici. Successivamente, Payne e collaboratori hanno confrontato biopsie bronchiali di bambini asmatici con biopsie bronchiali di bambini di controllo ed hanno dimostrato che i bambini con asma presentavano un ispessimento della membrana basale simile a quello descritto negli asmatici adulti. Tuttavia, in questo studio sono stati esaminati bambini con asma grave che continuavano ad avere sintomi nonostante il trattamento

con alte dosi di steroidi [99]. Fedorov e collaboratori hanno esteso queste osservazioni dimostrando che un ispessimento della membrana basale è presente non solo nei bambini con asma grave, ma anche in quelli con asma moderato [100]. Infine, Barbato e collaboratori hanno confermato che la membrana basale è ispessita anche nei bambini con asma lieve-moderato [101,102]. Tutti questi studi suggeriscono che tale alterazione insorga precocemente nella patogenesi dell'asma e sia presente in tutti gli stadi di gravità della malattia.

Infiltrazione eosinofila

Diversi studi hanno descritto un'importante eosinofilia in bambini asmatici, dimostrandola nella zona sottoepiteliale di biopsie bronchiali [101,102] in reperti autoptici [98] e nell'espettorato [103].

Al contrario, altri studi non hanno evidenziato un incremento del numero di eosinofili nelle biopsie di bambini asmatici [100,104]. Tuttavia, questi studi erano focalizzati su bambini con asma grave in terapia con dosi elevate di corticosteroidi, e questo trattamento può aver ridotto il numero di eosinofili a causa dei suoi effetti proapoptotici.

Per quanto riguarda la presenza di altre cellule infiammatorie diverse dagli eosinofili (neutrofili, macrofagi, mastociti, linfociti T CD4) non sono state riscontrate differenze significative tra bambini asmatici e bambini di controllo [101-104]. Questi risultati sono in accordo con precedenti osservazioni condotte negli adulti. Infatti, anche se è stato ipotizzato che i mastociti, linfociti T CD4⁺, macrofagi e neutrofili possano svolgere un ruolo nella patogenesi dell'asma, un aumento di queste cellule nei pazienti con asma non è stato sistematicamente documentato in letteratura [105,106].

Numerosi studi in adulti asmatici hanno utilizzato il liquido di broncolavaggio alveolare per esaminare i vari profili nell'ambito delle citochine. Invece nei bambini con sintomi di asma, pochi studi hanno investigato il ruolo delle citochine utilizzando il BAL. Kim e collaboratori hanno dimostrato un aumentato livello di IL-5 nel BAL di bambini con sintomi di asma rispetto a bambini di controllo. Lo studio ha dimostrato,

inoltre, che i livelli di IL-5 correlano significativamente con la percentuale di eosinofili [107]. Questi risultati suggeriscono che, come negli adulti, l'IL-5 associata all'induzione dell'infiammazione eosinofilica, rivesta un ruolo chiave nei meccanismi patogenetici responsabili dell'asma in età pediatrica. In un altro studio sul sangue periferico di bambini con asma atopico, Gemou-Engesaeth e collaboratori, hanno dimostrato un'aumentata espressione di RNA messaggero per l'IL-4 e l'IL-5 rispetto al gruppo controllo [108]. Anche questi risultati sono analoghi a quelli osservati negli adulti.

Desquamazione epiteliale

In passato sono state riportate solo evidenze indirette di danno epiteliale nei bambini. Marguet e collaboratori hanno osservato un'aumentata percentuale di cellule epiteliali nel lavaggio broncoalveolare di bambini asmatici rispetto a bambini di controllo [109], mentre Fedorov e collaboratori, nelle biopsie bronchiali, hanno riportato un'aumentata espressione del recettore per il fattore di crescita epiteliale (EGFR) [100]. Poiché l'EGFR viene espresso in risposta ad uno stimolo dannoso, gli autori hanno ipotizzato la presenza di un danno epiteliale nei bambini asmatici. Nello stesso studio è stato osservato inoltre che l'aumentata espressione di EGFR è associata ad una diminuita espressione del marker di proliferazione cellulare Ki67, indicando una ridotta capacità rigenerativa dell'epitelio. Gli autori hanno quindi ipotizzato che l'epitelio danneggiato dei bambini asmatici non sia in grado di ripararsi in modo adeguato.

In un recente studio su biopsie bronchiali, Barbato e collaboratori [102] per la prima volta hanno dimostrato direttamente la presenza di desquamazione epiteliale nei bambini asmatici, confermando ed estendendo le precedenti osservazioni. L'insieme dei risultati induce ad ipotizzare che nei bambini asmatici vi sia una maggiore fragilità epiteliale e che questa possa svolgere un ruolo importante nella patogenesi dell'asma. L'epitelio danneggiato può, infatti, promuovere sia il processo

infiammatorio che il rimodellamento delle vie aeree attraverso il rilascio di fattori di crescita, fattori mitogeni, e proinfiammatori che inducono la proliferazione delle cellule muscolari, l'angiogenesi e la deposizione di collagene che porta ad ispessimento della membrana basale [96]. Lo stesso studio ha dimostrato che nei bambini asmatici la desquamazione epiteliale è associata all'ispessimento della membrana basale e all'aumento della vascolarizzazione. Queste osservazioni confermano l'ipotesi che un'alterata interazione tra cellule epiteliali danneggiate e cellule mesenchimali (ovvero un anomalo funzionamento dell'unità epitelio mesenchimale –EMTU–) [96] abbia un ruolo fondamentale nell'asma bronchiale già nei bambini con asma lieve/moderato.

Angiogenesi

L'angiogenesi è stata riscontrata anche nelle vie aeree dei bambini asmatici [102]. L'aumento del numero di vasi potrebbe essere dovuto non solo alla formazione di vasi ex-novo ma anche all'allungamento di vasi preesistenti che ripiegandosi potrebbero attraversare più volte il piano di sezione. In entrambi i casi l'aumento della densità dei vasi dipenderebbe da una risposta vascolare a stimoli proliferativi [110]. Numerosi fattori angiogenetici, come ad esempio il fattore di crescita VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), possono indurre tale risposta.

STORIA NATURALE

L'asma è una condizione eterogenea che si manifesta con molteplici espressioni cliniche (fenotipi). La presenza di condizioni differenti che possono essere associate all'ostruzione delle vie aeree inferiori nell'infanzia complica la nostra comprensione della patogenesi dell'asma [111]. Il respiro sibilante è la principale espressione clinica della malattia ed è il sintomo più frequente nei bambini con asma.

Studi epidemiologici hanno dimostrato che nei primi anni di vita possono essere presenti diversi fenotipi di respiro sibilante (*Figura 6*).

Lo studio Tucson (Tucson Children's Respiratory Cohort Study) ha avuto un ruolo particolarmente rilevante nella definizione dei vari fenotipi [112,113]. Questo è uno studio longitudinale, prospettico, a lungo termine, che ha esaminato i fattori di rischio per malattie respiratorie acute nei bambini e croniche nelle età successive. È stato condotto nella città di Tucson, Arizona, USA ed ha arruolato alla nascita bambini sani nati dal 1980 al 1984, per un totale di 1246 soggetti. Questi bambini sono stati studiati nel corso degli anni dal punto di vista respiratorio con periodici accertamenti che hanno valutato l'anamnesi familiare, il tipo e la frequenza degli eventuali disturbi respiratori (ad es. infezioni delle alte e basse vie aeree, tosse, respiro sibilante, broncoostruzione reversibile), le eventuali terapie e le relative risposte, l'andamento della funzionalità respiratoria. È stata valutata anche la presenza di atopia. I curatori dello studio, Martinez e collaboratori [37,111,114-116], hanno pertanto dimostrato che i fenotipi più comuni di respiro sibilante sono (*Figura 6*):

- a) respiro sibilante transitorio, precoce (scompare intorno ai 3-5 anni di età);
- b) respiro sibilante non-atopico (scompare intorno ai 13 anni di età);
- c) respiro sibilante associato ad atopia/asma "classico" (persiste anche nell'età adulta).

Tuttavia, questa classificazione dei fenotipi di respiro sibilante non implica che l'appartenenza ad uno di questi sia mutualmente esclusiva.

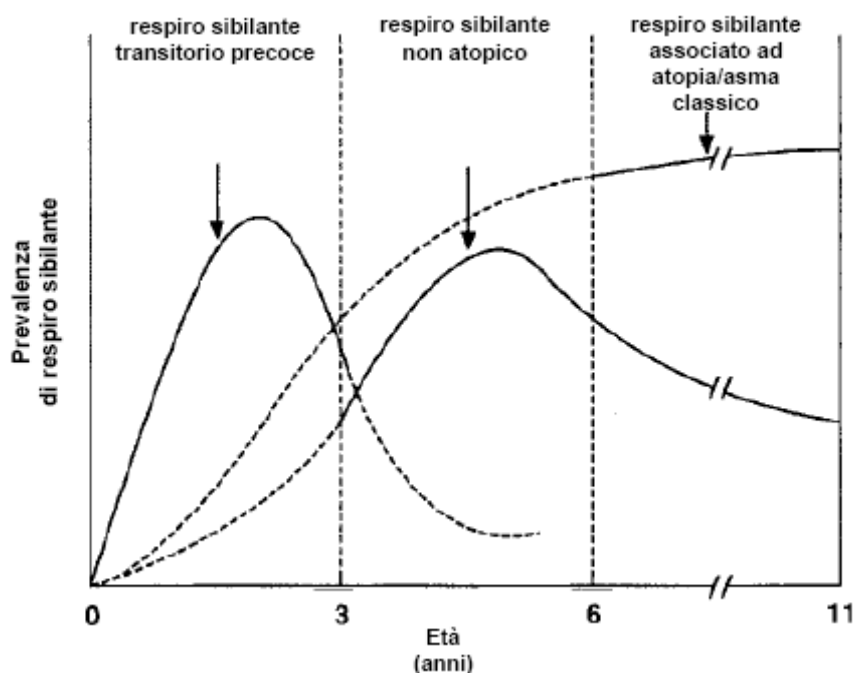


Figura 6. Storia naturale dell'asma nell'età prescolare e scolare. Ipotetico picco di prevalenza dei diversi fenotipi di respiro sibilante nell'infanzia. Sono evidenziati i tre fenotipi più frequenti. Le linee tratteggiate suggeriscono che il respiro sibilante può essere rappresentato da differenti forme di curve, che derivano da molteplici fattori, inclusa una sovrapposizione dei gruppi. Adattato da Thorax 1997; 52:946-52. [115].

RESPIRO SIBILANTE TRANSITORIO PRECOCE

Nella maggior parte dei casi, il respiro sibilante e i sintomi relativi si risolvono tra i 3 e i 5 anni d'età. Questo fenotipo di respiro sibilante transitorio non è comunemente associato ad una storia familiare di asma o atopica [117]. Il principale fattore di rischio sembra essere una riduzione della funzionalità respiratoria polmonare diagnosticata alla nascita o prima di qualsiasi episodio di infezione delle basse vie respiratorie [115]. In questi bambini, la funzionalità polmonare aumenta con l'età, ma rimane inferiore rispetto a quella dei coetanei che non hanno mai avuto respiro sibilante [37]. È stato osservato che questi bambini a 11 anni non presentano un'augmentata prevalenza di iperreattività alla prova con la metacolina né un'augmentata variabilità del picco di flusso espiratorio.

Inoltre, questi bambini hanno la stessa probabilità di sviluppare l'asma negli anni futuri dei soggetti che non hanno mai avuto respiro sibilante [37].

Altri fattori di rischio per il respiro sibilante transitorio precoce sono: la nascita prematura [118], il contatto con altri fratelli o con altri bambini negli asili [119], il fumo in gravidanza [113] e l'esposizione post-natale al fumo di sigaretta [120].

RESPIRO SIBILANTE NON-ATOPICO

Lo studio Tucson ha dimostrato che in molti casi i sintomi di respiro sibilante comparsi nell'età prescolare e scolare scompaiono alla pubertà [112,113]. In questi casi il respiro sibilante non è associato ad atopia o a storia familiare di asma. Tuttavia, diversamente dai bambini con respiro sibilante transitorio precoce, precedentemente descritti, i bambini con respiro sibilante non-atopico hanno una funzionalità polmonare normale all'inizio della vita e sviluppano le alterazioni funzionali più tardi nel corso dell'infanzia.

Il respiro sibilante non-atopico è strettamente associato a infezioni delle basse vie aeree nei primi tre anni di vita ed in particolare ad infezioni da virus respiratorio sinciziale [121]. Non si può escludere la possibilità che l'infezione da RSV scateni una risposta immunitaria responsabile della riduzione della funzionalità polmonare [36]. I bambini con una storia di infezioni precoci delle basse vie aeree da RSV hanno a 11 anni una funzionalità polmonare generalmente inferiore rispetto ai coetanei senza storia di infezioni pregresse. Numerosi studi prospettici a lungo termine su bambini ricoverati in ospedale con infezione da RSV documentata hanno evidenziato che approssimativamente il 40% dei bambini continua ad avere respiro sibilante fino alla tarda infanzia [1]. Studi recenti hanno dimostrato che, altri virus sono in grado di conferire suscettibilità per il futuro sviluppo dei sintomi di respiro sibilante [12,122].

RESPIRO SIBILANTE ATOPICO O ASMA “CLASSICO”

In molti casi i sintomi di respiro sibilante presenti nell'infanzia persistono anche in età adulta e diventano manifestazioni cliniche dell'asma “classico”. Anche in questi casi i sintomi compaiono molto precocemente nel corso della vita, quasi sempre prima dei 6 anni. I bambini che svilupperanno asma “classico” hanno una funzionalità respiratoria normale nei primi anni di vita e solo in seguito presenteranno deficit funzionali significativi a causa di una ridotta crescita della funzionalità respiratoria [123]. Numerosi studi epidemiologici [37,124] hanno dimostrato che il respiro sibilante persistente è associato ad iperreattività bronchiale, aumentato livello sierico di IgE (atopia), presenza di malattia allergiche (ad es. dermatite atopica) e sensibilizzazione allergica ai comuni allergeni [13,125].

Alcuni studi hanno dimostrato che i bambini con atopia hanno una funzionalità respiratoria ridotta all'età di 3 anni, indicando che modificazioni importanti nella fisiologia delle vie aeree hanno un inizio molto precoce [37]. In particolare si è visto che l'effetto della sensibilizzazione allergica sullo sviluppo delle alterazioni funzionali dell'asma è tanto più importante quanto più precocemente avviene [115]. L'assenza di tale sensibilizzazione allergica determinerebbe la regressione dei sintomi ed il raggiungimento di una funzionalità polmonare normale alla pubertà [13].

Pertanto il timing del processo di sensibilizzazione è particolarmente importante: l'effetto dannoso dell'esposizione agli allergeni domestici negli individui sensibilizzati risulta molto più pronunciato nei primi tre anni di vita, identificando quindi in questa finestra temporale il momento potenzialmente efficace per intraprendere un tentativo di controllo della storia naturale della patologia asmatica [12]. Tuttavia bisogna tener conto che studi recenti su bambini di 2-3 anni di età con respiro sibilante hanno dimostrato che il trattamento con corticosteroidi inalatori non è in grado di modificare la storia naturale della malattia [126-128].

Queste osservazioni indicano che gli eventi che accadono nei primi anni di vita potrebbero avere un ruolo estremamente importante nel determinare l'evoluzione della malattia negli anni successivi. Diventa quindi fondamentale indagare le alterazioni anatomo-patologiche presenti nelle vie aeree dei bambini asmatici.

In questa tesi, per aggiungere nuovi elementi utili a chiarire i meccanismi patogenetici e la storia naturale dell'asma, sono stati eseguiti due studi focalizzati sull'analisi di biopsie bronchiali di bambini con sintomi di respiro sibilante.

STUDIO I

EPITHELIAL DAMAGE AND ANGIOGENESIS IN THE AIRWAYS OF CHILDREN WITH ASTHMA

***AJRCCM* 2006; 174:975-981**

SCOPO DELLO STUDIO

L'infiammazione svolge un ruolo fondamentale nella patogenesi dell'asma bronchiale. Tuttavia, recentemente è stato ipotizzato che le alterazioni strutturali delle vie aeree, che finora sono state considerate una conseguenza dell'infiammazione abbiano di per sé un ruolo patogenetico nell'asma. Lo studio delle alterazioni presenti nelle vie aeree dei bambini con asma è quindi importante per valutare se le caratteristiche anatomico-patologiche presenti nell'adulto inizino a svilupparsi precocemente nella storia naturale della malattia e se il rimodellamento delle vie aeree avvenga parallelamente all'infiammazione o consequenzialmente ad essa.

L'obiettivo della prima parte della tesi è stato quindi, esaminare e quantificare i processi di infiammazione e rimodellamento delle vie aeree in bambini con asma lieve/moderato.

A questo scopo nelle biopsie bronchiali di bambini con asma sono stati analizzati:

- Il grado di desquamazione epiteliale, la presenza di metaplasia squamosa e di iperplasia delle cellule caliciformi mucipare nell'epitelio;
- L'ispessimento della membrana basale sottoepiteliale;
- Il numero dei vasi presenti nella sottomucosa e l'area da essi occupata;
- L'espressione del VEGF, nei vasi della sottomucosa e nell'epitelio;
- La presenza delle cellule infiammatorie nella sottomucosa, in particolare: eosinofili, neutrofili, mastociti, linfociti T CD4⁺ e macrofagi.

I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti dall'analisi di un gruppo di bambini atopici non-asmatici e di un gruppo di bambini di controllo non-atopici e non-asmatici.

MATERIALI E METODI

SOGGETTI

In questo studio, sono stati inclusi 44 bambini di età compresa tra 1 e 15 anni, reclutati tra quelli sottoposti a fibrobroncoscopia per indicazioni cliniche adeguate perché affetti da una patologia, diversa dall'asma, il cui iter diagnostico, come stabilito dalle linee guida internazionali, prevede l'esecuzione di una broncoscopia [129-131]. In particolare sono stati esaminati 17 bambini con asma (di età compresa tra i 2 e i 15 anni), 12 bambini atopici non-asmatici (di età compresa tra 1 e 11 anni) e 15 bambini di controllo non-atopici e non-asmatici (di età compresa tra 1 e 14 anni).

I bambini asmatici sono stati sottoposti a broncoscopia per stridore laringeo (n=2), polmonite ricorrente (n=8) o tosse cronica (n=7). I bambini atopici non-asmatici sono stati sottoposti a broncoscopia per stridore laringeo (n=3), polmonite ricorrente (n=3), tosse cronica (n=4), tracheomalacia (n=1) o sindrome delle apnee ostruttive del sonno (OSA) (n=1). I bambini di controllo, infine, sono stati sottoposti a broncoscopia per stridore laringeo (n=1), polmonite ricorrente (n=6), tosse cronica (n=6), tracheomalacia (n=1) o laringomalacia (n=1).

L'asma è stato diagnosticato su base clinica, quando il bambino presentava episodi ripetuti di respiro sibilante, dispnea e tosse (soprattutto notturni o nelle prime ore del mattino) che miglioravano in seguito all'uso di farmaci broncodilatatori [101]. La presenza e la reversibilità di questi sintomi erano riferite dai genitori del bambino sulla base di un questionario specifico e confermate dal pediatra.

L'atopia è stata definita sulla base dell'incremento delle IgE sieriche totali (PRIST) o delle IgE specifiche (RAST) per i seguenti allergeni: acari della polvere (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*), muffe (*Alternaria alternata*), epitelio di gatto e pollini (*Lolium*

perenne, *Poa pratensis*, *Phleum pratense*, *Dactylis glomerata*, *Cynodon dactylon*).

Nel gruppo dei bambini atopici non-asmatici, l'asma è stato escluso perché, come riferito dai genitori, questi bambini non hanno mai avuto episodi di respiro sibilante, dispnea o tosse, che miglioravano in seguito al trattamento con un broncodilatatore. Infatti, i 4 bambini di questo gruppo con tosse cronica sono stati trattati con β_2 -agonisti e corticosteroidi per due settimane senza alcun beneficio clinico. Inoltre per escludere l'asma nei bambini atopici non-asmatici, è stato eseguito il test da sforzo. Purtroppo solo due di questi bambini avevano più di 6 anni e sono stati quindi in grado di sostenere il test.

Prima dell'esecuzione della broncoscopia, ciascun paziente è stato sottoposto ad anamnesi, esame obiettivo, esami ematochimici di routine, a prove allergologiche (PRIST e RAST), mentre le prove di funzionalità respiratoria (spirometria) sono state eseguite soltanto nei bambini di età superiore a 5 anni perché capaci di cooperare alla corretta esecuzione del test. Il volume espiratorio massimo in un secondo (FEV_1) è stato misurato utilizzando uno spirometro a campana 10-L (Biomedin, Padova) e la migliore di tre misure è stata espressa in percentuale (%) di un valore teorico in accordo con i parametri di riferimento di Polgar e Promadhat [132].

Lo studio è stato portato a termine in accordo con le indicazioni della Dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal comitato etico dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

I genitori sono stati informati ed hanno espresso il loro consenso alla partecipazione dei bambini allo studio.

BRONCOSCOPIA

La broncoscopia è stata eseguita con un broncoscopio a fibre ottiche Olympus MA-651 (k) con un diametro esterno di 4.9 mm. Attraverso una pinza bioptica Olympus FB 19 C-1, inserita lungo il canale di servizio del broncoscopio, è stato prelevato un campione bioptico della mucosa

bronchiale. In tutti i bambini le biopsie sono state prelevate dalla carena principale in quanto questo sito risulta facilmente accessibile ed assicura che i campioni biotici siano prelevati allo stesso livello dell'albero bronchiale. Il broncoscopio è stato introdotto per via orale usando un "mouth" a protezione dello strumento e della cavità orale dei bambini. Durante l'esecuzione dell'indagine i bambini erano sedati con propofol (3 mg pro Kg) e trattati con anestesia locale con lidocaina sopra e sotto la laringe (1% e 0.5% rispettivamente).

PROCESSAZIONE ED ANALISI DELLE BIOPSIE BRONCHIALI

I campioni biotici ottenuti con la procedura sopra descritta, sono stati fissati in formaldeide al 4% per 4 ore, poi disidratati attraverso passaggi successivi in alcool etilico a concentrazioni crescenti, diafanizzati mediante passaggi ripetuti in xilolo ed infine inclusi in paraffina.

Le biopsie incluse sono state poi tagliate con il microtomo; si sono ottenute sezioni seriali di 5 μm ciascuna che successivamente sono state colorate con tecniche istochimiche ed immunoistochimiche. Ciascuna colorazione è stata eseguita su due sezioni della stessa biopsia a distanza di circa 100 μm l'una dall'altra. Le biopsie sono state considerate idonee per l'analisi quando presentavano almeno 1 mm di lunghezza di membrana basale e 0.1 mm^2 di tessuto conservato nella zona sottoepiteliale.

La colorazione istochimica con ematossilina ed eosina è stata utilizzata per esaminare l'epitelio e la membrana basale.

Per quantificare la desquamazione epiteliale sono state misurate sia la lunghezza dell'epitelio distrutto che la lunghezza dell'epitelio totale (inteso come lunghezza della membrana basale); la desquamazione epiteliale è stata espressa come percentuale di epitelio distrutto rispetto alla lunghezza totale della membrana basale. L'epitelio è stato considerato distrutto sia quando la membrana basale era completamente scoperta sia quando era coperta solo da un singolo strato di cellule basali privo di cellule cigliate o di cellule caliciformi mucipare. Nei tre gruppi di bambini è

stata inoltre valutata la presenza di metaplasia squamosa definita come presenza di un epitelio pluristratificato costituito da cellule poligonali coperte da un sottile strato di cellule squamose in assenza di cellule cigliate [133]. Infine, per valutare l'iperplasia delle cellule calciformi mucipare, queste cellule sono state quantificate nelle zone di epitelio intatto ed espresse come numero di cellule per mm di membrana basale.

Nelle sezioni colorate con ematossilina-eosina, è stato misurato anche lo spessore della membrana basale eseguendo misure ripetute ad intervalli di 50 μm lungo tutta la sua lunghezza.

Le tecniche immunistochemiche sono state utilizzate per l'identificazione dei vasi, del VEGF e delle cellule infiammatorie presenti nella sottomucosa.

I vasi sono stati identificati con un anticorpo monoclonale anti-CD31. Le sezioni sono state pretrattate per 5 minuti con H_2O_2 (3% in PBS) e per 15 minuti con una soluzione acquosa contenente 0.1% tripsina e 0.1% CaCl_2 a pH 7.8 a 37°C per esporre gli epitopi immunoreattivi. Per saturare i siti aspecifici di legame le sezioni sono state trattate con siero di coniglio. In seguito, sono state incubate per un'ora con l'anticorpo monoclonale di topo anti-CD31 (M0823 clone JC70A, Dako) diluito 1:30 in tampone trisma-maleato (Sigma). Il legame con l'antigene è stato rilevato mediante il metodo Envision (Dako) usando come substrato cromogeno la diaminobenzidina (DAB), che evidenzia tale legame attraverso una colorazione marrone. Le sezioni sono state poi contrastate con ematossilina di Mayer. I vasi sono stati quantificati nella sottomucosa nella zona che si estende per 100 μm al di sotto della membrana basale reticolare. Nella sottomucosa è stata misurata anche l'area occupata dai vasi. I risultati sono stati espressi come numero di vasi per mm^2 di area esaminata e come percentuale di area occupata dai vasi rispetto all'area totale esaminata.

I vasi che esprimevano il fattore di crescita VEGF sono stati identificati utilizzando un anticorpo monoclonale specifico anti-VEGF umano (M7273, Dako). Per rendere accessibili i siti di legame le sezioni sono state poste

in citrato buffer a pH 6 e in forno a microonde 15 minuti alla massima potenza. Sono state poi raffreddate, trattate con siero di coniglio per bloccare i siti di legame aspecifici ed incubate con l'anticorpo primario anti-VEGF diluito 1:30 per tutta la notte a 4 °C. Il legame con l'antigene è stato rilevato con l'uso di un sistema fosfatasi alcalina-antifosfatasi alcalina (APAAP, Dako) utilizzando come substrato cromogeno Fast Red (Dako) che evidenzia il legame con l'antigene attraverso una colorazione rossa. Si è poi eseguita una colorazione di contrasto con ematossilina. I vasi VEGF⁺ sono stati quantificati nella sottomucosa ed espressi come numero di vasi positivi per mm² di sottomucosa esaminata. Inoltre, l'espressione del VEGF è stata quantificata anche nell'epitelio, sia intatto che distrutto, con un metodo semiquantitativo attribuendo un valore di score compreso tra 0 e 3 ad ogni campo microscopico esaminato. Il valore 0 veniva assegnato al campo microscopico quando nell'epitelio non erano presenti cellule VEGF⁺, mentre il valore 3 veniva attribuito al campo microscopico quando tutte le cellule epiteliali erano VEGF⁺. Per ogni paziente il valore finale di score è stato ottenuto calcolando la media degli score.

Le cellule infiammatorie sono state quantificate con tecniche immunostochimiche. Ogni tipologia cellulare è stata evidenziata mediante un anticorpo monoclonale specifico: anticorpo anti-EG2 (Pharmacia) diluito 1:300 per gli eosinofili, anticorpo anti-elastasi neutrofila (M752, Dako) diluito 1:100 per i neutrofili, anticorpo anti-CD4 (M834 clone OPD4, Dako) diluito 1:50 per i linfociti CD4, anticorpo anti-CD68 (M814, Dako) diluito 1:400 per i macrofagi ed anticorpo anti-triptasi (M7052, Dako) diluito 1:400 per i mastociti. Per rendere più accessibili i siti di legame, nelle colorazioni per eosinofili, macrofagi e mastociti, le sezioni sono state incubate in una soluzione di tripsina (Tripsina 0.1% CaCl₂ 0.1%, pH 7.8 a 37 °C) per 15 minuti. Tutte le sezioni in esame sono state trattate con siero di coniglio, ed incubate con l'anticorpo primario per un'ora. Il legame con l'antigene è stato rilevato con il sistema APAAP e Fast Red. Si è poi eseguita una colorazione di contrasto con ematossilina. Le cellule

infiammatorie sono state quantificate nella sottomucosa ed espresse come numero di cellule positive per mm^2 di tessuto esaminato.

L'analisi microscopica è stata eseguita con microscopio ottico Olympus Bx41 e con l'ausilio di un sistema di analisi d'immagini computerizzato (Casti Imaging Venice, Italy). Per evitare errori nelle letture tutti i casi sono stati classificati e le misurazioni sono state effettuate senza che l'osservatore fosse a conoscenza dei dati clinici.

ANALISI STATISTICA

Sono state eseguite almeno 4 misure ripetute dei parametri morfologici da parte dello stesso osservatore e la variabilità tra le misure è stata stimata con il coefficiente di variazione.

I dati di ciascun gruppo sono stati espressi come media ed errore standard della media (SEM) per i valori parametrici o come mediana e range per i valori non parametrici. Le differenze tra i tre gruppi sono state analizzate usando l'analisi della varianza (ANOVA) per i dati clinici e il test di Kruskal-Wallis per i dati istologici. Il test U di Mann-Whitney è stato applicato dopo il test di Kruskal-Wallis quando appropriato. I coefficienti di correlazione sono stati calcolati usando il test di Spearman's rank.

Sono stati accettati come significativi valori di probabilità $p < 0.05$.

RISULTATI

DATI CLINICI

Le caratteristiche cliniche dei bambini inclusi nello studio sono riportate in *Tabella 2*.

Tabella 2. Caratteristiche cliniche dei bambini esaminati

	BAMBINI ASMATICI	BAMBINI ATOPICI NON-ASMATICI	BAMBINI DI CONTROLLO
N° E SESSO (M/F)	5M/12F	8M/4F	8M/7F
ETÀ (anni) mediana e range	5 (2-15)	4 (1-11)	4 (1-14)
DURATA DEI SINTOMI (anni) mediana e range	3.3 (0.6-10)	-	-
ATOPIA	7/17	12/12	0/15
FEV ₁ (% del teorico) media ± SE	83±4*	100±6	102±5
FEV ₁ /FVC (%) media ± SE	88±2	90±3	91±3

F= femmine; M= maschi;

* p= 0.03 vs bambini atopici e p= 0.01 vs bambini di controllo

I bambini nei tre gruppi avevano un'età simile. La broncoscopia è stata ben tollerata in tutti i bambini e non si sono verificate complicanze successive. I test di funzionalità respiratoria sono stati eseguiti da 11 dei 17 bambini con asma, 6 dei 12 bambini atopici non-asmatici e da 5 dei 15 bambini di controllo. Il valore del FEV₁ era significativamente diminuito nei bambini con asma sia rispetto ai bambini atopici (p=0.03) sia rispetto ai bambini di controllo (p=0.01).

Nei bambini con FEV₁ inferiore all'80% del teorico la risposta media al test di broncodilatazione è stata del 14% (range 12-16%) rispetto ai valori basali. Al momento dell'inserimento nello studio la durata media dei sintomi nei bambini asmatici era di 3.3 anni (range 7 mesi - 10 anni). In alcuni di questi bambini i sintomi erano talvolta (ma non esclusivamente)

scatenati dal raffreddore o da un episodio influenzale. Dodici dei diciassette bambini asmatici avevano asma lieve ben controllato con salbutamolo al bisogno. Gli altri cinque bambini avevano un asma di grado moderato trattato regolarmente con combinazioni di salmeterolo/fluticasone (50/100 µg due volte al giorno in 4 bambini e 25/125 µg due volte al giorno in 1 bambino). Tutti i bambini con polmoniti ricorrenti (n=17) erano stati trattati con cicli di antibiotici.

Nei bambini atopici non-asmatici, per escludere l'asma è stato eseguito il test da sforzo. Purtroppo solo due di questi bambini avevano più di 6 anni ed erano quindi in grado di sostenere il test. In entrambi i casi la caduta del FEV₁ dopo l'esercizio fisico è stata inferiore al 10%. Quando è stata indagata la presenza di dermatite atopica nei bambini atopici non-asmatici è stato osservato che al momento dello studio era presente in un solo bambino mentre altri due bambini ne erano stati affetti solo nei primi anni di vita. Le caratteristiche dei bambini atopici non-asmatici sono riportate in *Tabella 3*.

Tabella 3. Stato atopico nei bambini atopici non-asmatici

BAMBINO ATOPICO	ETÀ (anni)	IGE TOTALI (PRIST) U/ml	IGE SPECIFICHE (RAST +)
1	8	72.8 [§]	Acari della polvere
2	5	269 [§]	pollini
3	4	52	Pollini
4*	1	99.3	OVA
5	4	25.3	Pollini
6	5	142 [§]	-
7*	2	359 [§]	-
8	4	35.7	Pollini
9*	4	170 [§]	-
10	4	946 [§]	-
11	4	81.6 [§]	Acari della polvere
12	11	885 [§]	Acari della polvere, forfora di gatto, pollini.

* bambino con dermatite atopica;

§ Sopra il limite della norma (in relazione all'età)

DATI ISTOLOGICI

Le biopsie sono state considerate adeguate per le successive analisi quando la lunghezza della membrana basale era superiore ad 1 mm e quando erano presenti almeno 0.1 mm² di sottomucosa esaminabile. Secondo tale criterio, è stato possibile eseguire tutte le quantificazioni in tutti i bambini, eccetto in un bambino atopico non-asmatico in cui non è stato possibile quantificare il numero di vasi nella sottomucosa.

L'analisi della varianza con il test di Kruskal-Wallis ha dimostrato che i tre gruppi sono diversi per il grado di desquamazione epiteliale ($p=0.002$), l'ispessimento della membrana basale ($p=0.0002$), per il numero di vasi ($p=0.04$) e per il numero di eosinofili ($p=0.004$) nella sottomucosa.

La desquamazione epiteliale è aumentata nei bambini asmatici sia rispetto ai bambini di controllo [mediana, range: 54 (12-100) vs 14 (0-100) %; $p=0.005$] sia rispetto ai bambini atopici non-asmatici [54 (12-100) vs 20 (0-100) %; $p=0.002$]. Non è stata osservata alcuna differenza significativa tra i bambini atopici non-asmatici ed i bambini di controllo (*Figura 7A*). Il danno epiteliale è dovuto prevalentemente alla perdita delle cellule colonnari, mentre la distruzione totale dell'epitelio con perdita sia delle cellule colonnari che delle cellule basali è stata osservata molto raramente. È presente, infatti, solo in pochi bambini (4 asmatici, 2 atopici non-asmatici e 3 controlli) ed interessa solo una piccola percentuale dell'intero epitelio [media (range): 8.3 (1.7-16.6) %]. La desquamazione epiteliale osservata nei bambini asmatici rimane aumentata rispetto agli altri gruppi sia includendo l'epitelio totalmente distrutto, sia considerando solo l'epitelio con cellule basali privo di cellule colonnari. L'esame delle cellule caliciformi mucipare non mostra differenze significative tra i tre gruppi di bambini. Inoltre in nessuna delle biopsie esaminate sono state evidenziate aree di metaplasia squamosa.

Lo spessore della membrana basale è aumentato nei bambini asmatici sia rispetto ai bambini di controllo [mediana (range); 4.5 (2.5-6.2) vs 2.7 (1.8-4.9) μm ; $p=0.0002$], sia rispetto ai bambini atopici non-asmatici

[4.5 (2.5-6.2) vs 3.2 (2.3-4.7) μm ; $p=0.005$]. La membrana basale è ispessita anche nei bambini atopici non-asmatici rispetto ai bambini di controllo ma in grado minore [3.2 (2.3-4.7) vs 2.7 (1.8-4.9) μm ; $p=0.053$] (Figura 7B).

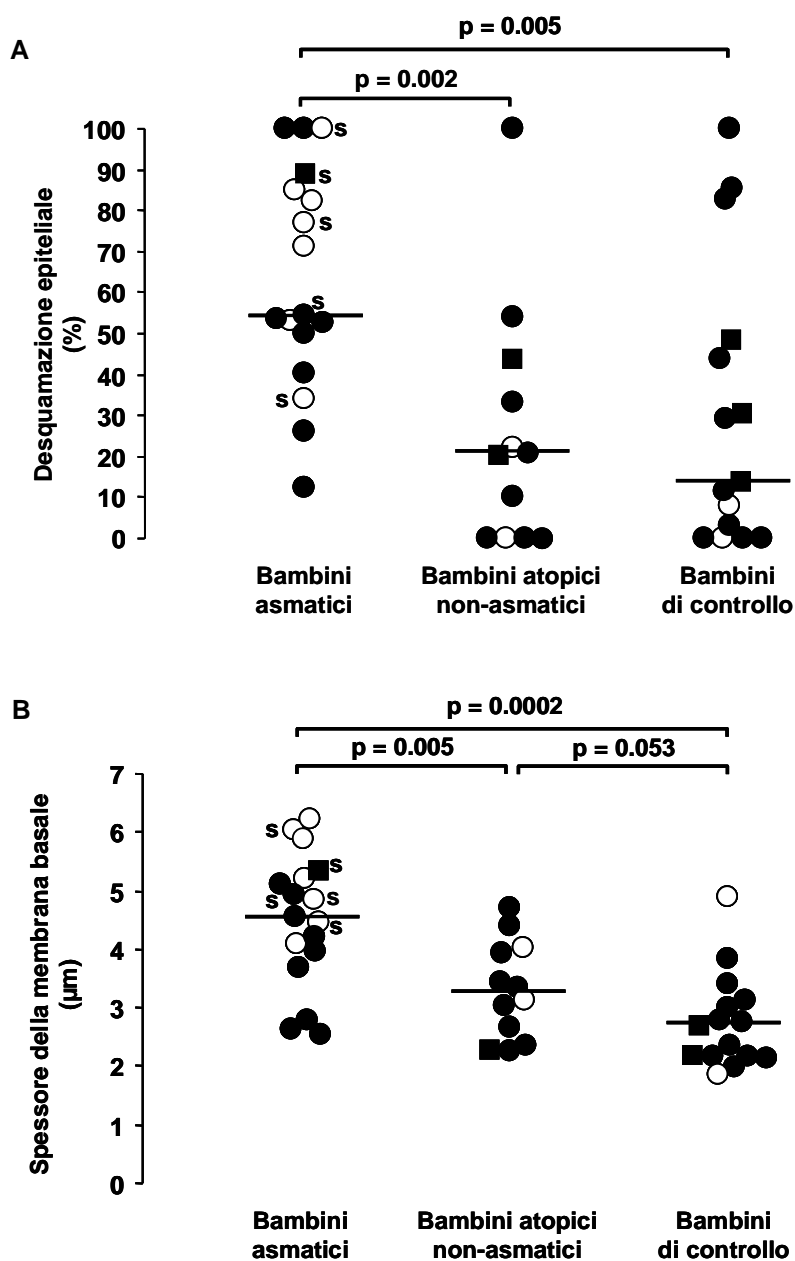


Figura 7. Valori individuali della desquamazione epiteliale (A) e dell'ispessimento della membrana basale (B) nei tre gruppi di bambini esaminati. ■ = bambino di età < 3 anni; ● = bambino di età ≥ 3 anni e ≤ 6 anni; ○ = bambino di età > 6 anni. "s" indica i bambini asmatici in trattamento steroideo. Le barre orizzontali rappresentano le mediane.

Il numero dei vasi è aumentato sia nei bambini asmatici [mediana (range), 207 (25-377) vs 81 (0-260) vasi/mm²; p=0.03], sia nei bambini atopici non-asmatici [200 (0-588) vs 81 (0-260) vasi/mm²; p=0.03] rispetto ai bambini di controllo (Figura 8A). Anche la percentuale di area occupata dai vasi è aumentata sia nei bambini asmatici [1.1 (0.1-4.7) vs 0.5 (0-1.8) %; p=0.03] sia nei bambini atopici non-asmatici [1.0 (0.1-6.0) vs 0.5 (0-1.8) %; p=0.06] rispetto ai bambini di controllo (Figura 8B). L'area media dei vasi invece è simile nei tre gruppi di bambini.

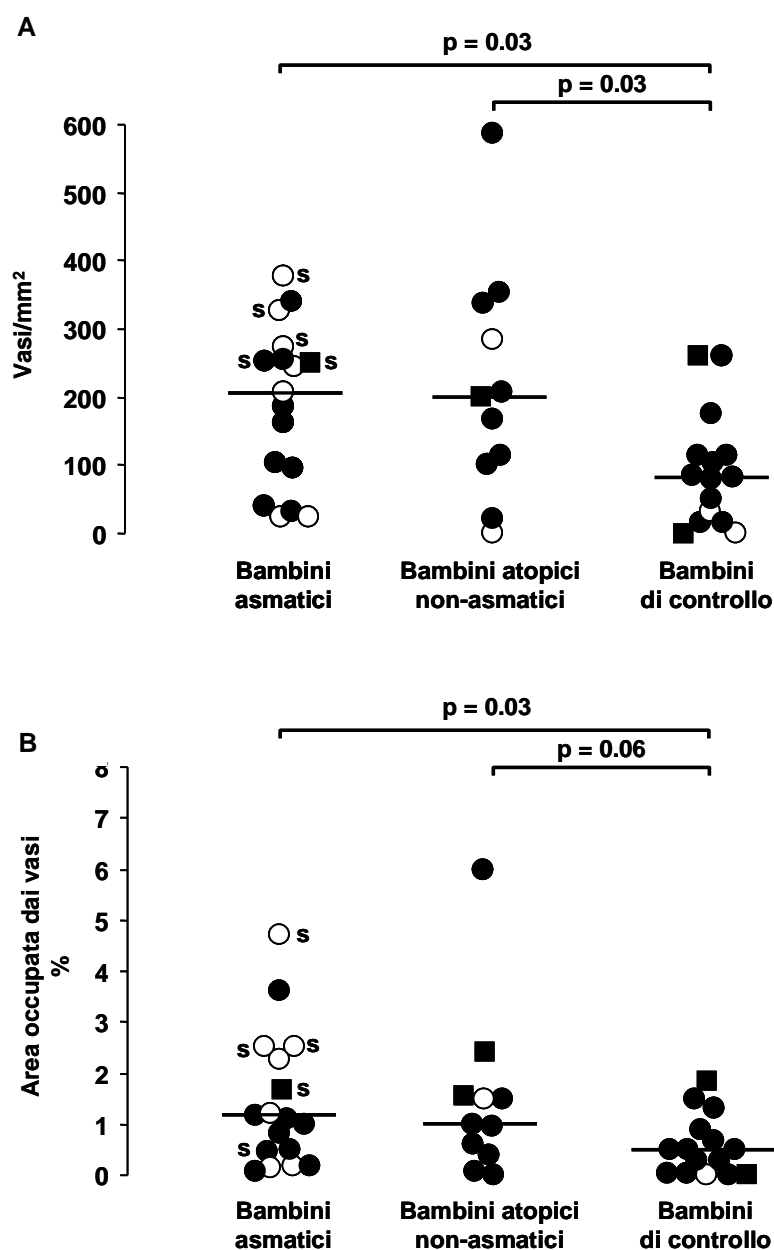


Figura 8. Valori individuali del numero di vasi (A) e dell'area occupata dai vasi nella sottomucosa (B) nei tre gruppi di bambini esaminati. ■ = bambino di età < 3 anni; ● = bambino di età ≥ 3 anni e ≤ 6 anni; ○ = bambino di età > 6 anni. Le lettere "s" indicano i bambini asmatici in trattamento steroideo. Le barre orizzontali rappresentano le mediane.

Non sono state evidenziate differenze significative nel numero di vasi VEGF⁺ tra bambini asmatici, atopici non-asmatici e bambini di controllo. Inoltre, l'espressione del VEGF nell'epitelio intatto e nell'epitelio distrutto (dove erano presenti solo cellule basali) è simile nei tre gruppi di soggetti.

Per quanto riguarda la quantificazione delle cellule infiammatorie, gli eosinofili risultano aumentati solo nei bambini asmatici rispetto ai bambini di controllo [mediana (range), 38 (8-216) vs 8 (0-845) cell/mm²; p=0.0002]. Tra i tre gruppi di soggetti non si sono evidenziate differenze significative nella presenza delle altre cellule infiammatorie esaminate: granulociti neutrofili, macrofagi, mastociti e linfociti T CD4⁺. (*Tabella 4*).

La desquamazione epiteliale, l'ispessimento della membrana basale, l'aumento dei vasi e degli eosinofili nella sottomucosa nelle vie aeree dei bambini asmatici sono rappresentate in *Figura 9*.

Tabella 4. Conte cellulari nella sottomucosa

	BAMBINI ASMATICI	BAMBINI ATOPICI	BAMBINI DI CONTROLLO
EOSINOFILI	38 (8-216)*	28 (0-207) [§]	8 (0-845)
LINFOCITI T CD4	135 (0-1191)	334 (85-662)	173 (0-524)
MACROFAGI	77 (0-225)	145 (19-345)	62 (0-535)
NEUTROFILI	100 (0-322)	127 (14-507)	92 (0-222)
MASTOCITI	56 (0-282)	100 (0-394)	73 (6-322)

I valori sono espressi come mediana (range)

* p = 0.0002 vs bambini di controllo

[§] p= 0.008 vs bambini di controllo

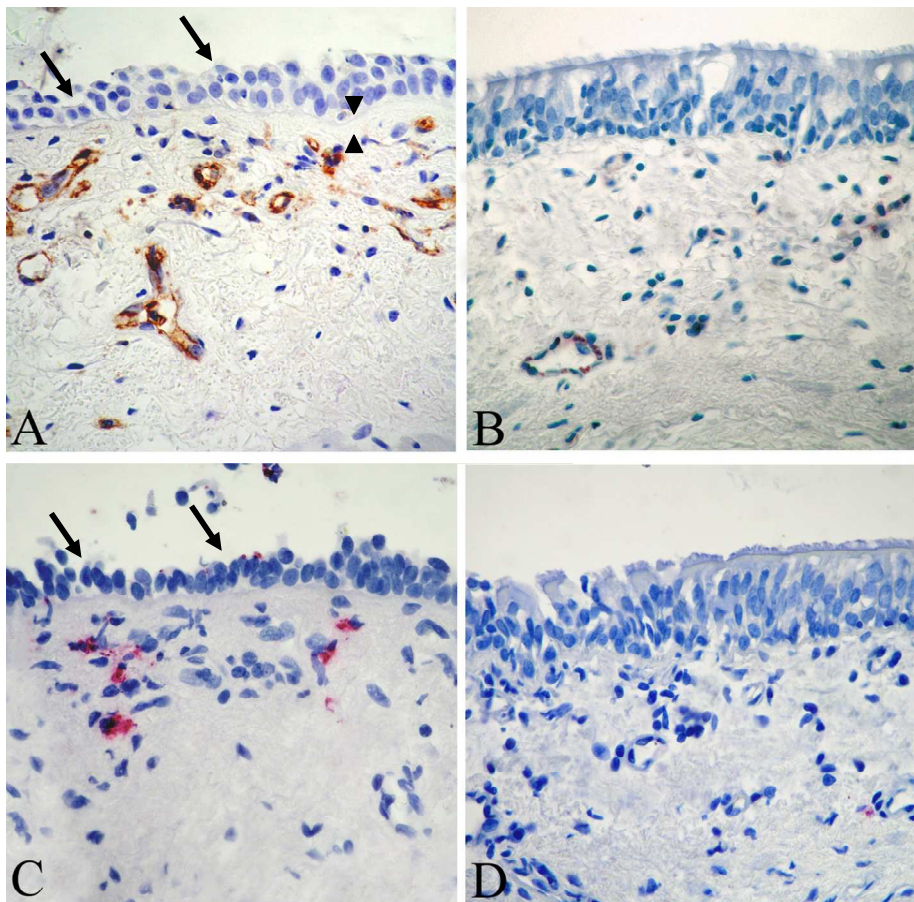


Figura 9. Sezioni di biopsie bronchiali di un bambino asmatico (A e C) e di un bambino di controllo (B e D). Le frecce indicano la desquamazione epiteliale (A e C) mentre le teste di freccia indicano l'ispessimento della membrana basale (A). I vasi (A, in marrone) e gli eosinofili (C, in rosso) sono aumentati nel bambino asmatico rispetto al bambino di controllo. Colorazione immunistochimica con anticorpo monoclonale anti-CD31 (A e B) e anti-EG2 (C e D). Ingrandimento originale 630X.

Per valutare se le alterazioni istopatologiche siano già presenti in età prescolare, è stata condotta una ulteriore analisi considerando solo i bambini di età inferiore ai 6 anni. I risultati dimostrano che i bambini asmatici di età inferiore ai 6 anni (n=10) presentano un aumento della desquamazione epiteliale, dello spessore della membrana basale e del numero di eosinofili rispetto ai bambini di controllo di pari età (n=13). I vasi nella sottomucosa sono aumentati nei bambini asmatici sebbene la differenza non raggiunga la significatività statistica (*Tabella 5*).

Quando sono stati confrontati i bambini asmatici di età inferiore a 6 anni e i bambini asmatici di età superiore a 6 anni non sono state

riscontrate differenze significative per quanto riguarda la percentuale di epitelio distrutto, il numero di vasi ed il numero di eosinofili nella sottomucosa. Lo spessore della membrana basale invece era aumentato nei bambini di età superiore a 6 anni rispetto ai bambini di età inferiore a 6 anni [5.2 (4.1-6.2) vs 4.1 (2.5-5.3) μm , $p=0.03$].

Tabella 5. Alterazioni strutturali nei bambini asmatici e nei bambini di controllo di età inferiore a 6 anni.

	BAMBINI ASMATICI ≤ 6 ANNI	BAMBINI DI CONTROLLO ≤ 6 ANNI	VALORI DI P
DESQUAMAZIONE EPITELIALE (%)	53(12-100)	29 (0-100)	0.05
SPESSORE MEMBRANA BASALE (μm)	4.1 (2.5-5.3)	2.7 (2.0-3.8)	0.004
VASI/ mm^2	174 (31-339)	85 (0-260)	NS
EOSINOFILI/ mm^2	33 (8-90)	7 (0-845)	0.004

I valori sono espressi come mediana (range); NS = non significativo.

Infine, considerando tutti i bambini insieme i valori di FEV_1 correlano inversamente sia con il numero di vasi nella sottomucosa ($r=-0.43$; $p=0.046$) sia con l'area occupata dai vasi ($r=-0.47$; $p=0,04$). Quest'ultima correlazione rimane significativa anche escludendo dall'analisi i bambini di controllo ($r=-0.6$; $p=0.01$). Inoltre, il numero di eosinofili nella sottomucosa correla positivamente sia con lo spessore della membrana basale ($r=0.36$; $p=0.02$), sia con il grado di desquamazione epiteliale ($r=0.4$; $p=0.01$). Quest'ultima correlazione rimane significativa anche escludendo dall'analisi i bambini di controllo ($r=0.38$; $p=0.05$). Non sono state rilevate altre correlazioni significative tra misurazioni morfometriche e dati funzionali.

DISCUSSIONE

Questo studio ha dimostrato che la desquamazione epiteliale, l'ispessimento della membrana basale, l'angiogenesi e l'infiltrazione eosinofila, che sono alterazioni anatomico-patologiche caratteristiche dall'asma nell'adulto, sono presenti già nei bambini con asma lieve/moderato.

La desquamazione epiteliale, è una caratteristica tipica dell'asma dell'adulto che non era mai stata studiata nelle biopsie bronchiali dei bambini asmatici. Fino ad ora, infatti, erano state riportate solo evidenze indirette di danno epiteliale nei bambini. Marguet e collaboratori hanno osservato un'aumentata percentuale di cellule epiteliali nel lavaggio broncoalveolare di bambini asmatici rispetto a bambini di controllo [109] mentre, Fedorov e collaboratori, nelle biopsie bronchiali, hanno riportato un'aumentata espressione del recettore per il fattore di crescita epiteliale (EGFR) [100]. Poiché l'EGFR viene espresso in risposta ad uno stimolo dannoso, gli autori hanno ipotizzato che nei bambini asmatici sia presente un danno epiteliale. Nello stesso studio è stato osservato, inoltre, che l'aumentata espressione di EGFR era associata ad una ridotta espressione del marker di proliferazione cellulare Ki67, indicando una ridotta capacità rigenerativa dell'epitelio. Gli autori hanno quindi ipotizzato che l'epitelio danneggiato dei bambini asmatici non sia in grado di ripararsi in modo adeguato.

Il presente studio, che per la prima volta dimostra direttamente la presenza di desquamazione epiteliale nei bambini asmatici, conferma ed estende le osservazioni precedenti. È necessario tuttavia puntualizzare che la presenza di desquamazione epiteliale nell'asma è una questione tuttora dibattuta. Infatti, alcuni autori considerano la desquamazione epiteliale un artefatto dovuto alla processazione del campione bioptico [134]. Poiché in questo studio, le biopsie bronchiali dei tre gruppi di bambini sono state processate con le stesse tecniche, è alquanto improbabile che la desquamazione epiteliale osservata solo nei bambini

asmatici sia un artefatto dovuto alle procedure di processazione. Le osservazioni, invece, ci inducono ad ipotizzare che nei bambini asmatici vi sia una maggiore fragilità epiteliale e che questa possa svolgere un ruolo importante nella patogenesi dell'asma [84,95]. L'epitelio danneggiato può infatti promuovere sia il processo infiammatorio che il rimodellamento delle vie aeree attraverso il rilascio di fattori di crescita, fattori mitogeni, e proinfiammatori che inducono la proliferazione delle cellule muscolari, l'angiogenesi e la deposizione di collagene che porta ad ispessimento della membrana basale [96]. La nostra osservazione che nei bambini asmatici, la desquamazione epiteliale è associata all'ispessimento della membrana basale e all'aumento della vascolarizzazione conferma l'ipotesi che un'alterata interazione tra cellule epiteliali danneggiate e cellule mesenchimali (ovvero un anomalo funzionamento dell'unità epitelio-mesenchimale (EMTU)) abbia un ruolo fondamentale nell'asma bronchiale già nei bambini con asma lieve/moderato [96].

Un ispessimento della membrana basale, come quello osservato in questo studio, è una caratteristica fondamentale dell'asma, descritta da lungo tempo nell'adulto e riportata recentemente anche in altri studi su bambini asmatici [99,135]. In questi studi tuttavia, l'analisi è stata eseguita in modo qualitativo (e non quantitativo) e non sono stati inclusi bambini di controllo non-asmatici. Più recentemente, Payne e collaboratori [99,136] hanno confrontato biopsie bronchiali di bambini asmatici con biopsie bronchiali di bambini di controllo ed hanno dimostrato che i bambini con asma presentavano un ispessimento della membrana basale simile a quello descritto negli asmatici adulti. In questi studi tuttavia, sono stati esaminati solo bambini con asma grave. Fedorov e collaboratori hanno esteso queste osservazioni dimostrando che un ispessimento della membrana basale è presente non solo nei bambini con asma grave, ma anche in quelli con asma moderato [100]. I risultati di questa tesi sono in accordo con uno studio precedente [101] che ha dimostrato che un ispessimento della membrana basale è presente anche nei bambini con asma lieve. Tutte queste osservazioni suggeriscono che l'ispessimento

della membrana basale sia un evento precoce presente in tutti gli stadi di gravità della malattia.

Il presente studio mostra per la prima volta che nei bambini con asma è presente un'aumentata vascolarizzazione della parete delle vie aeree che rispecchia le osservazioni riscontrate nell'adulto. Studi sull'adulto hanno infatti evidenziato un aumento della vascolarizzazione nelle vie aeree prossimali e periferiche di soggetti con asma lieve [86-89]. La nostra osservazione di aumento del numero di vasi nei bambini asmatici suggerisce che la formazione di nuovi vasi o neoangiogenesi sia una componente precoce ed importante del rimodellamento delle vie aeree nell'asma. Come puntualizzato da Li e Wilson [98], l'aumento del numero di vasi può essere dovuto non solo alla formazione di vasi ex-novo ma anche all'allungamento di vasi preesistenti che ripiegandosi potrebbero attraversare più volte il piano di sezione. In entrambi i casi l'aumento della densità dei vasi è dovuto ad una risposta vascolare a stimoli proliferativi. Numerosi fattori angiogenetici come ad esempio il fattore di crescita VEGF possono contribuire a tale risposta. Tuttavia nel nostro studio, l'espressione di VEGF non era aumentata nei vasi dei bambini asmatici facendo supporre che la neoangiogenesi nei bambini con asma lieve/moderato non sia VEGF dipendente, ma sia mediata da altri fattori angiogenetici che andranno studiati.

Sebbene il significato funzionale delle alterazioni vascolari nell'asma non sia ancora completamente chiaro è ipotizzabile che tali alterazioni abbiano un ruolo nella iperreattività bronchiale. È stato dimostrato che un aumento del numero di vasi può contribuire all'ispessimento della parete delle vie aeree, causando un notevole restringimento del lume bronchiale quando avviene la contrazione del muscolo liscio [92]. Le alterazioni vascolari possono contribuire alla broncoostruzione anche in modo indiretto: l'edema associato alla proliferazione dei vasi può contribuire sia al restringimento delle vie aeree che al danno subepiteliale tipico dell'asma [87]. È interessante sottolineare che nel nostro studio abbiamo osservato una correlazione negativa tra il numero di vasi nella

sottomucosa e i valori di VEMS. Anche se siamo consapevoli che le correlazioni non indicano una relazione causa-effetto, la nostra osservazione suggerisce che l'angiogenesi possa avere un ruolo nello sviluppo delle alterazioni funzionali nell'asma.

I vasi, infine, possono agire da porta d'entrata per le cellule infiammatorie che contribuiscono all'infiammazione cronica. Tale ipotesi è sostenuta dall'osservazione che nel nostro studio, l'aumento del numero dei vasi nei bambini asmatici è associato ad eosinofilia.

La presenza di eosinofilia nelle vie aeree di bambini con asma è in accordo con studi precedenti che hanno dimostrato un'importante eosinofilia nelle biopsie endobronchiali, nei reperti autoptici [98] e nell'espettorato di bambini asmatici [101]. I nostri risultati contrastano invece con i risultati di altri studi che non hanno evidenziato un incremento del numero di eosinofili nelle biopsie di bambini asmatici [100,104]. Tuttavia questi studi erano focalizzati su bambini con asma grave in terapia con dosi elevate di corticosteroidi, e questa terapia può aver ridotto il numero di eosinofili. Al contrario, la maggior parte dei bambini inclusi in questo studio, aveva un asma di grado lieve che non richiedeva il trattamento con corticosteroidi.

Quando abbiamo quantificato le altre cellule infiammatorie (diverse dagli eosinofili) non abbiamo trovato differenze significative tra i tre gruppi di bambini esaminati. Questo risultato è in accordo con studi precedenti condotti sia su bambini [101,104] che su soggetti adulti con asma. Infatti, sebbene mastociti, macrofagi, neutrofili e linfociti T CD4 siano coinvolti nella patogenesi dell'asma bronchiale, il loro aumento nelle vie aeree di pazienti con asma non è sistematicamente documentato in letteratura [105,106].

La relazione temporale tra infiammazione e rimodellamento strutturale delle vie aeree è una questione enormemente dibattuta. La visione tradizionale è che il rimodellamento delle vie aeree dipenda dal precedente sviluppo di un'infiammazione cronica. Questo concetto è stato recentemente messo in dubbio, fino a proporre che il rimodellamento delle

vie aeree sia il primo evento nella patogenesi dell'asma e che possa verificarsi anche in assenza di una significativa infiammazione [96]. Tuttavia come abbiamo precedentemente riportato, tutti gli studi che hanno evidenziato assenza di infiammazione nelle vie aeree erano focalizzati su bambini con asma grave in trattamento con steroidi. Questo trattamento può aver influito pesantemente sui risultati riducendo il numero di eosinofili. Il nostro studio focalizzato su bambini con asma lieve, dei quali meno di un terzo erano in terapia steroidea, ha mostrato che il rimodellamento delle vie aeree era associato invece ad eosinofilia. Sulla base di queste osservazioni possiamo ipotizzare che sia l'infiammazione che il rimodellamento sono fenomeni precoci nella storia naturale dell'asma bronchiale, strettamente dipendenti l'uno dall'altro e che contribuiscono entrambi alla patogenesi della malattia.

È interessante notare che alcune alterazioni quali l'ispessimento della membrana basale, l'angiogenesi e l'eosinofilia non sono presenti solo nei bambini asmatici ma anche nei bambini atopici non-asmatici. Queste osservazioni sui bambini atopici sono coerenti con l'ipotesi emergente che il rimodellamento delle vie aeree e l'infiammazione siano già presenti nei soggetti atopici in assenza di sintomi bronchiali specifici. Questa ipotesi è in accordo con precedenti osservazioni di un ispessimento della membrana basale in adulti atopici non-asmatici. D'altra parte, poiché la sensibilizzazione allergica precoce gioca un ruolo importante nello sviluppo dell'asma nei primi anni di vita, è possibile che alcuni dei bambini atopici inclusi in questo studio sviluppino asma in seguito. In questo contesto possiamo ipotizzare che le alterazioni patologiche possano precedere il successivo sviluppo dall'asma [137]. Questa ipotesi è in accordo con l'osservazione di Pohunek [138] e collaboratori che hanno osservato un ispessimento della membrana basale in un gruppo di bambini quattro anni prima che l'asma fosse diagnosticata. Tuttavia, se le modificazioni strutturali delle vie aeree precedano la comparsa dei sintomi di asma è ancora oggetto di dibattito. Infatti, Saglani e collaboratori [139] esaminando bambini di età inferiore ai 2 anni, con sintomi di respiro

sibilante e tosse, talvolta associati ad ostruzione reversibile delle vie aeree, hanno dimostrato che, in questi bambini, i sintomi non erano associati all'ispessimento della membrana basale.

Alla luce di queste osservazioni abbiamo eseguito un'analisi stratificata in base all'età analizzando i bambini di età inferiore a 6 anni ed abbiamo riscontrato che l'eosinofilia, la desquamazione epiteliale e l'ispessimento della membrana basale sono già presenti nel gruppo di bambini in età prescolare (2-6 anni). Tutte queste osservazioni fanno presumere che le alterazioni patologiche, caratteristiche dell'asma bronchiale sono degli eventi precoci nella storia naturale della malattia, che non sono presenti alla nascita, ma che compaiono successivamente, nel periodo prescolare quando il sistema respiratorio e il sistema immunitario stanno completando il loro sviluppo [140].

Un possibile punto debole di questa tesi è che tutti i bambini sono stati sottoposti a broncoscopia per indicazioni cliniche specifiche (polmonite ricorrente, atelettasia, tosse cronica e stridore laringeo) e la presenza di queste condizioni patologiche, in particolare della polmonite, potrebbe aver influenzato i risultati. Tuttavia il fatto che queste condizioni patologiche erano equamente distribuite nei bambini con asma, nei bambini atopici e nei bambini di controllo fa supporre che i risultati ottenuti siano validi.

È importante ribadire che le biopsie prelevate da bambini sottoposti a broncoscopia per indicazioni cliniche diverse dall'asma sono l'unico mezzo per esaminare direttamente le caratteristiche anatomo-patologiche delle vie aeree in bambini con asma lieve, che per ragioni etiche non potrebbero essere esaminati altrimenti.

CONCLUSIONI

Questo studio ha dimostrato che la desquamazione epiteliale, l'ispessimento della membrana basale, l'angiogenesi e l'infiltrazione eosinofilica, che sono alterazioni anatomo-patologiche caratteristiche dall'asma nell'adulto, sono presenti già nei bambini con asma lieve/moderato.

Questi risultati fanno ipotizzare che le alterazioni anatomo-patologiche avvengano precocemente nella storia naturale della malattia e che le alterazioni strutturali si sviluppino parallelamente all'infiammazione e non consequenzialmente ad essa.

Questo studio dimostra inoltre che alcune alterazioni come l'ispessimento della membrana basale, l'angiogenesi e l'infiltrazione eosinofilica sono presenti non solo nei bambini asmatici, ma anche nei bambini atopici non-asmatici. Tali risultati fanno ipotizzare che queste alterazioni anatomo-patologiche possano essere associate all'atopia anche in assenza di sintomi di asma.

STUDIO II

**NON-ATOPIC WHEEZING CHILDREN HAVE THE
AIRWAY PATHOLOGY OF “CLASSIC” ASTHMA**

Submitted

SCOPO DELLO STUDIO

Il sintomo più caratteristico dell'asma bronchiale in età pediatrica è il respiro sibilante che tuttavia può essere associato anche ad altre condizioni cliniche. Uno studio recente ha dimostrato che il 90% dei bambini che presentano respiro sibilante nell'età prescolare, ma che non sviluppano sensibilizzazione atopica, perdono i sintomi entro la pubertà [13]. Al contrario, bambini con respiro sibilante che sviluppano sensibilizzazione ad allergeni perenni sono maggiormente predisposti ad un decorso cronico dell'asma, caratterizzato da sintomi persistenti più gravi, presenza di iperreattività bronchiale ed alterazioni della funzionalità polmonare [13]. Anche se la relazione tra respiro sibilante e atopia nei primi anni di vita è ancora controversa, queste ed altre osservazioni suggeriscono che la sensibilizzazione allergica sia un fattore determinante per il successivo sviluppo di asma persistente. Questa convinzione implica che, nella pratica clinica, i pediatri pongano più facilmente diagnosi di asma nei bambini atopici che non in quelli non-atopici [141].

Sulla base di questi dati ci si può aspettare che le caratteristiche istopatologiche tipiche dell'asma siano presenti solo nei bambini atopici con sintomi di respiro sibilante e non in quelli non-atopici.

L'obiettivo di questo studio è, quindi, indagare le alterazioni istopatologiche caratteristiche dell'asma e i loro meccanismi nelle vie aeree di bambini con respiro sibilante atopici e non-atopici.

A questo scopo nelle biopsie bronchiali di un gruppo di bambini non-atopici con sintomi di asma e di un gruppo di bambini atopici con sintomi di asma, sono stati quantificati:

- l'ispessimento della membrana basale;
- la desquamazione epiteliale;
- l'infiltrato infiammatorio nella sottomucosa, in particolare il numero di eosinofili, linfociti T CD4⁺, macrofagi, neutrofili e mastociti;
- l'espressione dell'IL-4 e IL-5, citochine specifiche derivate dalla linea cellulare Th2;

- l'angiogenesi.

I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti dall'analisi di un gruppo di bambini di controllo asintomatici e non-atopici.

MATERIALI E METODI

SOGGETTI

Per questo studio sono stati esaminati tre gruppi di bambini di età compresa tra i 2 ed i 15 anni, reclutati tra i bambini sottoposti a fibrobroncoscopia per indicazioni cliniche adeguate (perché affetti da una patologia, diversa dall'asma, il cui iter diagnostico, come stabilito dalle linee guida internazionali, prevede l'esecuzione di una broncoscopia [129-131]: 11 bambini non-atopici con sintomi di asma (di età compresa tra i 3 ed i 10 anni), 11 bambini atopici con sintomi di asma (di età compresa tra i 2 ed i 15 anni), 17 bambini di controllo, non-atopici e senza sintomi di asma (dai 2 ai 14 anni).

L'asma e l'atopia sono stati diagnosticati come precedentemente descritto (Studio I, pag. 44).

Tutti i bambini nei tre gruppi sono stati sottoposti agli esami ematochimici di routine, mentre la spirometria è stata eseguita solo nei soggetti in grado di cooperare alla corretta esecuzione del test. I bambini non-atopici con sintomi di asma sono stati sottoposti a fibrobroncoscopia per le seguenti indicazioni: polmonite ricorrente (n=7), stridore laringeo (n=1), tosse cronica (n=3); i bambini atopici per polmonite ricorrente (n=6), stridore laringeo (n=1), tosse cronica (n=4); i bambini di controllo per polmonite ricorrente (n=7), stridore laringeo (n=1), laringomalacia (n=1), o tosse cronica (n=8).

Per evitare la potenziale influenza delle terapie antinfiammatorie nell'analisi morfologica, i bambini trattati con corticosteroidi inalatori o orali sono stati esclusi dallo studio.

Lo studio è stato condotto in accordo con le indicazioni della Dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal comitato etico dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Inoltre i genitori sono stati informati sul protocollo dello studio ed hanno espresso il loro consenso informato alla partecipazione dei bambini.

PROCESSAZIONE ED ANALISI DELLE BIOPSIE BRONCHIALI

I campioni biotici ottenuti sono stati fissati in formaldeide al 4% per 4 ore, quindi disidratati attraverso passaggi successivi in alcool etilico a concentrazioni crescenti, diafanizzati mediante passaggi ripetuti in xilolo, infine inclusi in paraffina. Le biopsie incluse sono state poi tagliate con il microtomo ottenendo sezioni seriali di 5 μm ciascuna che successivamente sono state colorate mediante tecniche istochimiche ed immunostochimiche.

Mediante colorazione istochimica con ematossilina ed eosina sono state quantificate la desquamazione epiteliale e l'ispessimento della membrana basale.

Le tecniche immunostochimiche sono state utilizzate per l'identificazione delle cellule infiammatorie, delle cellule IL-4⁺, delle cellule IL-5⁺, dei vasi presenti nella sottomucosa.

Le cellule infiammatorie sono state evidenziate mediante un anticorpo monoclonale specifico come descritto precedentemente (Studio I, pag. 48).

Le cellule IL-4⁺ e IL-5⁺ sono state identificate con specifici anticorpi anti IL-4 e anti IL-5 umani. Per esporre gli epitopi immunoreattivi le sezioni sono state poste in citrato buffer (pH 6.0) e poste in forno a microonde alla massima potenza per 5 minuti. Dopo essere state raffreddate in acqua, sono state trattate con siero di suino (X0901, Dako) diluito 1:30 per 30 minuti per saturare i siti di legame aspecifici e quindi incubate con l'anticorpo primario anti-IL-4 (500P24, Peprotech) o anti-IL-5 (500P25, Peprotech) diluito rispettivamente 1:100 e 1:600 per tutta la notte a 4°C. Le sezioni sono state poi lavate in tampone trisma-maleato (pH 7.6), asciugate e incubate con IgG biotinilate di suino anti-coniglio (E431, Dako) diluito 1:400 per 30 minuti. Il complesso antigene-anticorpo è stato rilevato con il complesso streptavidina-biotina coniugato con una fosfatasi alcalina (Strept AB complex/AP, K0391, Dako) seguito da colorazione tramite il substrato cromogeno Fast Red (Dako), che evidenzia il legame con antigene mediante una colorazione rossa. Si è poi eseguita una colorazione di contrasto con ematossilina. Le cellule IL-4⁺ e IL-5⁺ sono

state quantificate nella sottomucosa considerando l'area che si estende per 50 μm al di sotto della membrana basale reticolare ed espresse come numero di cellule positive/ mm^2 di sottomucosa esaminata.

L'analisi microscopica è stata condotta con microscopio ottico a luminescenza Olympus BX41 e tutte le misurazioni morfometriche sono state effettuate usando un sistema di analisi di immagine computerizzato (Image Pro Plus, Media Cybernetics, USA). Per evitare influenze nelle letture i casi sono stati codificati e le misurazioni sono state effettuate senza che l'osservatore fosse a conoscenza dei dati clinici.

ANALISI STATISTICA

Sono state eseguite almeno 4 misure ripetute dei parametri morfologici da parte dello stesso osservatore e la variabilità tra le misure è stata stimata con il coefficiente di variazione.

I dati di ciascun gruppo sono stati espressi come media ed errore standard della media (SEM) per i valori parametrici o come mediana e range per i valori non parametrici. Le differenze tra i tre gruppi sono state analizzate usando l'analisi della varianza (ANOVA) per i dati clinici (valori parametrici) e il test di Kruskal-Wallis per i dati istologici (valori non parametrici). Il test U di Mann-Whitney è stato applicato dopo il test di Kruskal-Wallis quando appropriato. I coefficienti di correlazione sono stati calcolati usando il test di Spearman's rank.

Sono stati accettati come significativi valori di probabilità $p < 0.05$.

RISULTATI

DATI CLINICI

Le caratteristiche dei bambini esaminati sono riportate in *Tabella 6*.

I bambini nei tre gruppi avevano un'età simile. I test di funzionalità respiratoria sono stati eseguiti con successo in 6 su 11 bambini non-atopici con sintomi di asma, 5 su 11 bambini atopici con sintomi di asma e 7 su 17 bambini di controllo. Il FEV₁ e l'indice di Tiffenau (FEV₁/FVC) non erano significativamente diversi tra i bambini con sintomi di asma non-atopici e atopici. Tuttavia il FEV₁ era ridotto nei bambini non-atopici con sintomi di asma rispetto ai bambini di controllo. Infine, anche l'età d'inizio dei sintomi di asma era simile nei bambini non-atopici e atopici.

Come indicato nella sezione "metodi" nessuno dei bambini esaminati era in trattamento con corticosteroidi inalatori o orali. Tutti i bambini con polmonite ricorrente (n = 20) sono stati trattati con antibiotici.

La procedura broncoscopica è stata ben tollerata da tutti i bambini e non si sono verificate complicazioni successive.

Tabella 6. Caratteristiche cliniche dei bambini esaminati

	BAMBINI NON-ATOPICI CON SINTOMI DI ASMA	BAMBINI ATOPICI CON SINTOMI DI ASMA	BAMBINI DI CONTROLLO
N° E SESSO (M/F)	3M/5F	7M/4F	7M/7F
ETÀ (ANNI) mediana e range	5 (3-10)	5 (2-15)	4 (2-14)
ETÀ D'INIZIO DEI SINTOMI (ANNI) mediana e range	2.5 (0-8)	2.5 (0.5-14)	-
FEV ₁ (% DEL TERORICO)* media ± SE	83.3±5.2 [§]	95.0±3.3	100.6±3.8
FEV ₁ /FVC (%)* media ± SE	89.3±3.2	92.4±2.6	91.2±2.8

F= femmine; M= maschi; * La funzionalità respiratoria è stata misurata in 6 bambini non-atopici con sintomi di asma, 5 bambini atopici con sintomi di asma e 7 bambini di controllo. [§]p=0.02 vs bambini di controllo.

Le caratteristiche dei bambini atopici con sintomi asmatici sono riportate in *Tabella 7*.

Tabella 7. Stato atopico nei bambini atopici non-asmatici

BAMBINO ATOPICO CON SINTOMI DI ASMA	ETÀ (anni)	IgE TOTALI (PRIST) U/ml	IgE SPECIFICHE (RAST +)
1	10	1029	Acari della polvere, forfora di gatto
2	5	1011	-
3	5	841	Acari della polvere, Alternaria alternata, Pollini
4	6	163	Acari della polvere
5	5	124	Alternaria alternata
6	15	4335	Acari della polvere, Alternaria alternata, Pollini
7	4	1023	Alternaria alternata
8	2	175	-
9	4	141	-
10	3	71	Ovalbumina
11	4	130	-

Tutti i valori di PRIST erano sopra il limite della norma (in relazione all'età).

DATI ISTOLOGICI

L'analisi della varianza con il test di Kruskal-Wallis ha dimostrato che i tre gruppi sono diversi per il grado di desquamazione epiteliale ($p=0.02$), l'ispessimento della membrana basale ($p=0.0003$), per il numero di vasi ($p=0.04$) e per il numero di eosinofili ($p=0.004$), di cellule IL-4⁺ ($p=0.0005$) e di cellule IL-5⁺ ($p=0.04$) nella sottomucosa.

Infatti sia i bambini non-atopici che quelli atopici con sintomi di asma presentano l'ispessimento della membrana basale [mediana (range) 5.8 (2.6-11.5) vs 2.7 (1.8-4.9) μm ; $p=0.002$ e 5.5 (2.5-7.4) vs 2.7 (1.8-4.9) μm ; $p=0.0005$] e un aumentato numero di eosinofili [28 (0-620) vs 0 (0-845) cellule/ mm^2 ; $p=0.003$ e 47 (0-155) vs 0 (0-845) cellule/ mm^2 ; $p=0.01$]

rispetto ai bambini di controllo (*Figura 10*). Nessuna differenza significativa è stata osservata nel numero delle altre cellule infiammatorie (linfociti T CD4, macrofagi, neutrofili, mastociti) tra i tre gruppi di bambini esaminati (*Tabella 8*).

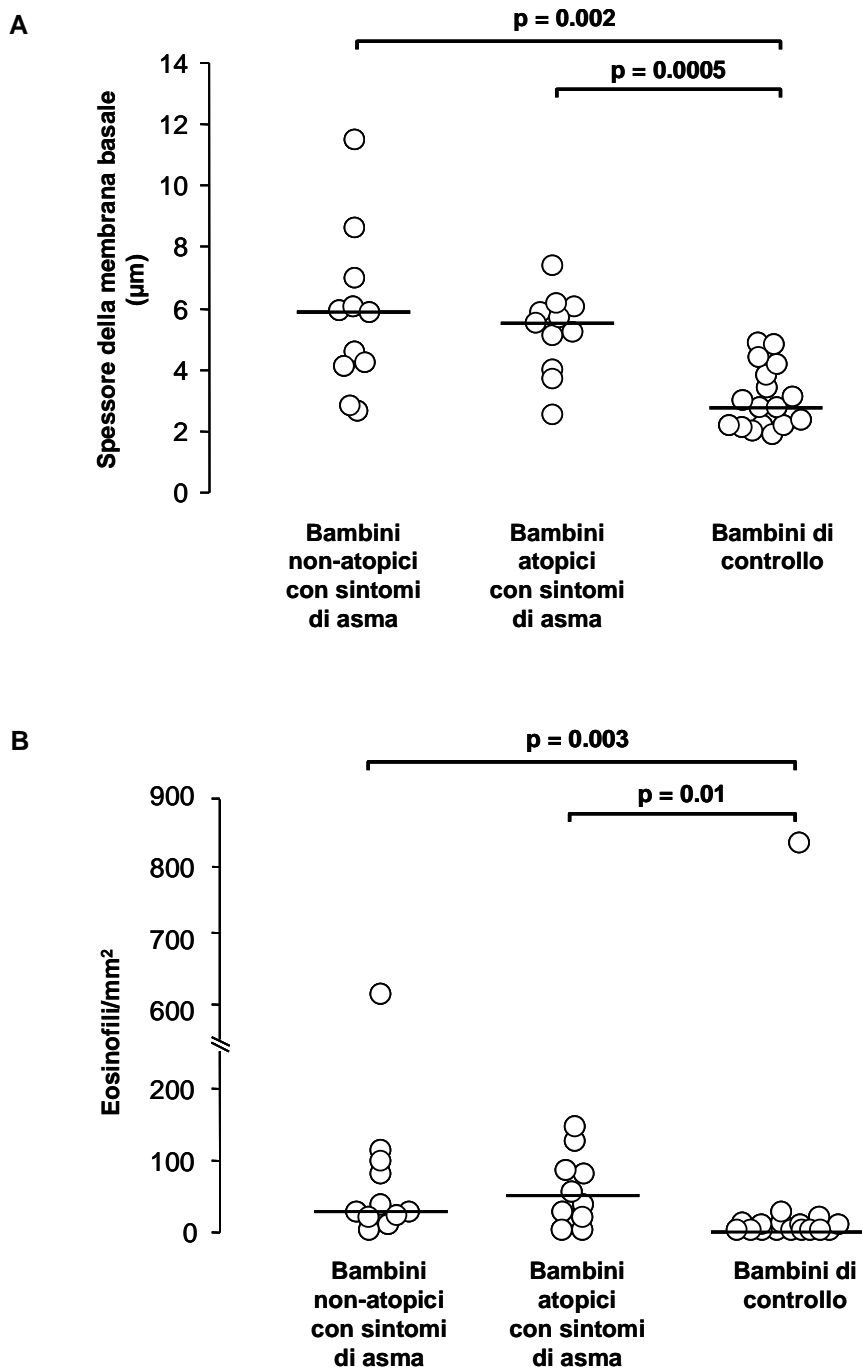


Figura 10. Valori individuali dell'ispessimento della membrana basale (A) e del numero di eosinofili (B) nei tre gruppi di bambini esaminati. Le barre orizzontali rappresentano le mediane.

Tabella 8. Conte cellulari nella sottomucosa

	BAMBINI NON-ATOPICI CON SINTOMI DI ASMA	BAMBINI ATOPICI CON SINTOMI DI ASMA	BAMBINI DI CONTROLLO
EOSINOFILI	28 (0-620)*	47 (0-155) [§]	8 (0-845)
LINFOCITI T CD4	230 (0-620)	127 (0-1191)	189 (0-524)
MACROFAGI	81 (0-169)	40 (0-117)	49 (0-535)
NEUTROFILI	127 (34-432)	94 (0-268)	123 (0-222)
MASTOCITI	113 (42-1239)	113 (0-191)	82 (0-282)

I valori sono espressi come mediana (range); i valori sono espressi come cellule/mm².

* p = 0.003 vs bambini di controllo.

[§] p = 0.01 vs bambini di controllo.

Per chiarire i meccanismi patogenetici alla base di queste alterazioni è stata valutata l'espressione di IL-4 e IL-5.

I risultati hanno dimostrato che i bambini non-atopici con sintomi di asma presentano un'aumentata espressione di IL-4 [mediana (range) 127 (14-220) vs 42 (8-141) cellule/mm²; p=0.004] e di IL-5 [337 (125-834) vs 304 (0-659) cellule/mm²; p=0.05] rispetto ai bambini di controllo. L'espressione di IL-4 e IL-5 è aumentata anche nei bambini atopici con sintomi di asma rispetto al gruppo di controllo [rispettivamente 144 (49-259) vs 42 (8-141) cellule/mm²; p=0.0004 e 366 (296-920) vs 304 (0-659) cellule/mm²; p=0.02] (Figure 11-12).

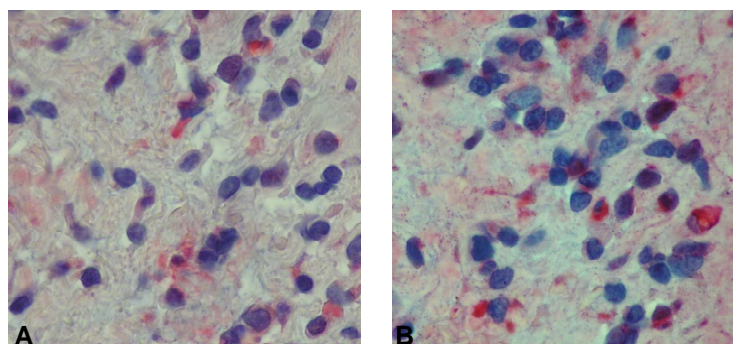


Figura 11. Microfotografia raffigurante cellule IL-4⁺ (A) e IL-5⁺ (B) nella sottomucosa di una sezione di biopsia bronchiale di un bambino con sintomi di asma. Ingrandimento originale 630 X.

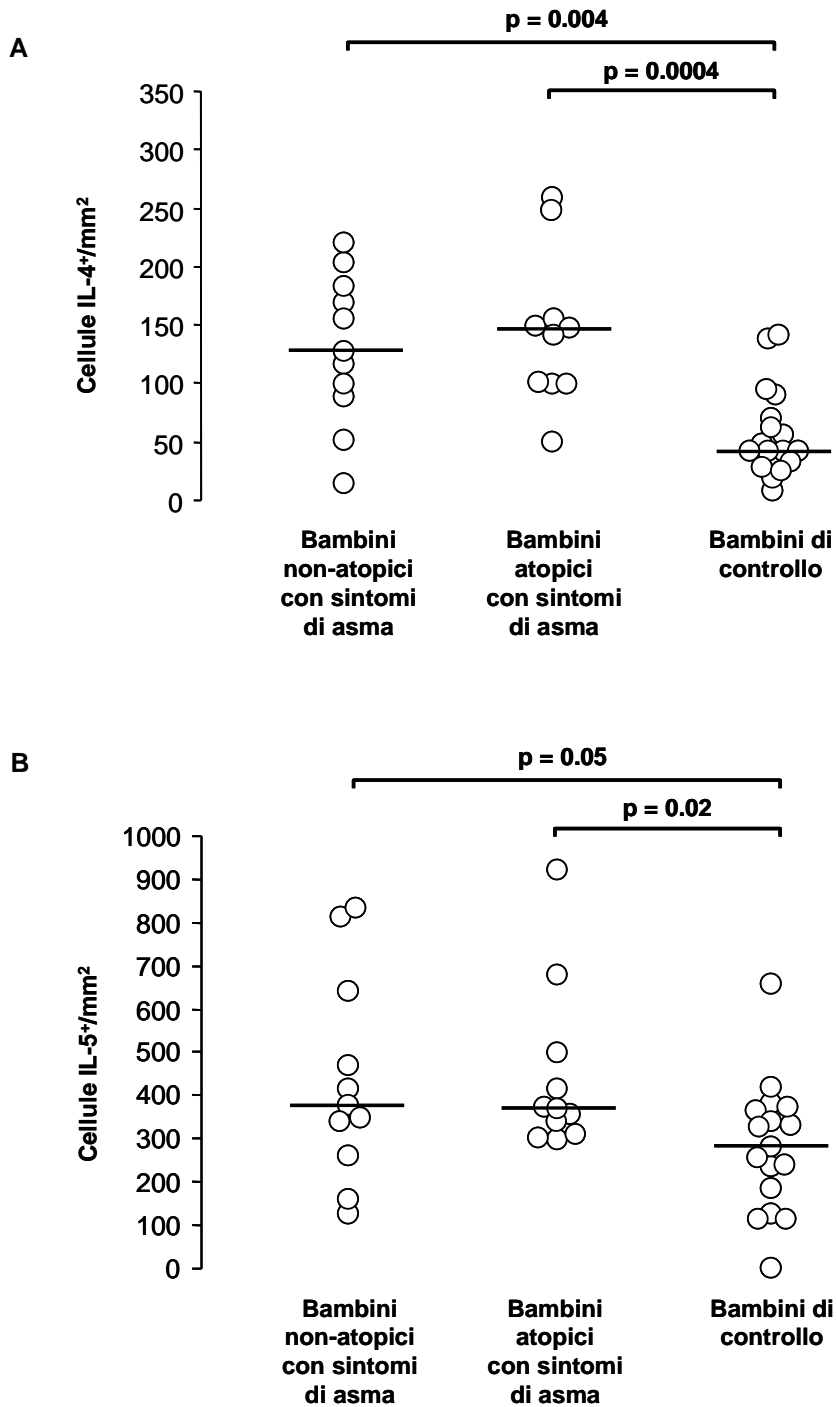


Figura 12. Valori individuali del numero di cellule IL-4⁺ (A) e IL-5⁺ (B) nei tre gruppi di bambini esaminati. Le barre orizzontali rappresentano le mediane.

L'analisi di altre alterazioni strutturali tipiche dell'asma ha evidenziato che sia i bambini non-atopici con sintomi di asma che quelli atopici con sintomi di asma presentano un'aumentata distruzione epiteliale rispetto ai bambini di controllo [(52.8 (12.5-100) vs 29.0 (0-100) %; $p=0.05$ e 62.2 (26-100) vs 29.0 (0-100) %; $p=0.01$]. Inoltre i bambini non-atopici con sintomi di asma hanno un aumentato numero di vasi rispetto al gruppo di controllo [(186 (25-339) vs 85 (0-260) vasi/mm²; $p=0.01$] (Figure 13,14).

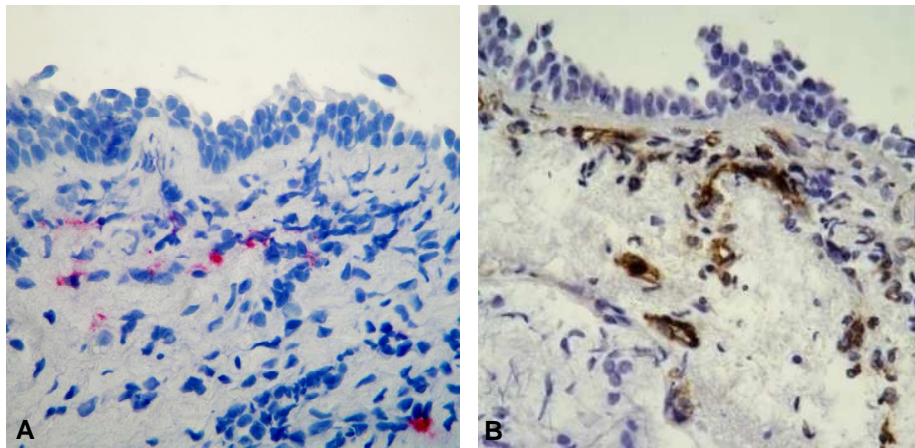


Figura 13. Sezioni di biopsia bronchiale di un bambino non-atopico con sintomi di asma. Colorazione immunistochemica con anticorpo monoclonale anti-EG2 per evidenziare gli eosinofili (A, in rosso) e anti-CD31 per evidenziare i vasi (B, in marrone). Sono visibili la desquamazione epiteliale e l'ispessimento della membrana basale (A e B), l'aumento del numero di eosinofili (A) e del numero di vasi (B) nella sottomucosa. Ingrandimento originale 630 X.

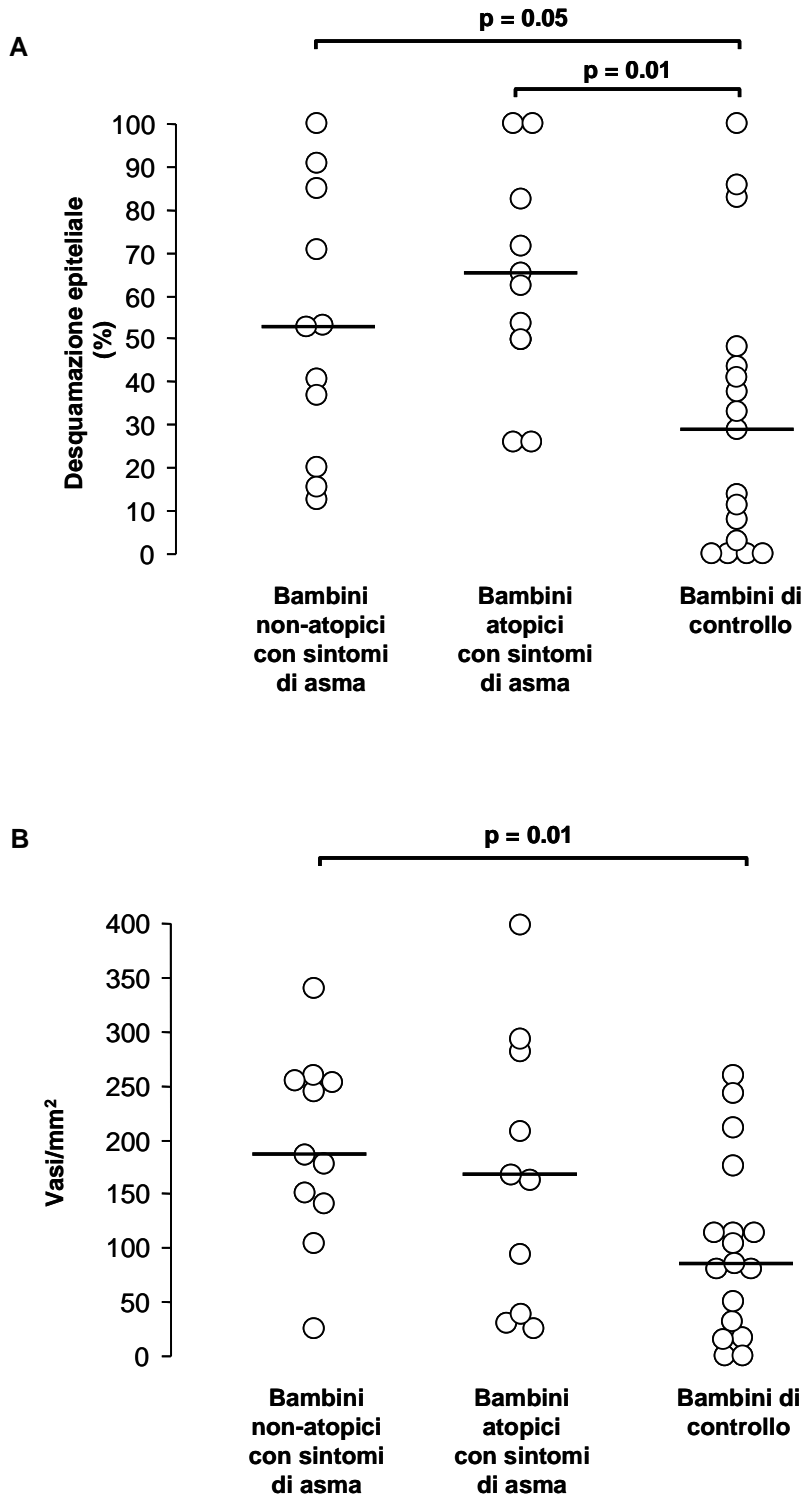


Figura 14. Valori individuali della desquamazione epiteliale (A) e del numero di vasi nella sottomucosa (B) nei tre gruppi di bambini esaminati. Le barre orizzontali rappresentano le mediane.

Per valutare se le alterazioni istopatologiche fossero già presenti in età prescolare, è stata condotta una ulteriore analisi considerando solo i bambini di età inferiore ai 6 anni. I bambini non-atopici con sintomi di asma di età inferiore ai 6 anni (n=7) presentano ispessimento della membrana basale [mediana (range); 4.5 (2.6-8.6) vs 2.7 (1.9-4.9) μm ; p=0.02], un aumentato numero di eosinofili [28 (8-103) vs 0 (0-845) cellule/ mm^2 ; p=0.007] e di vasi [186 (103-339) vs 94 (0-260) vasi/ mm^2 ; p=0.01] nella sottomucosa rispetto ai bambini di controllo della stessa età (n=14). Infine l'espressione di IL-4 è aumentata nei bambini non-atopici con sintomi di asma rispetto ai bambini di controllo anche se la differenza non raggiunge la significatività statistica [99 (14-183) vs 45(19-137) cellule/ mm^2 ; p=0.07]. Tutte queste caratteristiche patologiche presenti nei bambini non-atopici sono simili a quelle presenti nei bambini atopici con sintomi di asma di età inferiore a 6 anni (n= 9).

Considerando i bambini tutti insieme, l'espressione di IL-4 correla positivamente con lo spessore della membrana basale (p=0.003, r=0.49), con il grado di desquamazione epiteliale (p=0.05, r=0.31) e con l'espressione di IL-5 (p=0.04, r=0.33). Infine, il numero di eosinofili correla positivamente con l'espressione di IL-5 (p=0.005, r=0.47) e con il grado di desquamazione epiteliale (p=0.04, r=0.35).

DISCUSSIONE

Lo scopo di questo studio è di indagare le alterazioni istopatologiche caratteristiche dell'asma e i loro meccanismi nelle vie aeree di bambini con respiro sibilante non-atopici e atopici. I bambini non-atopici con sintomi di asma, infatti, sono spesso considerati come soggetti con sintomatologia transitoria e non come veri e propri asmatici, mentre i bambini atopici con sintomi di asma sono considerati con sintomatologia persistente destinata a diventare asma "classico". Inaspettatamente, l'analisi delle biopsie bronchiali ha evidenziato che l'ispessimento della membrana basale e l'eosinofilia, considerate caratteristiche tipiche dell'asma, sono presenti sia nei bambini non-atopici che nei bambini atopici con sintomi di asma. In entrambi i fenotipi di bambini con sintomi di asma queste alterazioni erano associate ad un aumentata espressione di IL-4 e IL-5. Questi risultati suggeriscono che, quando in età pediatrica sono presenti i sintomi caratteristici dell'asma, questi sono associati con il quadro patogenetico della malattia indipendentemente dalla presenza di atopia.

Il respiro sibilante è l'espressione clinica più frequente dell'asma bronchiale, sebbene sia ampiamente riconosciuto che si tratta di un segno non-specifico associato all'ostruzione delle vie aeree. La presenza di molteplici condizioni che, durante l'infanzia, possono associarsi all'ostruzione delle basse vie aeree e quindi alla presenza di sintomi di respiro sibilante, complica la nostra comprensione della patogenesi della malattia [111]. Il respiro sibilante è anche l'unico segno a cui possiamo far riferimento per la diagnosi di asma nei bambini quando sono troppo piccoli per essere sottoposti ai test di funzionalità polmonare. Perciò, chiarire la natura del respiro sibilante è una questione cruciale per comprendere la storia naturale dell'asma. Numerosi studi hanno affrontato questa questione dal punto di vista epidemiologico; questo studio ha cercato di contribuire con un approccio anatomo-patologico.

Gli studi epidemiologici hanno descritto molteplici fenotipi di respiro sibilante nell'infanzia tra i quali il respiro sibilante transitorio precoce, che

si risolve entro i tre anni di età, il respiro sibilante non associato ad atopia, che si risolve entro i 13 anni di età, infine il respiro sibilante associato ad atopia che persiste nella vita adulta [37,111,115,116]. Un recente studio ha evidenziato che il respiro sibilante presente nell'infanzia persiste dopo l'età scolare, risultando nell'asma "classico" solo quando associato a precoce sensibilizzazione allergica [13].

Date queste premesse, ci si aspetterebbe che i bambini con sintomi di asma atopici e non-atopici avessero un quadro anatomopatologico completamente differente. Sorprendentemente, dai risultati di questo studio è emerso invece che tutti gli aspetti istopatologici caratteristici dell'asma "classico" sono presenti in entrambi i fenotipi di respiro sibilante.

L'osservazione che, nei bambini asmatici, l'ispessimento della membrana basale era associato alla desquamazione epiteliale e all'aumento della vascolarizzazione conferma l'ipotesi che un'alterata interazione tra cellule epiteliali danneggiate e cellule mesenchimali (ovvero un anomalo funzionamento dell'unità epitelio-mesenchimale (EMTU)) abbia un ruolo fondamentale nell'asma bronchiale già nei bambini con asma lieve. Infatti, l'esposizione ad allergeni può danneggiare l'epitelio e scatenare tutti gli eventi che conducono al rimodellamento delle vie aeree mediante il rilascio di fattori mitotici e fibrogenici, che a loro volta possono promuovere l'angiogenesi e l'ispessimento della membrana basale [95,96]. È particolarmente rilevante che tutti questi eventi cellulari risultino attivati anche nei bambini con sintomi di asma senza atopia, nei quali non può essere identificata una risposta IgE specifica verso allergeni e gli episodi di respiro sibilante si pensa siano scatenati principalmente da infezioni virali [121].

La natura di una risposta immune dipende dal patrimonio genetico dell'individuo, dalla concomitante esposizione ambientale (allergeni e agenti infettivi) e dal grado di maturazione dei sistemi respiratorio ed immunitario [35]. L'esposizione precoce ad agenti infettivi, combinata con una risposta immune innata deficitaria, caratterizzata da alterata produzione di IFN- γ e IFN- λ , si pensa giochi un ruolo importante nella

patogenesi dell'asma [35,142]. Questo effetto può aggiungersi ad altri fattori, quali il polimorfismo dei geni codificanti per IL-4 ed IL-13, risultando in una predominanza della risposta di tipo Th-2, che a sua volta può influenzare il rimodellamento delle vie aeree. Pertanto, l'esposizione ambientale, la maturazione del sistema immunitario e lo sviluppo delle vie aeree nei primi anni di vita sono strettamente implicate nella successiva persistenza dei sintomi. In questo studio, si osserva sia nei bambini atopici che non-atopici, l'infiltrazione della mucosa bronchiale non solo di eosinofili, ma anche di cellule che esprimono le citochine IL-4 e IL-5. Tradizionalmente, si pensava che l'IL-4 fosse implicata nella patogenesi dello stato atopico, promuovendo nei linfociti B lo switch verso l'isotipo IgE [143]. In questo contesto, è stato osservato che altri stimoli in aggiunta alla sensibilizzazione allergica, come le infezioni virali, possono scatenare risposte infiammatorie Th2-mediate [144].

È interessante sottolineare che Humbert e collaboratori hanno dimostrato che anche negli asmatici adulti, l'espressione di IL-4 e di IL-5 aumenta non solo nei soggetti atopici ma anche in quelli non-atopici [145]. Lo stesso gruppo, in uno studio più recente, ha inoltre riportato che l'aumento della sintesi di IgE, IL-4 dipendente, considerata caratteristica dell'asma atopico, può essere osservata anche nell'asma non-atopico. Secondo gli autori, queste osservazioni indicano che i due fenotipi di asma, pur mostrando diverse caratteristiche cliniche sono caratterizzate da meccanismi immunopatologici simili [52]. Negli adulti, l'evidenza che i soggetti asmatici atopici e non-atopici hanno il medesimo quadro istopatologico è convincente al punto tale che i due tradizionali fenotipi di asma intrinseco ed estrinseco sono attualmente considerati una singola patologia [52].

I risultati di questo studio confermano dati di studi precedenti su bambini con asma lieve/moderato (non in terapia steroidea) [101,102], che hanno dimostrato che il rimodellamento delle vie aeree era associato ad un aumento del numero di eosinofili. Sulla base di queste osservazioni si può ipotizzare che sia l'infiammazione che il rimodellamento siano

fenomeni precoci nella storia naturale dell'asma bronchiale, strettamente dipendenti l'uno dall'altro, che contribuiscono entrambi alla patogenesi della malattia e non dipendono dalla presenza di atopia.

Pohunek e collaboratori [138] hanno osservato un ispessimento della membrana basale in un gruppo di bambini quattro anni prima che l'asma fosse diagnosticata. Tuttavia, se le modificazioni strutturali delle vie aeree precedano la comparsa dei sintomi di asma è ancora oggetto di dibattito. Infatti, Saglani e collaboratori [146], esaminando bambini di età inferiore ai 2 anni con sintomi di respiro sibilante e tosse hanno dimostrato che, in questi bambini, i sintomi non erano associati all'ispessimento della membrana basale né ad infiammazione eosinofila, neppure in presenza di atopia o di broncostruzione reversibile. In un recente studio, lo stesso gruppo di ricerca ha dimostrato che l'ispessimento della membrana basale e l'eosinofilia sono presenti in età prescolare in bambini con asma. Gli autori dunque hanno individuato nella fascia d'età compresa tra 1 e 3 anni, la finestra temporale per intervenire terapeuticamente e modificare la storia naturale della malattia [147]. Questa osservazione è in accordo con i risultati di questa tesi poiché quando abbiamo eseguito l'analisi stratificata per età, considerando solo i bambini di età inferiore ai 6 anni abbiamo osservato che sia le alterazioni strutturali che quelle infiammatorie sono presenti nei bambini di età compresa tra 2 e 6 anni. È importante sottolineare che Saglani e collaboratori hanno esaminato una popolazione di bambini con sintomi gravi, metà dei quali erano in trattamento con steroidi. In questo studio, invece, sono stati considerati bambini con sintomatologia lieve ed è stata estesa l'analisi esaminando, oltre che l'ispessimento della membrana basale, anche altre alterazioni strutturali (desquamazione epiteliale e angiogenesi) e l'espressione di IL-4 e IL-5, interleuchine della linea Th2. I risultati ottenuti, insieme con quelli di Saglani, fanno presumere che le alterazioni patologiche caratteristiche dell'asma bronchiale siano degli eventi precoci nella storia naturale della malattia, che non siano presenti alla nascita, ma che compaiono

successivamente, nel periodo prescolare quando il sistema respiratorio e il sistema immunitario stanno completando il loro sviluppo [140].

Nell'insieme, i risultati di questa tesi forniscono una prova evidente delle strette somiglianze nell'immunopatogenesi delle forme di respiro sibilante atopico e non-atopico nei bambini, che sono distinte in termini di eziologia ma che clinicamente sono indistinguibili. Infatti, in questo studio, sia i bambini atopici che non-atopici presentavano ripetuti episodi di respiro sibilante, mancanza di respiro e tosse, responsivi ai broncodilatatori. In questo quadro, la presenza di sintomi caratteristici e la loro reversibilità appaiono essere elementi chiave da considerare per porre diagnosi di asma.

È interessante notare che l'evoluzione dei sintomi nel corso dell'infanzia, dell'adolescenza, e della media età adulta è tuttora oggetto di dibattito. Infatti i sintomi possono persistere, andare incontro a remissione completa o infine regredire e ricomparire più tardi nel corso della vita [124,148]. È stato recentemente dimostrato che la completa remissione clinica del respiro sibilante dell'infanzia è meno frequente di quanto in precedenza pensato [149]. Inoltre, anche quando apparentemente ha luogo la remissione clinica, il rimodellamento delle vie aeree può permanere e promuovere una ricaduta dei sintomi anche a distanza di tempo [150]. Dobbiamo riconoscere che questo è uno studio trasversale che non può fornire conclusioni definitive su tale questione. Ciò può essere ottenuto solo mediante studi longitudinali che approfondiscono l'anatomia patologica nel tempo, sia nell'infanzia che nella pubertà. Poiché studi longitudinali di questo genere non possono essere proposti per ragioni etiche, in questo studio si è cercato di raggiungere nuove conoscenze integrando il dibattito epidemiologico con l'approccio anatomopatologico.

CONCLUSIONI

Questo studio dimostra che le alterazioni strutturali e l'infiammazione Th2-mediata caratteristiche dell'asma sono presenti anche in bambini non-atopici con sintomi di asma. Infatti, sorprendentemente, l'ispessimento della membrana basale, l'eosinofilia, l'aumentata espressione di IL-4, la desquamazione epiteliale e l'angiogenesi sono presenti non solo nei bambini atopici con respiro sibilante, che sono considerati veri asmatici, ma anche nei bambini non-atopici, che sono considerati bambini con sintomatologia transitoria e reversibile. I risultati ottenuti indicano che nei bambini i sintomi caratteristici dell'asma sono associati alle alterazioni istopatologiche della malattia, indipendentemente dalla presenza di atopia. Sebbene non sappiamo quale possa essere l'evoluzione dei sintomi in questi bambini non-atopici con sintomi di asma, sulla base del loro quadro anatomopatologico, dovrebbero essere considerati veri asmatici.

BIBLIOGRAFIA

1. GINA Workshop Report (Updated 2006). Global strategy for asthma management and prevention. National Institute of Health; National Heart, Lung and Blood Institute. U.S.A.
2. Mochizuki H, Shigeta M, Tokuyama K, Morikawa A. Difference in airway reactivity in children with atopic vs nonatopic asthma. *Chest* 1999; 116:619-624.
3. Ulrik CS, Backer V, Dirksen A. A 10 year follow up of 180 adults with bronchial asthma: factors important for the decline in lung function. *Thorax* 1992; 47:14-18.
4. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. Global Burden of Asthma developed for Global Initiative for Asthma 2004.
5. Skrepnek GH, Skrepnek SV. Epidemiology, clinical and economic burden and natural history of chronic obstructive pulmonary disease and asthma, *Am J Manag Care* 2004; 10:S129-S138.
6. Burney PG, Laitinen LA, Perdrizet S, Huckauf H, Tattersfield AE, Chinn S, et al. Validity and repeatability of the IUATLD (1984) Bronchial Symptoms Questionnaire: an international comparison. *Eur Respir J* 1989; 2:940-5.
7. Burney P, Malmberg E, Chinn S, Jarvis D, Luczynska C, Lai E. The distribution of total and specific serum IgE in the European Community Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:314-22.
8. Sears MR. Natural history and epidemiology. In: Fitzgerald JM, Ernt P, Boulet LP, O'Byrne PM, eds. Evidence-based asthma management. Hamilton, BC: Deker; 2001.p. 1-12.
9. Helms PJ. Issues and unmet needs in pediatric asthma. *Pediatric Pulmonol* 2000; 30:159-65.

10. Groban MD, Evans RM, Edgren B, Butt LT, DeStefano A, Fernandes DJ, et al. Clinical benefits and cost reduction associated with a comprehensive asthma management programme at a managed care organization. *Dis Manage Health Outcomes* 1998; 4:93-100.
11. Luppi F, De Guglielmo M, Fabbri L.M. Fattori di rischio dell'asma bronchiale. In: Rapporto sull'Asma 2001. De Palma M, Fabbri L.M, Grassi C eds, Sintagma Publ, Milano, 2001, pp 47-68.
12. Saglani S, Bush A. Early-life origins of asthma, *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2007, 7:83-90.
13. Illi S, von Mutius E, Lau S, Niggemann B, Grüber G, Wahn U. Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study. *Lancet* 2006; 368:763-70.
14. Holloway JW, Beghè B, Holgate ST. The genetic basis of atopic asthma. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:1023-32.
15. Malerba G, Pignatti PF. A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. *J Appl Genet* 2005; 46:93-104.
16. Postma DS, Bleecker ER, Amelung PJ, Holroyd KJ, Xu J, Panhuysen CI, et al. Genetic susceptibility to asthma-bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N Engl J Med* 1995; 333:894-900.
17. Israel E, Chinchilli VM, Ford JG, Boushey HA, Cherniack R, Craig TJ, et al. Use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomised, placebo-controlled cross-over trial. *Lancet* 2004; 364:1505-12.
18. Ito K, Chung KF, Adcock IM. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:522-43.
19. In KH, Asano K, Beier D, Grobholz J, Finn PW, Silverman EK, et al. Naturally occurring mutations in the human 5-lipoxygenase

- gene promoter that modify transcription factor binding and reporter gene transcription. *J Clin Invest* 1997; 99(5):1130-7.
20. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet* 1998; 351:1225-32.
 21. Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax* 1999; 54:268-272.
 22. Weringa MH, McNicol KN. Prevalence, natural history, and relationship of wheezy bronchitis and asthma in children. An epidemiological study. *BMJ* 1969; 4:321-5.
 23. Jansen DF, Timens W, Kraan J, Rijcken B, Postma DS. (A)symptomatic bronchial hyperresponsiveness and asthma. *Respir Med* 1997; 91:121-134.
 24. Laprise C, Boulet L. Asymptomatic airway hyperresponsiveness: a three year follow-up. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:403-409.
 25. Palmer LJ, Rye PJ, Gibson NA. Airway responsiveness in early infancy predicts asthma, lung function and respiratory symptoms by school age. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:37-42.
 26. Xuan W, Peat JK, Toelle BG, Marks GB, Berry G, Woolcock AJ. Lung function growth and its relation to airway hyperresponsiveness and recent wheeze: results from a longitudinal population study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1820-1824.
 27. Carey VJ, Weiss ST, Tager IB, Leeder SR, Speizer FE. Airway hyperresponsiveness, wheeze onset and recurrent asthma episodes in young adolescents: the East Boston Childhood Respiratory Disease Cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:356-361.

28. Gissler M, Jarvelin MR, Louhiala P, Hemminki E. Boys have more health problems in childhood than girls: follow up of the 1987 Finnish birth cohort. *Acta Paediatr* 1999; 88:310-4.
29. De Marco R, Locatelli F, Sunyer J, Burney O. Difference in incidence of reported asthma related to age in men and women. A retrospective analysis of the data of the European Respiratory Health Survey. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:68-74.
30. Mandhane PJ, Greene JM, Cowan JO, Taylor DR, Sears MR. Sex differences in factors associated with childhood and adolescent onset wheeze. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:45-54.
31. GINA Global Strategy for asthma management and prevention updated 2004.
32. Kurukulaaratchy RJ, Matthews S, Hasan Arshad S. Does environment mediate earlier onset of the persistent childhood asthma phenotype? *Pediatrics* 2004; 113:345-350.
33. Von Mutius E, Martinez FD, Fritzsche C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:358-64.
34. Sigurs N, Gustafsson PM, Bjarnason R, Lundberg F, Schmidt S, Sigurbergsson F, Kjellman B. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:137-141.
35. Martinez FD. Heterogeneity of the association between lower respiratory illness in infancy and subsequent asthma Proceedings of the American Thoracic Society 2005; vol. (2) 57-161.
36. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, et al. Respiratory syncytial virus in early life and

- risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999; 354:541-5.
37. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med* 1995; 332:133-8.
 38. Gern JE, Lemanske RF Jr, Busse WW. Early life origins of asthma. *J Clin Invest* 1999; 104:837-43.
 39. Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, Fortini M, Ferrigno L, Rapicetta M, et al. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ* 2000; 320:412-7.
 40. Venables KM, Chan-Yeung M. Occupational asthma. *Lancet* 1997; 349:1465-9.
 41. Maziak W. The asthma epidemic and our artificial habitats. *BMC Pulm Med* 2005; 5:5-12.
 42. Camargo C, Willett WC, Weiss S, Speizer FE. Obesity and incident asthma among children of the Nurses' Health study. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:150.
 43. Martindale S, McNeill G, Devereaux G, Campbell D, Russell G, Seaton A. Antioxidant intake in pregnancy in relation to wheeze and eczema in the first two years of life. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:121-128.
 44. Hasler G, Gergen PJ, Kleinbaum DG, Ajdacic V, Gamma A, Eich D, Rossier W, Angst J. Asthma and panic in young adults: a 20-year prospective community study. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:1224-1230.
 45. Barr RG, Wentowski CC, Curhan GC, Somers SC, Stampfer MJ, Schwartz J, Speizer FE, Camargo CA Jr. Prospective study of

- acetaminophen use and newly diagnosed asthma among women. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:836-841.
46. Nowen A, Freeston MH, Labbe R, Boulet LP. Phsicological factors associated with emergency room visits among asthmatic patients. *Behav Modif* 1999; 23:217-22.
 47. Gern GS, Busse WW. Association of rhinovirus infections and asthma. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:9-18.
 48. Clark JC, Cochrane LM. Physical activity and asthma. *Curr Opin Pulm Med* 1999; 5:68-75.
 49. Horak E, Grassi G, Skladal D, Ulmer H. Lung function and symptom perception in children with asthma and their parents. *Ped Pulmonology* 2003; 35:23-28.
 50. Fabbri LM, Durham S, Holgate ST, O Byrne PM, Posthma DS. Assesment of airway inflammation: an overview. *Eur Resp J* 1998; 11:6-8S.
 51. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, De Marzo N, Milani GF, Pinvirotto F, Mapp CE, Fabbri LM. Airway mucosal inflammation in occupational asthma induced by toluene diisocyanate. *Am Rev Resp Dis* 1992; 145:160-168.
 52. Barnes PJ. New drugs for asthma. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3:831-44.
 53. Kay AB, Phipps S, Robinson DS. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. *Trends Immunol* 2004; 25:477-82.
 54. Robinson DS. The role of the mast cell in asthma: induction of airway hyperresponsiveness by interaction with smooth muscle? *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:58-65.
 55. Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J* 2002; 19:879-885.

56. Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R, Heusser CH, Howarth PH, Holgate ST. Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10:471-80.
57. Desreumaux P, Janin A, Colombel JF, Prin L, Plumas J, Emilie D, Torpier G, et al. Interleukin -5 messenger RNA, expression in the intestinal mucosa of patients with celiac disease. *J Exp Med* 1992; 175:293-6.
58. Kuipers H, Lambrecht BN. The interplay of dendritic cells, Th2 cells and regulatory T cells in asthma. *Curr Opin Immunol* 2004; 16:702-8.
59. Peters-Golden M. The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31:3-7.
60. Wenzel. Severe asthma in adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:149-60.
61. Wenzel S. Mechanisms of severe asthma. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:1622-8.
62. Groneberg DA, Quarcoo D, Frossard N, Fischer A. Neurogenic mechanisms in bronchial inflammatory diseases. *Allergy* 2004; 59:1139-52.
63. Renauld JC. New insight into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* 2001; 54:577-589.
64. Kips JC. Cytokines in asthma. *Eur Respir J* 2001;18:suppl.34, 24s-33s.
65. Kotsimbos TC, Ghaffar O, Minshall EM, Humbert M, Durham SR, Pfister R, et al. Expression of the IL-4 receptor alpha-subunit is increased in bronchial biopsy specimens from atopic

- and nonatopic asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:859-866.
66. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:635-73.
 67. Bacharier LB, Geha RS. Molecular mechanisms of IgE regulation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:547-58.
 68. Humbert M, Menz G, Ying S, Corrigan CJ, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol Today* 1999; 20:528-33.
 69. Dabbagh K, Takeyama K, Lee HM, Ueki IF, Lausier JA, Nadel JA. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunol* 1999; 162:6233-6237.
 70. Trautmann A, Krohne G, Brocker EB, Klein CE. Human mast cells augment fibroblast proliferation by heterotypic cell-cell adhesion and action of IL-4. *J Immunol* 1998; 160:5053-5057.
 71. Moser R, Fehr J, Bruijnzeel PLB. IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals. *J Immunol* 1992; 149:1432-8.
 72. Humbert M, Durham SR, Kimmitt P, Powell N, Assoufi B, Pfister R, et al. Elevated expression of messenger ribonucleic acid encoding IL-13 in the bronchial mucosa of atopic and non-atopic subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:657-665.
 73. De Vries JE. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:165-169.
 74. Koike M, Takatsu K. IL-5 and its receptor: which role do they play in the immune response? *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 104:1-9.

75. Dent LA, Strath M, Mellor AL, Sanderson CJ. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin-5. *J Exp Med* 1990; 172:1425-31.
76. Shi HZ, Xiao CQ, Zhong D, Qin SM, Liu Y, Liang GR et al. Effect of inhaled interleukin-5 on airway hyperreactivity and eosinophilia in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:204-209.
77. Shimbara A, Christodoulopoulos P, Soussi-Gounni A, Olivenstein R, Nakamura Y, Levitt RC, et al. IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: increased expression in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:108-15.
78. Townsend MJ, Fallon PG, Matthews DJ, Smith P, Jolin HE, McKenzie AN. IL-9 deficient mice establish fundamental roles for IL-9 in pulmonary mastocytosis and goblet cell hyperplasia but not T cell development. *Immunity* 2000; 13:573-583.
79. Miller AL, Lukacs NW. Chemokine receptors: understanding their role in asthmatic disease. *Immunol Allergy Clin North Am* 2004; 24:667-83.
80. Leff AR. Regulation of leukotrienes in the management of asthma: biology and clinical therapy. *Annu Rev Med* 2001; 52:1-14.
81. Smith AD, Taylor DR. Is exhaled nitric oxide measurement a useful clinical test in asthma? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5:49-56.
82. Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Monsignore G. Airway remodelling in asthma. *Chest* 2003; 123:417-422.
83. Evans MJ, Van Winkle LS, Fanucchi MV, Plopper CG. The attenuated fibroblast sheath of the respiratory tract epithelial-

- mesenchymal trophic unit. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21:655-657.
84. Montefort S, Roberts JA, Beasley R, Holgate ST, Roche WR. The site of disruption of the bronchial epithelium in asthmatic and non-asthmatic subjects. *Thorax* 1992; 47:499-503.
85. Fahy JV. Remodelling of the airway epithelium in asthma. *Am J Respir Crit Care* 2001; 164:S46-S51.
86. Kuwano K, Bosken CH, Perè PD, Bay TR, Wiggs BR, Hogg JC. Small airways dimensions in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:1220-1225.
87. Li X, Wilson JW. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:229-233.
88. Salvato G. Quantitative and morphological analysis of the vascular bed in bronchial biopsy specimens from asthmatic and non-asthmatic subjects. *Thorax* 2001; 56:902-906.
89. Chetta A, Zanini A, Falesi A, Del Domo M, Castagnaro A, D'Ippolito R, et al. Vascular component of airway remodelling in asthma is reduced by high dose of fluticasone. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:751-757.
90. Hoshino M, Takahashi M, Aoike N. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:295-301.
91. Hoshino M, Aoike N, Takahashi M, Nakamura Y, Nakagawa T. Increased immunoreactivity of stromal cell-derived factor 1 and angiogenesis in asthma. *Eur Respir J* 2003; 21:804-809.
92. Hogg JC, Parè PD, Moreno R. The effect of submucosal edema in airways resistance. *Am Rev Resp Dis* 1987; 135:s54-s56.

93. Woodruff PG, Dolganov GM, Ferrando RE, Donnelly S, Hays SR, Solberg OD, Carter R, Wong HH, Cadbury PS, Fahy JV. Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:1001-1006.
94. Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1360-1368.
95. Holgate ST, Holloway J, Wilson S, Bucchieri F, Puddicombe S, Davies DE. Epithelial-mesenchymal communication in the pathogenesis of chronic asthma. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1:93-98.
96. Holgate ST, Davies DE, Puddicombe S, Richter A, Lackie P, Lordan J, Howarth P. Mechanisms of airway epithelial damage: epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma *Eur J Respir* 2003; 22: Suppl 44, 24s-29s.
97. Cokugras H, Akcakaya N, Seekin I, Camcioglu Y, Sarimurat N, Aksoy F. Ultrastructural examination of bronchial biopsy specimens from children with moderate asthma. *Thorax* 2001; 56:25-29.
98. Cutz E, Levison H, Cooper DM. Ultrastructure of airways in children with asthma. *Histopathology* 1978; 2:407-42.
99. Payne DNR, Rogers AV, Delroth E, Bandi V, Guntupalli KK, Bush A, Jeffery PK. Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 78-82.
100. Fedorov IA, Wilson SJ, Davies DE, Holgate ST. Epithelial stress and structural remodelling in childhood asthma. *Thorax* 2005; 60:389-394.

101. Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Tura M, et al. Airway inflammation in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:798-803.
102. Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Panizzolo C, Zanin ME, et al. Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:975-981.
103. Gibson PG, Simpson JL, Hankin R, Powell H, Henry RL. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax* 2003; 58:116-121.
104. Payne DNR, Adeok IM, Wilson NM, Oates T, Scallan M, Bush A. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1376-1381.
105. Bentley AM, Maestrelli P, Saetta M, Fabbri LM, Robinson WS, Bradley BL, et al. Activated T-lymphocytes and eosinophils in the bronchial mucosa in isocyanate-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89:821-829.
106. Maestrelli P, Occari P, Turato G, Papiris SA, Di Stefano A, Mapp CE, et al. Expression of interleukin (IL)-4 and IL- 5 proteins in asthma induced by toluene diisocyanate (TDI). *Clin Exp Allergy* 1997; 11:1292-1298.
107. Kim CK, Kim SW, Park CS, Kim BI, Kang H, Koh YY. Bronchoalveolar lavage cytokine profiles in acute asthma and acute bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:64-71.
108. Gemou-Engesaeth V, Bush A, Kay AB, Hamid Q, Corrigan CJ. Inhaled glucocorticoid therapy of childhood asthma is associated with reduced peripheral blood T cell activation and "Th2-type" cytokine mRNA expression. *Pediatrics* 1997; 99:695-703.

109. Marguet C, Jouen-Boedes F, Dean TP, Warner JO. Brochoalveolar cell profiles in children with asthma, infantile wheeze, chronic cough, or cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1533-1540.
110. Li X, Wilson JW. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:229-233.
111. Stein RT, Martinez FD. Asthma phenotypes in childhood. lessons from an epidemiological approach. *Paediatric Respiratory Reviews* 2004; 5:155-161.
112. Taussig LM, Wright AL, Morgan WJ, Harrison HR, Ray CG, The Group Health Medical Associates, The Tucson Children's Respiratory Study I. Design and implementation of a prospective study of acute and chronic respiratory illness in children. *Am Journal of Epidemiology* 1989;129: 1219-1231.
113. Stein RT, Holberg CJ, Sherrill D, Wright AL, Morgan WJ, Taussig L, Martinez FD. Influence of Parental Smoking on Respiratory Symptoms during the First Decade of Life. The Tucson Children's Respiratory Study. *American Journal of Epidemiology* 1999; 149:1030-1037.
114. Martinez FD, Helms PJ. Types of asthma and wheezing. *Eur Respir J* 1998; 12: Suppl. 27, 3s-8s.
115. Stein RT, Holberg CJ, Morgan WJ, Wright AL, Lombardi E, Taussig L, Martinez FD. Peak flow variability, methacholine responsiveness and atopy as markers for detecting different wheezing phenotypes in childhood. *Thorax* 1997; 52:946-52.
116. Morgan WJ, Stern DA, Sherrill DL, Guerra S, Holberg CJ, Guilbert TW, et al. Outcome of asthma and wheezing in the first 6 years of life. *Am J Respir Crit Care Med* 2005, 172:1253-1258.

117. Martinez FD. Role of respiratory infection in onset of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 53-58.
118. Speer CP, Silverman M. Issues relating to children born prematurely. *Eur Respir J* 1998; 27:13S-16S.
119. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 2000; 343: 538-543.
120. Soyseth V, Kongerud J, Boe J. Postnatal maternal smoking, increases the prevalence of asthma but not of bronchial hyperresponsiveness or atopy in their children. *Chest* 1995; 107: 389-394.
121. Martinez FD. Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:S76-82.
122. Lemanske RF Jr, Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Li Z, Shult PA, et al. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:571-7.
123. Lowe L, Murray CS, Custovic A, Simpsom BM, Kissen PM, Woodcock A. Specific airway resistance in 3-year-old children: a prospective cohort study. *Lancet* 2002; 359:1904-1908.
124. Sears MR, Greene JM, Willan AR, Wiecek EM, Taylor DR, Flannery EM, et al. A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood. *N Engl J Med* 2003; 349:1414-22.
125. Sears MR, Burrows B, Flawndry EM, Herbison GP, Hewitt CJ, Holdaway MD. Relation between airway responsiveness and

- serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *N Engl J Med* 1991; 325:1067-1071.
126. Guilbert TV, Morgan WJ, Zeiger RS, Mauger DT, Boehmer SJ, Szeffler SJ, et al. Long-term inhaled corticosteroids in preschool children at high risk for asthma, *N Engl J Med* 2006; 354:1985-97.
 127. Bisgaard H, Northman Hermansen M, Loland L, Brydesholt Halkjaer L, Buchvald F. Intermittent inhaled corticosteroids in infants with episodic wheezing. *N Engl J Med* 2006; 354:1998-2005.
 128. Gold DR, Fuhlbrigge AL, Inhaled corticosteroids for young children with wheezing. *N Engl J Med* 2006; 354:2058-2060.
 129. Green CG, Eisenberg J, Leong A, Nathanson I, Schnapf BW, Wood RE: Flexible Endoscopy of pediatric airway. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:233-35.
 130. Barbato A, Magarotto M, Crivellaro M, Novello A Jr, Cracco A, de Blic J, et al: Use of pediatric broncoscope, flexible and rigid, in 51 European centres. *Eur Respir J* 1997; 10:1761-66.
 131. Midolla F, de Blic J, Barbato A, Bush A, Eber E, Kotecha S, et al. Flexible endoscopy of pediatric airways. *Eur Respir J* 2003; 22: 698-708.
 132. Polgar G, Promadhat V: Pulmonary function testing in children: techniques and standards. Philadelphia: W.B. Saunders; 1971.
 133. Aarbiou J, van Schadewijk A, Stolk J, Sont JK, de Boer WI, Rabe KF, et al. Human neutrophil defensin and secretory leukocyte proteinase inhibitor in squamous metaplastic epithelium of bronchial airways. *Inflamm Res* 2004; 53:230-238.
 134. Ordonez C, Ferrando R, Hyde DM, Wong HH, Fahy JV. Epithelial desquamation in asthma, artifact or pathology?. *Am J Respir Crit Care* 2000; 162:2324-2329.

135. Ward C, Pais M, Bish R, Feltis B, Johns D, Walters EH: Airway inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asthma. *Thorax* 2002; 57:309-316.
136. Payne DNR, Qiu Y, Zhu J, Peachey L, Scallan M, Bush A, Jeffery PK: Airway inflammation in children with difficult asthma: relationship with airflow limitation and persistent symptoms. *Thorax* 2004; 59:862-869.
137. Vignola AM, Bousquet J. Rhinitis and asthma: a continuum of disease? *Clin Exp Allergy* 2001; 31:674-677.
138. Pohunek P, Warner JO, Turzikova J, Kudrmann J, Roche WR. Markers of eosinophilic inflammation and tissue remodelling in children before clinically diagnosed bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16:43-51.
139. Saglani S, Malmstrom K, Pelkonen AS, Malmberg PL, Lindahl H, Makela MJ, et al. Absence of reticular basement membrane thickening in symptomatic infants with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169: A265.
140. Holt PG, Upham JW, Sly PD. Contemporaneous maturation of immunologic and respiratory functions during early childhood: implications for development of asthma prevention strategies. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:16-24.
141. Eysink P, Bindels P, Huisman J, Bottema B, Aalberse R, Schadé B. Development of specific immunoglobulin E in coughing toddlers: a medical records review of symptoms in general practice. *Pediatr Allergy Immunol* 2001; 12:133-141.
142. Contoli M, Message SD, Laza-Stanca V, Edwards MR, Wark PA, Bartlett NW, et al. Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nat Med* 2006; 12:1023-6.

143. Ngoc PL, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedon JC. Cytokines, allergy, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005; 5:161-6.
144. Román M, Calhoun WJ, Hinton KL, Avendaño LF, Simon V, Escobar AM, et al. Respiratory syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2 like response. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:190-195.
145. Humbert M, Durham SR, Ying S. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: Evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1497-1504.
146. Saglani S, Malmström K, Pelkonen AS, Malmberg LP, Lindahl H, Kajosaari M, et al. Airway remodeling and inflammation in symptomatic infants with reversible airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:722-727.
147. Guerra S. Clinical remission of asthma: what lies beyond? *Thorax* 2005; 60:5-6.
148. Saglani S, Payne DN, Zhu J, Wang Z, Nicholson AG, Bush A, Jeffery PK. Early detection of airway wall remodelling and eosinophilic inflammation in preschool wheezers. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:858-864.
149. Guerra S, Wright AL, Morgan WJ, Sherrill DL, Holberg CJ, Martinez FD. Persistence of asthma symptoms during adolescence. Role of obesity and age at the onset of puberty *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:78-85.
150. Van den Toorn LM, Overbeek SE, De Jongste JC, Leman K, Hoogsteden HC, Prins JB. Airway Inflammation is present during clinical remission of atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:2107-2113.

PUBBLICAZIONI DURANTE IL CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

Baraldo S, Turato G, Zanin ME, Zuin R, Saetta M. Leucotrieni ed antileucotrieni: meccanismi d'azione. *Pneumologia Pediatrica* 2005; 17:3-9.

Baraldo S, Zanin ME, Zuin R and Saetta M. Lymphocyte. In Stockley R, Rennard S, Rabe K and Celli B, editors. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Ed. Blackwell Publishing Book; 2006. p. 269-274.

Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Panizzolo C, Zanin ME, Zuin R, Maestrelli P, Fabbri LM, Saetta M. Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:975-981.

Baraldo S, Bazzan E, Zanin ME, Turato G, Garbisa S, Maestrelli P, Papi A, Miniati M, Fabbri LM, Zuin R, Saetta M. Matrix Metalloproteinase-2 Protein in lung periphery is related to COPD progression. *Chest* 2007; 132:1733-40.

APPENDICE

