



# Lo stress ossidativo nell'asma

## Oxidative stress in asthma

Not Allergol 2016; vol. 34: n.2: 51-71.

**Marcello Cottini**

Specialista Allergologia

e Immunologia Clinica

Specialista Malattie Apparato Respiratorio

Libero Professionista Bergamo

Membro della Società Italiana di Allergologia,

Asma ed Immunologia Clinica -SIAIC

(Coordinatore Sezione Lombardia e referente per la libera professione ed i cultori della materia)

Italian Chapter of Interasma

North-East Allergy Team (NEAT)

### INTRODUZIONE

L'asma bronchiale è una delle patologie croniche più comuni e la più frequente malattia cronica non trasmissibile in età pediatrica (1). Secondo la World Health Organization, l'asma colpisce più di 300 milioni di persone al mondo (2), di cui circa trenta milioni in Europa (3); il "Global Burden of Disease Study" (4) stima che l'asma rappresenti la quattordicesima malattia più importante in termini di Disability-Adjusted Life Year (DALY), associandosi a un significativo impatto socio-economico, soprattutto per quanto riguarda i costi indiretti. L'asma è una malattia eterogenea, caratterizzata normalmente da un'inflammatione cronica delle vie aeree (5). L'andamento della malattia è tipicamente variabile da paziente a paziente e gli asmatici possono manifestare differenti fenotipi, termine utilizzato per definire le caratteristiche osservabili di un organismo, risultanti dall'interazione fra il suo makeup genetico e l'ambiente (6). Una precisa definizione dei fenotipi

### RIASSUNTO

#### Parole chiave e sigle

• Stress ossidativo (SO) • Antiossidanti • Asma bronchiale • Fenotipi dell'asma

L'asma è considerata una malattia eterogenea, caratterizzata normalmente da un'inflammatione cronica delle vie aeree. L'andamento della malattia è tipicamente variabile da paziente a paziente e gli asmatici possono manifestare differenti fenotipi. Un'aumentata produzione di ossidanti è ben documentata nell'asma e, negli ultimi 20 anni, lo stress ossidativo è stato riconosciuto un fattore essenziale nella patogenesi di questa malattia. Alti livelli di ROS giocano un ruolo cruciale nell'inflammatione, nell'iperattività bronchiale e nel rimodellamento delle vie aeree, soprattutto in quei pazienti (e fenotipi asmatici) che rispondono poco alle terapie convenzionali, tra i quali i corticosteroidi per via inalatoria. Al centro della fisiologica risposta allo stress ossidativo è il sistema Keap1/Nrf2/ARE, che regola la trascrizione di molti geni antiossidanti e detossificanti; inoltre, l'attivazione di Nrf2 induce una serie di eventi intracellulari che si associano a significativa riduzione di NF-kB e citochine pro-inflammatorie. Le diete notoriamente più "salutari", anche nella prevenzione dell'asma, sono ricche in nutrienti in grado di attivare Nrf2. Le diete moderne al contrario sono caratterizzate da un basso intake di sostanze come polifenoli, tocoferoli gamma e delta e tocotrienoli, acidi grassi omega-3, carotenoidi, isotiocianati (sulforafano), terpenoidi. Questa review ha lo scopo di analizzare le recenti evidenze sul ruolo dello stress ossidativo nell'asma, soprattutto in alcuni fenotipi caratterizzati da ridotta risposta alle terapie convenzionali, e il ruolo di alcune strategie "nutrizionali", potenzialmente utili nel modulare inflammatione e stress ossidativo, attraverso l'attivazione del sistema regolatorio Nrf2.



### SUMMARY

#### Key words and Acronyms

• Oxidative stress (OS) • Antioxidants • Bronchial asthma • Asthma phenotypes

*Asthma is a heterogeneous disease, usually characterized by chronic airway inflammation. The course of disease is variable and typically can differ between individuals. Patients with asthma can exhibit different phenotypes. Enhanced oxidant production is well documented in asthma and, for the past 20 years or so, oxidative stress has been increasingly recognized as a contributing factor in the pathophysiology of this disease. High levels of reactive oxygen species (ROS), compared to antioxidant defenses, are considered to play a major role in airflow obstruction, airway hyperreactivity, and remodeling, especially in patients (and asthma phenotypes) who respond poorly to current therapies, eg inhaled corticosteroids. At the center of the day-to-day biological response to oxidative stress is the Keap1/Nrf2/ARE pathway, which regulates the transcription of many antioxidant genes that preserve cellular homeostasis and detoxification genes; furthermore, Nrf-2 activation induces intracellular events that concur to NF-κB suppression and vice versa. The most healthful diets known, traditional Mediterranean and Okinawan, are rich in Nrf2 raising nutrients. Modern diets are deficient in such nutrients, as phenolic antioxidants, gamma and delta-tocopherols and tocotrienols, long chain omega-3 fatty acids DHA and EPA, carotenoids, isothiocyanates from cruciferous vegetables, sulfur compounds from allium vegetables and terpenoids. The following review has the aim of analyzing the recent evidence about the role of oxidative stress in asthma, particularly in some phenotypes characterized by a reduced response to conventional therapy, and the role of some nutritional strategies that modulate inflammation and oxidative stress pathways, via activation of the master antioxidant switch Nrf2*

### LO STRESS OSSIDATIVO: ASPETTI GENERALI

Nel nostro organismo è presente in condizioni normali un equilibrio tra sostanze ossidanti, prodotte dalle cellule durante i processi metabolici endogeni (in primis la respirazione cellulare, ma anche l'attivazione delle cellule infiammatorie) o provenienti da fonti esogene (agenti fisici, chimici, biologici) e l'efficienza dei sistemi di difesa antiossidanti (9) (Figura 1).

Quando le sostanze ossidanti, i radicali liberi, prevalgono e/o le difese antiossidanti si riducono, si instaura una condizione di stress ossidativo (modello "classico", Figura 2 A), meritevole di eventuale correzione (10).

I radicali liberi sono entità molecolari molto reattive aventi vita media di norma brevissima, costituite da un atomo o una molecola formata da più atomi che presentano un elettrone spaiato: questo elettrone rende il radicale estremamente reattivo, in grado di legarsi ad altri radicali o di sottrarre un elettrone ad altre molecole vicine (11). Tale meccanismo dà origine a nuove molecole instabili ossidate e innesca una reazione a catena che può danneggiare le strutture cellulari. Tra i radicali liberi, le specie reattive dell'ossigeno (ROS, Reactive Oxygen Species), sono quelli a maggior diffusione. Le più importanti sostanze chimiche reattive sono l'anione superossido O<sub>2</sub><sup>-</sup>, il perossido d'idrogeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e il radicale ossidrilico -OH, mentre le specie reattive dell'azoto (Reactive Nitrogen Species) di maggior interesse sono l'ossido nitrico (NO) e il perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (12).

dell'asma è diventata sempre più importante, poiché il riconoscimento di specifici sub-fenotipi ed endotipi può migliorare la nostra conoscenza dei meccanismi fisiopatologici e della risposta ai farmaci, soprattutto nei pazienti poco responsivi alle comuni terapie (7). I farmaci antiastmatici non funzionano, infatti, in tutti i soggetti e comunque esiste una marcata variabilità di risposta terapeutica tra paziente e paziente (8). Vi è evidenza sempre maggiore del ruolo assai importante svolto dallo stress ossidativo non solo nella patogenesi della malattia ma anche

nel determinare una ridotta risposta alla terapia, con conseguente minor controllo dell'asma, aumentato rischio di riacutizzazioni, peggiore qualità di vita e maggior ricorso alle strutture sanitarie (9). Questa review ha lo scopo di analizzare le recenti evidenze sul ruolo dello stress ossidativo (SO) nell'asma, soprattutto in alcuni fenotipi caratterizzati da ridotta risposta alla terapia convenzionale e da scarso controllo della malattia, e di valutare il ruolo di alcune strategie "nutrizionali", potenzialmente utili nel modulare lo stress ossidativo e l'infiammazione.



I radicali liberi sono responsabili del danno ossidativo a carico di macromolecole biologiche, come DNA, lipidi e proteine ma, aspetto recentemente assai rivalutato, non sono sempre solo dannosi: la produzione di ROS è, infatti, parte essenziale del metabolismo, e quindi un certo grado di stress ossidativo è richiesto per i normali meccanismi fisiologici (13). A concentrazioni moderate, infatti, i ROS partecipano attivamente a una varietà di processi biologici complessi, quali la trasduzione dei segnali, il controllo dell'espressione genica, l'apoptosi, la senescenza cellulare. Un lieve squilibrio pro-ossidativo è pertanto fisiologico (modello "rivisitato", Figura 2 B) e non va corretto (10).

Con il termine "antiossidante" si fa riferimento a tutte quelle molecole capaci di stabilizzare o disattivare i radicali liberi prima che essi danneggino le cellule, secondo il meccanismo mostrato in Figura 3.

Per contrastare l'azione dei ROS, l'organismo ha a disposizione una serie di meccanismi enzimatici o non-enzimatici di difesa (Figura 4). In particolare, gli enzimi antiossidanti cruciali per la protezione delle vie respiratorie includono superossido dismutasi (SOD) e glutatione perossidasi (GPx) (14). La nutrizione svolge un ruolo fondamentale nel mantenere l'efficacia delle difese antiossidanti non enzimatiche (14).

### STRESS OSSIDATIVO E INFIAMMAZIONE: IL SISTEMA KEAP1-NRF2

Particolarmente interessante appare il legame tra stress ossidativo e infiam-

mazione: le specie reattive dell'ossigeno sono, infatti, in grado di modificare lo stato ossido-riduttivo delle cellule e molteplici geni infiammatori con i relativi fattori di trascrizione (ad esempio NFkB e AP-1) sono regolati tramite meccanismi sensibili allo stato ossido-riduttivo. In particolare, l'attivazione di NF-kB da parte dei ROS determina la trascrizione di numerosi geni infiammatori codificanti citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e interleuchine 1, 2, 6 e 12) e molecole di adesione (15). L'attivazione di NF-kB, inoltre, sopprime la trascrizione di enzimi antiossidanti, con ulteriore formazione di ROS, determinando un circolo vizioso tra stress

ossidativo e infiammazione (Figura 5). Per difendersi dallo stress ossidativo gli organismi viventi hanno sviluppato molti sistemi di risposta tra cui particolarmente importante è quello che coinvolge il fattore Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2). Nrf2 è un potente attivatore trascrizionale e funziona legandosi a un elemento di sequenza chiamato "antioxidant/electrophile responsive element" (ARE/EpERE) presente sul promotore dei geni da esso regolati (16). Questo fattore induce la trascrizione di oltre 500 geni che codificano, tra l'altro, per proteine coinvolte nelle difese antiossidanti e per enzimi di fase 2 implicati nell'eliminazione delle sostanze

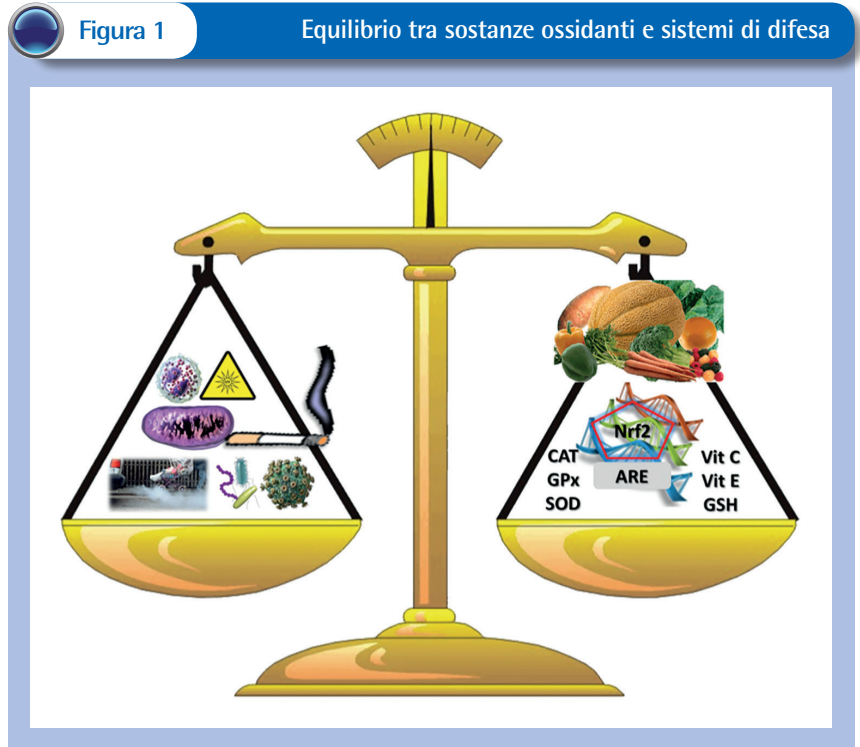




Figura 2A

### Stress ossidativo "modello classico"

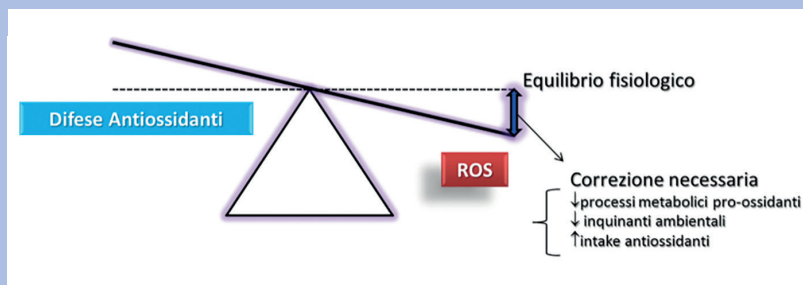
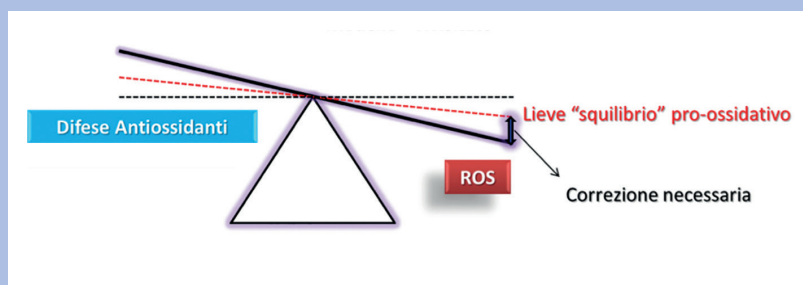


Figura 2B

### Stress ossidativo "modello rivisitato"



estranee. L'attività di Nrf2 è regolata a vari livelli e con diversi meccanismi. Tra questi, quello più studiato è il sistema Nrf2/Keap1. La proteina Nrf2 in condizioni basali è localizzata nel citoplasma, legata alla proteina del citoscheletro cellulare Keap1. In seguito a stress ossidativo Nrf2 si stacca da Keap1 e migra nel nucleo, dove svolge la sua funzione di attivatore trascrizionale di geni implicati nella resistenza allo stress ossidativo (17). Altro aspetto d'importanza essenziale (soprattutto per le centinaia di milioni di persone esposte quotidianamente a elevati livelli di sostanze tossiche) è l'atti-

vazione da parte di Nrf2 di oltre 30 geni che codificano enzimi essenziali per i meccanismi di detossificazione da xenobiotici ambientali (Figura 6). Altrettanto importante è l'azione antiinfiammatoria di Nrf2, che si esplica attraverso l'inibizione dell'attività di NF-kB e di una serie di mediatori proinfiammatori e l'up-regulation della trascrizione di IL-10, potente citochina antiinfiammatoria (18). Il preciso meccanismo inibitorio di Nrf2 su NF-kB è complesso e non ancora completamente noto, ma sembra probabile che giochino un ruolo cruciale Keap-1 (quando Nrf2

si stacca da Keap-1 per stimoli ossidativi, si assiste a un aumento del pool di Keap-1 non legata, che a questo punto può "catturare" IKK $\beta$  intracellulare, e inibire l'espressione di NF-kB), la riduzione Nrf2-dipendente dei livelli di ROS e la trascrizione di geni anti-infiammatori (18) (Figura 7).

Di contro, NF-kB sembra poter direttamente reprimere il segnale Nrf2 a livello trascrizionale (Figura 5). L'interesse nei confronti dello stress ossidativo risulta evidente se si esegue una ricerca su Pub Med digitando "oxidative stress": in data 5 luglio 2016 compaiono, infatti, oltre 157.000 articoli! Ovviamente molti studi si sono concentrati sui processi dell'invecchiamento, ma occorre ricordare che lo SO gioca un ruolo essenziale anche nella patogenesi di numerose malattie croniche (19) che, non sorprendentemente, sono caratterizzate anche da alti livelli d'infiammazione (Figura 8).

## STRESS OSSIDATIVO E ASMA

Il polmone presenta caratteristiche del tutto peculiari rispetto ad altri organi vitali, essendo direttamente esposto ad alti livelli di ossigeno; pertanto deve possedere efficaci meccanismi antiossidanti per la protezione primaria delle vie aeree sia da ossidanti esogeni (20), che da fonti endogene (cellulari) di ROS, tra le quali ricordo neutrofili, eosinofili, macrofagi alveolari, cellule epiteliali e cellule endoteliali. Negli ultimi anni si è visto che lo SO gioca un ruolo critico nella patogenesi di varie malattie respiratorie tra cui asma, BPCO, ARDS, fibrosi polmonare, fibrosi cistica e neoplasie (21).



In particolare, i risultati di molti studi indicano che lo SO è importante nella fisiopatologia dell'asma. Ormai sono molteplici le evidenze, sia in bambini sia in adulti con asma, di alti livelli di SO e di ridotte difese antiossidanti, enzimatiche e non (22-24). La misura diretta dei ROS non è agevole poiché altamente reattivi e caratterizzati da emivita assai breve; pertanto lo SO è spesso studiato attraverso la misurazione di prodotti dell'interazione tra i ROS e lipidi, proteine o DNA, non solo nelle vie aeree ma anche a livello sistemico (Figura 9).

Recentemente, molto interesse ha destato la dimetilarginina asimmetrica (ADMA), un inibitore endogeno dell'ossido nitrico sintasi (NOS); si ritiene, infatti, che, attraverso la formazione di perossinitrito, ADMA sia coinvolta in molteplici aspetti patogenetici dell'asma, come lo SO, l'infiammazione delle vie aeree, l'iperreattività bronchiale ed il rimodellamento (25). I livelli di ADMA sono aumentati significativamente nello sputo indotto di asmatici allergici dopo challenge con allergene (25) e, in particolare, elevati livelli plasmatici di ADMA caratterizzano il fenotipo asmatico "late-onset" che si sviluppa in un quadro di obesità (26). Per quanto riguarda l'età pediatrica, in un lavoro pubblicato su Chest nel 2013, un gruppo italiano ha evidenziato nel condensato esalato di bambini asmatici livelli di ADMA significativamente più elevati rispetto ai controlli, con valori non modificati dall'assunzione di steroidi inalatori (27). Un'analogica scarsa risposta alla terapia cortisonica di altri biomarkers di SO, come 8-isoprostano,

è stata riportata in diversi studi (28,29). Uno studio australiano ha evidenziato una significativa correlazione fra ridotte difese antiossidanti sistemiche e iperreattività bronchiale aspecifica, severità/mancato controllo dell'asma, riduzione della funzione respiratoria (30). Un importante effetto dello stress ossidativo e dell'infiammazione è rappresentato dall'up-regulation di geni antiossidanti, che svolgono un ruolo protettivo essenziale nelle cellule epiteliali e nelle vie aeree (31). Polimorfismi genetici del gene glutatione S-transferasi (GST) P1, M1 e T1, associati a perdita o a una consistente riduzione dell'attività dell'enzima, sono stati riconosciuti come importanti fattori di rischio per insorgenza di asma, soprattutto nei soggetti atopici (32). Bimbi asmatici con un polimorfismo GSTM1 sono inoltre più suscettibili agli effetti dannosi dell'ozono (33), partico-

larmente a carico delle piccole vie aeree. Negli ultimi anni sono risultati sempre più evidenti gli stretti legami tra l'infiammazione cronica tipica dell'asma e un aumentato SO delle vie aeree (9,34). Nell'asmatico i ROS, attraverso la trascrizione (meccanismo sensibile allo stato ossido-riduttivo) di nuclear factor-kB e AP-1 nelle cellule epiteliali bronchiali, inducono produzione di citochine e chemochine pro-infiammatorie (Figura 5), che facilitano l'up-regulation di molecole di adesione e l'aumentato rilascio di mediatori pro-infiammatori (36). A livello delle vie respiratorie lo stress ossidativo si è dimostrato in grado di peggiorare la funzione respiratoria, determinare iperreattività bronchiale aspecifica e indurre ipersecrezione di muco, shedding epiteliale, edema e rimodellamento potenzialmente non reversibile (35). I neutrofili isolati dal sangue



Figura 3

Meccanismo d'azione degli antiossidanti

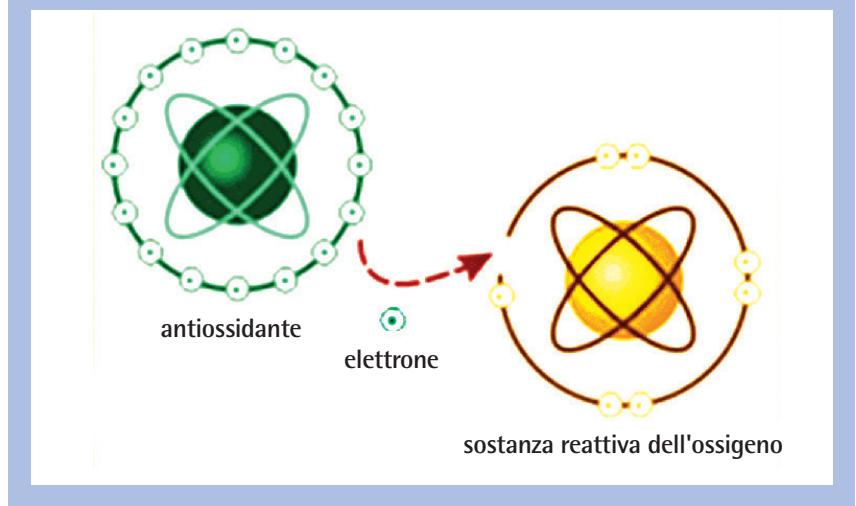
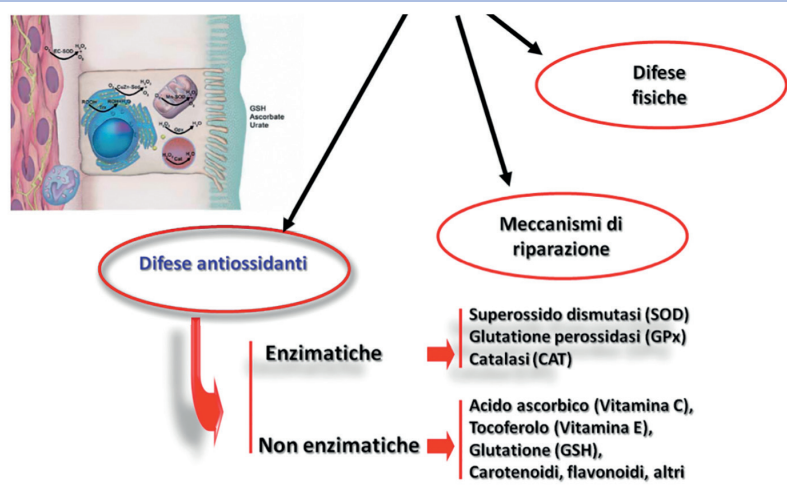




Figura 4

Meccanismi di difesa contro lo stress ossidativo indotto dai radicali liberi



Tratta da M. Valko: *Int J Blochem Cell Biol* 2007; 39:44, con modifiche

periferico di asmatici generano ROS in misura significativamente superiore rispetto alle cellule dei soggetti normali, e ciò correla con il grado d'iperreattività bronchiale aspecifica (37). Lo squilibrio tra produzione di radicali liberi e sistema antiossidante appare più evidente in alcuni fenotipi (figura 10) e nelle forme severe (38,39), anche se già nelle forme lievi/intermittenti sono evidenziabili livelli di SO talora elevati. Recentemente, un esame del profilo “metabolomico” di bambini con asma grave ha mostrato una significativa correlazione della severità della malattia con biomarkers metabolici associati a stress ossidativo (40). Sempre in bimbi asmatici, nelle forme più severe un elevato stress ossidativo (alti livelli di 8-isoprostano e malondial-

deide) si associa ad attivazione/espressione di TGF- $\beta$ 1 a livello delle vie aeree, rappresentando quindi un importante fattore di rischio per rimodellamento dei bronchi (41). Nrf2 è abbondantemente espresso nell'epitelio respiratorio e nei macrofagi alveolari e protegge i polmoni da stress ossidativo, apoptosi delle cellule alveolari, proteolisi della matrice extracellulare e infiammazione cronica. Alcuni lavori recenti hanno evidenziato una ridotta attivazione del sistema Nrf2/ARE negli asmatici adulti con forme moderate/severe (oltre che nei forti fumatori e nei pazienti BPCO) e, a livello della muscolatura liscia, questo fenomeno pare correlato ad aumentata espressione di TGF- $\beta$  (42). Il sistema Nrf2/ARE ha, infatti, dimostrato importanti

attività anti-fibrotiche nei polmoni (ma anche nel fegato e nei reni), inducendo una riduzione significativa dell'espressione di TGF- $\beta$  e della differenziazione dei fibroblasti. Nei bambini con forme severe, si evidenzia un'aumentata espressione del sistema Nrf2/ARE, che però appare decisamente “disfunzionale”, verosimilmente per modifiche post-traduzionali indotte dallo SO (43).

### STRESS OSSIDATIVO E RIACUTIZZAZIONI

La maggioranza degli studi sul ruolo dello stress ossidativo ha preso in considerazione lo squilibrio tra produzione di radicali liberi e sistema antiossidante in fase di stabilità della malattia. Vi sono però anche molte evidenze di un aumentato SO durante le riacutizzazioni asmatiche, sia nelle vie aeree che a livello sistemico (44,45), e i markers di SO correlano con la frequenza delle riacutizzazioni (46). Molti trigger di riacutizzazioni asmatiche, tra cui allergeni, infezioni virali e inquinanti ambientali, possono, infatti, attivare la produzione di ROS, aumentando l'infiammazione e i sintomi asmatici. Markers indiretti di SO come isoprostani e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sono aumentati nel condensato esalato, nello sputo e nel BAL durante le esacerbazioni (47). In alcuni lavori condotti durante riacutizzazioni asmatiche, si è evidenziata, a livello plasmatico, anche una riduzione della Capacità Antiossidante Totale nel plasma (Plasma total antioxidant capacity) (46). Bambini con asma instabile (più di 3 riacutizzazioni con uso di steroide per os nell'anno precedente) mostrano



livelli di 8-isoprostano nel condensato esalato significativamente più elevati rispetto ai controlli e ai bimbi con asma stabile (28). Va segnalato che nonostante la terapia steroidea (topica e sistemica), durante le riacutizzazioni i markers di stress ossidativo permangono elevati per lungo periodo, a differenza di quanto accade per FeNO, citochine Th2 e cys-leucotrieni (28). Al contrario di quanto accade in fase di stabilità, nelle riacutizzazioni asmatiche (soprattutto in quelle indotte da infezioni virali) è spesso evidente un'infiammazione neutrofila delle vie aeree, tendenzialmente resistente alla terapia con glucocorticoidi, topici e sistemici, a causa della ridotta attività ed espressione dell'istone deacetilasi-2 (48), essenziale per la down-regulation dei geni pro-infiammatori da parte dei corticosteroidi, fenomeno strettamente legato allo stress ossidativo (vedi Figura 11), ma verosimilmente giocano un ruolo importante anche modifiche post-traduzionali del recettore per i glucocorticoidi (49). Fenotipi dell'asma e stress ossidativo

La presenza di elevati livelli di SO è praticamente una costante negli asmatici, soprattutto con forme moderate/severe e non controllate, ma è particolarmente significativa in alcuni fenotipi (Figura 10).

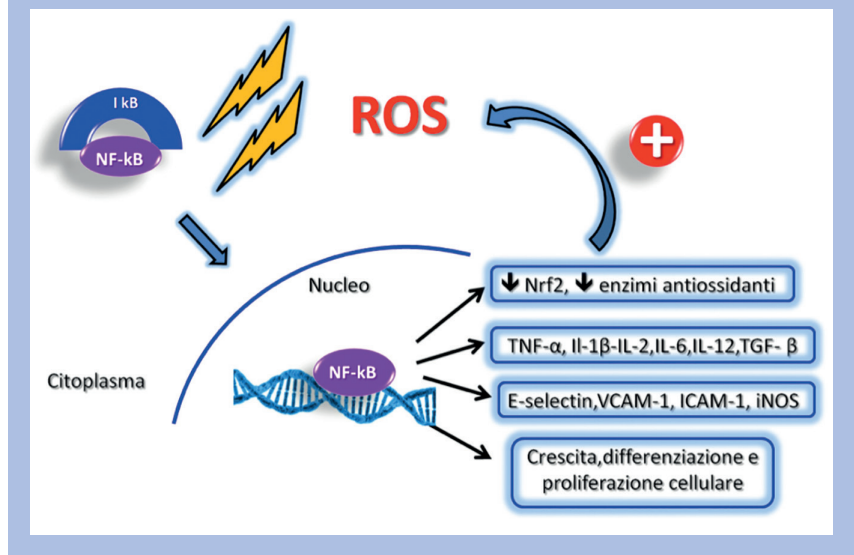
### ASMA ALLERGICO

Markers indiretti di stress ossidativo come isoprostani e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> risultano costantemente aumentati nel condensato esalato, nello sputo e nel BAL di pazienti asmatici dopo esposizione all'allergene (50,51). Studi nel modello murino hanno evidenziato una ridot-

ta espressione di Nrf2 dopo challenge con ovoalbumina, condizionante un'infiammazione Th-2 più severa e iperreattività bronchiale (52). Sempre in studi nell'animale, dopo challenge con ovoalbumina l'aumento dello stress ossidativo nei bronchi precede le altre classiche caratteristiche dell'asma allergico, quali infiammazione, ipersecrezione di muco e iper-reattività bronchiale (53). Anche nell'uomo si è evidenziato che l'infiammazione allergica indotta da challenge specifico è in grado di ridurre drammaticamente l'espressione di Nrf2 e SOD nei macrofagi alveolari di soggetti asmatici (54). Recentemente si è visto che i granuli pollinici (ricchi di NAD (P) H ossidasi) e i loro estratti allergenici esercita-

no, entro pochi minuti dall'esposizione, una potente attività pro-ossidante, che induce marcato stress ossidativo a carico delle mucose nasali/bronchiali e nella congiuntiva (55). Lo stress ossidativo indotto dai granuli pollinici mostra un duplice impatto sulle cellule dendritiche, dimostrandosi capace di stimolarne la produzione di citochine pro-infiammatorie (immunità innata locale) e di agire come fattore adiuvante nell'inizio delle risposte immuni adattative contro gli antigeni pollinici (56); attraverso la produzione di IL-27, lo stato ossido-riduttivo a livello delle cellule dendritiche influenza, infatti, la polarizzazione in senso Th2 (57). Una ridotta capacità dell'ospite di controllare lo stress ossidativo può agire quindi

**Figura 5** Attivazione di NF-κB e conseguente traslocazione del nucleo con produzione di citochine proinfiammatorie, soppressione della trascrizione di enzimi antiossidanti e ulteriore formazione di ROS





da “priming” per la sensibilizzazione allergica. Alcuni allergeni, come quelli degli acari, hanno un’elevata attività proteasica, in grado di indurre stress ossidativo in vivo. Recentemente (58) è stato evidenziato che l’esposizione diretta delle cellule epiteliali bronchiali umane all’acaro determina SO, che si accompagna ad aumentata apoptosi delle cellule e a maggior produzione di citochine pro-infiammatorie. Un lavoro italiano (59) ha evidenziato un significativo incremento di 8-isoprostano nel condensato esalato dopo challenge in soggetti allergici al gatto e la stretta correlazione tra stress ossidativo e infiammazione leucotrienica nelle vie aeree. Va segnalato che in questo studio un significativo stress ossidativo a carico delle vie aeree era già presente in pazienti con asma lieve intermittente.

### “SMOKINGASTHMA” INDOOR POLLUTION

Gli inquinanti ambientali respirabili possono aumentare il livello di radicali liberi dell’ossigeno e attivare e sostenere i meccanismi dello stress ossidativo, al quale contribuisce la formazione indiretta di ROS attraverso l’attivazione di macrofagi e leucociti polimorfo nucleati (21). Il fumo di sigaretta è un potente induttore di SO: già 15 minuti dopo l’inalazione si rileva significativo incremento di 8-isoprostano nel condensato esalato (60) e ciò non sorprende, perché un’aspirazione contiene 1014 radicali, liberi! In Europa circa il 30% degli asmatici adulti fuma e il 20% è un ex fumatore (61). Soprattutto nel fenotipo asmatico “late-onset” il fumo sembra poter giocare un ruolo cruciale nell’insorgenza della malattia

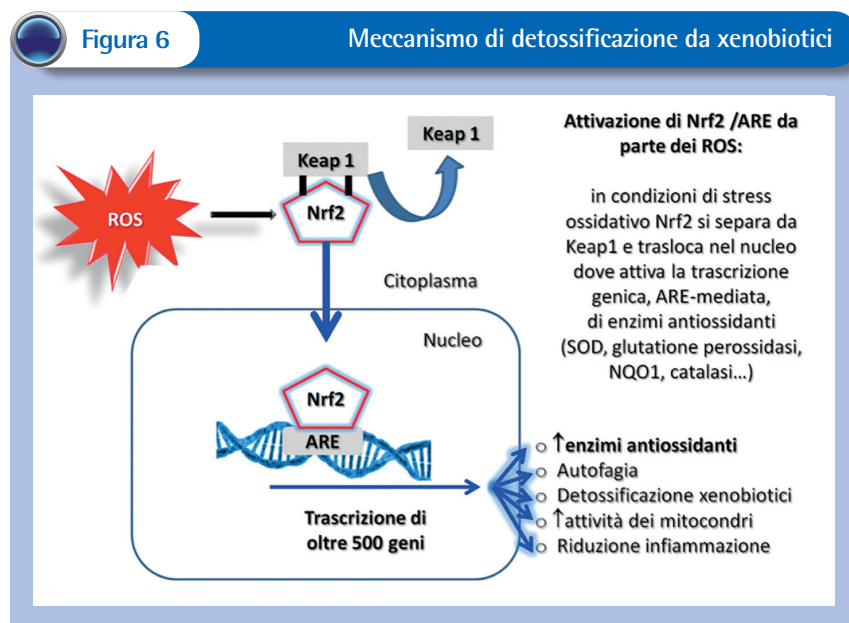
(62). Questo fenotipo è caratterizzato da assai elevati livelli di stress ossidativo, che sono paragonabili a quelli riscontrati nei pazienti con BPCO (63)! Lo squilibrio tra produzione di radicali liberi e sistema antiossidante determina nelle vie aeree del fumatore asmatico alti livelli d’infiammazione e maggior rischio di rimodellamento: ciò spiega la maggior gravità del quadro clinico e la peggior prognosi nei pazienti fumatori, anche per gli stretti legami tra SO e ridotta risposta agli steroidi inalatori (64,65). Negli ultimi anni è risultato evidente che anche l’asmatico non fumatore ma esposto a fumo passivo è caratterizzato da alti livelli di SO, e questo giustifica il peggior controllo dell’asma e la maggior frequenza di riacutizzazioni nei pazienti asmatici (adulti e bambini) esposti a fumo passivo (66). Nei paesi in via di sviluppo decine di milioni di asmatici sono inoltre esposti a inquinamento indoor da biomasse, soprattutto donne e bambini, e ciò rappresenta un importante fattore di rischio per asma più severa/poco controllata, legandosi a situazioni di aumentato SO e ad alti livelli d’infiammazione, in particolare neutrofila, delle vie aeree (67).

### OUTDOOR POLLUTION

I principali inquinanti ambientali esercitano un effetto negativo sulla salute attraverso molti meccanismi, uno dei quali è l’induzione di SO nelle cellule e nei tessuti con cui vengono a contatto (21). Un’esposizione anche di breve durata a inquinanti legati al traffico è in grado di indurre infiammazione e marcato stress ossidativo a carico delle vie respiratorie

Figura 6

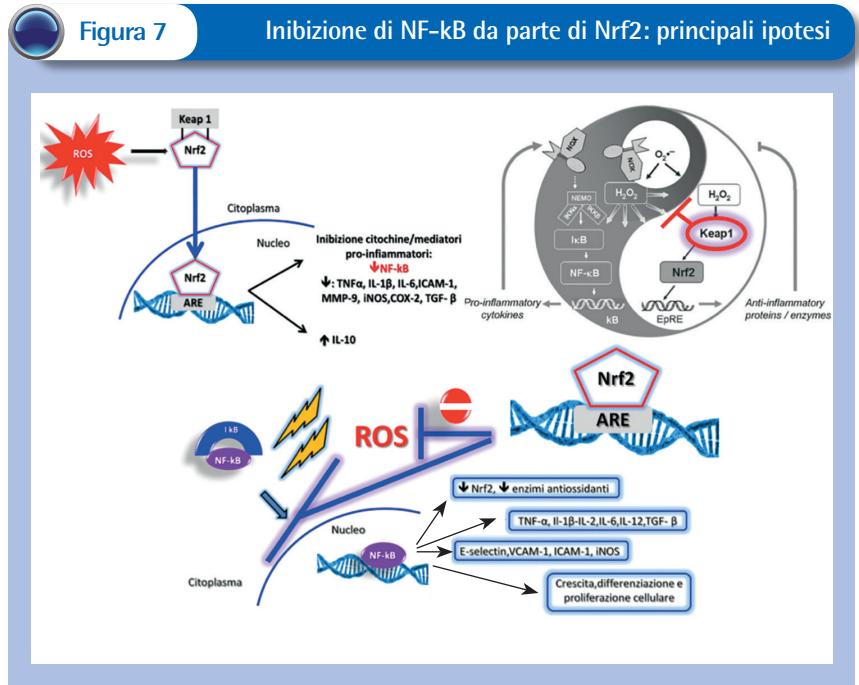
Meccanismo di detossificazione da xenobiotici







(68). L'esposizione a particolato diesel (DEP) induce importante formazione di ROS, per via diretta e indiretta (infiammazione) (69), ma tra gli inquinanti ambientali esterni è la formazione di Ozono (O<sub>3</sub>) come inquinante secondario, che costituisce il più importante fattore di rischio per stress ossidativo a livello dell'apparato respiratorio. Infatti, questo potente ossidante causa irritazione e infiammazione delle vie aeree e, attraverso meccanismi di tossicità da stress ossidativo, provoca un aumento delle citochine infiammatorie e un significativo danno isto-patologico e funzionale del polmone (70). Il ruolo dell'inquinamento come fattore di rischio per insorgenza dell'asma appare ormai consolidato, soprattutto in popolazioni a rischio come bambini (in associazione ad aumentato rischio di ridotta crescita della funzione respiratoria), ma anche negli anziani, che appaiono particolarmente suscettibili agli effetti avversi cardiorespiratori dell'outdoor pollution (71). Va però notato che, mentre l'esposizione a inquinanti ambientali rappresenta indubbiamente un importante fattore di rischio per riacutizzazioni e maggior severità della malattia (72), alcuni studi non hanno evidenziato una chiara correlazione tra inquinamento outdoor e aumentata incidenza di asma, sia in età pediatrica sia negli adulti (73-75). Per spiegare tali contrastanti risultati, occorre considerare il ruolo di particolari polimorfismi genetici, in grado di condizionare la risposta allo stress ossidativo, in particolare in età pediatrica. Un recente studio ha valutato gli effetti dei polimorfismi del gene GST (Glutazione-S-Transferasi) nella relazione



tra esposizione a traffico nel primo anno di vita e rischio di asma in una coorte di 620 soggetti seguiti dalla nascita fino al diciottesimo anno di età. Nei portatori del polimorfismo GSTT1 null, alleli ile/ile per GSTP1 e alleli G per GSTCD si è osservato un rischio raddoppiato di asma a 12 anni di età (76). I risultati degli studi di Romieu e collaboratori, hanno dimostrato che bambini asmatici con genotipo glutazione S-transferasi null M1 (GSTM1 null) e glutazione S-Transferasi P1 Valina/Valina (GSTP1 Val/Val) risultano maggiormente suscettibili allo sviluppo di sintomi di tipo respiratorio dopo esposizione a ozono (33). Al contrario, altri polimorfismi, ad esempio la presenza di un allele Val105 del genotipo GSTM1, costituiscono un

fattore di protezione verso l'insorgenza di asma da sforzo in bambini esposti a elevate concentrazioni di ozono (77). Infine polimorfismi dei geni che controllano la risposta immunitaria innata (polimorfismi dei TLR4 rs1927911, rs10759931, e rs6478317) modificano l'associazione dell'esposizione a PM-NO<sub>2</sub> con la funzione respiratoria e l'incidenza di asma (78).

### OBESITÀ E ASMA

L'obesità è caratterizzata da SO e infiammazione sistemica (79,80), e un'ampia letteratura negli ultimi anni ha evidenziato gli stretti legami intercorrenti fra SO e sindrome metabolica negli obesi (79,80). Il fenotipo "asmatico obeso"



Figura 8

Processo di invecchiamento



ADULT-ONSET ASTHMA

L'asma che esordisce in età adulta presenta alcune importanti differenze rispetto alla "early-onset asthma": si associa molto meno spesso all'atopia e a malattie allergiche, è più frequente nel sesso femminile, nei fumatori, negli obesi, nei soggetti con comorbidità rinosinusale, è generalmente più severa e mostra un più rapido declino funzionale (89.) Studi recenti hanno suggerito un ruolo cruciale delle difese antiossidanti nell'incidenza di nuova asma nell'adulto (90). Larkin e collaboratori, in una coorte di 65.000 donne (The Shanghai Women's Asthma and Allergy Study) di età compresa tra i 40 e i 70 anni, prive di asma al reclutamento e seguite per 8 anni, hanno, infatti, evidenziato che bassi livelli di difese anti-ossidanti, enzimatiche e non enzimatiche, basali rappresentavano un importante fattore di rischio per nuova asma.

è caratterizzato da una maggior severità (81,82), da peggiore funzione respiratoria (83) e da una ridotta risposta ai corticosteroidi (79). In effetti, andrebbero separati due distinti sub-fenotipi: un asma "early-onset", complicata da obesità, e una forma "late-onset" che si sviluppa in un quadro di obesità; in quest'ultimo fenotipo l'obesità sembra giocare un ruolo essenziale nell'insorgenza della patologia asmatica. In entrambi i sub-fenotipi, i markers di stress ossidativo nelle vie aeree e nel plasma dei pazienti obesi (84) sono aumentati, anche rispetto agli asmatici non obesi, ma è nella "late-onset obese asthma" che lo squilibrio tra produzione di radicali liberi e sistema antiossidante

sembra, dai dati recenti della letteratura, giocare un ruolo centrale nella patogenesi della malattia, condizionando alti livelli d'infiammazione (85). In particolare, lo SO si correla positivamente con l'attivazione di NF-κB nei polmoni (che a sua volta incrementa ulteriormente lo SO), verosimilmente anche mediante l'incremento significativo di leptine nelle vie aeree degli asmatici obesi (86,87). Infine, soprattutto nel sesso femminile, lo SO si associa a una flogosi prevalentemente neutrofila, poco responsiva alla terapia cortisonica (79,85). Un gruppo di asmatici obesi particolarmente a rischio per alti livelli di SO è quello dei soggetti con apnee ostruttive del sonno (OSA) (88).

AERD (ASPIRIN-EXACERBATE RESPIRATORY DISEASE)

Un importante fenotipo "late-onset", caratterizzato da sintomi severi e comorbidità rino-sinusale (poliposi!) è quello costituito dall'AERD (Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease), dove i sintomi a carico delle alte e basse vie respiratorie sono "precipitati" dall'assunzione di farmaci anti-infiammatori non steroidei in grado di inibire gli isoenzimi COX-1 (91). Lo SO sembra giocare un ruolo importante in questi pazienti (92); infatti, aumentati livelli di 8-isoprostani sono stati ripetutamente evidenziati nel condensato esalato



di asmatici ASA-sensibili in fase di stabilità, non in terapia di fondo con ICS, con un aumento significativo dei valori dopo challenge, che correla con l'aumento concomitante di Cys-leucotrieni (93).

### ESACERBAZIONI INDOTTE DA VIRUS

Molteplici sono le evidenze di un aumentato stress ossidativo durante le esacerbazioni asmatiche indotte da virus, sia a livello polmonare sia sistemico, che si associa a riduzione delle difese antivirali (in primis produzione di INF- $\lambda$ ) e della funzionalità mitocondriale delle cellule epiteliali infettate (94). Da tempo è inoltre nota la correlazione diretta tra severità dei sintomi associati a infezione da rinovirus (RV, principale trigger di riacutizzazioni infettive dell'asma) e concentrazioni di IL-8 nelle secrezioni nasali; dati recenti indicano che la stimolazione, indotta da RV, di IL-8 a livello dell'epitelio respiratorio è mediata dalla produzione di ROS e dalla conseguente attivazione di NF- $\kappa$ B (95) Durante le riacutizzazioni asmatiche, l'up-regolazione di NF- $\kappa$ B e IL-8 "richiama" nelle vie respiratorie neutrofili, e questo contribuisce a una ridotta risposta agli steroidi (47).

### STRESS OSSIDATIVO E RIDOTTA RISPOSTA AI FARMACI

Gli steroidi inalatori (CS) sono utilizzati quotidianamente, come monoterapia o in combinazione con altre molecole, da milioni di pazienti asmatici, ma circa un terzo dei pazienti non trae particolare

beneficio da tale trattamento (8), con conseguente scarso controllo dell'asma, aumentato rischio di riacutizzazioni, ridotta qualità di vita, maggior ricorso alle strutture sanitarie e ridotta produttività (presenteismo, assenteismo). Vi è un'evidenza sempre maggiore, soprattutto in alcuni fenotipi asmatici, del ruolo dello stress ossidativo nel determinare una ridotta risposta alla terapia. Infatti, numerosi studi, sia in bambini sia in adulti, hanno evidenziato alti livelli di stress ossidativo nelle vie respiratorie dei pazienti asmatici con asma non controllato dalla terapia, sia in fase di stabilità sia durante riacutizzazioni (28,29). In particolare, nei meccanismi della resistenza agli steroidi negli ultimi anni è stato attentamente indagato il ruolo dell'Istone deacetilasi (HDAC2) (Figura 11).

Nell'asma moderato/severo (e in ogni caso nei fenotipi asmatici dove lo stress ossidativo gioca un ruolo importante,

vedi Figura 10), la ridotta/assente risposta ai cortisonici può essere riconducibile, in buona parte, ad un effetto inibitorio dello stress ossidativo sull'istone deacetilasi 2, enzima necessario perché i corticosteroidi possano spegnere i geni infiammatori attivati, con una conseguente interferenza negativa sul loro meccanismo antinfiammatorio fondamentale. In pratica, si viene ad avere uno squilibrio tra un eccesso di acetilazione degli istoni legati a geni che codificano per mediatori infiammatori e un deficit di istone deacetilasi selettiva proprio per questi istoni (HDAC-2). Gli steroidi si trovano quindi privi del substrato che ne consente l'azione e il risultato è un netto incremento della sintesi di mediatori come il TNF- $\alpha$ , IL-8 e metalloproteasi (MMP)-9, che amplificano ulteriormente la risposta infiammatoria e lo stress ossidativo (96). Eleganti studi con biopsie bronchiali hanno evidenziato negli



Figura 9

Indicatori dello stress ossidativo e delle difese

#### ↑ Stress ossidativo



- ↑ 8-isoprostano (aria esalata, BAL, condensato esalato, sputo indotto)
- ↑ Perossido di idrogeno (condensato esalato, sputo indotto)
- ↑ pH condensato esalato
- ↑ Malondialdeide (sputo indotto, plasma, BAL, condensato esalato)
- ↑ Perossidasi/Mieloperossidasi eosinofila (sangue, sputo, BAL)
- ↑ Bromotirosina (BAL e urine)

#### ↓ Difese antiossidanti

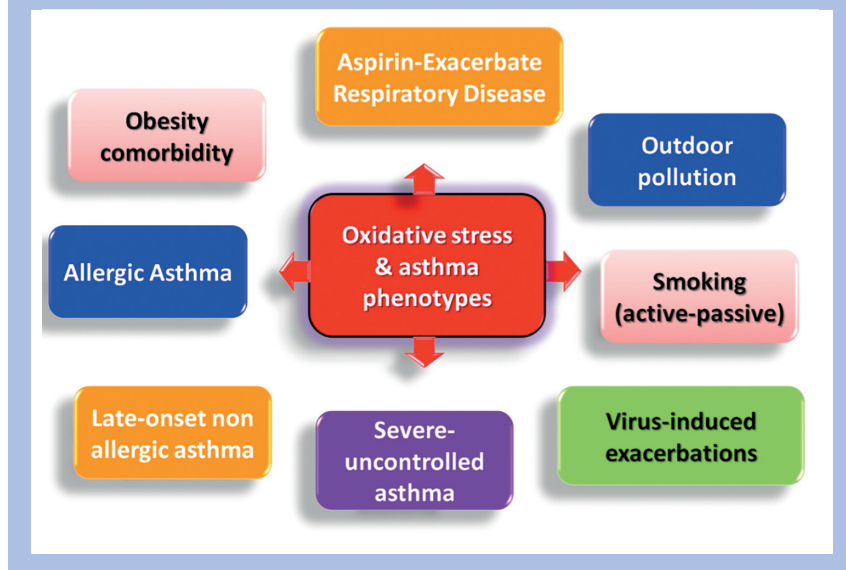


- ↓ Plasma total antioxidant status (TAS)
- ↓ Attività Glutazione perossidasi (GSH-Px), catalasi (CAT), superossido dismutasi (SOD) (plasma, BAL, aria esalata)
- ↓ plasma total thiol (PTT)
- ↓ livelli sierici Vitamine A, C, E, selenio, zinco



Figura 10

## Stress ossidativo in alcuni fenotipi di asma



asmatici con forme moderate-severe (in particolare nei fumatori) ridotti livelli di HDAC2 (96) e in un esperimento su cellule epiteliali in vitro Ito e coll, bloccando selettivamente la HDAC2, hanno dimostrato un incremento nell'espressione dei geni per GM-CSF e una ridotta sensibilità ai corticosteroidi (48). Topi HDAC2<sup>-/-</sup> mostrano elevato reclutamento di neutrofili nelle vie aeree in risposta ai corticosteroidi. Recentemente, anche in bambini asmatici esposti in fumo passivo e con alti livelli di stress ossidativo (aumento livelli di malondialdeide) è stata evidenziata una ridotta efficacia della HDAC2, condizionante scarsa risposta ai cortisonici inalatori e peggior controllo/severità della malattia (97). Negli ultimi anni, una serie di lavori nel modello murino ha evidenziato

il ruolo essenziale del sistema Keap1-Nrf2 (Figura 4) nel regolare la risposta ai corticosteroidi via HDAC2. Il deficit di Nrf2 conduce, infatti, a steroidoresistenza determinando sia la riduzione di HDAC2, verosimilmente anche attraverso modifiche post-traslazionali (98) che l'attivazione basale di NF-κB, con l'aumentato afflusso di neutrofili nei polmoni, nota causa di "resistenza" agli steroidi. D'altro canto, la ridotta attività di HDAC2 determina acetilazione e minor stabilità di Nrf2, con conseguente riduzione delle difese antiossidanti (99) (Figura 12).

Lo SO determina ridotta risposta ai cortisonici non solo mediante inibizione dell'istone deacetilasi 2, ma anche tramite modifiche post-traduzionali del recettore per i glucocorticoidi, che ne ri-

ducono la funzione (verosimilmente per l'ossidazione dell'aminoacido cisteina indotta dai ROS), come recentemente evidenziato in bambini affetti da asma "difficult-to-treat" (49). Va infine ricordato che anche in pazienti con asma ben controllato, in regolare terapia con steroidi inalatori, possono essere comunque evidenziati nelle vie aeree livelli elevati di stress ossidativo (100,101). Per quanto riguarda altri farmaci, i cysleucotrieni, in primis LT C<sub>4</sub>, rappresentano trigger assai importanti di danni cellulari e al DNA mediati da SO (102); anche se in molti lavori "face to face" montelukast appare generalmente meno efficace come controller rispetto agli ICS nell'asma lieve persistente, alcuni fenotipi (asma nei fumatori, "obese-asthma", AERD, "small airways disease", asma da esercizio fisico ecc), non sorprendentemente caratterizzati da alti livelli di stress ossidativo, sembrano rappresentare un potenziale bersaglio per i farmaci antagonisti dei Cys-LT (103). Va peraltro segnalato che alcuni studi (104,105) non hanno evidenziato da parte di montelukast un'azione significativa nel ridurre i livelli di SO. Recentemente (106) è stato dimostrato, in asmatici non obesi, che un pasto ricco di grassi induce infiammazione neutrofila delle vie aeree (espettorato indotto), attivazione dell'immunità innata (aumentata espressione di TLR-4) e ridotta efficacia non solo dei cortisonici inalatori ma anche della terapia con broncodilatatori (perdita di reversibilità). Per quanto riguarda Omalizumab, sono presenti in letteratura pochissimi dati (107). In uno studio condotto in asmatici allergici alla parietaria,



Nicola Schichilone (108) ha dimostrato che un ciclo di immunoterapia sottocutanea pre-stagionale è in grado di ridurre i markers di stress ossidativo, durante e dopo la stagione pollinica.

### DIETA E STRESS OSSIDATIVO: ASPETTI GENERALI

La restrizione calorica, intesa come riduzione dell'introduzione di calorie senza malnutrizione, si è ripetutamente dimostrata una strategia in grado di prolungare la sopravvivenza in differenti specie, dai moscerini ai roditori e ai primati (109). Questo risultato si deve in gran parte alla riduzione dei livelli di stress ossidativo: la restrizione calorica riduce, infatti, la produzione di ROS, aumenta il sistema riduttivo delle membrane plasmatiche, migliora il segnale insulinico e attenua l'infiammazione (110). La maggior parte di tali effetti è stata attribuita all'attivazione di Nrf2. Diversi lavori e alcune revisioni sistematiche concordano sul fatto che la dieta mediterranea (inclusa da UNESCO nel 2010 nella lista dei patrimoni culturali immateriali dell'umanità), ricca di antiossidanti diretti e indiretti, tra i quali vitamina C, vitamina E, polifenoli & flavonoidi, olio di oliva, pesce, carotenoidi, isotiocianati e acidi grassi poli-insaturi omega-3, in aggiunta ad una importante quota di carboidrati complessi (zuccheri forniti da farinacei) e fibra alimentare, si associ a un miglioramento della capacità antiossidante totale e a ridotta incidenza di patologie strettamente correlate allo stress ossidativo (111). Analogo potere antiossidante sembrano possedere la

dieta "paleolitica" e quella di Okinawa (112,113). Come per gli effetti positivi della restrizione calorica (e del regolare esercizio fisico, di entità moderata), anche per le diete "salutari" si è ipotizzato negli ultimi anni un ruolo cruciale del sistema regolatorio Nrf2 (Figura 13). Infatti, in tali diete è abbondante il contenuto di nutrienti dalla dimostrata azione "attivante" Nrf2: polifenoli/flavonoidi, isotiocianati da crucifere (sulforafano in primis), composti vegetali solforati (aglio, cipolla), carotenoidi, tocoferoli e tocotrienoli, terpenoidi e  $\Omega$ -3 (DHA ed EPA). Ovviamente alcuni di questi nutrienti possiedono anche attività, sia antiossidanti dirette (scavengers dei ROS) che antiinfiammatorie, indipendenti dall'attivazione di Nrf2 (17). Anche in

soggetti anziani un elevato intake quotidiano di frutta e vegetali si associa con un miglioramento dell'equilibrio ossidoriduttivo rispetto a coetanei con diete a basso tenore di frutta e verdura (114).

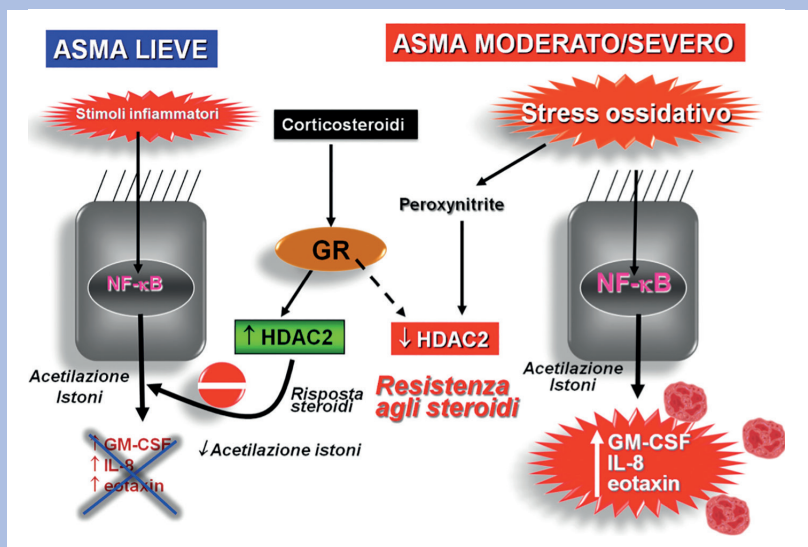
### PERCHÉ E QUANDO CONSIDERARE UNA "INTEGRAZIONE"?

Ovviamente l'utilizzo di antiossidanti "sintetici" non rappresenta una alternativa al quotidiano consumo di frutta e vegetali. Va però ricordato che gran parte della popolazione mondiale non assume le dosi consigliate di frutta e verdura, e questo accade anche nei paesi industrializzati: negli Stati Uniti l'80% dei bimbi/adolescenti e il 68% degli adulti



Figura 11

Resistenza agli steroidi negli asmatici

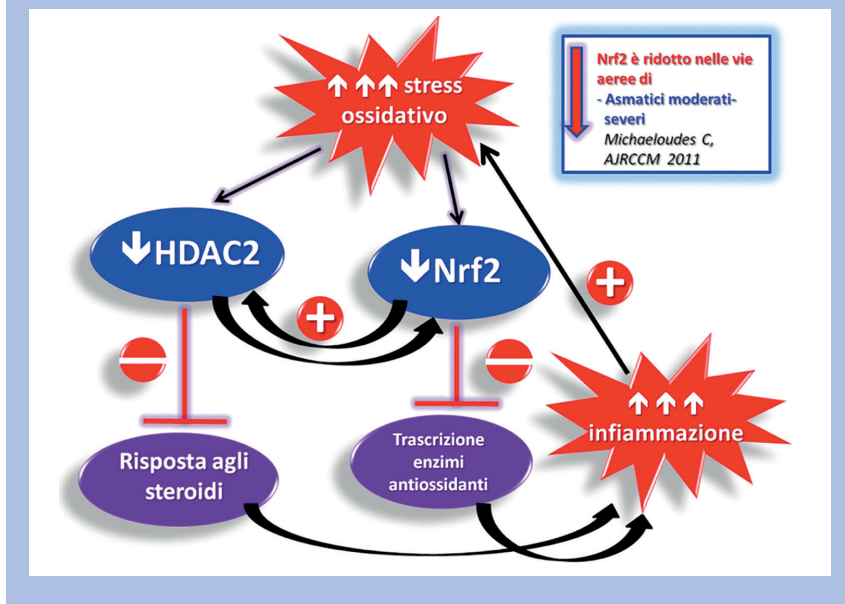


Tratta da Barnes PJ, JACI 2013 con modifiche



Figura 12

HDAC2 e riduzione delle difese antiossidanti



non assume le canoniche 5 porzioni/die. Dal 2000 ad oggi gli italiani hanno “rinunciato” a circa 1.700 tonnellate di frutta e verdura (-18%). La contrazione dei consumi pro capite ha riguardato soprattutto la frutta (calata del 15% rispetto al 2000), ma non ha risparmiato nemmeno gli ortaggi (-6%). Inoltre l’impoverimento del suolo, la coltivazione in serre, i processi di raffinazione, trasformazione, conservazione, cottura e le talora notevoli, distanze tra luogo di produzione e di consumo dei cibi, possono determinare una riduzione del contenuto di antiossidanti (soprattutto polifenoli) negli alimenti. Infine va ricordato che la maggioranza della popolazione mondiale è esposta a livelli elevati d’inquinamento indoor e/o outdoor. Non

sorprendentemente, quindi, milioni di persone assumono quotidianamente antiossidanti sintetici nel tentativo di ridurre lo stress ossidativo, di modulare/ritardare i processi d’invecchiamento e di migliorare la salute. Negli USA, i supplementi antiossidanti rappresentavano già a fine secolo scorso un mercato di oltre 7 miliardi di dollari (oltre 30 miliardi nel mondo) (10). Va subito precisato che, per quanto riguarda l’uso degli antiossidanti sintetici, in primis vitamine A, C e E, la letteratura scientifica non evidenzia, nella prevenzione/terapia delle malattie croniche (caratterizzate da alto stress ossidativo/infiammazione), risultati paragonabili a quelli delle diete “antiossidanti” citate in precedenza. Al contrario, molti studi clinici nei quali

ai partecipanti sono stati somministrati uno o più antiossidanti sintetici non hanno evidenziato risultati positivi. In particolare, nessuno studio che prevedeva come endpoint primari mortalità e morbidità ha mostrato risultati positivi con la supplementazione di antiossidanti come vitamina C, vitamina E, o  $\beta$ carotene (115). Un punto di non ritorno è costituito da alcune revisioni sistematiche, tra cui la famosa meta-analisi di Bjelakovic, nella quale gli autori evidenziavano che la supplementazione “chimica” per lungo periodo con antiossidanti, soprattutto liposolubili (beta carotene, vitamina A, e vitamina E) si associava a maggior mortalità, almeno nelle popolazioni con adeguato intake di antiossidanti con la dieta (116). Risultati contrastanti sono stati evidenziati in studi con supplementazione di Vitamina C e selenio. Per comprendere le “tribolazioni” degli studi con antiossidanti sintetici, “scavengers” diretti dei ROS, occorre ripensare al ruolo dello stress ossidativo nei sistemi biologici, alle funzioni “fisiologiche” dei radicali liberi e al concetto di “ormesi”. Con il termine di ormesi si indicano gli effetti positivi derivanti dalla risposta di un organismo a stress di bassa intensità (117,118). I ROS non presentano solo aspetti negativi, ma giocano un ruolo essenziale nelle normali funzioni cellulari, incluse differenziazione, proliferazione, invecchiamento e processi di riparazione. NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sono poi importanti secondi messaggeri. Va ricordato che le cellule fagocitarie coinvolte nella risposta immune primaria (neutrofili, monociti o macrofagi) sintetizzano radicali liberi come parte dei processi di difesa contro



organismi patogeni e cellule danneggiate, tra cui quelle precancerose/cancerose. Inoltre, lo stress ossidativo stimola la produzione di citochine anti-infiammatorie, all'interno di un feedback negativo atto a controllare le risposte flogistiche (13). Questa nuova visione dello stress ossidativo può spiegare perché l'utilizzo cronico per via sistemica di antiossidanti "diretti" (soprattutto vitamine) non necessariamente produca effetti benefici e anzi possa associarsi a stress "riduttivo" potenzialmente dannoso e a effetti finali pro-ossidanti (10). L'assunzione di un singolo antiossidante, soprattutto ad alte dosi, può alterare il sistema di difesa cellulare, modificare l'apoptosi delle cellule e ridurre la sintesi di antiossidanti endogeni (10). Sicuramente più promettente appare quindi un approccio che porti all'upregulation di network endogeni di antiossidanti, in grado di assicurare una più profonda e prolungata (lunga emivita) protezione cellulare rispetto alla supplementazione con antiossidanti diretti. Il fattore di trascrizione Nrf2 è emerso recentemente come il "master regulator" delle difese antiossidanti cellulari, ideale bersaglio di antiossidanti "indiretti", in grado di mantenere l'omeostasi ossidoriduttiva senza danneggiare il consolidato network delle difese antiossidanti (Figura 14). A basso dosaggio molti nutrienti noti come "antiossidanti" (sulforafano, curcuma, resveratrolo, ecc) possiedono caratteristiche "ormetiche", inducendo, infatti, un'iniziale formazione di ROS a livello dei mitocondri e una successiva risposta adattativa a tale stress, con attivazione di fattori di trascrizione, tra cui Nrf2, che inducono l'espressione

di enzimi antiossidanti (10,17). Molti "attivatori" di Nrf2 sono sostanze naturali, di derivazione vegetale, ma altri sono composti chimici non presenti in natura. Recentemente è stato approvato anche in Italia l'utilizzo nella sclerosi multipla di un farmaco per via orale, il dimetilfumarato, che, legandosi a KEAP-1 consente la traslocazione nel nucleo di Nrf2, fornendo alle cellule dell'organismo una difesa fisiologica dall'infiammazione e dallo stress ossidativo tipici di questa malattia (119).

### STRESS OSSIDATIVO, DIETA, SUPPLEMENTAZIONE: E NELL'ASMA?

Il "drammatico" incremento di prevalenza dell'asma che si è verificato negli ultimi decenni nei paesi industrializzati

e, più recentemente, nei paesi che hanno acquisito uno stile di vita "occidentale", suggerisce l'importanza, nell'esordio e nello sviluppo della malattia, di fattori ambientali (anche attraverso meccanismi epigenetici), tra cui l'alimentazione. Alcuni Autori hanno sostenuto l'ipotesi che la dieta occidentale, caratterizzata da alti livelli calorici, ricca di grassi e cibi processati/raffinati e povera di nutrienti antiossidanti (frutta e verdura!), abbia notevolmente contribuito all'"epidemia" di asma (e obesità!) (120). Soprattutto gli studi in età pediatrica hanno evidenziato una correlazione tra dieta occidentale e maggior rischio di asma e iperreattività bronchiale (121,122) Anche se nell'adulto i differenti pattern dietetici non sempre correlano con maggior prevalenza di malattia, la maggioranza dei lavori ha però identificato nella dieta

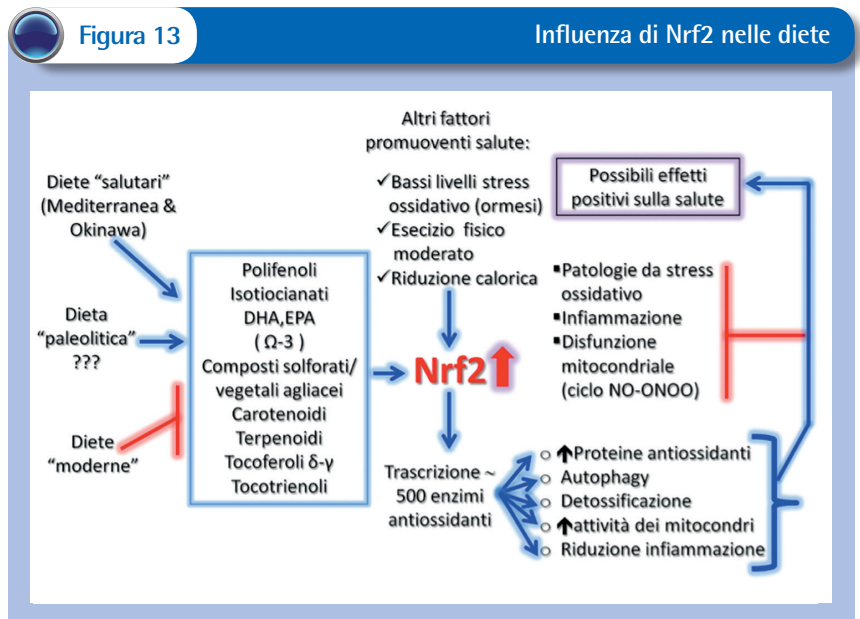
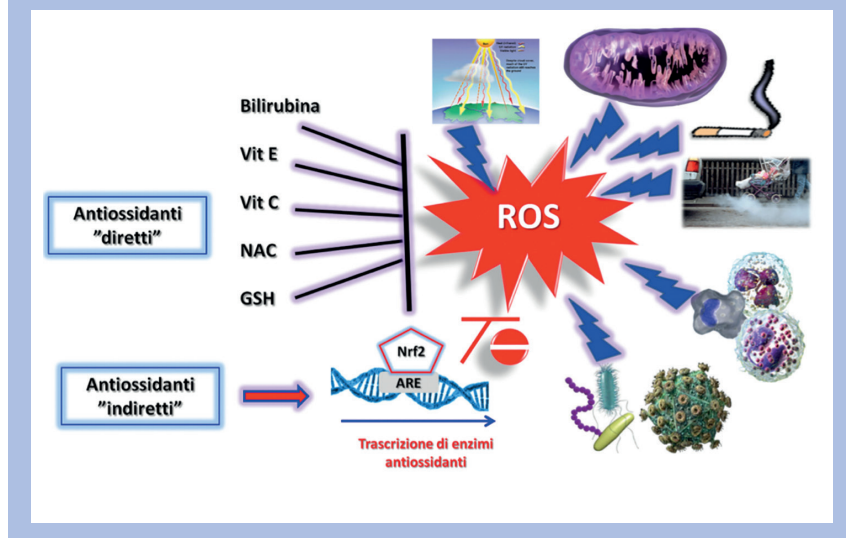




Figura 14

Network delle difese antiossidanti dirette e indirette



“occidentale” un importante fattore di rischio per aumentata severità dell’asma (123,124) e maggior frequenza di riacutizzazioni (125). In aggiunta, un challenge con un pasto “fast food”, ricco di grassi, si associa a significativo peggioramento dell’inflammatione neutrofila delle vie aeree (87). Un elevato intake di grassi saturi attiva, sia a livello delle vie aeree che sistemico, la risposta immune innata, attraverso i toll-like receptor 4, induce una cascata infiammatoria guidata da NF-kB, con un pattern infiammatorio tendenzialmente più neutrofilico, notoriamente meno responsivo agli steroidi (126,87). Un continuo surplus calorico/metabolico ovviamente rappresenta anche il principale fattore di rischio per obesità: il tessuto adiposo è metabolicamente assai attivo e rilascia, fra l’altro, sia mediatori pro-infiamma-

tori come IL-6, TNF- $\alpha$  e PCR, che adipochine come la leptina (d’importanza cruciale nei pathways dell’immunità innata) (79,85). Le popolazioni dei paesi occidentali hanno inoltre aumentato il loro consumo di n-6 PUFA e, parallelamente, ridotto l’introduzione di n-3 PUFA (127); alcuni studi sperimentali hanno evidenziato che i n-3 PUFA sono in grado di ridurre la produzione di prostaglandine pro-infiammatorie e di leucotriene B<sub>4</sub>, e l’espressione di NFkB, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e molecole di adesione, ma va segnalato che i dati sulla supplementazione nei soggetti asmatici con omega-3 sono contrastanti (128, 129). Infine, alcuni studi hanno correlato una maggior prevalenza e severità dell’asma con ridotti livelli di Vitamina D, in parte attribuibili a modifiche dietetiche. Tra i fattori dietetici “protettivi”, la re-

strizione calorica ha evidenziato effetti positivi su infiammazione, stress ossidativo e sintomi/controllo anche in pazienti asmatici, soprattutto sovrappeso/obesi (130). Una recente meta-analisi, condotta su adulti e bambini, che ha analizzato 12 coorti, 4 studi di popolazione controllati e 26 studi cross-sectional ha evidenziato che il consumo di frutta e verdura correla inversamente con il rischio di asma (131), e questi dati si vanno ad aggiungere a quelli degli studi che hanno valutato la dieta mediterranea (132-135). Recentemente, una analisi accurata delle esistenti revisioni sistematiche sui rapporti tra dieta e asma, condotta secondo le linee guida PRISMA selezionando lavori con score AMSTAR > 32, ha evidenziato una chiara relazione inversa tra asma e consumo di frutta/aderenza a una dieta di tipo mediterraneo (136). Analoga relazione inversa con asma era evidente per il contenuto nella dieta di vit C, E e D. Alcuni lavori hanno mostrato, soprattutto negli adulti, una chiara correlazione tra alta aderenza a una dieta di tipo “mediterraneo” e comunque ricca di frutta e vegetali e maggior controllo/ridotta severità dei sintomi, minore frequenza delle riacutizzazioni e miglioramento della funzione respiratoria (132,133,137-139). Recentemente, il gruppo australiano di Peter Gibson, in un trial randomizzato controllato, ha evidenziato che una dieta ad alto contenuto di antiossidanti (frutta e verdura) rispetto a una a basso contenuto si associa a una miglior funzione respiratoria, a minori sintomi e a ridotto rischio di riacutizzazioni (140). In una recente meta-





analisi (134), Nurmatov evidenzia che l'aderenza alla dieta mediterranea durante la gravidanza si associa a una riduzione di asma prescolare del 78% (!) e di atopia del 45%. In particolare, alcune popolazioni di asmatici, caratterizzate da esposizione ad alti livelli di stress ossidativo, hanno dimostrato di trarre particolare beneficio da tale approccio dietetico (ricordo soprattutto i fumatori attivi e passivi, gli asmatici obesi e i pazienti esposti ad alti livelli di PM, ozono e biomasse) (141). Se ci concentriamo sul contenuto nella dieta di particolari sostanze fitochimiche, in un lavoro del 2015 la supplementazione dietetica con sulforafano (142) ha migliorato (valore medio del 21%) la reattività bronchiale nel 60% degli asmatici studiati, verosimilmente mediante l'attivazione del sistema Nrf2. In un lavoro finlandese su oltre 10000 soggetti adulti, l'introduzione con la dieta di quercetina si mostrava protettiva sull'incidenza di asma (143). In 300 asmatici adulti, un moderato-alto contenuto dietetico di isoflavoni di soia correlava con migliore funzione respiratoria e buon controllo della malattia (144). In adulti asmatici, un alto tenore dietetico di pomodori (licopene) si correla positivamente con una miglior funzione respiratoria e con riduzione dell'infiammazione neutrofila (145,146). Va infine ricordato il ruolo della curcumina, un estratto dalla *Curcuma longa*, parte integrante della medicina e fitoterapia di molti paesi del Sud-Est asiatico. La curcumina è un attivatore naturale di Nrf2 e ciò spiega le capacità antiossidanti e antiinfiammatorie (inibizione  $TNF-\alpha$  e  $NF-\kappa B$ ) della

molecola. Alcuni recenti lavori condotti su popolazioni di asmatici asiatici hanno evidenziato un significativo miglioramento dei sintomi e della funzione respiratoria con una dieta ricca di curcuma, soprattutto nei pazienti fumatori e over 65 (147). L'asma appare un "bersaglio" ideale per un'eventuale supplementazione, dati i livelli elevati di stress ossidativo che la caratterizzano, soprattutto in pazienti con alimentazione non corretta. Nonostante bassi valori plasmatici di vitamine "antiossidanti" rappresentino un fattore di rischio per patologie croniche ostruttive delle vie aeree (148,149), in diversi lavori la supplementazione con vitamine e omega-3 ha evidenziato effetti al più modesti (150-153) e, talora, dannosi (154,155).

Recentemente, in una revisione della letteratura su dieta ed asma, gli autori concludono che "...there is insufficient evidence to recommend the use of any vitamin supplement for the prevention or treatment of asthma" (156). Per quanto riguarda i contraddittori risultati con la supplementazione di Vitamina E, è possibile che giochino un ruolo le differenti isoforme della vitamina (157). I risultati migliori con le vitamine antiossidanti sono stati sicuramente ottenuti in studi su popolazioni a rischio, in quanto caratterizzate da ridotto apporto di antiossidanti con la dieta e alta esposizione a fonti ambientali di ROS. Alcuni studi hanno valutato il ruolo dell'introduzione di antiossidanti nella dieta di bambini maggiormente vulnerabili per

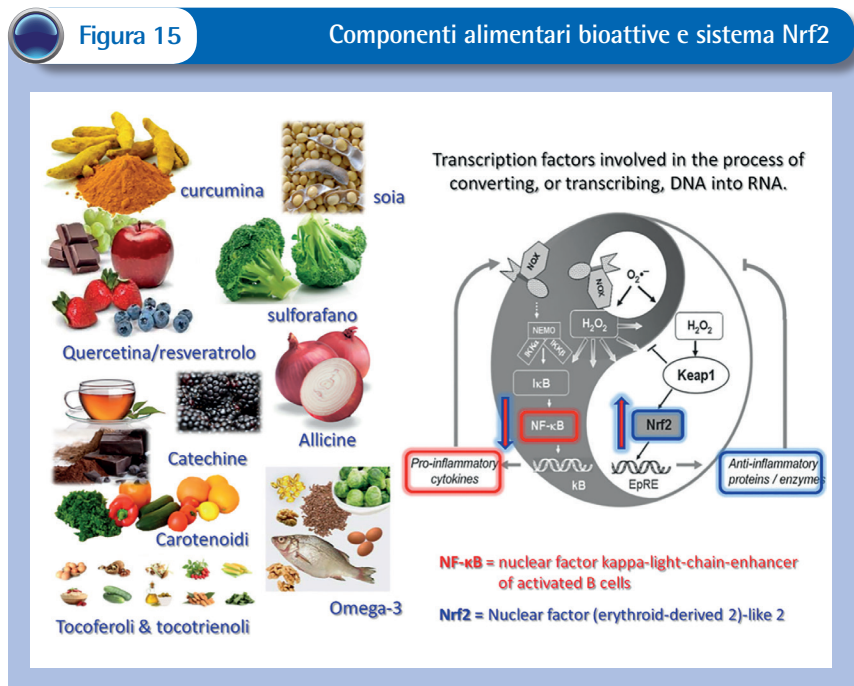
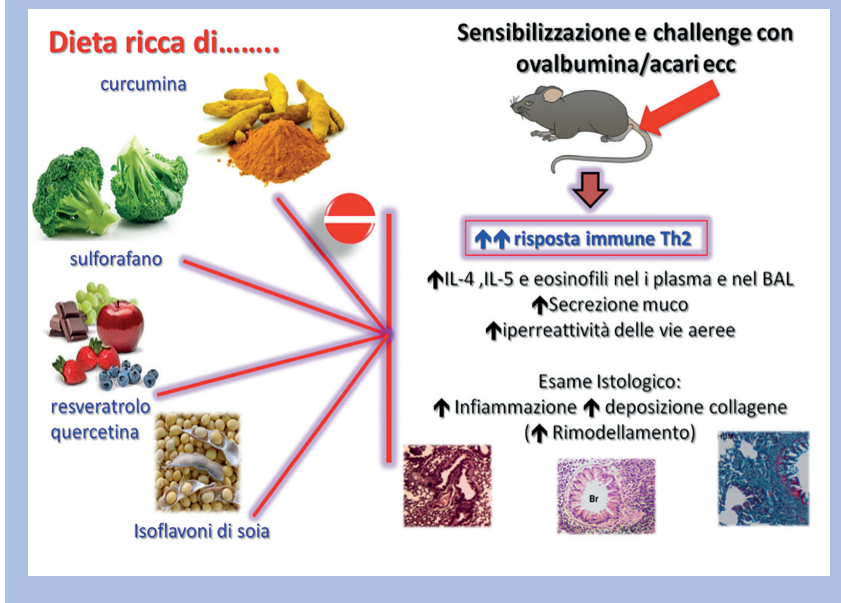




Figura 16

Componenti dietetiche bioattive e modello murino di asma allergico



Va però ricordato che alcune sostanze (vedi ad esempio curcumina e sulfurafano) presentano anche un'attività antiossidante diretta, come scavengers dei ROS (10). La vitamina E ha dimostrato di poter stimolare Nrf2, ma questo soprattutto grazie a  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferolo, mentre  $\alpha$ -tocoferolo, la comune forma di vitamina E presente nei supplementi, esplica solo una modesta attività di induzione di Nrf2 in vivo (17,163). Recentemente, nel modello murino  $\gamma$ -tocotrienolo si è dimostrato in grado di ridurre i livelli di NFkB e di aumentare quelli di Nrf2 nei tessuti bronchiali, rispetto a  $\alpha$ -tocoferolo e prednisolone (164). Negli ultimi anni alla vitamina D è stata riconosciuta una attività antiossidante, che si svolge anche attraverso la stimolazione di Nrf2-keap-1 (165). Analoghe considerazioni valgono per lo zinco, noto induttore del pathway ARE-Nrf2 (166). Ridotti livelli ematici di magnesio correlano nel modello murino con alti livelli di stress ossidativo. Sempre nel modello murino (animale sensibilizzato con ovoalbumina, acaro o altri allergeni e quindi sottoposto a challenge per via inalatoria), diversi lavori hanno evidenziato che il pretrattamento con polifenoli, curcumina e sulfurafano è in grado di esplicare un'azione anti-allergica e anti-infiammatoria (riduzione espressione di NF-kB, TNF- $\alpha$  e citochine Th2), migliorare la reattività bronchiale, ridurre la produzione di muco e i fenomeni di rimodellamento delle vie aeree (167-171) (Figura 16).

Se consideriamo poi il ruolo che stress ossidativo e riduzione del fattore di

le condizioni sfavorevoli di esposizione ambientale e per la presenza di polimorfismi genetici (158). Romieu e coll, in uno studio randomizzato in doppio cieco vs placebo, hanno dimostrato che in bambini con asma moderato/grave con supplementazione giornaliera di vitamine (50 mg/die di vitamina E e 250 mg/die di vitamina C) non erano presenti alterazioni funzionali spirometriche al contrario riscontrabili nel gruppo di asmatici trattati con placebo (159). In questi ultimi i livelli di ozono un giorno prima della spirometria erano inversamente associati in modo significativo a una riduzione di FEF 25-75, FEV1 e PEF. I risultati dello studio suggeriscono che la supplementazione con antiossi-

danti potrebbe modulare l'impatto dell'esposizione all'ozono sulle piccole vie aeree di bambini asmatici e prevenire un ridotto sviluppo della funzione respiratoria, noto rischio per insorgenza di BPCO (160).

**ANTIOSSIDANTI "INDIRETTI" NELL'ASMA**

Negli ultimi dieci anni ha suscitato molto interesse il possibile utilizzo, anche nell'asma, di nutrienti e sostanze fitochimiche con nota azione antiossidante "indiretta" (17,161,162), in grado di attivare Nrf2 (con conseguente azione anti-infiammatoria da inibizione di NF-kB) (Figura 15).



trascrizione Nrf2 rivestono nei meccanismi della steroido-resistenza, vanno ricordati alcuni studi, sia nel modello murino sia su cellule umane (cellule epiteliali e macrofagi alveolari), che hanno valutato i risultati della supplementazione di antiossidanti indiretti sul ripristino dell'azione dell'istone deacetilasi e conseguente "restore" dell'attività dei corticosteroidi (96,172). Molto "intrigante" è l'azione (172) che la curcumina ha evidenziato in vitro (monociti umani esposti a fumo di tabacco), con possibili implicazioni terapeutiche nelle forme asmatiche resistenti agli steroidi (98); quest'aspetto è condiviso con altri polifenoli, ad esempio resveratrolo, quercetina, catechine e con il sulforafano (96) (Figura 17), anche se per quest'ultimo e per la curcumina l'azione antiossidante/antiinfiammatoria è solo parzialmente attribuibile ad attivazione del sistema Nrf2/Keap-1.

Inoltre, dato il ruolo delle infezioni respiratorie virali (principale causa di esacerbazioni dell'asma) nell'induzione di una flogosi generalmente poco responsiva ai corticosteroidi, particolarmente "intrigante" è l'attività inibitoria sulla replicazione dei virus (RV, RSV, influenza A) che resveratrolo, quercetina, sulforafano, curcumina e isoflavoni hanno evidenziato in studi su cellule epiteliali bronchiali, sia nel modello murino sia in quello umano (173-176); questo dato appare molto interessante negli asmatici, soprattutto allergici, in genere caratterizzati da una ridotta risposta immunitaria innata ( $\downarrow$ IFN- $\gamma$ ) nei riguardi dei virus respiratori (ad esempio rhinovirus e virus influenza-

li). Ultimamente, nei meccanismi della steroido-resistenza, è stato indagato anche il ruolo del deficit di vitamina D: negli asmatici bassi livelli di vitamina D si associano, infatti, a ridotta risposta ai corticosteroidi. Cellule CD4+ T di soggetti cortisone-resistenti non sono in grado di produrre adeguati livelli di IL-10 dopo stimolazione in presenza di desametasone, e questo fenomeno è superato con la somministrazione di vitamina D (177,178). La Vit D ha inoltre dimostrato effetti di potenziamento dell'azione dei corticosteroidi nei monociti di pazienti asmatici (sia steroido-sensibili che steroido-resistenti), come dimostrato dall'incremento di produzione di MKP-1, fosfatasi che inattiva

selettivamente p38 MAPK, con conseguente inibizione della produzione di citochine proinfiammatorie in risposta a desametasone, dopo pretrattamento con vit D. Infine, va anche ricordato infine il ruolo protettivo che la vitamina D esercita sui potenziali effetti avversi dei corticosteroidi, topici e sistemici, a carico del metabolismo osseo (179). Recentemente (180), uno studio condotto nell'Istituto Pio XII di Misurina (1756 metri sopra livello del mare) su bambini con asma moderata/severa, allergici agli acari, ha valutato l'efficacia di un supplemento nutraceutico "antiossidante" (a base di curcumina Meriva, resveratrolo, isoflavoni di soia, vit D, zinco, magnesio e selenio) sui livelli di

**Figura 17** Azione dei polifenoli su monociti umani esposti al fumo

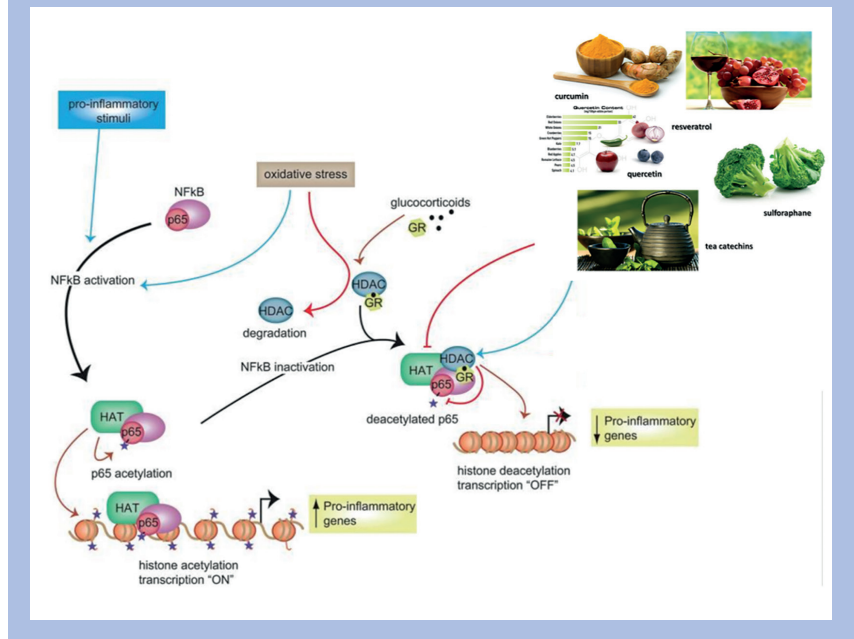
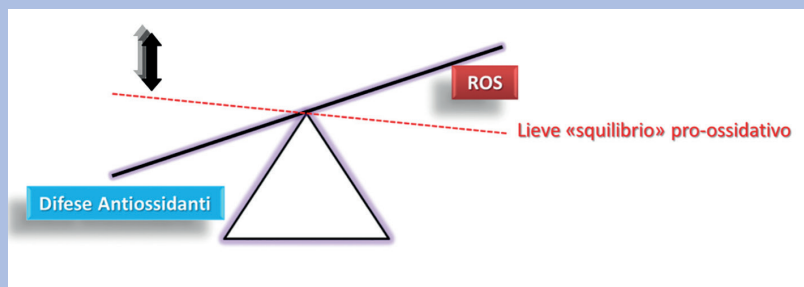




Figura 18

Stress ossidativo



NO nell'aria esalata. Precedenti lavori condotti nello stesso centro avevano evidenziato una riduzione dei livelli di FeNO (e dei markers di stress ossidativo) entro due settimane di permanenza ad alta quota, peraltro con raggiungimento di un plateau dei livelli, senza ulteriore riduzione nonostante soggiorno più prolungato in ambiente mite-free. Dopo 4 settimane di supplementazione "nutraceutica" i valori di FeNO si sono significativamente ridotti rispetto al gruppo controllo (verosimile stimolazione di Nrf2, con conseguente inibizione di citochine pro-infiammatorie e riduzione dell'espressione di iNOS, NO sintasi inducibili).

**INTEGRATORI "ANTIOSSIDANTI":  
ALCUNI PUNTI CRITICI**

Diversi studi in vitro e nell'animale suggeriscono un ruolo importante per vari nutrienti, talora con il supporto di studi epidemiologici. Indubbiamente l'impatto positivo di un alto consumo di frutta e verdura appare incontestabile, mentre, per quanto riguarda la supplementazio-

ne "non dietetica" di antiossidanti, vanno segnalati alcuni punti critici:

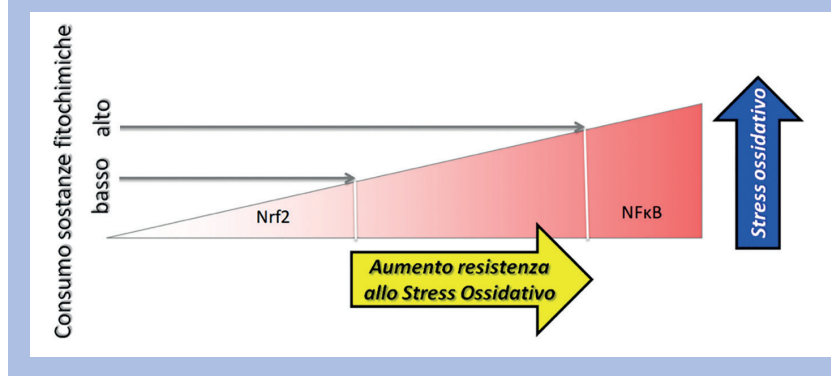
1. Ridotto numero di studi in vivo e mancanza studi RDBPC (Randomized double-blind placebo-controlled).
2. Biodisponibilità? Interazioni tra nutrienti/sostanze fitochimiche? Dosaggi?
3. Safety? Eccessiva attivazione di Nrf2?

Nei prossimi anni saranno ovviamente necessari studi in vivo, sia RDBPC sia "real life" (vedi Misurina), caratterizzati

da durata adeguata, valutazione di outcomes clinici idonei, correzione per potenziali fattori confondenti (stato socioeconomico, BMI, consumo di altri nutrienti, esposizioni ambientali, eventuali polimorfismi genetici) e conoscenza dei valori basali di SO pre-intervento. Per alcuni nutraceutici (ad esempio resveratrolo, quercetina e curcuma), va segnalata una biodisponibilità orale non ottimale, rispetto a quella degli stessi nutrienti assunti con la dieta, a causa dei processi di solfatazione, glucoronazione e metilazione a livello epatico e del ridotto assorbimento intestinale: ricordo che per il resveratrolo la biodisponibilità da vino e succo d'uva è sei volte superiore a quella da compresse! Nel caso della curcuma, si rilevano 50ng/ml nel torrente ematico dopo la somministrazione orale di 12g. Per aumentare la biodisponibilità è possibile associare tra di loro alcuni nutraceutici, ad esempio quercetina, resveratrolo e curcuma: questa strategia ha dimostrato di poter aumentare no-

Figura 19

Sostanze fitochimiche e soglia di stress ossidativo





tevolmente l'assorbimento intestinale di resveratrolo e curcuma (181); la contemporanea assunzione di piperina o l'utilizzo di curcuma Meriva, arricchita con fosfatidilcolina (182), consentono infine un cospicuo incremento della biodisponibilità di curcuma (più di cinque volte superiore per curcuma Meriva). Per quanto riguarda i dosaggi e il profilo di sicurezza, è ormai assodato che, nell'ottica del concetto di "ormesi", alti dosaggi di nutraceutici antiossidanti, diretti o indiretti, sono del tutto inutili e anzi potenzialmente pericolosi, sia per un effetto "pro-ossidante", che per la possibile insorgenza di "stress anti-ossidativo", termine utilizzato per la prima volta da Dundar e Aslan (183) per descrivere gli effetti negativi degli antiossidanti (Figura 18).

Ovviamente il rischio di stress anti-ossidativo sarà maggiore con l'utilizzo di nutraceutici, soprattutto singoli e ad alto dosaggio (aspetti assenti nelle diete "salutari"), in soggetti con forme asmatiche lievi/intermittenti, appartenenti a fenotipi meno "a rischio", con alimentazione corretta e senza significative esposizioni a inquinanti. L'assunzione di un solo antiossidante può alterare il complesso sistema endogeno di difesa antiossidante delle cellule, o modificare il sistema di apoptosi cellulare; la modifica dei livelli di un antiossidante può causare un cambiamento "compensatorio" in altri antiossidanti, e la capacità antiossidante complessiva può risultare ridotta (10). Una dieta ricca di differenti sostanze fitochimiche appare, al contrario, in grado di aumentare la soglia di stress ossidativo in grado di attivare

NFκB; l'aumentata resistenza cellulare allo stress ossidativo risultante dal priming (166) del sistema Keap1/Nrf2/ARE risulta quindi protettiva verso l'infiammazione cronica (Figura 19), e a questo scopo appare sicuramente vincente l'associazione di diverse sostanze antiossidanti a bassi dosaggi, paragonabili a quelli assunti ad esempio con la dieta mediterranea, sfruttando possibili effetti sinergici (vedi quercetina & resveratrolo, che mostra sinergia d'azione su Nrf2, ma solo a basso dosaggio), meccanismi d'azione differenti nell'attivazione di Nrf2 e possibili interazioni potenzianti l'assorbimento intestinale. L'utilizzo di nutraceutici antiossidanti "indiretti", attivanti Nrf2, in combinazione e a bassi dosaggi, può in tal modo assicurare un profilo di safety paragonabile a quello delle stesse sostanze contenute nelle diete più note per il loro effetto salutare. Va però ricordato il possibile ruolo dei polimorfismi genetici (184) e l'aspetto da "Giano bifronte" del sistema Nrf2, ad esempio nella chemio prevenzione delle forme tumorali: decine di lavori hanno evidenziato, negli ultimi anni, che l'attivazione di Nrf2 ha un ruolo protettivo, riducendo il rischio di neoplasie attraverso la limitazione dello stress ossidativo e la prevenzione dei danni del DNA a livello cellulare (185). Inoltre in molti tumori l'induzione Nrf2-mediata di enzimi detossificanti di fase 2 è un momento d'importanza cruciale per combattere mutagenesi e carcinogenesi. D'altro canto, recentemente si è visto che in alcuni tipi di tumori umani Nrf2 appare up-regolato, promuovendo lo sviluppo

delle cellule tumorali e la resistenza ai farmaci chemioterapici. Tali evidenze suggeriscono che processi cellulari di difesa Nrf2-mediati sono essenziali nella protezione dall'insorgenza delle neoplasie, mentre, in alcune forme tumorali e in fasi avanzate della malattia neoplastica, un'aumentata risposta Nrf2 può creare un ambiente intracellulare favorevole per la crescita e la sopravvivenza delle cellule tumorali. Tale concetto è supportato da studi condotti in popolazioni asiatiche con polimorfismi genetici che determinano aberrante produzione di Nrf2 e aumentato rischio, ad esempio di carcinoma polmonare non a piccole cellule (185,186). In presenza di forme tumorali accertate appare prudente, pertanto, evitare supplementazioni indiscriminate di antiossidanti (diretti e indiretti), soprattutto ad alto dosaggio.

## Bibliografia

1. Pearce N, Ait-Khaled N, Beasley R et al. - ISAAC Phase Three Study Group. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*. 2007;9:758-766.

...

186. Cho HY, Kwak MK, Pi J - Nrf2 in host defense: over the rainbow. *Oxid Med Cell Longev* 2013;vol 2013: article ID 975839.

**La bibliografia completa  
è scaricabile dal sito  
[www.lofarma.it](http://www.lofarma.it)**