

Focus su FeNO nel paziente con asma grave

FABIO L.M. RICCIARDOLO,

*Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche
Università degli Studi di Torino*

Il monossido d’azoto, NO, anche noto come ossido nitrico è un radicale libero biatomico gassoso dalla breve emivita. Fino agli anni ‘80 è stato considerato unicamente un inquinante ambientale presente nel fumo di sigaretta e nello smog, responsabile del danneggiamento dello strato di ozono.¹ Nel 1987 è stata dimostrata l’analogia funzionale tra NO e il fattore di rilascio endotelio-derivato (EDFR)² responsabile della vasodilatazione da rilassamento della muscolatura liscia attraverso la formazione di guanosin-monofosfato ciclico (cGMP). Nel 1998 l’elevata rilevanza scientifica di tali studi ha determinato l’assegnazione del premio Nobel agli autori pionieri (Ignarro, Furchgott e Murad) di questa linea di ricerca.

*L’ossido nitrico
modula il tono
broncomotore
ed è presente in
misura maggiore
nell’esalato degli
asmatici*

In ambito pneumologico un sempre crescente interesse si è generato negli anni ‘90, favorendo lo sviluppo di due grandi linee di ricerca: la prima ha evidenziato la presenza di ossido nitrico nell’esalato di soggetti normali e, in misura maggiore, negli asmatici;^{3,4} la seconda ha dimostrato l’attività di NO come neurotrasmettitore e modulatore del tono broncomotore.⁵⁻⁷ Successivamente si è compreso che alla base di queste due risposte, tra loro separate, risiedono differenti attività di due isoforme dell’enzima NO sintetasi.⁸

Sintesi dell’ossido nitrico

Nel polmone l’ossido nitrico è prodotto da diversi tipi cellulari come cellule epiteliali, vascolari endoteliali, infiammatorie e nervose. L’enzima responsabile della sintesi è l’ossido nitrico sintetasi (NOS) che catalizza l’ossidazione dell’aminoacido L-arginina (Fig. 1).

Esistono due isoforme funzionali di tale enzima: una forma inducibi-

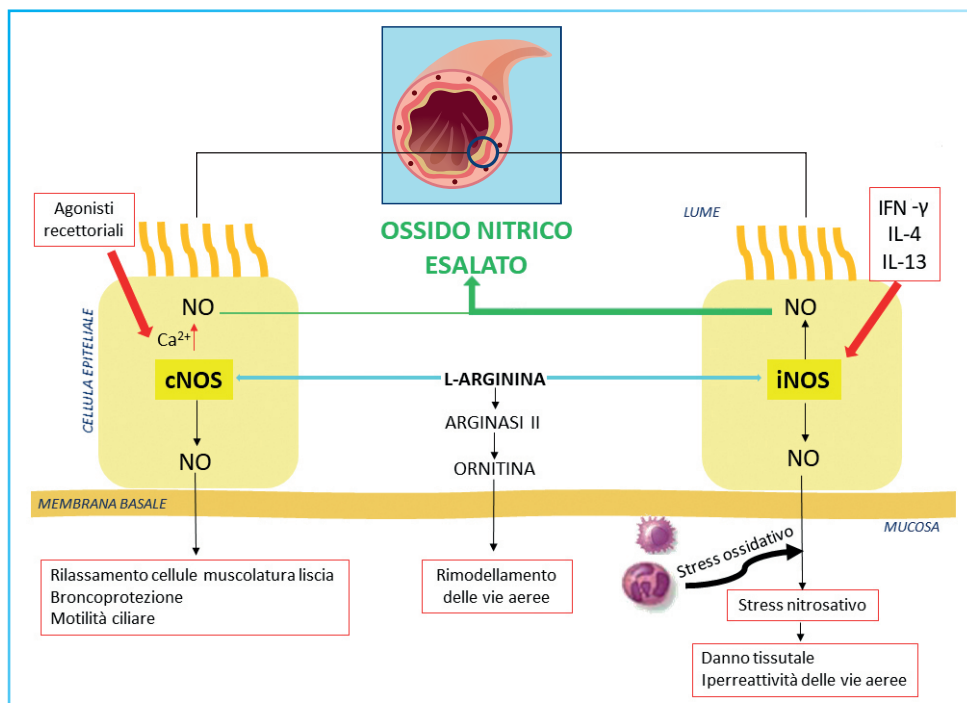


Figura 1. Rappresentazione dei meccanismi di sintesi dell'ossido nitrico (NO) nelle vie aeree. L'attività dell'isoforma costitutiva della NOS (cNOS) è indotta da un'aumentata concentrazione di calcio (Ca^{2+}) intracellulare che segue a un processo di agonismo recettoriale (recettore bradichinina e muscarinico). L'espressione dell'isoforma inducibile (iNOS) è indotta da citochine pro-infiammatorie, quali IL-4, IL-13 e IFN- γ . Quest'ultimo può favorire un'espressione costitutiva dell'iNOS che è responsabile della produzione del 90% circa di NO esalato. Parte dell'ossido nitrico prodotto dall'iNOS, reagendo con le specie reattive dell'ossigeno prodotte da cellule immunitarie (macrofagi e neutrofili) presenti nelle vie aeree, causa stress nitrosativo che si traduce con danno cellulare, alterata funzionalità proteica e iperreattività delle vie aeree. L'amminoacido L-arginina è trasportato all'interno della cellula epiteliale, dove viene utilizzato come substrato dagli enzimi NOS.

le (iNOS) ed una costitutivamente espressa (cNOS) della quale si possono ulteriormente distinguere la NOS-neuronale (nNOS o NOS-1) e la NOS-endoteliale (eNOS o NOS-3).⁹ Queste ultime, attraverso un meccanismo Ca^{2+} dipendente, producono bassi livelli di NO (range di femto- o pico-moli) che prende parte a importanti processi fisiologici quali sviluppo polmonare, rilassamento delle cellule della muscolatura liscia, motilità ciliare e protezione dei bronchi da stimoli broncoconstrictori.

La forma **iNOS** è sintetizzata dalle cellule in risposta a rilascio di citochine (IL-1 β , IFN- γ e TNF- α) indotto da stimoli infiammatori o infettivi e, attraverso un processo Ca²⁺ indipendente, produce quantità nanomolari (10⁻⁹) di NO, che media meccanismi di difesa tipici delle malattie caratterizzate da uno stato infiammatorio cronico.

Recentemente è stato dimostrato *in vitro* che l'espressione di iNOS può essere indotta dall'interleuchina 13 (IL-13), una delle citochine pro-infiammatorie maggiormente responsabili della risposta immunitaria mediata dai linfociti T helper di tipo 2 (Th2).¹⁰ Inoltre, iNOS è il maggior responsabile della concentrazione frazionale di NO misurabile nell'aria esalata dai pazienti (**FeNO**),^{11,12} e la sua attività è ridotta dai corticosteroidi.

Un altro fattore che può influenzare la sintesi di NO da parte delle NOS è rappresentato dall'enzima **arginasi 2**, che catalizza la conversione della L-arginina in ornitina e urea, passaggi necessari per la sintesi delle poliammine, riducendo quindi la disponibilità di substrato alle NOS.

FeNO in asma con fenotipo T2 high

La concentrazione frazionale di ossido nitrico nell'aria esalata (FeNO) è un indicatore di infiammazione delle vie aeree.¹³

Diversi studi hanno dimostrato la correlazione esistente tra elevati livelli di FeNO e alte concentrazioni di eosinofili nel sangue, nell'espettorato, nelle biopsie bronchiali e nel liquido di lavaggio broncoalveolare di pazienti asmatici.^{14,15} Nel 2016 Malinovski *et al* hanno inoltre dimostrato che i pazienti asmatici con alti livelli di FeNO (≥ 20 -25 ppb) e alte conte di eosinofili nel sangue (≥ 300 cell/ μ L) potevano essere maggiormente soggetti a iper-reattività bronchiale e avere forme di asma non controllato.¹⁶

Inizialmente, il FeNO era stato associato all'asma allergica nell'adulto,¹⁷ evidenza supportata da successivi studi che avevano mostrato una positiva correlazione tra livelli di FeNO, eosinofilia sistemica e livelli di IgE sieriche in bambini con asma allergica.¹⁸

Studi recenti hanno riportato che in soggetti asmatici elevati livelli di FeNO ed alte concentrazioni sistemiche di eosinofili o di un marker di infiammazione eosinofila erano tra loro associati, e favorivano una diminuita funzionalità polmonare e un maggior rischio di avere esacerbazioni.^{19,20}

Gli asmatici con FeNO ed eosinofili ematici elevati sono più soggetti ad asma non controllato

Attualmente i due principali gruppi di fenotipi di asma sono identificati sulla base del profilo infiammatorio e sono indicati come "T2 high" e "T2 low".²¹ Il primo è caratterizzato da una infiammazione di tipo eosinofilo, il secondo da un infiltrato cellulare neutrofilico o paucigranulocitico (assenza della componente neutrofilica ed eosinofila).²²

Unitamente alle evidenze riportate in letteratura, la dimostrazione che il FeNO misurato nei pazienti asmatici deriva quasi totalmente dall'attività dell'isoforma iNOS nell'epitelio bronchiale e che l'espressione della stessa è fortemente modulata da IL-13 hanno portato a considerare il FeNO come un importante marcatore della risposta immunitaria di tipo 2, classicamente associata a eosinofilia bronchiale.^{10,23} Ad oggi il FeNO (>30 ppb) è incluso, insieme ad alti livelli di eosinofili nel sangue (>300 cell/μl), alti livelli di IgE (>100 KUI/l) e atopia nei criteri per la definizione di asma T2 high (Fig. 2).

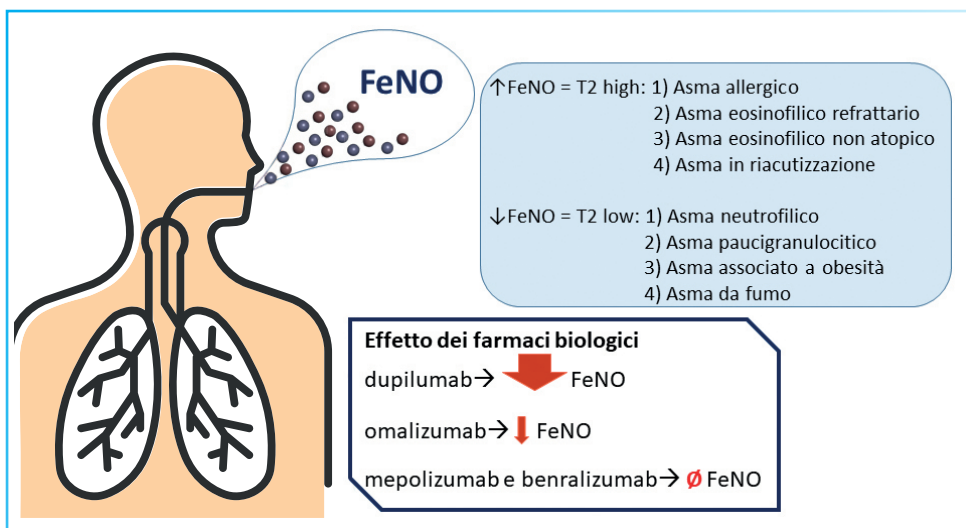


Figura 2. Livelli di FeNO associati a diversi fenotipi asmatici.

↑FeNO: concentrazioni di FeNO >30 ppb (caratteristiche di fenotipo T2 high); ↓FeNO: concentrazioni di FeNO <20 ppb (caratteristiche di fenotipo T2 low). Effetto dei farmaci biologici. Dupilumab è in grado di ridurre marcatamente i livelli di FeNO; omalizumab riduce i valori di FeNO, ma non in maniera marcata; mepolizumab e benralizumab non hanno effetti sul FeNO.

Per quanto riguarda la risposta ai corticosteroidi inalatori (ICS), questa è altamente variabile e dipendente dal fenotipo asmatico preso in considerazione. In generale, gli asmatici caratterizzati da un fenotipo T2

high risultano essere più sensibili alla terapia steroidea, a differenza dei T2 low. Di conseguenza, l'uso del FeNO come bio-marcatore di infiammazione di tipo T2, insieme ad altri biomarcatori, potrebbe rivelarsi utile per identificare pazienti asmatici steroide-sensibili.²⁴

FeNO nella diagnosi dell'asma

L'utilizzo del FeNO come fattore utile nella diagnosi di asma è stato argomento di dibattito negli ultimi anni. Infatti, sebbene fattori antropometrici quali età, genere o altezza possano influenzare le concentrazioni di FeNO,²⁵ le quantità esalate dai pazienti asmatici sono più alte rispetto a quelle riscontrabili nella popolazione non asmatica.^{4,26} Aumentate concentrazioni di FeNO in pazienti con sintomi simil-asmatici favorirebbero la diagnosi di asma²⁷ ed attualmente le linee guida NICE (National Institute for Health and Care Excellence) ne sottolineano il forte potenziale diagnostico.²⁸ A maggior ragione, una recente meta-analisi ha evidenziato come la valutazione del FeNO abbia una capacità predittiva (valori predittivi positivi - PPV) paragonabile a quella fornita dai test di provocazione bronchiale, pur essendo poco invasiva.²⁶

Tuttavia, la valutazione del FeNO integrata con la valutazione cellulare dell'espettorato indotto consente di identificare pazienti con diagnosi di asma associati a flogosi bronchiale eosinofila.²⁹ Il FeNO, infatti, è prodotto soprattutto in seguito ad infiammazione di tipo 2 della mucosa bronchiale,³⁰ quindi basse concentrazioni non escludono la presenza di altri tipi di asma, quali quella neutrofilica.

Un altro fattore limitante è rappresentato dalla bassa specificità del test, in quanto alti valori di FeNO possono essere riscontrabili in soggetti affetti da altre patologie respiratorie come rinite cronica,³¹ rigetto di polmone e disturbi non strettamente legati al tratto respiratorio (dermatite atopica).¹³ Al contrario, è stato dimostrato che si possono raggiungere buoni livelli di specificità e sensibilità nell'identificazione di pazienti asmatici quando il FeNO è associato ad altri test, quali spirometria e test di provocazione bronchiale.²⁸

Le linee guida inglesi **NICE** raccomandano l'utilizzo del FeNO, unitamente ai test di funzionalità respiratoria, per la diagnosi di asma (Fig. 3).²⁸

Secondo tali linee guida, è considerato positivo un test che fornisca un risultato con valori di FeNO >40 ppb per gli adulti e superiore

La valutazione del FeNO ha un forte potenziale diagnostico e una bassa invasività

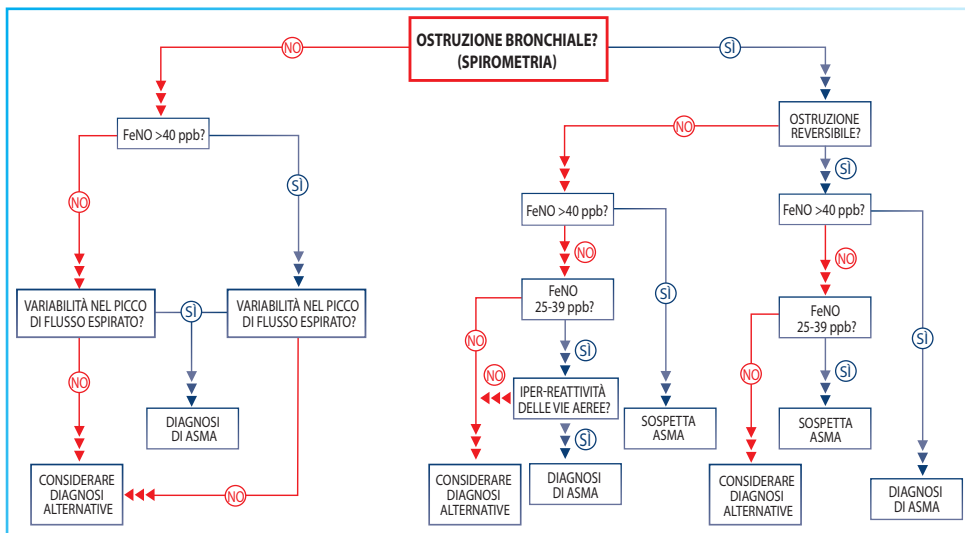


Figura 3. Flow chart relativa all'applicazione delle misurazioni di FeNO nella diagnosi dell'asma (mod. da Ref. 28)

a 35 ppb per i bambini. In alternativa, alcuni autori suggeriscono la valutazione del FeNO in prima istanza, individuando i test di provocazione bronchiale come secondo passaggio per discriminare tra i pazienti asmatici con bassi valori di FeNO ed individui non asmatici.²⁶

Le linee guida **ATS** consigliano l'utilizzo del FeNO, non come singolo test, per la diagnosi iniziale dell'asma e per valutare l'infiammazione delle vie aeree. I cut-off indicati permettono di riconoscere, per quanto riguarda i pazienti adulti, valori di FeNO alti (>50 ppb), intermedi (25-50 ppb) e bassi (>25 ppb).³²

FeNO nella gestione clinica e controllo dell'asma

L'attuale standard di riferimento nella gestione del paziente asmatico concentra l'attenzione sul controllo dell'asma. A tale scopo monitorare lo stato infiammatorio delle vie aeree può rivelarsi fondamentale, in quanto i sintomi non sempre rispecchiano i processi infiammatori che si verificano nell'asma.

I risultati di diversi studi hanno suggerito che le concentrazioni di FeNO possano essere utili nel determinare la responsività al trattamento con

Il FeNO predice la risposta ai corticosteroidi

corticosteroidi. Smith *et al* hanno identificato un cut-off di FeNO di 47 ppb tramite il quale è possibile predire miglioramenti nei valori di FEV₁ e riduzione nelle dosi di ICS.³³ Le linee guida ATS associano valori <25 ppb a una probabile resistenza alla terapia corticosteroidica negli adulti. Contrariamente, misure di FeNO >50 ppb sono sinonimo di responsiveness (Fig. 4).^{26,34,35}

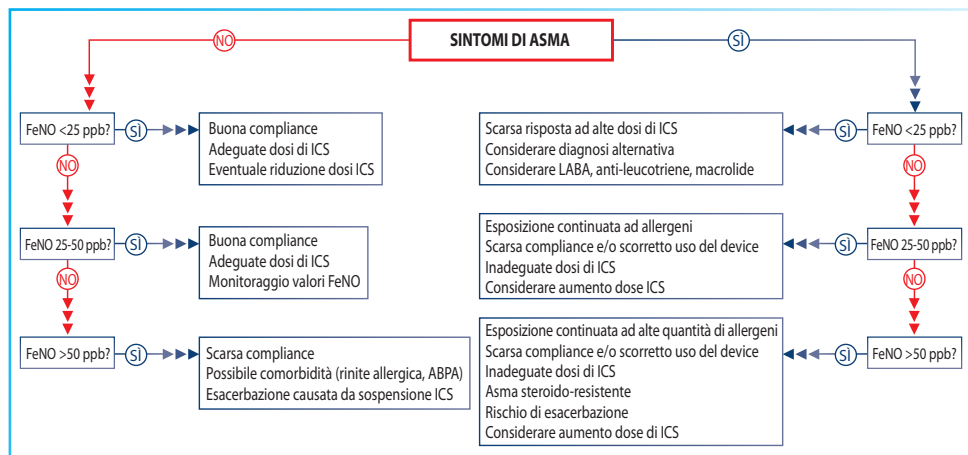


Figura 4. Flow chart relativa all’applicazione delle misurazioni di FeNO nella gestione clinica dell’asma (mod. da Ref. 15)

La letteratura, inoltre, suggerisce che il FeNO possa essere considerato un utile strumento per la gestione clinica dell’asma in specifiche popolazioni di asmatici. Uno studio eseguito dal gruppo di ricerca di Gibson su una coorte di pazienti asmatiche in gravidanza ha dimostrato che una terapia impostata sulla base di misurazione del FeNO e valutazione dei sintomi riduceva le esacerbazioni e le dosi di ICS somministrate.³⁶

In uno studio della durata di 12 mesi, una strategia di aggiustamento terapeutico delle dosi di ICS sulla base dei valori di FeNO e di conta degli eosinofili nell’espettorato portava a una progressiva riduzione della dose di ICS somministrata ad asmatici (lievi e moderati) associata a una riduzione dei sintomi e dei livelli di FeNO ed eosinofili dell’espettorato.³⁷ Inoltre, una recente meta-analisi ha messo in evidenza che una strategia terapeutica facente riferimento ai valori di FeNO o a eosinofili dell’espettorato determinava una diminuzione della frequenza di esacerbazioni in adulti asmatici.³⁸

Valori elevati di FeNO si associano a uno scarso controllo dell'asma

Infine, in un recente studio di *real-life* abbiamo dimostrato che alti valori di FeNO si associano a uno scarso controllo di asma e a un incremento dei sintomi, suggerendo che questo esame è un utile strumento di complemento alla valutazione clinica dell'asma.³⁹

In conclusione, il FeNO può risultare efficace nella gestione clinica dell'asma, principalmente per quanto riguarda la riduzione delle esacerbazioni e l'impostazione della terapia inalatoria. Restano tuttavia necessarie ulteriori indagini per confermare i risultati fino ad ora ottenuti.

FeNO in asma grave

La definizione di asma grave attualmente accettata è quella proposta in un documento congiunto ERS/ATS 2014 secondo cui la gravità dell'asma si giudica sulla base del livello di trattamento necessario per cercare di ottenere il controllo dello stato patologico.⁴⁰ In tal senso, definiamo grave un'asma che abbia richiesto, nel corso dell'anno precedente, trattamento con alte dosi di ICS unitamente a un farmaco sintomatico (LABA, anti-leucotrieni o teofillina) oppure corticosteroidi orali (OCS) per un periodo superiore a 6 mesi/anno.

Diversi studi hanno evidenziato un'associazione tra il grado di infiammazione eosinofila e la gravità dell'asma.⁴¹

Forme più gravi di asma sono anche state associate a una maggior espressione dell'enzima iNOS e a un più alto rapporto tra le concentrazioni di mRNA di iNOS e arginasi 2 nel tessuto epiteliale bronchiale.⁴² Nello stesso studio è stato anche messo in evidenza che nell'epitelio bronchiale di pazienti asmatici gravi esisteva una correlazione tra i livelli proteici e dei trascritti di iNOS con i valori di FeNO.

Tuttavia, l'associazione tra livelli di FeNO e gravità dell'asma, e di conseguenza l'utilizzo del FeNO nella gestione clinica dell'asma grave, è tuttora argomento di dibattito, anche alla luce dell'azione inibitoria esercitata dai farmaci steroidei sull'attività di iNOS.

Esistono però osservazioni che mettono in evidenza una relazione tra la concentrazione di NO nell'esalato e forme di asma più severe. Silkoff *et al* hanno infatti dimostrato che il 50% dei pazienti con un'asma grave steroide-dipendente avevano elevati valori di FeNO.^{12,43} È stato anche riportato che pazienti con asma "late-onset", prevalentemente non atopici, avevano alte concentrazioni di FeNO e di eosinofili nel sangue

e nell'espettorato. L'aumentata espressione di marcatori infiammatori di tipo 2 riscontrata in questa popolazione di asmatici poteva essere in relazione con la gravità dell'asma.

Un'ulteriore ricerca eseguita su pazienti asmatici gravi (SARP) aveva rilevato una corrispondenza tra più elevati valori di FeNO e una maggiore reattività delle vie aeree, aumentata eosinofilia nell'espettorato, atopia, iperventilazione e anche una ridotta percezione dei sintomi.³⁴ Inoltre, sempre nello stesso studio, le misure di FeNO più elevate caratterizzavano gli asmatici gravi maggiormente ostruiti in associazione con un elevato intrappolamento aereo e con un più alto numero di accessi al pronto soccorso.

Tutte queste evidenze sembrano suggerire che il FeNO possa rappresentare un bio-marcatore attendibile per identificare pazienti asmatici con un fenotipo più aggressivo. D'altra parte, l'elevato grado di eterogeneità dell'asma, anche nelle sue forme più severe, rende necessario l'utilizzo di altri biomarcatori, unitamente al FeNO, per la caratterizzazione di determinati fenotipi asmatici.

Recentemente è stata pubblicata una Consensus italiana a firma delle società nazionali italiane SIAAIC e SIP per supportare l'utilizzo del FeNO nella diagnosi e gestione dell'asma e dell'asma grave, e nel guidare la scelta dei trattamenti a base di corticosteroidi o biologici.⁴⁴

FeNO e asma grave in trattamento con farmaci biologici

Sebbene i complessi meccanismi fisiopatologici alla base dell'asma grave non siano tuttora completamente compresi, è unanimemente riconosciuto il ruolo centrale ricoperto da una persistente infiammazione eosinofila associata a una risposta immunitaria di tipo 2.

Oltre agli eosinofili, gli altri marcatori di infiammazione di tipo 2 che sono strettamente associati all'asma includono le IgE sieriche, le interleuchine 4 e 13 e il FeNO.

Sono stati sviluppati diversi farmaci biologici, rappresentati da anticorpi monoclonali diretti verso i principali effettori dell'infiammazione di tipo 2.

Il primo farmaco biologico ad essere approvato in aggiunta alla terapia di mantenimento è stato omalizumab, un anticorpo monoclonale diretto verso le IgE. Diversi studi hanno dimostrato l'azione inibitoria

Il FeNO consente di identificare pazienti con fenotipo asmatico aggressivo

L'ossido nitrico è un gas prodotto dalle cellule epiteliali bronchiali, associato a un'infiammazione di tipo 2

Il FeNO è un biomarcatore oggettivo dell'infiammazione delle vie aeree

L'inibizione dell'IL-4R α permette di ridurre marcatamente i livelli di FeNO

di omalizumab sul FeNO in pazienti con asma grave allergica e in pazienti con asma e aspergilloso broncopolmonare allergica (ABPA),⁴⁵⁻⁴⁷ suggerendo un effetto antinfiammatorio correlato al FeNO (Fig. 2). La possibile relazione tra l'efficacia di questo farmaco con il FeNO è stata esaminata in diversi studi, condotti su pazienti asmatici allergici. Nello studio EXTRA, su una coorte di pazienti con asma grave e scarsamente controllato, livelli di FeNO >19.5 ppb, eosinofili >260 cell/ μ l e di perioistina \geq 50 ng/ml erano in associazione con una maggiore efficacia di omalizumab nel ridurre la frequenza di esacerbazioni.⁴⁸ Il progetto PROSPERO, condotto su pazienti con asma moderata e severa, dimostra che la risposta positiva a omalizumab era indipendente dai livelli di FeNO ed eosinofili del sangue.⁴⁹ I risultati contrastanti qui riportati non permettono a oggi di stabilire una oggettiva utilità del FeNO come bio-marcatore predittivo della risposta al trattamento.

Mepolizumab, un anticorpo specifico per l'interleuchina 5, riduce le riacutizzazioni in pazienti con asma grave, ma non è stato dimostrato alcun effetto sulle concentrazioni di FeNO. La sua efficacia nel diminuire la frequenza di esacerbazioni nei pazienti asmatici è molto probabilmente legata all'effetto altamente riducente nei confronti degli eosinofili.⁵⁰ D'altro canto, in una successiva fase dello stesso studio è stato rivelato che mepolizumab era in grado di abbassare il numero di esacerbazioni in pazienti asmatici che presentavano, in condizioni basali, elevati livelli di FeNO congiuntamente ad alta eosinofilia sistemica.⁵¹

Dupilumab, farmaco di più recente sintesi, è un anticorpo monoclonale totalmente umano diretto contro la subunità IL-4R α del recettore di tipo 2 legante le interleuchine 4 e 13. Nel lavoro di Wenzel *et al*, pazienti con asma eosinofilico riportavano un miglioramento della funzionalità polmonare e una riduzione delle esacerbazioni e dei sintomi asmatici dopo il trattamento con dupilumab. Inoltre, negli stessi pazienti, gli alti valori di FeNO misurati prima della terapia venivano marcatamente diminuiti dal trattamento, senza alcun effetto sulle conte eosinofiliiche nel sangue (Fig. 2).⁵² Recentemente è stato riportato che pazienti con asma moderata-grave non controllata beneficiavano del trattamento con dupilumab (aumentato FEV₁ e diminuito numero di esacerbazioni) se presentavano FeNO >25 ppb o eosinofili sistemici >150 cell/ μ l, indicando la funzione predittiva di entrambi i marcatori

di risposta al trattamento biologico.^{53,54} Infine, lo studio VENTURE, ha dimostrato che dupilumab è in grado di sopprimere i livelli di FeNO in pazienti con asma grave corticosteroido-resistente durante il periodo di intervento (24 settimane) caratterizzato dalla riduzione delle dosi di corticosteroidi orali e dalla riduzione della frequenza di riacutizzazioni.⁵⁵

KEY POINTS

- L'asma è una patologia respiratoria complessa e multifattoriale, la cui eterogeneità determina l'esistenza di diversi fenotipi clinici ed infiammatori, ciascuno dei quali caratterizzato da un insieme di meccanismi molecolari (endotipi).
- L'elevata complessità dell'asma rende difficile prevedere la risposta individuale ai farmaci comunemente utilizzati per la gestione della stessa, determinando di conseguenza la necessità dell'individuazione di marcatori che possano contribuire all'impostazione di terapie mirate e personalizzate.
- Il FeNO è un marcatore di asma a impronta infiammatoria di tipo 2, non invasivo e di facile misurazione.
- Pur tenendo conto che fattori non legati al tipo di infiammazione delle vie aeree (età, genere, altezza, tabagismo, obesità) possano influenzare i valori di FeNO, esso resta un marcatore altamente attendibile per prevedere la risposta alla terapia corticosteroidica in pazienti asmatici con un processo infiammatorio a componente eosinofila.
- Utilizzato insieme ad altri test diagnostici (spirometria, broncprovocazione, valutazione della cellularità nell'espettorato) il FeNO può fornire un utile apporto nell'individuazione di fenotipi asmatici (asma grave e non controllato) e di pazienti responsivi ai corticosteroidi.
- Il FeNO può inoltre agevolare l'impostazione di una terapia personalizzata con farmaci biologici e il monitoraggio clinico, con conseguente aggiustamento delle dosi di ICS somministrate.

Bibliografia

1. Culotta E, Koshland DE Jr. NO news is good news. *Science* 1992;258:1862-5.
2. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-6.
3. Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, et al. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;18:852-7.
4. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, et al. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994;343:133-5.
5. Belvisi MG, Stretton CD, Yacoub M, et al. Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. *Eur J Pharmacol* 1992;210:221-2.
6. Ellis JL, Udem BJ. Antigen-induced enhancement of noncholinergic contractile responses to vagus nerve and electrical field stimulation in guinea pig isolated trachea. *J Pharmacol* 1992;262:646-53.
7. Ricciardolo FLM, Nadel JA, Yoshihara S, et al. Evidence for reduction of bradykinin-induced bronchoconstriction in guinea-pigs by release of nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1994;113:1147-52.
8. Ricciardolo FLM. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax* 2003;8:175-82.
9. Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004;84:731-65.
10. Chibana K, Trudeau JB, Mustovich AT, et al. IL-13 induced increases in nitrite levels are primarily driven by increases in inducible nitric oxide synthase as compared with effects on arginases in human primary bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 2008;38:936-46.
11. Hansel TT, Kharitonov SA, Donnelly LE, et al. A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase inhibits exhaled breath nitric oxide in healthy volunteers and asthmatics. *FASEB J* 2003;17:1298-300.
12. Spahn JD, Malka J, Szeffer SJ. Current application of exhaled nitric oxide in clinical practice. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:1296-8.
13. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Available from: www.ginasthma.org. 2019.
14. Malinovsky A, Fonseca JA, Jacinto T, et al. Exhaled nitric oxide levels and blood eosinophil counts independently associate with wheeze and asthma events in National Health and Nutrition Examination Survey subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:821-7.
15. Ricciardolo FLM, Sorbello V, Ciprandi G. FeNO as biomarker for asthma phenotyping and management. *Allergy Asthma Proc* 2015;36:e1-e8.
16. Malinovsky A, Janson C, Borres M, et al. Simultaneously increased fraction of exhaled nitric oxide levels and blood eosinophil counts relate to increased asthma morbidity. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:1301-8.e2.
17. Gratzou C, Lignos M, Dassiou M, et al. Influence of atopy on exhaled nitric oxide in patients with stable asthma and rhinitis. *Eur Respir J* 1999;14:897-901.
18. Silvestri M, Pistorio A, Battistini E, et al. IgE in childhood asthma: Relevance of demographic characteristics and polysensitisation. *Arch Dis Child* 2010;95:979-84.
19. Mogensen I, Alving K, Bjerg A, et al. Simultaneously elevated exhaled nitric oxide and serum-eosinophil cationic protein relate to recent asthma events in asthmatics in a cross-sectional population-based study. *Clin Exp Allergy* 2016;46:1540-8.
20. Mogensen I, Alving K, Jacinto T, et al. Simultaneously elevated FeNO and blood eosinophils relate to asthma morbidity in asthmatics from NHANES 2007-12. *Clin Exp Allergy* 2018;48:935-43.
21. Zervas E, Samitas K, Papaioannou AI, et al. An algorithmic approach for the treatment of severe uncontrolled asthma. *ERJ Open Res* 2018;4(1). pii: 00125-2017.
22. Busse WW. Biological treatments for severe asthma: A major advance in asthma care. *Allergol Int* 2019;68:158-66.
23. Alving K, Malinovsky A. Basic aspects of exhaled nitric oxide. *Eur Respir Mon* 2010;49:1-31.
24. Ricciardolo FLM and Silkoff PE. Perspectives on exhaled nitric oxide. *J Breath Res* 2017;11:047104.
25. Olin AC, Rosengren A, Thelle DS, et al. Height, age, and atopy are associated with fraction of exhaled nitric oxide in a large adult general population sample. *Chest* 2006;130:1319-25.
26. Karasch S, Linde K, Rucker G, et al. Accuracy of FENO for diagnosing asthma: A systematic review. *Thorax* 2017;72:109-16.
27. Smith AD, Cowan JO, Filsell S, et al. Diagnosing asthma: comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:473-8.
28. National Institute for Health and Care Excellence (NICE). Asthma: diagnosis, monitoring and chronic asthma management (NICE Guidelines 80), 2017.

29. Schneider A, Schwarzbach J, Faderl B, et al. FENO measurement and sputum analysis for diagnosing asthma in clinical practice. *Respir Med* 2013;107:209-16.
30. Bjermer L, Alving K, Diamant Z, et al. Current evidence and future research needs for FeNO measurement in respiratory diseases. *Respir Med* 2014;108:830-41.
31. Kalpaklioglu AF, Kalkan IK. Comparison of orally exhaled nitric oxide in allergic versus nonallergic rhinitis. *Am J Rhinol Allergy* 2012;26(2):50-4.
32. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, et al. American Thoracic Society Committee on interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FeNO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:602-15.
33. Smith AD, Cowan JO, Brasseur KP, et al. Exhaled nitric oxide: a predictor of steroid response. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:453-9.
34. Dweik RA, Sorkness RL, Wenzel S, et al. Use of exhaled nitric oxide measurement to identify a reactive, at-risk phenotype among patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:1033-41.
35. Ricciardolo FLM. Revisiting the role of exhaled nitric oxide in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2014;20:53-9.
36. Powell H, Murphy VE, Taylor DR, et al. Management of asthma in pregnancy guided by measurement of fraction of exhaled nitric oxide: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2011;378:983-90.
37. Malerba M, Ragnoli B, Radaeli A, et al. Long-term adjustment of stable asthma treatment with fractional exhaled nitric oxide and sputum eosinophils. *Eur J Inflamm* 2012;10:383-92.
38. Petsky HL, Cotes CJ, Kew KM, et al. Tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils): a systematic review and meta-analysis. *Thorax* 2018;73:1110-9.
39. Ricciardolo FLM, Sorbello V, Bellezza Fontana R, et al. Exhaled nitric oxide in relation to asthma control: A real-life survey. *Allergol Immunopathol* 2016;44:197-205.
40. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J* 2014;43:343-73.
41. Carr TF, Zeki AA, Kraff M. Eosinophilic and noneosinophilic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;197:22-37.
42. Yamamoto M, Tochino Y, Chibana K, et al. Nitric oxide and related enzymes in asthma: relation to severity, enzyme function and inflammation. *Clin Exp Allergy* 2012;42:760-8.
43. Silkoff PE, Lent AM, Busacker AA, et al. Exhaled nitric oxide identifies the persistent eosinophilic phenotype in severe refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:1249-55.
44. Heffler E, Carpagnano GE, Favero E, et al. Fractional Exhaled Nitric Oxide (FENO) in the management of asthma: a position paper of the Italian Respiratory Society (SIP/IRS) and Italian Society of Allergy, Asthma and Clinical Immunology (SIAAC). *Multidiscip Respir Med* 2020;15.
45. Silkoff PE, Romero FA, Gupta N, et al. Exhaled nitric oxide in children with asthma receiving xolair (omalizumab), a monoclonal anti-immunoglobulin E antibody. *Pediatrics* 2004;113:e308-12.
46. Mansur AH, Srivastava S, Mitchell V, et al. Long term clinical outcomes of omalizumab therapy in severe allergic asthma: study of efficacy and safety. *Respir Med* 2017;124:36-43.
47. Voskamp AL, Gillman A, Symons K, et al. Clinical efficacy and immunological effects of omalizumab in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2015;3:192-9.
48. Hanaia NA, Wenzel S, Rosén K, et al. Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: an analysis of biomarkers in the EXTRA study. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:804-11.
49. Casale TB, Luskin AT, Busse W, et al. Omalizumab effectiveness by biomarker status in patients with asthma: evidence from PROSPERO, a prospective real-world study. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2019;7:156-64.
50. Pavord ID, Korn S, Howarth P, et al. Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2012;380:651-9.
51. Shrimanker R, Keene O, Hynes G, et al. Prognostic and predictive value of blood eosinophil count, fractional exhaled nitric oxide and their combination in severe asthma: a post-hoc analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 2019;200:1308-12.
52. Wenzel S, Ford L, Pearlman D, et al. Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. *N Engl J Med* 2013;368:2455-66.
53. Castro M, Corren J, Pavord ID, et al. Dupilumab efficacy and safety in moderate-to-severe uncontrolled asthma. *N Engl J Med* 2018;378:2486-96.
54. Wenzel S, Castro M, Corren J, et al. Dupilumab efficacy and safety in adults with uncontrolled persistent asthma despite use of medium-to-high-dose inhaled corticosteroids plus a long-acting β_2 agonist: A randomised double-blind placebo-controlled pivotal phase 2b dose-ranging trial. *Lancet* 2016;388:31-44.
55. Rabe KF, Nair P, Brusselle G, et al. Efficacy and safety of dupilumab in glucocorticoid-dependent severe asthma. *N Engl J Med* 2018;378:2475-85.