

Asma bronchiale e rinite allergica: ruolo del recettore ST2 sui linfociti T helper 2

Introduzione

Le citochine hanno un'importanza critica per la comunicazione intercellulare che si verifica nei processi infiammatori: contribuiscono alla patofisiologia, attraverso il reclutamento e l'attivazione di leucociti proinfiammatori e alla cronicizzazione della malattia scatenando eventi pro-fibrotici e di rimodellamento. Le malattie allergiche, incluse la rinite e l'asma, sono delle patologie infiammatorie croniche caratterizzate da una prevalente risposta immunitaria da parte dei linfociti T helper 2 (Th2) (1).

L'Asma Bronchiale

L'Asma Bronchiale è stata definita nel 1992, da un gruppo di esperti internazionali che hanno redatto l'International Consensus Report on the Diagnosis and Treatment of Asthma, una "malattia infiammatoria cronica delle vie aeree" guidata dai linfociti Th2 e caratterizzata sempre da infiammazione, principalmente di tipo eosinofilo. E' una malattia cronica, destinata cioè a manifestarsi per un tempo imprevedibilmente lungo, potenzialmente per tutto l'arco della vita, ed è caratterizzata da una broncoostruzione che spesso ma non sempre è reversibile a breve termine e si accompagna in tutti i casi a una condizione di iperreattività bronchiale (Airway Hyperresponsiveness - AHR) che, pur con gradi diversi, condiziona tutta la vita del paziente. Le cause della malattia sono verosimilmente molteplici e, nella maggioranza dei casi, è possibile soltanto individuare o sospettare l'incidenza di

alcuni dei fattori responsabili: i *fattori genetici*, per esempio, sono sempre presenti accanto a quelli ambientali; i *fattori allergici* hanno carattere familiare e insorgenza precoce e, anche se le sostanze aerogene potenzialmente allergizzanti sono innumerevoli, la prevalenza dei casi di asma allergico è sostenuta da un ristretto numero di allergeni: nell'infanzia, più spesso responsabili sono alcuni derivati del *Dermatophagoides pteronyssinus* e di altri acari presenti nella polvere domestica; nelle altre età, oltre agli acari, un ruolo rilevante è svolto più che altro dai pollini; i *fattori professionali*, sono quelli implicati nello sviluppo di asma in soggetti che si sensibilizzano a sostanze presenti nell'ambiente di lavoro; per ciò che riguarda i *fattori farmacologici*, alcuni pazienti asmatici riferiscono l'aggravarsi della sindrome in seguito alla somministrazione di acido acetilsalicilico o di altri FANS, per cui si scatenerrebbe un meccanismo non immunitario ma verosimilmente collegato all'inibizione che questi farmaci esercitano sulla via cicloossigenasica del metabolismo dell'acido arachidonico: a causa di questa inibizione prevarrebbe la via metabolica alternativa della lipoossigenasi che conduce alla formazione di potenti mediatori della broncocostrizione, i leucotrieni.

Le tappe principali attraverso cui si articolano le manifestazioni spontanee della malattia asmatica, sono:

1. La **sensibilizzazione**, che consiste in una condizione di disregolazione immunitaria relativa al controllo della sintesi delle IgE che predispone all'asma. Perché questa predisposizione si manifesti in forma clinica, è necessaria la sensibilizzazione nei confronti di un allergene e, perché ciò

avvenga, occorre la presentazione dell'allergene ai linfociti T helper (Th) da parte delle cellule dendritiche presenti nella mucosa delle vie aeree: queste ultime elaborano l'antigene, ne esprimono in superficie dei frammenti peptidici e formano il complesso peptide-molecola di classe II del sistema HLA che può essere riconosciuto dal recettore specifico del linfocita Th. Quest'ultimo, solo dopo aver assunto il particolare fenotipo funzionale Th2, interagisce con il linfocita B stimolandolo e dando avvio al processo di sintesi delle IgE;

2. La **reazione immediata**, che si verifica nel soggetto allergico sensibilizzato, per cui l'esposizione all'allergene (ma anche a fattori del tutto aspecifici) scatena immediatamente una serie di eventi connessi con la liberazione di mediatori spasmogeni. Per quanto riguarda i soggetti allergici, i mastociti e i basofili esprimono in superficie recettori ad alta affinità per le IgE che fissano grandi quantità di queste immunoglobuline, per cui, se il soggetto inala l'allergene, le molecole di quest'ultimo si legano ciascuna a una coppia di IgE specifiche fissate sulle cellule: questo fenomeno costituisce un segnale di attivazione che conduce, a sua volta, alla liberazione del contenuto dei granuli già esistenti all'interno di queste cellule (contenenti i mediatori chimici preformati come l'istamina e la serotonina) e alla stimolazione di processi di sintesi di mediatori *ex novo* (come il PAF e i metaboliti dell'acido arachidonico) a partire dai componenti fosfolipidici della membrana cellulare;

3. La **reazione infiammatoria tardiva**, che, non solo aggrava e perpetua la broncoostruzione, ma determina anche una condizione di accentuata reattività. In particolare, a seguito di stimolazione IgE-dipendente i mastociti rilasciano, oltre i mediatori della risposta immediata, diverse citochine implicate nell'induzione della flogosi. La conseguenza morfologica più evidente di tutto ciò è il denso infiltrato di cellule infiammatorie sulle pareti bronchiali, innescato dall'adesione delle cellule all'endotelio, a sua volta resa possibile da un considerevole aumento di espressione di molecole, cosiddette di adesione, indotto da alcune citochine: i linfociti Th2, proprio in questo modo, possono contribuire ad indurre il processo infiammatorio, poiché controllano il reclutamento cellulare attraverso la produzione di citochine, quali l'IL-3 (che promuove l'adesione dei basofili all'endotelio), l'IL-4 (che facilita la chemiotassi) e l'IL-5 (che induce la differenziazione e la maturazione degli eosinofili). Gli eosinofili costituiscono i protagonisti della flogosi nell'asma: sono presenti in numero elevato sia nel sangue periferico sia all'interno della mucosa, dove rilasciano numerosi mediatori con effetto pro-infiammatorio e citolesivo.

L'alterazione istopatologica comune a tutte le forme di asma è la flogosi cronica delle vie aeree. La parete delle vie aeree, inoltre, può mostrare livelli diversi di edema e di vasodilatazione, mentre l'epitelio presenta alterazioni di vario grado: dalla perdita delle ciglia alla completa esfoliazione, fino ad arrivare allo sfaldamento

vero e proprio che assume un particolare rilievo perché si correla con il grado di iperreattività delle vie aeree. Un altro evento, molto importante nelle fasi croniche dell'asma, è costituito dall'ispessimento della membrana basale: questo fenomeno contribuisce a ridurre irreversibilmente il calibro delle vie aeree, anche se è dimostrato che la terapia corticosteroidica può determinare una remissione di questo fenomeno. Per quanto riguarda la muscolatura liscia bronchiale, mentre nelle forme acute ed episodiche è rilevabile soltanto il classico *spasmo*, nelle condizioni croniche si riscontrano sia *iperplasia* che *ipertrofia* muscolare.

Nel caso della patologia asmatica, la valutazione clinica deve essere supportata ed integrata dalla valutazione spirometrica: infatti, questa, consente di determinare il livello di severità della disfunzione ostruttiva, nonché il grado di reversibilità della stessa, attraverso la misura della risposta all'uso estemporaneo di farmaci broncodilatatori. L'inquadramento funzionale comprende anche il monitoraggio delle variazioni del grado dell'ostruzione bronchiale tramite il FEV1 (**F**orced **e**xpiratory **v**olume in the **1**st second), parametro patofisiologico predittivo usato in spirometria, che riflette il volume di aria espirata nel corso del primo secondo di una espirazione massima forzata e indica il grado di pervietà delle grandi vie aeree.

In corso di patologie bronco-polmonari ostruttive come l'asma, il valore assoluto del FEV1 si riduce ed è strettamente correlato con il grado di broncoostruzione. La misurazione del FEV1 viene anche utilizzata nelle tecniche di valutazione dell'iperreattività bronchiale aspecifica e della risposta bronchiale ai farmaci

broncodilatatori.

La European Respiratory Society definisce come *lieve*, un'ostruzione in cui si ha un FEV1 uguale o inferiore all'80% del predittivo; *moderata*, se è compreso tra 60% e 40%; *grave*, se è al di sotto del 40%. La diagnosi di asma, sospettata sulla base della storia clinica, è quindi confermata con la valutazione della funzione respiratoria, che dimostra un incremento (detto reversibilità) del FEV1 del 12% (o di almeno 200 ml) dopo somministrazione di un farmaco broncodilatatore.

Il trattamento farmacologico delle manifestazioni cliniche dell'asma può essere effettuato con i farmaci broncodilatatori e con quelli antiinfiammatori. I primi, che agiscono sul sintomo ma sono inefficaci sulla flogosi, sono i classici agonisti dei recettori β_2 adrenergici. Gli antiinfiammatori, invece, intervenendo sulla flogosi, curano la malattia; i farmaci antiinfiammatori di elezione sono i corticosteroidi che sono disponibili sia per via generale sia per via inalatoria: questi ultimi sono più sicuri e sono da preferire rispetto a quelli attivi per via sistemica poiché il loro assorbimento è molto modesto. Lo scopo della terapia dell'asma è quello di ottenere il pieno controllo della malattia, espresso non solo dalla remissione dei sintomi ma anche dal ripristino della normale funzione respiratoria e dal ritorno ad una normale qualità della vita, ivi compresa la capacità di svolgere attività fisica (2,3).

La forma più comune della malattia è l'asma allergico che risulta da un'esagerata risposta immunitaria ai più comuni allergeni inalanti (acari della polvere, scarafaggio, pollini o spore fungine) in individui geneticamente predisposti con elevati livelli sierici

totali di IgE allergene-specifiche. L'asma allergico è caratterizzato da un'aberrante risposta immunitaria con produzione di citochine da parte dei linfociti Th2 che reclutano e attivano le cellule effettrici della risposta allergica (mastcellule, eosinofili, linfociti T) e sono responsabili delle caratteristiche più peculiari dell'asma: eosinofilia delle vie aeree, metaplasia delle cellule caliciformi, over-produzione di muco con ostruzione progressiva dell'albero bronchiale, edema della mucosa, rimodellamento delle vie aeree e iperreattività bronchiale (AHR), la tendenza delle vie aeree a reagire in modo esasperato a qualsiasi stimolo non specifico come aria fredda ed esercizio fisico (4,5).

La Rinite Allergica

La rinite è un disordine molto comune causato da infiammazione o irritazione della mucosa nasale. Il sintomo dominante è l'ostruzione nasale, anche se la rinorrea, gli starnuti e il prurito nasale sono i sintomi più fastidiosi. La forma più diffusa di rinite è la Rinite Allergica (R), in cui la causa più comune dell'infiammazione nasale è la risposta allergica agli allergeni trasportati dall'aria. Il prurito e i sintomi oculari sono più comuni nella rinite allergica, mentre gli altri sintomi come l'ostruzione nasale, la rinorrea e gli starnuti possono riguardare sia pazienti con rinite allergica sia non allergica. Infine, i pazienti con R presentano spesso i sintomi caratteristici dopo esposizione ad agenti irritanti e a cambiamenti di temperatura e di umidità e questa esposizione può qualche volta causare sintomi più severi dell'esposizione agli allergeni. La sensibilità a stimoli non specifici è di solito chiamata iperreattività nasale non-specifica.

La rinite allergica (R) si presenta in seguito ad un'interazione delle immunoglobuline E (IgE) con un allergene che si trova a contatto con la mucosa nasale di un paziente sensibilizzato. La sensibilizzazione a certi aero-allergeni come i pollini, la polvere, le muffe e i peli di animali, si presenta di solito in famiglie con un background di allergie, cosa che risulta utile nel fare la diagnosi in pazienti che presentano R in un certo periodo dell'anno o un peggioramento dei sintomi nasali che si verifica nell'ambiente tipico di uno specifico allergene. La diagnosi è poi clinicamente confermata testando la sensibilità a determinati allergeni mediante lo Skin Prick Test e determinando la presenza di specifici anticorpi IgE nel siero del paziente.

Il trattamento della R consiste innanzitutto nel cercare di evitare il contatto con gli allergeni, oltre al ricorso a cure mediche e immunoterapia. Evitare gli allergeni significa ridurre quelli di origine ambientale (pulizie domestiche, contatto con animali), anche nel posto di lavoro, condizione non sempre facile da realizzare. I farmaci sono di solito necessari per controllare i sintomi ed includono anti-istaminici e steroidi nasali. Gli anti-istaminici devono essere di seconda generazione, quelli che non causano sedazione, e spesso questo tipo di trattamento mostra una maggiore efficacia sulla rinorrea, sugli starnuti e sul prurito nasale che sul naso chiuso. Gli steroidi nasali sono più potenti degli anti-istaminici nel migliorare la pervietà nasale e sono almeno altrettanto potenti nel controllo di tutti gli altri sintomi nasali e oculari (6).

Epidemiologia e linee guida

La R, che è una malattia respiratoria cronica importante a causa della sua prevalenza, del suo forte impatto sulla qualità della vita, sul rendimento al lavoro/scuola e dell'onere economico che comporta, ha uno stretto legame con la patologia asmatica (7).

La prevalenza delle malattie allergiche come la R e l'asma sta sensibilmente aumentando in tutto il mondo, in particolare da quando le società hanno cominciato ad adottare uno stile di vita cosiddetto 'occidentale'. La sensibilizzazione allergica è un fattore di rischio importante sia per l'asma che per la R ed è per questo che le due condizioni patologiche spesso coesistono. Si stima che 300 milioni di persone in tutto il mondo soffrano di asma e che circa 400 milioni siano affette da R. Tuttavia, la R è spesso sotto-stimata e non è affrontata in modo adeguato, quando invece si tratta di una patologia che, sia da sola sia in co-presenza di asma allergico, presenta un enorme impatto economico. Pertanto, si è fatta sempre più evidente la necessità di creare un documento globale basato sull'evidenza, che dovrebbe porre l'accento sulle interazioni tra le alte e le basse vie aeree includendo la diagnosi, l'epidemiologia, i fattori di rischio comuni, la gestione e la prevenzione di queste patologie.

Per questa ragione, in un workshop del World Health Organization (WHO) del 1999, è stata intrapresa la stesura di un documento «Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA)» il quale è stato pubblicato per la prima volta nel 2001 come “stato dell'arte, linee guida e raccomandazioni per la diagnosi e la gestione della malattia” (8).

ARIA ha anche riclassificato la rinite allergica come

lieve/moderata-severa e intermittente/persistente: risulta subito evidente come questa nuova classificazione rifletta più da vicino l'impatto della rinite allergica sui pazienti. Successivamente, le nuove evidenze scientifiche riguardanti i meccanismi patogenetici, i nuovi farmaci e le conoscenze più avanzate hanno portato alla pubblicazione dell'aggiornamento ARIA 2008 (8).

Nella sua successiva revisione del 2010, ARIA ha ulteriormente sviluppato le linee guida della pratica clinica per la gestione della comorbilità asma-rinite basata sulla 'scala' GRADE (Grading of Recommendation, Assessment, Development and Evaluation) (9).

Nuovi agenti terapeutici, come gli antagonisti del recettore per i leucotrieni, sono inclusi nella revisione più recente delle linee guida GINA (Global INitiative for Asthma), sebbene il loro ruolo nella terapia dell'asma non sia stato ancora completamente stabilito. Le linee guida ARIA sono state diffuse ed implementate in più di 50 paesi del mondo e in questi paesi pare ci sia stata una riduzione della prevalenza dell'asma persistente-moderata cosa che però non si è osservata per l'asma severa e ciò dimostra che, senza dubbio, esistono ancora dei margini di miglioramento (10,11).

Immunologia e Patofisiologia

Per entrare nel vivo dell'aspetto prettamente biochimico e delle conoscenze più avanzate sulla patofisiologia della rinite allergica R, recenti evidenze hanno suggerito che un meccanismo esteso, molteplice e dettagliato può contribuire alla risposta infiammatoria della mucosa nasale in soggetti con R indotta da infiltrazione intranasale di allergeni. Questo pathway include, di fatto,

un'immediata produzione di mastcellule IgE mediata così come una risposta a lungo termine caratterizzata dal reclutamento di eosinofili, basofili e cellule T che producono citochine di tipo Th2, tra le quali l'Interleuchina 4, che funziona da interruttore nella sintesi delle IgE e l'Interleuchina 5, noto fattore di crescita degli eosinofili. Studi più recenti suggeriscono ancora un meccanismo addizionale che può contribuire alla patofisiologia della R e che prevede la sintesi locale di IgE nella mucosa nasale e la produzione da parte dell'epitelio di citochine, quali l'Interleuchina 17A (IL-17A) e l'Interleuchina 33 (IL-33), che regolano la produzione di citochine di tipo Th2; infatti, diversi studi preclinici hanno dimostrato un ruolo molto importante per queste citochine di derivazione epiteliale (IL-17A e IL-33) nel regolare la risposta dei linfociti Th2 sulla superficie stessa della mucosa (12).

Anche per quanto riguarda la patologia asmatica, le indagini più recenti hanno riscontrato la presenza di linfociti T CD4⁺ in biopsie di pazienti asmatici e negli ultimi 30 anni il paradigma Th1-Th2 ha dominato il campo di ricerca sull'asma (13). Infatti, come abbiamo già accennato, l'asma allergico è caratterizzato dall'infiammazione allergica delle vie respiratorie con infiltrazione locale di eosinofili, mastcellule e linfociti T helper attivati. La risposta immunitaria iniziale, responsabile di tutto ciò, è la produzione appunto di cellule CD4⁺ T helper-2 (Th2) che producono citochine di tipo Th2 e non di cellule e citochine T helper 1 (Th1). Sono numerosissime le evidenze scientifiche in letteratura che supportano il concetto secondo il quale l'infiammazione allergica è condotta da un 'imbalance' (squilibrio) tra le citochine di tipo Th1 e quelle di tipo Th2, a

favore della risposta immunitaria di tipo Th2 (14).

Da più di vent'anni i sottotipi cellulari Th1 e Th2 sono stati descritti sulla base del loro profilo citochinico e delle loro differenti funzioni (15). Le cellule Th2 producono IL-4 che è essenziale nella produzione di IgE, IL-5 che guida la differenziazione terminale e la sopravvivenza degli eosinofili e IL-13 che induce la secrezione di muco, l'iperreattività bronchiale (AHR) e il rimodellamento tissutale. In ragione di ciò, ha sempre più guadagnato credibilità l'ipotesi che le malattie allergiche siano principalmente dei disordini Th2-mediati. Infatti, la rinite allergica e l'asma allergico sono entrambe caratterizzate da elevati livelli sierici di IgE con incrementata reattività agli allergeni. La maggior parte dei soggetti asmatici (mild to moderate) presenta una patologia eosinofila, sebbene alcuni dei pazienti più gravi (severe) presentino un'elevata conta dei neutrofili all'interno delle vie aeree (16). In seguito ad un appropriato stimolo allergenico, si osserva quindi un afflusso di linfociti Th2 e di citochine di tipo Th2 nelle vie aeree di soggetti allergici e il numero di cellule Th2 infiltranti si correla positivamente con la gravità della malattia. Per questo motivo è ragionevole sostenere che le cellule Th2 siano la chiave responsabile nella patofisiologia della malattia allergica (17).

Riassumendo quindi quanto detto finora, tutti gli studi più recenti sui fenotipi clinici di asma e rinite, hanno fatto emergere sempre maggiore interesse verso questo ruolo dei linfociti Th2 e, contemporaneamente, si sono anche rivolti verso l'osservazione di altri fenotipi di cellule T, citochine e cellule dell'immunità innata,

pure coinvolte nella patogenesi delle malattie allergiche, ciò portando all'introduzione di relativamente nuovi 'giocatori': IL-17A, IL-33 con il suo peculiare recettore ST2, come anche l'IL-31, allo scopo di studiare e monitorare i loro potenziali ruoli nei meccanismi patogenetici dell'asma e della R (16).

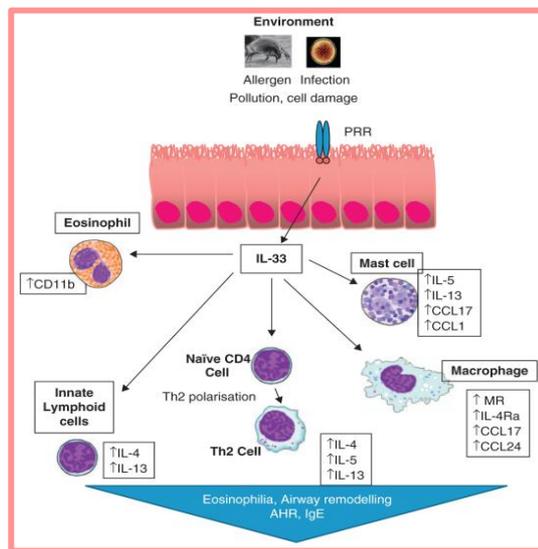
L'Interleuchina 33

L'Interleuchina 33 (IL-33) è un membro della famiglia di citochine dell'Interleuchina 1 e, per le sue proprietà sia pro-infiammatorie che anti-infiammatorie, è una citochina molto interessante. Si crede che l'IL-33 sia coinvolta nella risposta infiammatoria Th2-mediata di malattie allergiche come l'asma, l'anafilassi, la dermatite atopica e la rinite allergica (18).

Inoltre, si pensa che l'IL-33 funzioni da 'ponte' tra la risposta immunitaria innata e quella acquisita, ovvero, è stato dimostrato che questa citochina agisce a monte della cascata delle citochine effettrici di tipo Th2, attraverso la stimolazione di diverse cellule dell'immunità innata e acquisita (13,19). All'origine è stata identificata come un fattore nucleare proteico e il primo lavoro scientifico che descrive questa proteina come IL-33 risale al 2005: per tale ragione le nostre conoscenze sul ruolo e la funzione di questa citochina sono ancora in evoluzione (18).

L'IL-33 può essere rilasciata dalle cellule epiteliali durante la loro lesione o necrosi causata da agenti esogeni come traumi meccanici, virus, fumo, allergeni aero-trasportati o da stimoli endogeni. Il fatto che le cellule in necrosi rilascino IL-33 non clivata proteoliticamente ma biologicamente attiva, cioè perfettamente in grado di reclutare e attivare le cellule del sistema

immunitario, suggerisce che questa citochina può agire come ‘segnale endogeno di pericolo’ ed è per questa ragione che l’IL-33 è stata chiamata <<allarmina>>. Ciò può spiegare perfettamente il fatto che l’IL-33 è soprattutto prodotta dalle cellule strutturali e di rivestimento come le cellule endoteliali, i fibroblasti e le cellule epiteliali, proprio dove solitamente insorge la prima linea di difesa dell’ospite contro gli agenti patogeni. Ecco perché si è pensato che l’IL-33 possa avere un importante ruolo di ‘rilevamento danni’ in diverse patologie infiammatorie (19,20).



Il recettore ST2

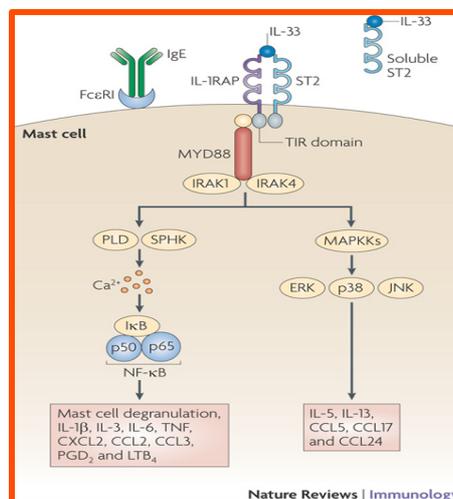
L’IL-33 agisce attraverso l’attivazione del complesso recettoriale ST2, un membro della famiglia dei recettori IL-1 che fu all’inizio identificato, nel 1989, come recettore orfano (14,21). Nel 2005, la scoperta dell’IL-33 come ligando per il recettore ST2, ha fornito nuove conoscenze sul meccanismo di segnalazione di questo recettore (14,22). Il pathway innescato da IL-33/ST2 è coinvolto nella risposta immunitaria mediata dalle cellule T, in particolare dalle Th2, e nella produzione di citochine Th2-associate (14,23).

In seguito a splicing alternativo del gene che codifica per la proteina recettoriale, esistono almeno 3 isoforme del recettore ST2 (noto anche come IL-1RI e T1/ST2):

1. ST2L è il vero e proprio recettore transmembrana, molto simile nella struttura ai recettori IL-1 di tipo I. Possiede un dominio extracellulare composto da tre porzioni immunoglobulino-simili collegate, da un segmento transmembrana e da un dominio intracitoplasmatico TIR.
2. La seconda isoforma rappresenta la forma solubile di ST2 (sST2), la quale viene rilasciata nel siero dopo induzione; dal punto di vista strutturale, possiede una sequenza di nove aminoacidi C-terminale, del tutto simile alla porzione del dominio extracellulare di ST2L che riconosce il ligando, e manca dei domini transmembrana e citoplasmatico, presenti, invece, nella struttura di ST2L. Questa forma solubile di ST2, contenendo quindi nella sua struttura soltanto il dominio extracellulare che riconosce il ligando e non quello intracellulare responsabile della trasduzione del segnale, agisce come 'decoy receptor' (recettore trappola) per l'IL-33 e, pertanto, inibisce funzionalmente l'attività della citochina *in vitro* ed *in vivo*. In questo modo, sST2 esercita una vera e propria funzione regolatoria sull'attività della citochina, in quanto può riconoscere e legare l'IL-33, impedendone il legame con l'unica forma attiva del recettore, l'isoforma di membrana (membrane bound) ST2L, bloccando così totalmente la trasduzione del segnale.
3. La terza isoforma, ST2V, è una variante costitutivamente attiva del recettore ed è caratterizzata dall'assenza del

dominio immunoglobulino-simile e dallo splicing alternativo della porzione C-terminale di ST2. Si pensa che questa isoforma sia localizzata nella membrana plasmatica e che si trovi principalmente nei tessuti gastrointestinali di alcuni organi (14,18,20).

L'IL-33, per la trasduzione del segnale, si lega in realtà ad un complesso recettoriale eterodimerico ancorato alla membrana che è costituito da ST2 e da una proteina accessoria IL-1R (IL-1RAcP) ed induce il segnale attraverso il dominio TIR dell'IL-1RAcP che rappresenta, pertanto, un co-recettore essenziale per l'attività dell'IL-33 via T1/ST2 (24). Il complesso recettoriale recluta la proteina della risposta primaria della differenziazione mieloide (MYD88), la chinasi 1 associata all'IL-1R (IRAK1) e l'IRAK4: queste inducono l'attivazione di numerose proteine segnale, incluse la NF- κ B e il suo inibitore I κ B α , la chinasi 1 extracellulare regolata da segnale (ERK1, anche nota come MAPK3), ERK2 o MAPK1 e di altre MAPKs. L'attivazione di questi pathways, infine, induce l'espressione di citochine di tipo Th2 portando a cambiamenti patologici gravi nella mucosa di diversi organi (20).



Diversi tipi cellulari esprimono il recettore di membrana ST2L e sono pertanto influenzati dall'attività dell'IL-33. Dati i primi ritrovamenti di una selettiva espressione di ST2 sui linfociti Th2 e non sulle cellule Th1, fu inizialmente indagato il ruolo dell'IL-33 sulle cellule T helper 2. Il trattamento delle cellule Th2 con l'IL-33 incrementa la produzione di IL-4, IL-5 e IL-13, le principali citochine di tipo Th2, ed è in grado anche di polarizzare le native cellule T a produrre queste stesse citochine. IL-33 è inoltre chemio-attrattore per le cellule Th2 *in vitro* e *in vivo*, indicando un importante ruolo per questa citochina nella mobilitazione dei linfociti Th2. L'IL-33 è ancora un potente induttore di citochine e chemochine pro-infiammatorie dalle mastcellule e dai basofili ed è un induttore molto potente dell'eosinofilia *in vivo*, attivando e promuovendo l'adesione e la sopravvivenza degli eosinofili (18). Pertanto, l'abilità dell'Interleuchina 33 di avere come target diversi tipi di cellule del sistema immunitario, sottolinea il suo potenziale nell'influenzare il verificarsi di un ampio range di patologie e, visto il ruolo chiave che hanno le mastcellule, i basofili e gli eosinofili nella risposta allergica, queste evidenze suggeriscono che l'IL-33 ha una funzione chiave nelle patologie allergiche e, in particolare, nell'asma e nella rinite allergica (20). Di particolare rilevanza, a livello delle vie aeree, è il fatto che la risposta linfocitaria di tipo Th2, indotta e guidata dall'IL-33, consiste in un'importante infiltrazione eosinofila del tessuto polmonare. Le cellule muscolari lisce delle vie aeree esprimono IL-33 sia come proteina che come mRNA e questa espressione aumenta nelle biopsie bronchiali di soggetti asmatici rispetto ai controlli, così come nei soggetti con asma severo (25).

L'interleuchina 33 è quindi espressa a livelli elevati nei pazienti asmatici e il suo recettore ST2 funziona come un'importante molecola effettrice della risposta Th2 in numerosi esperimenti che utilizzano modelli murini asmatici: quando viene somministrata direttamente nel polmone del topo, l'IL-33 induce un aumento dell'infiltrazione eosinofila delle vie aeree, iperplasia delle cellule caliciformi e iperreattività bronchiale (AHR). La correlazione, infine, tra il numero di cellule Th2 presenti nelle vie respiratorie e il grado di severità della malattia, suggerisce un ruolo fondamentale per le cellule Th2 nell'asma.

Questi dati suggeriscono come l'IL-33 svolga un ruolo da protagonista durante lo sviluppo e l'esacerbazione di alcuni tipi di infiammazione delle vie aeree come l'asma bronchiale. Inoltre, le cellule epiteliali bronchiali sono una potenziale fonte di IL-33 e ciò mette in luce un possibile ruolo per il tessuto polmonare stesso nel regolare direttamente i meccanismi infiammatori in questa patologia (20).

L'attività pluri-potente e pleiotropica dell'IL-33 nella reattività immunitaria di tipo Th2 mette sempre più in luce il ruolo di questa proteina anche in altri disordini di origine allergica. Svariati studi recentemente condotti hanno, ad esempio, messo in evidenza il ruolo chiave svolto dall'IL-33 nella patogenesi della rinite allergica (R) (18,19).

I risultati di questi studi, hanno dimostrato elevati livelli sierici di IL-33 in pazienti con R intermittente sensibile al polline degli alberi e/o delle graminacee, livelli che aumentano con l'aggravarsi della sintomatologia, suggerendo il suo ruolo chiave nella patofisiologia di questa malattia. I livelli aumentati di questa

proteina sono inoltre paragonabili con quelli osservati nei pazienti asmatici (26).

Studi ancora più recenti hanno evidenziato come l'IL-33 costitutivamente espressa nelle cellule epiteliali nasali, è rilasciata dalle stesse in seguito ad esposizione all'allergene: ciò mette ancora più in evidenza il contributo dato da questa citochina nella patogenesi della R (27).

Anche nella R, come nell'asma allergico, il progredire del processo infiammatorio è direttamente responsabile degli ultimi stadi e della cronicizzazione dei sintomi della malattia: a loro volta, infatti, le citochine prodotte dalle cellule Th2, stimulate da IL-33, possono indurre iperplasia delle cellule caliciformi, che può portare ad un'ipertrofia irreversibile della mucosa, osservata anche nei pazienti con R. In maniera definitiva, quindi, l'IL-33 è implicata nell'induzione, nel mantenimento e nella cronicizzazione della patologia respiratoria allergica, non soltanto nell'asma ma anche nella R (20).

Tutti i risultati ottenuti finora indicano che l'IL-33 ha un ruolo chiave nello sviluppo dell'infiammazione allergica della mucosa nasale, strettamente correlato ai sintomi della patologia, e che il reclutamento delle cellule infiammatorie, mastcellule, eosinofili e basofili, così come delle cellule Th2 all'interno della mucosa nasale è un evento critico per i sintomi della R ed in particolare per la sua cronicizzazione. Infine, visto anche che l'IL-33 è prodotta e rilasciata dalle cellule epiteliali quando vengono danneggiate o vanno in necrosi, questa proteina potrebbe essere utilizzata come segnale di danno tissutale, in particolar modo per

quelle cellule, come le cellule epiteliali e/o endoteliali, che sono direttamente esposte agli stimoli ambientali e, pertanto, l'IL-33 sembra essere un sempre più utile marker delle patologie Th2-mediate come la R e l'asma bronchiale, sebbene non esclusivo (18).

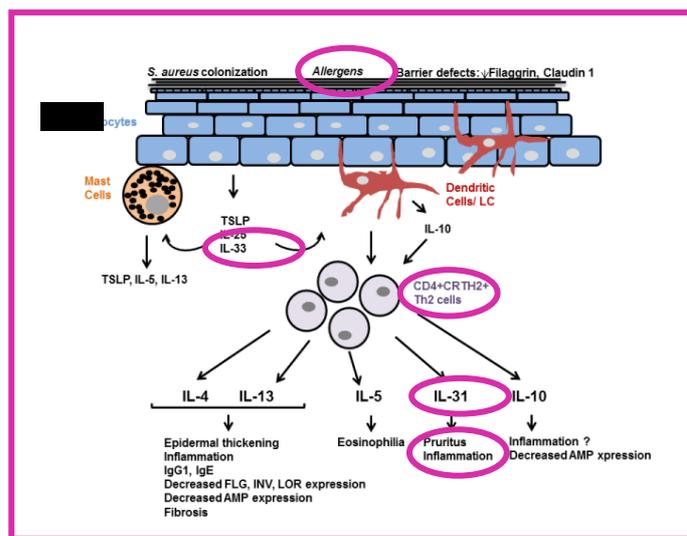
Interleuchina 31

L'Interleuchina 31 (IL-31) è una nuova citochina, membro della famiglia di citochine dell'IL-6, principalmente prodotta dai linfociti T CD4⁺, in particolare dal fenotipo cellulare T helper 2, anch'essa coinvolta nel processo infiammatorio di natura allergica e recentemente implicata anche nella patogenesi dell'infiammazione bronchiale.

Alcuni studi recenti, infatti, dimostrano che l'IL-31, in maniera dose-dipendente, induce la secrezione di citochine proinfiammatorie e che agisce essa stessa come una potente citochina pro-infiammatoria derivata dalle cellule Th2 e i cui effetti sono comparabili a quelli dell'IL-17A (28). Diverse riviste scientifiche riportano che l'aumentata espressione dell'IL-31 nel siero, nei tessuti infiammati e nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs), potrebbe essere una caratteristica comune nei pazienti con malattie allergiche atopiche e che, in particolare nella R, la produzione di IL-31 antigene-indotta è selettivamente associata con la risposta Th2 nei PBMCs. Diversamente, quindi, da altre citochine Th2-Type, IL-31 mostra avere un ruolo unico ed indipendente nella patofisiologia della RA e la quantità di IL-31 antigene-indotta prodotta dai PBMCs è selettivamente associata con la severità della patologia (29).

L'attività dell'IL-31 umana è mediata da un recettore eterodimerico composto da Il-31 receptor A (IL-31RA) e da oncostatina M receptor (OSMR), il quale è in grado di attivare sia il fattore 3 trasduttore di segnale e attivatore di trascrizione (STAT3) che la chinasi extracellulare regolata dal segnale (ERK) nelle cellule epiteliali alveolari e bronchiali umane. Infatti, le cellule epiteliali bronchiali umane (HBECs), a causa della presenza costitutiva dell'IL-31RA, sono un target dell'IL-31 e per questo motivo è stato suggerito un ruolo funzionale per l'IL-31 nell'infiammazione e nel rimodellamento bronchiale. L'IL-31 potrebbe quindi stimolare le HBECs ad aumentare la produzione di un'altra chemochina, la MCP-1/CCL2, così come dei fattori di crescita VEGF e EGF, che possono indurre, rispettivamente, ipersensibilità e rimodellamento delle vie aeree nell'asma allergico. In particolare, la CCL2 e il VEGF sono costitutivamente espressi nelle HBECs e sono up-regolati dall'IL-31, mentre, EGF non è prodotto dalle cellule ma il suo rilascio è indotto dopo stimolazione da parte dell'IL-31. Diverse evidenze hanno suggerito che CCL2, VEGF e EGF possono agire nel reclutamento di cellule infiammatorie e che sono dei mediatori che hanno un ruolo chiave nell'infiammazione e nel rimodellamento bronchiale caratteristici della patologia asmatica (29). Inoltre, recenti studi hanno anche dimostrato che l'espressione di IL-31 è significativamente aumentata e correlata con quella di altre citochine di tipo Th2, in particolare con l'IL-4 e l'IL-13, in diverse patologie di natura allergica, cosa che farebbe ipotizzare che queste due citochine possano avere un effetto sinergico con l'attività dell'IL-31. In conclusione, quindi, questi recenti studi, dimostrano per la prima volta che anche questa

nuova citochina, l'IL-31, da sola o in combinazione con altre Th2-citochine e con gli eosinofili modula la funzione delle HBECs attraverso, almeno in parte, l'attivazione di meccanismi segnale attivati da MAPK e la produzione di mediatori infiammatori. Questi risultati hanno suggerito un nuovo ruolo per l'IL-31 nello sviluppo dell'infiammazione allergica delle vie aeree e sarebbe utile determinare se l'IL-31 e il suo recettore fossero over-espressi in campioni di pazienti con asma allergico. L'interleuchina 31, infine, potrebbe anche essere presa in considerazione come un nuovo target per lo sviluppo di agenti terapeutici per il trattamento dell'asma allergica e della R (30).



Cellule Th17 e Interleuchina 17A

Recenti evidenze dimostrano che le malattie allergiche non possono più essere considerate soltanto una risposta acquisita del sistema immunitario ma che un crosstalk tra la risposta immunitaria innata e quella acquisita è d'importanza cruciale per l'innescare e la propagazione delle reazioni allergiche (13).

Inoltre, fermo restando che le malattie allergiche riflettono vari meccanismi dell'infiammazione linfocitaria di tipo T e che questi comprendono in gran parte i processi associati ai linfociti T helper 2, secondo le indagini e la letteratura più recente, si è ritenuto necessario che, il precedente paradigma per cui è l'imbalance Th1/Th2 a guidare queste malattie, venisse ampliato con l'identificazione di nuove famiglie di linfociti T helper.

Queste, implicate nel processo infiammatorio con le loro caratteristiche citochine, forniscono percorsi alternativi anche per l'indagine delle manifestazioni più eterogenee delle malattie allergiche (30). Infatti, per esempio, alcuni dati, raccolti di recente su diversi fenotipi clinici, mostrano l'esistenza di due sottotipi di asma: eosinofilo e non-eosinofilo, suggerendo che altri meccanismi, oltre a quello legato alle cellule Th2, possono essere coinvolti nella patologia in alcuni pazienti (20,36).

E' stata identificata una nuova linea di cellule T effettrici pro-infiammatorie CD4⁺, distinta dalle cellule Th1 e Th2, chiamata Th17 che gioca un ruolo importante nell'infiammazione e nel danno tissutale. Le cellule Th17 producono principalmente l'Interleuchina-17A (IL-17A), attraverso cellule T CD4 e CD8 di entrambi i profili citochinici Th1 e Th2, che si differenziano in Th17 tramite l'attivazione del recettore nucleare orfano γ t correlato all'acido retinoico (ROR γ t) (30).

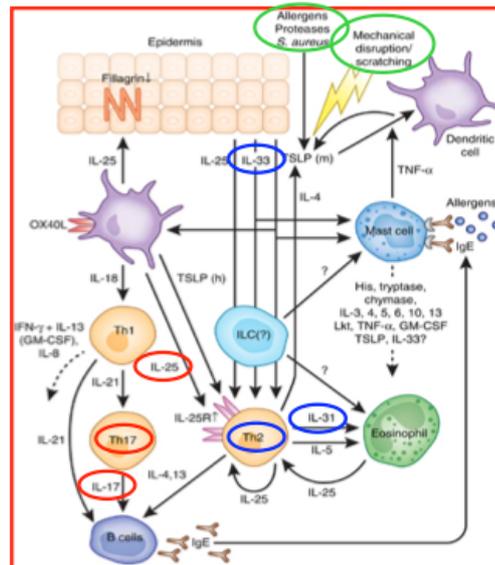
Recenti studi hanno suggerito che, sia le cellule Th17 che le citochine Th17 sono coinvolte nella patogenesi, nello sviluppo e nella regolazione dell'infiammazione allergica. Infatti, l'IL-17A è over-espressa nei polmoni di pazienti asmatici e i livelli della citochina correlano con la gravità della patologia, in particolare in

quei pazienti con asma neutrofilico e steroide-resistente (20,32). Per di più, cellule T CD4⁺IL-17⁺ infiltranti sono state trovate nei tessuti polmonari di pazienti con asma (31).

Ulteriori studi su queste cellule CD4⁺IL-17⁺ hanno rivelato un importante ruolo per le cellule Th17 nell'infiammazione allergica. La sensibilizzazione aerea o epicutanea con un allergene provoca una moderata risposta cellulare Th2 insieme ad una forte risposta da parte delle cellule Th17 che promuove neutrofilia delle vie aeree e iperattività bronchiale (AHR) acuta, esasperando anche la stessa infiammazione eosinofila delle vie aeree Th2 mediata e rafforzando così ulteriormente l'associazione tra le cellule Th17 e l'asma severo (34,35).

I principali effetti dell'immunità legata alle cellule Th17 nel promuovere la rinite allergica e l'asma allergica è mediata dalle citochine di tipo Th17 e, in particolare, dall'IL-17A. L'IL-17A agisce sulle cellule epiteliali delle vie aeree, sui fibroblasti del polmone e su altri tipi di cellule infiammatorie inducendo la produzione di citochine pro-infiammatorie, chemochine e metalloproteinasi della matrice; promuove infine il reclutamento di neutrofili e macrofagi, provocando così l'infiammazione del tessuto (32). Un recente studio sperimentale riporta che, in pazienti con asma e rinite allergica, è stato anche riscontrato un incremento sistemico di IL-17A nel plasma e nei PBMCs attivati. La concentrazione di IL-17A nel plasma riflette lo stato vero e proprio dei soggetti *in vivo*, laddove invece, la secrezione di IL-17A *in vitro* da PBMCs attivati, rappresenta le cellule che potenzialmente producono l'IL-17A (33). In questo stesso studio risulta ancora che, anche l'IL-25, un altro membro della famiglia

dell'IL-17A, è coinvolta nella patogenesi delle malattie infiammatorie allergiche ed è interessante notare come i livelli di questa citochina, che viene secreta da eosinofili e basofili umani attivati, aumentano nei soggetti allergici rispetto ai controlli sani.



Quindi, l'IL-25 può essere coinvolta nello sviluppo dell'infiammazione allergica, probabilmente in associazione con gli eosinofili ed inducendo e amplificando la risposta Th2. I differenti patterns di espressione e le diverse attività biologiche dell'IL-17 e dell'IL-25 implicano che queste citochine possono giocare differenti ruoli nella risposta immunitaria Th17-mediata coinvolta nella patogenesi dei processi allergici. Il possibile meccanismo nel quale sono implicate le due citochine, potrebbe essere quello per cui, inizialmente, l'IL-17 agisce sulle molecole effettrici innate, durante l'insorgere dell'infiammazione allergica. In un secondo momento, l'IL-25, prodotta da queste molecole effettrici, può mantenere l'attività delle cellule Th2 allergene-specifiche esprimenti il suo recettore, IL-25R, e quindi amplificare la risposta immunitaria di tipo Th2.

Pertanto, un feedback positivo tra immunità innata e acquisita, insieme ad una regolazione critica dell'immunità acquisita, porta allo sviluppo dell'infiammazione allergica (32,33,34).

Profilo della ricerca

Alla luce di tutto ciò, gli obiettivi proposti in questo studio sono:

- rilevare, mediante dosaggi *in vivo*, un aumento dei livelli plasmatici delle citochine IL-33, IL-31 e IL-17A in soggetti con patologia infiammatoria allergica e valutare l'eventuale correlazione di questi livelli con la patofisiologia dell'asma bronchiale e della rinite allergica;
- condurre un'indagine *in vitro* sulle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) allo scopo di valutare l'attività pro-infiammatoria dell'asse IL-33/ST2 e delle cellule Th-17 sui linfociti Th2, risultante nella produzione intracellulare delle citochine IL-17A e IL-31.
- evidenziare altresì le possibili correlazioni esistenti tra le cellule T responsabili delle patologie infiammatorie, le citochine da esse prodotte e il loro ruolo nell'induzione del processo infiammatorio allergico;
- infine, considerato che l'asse IL-33/ST2 è cruciale per l'infiammazione allergica, sarebbe ragionevole ipotizzare che una regolazione dell'espressione del recettore ST2 potrebbe essere un potenziale target di strategie terapeutiche per il trattamento di asma e R; per questa ragione, un altro obiettivo dello studio è stato quello di valutare l'attività *in vitro* di uno steroide, il Beclometasone Dipropionato (BDP),

sull'espressione delle citochine intracellulari IL-17A e IL-31 in associazione con il recettore ST2 in colture di PBMCs.

Materiali e Metodi

Soggetti

Per questo studio sono stati reclutati tre gruppi: 14 soggetti con rinite allergica (R), 17 con asma allergica ed R insieme (AR) e 20 soggetti controllo (C). La diagnosi di asma e la valutazione del suo grado di severità sono state condotte in accordo con le linee guida GINA (Global Initiative for Asthma) (10). La diagnosi di rinite è stata eseguita all'inizio dello studio in accordo con le linee guida ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) (9).

Il gruppo controllo è composto da 20 soggetti sani, sottoposti agli adeguati test per escludere qualsiasi forma di malattia allergica. Abbiamo selezionato soggetti senza polipi nasali, senza infezioni del tratto bronchiale o respiratorio e, soprattutto, senza alterazioni dei parametri funzionali respiratori. Entro due giorni dalla raccolta dei campioni di sangue, tutti i soggetti sono stati sottoposti ai test per la valutazione della funzione polmonare, come raccomandato dalle linee guida GINA (10).

Valutazione dell'atopia

Tutti i soggetti inclusi nello studio sono stati valutati per quanto riguarda l'eventuale stato atopico attraverso la storia clinica confermata dallo Skin Prick Test (SPT) (Stallergenes, France), messo a punto utilizzando il metodo Prick standard (37). I pazienti mono-sensibilizzati all'acaro della polvere (*Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae*)

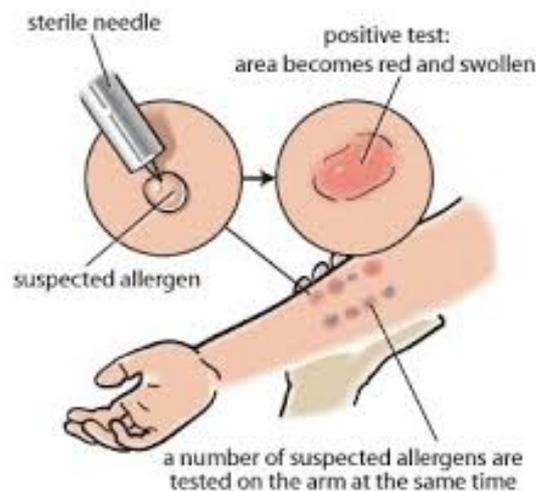
sono stati inclusi nello studio allo scopo di selezionare una popolazione il più possibile omogenea. Il gruppo controllo deve avere un SPT negativo e nessun sintomo di asma o rinite.

Il *prick test* viene utilizzato per lo screening degli allergeni di origine inalatoria ed alimentare. Il prick test è utilizzato per determinare se una sostanza specifica provoca infiammazione allergica con meccanismo IgE-mediato (immediate-type hypersensitivity o reazione di I tipo secondo la classificazione di Coombs e Gell). Nel prick test, alcune gocce di allergene purificato vengono posizionate sulla superficie cutanea, solitamente dell'avambraccio, e successivamente la cute viene scalfita con una lancetta monouso al fine di lasciar penetrare l'allergene attraverso gli strati più superficiali. Dopo un'attesa di circa 15-20 minuti si valuta la reazione cutanea ottenuta in corrispondenza di ogni allergene precedentemente posizionato. La reazione a livello dei singoli allergeni testati viene confrontata con un controllo positivo (di solito istamina) e con un controllo negativo (solitamente costituito da glicerina, il liquido di diluizione degli allergeni).

In caso di risultato positivo è possibile osservare una reazione caratterizzata da pomfo (area circoscritta di edema cutaneo) intensamente pruriginoso, contornato da un alone di eritema. Del pomfo ottenuto viene misurato o il suo diametro medio (il diametro più lungo + il diametro ad esso perpendicolare /2) oppure la sua area. Un diametro medio del pomfo 3 mm più largo del controllo negativo oppure un'area del pomfo superiore a 7 mm^2 consente di definire il test in oggetto come positivo.

Con il prick test può essere valutata la sensibilizzazione allergica verso allergeni di varia natura: allergeni inalanti, pollini, derivati degli acari o degli animali domestici, muffe, alimenti, sia di origine vegetale che animale, e farmaci.

Il prick test è un esame molto sensibile ($> 90\%$), il cui valore diagnostico è soprattutto negativo: pertanto, di fronte ad un risultato negativo si è in grado di escludere la sensibilizzazione allergica nei confronti dell'allergene. Per contro, il prick test è gravato da una scarsa specificità e potere predittivo positivo (50-85%): ciò significa che un test positivo non è in grado di assicurare l'effettiva presenza di ipersensibilità nel paziente, per cui la diagnosi finale di allergia dovrà sempre poggiare su altri test.



Isolamento delle cellule mononucleate umane del sangue periferico (PBMCs)

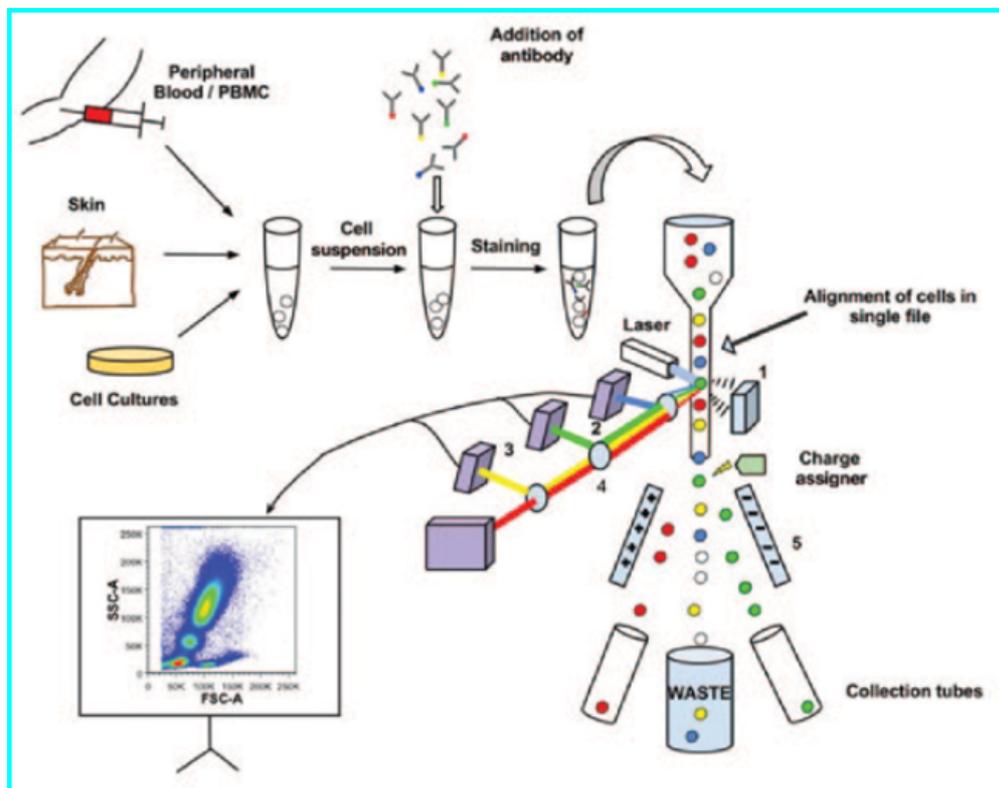
Campioni di sangue prelevati da pazienti allergici e soggetti controllo, sono stati raccolti in provette sotto vuoto contenenti EDTA (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) e sono stati utilizzati per la separazione del plasma e per l'isolamento dei PBMCs. Le sospensioni linfocitarie sono state ottenute dai campioni biologici tramite stratificazione su Ficoll-paqueTM PLUS (Amersham Biosciences SE-751 84, Uppsala, Sweden) e, dopo avere effettuato due lavaggi, le cellule sono state risospese in terreno di coltura RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, Italy) contenente Fetal Bovine Serum (FBS) al 10% inattivato al calore, L-glutamina 2mM, HEPES 20mM, penicillina 100 U/ml, streptomicina 100 µg/ml, 2-ME 5×10^{-5} M e gentamicina 85 µg/ml. La conta, la purezza e la vitalità delle cellule sono state valutate alla fine di ogni esperimento utilizzando il metodo di esclusione con trypan blu (che sarà poi impiegato anche per escludere la tossicità del farmaco testato).

Coltura e stimolazione delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs)

Per la valutazione *in vitro* dei livelli di IL-17A, IL-31 e del recettore ST2, i PBMCs (2×10^6 cells/ml) isolati da sangue periferico sono stati messi in coltura in piastre a 24 pozzetti (volume finale 1 ml a pozzetto) e incubati per 48 h a 37°C e CO₂ al 5%, in presenza di Forbolo Miristato Acetato (PMA) (50 ng/ml) (Sigma Aldrich, Italy) e Ionomicina sale di calcio (250 ng/ml)

(Sigma Aldrich, Italy).

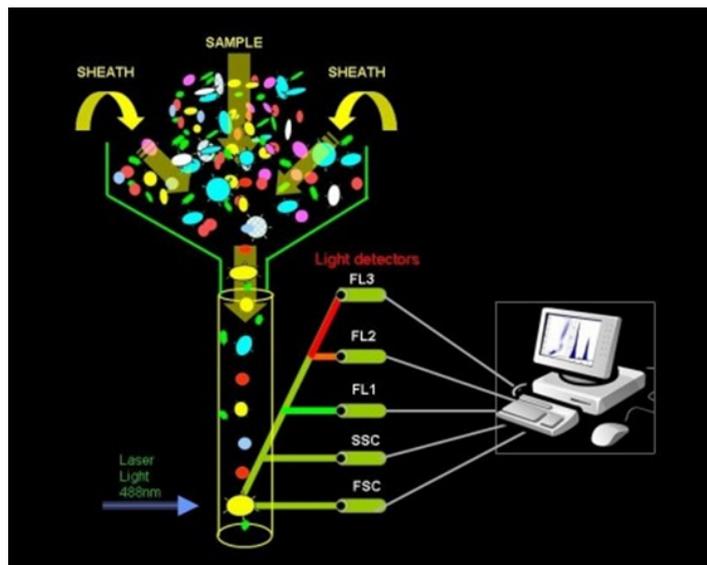
Al termine delle 48 h di incubazione, le cellule sono state raccolte per essere poi sottoposte alla marcatura di superficie con i rispettivi anticorpi coniugati a differenti fluorocromi e alla marcatura per l'identificazione delle citochine intracellulari, quindi, acquisite al citofluorimetro come viene di seguito descritto.



La *citofluorimetria* è un metodo molto flessibile per la caratterizzazione di cellule in sospensione e permette di analizzare simultaneamente parametri fisici e caratteristiche di fluorescenza di molte migliaia di cellule in pochi secondi.

Una sospensione cellulare monodispersa (cellule da sangue periferico, aspirato midollare, ecc.) viene iniettata in un sistema

fluidico il quale tende, in opportune condizioni idrodinamiche, a trasportare le cellule in maniera separata e ordinata fino al punto di misura, dove incontra il fascio di luce focalizzata proveniente dal laser. L'incontro tra il raggio di luce e ogni singola cellula presente nel flusso cellulare genera dei segnali.



Questi segnali sono legati alle caratteristiche fisiche della cellula e alla presenza di molecole fluorescenti. I segnali sono raccolti da un sistema di lenti, specchi e filtri ottici, e inviati ai rispettivi sensori (fotodiodi e fotomoltiplicatori) che ne misurano l'intensità.

I segnali elettrici provenienti da ogni sensore, opportunamente amplificati e digitalizzati, sono inviati ad un analizzatore di dati che provvede alla loro visualizzazione su monitor, rappresentazione grafica, e definizione statistica.

Marcatura di superficie

Le cellule sono state raccolte in provette di polipropilene e marcate con anti-CD4 FITC (Becton Dickinson, Mountain View,

CA, USA) o anti-CD4-PE (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) e monoclonal mouse anti-human ST2/IL-1 R4-PE (R&D Systems. Inc, MN, USA), per 30 minuti a temperatura ambiente, in accordo con le linee guida del produttore. Per ogni anticorpo monoclonale sono stati utilizzati gli isotipi di controllo allo scopo di escluderne la aspecificità. Infine, le cellule sono state lavate due volte e sottoposte ad acquisizione al citofluorimetro FACSCaliburTM, supportato dal software di acquisizione e di analisi dei dati CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule positive.

Marcatura delle citochine intracellulari

Per l'indagine delle citochine intracellulari, i PBMCs sono stati coltivati overnight in presenza di Golgi Stop (concentrazione finale 2 µM) (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Le cellule sono state quindi raccolte in provette di polipropilene, lavate due volte in PBS con FBS all'1% e marcate con gli anticorpi di superficie anti-CD4 FITC (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) o anti-CD4-PE (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) per 30 minuti a 4°C. In seguito a due lavaggi, le cellule sono state quindi fissate con PBS contenente il 4% di paraformaldeide per 20 minuti a temperatura ambiente. Una volta fissate, le cellule sono state lavate due volte con il Permeabilization Buffer (PBS contenente 1% di FBS, 0.3% di saponina e 0.1% di Na azide) e marcate per 30 minuti a 4°C con i seguenti anticorpi: polyclonal anti-human IL-31-PE,Cy5 (Antibodies-online. Inc, GA, USA), polyclonal anti-human IL-

33-PE (Antibodies-online. Inc, GA, USA) e monoclonal mouse anti-human IL-17A Alexa Fluor 488 (Becton Dickinson Biosciences, CA, USA) o con l'isotipo di controllo di ogni anticorpo utilizzato. Dopo due lavaggi in PBS contenente FBS all'1%, le cellule sono state acquisite al citofluorimetro FACSCalibur™ e analizzate mediante il software CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Per ogni campione sono stati acquisiti almeno 100000 eventi.

Coltura e stimolazione di PBMCs: curva dose-risposta di Beclometasone Dipropionato

Per il dosaggio in vitro di uno steroide inalatorio, i PBMCs sono stati sempre stimolati per 48 h in piastre per colture cellulari a 24 pozzetti in terreno completo, in presenza di PMA (50 ng/ml) (Sigma Aldrich, Italy) e Ionomicina sale di calcio (250 ng/ml) (Sigma Aldrich, Italy), in assenza o in presenza di Beclometasone Dipropionato (BDP) (Chiesi, Italy) alle concentrazioni 10^{-8} M e 10^{-7} M (38).

Al termine delle 48 h di incubazione dei PBMCs con il farmaco, le cellule vengono raccolte, marcate con i rispettivi anticorpi coniugati ai differenti fluorocromi per la marcatura di superficie e per le citochine intracellulari e analizzate al citofluorimetro come è stato già in precedenza descritto.

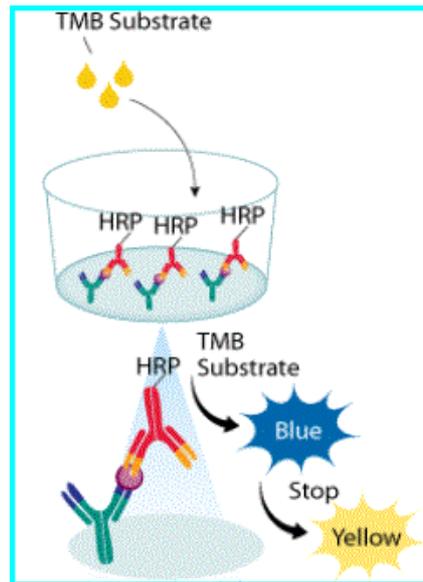
Dosaggio ELISA di IL-17A, IL-31 e di IL-33

I livelli di IL-17A, IL-31 e di IL-33 sono stati misurati nei campioni di plasma dei soggetti studiati: R, AR e C, utilizzando dei kit ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

disponibili in commercio (R&D Systems. Inc, MN, USA). I limiti inferiori di rilevabilità sono: 15 pg/ml per l'IL-17A, 7.8 pg/ml per l'IL-31, 1.65 pg/ml per l'IL-33.

L'*immunodosaggio ELISA* a sandwich combina la specificità degli anticorpi con la sensibilità dei dosaggi enzimatici. Si tratta di un saggio in fase solida effettuato su piastre da microdosaggio che sfrutta la capacità delle superfici di adsorbire quantità piccole ma rivelabili di proteina. Ogni piastra contiene 96 pozzetti e permette di saggiare contemporaneamente un elevato numero di campioni. Negli ultimi anni l'utilizzo della tecnica ELISA si è sempre più diffuso anche nei laboratori di ricerca. In particolare è utilizzata per determinare la presenza e la concentrazione di antigeni, anticorpi o citochine secrete, sia in vivo nel plasma che in vitro in medium. Nel sandwich ELISA un anticorpo, detto capture antibody, viene purificato e legato alla piastra. Si aggiunge la soluzione da testare contenente l'antigene, permettendo la formazione del complesso antigene-capture antibody. Le molecole che non si sono legate vengono eliminate tramite lavaggi. Un secondo anticorpo marcato, detto detection antibody, viene aggiunto, permettendo il suo legame all'antigene ed il completamento del sandwich. La quantificazione dell'antigene da determinare nel campione biologico avviene misurando la quantità di detection antibody legato, grazie all'utilizzo di substrati colorimetrici. L'*immunodosaggio ELISA* a sandwich è veloce ed accurato: utilizzando l'antigene purificato come standard, permette di determinare la quantità assoluta dell'antigene nel campione analizzato e richiede due anticorpi che riconoscono epitopi diversi sull'antigene. Questo risultato

può essere raggiunto sia utilizzando due anticorpi monoclonali con diversa specificità, o anticorpi policlonali (contengono molteplici specificità perché nella loro secrezione intervengono diverse cellule B che riconoscono regioni o epitopi diversi sull'antigene).



Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata condotta usando i test non parametrici di Kruskal Wallis e di Mann Whitney per valutare le differenze tra i gruppi. La dipendenza statistica tra due variabili è stata valutata utilizzando il test di correlazione di Spearman Rank. I dati sono stati espressi come mediana (10°-90° percentile).

I risultati degli esperimenti *in vitro* sono stati analizzati utilizzando il test ANOVA con la correzione di Fisher per comparazioni multiple. I dati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (DS). Un valore di $p < 0.05$ è considerato statisticamente significativo.

Risultati

Tabella 1: Caratteristiche demografiche, cliniche e atopiche dei soggetti.

	Control (C)	Rhinitis (R)	Asthma Rhinitis (AR)
	20	14	17
Age, (years) <i>Range</i>	37.0 (\pm 10.0) 27 – 47	38.3 (\pm 15.2) 23.1 – 53.5	31.5 (\pm 10.5) 21 – 42
Sex, n (<i>Male/Female</i>)	20 (10/10)	14 (6/8)	17 (9/8)
Body mass index, (kg/m ²) <i>Range</i>	22.8 (\pm 2.5) 19.8 – 25.3	23.3 (\pm 2.0) 21.3 – 25.3	23.4 (\pm 3.9) 19.5 – 27.3
FEV1 (% predicted)	104.0 (\pm 4.0)	96.4 (\pm 6.7)	84.5 (\pm 4.9)
SPT, any positive, n (%)	0	14 (100%)	17 (100%)
Total IgE IU/ml, (<i>Geometric mean</i>) <i>log tot IgE</i> (\pm <i>SD</i>)	73.87 2.31 (\pm 0.30)	342.08 2.53 (\pm 0.27)	301.50 2.30 (\pm 0.24)

Concentrazioni di IL-17A, IL-31 e IL-33 nei pazienti allergici

È stato osservato che i livelli di IL-17A, IL-31 e IL-33 erano aumentati in maniera statisticamente significativa sia nei pazienti con rinite allergica (R) che nei pazienti con AR rispetto ai controlli (C) (Figura 1). In particolare, l'aumento di IL-17A è risultato essere significativo tra i pazienti R e i controlli C ($p < 0.005$) come anche tra i pazienti AR vs R ($p < 0.035$), mentre non è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra i pazienti AR e i controlli C (Figura 1A). L'aumento dei livelli plasmatici di IL-33 sono risultati invece statisticamente significativi in entrambi i gruppi di pazienti R e AR vs i controlli C (rispettivamente

$p < 0.001$, $p < 0.004$); i livelli plasmatici di IL-33 sono risultati statisticamente aumentati nei pazienti AR rispetto ad R ($p < 0.032$) (Figura 1B). Dal dosaggio dell'IL-31 è risultato infine che i livelli plasmatici della citochina sono significativamente aumentati nei pazienti R e AR rispetto ai controlli C, (rispettivamente $p < 0.001$, $p < 0.009$), mentre tra i due gruppi R e AR non è stata rilevata alcuna differenza statisticamente significativa (Figura 1C).

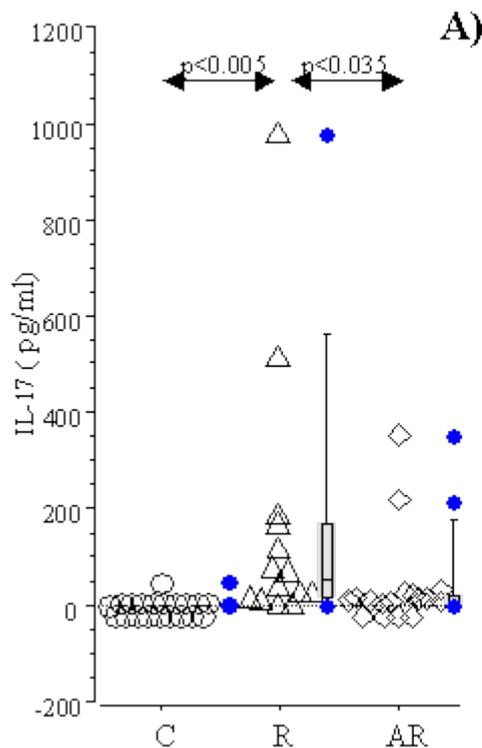
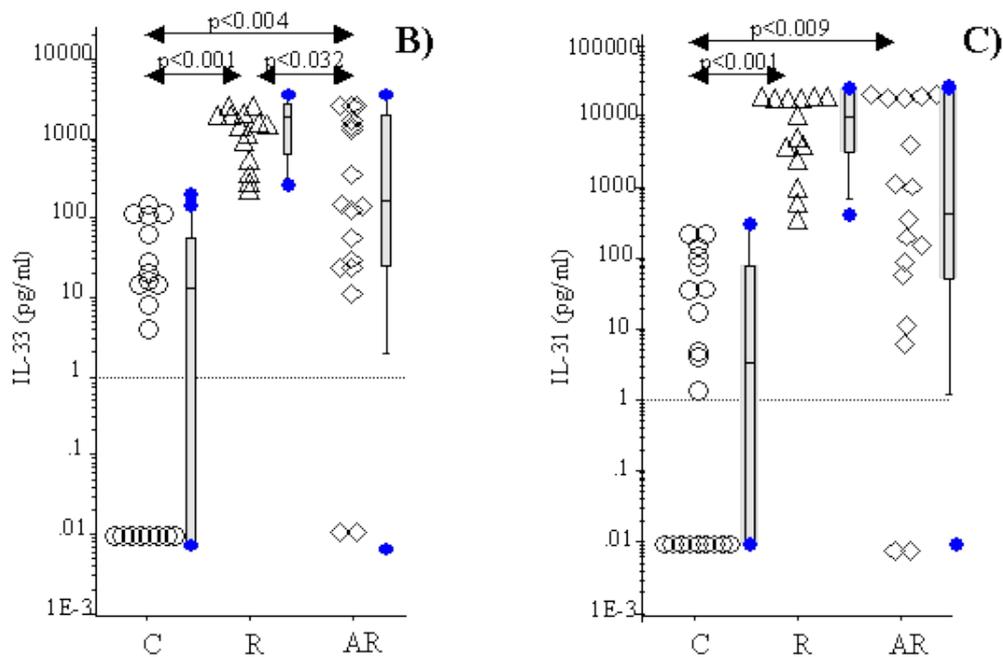


Figura 1. Livelli plasmatici di IL-17A, IL-31 e IL-33 nei soggetti controllo e nei pazienti allergici con asma e rinite. A, B, C) Livelli di IL-17A, IL-31 e IL-33 nel plasma dei gruppi di pazienti C, R e AR. I risultati sono stati espressi come pg/ml di plasma. I dati sono stati riportati come valori individuali. L'analisi statistica è stata condotta mediante i tests di Kruskal Wallis e di Mann-Whitney. La significatività è accettata per $p < 0.05$.



Correlazione di Spearman Rank

Dai coefficienti di correlazione di Spearman Rank risulta evidente che esiste una buona dipendenza statistica tra gli andamenti delle concentrazioni plasmatiche dell'IL-31 e dell'IL-33 nei pazienti e nei controlli ($RhoC=0.67$; $RhoR=0.88$; $RhoAR=0.97$) che dimostra che la produzione di IL-31 e di IL-33 sono strettamente dipendenti (Figura 2A). Per quanto riguarda le correlazioni tra IL-31 e l'IL-17A è stata trovata una buona dipendenza statistica tra gli andamenti delle concentrazioni solo nei pazienti con AR ($\rho_{AR}=0.67$), suggerendo una forte relazione tra IL-17A e IL-31 in soggetti con rinite che sviluppano asma (Figura 2B). Infine, per quanto riguarda la correlazione tra IL-33 e IL-17A è stata trovata una buona dipendenza statistica tra gli andamenti delle

concentrazioni soltanto nei pazienti con AR ($Rho_{AR}=0.66$) suggerendo anche stavolta una forte relazione tra queste due citochine in soggetti con rinite che sviluppano asma (Figura 2C).

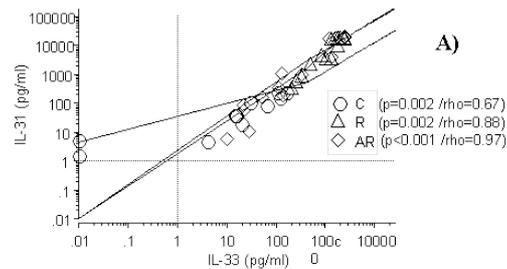


Figura 2A. Spearman Rank Correlation. IL-31 vs IL-33

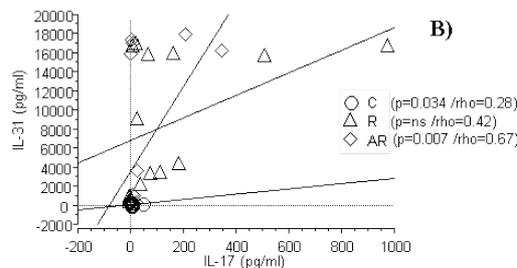


Figura 2B. Spearman Rank Correlation. IL-31 vs IL-17

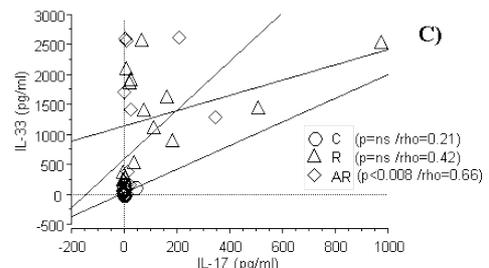


Figura 2C. Spearman Rank Correlation. IL-33 vs IL-17

Espressione del recettore di membrana ST2 e delle citochine intracellulari IL-17A e IL-31 nei PBMCs

Alla luce dei risultati ottenuti nel plasma, un gruppo più ristretto di pazienti allergici e di controlli oggetto dello studio (6 pazienti R, 10 pazienti AR e 6 soggetti C), è stato sottoposto a prelievo ematico per l'isolamento dei PBMCs ed è stata valutata la percentuale di cellule T che esprimono il recettore di membrana ST2 e i markers intracellulari IL-17A e IL-31. Sono stati riscontrati incrementi statisticamente significativi di espressione delle citochine intracellulari IL-17 e IL-31 in ognuno dei gruppi di

pazienti allergici R e AR rispetto al gruppo controllo C (Figura 3 A, B). Allo stesso tempo, i livelli di espressione del recettore ST2 nelle cellule degli stessi pazienti sono risultati considerevolmente più bassi rispetto ai controlli, con una differenza statisticamente significativa tra ognuno dei due gruppi di pazienti e i soggetti controllo rispettivamente (Figura 3C). Questa ridotta espressione di membrana del recettore libero viene interpretata come un aumento effettivo della percentuale di occupazione del sito recettoriale specifico per il suo ligando IL-33 e quindi come misura indiretta dell'aumento di espressione della citochina.

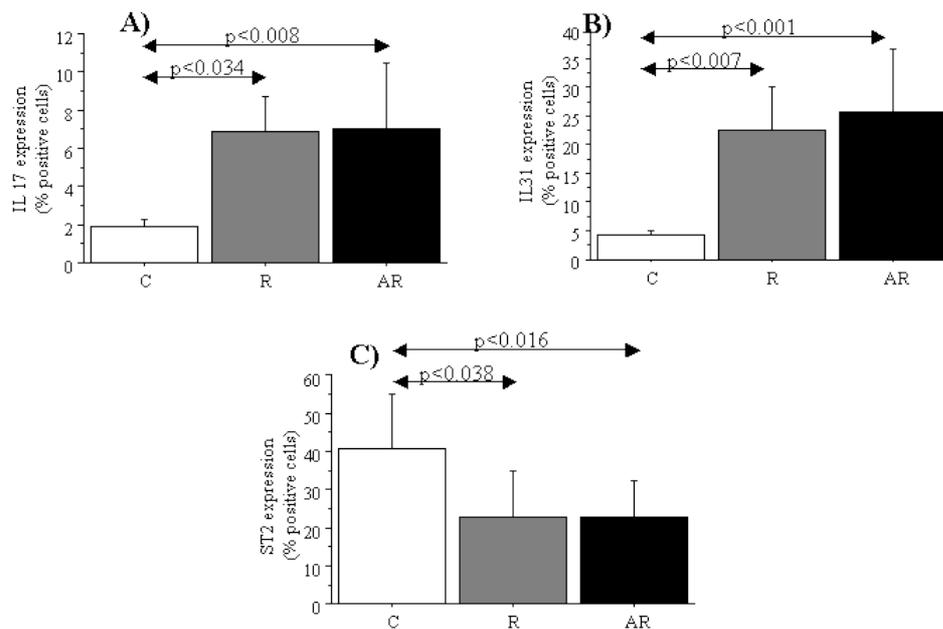


Figura 3. Espressione del recettore di membrana ST2 e delle citochine intracellulari IL-17A e IL-31 nei PBMCs di pazienti allergici. A) Espressione di CD4⁺IL-17A⁺ nelle cellule T di pazienti R (n=6) e AR (n=10) e di controlli C (n=6); B) Espressione di CD4⁺IL-31⁺ nelle cellule T di pazienti R (n=6) e AR (n=9) e di controlli C (n=6); C) Espressione di CD4⁺ST2⁺ sulla superficie delle cellule T di pazienti R (n=6) e AR (n=10) e di controlli C (n=6). L'analisi è stata condotta mediante acquisizione al citofluorimetro. Le barre rappresentano la media \pm SD della percentuale di cellule positive. L'analisi statistica è stata condotta mediante il test di Mann-Whitney. La significatività è accettata per $p < 0.05$.

Infine, dato che nei soggetti allergici, l'espressione dell'IL-17A, dell'IL-31 e del recettore ST2 è specificamente associata con le

cellule T CD4⁺, questi stessi parametri sono stati valutati nelle cellule T esprimenti questo specifico fenotipo coinvolto nelle patologie allergiche. L'andamento delle percentuali di espressione delle citochine e del recettore è risultato analogo a quello riscontrato nelle cellule T totali, con aumenti statisticamente significativi dei livelli intracellulari di IL-17A e di IL-31 nei pazienti R e AR rispetto ai C (per l'IL-31 l'aumento è statisticamente significativo anche tra i due gruppi di pazienti allergici) ed una marcata e statisticamente significativa riduzione dell'espressione di ST2 tra i soggetti C e i pazienti R e AR rispettivamente (Figura 4A, B, C).

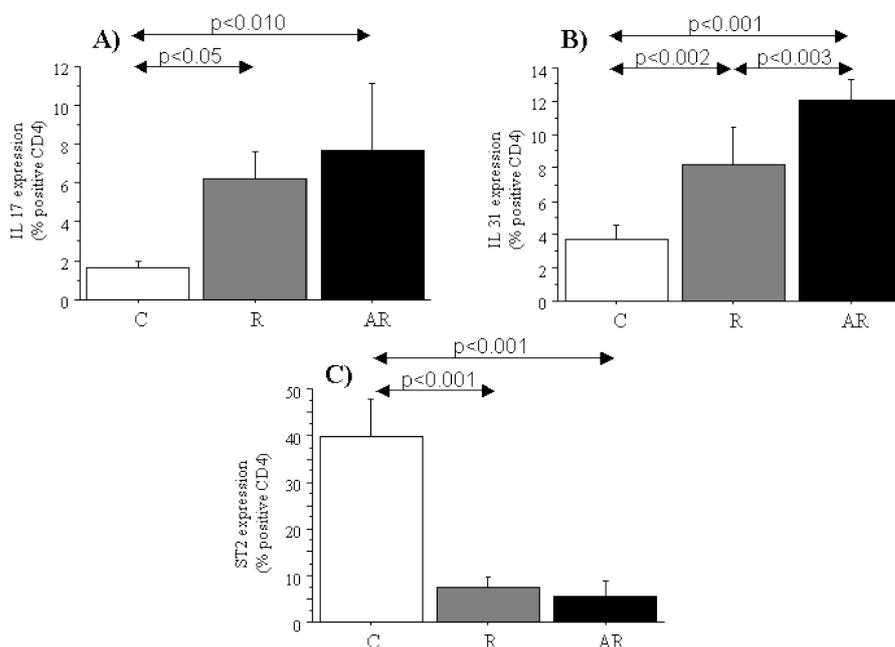


Figura 4. Espressione del recettore di membrana ST2 e delle citochine intracellulari IL-17A e IL-31 nelle cellule T CD4⁺ di pazienti allergici. A) Espressione di CD4⁺IL-17A⁺ nelle cellule T di pazienti R (n=4) e AR (n=7) e di controlli C (n=4); B) Espressione di CD4⁺IL-31⁺ nelle cellule T di pazienti R (n=4) e AR (n=7) e di controlli C (n=5); C) Espressione di CD4⁺ST2⁺ sulla superficie delle cellule T di pazienti R (n=4) e AR (n=7) e di controlli C (n=4). L'analisi è stata condotta mediante acquisizione al citofluorimetro. Le barre rappresentano la media \pm SD della percentuale di cellule positive. L'analisi statistica è stata condotta mediante il test di Mann-Whitney. La significatività è accettata per $p < 0.05$.

Colocalizzazione di IL-17A, IL-31 e ST2

Tramite la correzione di Fisher per comparazioni multiple sono state evidenziate le correlazioni esistenti tra l'espressione delle molecole infiammatorie oggetto dello studio sottoposte a colocalizzazione e il grado di severità della patologia allergica. È stato osservato un incremento statisticamente significativo nella colocalizzazione dell'IL-17A e dell'IL-31, solo nei pazienti con AR rispetto ai controlli C, nonostante ci sia una tendenza all'incremento anche nei pazienti con R. Questi risultati potrebbero coincidere con la dimostrazione che l'aumento della produzione di queste due citochine è associato con l'aggravarsi del processo infiammatorio di natura allergica verso l'asma (Figura 5A). Dalla co-localizzazione dell'IL-17A con il recettore ST2 è risultato un aumento statisticamente significativo non solo tra i controlli e i pazienti AR ma anche tra i due gruppi di pazienti allergici R e AR: da questo dato sperimentale si può dedurre, quindi, un incremento dello stato infiammatorio dovuto all'aumentata espressione di IL-17A che, a sua volta, induce l'espressione del recettore ST2 per l'IL-33 sui linfociti Th2 (Figura 5B), incrementando l'azione di questa citochina nei soggetti allergici che sviluppano asma. Dall'analisi della terza colocalizzazione risulta evidente il decremento nell'espressione del recettore ST2, che indica indirettamente un aumento di IL-33 legata e che assume significatività statistica in particolare tra C e pazienti AR. Questo dato potrebbe riflettere uno stato di attivazione dei linfociti Th2 che, per azione di elevati livelli di IL-33 legata al suo recettore, producono e rilasciano IL-31. Questa, a

sua volta, si lega al suo specifico recettore sulle cellule coinvolte nel processo infiammatorio ed è per questo motivo che noi vediamo una riduzione dei livelli di IL-31 nella colocalizzazione con ST2 (Figura 5C). Questi risultati *in vitro* supportano la correlazione tra gli aumentati livelli di espressione di queste citochine e l'aggravarsi della patologia infiammatoria di origine allergica.

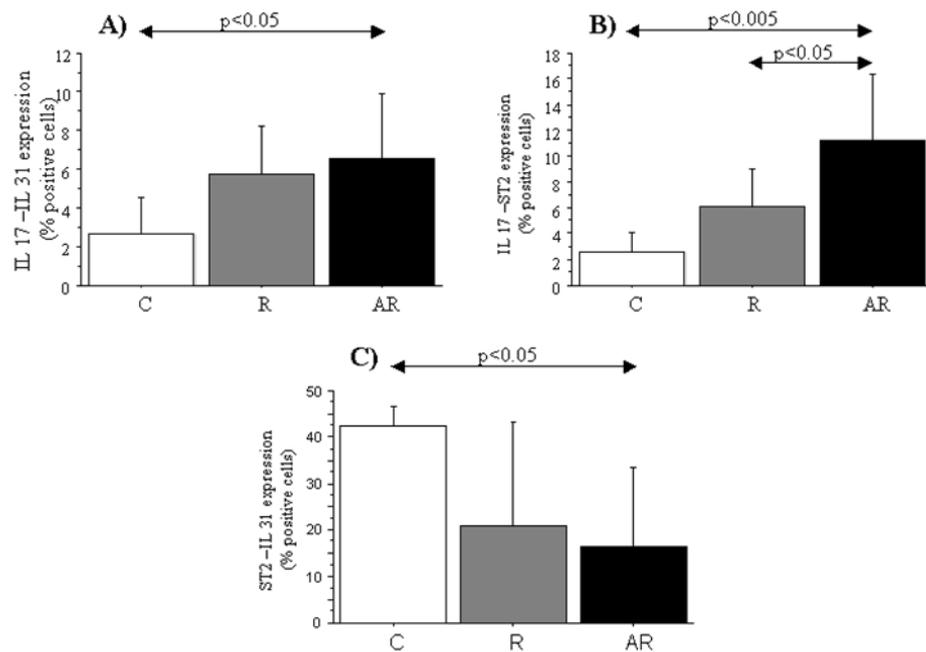


Figura 5. Co-localizzazioni del recettore di membrana ST2 e delle citochine intracellulari IL-17A e IL-31 nei PBMCs di pazienti allergici e relative correlazioni . A) Co-localizzazione di IL-17A con IL-31 nelle cellule T di pazienti R (n=4) e AR (n=8) e di controlli C (n=4); B) Co-localizzazione di IL-17A con ST2 nelle cellule T di pazienti R (n=4) e AR (n=5) e di controlli C (n=5); C) Co-localizzazione di ST2 con IL-31 nelle cellule T di pazienti R (n=4) e AR (n=8) e di controlli C (n=4). L'analisi è stata condotta mediante acquisizione al citofluorimetro. Le barre rappresentano la media \pm SD della percentuale di cellule positive. Le correlazioni statistiche sono state condotte tramite la correzione di Fisher per comparazioni multiple. La significatività è accettata per $p < 0.05$.

Effetto del Beclometasone Dipropionato (BDP) sulle cellule T

Nei campioni di 6 pazienti dello studio appartenenti al gruppo AR sono stati indagati gli effetti *in vitro* sulle cellule T di due diverse concentrazioni dello steroide BDP (10^{-7} M e 10^{-8} M) rispetto alla baseline (senza aggiunta di farmaco) e sono state elaborate le curve dose-risposta (Figura 6). Il BDP riduce significativamente i livelli intracellulari di IL-17A e di IL-31 nei PBMCs di questi pazienti in confronto alla baseline: in particolare, la diminuzione dell'IL-17A è statisticamente significativa ad entrambe le concentrazioni di farmaco valutate nell'esperimento rispetto alla linea di base, invece la riduzione dell'IL-31 assume importanza statistica soltanto ad una concentrazione di BDP 10^{-8} M (Figura 6A, B). Per quanto riguarda invece l'espressione del recettore ST2 sulla membrana delle cellule T, è stato riscontrato un aumento dose-dipendente, che diventa statisticamente significativo alla concentrazione di BDP 10^{-7} M rispetto alla baseline senza farmaco (Figura 6C).

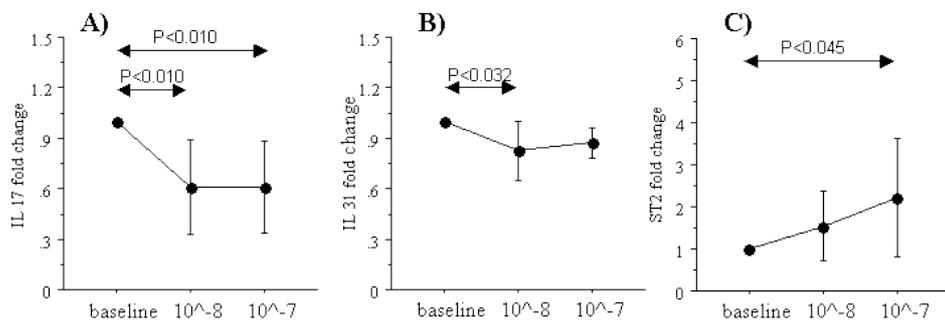


Figura 6. Effetto di due diverse concentrazioni (10^{-7} M e 10^{-8} M) di Beclometasone Dipropionato (BDP) sui livelli del recettore di membrana ST2 e delle citochine intracellulari IL-17A e IL-31 nei PBMCs di alcuni pazienti AR (n=6). A) Curva dose-risposta di BDP sull'espressione di IL-17A; B) Curva dose-risposta di BDP sull'espressione di IL-31; C) Curva dose-risposta di BDP sull'espressione di ST2. L'analisi è stata condotta mediante acquisizione al citofluorimetro. I punti sulla curva rappresentano la media \pm SD della percentuale di cellule positive. Le correlazioni statistiche sono state condotte tramite test ANOVA con correzione di Fisher per comparazioni multiple. I dati sono stati normalizzati calcolando i valori fold change. La significatività è accettata per $p < 0.05$.

Colocalizzazione di IL-17A, IL-31 e ST2 (BDP 10⁻⁷M)

Infine, dagli studi di colocalizzazione, è risultato evidente che l'attività *in vitro* dello steroide BDP 10⁻⁷M su PBMCs dei pazienti AR testati, ha determinato una riduzione statisticamente significativa delle cellule IL-17 IL-31 positive (Figura 7A) che, associata ad una riduzione statisticamente significativa di cellule IL-31 ST2 positive (Figura 7B), lascia pensare che, in soggetti con patologie allergiche delle vie aeree inferiori, l'impiego di steroidi sia in grado di controllare la produzione di IL-31 da parte di una sottopopolazione di cellule IL-17 positive regolate dall'attività del recettore ST2 dell'IL-33.

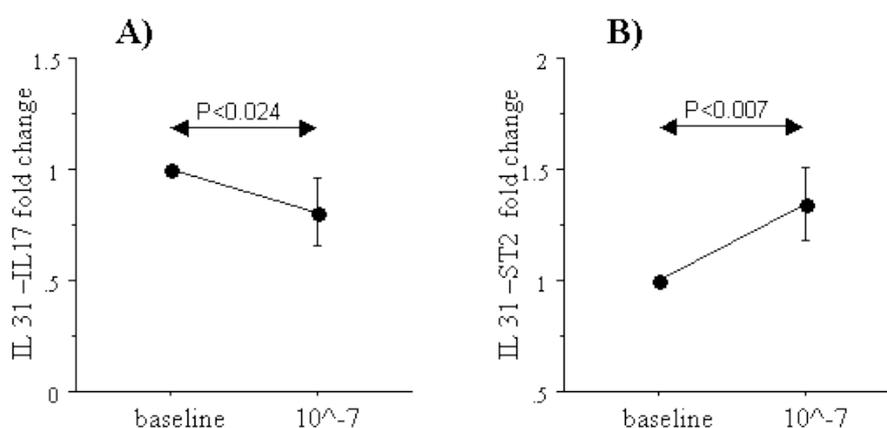


Figura 7. Co-localizzazioni del recettore di membrana ST2 e delle citochine intracellulari IL-17A e IL-31 nelle cellule T trattate con BDP 10⁻⁷M di alcuni pazienti AR (n=6) e relative correlazioni . A) Co-localizzazione di IL-17A con IL-31 nelle cellule T di pazienti AR (n=6); B) Co-localizzazione di IL-31 con ST2 nelle cellule T di pazienti AR (n=6). L'analisi è stata condotta mediante acquisizione al citofluorimetro. I punti sulla curva rappresentano la media ±SD della percentuale di cellule positive. Le correlazioni statistiche sono state condotte tramite correzione di Fisher per comparazioni multiple. I dati sono stati normalizzati calcolando i valori fold change. La significatività è accettata per p<0.05.

Discussione

Questo studio, a supporto delle più recenti evidenze sperimentali, ha permesso di dimostrare che livelli incrementati di IL-17A, IL-31 e IL-33 sono coinvolti nell'infiammazione sistemica di pazienti allergici affetti da asma e rinite. In particolare, nei linfociti T di pazienti con asma e rinite allergica, sono stati riscontrati aumenti nell'espressione delle citochine intracellulari IL-17A e IL-31 in associazione con una ridotta espressione del recettore di membrana ST2 dell'IL-33. Questi dati, unitamente agli aumentati livelli delle tre citochine plasmatiche, suggeriscono un coinvolgimento dei fenotipi Th2 e Th17 nelle forme allergiche di asma e rinite.

Inoltre, in questo studio sono anche state condotte delle indagini sull'attività dello steroide Beclometasone Dipropionato (BDP), correntemente utilizzato in formulazioni inalatorie e farmaco d'elezione nella terapia di asma e rinite allergica. Lo scopo è stato quello di valutare il suo impiego come strategia terapeutica nel controllo della risposta immunitaria Th2- e Th17-mediata e dell'attività di IL-31, IL-33 e di IL-17A in pazienti con rinite allergica e con comorbidità asma/rinite.

Nell'asma e nella rinite, l'infiammazione delle vie aeree è caratterizzata dall'attivazione di cellule T con fenotipo Th2, produzione di IgE ed eosinofilia. Le cellule T helper native CD4⁺ vengono indotte a differenziarsi in specifici lignaggi di fenotipi T helper: Th1, Th2, Th17 e Treg. Nell'asma e nella rinite si verifica un'imbalance tra le cellule Th1/Th2 a favore del fenotipo Th2 ed una conversione delle cellule Tregs nel fenotipo Th17 indotta da

opportuni stimoli infiammatori. Questi due meccanismi di imbalance, in questi pazienti, possono potenzialmente giocare un ruolo nei meccanismi patogenetici così come nella progressione e nell'aggravarsi delle malattie allergiche.

A tal proposito, in questo studio sperimentale è stato dimostrato che, le citochine IL-33, IL-31 e IL-17A sono coinvolte nell'infiammazione sistemica e che i loro livelli risultano significativamente aumentati, sia nel plasma che nelle cellule T di pazienti con rinite allergica R e con comorbidità asma/rinite AR rispetto ai controlli C, in perfetto accordo con gli incrementati livelli di espressione dei fenotipi Th2 e Th17 nei PBMCs. Questi risultati suggeriscono quindi un ruolo chiave per la risposta immunitaria di tipo Th2 e Th17, con le loro citochine relative, nei pazienti affetti da asma e rinite.

Inoltre, le nostre evidenze supportano il concetto che gli aumentati livelli di IL-17A, di IL-31 e di IL-33, sia nel plasma che nelle cellule T, riscontrati soprattutto in presenza di comorbidità asma-rinite, potrebbero essere la causa della progressione e dell'aggravarsi della malattia asmatica. Tutto ciò contribuisce a sottolineare ulteriormente il potenziale ruolo della risposta immunitaria di tipo Th2 e di tipo Th17 nella patogenesi delle malattie allergiche ed un suo forte coinvolgimento nelle forme più severe di queste patologie.

Infatti, è risultato evidente nel nostro studio, dalle rappresentazioni dei profili citofluorimetrici delle cellule T citochine-positive, che le percentuali di IL-17A e di IL-31 nei PBMCs sono più elevate nei pazienti AR rispetto ai pazienti R e ai controlli C. E questo

risultato sperimentale è perfettamente supportato in quanto l'IL-17A e l'IL-31 sono delle citochine pro-infiammatorie che giocano un ruolo veramente importante nell'induzione e nella propagazione dell'infiammazione dalla rinite all'asma.

Dagli stessi profili citofluorimetrici è risultato, inoltre, che il recettore ST2, valutato come misura indiretta del suo ligando IL-33, si riduce invece significativamente nei PBMCs di pazienti con comorbidità AR rispetto ai soggetti R e C, evidenziando, in questo gruppo di pazienti, un significativo aumento di IL-33 attiva, legata al suo recettore. Viene rispecchiato così perfettamente il dato trovato *in vivo* nel plasma e cioè che l'incremento di IL-33 mostra una correlazione positiva con l'evoluzione della malattia allergica verso l'asma bronchiale, in accordo con la peculiarità dell'IL-33 nell'essere una citochina coinvolta nella progressione della malattia.

Inoltre, dalle colocalizzazioni di IL-17A con IL-31 e di IL-31 con il recettore ST2 dell'IL-33 rispettivamente, si evince ancora che, IL-17A, IL-31 e IL-33 sono sicuramente correlate tra loro e che l'IL-33 attiverrebbe i linfociti T per la produzione di IL-31 in una sottopopolazione di Th17, i linfociti T helper che producono IL-17A. Il pathway coinvolto nell'induzione della patologia allergica è sinergico e l'IL-17 gioca un ruolo determinante a livello sistemico generando l'interazione tra IL-31 sistemica e IL-33 di produzione epiteliale-endoteliale (30,40).

L'attività di queste tre citochine, infine, è mediata dai loro specifici recettori di membrana espressi sulle cellule ematiche e su quelle strutturali, incluse le cellule T e le cellule dell'epitelio delle

vie aeree. In questa rappresentazione, l'IL-17A, l'IL-31 e l'IL-33, sia nella rinite allergica che nell'asma, possono rivestire sia gli aspetti della risposta immunitaria innata che di quella acquisita, rappresentando un decisivo crosstalk tra il sistema immunitario e le cellule strutturali come quelle epiteliali/endoteliali delle vie aeree (18,39,40).

Sulla base dei risultati sperimentali ottenuti, possiamo quindi concludere che esiste una correlazione tra l'aumento di IL-17A, l'attivazione dell'asse IL-33/ST2 e l'incremento di IL-31 nell'asma bronchiale e nella rinite allergica e che queste tre nuove citochine potrebbero quindi rappresentare dei validi biomarcatori valutabili per la patogenesi e per la diagnosi di asma e rinite.

Inoltre, l'evidenza di più alti livelli di IL-33, IL-31 e IL-17A, potrebbe assumere un significato importante in quei pazienti allergici con comorbidità rinite/asma, fornendo indicazioni utili attraverso l'identificazione di questi specifici biomarcatori, contribuendo ad una migliore classificazione dei pazienti allergici, consentendo una migliore gestione dei pazienti in base ai criteri ARIA e identificando specifici fenotipi patologici sui quali intervenire con possibili terapie personalizzate (8,10).

I glucocorticoidi per via inalatoria sono raccomandati come farmaci d'elezione e terapia di prima linea nel trattamento antiinfiammatorio dell'asma e della rinite allergica. Il trattamento con steroidi inalatori per il controllo della rinite e dell'asma ha dimostrato una grande efficacia negli stadi cronici persistenti delle patologie delle vie aeree ed è molto attivo nei confronti dell'infiammazione sia locale che sistemica in tutti i differenti

stadi delle malattie allergiche (41).

È stato dimostrato in questo lavoro che l'utilizzo dello steroide Beclometasone Dipropionato (BDP) è risultato efficace nell'interferire con il processo infiammatorio Th2- e Th17-mediato nei pazienti allergici. A supporto ulteriore dell'attività e dell'efficacia di questo farmaco, abbiamo analizzato le colture cellulari di PBMCs di alcuni dei pazienti allergici del gruppo AR, in presenza e in assenza di BDP (10^{-7} M e 10^{-8} M) e abbiamo dimostrato che il farmaco è capace di controllare l'espressione dei due fenotipi di cellule T, riducendo significativamente i livelli intracellulari di IL-17A e di IL-31 e, al contrario, incrementando l'espressione del recettore ST2.

Questi risultati hanno suggerito che il BDP potrebbe essere quindi capace di controllare i pathways Th2- e Th17-mediati e, soprattutto, di agire sull'asse IL-33/ST2, sia riducendo i livelli di IL-33 che, in particolar modo, riducendo *in vitro* il legame specifico della citochina al suo recettore di membrana. Questo incremento nell'espressione di membrana del recettore libero viene interpretata come una ridotta percentuale di occupazione del sito recettoriale specifico da parte del suo ligando IL-33 ed è quindi una misura indiretta della diminuita espressione della citochina.

In questo scenario, la comprensione dei meccanismi biochimici di queste citochine potrebbe essere cruciale per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici. Lo scopo di tutto ciò sarebbe quello di ottenere la remissione dell'infiammazione associata al crosstalk tra risposta immunitaria innata e acquisita durante il processo

infiammatorio allergico nell'asma e nella rinite.

A tal proposito, i risultati di questo studio suggeriscono e supportano il potenziale approccio terapeutico mediante l'impiego di BDP nel controllo dell'infiammazione locale e sistemica, generata dalla risposta immunitaria Th2- e Th17-mediata, in pazienti con malattie infiammatorie allergiche delle vie aeree.

Tuttavia, il nostro modello sperimentale, che vede l'uso del farmaco *in vitro* su PBMCs, presenta dei limiti nel supportare il concetto che il BDP agisca sul controllo dell'asse IL-31/IL-33/Th17 e, certamente, sarebbe più utile uno studio *in vivo*, un trials clinico, che preveda un programma di analisi in doppio cieco.

Le forme allergiche dell'asma e della rinite sono complessi disordini infiammatori dei tessuti che coinvolgono numerosi pathways citochinici con ruoli unici ma anche sovrapposti. Così, identificare la citochina che innesca il processo nelle malattie allergiche, rappresenta a tutt'oggi un traguardo ancora da raggiungere. Sia l'IL-4 che l'IL-13 hanno ricevuto una considerevole attenzione come protagonisti nella risposta immunitaria acquisita legata al processo allergico, sebbene, abbiamo potuto osservare come nuovi membri della famiglia delle citochine più recentemente identificati, possono fornire un link fondamentale tra l'attivazione della risposta innata immediata e la risposta allergica ritardata Th2 mediata.

In questo studio, infatti, si è ritenuto necessario sottolineare l'importanza di un gruppo di citochine a risposta precoce come l'IL-17A, l'IL-31 e l'IL-33, che possono anche essere secrete dalle

cellule epiteliali e/o dalle stesse cellule immunitarie innate residenti nel tessuto, in seguito a stimolo allergenico.

Riconoscimenti

Dott. ssa Mirella Profita, Prof. Angelo Sala, Prof. Giancarlo Folco, Dott. ssa Chiara Bolego, Dott. ssa Caterina Di Sano, Dott.ssa Caren Gabriela Uasuf, Dott. ssa Loredana Riccobono, Dott. ssa Anna Bonanno, Dott. ssa Rosalia Gagliardo, Dott. Giuseppe Albeggiani, Dott. Diego Cigna, Dott. ssa A. Marina Montalbano, Dott. ssa Giulia Anzalone, Dott. Iacopo Sorrentino.

Ringrazio tutti loro per il grande supporto scientifico, tecnico, professionale, psicologico, per la loro amicizia... e per aver creduto in me.

Bibliografia

1. Williams C. M. M. et al. Cytokine pathways in allergic disease. *Toxicol Pathol* 2012;40:205.
2. Bonsignore G. Bellia V. *Malattie dell'apparato respiratorio* 1995 McGraw-HILL.
3. Bousquet J. et al. and **Vignola A.M.** Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Res and Crit Care Med* 200;161(5):1720-45.
4. Urso D.L. et al. Diagnosis and treatment of asthma. *Recenti Prog. Med.* 2012;103(7-8):284-7.
5. Lloyd C. M. and Hessel E. M., Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol* 2010. 10: 838-848.
6. Kalogjiera L. et al. Rhinitis in adults *Acta Med Croatica* 2011;65(2):181-7.
7. Pawankar R, Bunnag C, Khaltaev N, Bousquet J. Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma in Asia Pacific and the ARIA Update 2008. *World Allergy Organ J.* 2012 Apr;5(Suppl 3):S212-7.
8. Pawankar R, Bunnag C, Chen Y, Fukuda T, Kim YY, Le LT, Huong le TT, O'Hehir RE, Ohta K, Vichyanond P, Wang DY, Zhong N, Khaltaev N, Bousquet J. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) Asian Pac J Allergy Immunol. 2009 Dec;27(4):237-43.
9. Yorgancıoğlu A, Özdemir C, Kalaycı Ö, Kalyoncu AF, Bachert C, Baena-Cagnani CE, Casale TB, Chen YZ, Cruz AA, Demoly P, Fokkens WJ, Lodrup Carlsen KC, Mohammad Y, Mullol J, Ohta K, Papadopoulos NG, Pawankar R, Samolinski B, Schünemann HJ, Yusuf OM, Zuberbier T, Bousquet J; WHO Collaborating Center on Asthma and Rhinitis. Tuberk Toraks ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) achievements in 10 years and future need. 2012;60(1):92-7.
10. Bousquet J. (2000) Global initiative for asthma (GINA) and its objectives. *Clin Exp Allergy* 30 Suppl 1: 2–5.
11. Bousquet J. (2001) ARIA Workshop Group. *J Allergy Clin Immunol* 108: S148–S260.
12. Broide DH. Allergic rhinitis: Pathophysiology. *Allergy Asthma Proc.* 2010;31(5):370-4.
13. Lambrecht B. N. and Hammad H. Asthma: the importance of dysregulated barrier immunity. *Eur J Immunol* 2013; “Accepted Article”, doi: 10.1002/eji.201343730.
14. Lee JH, Wang LC, Yu HH, Lin YT, Yang YH, Chiang BL. Type I IL-1 receptor (IL-1RI) as potential new therapeutic target for bronchial asthma. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:567351.
15. Mosmann T. R. et al. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73.
16. Hamid Q. and Tulic M. Immunobiology of asthma. *Annu Rev Physiol* 2009;71:489-507.
17. Larchè M. et al. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:450.
18. Rogala B. and Glück J. The role of interleukin-33 in rhinitis. *Curr Allergy*

- Asthma Rep 2013;13:196-202.
19. Kamekura R. et al. The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy*. 2012;42(2):218-228.
 20. Foo Y. Liew, Nick I. Pitman and Iain B. McInnes. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nature Rev. Immunol*. 2010;10:103-10.
 21. S. Tominaga, "A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor," *FEBS Letters*, vol. 258, no. 2, pp. 301–304, 1989.
 22. J. Schmitz, A. Owyang, E. Oldham et al., "IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor- related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines," *Immunity*, vol. 23, no. 5, pp. 479–490, 2005.
 23. R. Kakkar and R. T. Lee, "The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 7, no. 10, pp. 827–840, 2008.
 24. A. A. Chackerian, E. R. Oldham, E. E. Murphy, J. Schmitz, S. Pflanz, and R. A. Kastelein, "IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex," *Journal of Immunology*, vol. 179, no. 4, pp. 2551–2555, 2007.
 25. D. Préfontaine, S. Lajoie-Kadoch, S. Foley, et al., "Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells," *Journal of Immunology*, vol. 183, no. 8, pp. 5094–5103, 2009.
 26. Ohno T, Morita H, Arae K, Matsumoto K, Nakae S. Interleukin-33 in allergy. *Allergy* 2012;67:1203-1214.
 27. Haenuki Y. et al. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:184-194.
 28. Mitsuhiro Okano et al. Characterization of pollen antigen-induced IL-31 production by PBMCs in patients with allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2010;127:277-279.
 29. Ip WK. et al. Interleukin-31 induces cytokine and chemokine production from human bronchial epithelial cells through activation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways: implications for the allergic response. *Immunology* 2007;122(4):532-541.
 30. Wisniewski JA and Borish L. Novel cytokines and cytokine-producing T cells in allergic disorders. *Allergy Asthma Proc*. 2011;32(2):83-94.
 31. Albano G. D. et al. Th17 immunity in Children with allergic asthma and rhinitis: a pharmacological approach. *PLoS ONE* 2013;8(4):e58892.
 32. Wisam A. et al. Th17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:1185-1187.
 33. Zhao Y, Yang J, Gao YD, Guo W. Th17 immunity in patients with allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;151(4):297-307.
 34. Yang Zhao et al. Th17 Immunity in patients with allergic asthma *Int. Arch. Allergy Immunol*. 2010;151: 297-307.
 35. Hidefumi W. et al. IL-23 and Th17 Cells Enhance Th2-Cell-mediated Eosinophilic Airway Inflammation in Mice. *Am J Res Crit Care Med* 2008;10:1023-1032.
 36. Haldar P. and Pavord ID. Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and

- pathologic phenotype. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1043-1052.
37. Dreborg S. Skin testing the safety of Skin tests and the information obtained from using different methods and concentration of allergen. *Allergy* 1993 48: 473-5.
 38. Goleva E, Jackson LP, Gleason M, Leung DY. Usefulness of PBMCs to predict clinical response to corticosteroids in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Mar;129(3):687-693.
 39. Chun-Kwok Wong et al. Activation of eosinophils interacting with dermal fibroblasts by pruritogenic cytokine IL-31 and alarmin IL-33: implications in AD. *PLoS ONE* 2012;7(1)e29815.
 40. Ouyang W. et al. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008;28:454-67.
 41. Redington AE. Step one for asthma treatment: Beta2-agonists or inhaled corticosteroids? *Drugs* 2001;61:1231-8.