

Enrico Maggi

## Meccanismi immunologici delle malattie allergiche

Ordinario di Medicina Interna, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi di Firenze

**RIASSUNTO.** Negli ultimi anni vi è stato uno straordinario sviluppo nella comprensione dei meccanismi patogenetici delle malattie allergiche respiratorie con importanti ricadute cliniche. Dagli anni '90 è accettato il concetto che i linfociti Th2 sono i principali attori della flogosi allergica, in quanto producono citochine di tipo 2, rispondono agli allergeni ed richiamano mastociti, eosinofili e linfociti B produttori IgE che mantengono la flogosi. Recentemente sono state identificate anche cellule dell'immunità innata (ILC2) che localmente amplificano la flogosi allergica. Nella fase di cronicizzazione entrano in gioco molti meccanismi che localmente indirizzano la risposta T verso endotipi "Th2 high" (ILC2/Th2) o "Th2 low" (ILC3/Th17) con prevalenza nel BAL, rispettivamente, di eosinofili o neutrofili. Questa duplice risposta è dovuto alla plasticità dei linfociti T effettori modulabili da segnali microambientali. La definizione dei nuovi endotipi rilevabili con biomarkers selettivi e curabili con farmaci biologici mirati aprirà l'era della medicina personalizzata per questa patologia.

**Parole chiave:** infiammazione, linfociti T, asma.

**ABSTRACT.** In the last decades the knowledge on pathogenetic mechanisms of allergic diseases extraordinarily improved with relevant clinical outputs. From the '90s we know that Th2 cells are essential for allergic inflammation, since they produce type 2 cytokines, recognise allergens, induce IgE switch on B cells and recruit mast cells and eosinophils into tissues for maintaining the flogosis. Recently a new subset of innate immunity (ILC2) have been shown to amplify the allergic inflammation. The chronicity of respiratory allergy is characterised by tissue signals which address T cell to a "Th2 high"- (ILC2/Th2 responses) or a "Th2 low" (ILC3/Th17 responses) endotype, with a BAL prevalence of eosinophils or neutrophils, respectively. This double response is essentially due to T effector cell plasticity, modulated by microenvironmental signals. The discovery of new endotypes, diagnosed by selective biomarkers and cured by biological agents, will open the era of personalised medicine also for respiratory allergic disorders.

**Key words:** inflammation, T lymphocytes, asthma.

### Premessa

Le malattie allergiche respiratorie costituiscono un gruppo di patologie ad alto impatto socio-economico. La prevalenza di tali patologie è infatti in costante crescita nei paesi sviluppati. Studi epidemiologici indicano che la prevalenza della oculo-rinite allergica sia più che raddoppiata negli ultimi 20 anni nei paesi europei sia nei pazienti pediatrici che adulti. Analoghi incrementi sono stati segnalati per l'asma allergico e la Dermatite atopica. Circa il 5-10% dei soggetti affetti da asma bronchiale (AB) presenta una forma severa di malattia. Infine la mortalità per malattie allergiche come l'asma, è in aumento (range 3.08-8,43/100.000/anno malati secondo la WHO). L'aumentata morbilità ha ripercussioni in termini di farmaco-economia in quanto i costi per visite mediche, consumo di farmaci, giorni lavorativi persi e ospedalizzazione risultano molto elevati (1).

È proprio nell'ambito delle allergopatie respiratorie che negli ultimi anni vi è stato uno straordinario progresso nella comprensione degli aspetti patogenetici con importanti ricadute cliniche. Ricordiamo che dagli anni '90 nell'ambito della risposte cellule adattive sono state definite due sottopopolazioni T che mediano quadri fenotipici diversi ed in parte complementari: i linfociti Th2 sono capaci di produrre IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, rispondono ad allergeni ed antigeni parassitari ed inducono una flogosi cronica sostenuta da mastociti, eosinofili e linfociti B produttori IgE. I linfociti Th1 producono IL-2 e IFN- $\gamma$  rispondono a batteri e virus intracellulari, attivano i macrofagi e sviluppano prevalentemente risposte di tipo citolitico con formazione di granulomi per la rapida eliminazione dell'agente patogeno. È stato anche dimostrato che citochine del microambiente inducono la differenziazione delle cellule T naive in cellule effettrici. La IL-12 prodotta dalle cellule presentanti l'antigene favorisce la differenziazione dei linfociti Th1, mentre la IL-4 o le citochine prodotte da molte cellule tissutali attivate (IL-25, IL-33, TSLP ecc) determina la differenziazione delle cellule in senso Th2 (2).

Prenderemo in considerazione gli aspetti patogenetici delle malattie allergiche, i fattori genetici e ambientali, la fase di sensibilizzazione agli allergeni e i successivi meccanismi effettori che portano alla flogosi allergica e alla sua cronicizzazione.

## Genetica ed epigenetica contribuiscono allo sviluppo del fenotipo allergico

La risposta IgE nell'uomo coinvolge sia geni che controllano direttamente o indirettamente il locus IgE sia quelli che codificano per il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I/II che consente l'interazione delle cellule T e B nella risposta specifica agli allergeni. I maggiori geni candidati legati all'iperespressione delle IgE sono localizzati nel braccio corto del cromosoma 5 (regione 5q23-35 che include fra gli altri i geni di tutte le citochine di tipo 2 come IL-4, IL-5 e IL-13), cromosoma 6 (geni di istocompatibilità HLA di classe II e delle molecole di trasporto di peptidi TAP1 e TAP2), cromosoma 11 (regione 11q13, che codifica per la catena  $\beta$  del Fc $\epsilon$ RI), cromosoma 12 (geni del IFN- $\gamma$  e STAT6 per le risposte Th2), e cromosoma 16 (regione 16q11-12 geni della catena  $\alpha$  del IL-4R). Sono stati infine definiti numerosi polimorfismi associati ai geni candidati per le malattie allergiche respiratorie che variano anche in base a diversità razziali (3).

Si ritiene che l'interazione geni-ambiente influenzi lo sviluppo delle malattie allergiche e che i cambiamenti nello stile di vita degli ultimi 20-30 anni siano responsabili dell'aumentata prevalenza di questa patologia nei paesi sviluppati. Numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato che la riduzione delle esposizioni o del tipo di patogeni durante i primi anni di vita rappresenta un fattore critico per l'insorgenza della patologia IgE-mediata. L'"Ipotesi Igienica" che è stata proposta per spiegare l'aumento delle patologie allergiche, prevede che nei primi mesi di vita si verifichi un marcato viraggio delle risposte immunologiche (solitamente di tipo Th2) verso un profilo più protettivo di tipo Th1 dovuto alla riduzione dell'insulto microbico e delle citochine come IL-12 e IFN- $\alpha$  che favoriscono lo sviluppo delle risposte Th1. La mancata deviazione immune (Th2 verso Th1) è favorita anche dall'uso di vaccini, antibiotici, cibi crio-conservati, ridotta promiscuità, maggiore igiene ambientale, tutti fattori che rallentano o impediscono l'incontro con i patogeni (4).

L'importanza della ridotta attività delle cellule T regolatorie (teoria della ridotta immunoregolazione) è stata enfatizzata di recente per spiegare l'Ipotesi Igienica. Essa si basa sul riscontro di una ridotta prevalenza delle malattie allergiche nelle regioni con diffuse infestazioni da elminti che inducono risposte Th2, sull'aumento nei paesi sviluppati di patologie associate ad una risposta di tipo Th1 (Diabete di tipo I e Malattia di Crohn) e sulla capacità da parte di stimoli microbici di indurre elevati livelli di citochine regolatorie. Più recenti evidenze hanno rafforzato tuttavia l'ipotesi della mancata immunodeviazione in senso Th1. Lo studio ALEX, ad esempio, ha dimostrato come bambini che vivono in ambiente rurale/contadino mostrano minore capacità a sviluppare sensibilizzazioni per allergeni e asma rispetto a coetanei viventi nello stesso contesto socio-culturale, ma in condizioni igieniche maggiori. La differenza è dovuta al contatto nei primi anni di vita con ambiente poco igienico (animali da cortile e loro derivati) e dal consumo di latte non pastorizzato, entrambe contaminati dai prodotti batterici in grado di attivare i re-

cettori Toll-Like (TLR) delle cellule dendritiche (DC) con produzione di IL-12. Molti ligandi di TLR sia batterici che virali inducono la maturazione delle DC con produzione di citochine pro-Th1. Attualmente si ritiene che molti fattori epigenetici (patogeni, allergeni, igiene ambientale, alcuni alimenti ecc) siano in grado di indurre sia la ridotta immunodeviazione Th2-Th1 che la scarsa regolazione da parte delle cellule Treg e che entrambe i meccanismi possano spiegare l'Ipotesi Igienica (5).

## Aspetti patogenetici della flogosi allergica respiratoria

Le fasi della flogosi allergica respiratoria sono tre: la sensibilizzazione verso l'allergene, la risposta immediata dovuta a liberazione di mediatori e l'amplificazione/mantenimento della flogosi allergica con i suoi meccanismi di cronicizzazione.

Nella fase di sensibilizzazione nei soggetti che presentano una predisposizione genetica alle malattie IgE-mediate, il primo contatto con l'allergene induce lo sviluppo di un numero limitato di linfociti Th2 i quali attraverso la produzione di IL-4 e IL-13 favoriscono la produzione di anticorpi IgE da parte di linfociti B specifici per l'allergene. Le IgE si legano al recettore ad alta affinità (Fc $\epsilon$ RI) presente sulla membrana di mastociti e basofili (6).

Durante la fase della risposta immediata, gli allergeni, passati attraverso l'epitelio della mucosa bronchiale, si legano alle IgE fissate sui mastociti presenti nella sottomucosa. Questo fa liberare i mediatori preformati (istamina, chinine, ecc) nei granuli e induce la neoproduzione di eicosanoidi (leucotrieni, prostaglandine e trombossani), tutti responsabili delle alterazioni fisiopatologiche e quindi dei sintomi. Fra i mediatori preformati vi sono le citochine rilasciate dai mastociti e dai basofili quali la IL-4, IL-5, GM-CSF e TNF- $\alpha$ , capaci di indurre la crescita, la differenziazione e l'attivazione di cellule coinvolte nella flogosi allergica, anche nelle fasi più avanzate di cronicizzazione. Va sottolineato il leucotriene (LT)B<sub>4</sub> ed il "Platelet activating factor" (PAF), sono dotati di una cospicua attività chemiotattica. I cistenil-leucotrieni (cys-LTs) (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>) sono coinvolti in alcuni meccanismi della flogosi allergica quali: la secrezione di muco, il trasporto mucociliare, l'aumento della permeabilità vascolare e la formazione dell'edema della parete bronchiale, la contrazione e la proliferazione delle fibrocellule muscolari lisce, il rilascio di tachichinine dalle fibre nervose sensoriali C, l'incremento della chemiotassi e della sopravvivenza degli eosinofili, la riduzione dell'apoptosi anche dei linfociti T con conseguente produzione di citochine e chemochine attive sugli stessi eosinofili (IL-5, RANTES, eotassina) (6).

La terza fase o di mantenimento della flogosi allergica è caratterizzata da un incremento della risposta Th2 (indotta dall'allergene presentato dalle DC della sottomucosa) e dei suoi meccanismi effettori. Esiste un consenso unanime che molteplici vie controllate dal network di citochine Th2, come la IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, sono responsabili dell'induzione e mantenimento della infiammazione allergica. La citochina IL-13 è un potente induttore di citochine flogistiche, dell'iperplasia delle cellule

mucipare, della AHR e della fibrosi delle vie aeree. La IL-5 rappresenta il maggiore fattore chemiotattico per i precursori eosinofili, che favorisce la loro amplificazione e sopravvivenza nel tessuto flogistico, mentre la IL-3 e IL-4 sono entrambe coinvolte nel richiamo e sopravvivenza dei mastociti. La IL-9, infine, è una citochina rilevante nel danno tissutale e quindi coinvolta nel mantenimento della flogosi bronchiale. Recentemente la linfopoietina timica stromale -TLSP-, la IL-25 e la IL-33, prodotte dalle cellule epiteliali e DC, costituiscono importanti segnali amplificanti le risposte Th2. È stato dimostrato che anche le citochine di tipo 2 prodotte da eosinofili circolanti e mastociti sono responsabili dell'amplificazione della risposta Th2.

Recentemente è stata identificata una nuova popolazione di cellule tissutali in grado di ampliare la flogosi allergica: le cellule linfoidi innate (Innate lymphoid cells, ILC). Si tratta di cellule prive di recettori per l'antigene, coinvolte nella difesa verso patogeni che si differenziano in tre gruppi di cellule capaci di esprimere gli stessi recettori e di produrre le stesse citochine delle cellule effettrici Th1, Th2, Th17: da qui la denominazione di ILC1 (produttori IFN-gamma e IL-2), ILC2 (produttori IL-5 e IL-13), ILC3 (produttori IL-17 e IL-22). Le ILC2 tissutali sono stimolate da citochine prodotte dagli epitelii (IL-25, IL-33 e TSLP) e producono IL-5 e IL-13 (meno IL-4) amplificando le risposte Th2 a livello locale (richiamo di mastociti e eosinofili, attivazione di cellule Th2, induzione di produzione di IgE da parte di cellule B) (7, 8).

Il mantenimento della flogosi è dovuto a fenomeni di chemiotassi di cellule circolanti ed alla loro continua attivazione nella sede della flogosi. La migrazione degli eosinofili verso la mucosa è favorito dalla IL-5, PAF e GM-CSF. Gli eosinofili possono danneggiare la mucosa del tratto respiratorio mediante il rilascio di proteine basiche, di radicali liberi dell'ossigeno e di mediatori lipidici. Anche altre chemochine come MCP-1, MCP-3, RANTES, Eotassina sono chemiotattiche per gli eosinofili (6).

### **La fase di mantenimento/cronicizzazione della flogosi allergica**

L'esposizione cronica all'allergene ed il mantenimento di una flogosi "minima" a livello bronchiale favoriscono i fenomeni di cronicizzazione e di rimodellamento tissutale delle vie aeree. L'iperproduzione locale di IL-4 secreta da linfociti Th2, mastociti e eosinofili e di TGF- $\beta$  da parte di macrofagi e delle DC costituiscono il primo segnale per i fibroblasti e per la loro attivazione. Anche i LTs svolgono un ruolo nel rimodellamento delle strutture bronchiali in quanto possono indurre la proliferazione delle fibrocellule muscolari lisce e la sintesi di collagene con conseguente ispessimento della membrana basale. Essi sono attivi anche sulle cellule epiteliali e le cellule mucipare (6).

Di recente è stato dimostrato che anche le risposte Th17 sono coinvolte nella cronicizzazione della flogosi allergica. Si tratta di una sottopopolazione di cellule T appartenente ad un "lineage" diverso dai Th1 e Th2, coinvolta nelle alterazioni della flogosi cronica associata a leucociti neutrofili. I linfociti Th17 si caratterizzano per la produzione delle due isoforme IL-17A e IL-17F oltre che della IL-22,

IL-6 e TNF- $\alpha$ . Le isoforme IL-17A/F agendo su recettori specifici (IL-17RA e IL-17RC) espressi diffusamente su molti tipi cellulari promuovono il rilascio di numerose citochine proinfiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL6, G-CSF, IL-1 $\beta$ ) e soprattutto chemochine (CXCL1, CXCL8, CCL4, ecc) che favoriscono l'afflusso di granulociti e aumentano la granulopoiesi in situ. Le cellule Th17 mancano dei fattori trascrizionali tipici delle cellule Th1 e Th2 (tBet e GATA3), mentre attivano STAT3 e ROR $\gamma$ t come "main regulator" della loro differenziazione. È stato anche dimostrato che i linfociti Th17 vengono reclutati nella cute e nelle mucose in quanto esprimono recettori chemochinici (CCR4 e CCR6) da parte di CCL17 e CCL20. Lo sviluppo dei Th17 da cellule T naive può essere indotto dalla IL-1 $\beta$  in sinergia con la IL-23. È da notare che anche il TGF- $\beta$  può essere coinvolta nello sviluppo di Th17, così come di cellule Treg. Nell'uomo è stato anche dimostrato che cloni Th17 sono poco sensibili alle cellule Treg CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>. I linfociti Th17 hanno specificità per antigeni fungini o alcuni patogeni extracellulari svolgono un loro ruolo selettivo nel mantenimento dell'infiammazione come dimostrato in varie patologie soprattutto infezioni, malattie autoimmuni e tumori. Da notare che le ILC3 presentano caratteristiche analoghe alle cellule Th17 e contribuiscono con queste a mantenere la flogosi prevalentemente di tipo neutrofilico (9).

Per quanto attiene alle malattie allergiche respiratorie è stato osservato che la IL-17 è aumentata nel tessuto polmonare, nell'escreato indotto, nel liquido di lavaggio bronco-alveolare (BAL) e nel siero dopo stimolo allergenico specie nelle forme severe di asma. Inoltre è stato dimostrato che la broncoreattività aspecifica correla con i livelli di IL-17A nel BAL ed sono stati identificati polimorfismi della IL-17 correlati con lo sviluppo di asma o rinite cronica. Nei modelli animali di asma la somministrazione di IL-17 provoca infiltrazione di neutrofili nel polmone, mentre i topi KO per i recettori della IL-17 presentano una riduzione sia dell'infiltrato neutrofilo che eosinofilo, suggerendo un ruolo rilevante di questa citochina nel mantenimento anche della flogosi Th2-mediata (10).

### **La flessibilità/plasticità delle risposte effettrici T e i fenotipi/endotipi asmatici**

Negli ultimi anni è in corso una revisione sul ruolo delle cellule effettrici T in grado di mediare il tipo e l'intensità della malattia asmatica. Vi sono chiare evidenze che le cellule Th2 o Th17 non sono forme polarizzate terminali ma piuttosto elementi dotati di un alto grado di flessibilità mediata da segnali di membrana e fattori solubili presenti nel microambiente flogistico (11). È stato, ad esempio, dimostrato che segnali come la IL-12 può modulare la risposta sia Th2 che Th17 in senso pro-Th1 e che la IL-4 può indurre la produzione di citochine di tipo 2 da parte delle cellule Th17. È stato anche osservato che i linfociti Th2, in presenza di TGF- $\beta$ , possano acquisire la capacità di sintetizzare IL-9 e IL-10, dando luogo a nuovi fenotipi funzionali (Th9) con spiccate proprietà pro-flogogene. Del resto è noto che la stessa IL-9 è in grado di indurre la sintesi di

IL-17 da cellule T e non T. Tutte queste evidenze indicano che i fenotipi Th9 e Th17 giocano un ruolo essenziale nella cronicizzazione dell'asma IgE- o non IgE-mediato e per il rimodellamento tissutale (12). In particolare le cellule Th17 sembrano maggiormente in grado di espandersi in un tessuto cronicamente infiammato, in quanto non necessitano di IL-2 per la loro differenziazione, ma soprattutto, non risentono di segnali inibitori come quelli mediati cellule Treg, da citochine (TGF- $\beta$ ) o da segnali di membrana (PD-1L) regolatori. Queste nuove acquisizioni consentono di avere una visione unitaria della malattia asmatica e dei suoi diversi fenotipi. Infatti se nelle forme allergiche è stata chiaramente dimostrata una fase di induzione della flogosi mediata dalle risposte Th2/ILC2 e da una successiva coinvolgimento di risposte Th17/ILC3, queste ultime sembrano maggiormente associabili a molte forme (non-IgE mediate) severe di asma, specie quelle severe steroido-resistenti, da inquinanti, da esercizio fisico o da infezioni virali.

La recente distinzione di due principali endotipi asmatici "Th2 high" (asma prevalentemente eosinofila con prevalenza di risposte Th2 e ILC2) e "Th2 low" (asma prevalentemente neutrofila con prevalenza di risposte Th17 e ILC3) è in linea con le attuali conoscenze patogenetiche della malattia (13). Nell'ambito di queste due varianti possono essere estrapolati vari subendotipi asmatici. Ad esempio nelle forme "Th2 high" si può identificare il subendotipo con prevalenza di cellule eosinofile (IL-5), quello con iperproduzione di IgE (IL-4 e IL-13), quello con prevalente rimodellamento tissutale (IL-13, IL-9, IL-17). Il dosaggio della periosina, il FeNO e la conta degli eosinofili circolanti sono dei "surrogate markers" proposti per l'identificazione di alcuni endotipi asmatici. La prossima sfida è di potere disporre in tempi brevi di markers più selettivi capaci di identificare i vari subendotipi asmatici. La introduzione di farmaci biologici rivolti verso le citochine (IL-5, TSLP, IL-13) o i loro recettori (IL-5R, IL-4R ecc) essenziali per il mantenimento della flogosi, consentirà di attuare una medicina di precisione anche per il paziente asmatico (14).

## Bibliografia

- 1) Genuneit J, Seibold AM, Apfelbacher CJ, Konstantinou GN, Koplin JJ, La Grutta S, Logan K, Flohr C, Perkin MR. Task Force "Overview of Systematic Reviews in Allergy Epidemiology (OSRAE)" of the EAACI Interest Group on Epidemiology. The state of asthma epidemiology: an overview of systematic reviews and their quality. *Clin Transl Allergy* 2017; 29: 7-12.
- 2) Romagnani S. Regulatory T cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders? *Allergy* 2006; 61:3-14.
- 3) Mathias RA. Introduction to genetics and genomics in asthma: genetics of asthma. *Adv Exp Med Biol* 2014; 795: 125-55.
- 4) Romagnani S. Coming back to a missing immune deviation as the main explanatory mechanism for the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1511-3.
- 5) DeVries A, Vercelli D. Epigenetics in allergic diseases. *Curr Opin Pediatr* 2015; 27: 719-23.
- 6) Holgate ST. Novel targets of therapy in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2009; 15: 63-71.
- 7) Annunziato F, Romagnani C, Romagnani S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135: 626-35.
- 8) Cosmi L, Annunziato F. ILC2 are the Earliest Recruiters of Eosinophils in Lungs of Allergic Asthmatic Patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2017 (in press).
- 9) Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Cardilicchia E, Frosali F, Querci V, Angeli R, Matucci A, Fambrini M, Liotta F, Parronchi P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 222-30.
- 10) Cosmi L, Liotta F, Annunziato F. Th17 regulating lower airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2016; 16: 1-6.
- 11) O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2010; 327(5969): 1098-102.
- 12) Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis *Allergy* 2011; 66: 989-98.
- 13) Barnes PJ. Therapeutic approaches to asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndromes. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 136: 531-45.
- 14) Meyers DA, Bleecker ER, Holloway JW, Holgate ST. Asthma genetics and personalised medicine. *Lancet Respir Med* 2014; 2: 405-15.
- 15) Agache I, Akdis CA. Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine. *Allergol Int* 2016; 65: 243-52.

**Corrispondenza:** Enrico Maggi, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Viale Pieraccini 6, 50139 Firenze, Italy, E-mail: [enrico.maggi@unifi.it](mailto:enrico.maggi@unifi.it)