



Metodiche immunologiche per monitorare l'efficacia dell'ITS

Claudia Petrarca

*DMSI - Università di Chieti-Pescara
U.O. Allergologia e Immunotossicologia,
CeSIMEI, Chieti*

Not Allergol 2017; vol. 35: n. 2-3 : 52-60

Le nuove scoperte riguardanti la fisiopatologia delle malattie allergiche hanno portato allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici ed al miglioramento di quelli già in uso. Tra questi vi è l'immunoterapia con allergene (AIT) che è un trattamento immunomodulante in grado di indurre la tolleranza immunologica per le malattie allergiche mediate da IgE: la rinite allergica, l'asma allergica e la dermatite atopica. Sebbene questo approccio sia altamente efficace alcuni pazienti trattati non rispondono e, inoltre, il grado di remissione che è possibile ottenere con la AIT dipende da diversi fattori ancora non identificati. Per questo motivo è fondamentale individuare biomarcatori e sviluppare test analitici specifici che permettano di monitorare l'andamento della terapia, cioè che permettano di identificare precocemente i soggetti che potrebbero o meno rispondere, indicare la durata minima di trattamento per ottenere efficacia terapeutica, predire le ricadute sintomatiche e indicare quando eseguire un richiamo o un potenziamento della terapia. Inoltre, nei

pazienti responsivi, sarebbe utile di disporre di biomarcatori che indichino lo stato di tolleranza a lungo termine verso l'antigene al momento della conclusione di un ciclo/periodo terapeutico. Per l'individuazione di potenziali biomarcatori che possano guidare le decisioni mediche è necessario conoscere i meccanismi immunologici che sottendono la patologia e la effetti terapeutici positivi.

L'induzione di tolleranza indotta da AIT e la sua efficacia clinica sono state associate alla modificazione di diversi parametri immunologici cellulari e umorali, anche se finora non è stato possibile correlare causalmente tutti questi eventi tra loro in modo chiaro.

Tra le componenti del sistema immunitario che state analizzate in contesti sperimentali e clinici come potenziali biomarcatori predittivi ci sono: mastociti, basofili e eosinofili, le cellule linfoidi innate del gruppo II (ILC2), cellule T helper di tipo 2 (Th2); interleuchine IL-10, TGF- β , IL-4, IFN- γ , cellule dendritiche regolatorie (DCreg), cellule T regolatorie (T reg), cellule B-regolatorie (Breg), anticorpi IgG4 e immunoglobuline non-

IgE. Inoltre, il ruolo delle IgE specifiche come biomarcatore dell'efficacia della AIT è stato riesaminato recentemente (1). Sia per la componente cellulare che per quella umorale sono stati utilizzati sia metodi analitici ben validati che altri di più recente allestimento e non sempre applicabili alla pratica clinica.

Le Innate lymphoid cells 2 (ILC2)

sono cellule morfologicamente simili ai linfociti a cui manca il riarrangiamento somatico dei recettori per l'antigene e quindi mancano di specificità per l'antigene. Questo e altri gruppi di ILC forniscono immunità verso le infezioni parassitarie, virali e batteriche ma possono anche avere un ruolo patogenetico nell'infiammazione allergica. Sotto l'influenza di mediatori prodotti dalle cellule epiteliali (IL-33, IL-25, TSLP, LTD4) le ILC2 possono secernere citochine Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) e così promuovere l'infiammazione allergica di tipo 2, oltre che promuovere la riparazione dei tessuti. Alti livelli di ILC2 (caratterizzate dal marcatore di superficie CD84) sono stati trovati nelle lesioni da



RIASSUNTO

Parole chiave e acronimi

- Allergia • Immunoterapia specifica • Immunità innata • Biomarcatori
- Interleuchine • MicroRNA
- CTLA, Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen • FACS, Fluorescence activated cell sorting
- GATA, Transcription factor binding to the DNA sequence • IGF, Insulin growth factor
- RIPK, Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 • STAB, Stabilin
- STAT, Signal transducer and activator of transcription • TGF, Tumour growth factor
- TSLP, Thymic Stromal Lymphopoietin

I principali effetti immunologici che scaturiscono dall'immunoterapia con allergene (AIT) sono limitati alla induzione di anticorpi bloccanti e allo spostamento Th2-Th1 della risposta cellulare e all'induzione delle cellule T regolatorie. Questi e molti altri cambiamenti che sono stati descritti potrebbero contribuire all'attenuazione dei sintomi e costituire dei segnali anticipati di risposta efficace o di non risposta alla terapia. In questo articolo sono riassunte le principali metodologie di analisi più attuali e presi in esame i relativi biomarcatori determinati che, una volta validati in trials con end-point clinici altamente standardizzati, potrebbero chiarire i meccanismi immunologici della AIT e costituire end-point surrogati per monitorare, e possibilmente anticipare, gli effetti a breve e a lungo-termine della AIT.

dermatite atopica. Inoltre, queste cellule sono risultate rapidamente aumentate nel sangue periferico di soggetti con rinite allergica test di provocazione nasale con l'allergene di gatto (2). Inoltre, le ILC2 (CD117+ o IL13+) aumentano nel sangue periferico in pazienti esposti naturalmente al polline di graminacee, ma non in quelli trattati con immunoterapia iniettiva (SCIT). E' da notare però che al di fuori della stagione di pollinazione la frequenza di queste due sottopopolazioni di ILC2 non è diversa tra allergici e non allergici e che un trattamento di 4 mesi con immunoterapia per via sublinguale (SLIT) non ha portato a riduzione della frequenza delle ILC2 (3). Viste le apparenti discrepanze nei risultati dei due studi (forse dovute a la fatto di essere state condotte in stagioni diverse), il ruolo delle ILC2 nella risposta clinica alla AIT non è chiaro e tali cellule non possono essere considerate al momento un biomarcatore di risposta efficace.

Alcune sottopopolazioni di **cellule dendritiche, DC2 e DCreg**, le quali sono coinvolte rispettivamente nel differenziamento delle cellule Th2 e delle cellule T regolatorie la cui abbondanza relativa è implicata nello sviluppo e mantenimento o meno della risposta allergica, si sono rivelate interessanti come indicatori di effetto della AIT. In un ampio studio che ha coinvolto 79 soggetti, Zimmer e colleghi hanno individuato, mediante un'estesa analisi genomica e proteomica, due marcatori C1Q e STAB1 che rappresentano la "firma molecolare" delle DCreg tollerogeniche, la cui upregolazione in DCreg derivate in vitro da monociti

isolati dal sangue periferico correla con l'efficacia della AIT nei pazienti trattati responsivi (4). Anche in un altro studio, basato sull'analisi citofluorimetrica, la variazione del livello di espressione di antigeni specifici di DC tollerogeniche (anche esse generate in vitro) è stata indotta dalla AIT in pazienti con rinite allergica. Più precisamente, dopo 2 e 4 mesi di trattamento, il cambiamento del livello di espressione di 5 marcatori molecolari dei quali 3 sulle DC2 (riduzione di CD141, GATA3, e RIPK4) e due delle Treg (aumento di C1QA e FcγRIIIA) correlava con il beneficio clinico della AIT e ha permesso la effettiva classificazione in pazienti responsivi e non responsivi, con una sensibilità del 91% e una specificità del 61.9% (5).

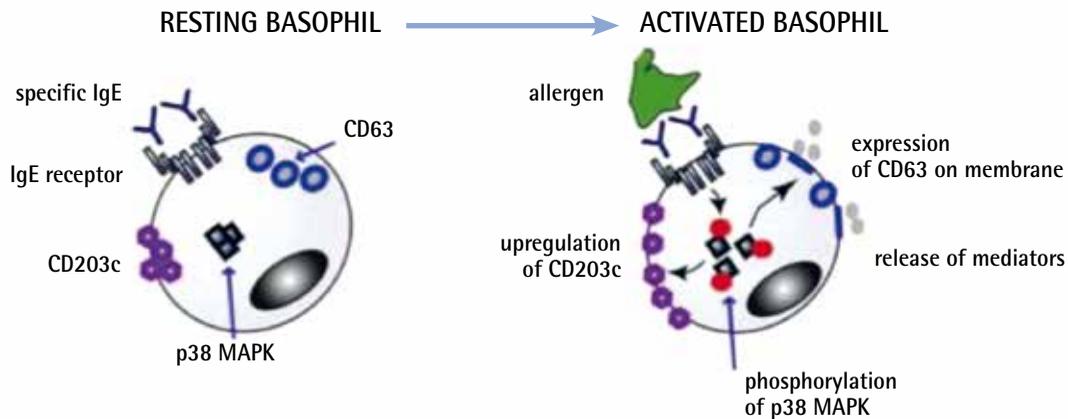
I linfociti B regolatori (Breg)

sono una sottopopolazione di cellule B CD19+ che producono IL-10 e hanno la capacità di sopprimere l'azione pro-infiammatoria di cellule T e B effettrici. Le cellule Breg promuovono la tolleranza immunologica attraverso la produzione di tre citochine: IL-10, IL-35 e TGF-β. La AIT è in grado di indurre una sottopopolazione di cellule Breg (CD25+CD71+CD73-) che produce IL-10 in grado di inibire la proliferazione di cellule T CD4+ antigene-specifiche e produrre anticorpi anti-infiammatori IgG4 (6). Cellule con questo immunofenotipo sono state purificate in soggetti tolleranti al veleno di imenotteri e hanno dimostrato in vitro di essere in grado di sopprimere la proliferazione antigene-di-



Figura 1

Marcatori di attivazione dei basofili



Cramhecke JL et al. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014;14:408

Hausmann OV et al. *Immunol Allergy Clin N Am* 2009; 555-66

modificato da: (8)

pendente di PBMC. Inoltre, nello stesso studio, cellule Breg specifiche per la fosfolipasi A2 e produttori IL-10 sono risultate aumentate in seguito a AIT con veleno di imenottero. Anche questi dati sono stati ottenuti mediante analisi FACS.

I basofili

rappresentano <1% dei leucociti umani nel sangue periferico. Essi contengono granuli di secrezione citoplasmatici citoplasmatici, fatti di proteoglicani e istamina. I basofili esprimono il recettore FcεRI, che può essere legato da IgE specifiche per l'allergene dopo l'esposizione all'allergene, e risultando nella degranulazione con rilascio di istamina, leucotrieni ed altri mediatori dell'infiammazione al-

lergica. Il CD63 (una proteina che è legata ai granuli) è tipicamente espressa sulla superficie dei basofili stimolati ed attivati dall'allergene nel sangue intero, mentre CD203c è espresso sulla membrana di tutti i basofili a prescindere dal loro stato di attivazione. CD63 e CD203c sono complementari per stabilire lo stato di attivazione dei basofili.

I basofili possiedono anche altre varie proteine di membrana che sono espresse quando vengono attivate, come CD13, CD107a e CD164. Inoltre, l'istamina può essere individuata nel fluido di lavaggio broncoalveolare da pazienti con asma allergico e nel plasma dei pazienti di dermatite atopica. Più recentemente, l'espressione intracellulare di **diamino**

ossidasi (DAO), identificabile mediante marcatura con fluorocromo, è stata indicata come potenziale biomarcatore di efficacia e tolleranza dopo AIT(7). (Figura 1) In uno studio clinico di AIT, l'attivazione dei basofili indotta da polline di graminacee è risultata elevata in pazienti con rinite allergica stagionale (SAR) e diminuita in individui trattati con AIT iniettiva (SCIT) o sublinguale (SLIT). La riduzione della reattività e rilascio di istamina misurata come DAO mediante citofluorimetria era associata a ridotti sintomi e numero di medicazioni salvavita (7).

I microRNA (miR)

sono piccole sequenze di RNA (18-22 nucleotidi) non-codificanti che costitu-



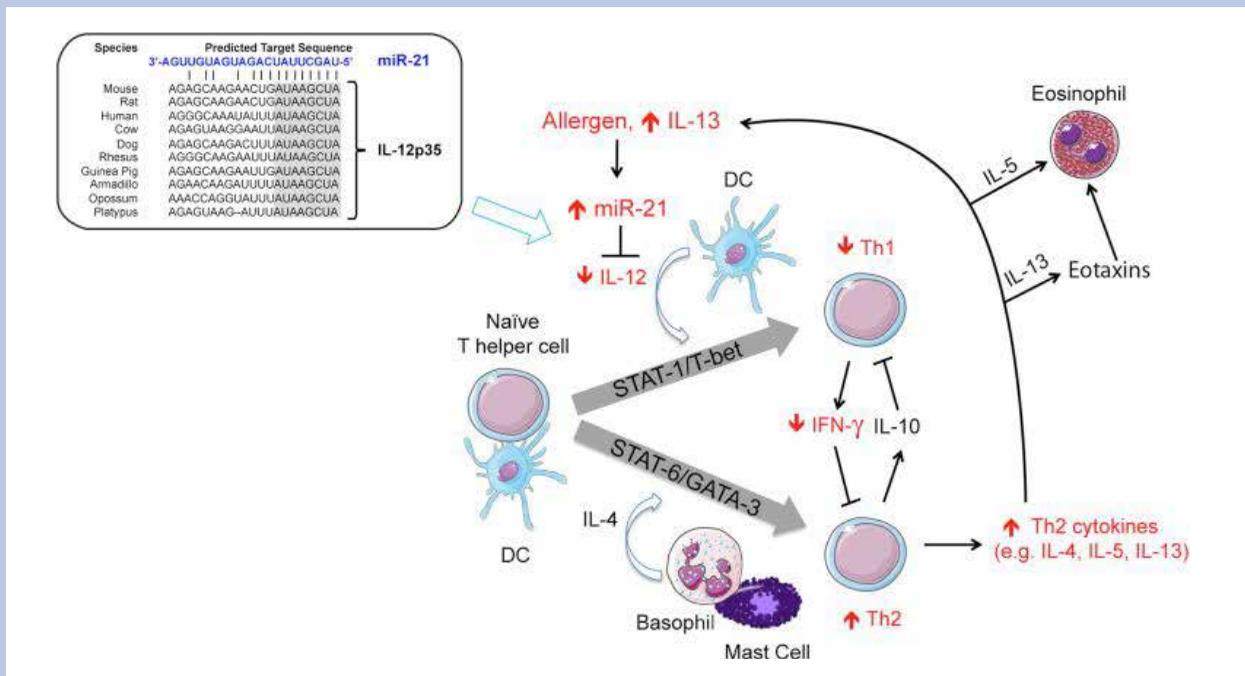
iscono uno dei meccanismi regolatori epigenetici fondamentali delle cellule. I miR (struttura a forcina per capelli) sono trascritti dal DNA genomico e trasformati in miRNA maturi (da una struttura a doppio filamento ripiegato ad una a singolo filamento), attraverso molteplici trasformazioni mediate da complessi enzimatici. Una volta trasportati nel citoplasma, i miR maturi vengono incorporati nei complessi RISC (RNA induced silencing complex) e possono riconoscere e appaiarsi a sequenze complementari su molecole bersaglio di RNA messaggero, ostaco-

landone la traduzione (attraverso degradazione o ingombro sterico). Oltre che all'interno delle cellule in cui si formano, i microRNA possono essere rilasciati dalle cellule nel plasma e nel siero all'interno di microvescicole da cui possono essere estratti e successivamente identificati e dosati mediante piattaforme analitiche che si basano su reazioni PCR e primer specifici che permettono l'analisi simultanea di centinaia di miR, ciascuno dei quali a sua volta controlla la trascrizione di circa 200 geni coinvolti in diversi processi biologici fisiologici e patologici, comprese le reazioni aller-

giche. Per esempio, miR-21 e miR-126 sono stati associati all'infiammazione allergica polmonare e IL-12p35, una citochina che contribuisce alla polarizzazione delle cellule Th in cellule Th2 è un bersaglio per l'azione di miR-21. Invece, il blocco di miR-126 comporta l'aumento di un fattore (POU2AF1) che attiva il fattore di trascrizione PU.1 il quale inibisce la funzione delle cellule Th2 attraverso la regolazione negativa dell'espressione di GATA-3. Cellule epiteliali bronchiali stimulate in vitro con IL-4 e TNF- α mostrano un aumento dei miR let-7 e miR-29a e miR-155 che

Figura 2

Ruolo di miR-21 nell'infiammazione allergica polmonare



modificato da: (9)



potrebbero agire come interruttori molecolari per resettare il profilo proteico delle cellule in risposta a stimoli esterni nell'infiammazione allergica. Altri microRNA riconoscono geni di mediatori del sistema immunitario come IL-13, IL-13Ra, CTLA-4, STAT-1, e modulano la funzione di varie cellule immunitarie come cellule T, cellule dendritiche e macrofagi [9] (Figura 2).

Per quanto appena descritto, anche **Panalis del miRnoma** (cioè della modulazione dell'insieme di tutti i miR noti ad oggi, circa 2000) mediante piattaforme strumentali dedicate e dotate di software per l'analisi biostatistica dei dati, potrebbe a breve costituire uno strumento analitico di immunologia molecolare per l'identificazione di endpoint surrogati per predire l'efficacia clinica della AIT (e di altre terapie).

In effetti, studi recenti suggeriscono che i microRNA possano essere utili nel monitoraggio della AIT: in pazienti adulti nella fase built-up della immunoterapia con veleno di imenotteri alcuni di essi vanno incontro a cambiamenti pre- post-AIT del livello di espressione, nel senso di una riduzione di quelli coinvolti nell'infiammazione allergica e dell'aumento di quelli con una funzione pro-tollerogenica (10); in pazienti in età pediatrica con rinite allergica verso gli acari della polvere di casa e trattati con immunoterapia con allergene (SLIT o SCIT) e valutati a 3 mesi, il livello di espressione di miR-146a è risultato aumentato e correlato all'aumento di altri parametri immunologici come aumento del livello di espressione di FOXP3, IL-10 e riduzione di IL-5 e TRAF-6 (11).

Molte osservazioni sperimentali e cliniche suggeriscono che **le cellule Treg** abbiano un ruolo importante nel controllo dell'allergia. La AIT può dirigere la risposta immunitaria verso l'induzione di cellule Treg con conseguente aumento della produzione delle citochine inibitorie IL-10 e TGF- β , prodotte da queste cellule, e la soppressione delle IgE (12). Nel corso della AIT, il numero di cellule della memoria di tipo Th2 si riduce in concomitanza con l'aumento delle cellule Treg e di quelle Th1 (13). Le cellule Treg possono essere indotte dall'esposizione naturale ad alte dosi di allergene, come si verifica per gli apicoltori che possono essere punti più volte, che inducono tolleranza mediata da IL-10 e da aumentati livelli di IgG4 antigene-specifici (14). Inoltre, è stato dimostrato che cellule Treg FOXP3+IL-10+ aumentano nella mucosa nasale di pazienti sottoposti a AIT (15). IL-10 ha un ruolo importante nel controllo dell'allergia mediante soppressione dell'infiammazione allergica e induzione di cellule Treg. Il bilanciamento tra sottopopolazioni di cellule T allergene-specifiche potrebbe essere influenzata dalla AIT, come suggerito dal fatto che in pazienti atopici la frequenza delle cellule Treg nel sangue periferico è scarsa, ma aumenta in pazienti trattati con AIT. Quindi, le Treg sembrano avere un ruolo fondamentale nell'induzione di tolleranza nella AIT sopprimendo la risposta allergica Th2 e inducendo lo stato di tolleranza Th1.

Recentemente, è stata possibile una caratterizzazione immunofenotipica più fine di queste cellule grazie all'identifi-

cazione di nuovi marcatori sulla loro superficie. In particolare, la ridotta o nulla espressione sulla superficie del CD127 correla direttamente con alti livelli di espressione del marcatore intracellulare e fattore di trascrizione specifico delle Treg, FOXP3. Questa scoperta ha permesso di superare l'ostacolo tecnico della marcatura intracitoplasmatica, che può determinare un aumento del segnale fluorescente aspecifico, e ha semplificato il protocollo di marcatura. Ciò è particolarmente utile quando sia necessario criocorserare il materiale da utilizzare per l'analisi per necessità tecniche e per permettere l'analisi simultanea (e quindi meno influenzata da variazioni inter-assay) di campioni di monociti da sangue periferico (PBMC) che sono stati prelevati in tempi diversi, come nel caso di campioni pre- post-terapia.

In base ai risultati delle prime analisi in citofluorimetria multiparametrica di alcuni campioni di PBMC di pazienti pediatrici pre- e post-AIT risulta che la frequenza delle cellule T reg (CD4+CD25+CD127-CD39+) effettrici (/CD45RA-HLA-DR-) ed effettrici terminali (/CD45RA-HLA-DR+) aumenta nel corso della terapia e parallelamente diminuiscono le Treg naive (/CD45RA+HLA-DR-). È interessante notare che piuttosto che un aumento della percentuale delle T reg totali si verifica una redistribuzione delle varie sottopopolazioni. I dati sono ovviamente preliminari ma questa tendenza è chiara. Inoltre, di uno di questi pazienti la percentuale delle Treg aumenta in modo dipendente dal tempo. Il CD39 è un ectoenzima espresso sulla superficie delle



che catalizza la formazione di adenosina che svolge un ruolo nella funzione inibitoria delle Treg (16). Le due sottopopolazioni HLA-DR- e HLA-DR+ T regs sono funzionalmente distinte e caratterizzate da cinetiche di soppressione diverse e meccanismi di azione diversi, mediato da IL-10 e TGF- β le prime e mediato da contatto cellula T-cellula T le seconde, in grado di indurre tolleranza dominante che persiste anche in presenza di macrofagi e altre APC professionali (17). Quindi il monitoraggio simultaneo di questi 6 marcatori permette, ad oggi, una caratterizzazione funzionale precisa delle cellule T reg circolanti. Sarà possibile anche un'analisi volta a individuare eventuali cellule T reg indotte. E' da notare che in questa analisi sono state utilizzate cellule crioconservate e ciò potrebbe aver alterato la immunoreattività di alcuni antigeni di superficie e necessitano quindi di ulteriori conferme su campioni freschi (Figura 3).

Gli anticorpi funzionali IgG4

sono tra i potenziali biomarcatori della AIT più interessanti. L'immunoterapia specifica è un trattamento efficace per le malattie allergiche IgE mediate che implica eventi che coinvolgono cellule T e B. I recettori per le IgE sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (APC) facilitano la presentazione degli allergeni in presenza di anticorpi IgE specifici e risultano nell'attivazione delle cellule T. L'interferenza con questo meccanismo dipendente dalle sIgE da parte di anticorpi IgG immunoreattivi e funzionali bloccanti può regolare ne-

gativamente le risposte delle cellule T e manifestarsi come una riduzione delle risposte allergiche in vivo. Alcuni studi clinici dimostrano che la risposta immunologica che segue alla somministrazione di allergene sia mediante SCIT

che SLIT è caratterizzata all'induzione di tali anticorpi serici IgG allergene-specifici immunoreattivi e funzionali, che rappresentano quindi degli utili biomarcatori di efficacia. In pazienti che hanno ricevuto un trattamento AIT

Figura 3 Rappresentazione schematica delle sottopopolazioni di cellule T regolatorie e dei marcatori noti

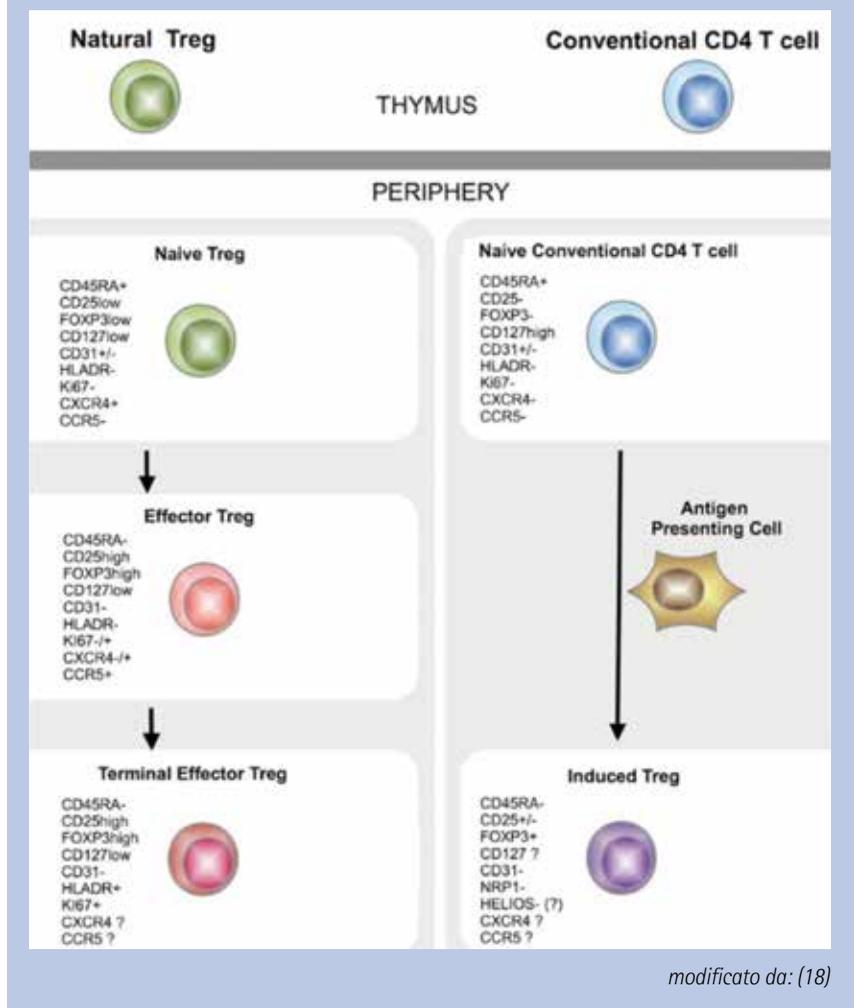
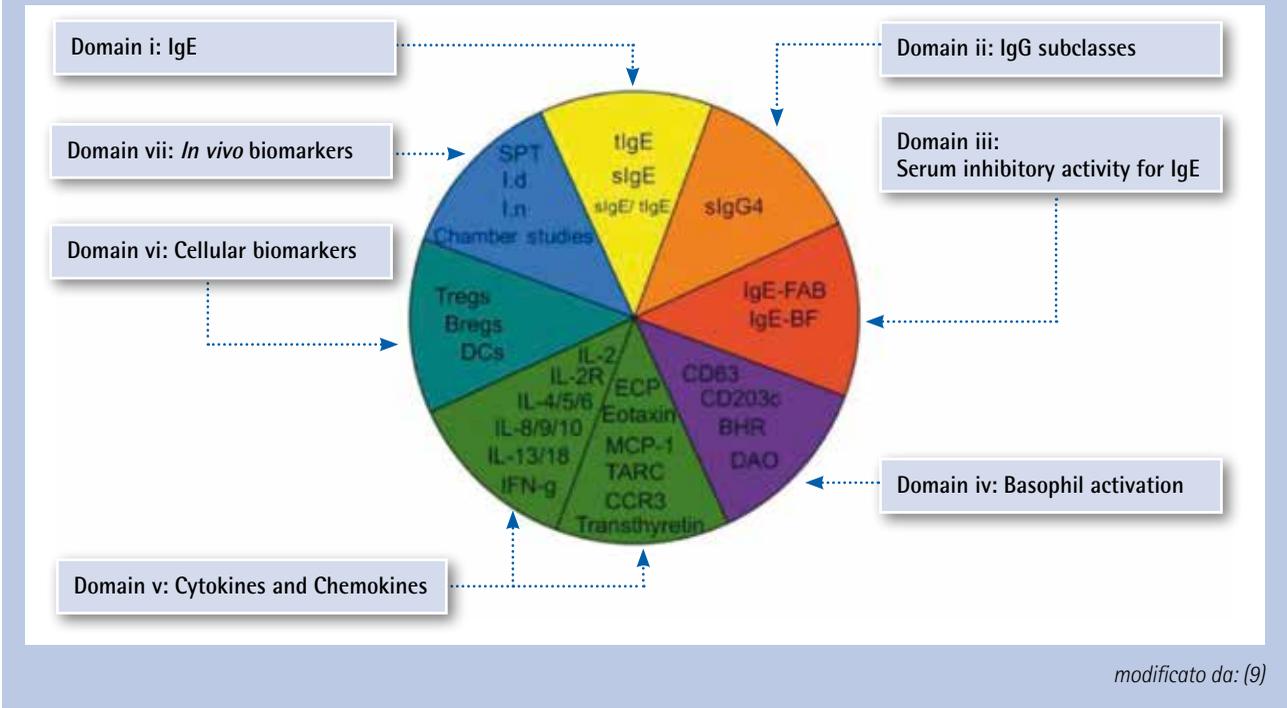




Figura 4

Categorie di biomarcatori per il monitoraggio della AIT



si può riscontrare un aumento di 10-100 volte della concentrazione di anticorpi allergene-specifici IgG1 e IgG4. Una correlazione tra le IgG4 allergene-specifiche seriche (sIgG4) e parametri di outcome clinici favorevoli è stata descritta in alcuni studi. In un trial clinico di SCIT dose-risposta randomizzato, in doppio cieco, con un gruppo di controllo placebo, i livelli di sIgG4 sono aumentati in modo tempo e dose dipendente; fatto ancor più significativo è che il legame del complesso allergene-IgE alle cellule B risultava diminuito dal siero con alto titolo sIgG4 in modo dipendente dal tempo e dalla dose e

che l'attività inibitoria del siero correlava positivamente con la riduzione dei sintomi e del numero di medicazioni salvavita (19). Anche in uno studio sull'effetto della SLIT sulla immunità a livello locale (mucosa sublinguale) era stato osservato un aumento tempo-dipendente dell'attività inibitoria del siero per le IgE-(IgE-FAB) nei pazienti atopici trattati in associazione con l'aumento di cellule Treg e sIgA e sIgG4 (20). Inoltre, in uno studio randomizzato di 2 anni con un gruppo trattato con placebo e l'altro con AIT (SCIT) per graminacee, quest'ultimo ulteriormente randomizzato in placebo o SCIT per

ulteriori 2 anni, i livelli di IgG1 e IgG4 erano aumentati a 2 e 4 anni nel gruppo trattato attivamente. Invece, nel gruppo che era stato trattato attivamente per 2 anni e poi aveva ricevuto altri 2 anni di placebo, si era verificato un declino del livello del titolo IgG4 di circa l'80% a 4 anni (21). E' interessante il fatto che l'attività inibitoria del siero nei confronti del legame con allergene facilitato dalle IgE (IgE-FAB) era perdurata per due anni dopo la cessazione del trattamento. Il siero dei pazienti che avevano sospeso anticipatamente la AIT avevano mostrato riduzione di tale attività IgE-FAB. Questi risultati indicano che le ri-



sposte anticorpali funzionali e protettive sono critiche per la tolleranza a lungo termine. Il vigore delle risposte proliferative di cloni di cellule T è indicativo del legame di complessi IgE-allergene alle cellule B e test basati sulla proliferazione in vitro di cloni T antigeni-specifici sono stati da tempo utilizzati per individuare la presenza nel siero delle sIgG funzionali. Recentemente, è stato sviluppato un test di più semplice realizzazione che possa misurare il legame dei complessi IgE-allergene alle cellule B. I complessi allergene-IgE possono essere individuate mediante analisi citofluorimetrica e questa tecnica semplificata è chiamata **test del legame con allergene facilitato da IgE (IgE-FAB)** (22). Esso si basa sull'analisi citofluorimetrica di cellule B (per es. linea cellulare trasformata da EBV) esprimenti elevati e stabili livelli di CD23 (cioè il recettore a bassa affinità per le IgE, Fc RII), come valutato dalla percentuale di cellule positive al legame con anti-CD23-PE. Il test poi prevede l'uso di un siero atopico indicatore ad elevata concentrazione IgE specifiche per l'allergene di interesse (RAST > 100 IU/ml), da utilizzare per assegnare il valore di positività pari al 100%. Una variante del test che potrebbe risultare interessante perché presuppone una identica sovrapposizione di sequenze riconosciute da parte degli anticorpi di classi diverse è quella di utilizzare per ciascun paziente il siero pre-trattamento per definire il livello basale di legame al CD23, al posto del siero indicatore, e quello post-trattamento per valutare la capacità di inibizione. Un limite del test

è rappresentato dal fatto che in alcuni pazienti la complessità del repertorio anticorpale IgE potrebbe influenzare la formazione del complesso allergene-IgE piuttosto che essere una diretta funzione del titolo in sé. Nonostante la affidabilità e riproducibilità di questo metodo, esso richiede cellule B vitali e con una stabile espressione del recettore CD23 sulla superficie, che potrebbe risultare compromessa da una coltura a lungo termine. Un'alternativa al IgE-FAB FACS è rappresentata dal test cellulare IgE-FAB ELISA (ELIFAB), in cui i complessi IgE-allergene, ma non le IgE libere, sono catturate da monomeri di CD23 immobilizzati su una superficie solida (23).

La tolleranza a lungo termine che consegue alla AIT implica lo spostamento da un risposta predominante di tipo Th2 verso una risposta Th1 che dovrebbe riflettersi nella diminuzione delle citochine Th2 (IL-4, IL-13, IL-9) delle citochine e chemochine infiammatorie, come IL-17, eotassina, TNF- α , e nell'aumento di quelle Th1 (IFN- γ , IL-12) e regolatorie (IL-10 e TGF- β). Campbell e colleghi hanno descritto una popolazione di cellule T allergene-specifiche esprimenti CD154, un marcatore di attivazione recente, e IFN- γ intracellulare, come biomarcatori cellulari per monitorare l'andamento della immunoterapia della rinite allergica in soggetti con rinite allergica sottoposti ad esposizione ambientale controllata al polline di graminacee (24). Però, solo alcuni studi hanno descritto queste modifiche e inoltre non è stato dimostrato un nesso tra citochine del siero e risposta

clinica alla AIT.

Molti altri vari fattori solubili del siero sono stati studiati come potenziali biomarcatori di outcome, ma nessuno di essi si è dimostrato correlabile alla risposta clinica. I livelli di citochine locali, piuttosto che quelli serici, potrebbero essere più indicativi degli effetti immunologici e clinici; ciò è stato osservato per esempio in uno dei pochi studi eseguiti su citochine locali che ha dimostrato diminuzione delle citochine Th2 e eotassina del fluido nasale dopo test di provocazione nasale con allergene dopo trattamento AIT efficace (25). Al momento però, soprattutto per la disomogeneità dei dati risultanti dai diversi studi, questi importanti fattori umorali non possono essere considerati dei validi biomarcatori.

Le varie tipologie di componenti immunologiche cellulari e molecolari cui si basano i gli studi e i test analitici che hanno finora permesso di individuarli come potenziali biomarcatori della AIT sono stati recentemente ampiamente revisionati in modo sistematico e critico e sono graficamente riassunti nella figura seguente (26) (Figura 4).

CONCLUSIONI

Finora, non è stato individuato alcun biomarcatore predittivo della risposta clinica all'AIT e molte delle metodologie di analisi sono di complessa realizzazione. Quelle più promettenti appaiono al momento le metodiche citofluorimetriche (DC, Treg, basofili e IgE-FAB) e l'analisi del profilo di espressione dei microRNA.



Bibliografia

1. Ciprandi G-Serum IgE as biomarker for predicting allergen immunotherapy effectiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139:2029.
2. Doherty TA, Scott D, Walford HH et al.-Allergen challenge in allergic rhinitis rapidly induces increased peripheral blood type 2 innate lymphoid cells that express CD84. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:1203-1205.
3. Lombardi V, Beurard C, Neukirch C et al.-Circulating innate lymphoid cells are differentially regulated in allergic and nonallergic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:305-8.
4. Zimmer A, Bouley J, Le Mignon M et al.-A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:1020-30.
5. Gueguen C, Bouley J, Moussu H et al.-Changes in markers associated with dendritic cells driving the differentiation of either TH2 cells or regulatory T cells correlate with clinical benefit during allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:545-58.
6. van de Veen W, Stanic B, Yaman G et al.-IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:1204-12.
7. Shamji MH, Layhadi JA, Scadding GW et al.-Basophil expression of diamine oxidase: A novel biomarker of allergen immunotherapy response. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:913-921.
8. Leysen J, Sabato V, Verweij MM, et al.-The basophil activation test in the diagnosis of immediate drug hypersensitivity. *Expert Rev Clin Immunol* 2011;7:349-55.
9. Lu TX, Rothenberg ME-Diagnostic, functional, and therapeutic roles of microRNA in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:3-13.
10. Specjalski K, Maciejewska A, Pawłowski R et al.-Changes in the Expression of MicroRNA in the Buildup Phase of Wasp Venom Immunotherapy: A Pilot Study. *Int Arch Allergy Immunol* 2016;170:97.
11. Luo X, Hong H, Tang J et al.-Increased Expression of miR-146a in Children With Allergic Rhinitis After Allergen-Specific Immunotherapy. *Allergy Asthma Immunol Res* 2016;8:132.
12. Akdis CA, Akdis M-Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:18-27.
13. Suárez-Fueyo A, Ramos T et al.-Grass tablet sublingual immunotherapy downregulates the TH2 cytokine response followed by regulatory T-cell generation. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:130-138.
14. Varga E-M, Kausar F, Aberer W et al.-Tolerant beekeepers display venom-specific functional IgG4 antibodies in the absence of specific IgE. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:1419-21.
15. Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR et al.-Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+CD25+ cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1467-1472.
16. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W et al.-Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007;204:1257-65.
17. Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA-MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol* 2006;176:4622-31.
18. Simonetta F, Bourgeois C-CD4+FOXP3+ Regulatory T-Cell Subsets in Human Immunodeficiency Virus Infection. *Front Immunol* 2013;4:215.
19. Shamji MH, Ljørring C, Francis JN et al.-Functional rather than immunoreactive levels of IgG4 correlate closely with clinical response to grass pollen immunotherapy. *Allergy* 2012;67:217-26.
20. Scadding GW, Shamji MH, Jacobson MR et al.-Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells. *Clin Exp Allergy* 2010;40:598-606.
21. James LK, Shamji MH, Walker SM et al.-Long-term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:509-516-5.
22. Shamji MH, Wilcock LK, Wachholz PA et al.-The IgE-facilitated allergen binding (FAB) assay: validation of a novel flow-cytometric based method for the detection of inhibitory antibody responses. *J Immunol Methods* 2006;317:71-9.
23. Shamji MH, Francis JN, Würtzen PA et al.-Cell-free detection of allergen-IgE cross-linking with immobilized phase CD23: Inhibition by blocking antibody responses after immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:1003-1005.
24. Campbell JD, Buchmann P, Kesting S et al.-Allergen-specific T cell responses to immunotherapy monitored by CD154 and intracellular cytokine expression. *Clin Exp Allergy* 2010;40:1025-35.
25. Kouser L, Kappen J, Walton RP et al.-Update on Biomarkers to Monitor Clinical Efficacy Response During and Post Treatment in Allergen Immunotherapy. *Curr Treat Options Allergy* 2017;4:43-53.
26. Shamji MH, Kappen JH, Akdis M et al.-Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI Position Paper. *Allergy* 2017;72:1156-73.