

Risposta delle cellule T regolatorie a basse o alte dosi di immunoterapia specifica sublinguale con o senza supplementazione di vitamina D nei bambini sensibilizzati all'acaro della polvere

Marianna I. Petrosino¹, Cosimo Giannini¹, Paola Di Filippo¹, Alessandra Scaparrotta², Marina Atanasi¹, Angelika Mohn¹, Francesco Chiarelli¹, Sabrina Di Pillo¹

¹Servizio Regionale di Allergologia e Fisiopatologia Respiratoria Infantile, Clinica Pediatrica, Università di Chieti, Chieti, Italia

²UOSD Pediatria, Vasto, Italia

Corrispondenza: Marianna I. Petrosino **e-mail:** marianna.petrosino@yahoo.it

INTRODUZIONE

Gli acari della polvere (*house dust mites*, HDM) giocano un ruolo causale ben consolidato nei pazienti con patologie respiratorie allergiche persistenti, come l'asma e la rinite allergica, il cui trattamento richiede un ampio *range* di terapie sintomatiche o l'immunoterapia allergene specifica (*allergen immunotherapy*, AIT). L'efficacia dell'AIT è stata a lungo riconosciuta dalle linee guida nazionali e internazionali (1). L'AIT è una forma unica di terapia in grado di modificare il decorso naturale delle patologie allergiche, contrastando i meccanismi patogenici sottostanti e determinando soppressione immunitaria, deviazione immunitaria e tolleranza (2, 3). Tuttavia, i meccanismi immunologici alla base dell'immunoterapia sono ancora da chiarire; in particolare, il ruolo centrale svolto dalle cellule T regolatorie (Treg) non è completamente definito (4). Recentemente sono state individuate 3 sottoclassi di Treg (*resting*, *activating* e *secreting*) (5), che sono ad oggi ancora oggetto di studio. Probabilmente la suddivisione in queste 3 sottoclassi potrà aiutare a chiarire ulteriormente la funzione delle cellule Treg. Nel corso degli anni, diversi sforzi scientifici hanno cercato di individuare gli adiuvanti in grado di aumentare l'efficacia e la sicurezza dell'AIT. In tale contesto recentemente la vitamina D (Vit D) è stata descritta come un potente induttore delle cellule Treg e un buon adiuvante nell'ambito dell'AIT (6). Inoltre, sebbene l'immunoterapia specifica sublinguale (SLIT) sia ormai utilizzata già da molti anni, il suo dosaggio ottimale è ancora oggetto di dibattito (7). Lo scopo del presente studio era di valutare la sicurezza e l'efficacia di diverse dosi di SLIT (2000 AU *versus* 4000 AU) in bambini con asma e rinite sensibilizzati agli acari (*endpoint* primario) e valutare se l'aggiunta di Vit D a queste due diverse dosi di SLIT poteva aumentare l'efficacia clinica della terapia e influenzare in particolare le risposte delle cellule Treg nei bambini sensibilizzati agli acari (*endpoint* secondario).

MATERIALI E METODI

Nel nostro studio sono stati reclutati, presso il Servizio Regionale di Allergologia e Fisiopatologia Respiratoria Pediatrica di Chieti, 70 bambini [54 maschi; età media \pm deviazione standard (SD), 10.6 ± 3.3 anni] che presentavano diagnosi di asma, rinite e allergia agli acari documentata dalla positività di skin prick test e IgE specifiche per *Dermatophagoides farinae* (Df) e *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp). Sono stati esclusi i bambini che presentavano ridotta funzionalità polmonare ($FEV_1 < 70\%$ del predetto), avevano effettuato un'AIT per via sottocutanea contro gli acari, presentavano patologie sistemiche o assumevano farmaci sistemici in grado di interferire con l'azione della SLIT. Dopo 4 giorni di fase di induzione, i pazienti reclutati sono stati randomizzati in 2 gruppi a seconda della dose di mantenimento di SLIT in compresse che ricevevano: gruppo a basso dosaggio (*low* SLIT), che includeva 35 bambini che assumevano 2000 AU di SLIT a settimana, e gruppo ad alto dosaggio (*high* SLIT), che

includeva 35 bambini che assumevano 4000 AU di SLIT a settimana. Per valutare inoltre gli effetti della supplementazione con Vit D in questi due gruppi, i pazienti di ogni braccio sono stati ulteriormente suddivisi in 2 sottogruppi:

- gruppo a basso dosaggio di SLIT più supplementazione con Vit D (*low SLIT + Vit D*), che includeva 18 bambini che assumevano 2000 AU di SLIT a settimana più una supplementazione con 400 U di Vit D;
- gruppo a basso dosaggio di SLIT senza supplementazione di Vit D (*low SLIT no Vit D*), che includeva 17 bambini che assumevano esclusivamente 2000 AU di SLIT a settimana;
- gruppo ad alto dosaggio di SLIT più supplementazione con Vit D (*high SLIT + Vit D*), che includeva 19 bambini che assumevano 4000 AU di SLIT a settimana più una supplementazione con 400 U di Vit D;
- gruppo ad alto dosaggio di SLIT senza supplementazione di Vit D (*high SLIT no Vit D*), che includeva 16 bambini che assumevano esclusivamente 4000 AU di SLIT a settimana.

Tutti i pazienti sono stati studiati al *baseline*, a 6 ed a 12 mesi mediante la valutazione di *score* clinici, VAS (*Visual Analogic Scale*) per valutare la gravità della rinite, classificazione ARIA (*Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma*) per valutare il tipo di rinite (intermittente o persistente e lieve o moderata/grave), ACT (*asthma control test*) per valutare il controllo dell'asma, utilizzo di farmaci sintomatici (antistaminici, corticosteroidi nasali e inalatori e antagonisti del recettore dei leucotrieni), studio della funzionalità respiratoria (FEV₁ basale e dopo test di broncodilatazione) e registrazione degli eventi avversi per valutare la sicurezza. I pazienti sono stati valutati al *baseline* e dopo 12 mesi di SLIT anche mediante l'esecuzione di esami di laboratorio (IgE totali, IgE specifiche per *Df* e *Dp* e Vit D). Inoltre, nel gruppo high SLIT con o senza supplementazione con Vit D è stata anche effettuata la valutazione delle cellule Treg e delle sottopopolazioni (*resting*, *activating* e *secreting*) al *baseline* e dopo 12 mesi di SLIT.

RISULTATI

Le caratteristiche al *baseline* della popolazione reclutata e suddivisa in base all'alto e basso dosaggio erano comparabili per quanto riguarda dati antropometrici, anamnestici, clinici, laboratoristici, di funzionalità respiratoria e di utilizzo di farmaci sintomatici. In nessuno dei pazienti di entrambi i gruppi (*low* e *high* SLIT) si sono verificati eventi avversi tali da indurre la sospensione della SLIT. I livelli sierici di IgE totali e specifiche per *Df* e *Dp* non mostravano differenze statisticamente significative in nessuno dei 2 gruppi di studio (Tabella 1). Sono stati documentati dei lievi incrementi del FEV₁ sia basale sia dopo test di broncodilatazione nel corso del trattamento, ma solo il FEV₁ basale raggiungeva la significatività statistica ed esclusivamente nel gruppo *high* SLIT dopo 6 mesi di trattamento ($p = 0.02$). Inoltre abbiamo documentato una riduzione statisticamente significativa nell'utilizzo dei farmaci esclusivamente nel gruppo *high* SLIT dopo 6 e/o 12 mesi di trattamento ($p < 0.05$). Per quanto concerne gli *score* clinici, abbiamo riscontrato un miglioramento statisticamente significativo di tutti e 3 i punteggi valutati (VAS, ARIA ed ACT) dopo 6 e 12 mesi di trattamento, sia nel gruppo *high* SLIT, sia nel gruppo *low* SLIT ($p < 0.01$), ma tali variazioni sono risultate più ampie nel gruppo *high* SLIT, dimostrando quindi una maggiore efficacia dell'alto dosaggio rispetto al basso dosaggio. Per valutare gli effetti della supplementazione con Vit D nei 2 gruppi, i pazienti di ogni braccio sono stati ulteriormente suddivisi in 2 sottogruppi (Tabella 2). Com'era prevedibile, abbiamo riscontrato un aumento statisticamente significativo dei livelli di Vit D esclusivamente nei gruppi nei quali era stata effettuata la sua supplementazione. Inoltre abbiamo documentato una riduzione significativa delle IgE totali nel gruppo *high* SLIT + Vit D dopo 12 mesi di trattamento ($p = 0.02$), ma non negli altri 3 gruppi. Nessuna differenza significativa è stata documentata per i livelli sierici di IgE specifiche per *Df* e *Dp*. Lo studio della funzionalità respiratoria non presentava variazioni significative in alcuno dei gruppi in studio ($p > 0.05$). Abbiamo riscontrato un miglioramento degli *score* clinici (VAS, ARIA ed ACT) in tutti e 4 i sottogruppi analizzati dopo 6 e 12 mesi di trattamento ($p < 0.01$). Tuttavia, tali variazioni erano

differenti tra i 4 gruppi. Infatti, dopo 6 mesi, i *delta changes* risultavano essere significativamente maggiori nel gruppo *high* SLIT + Vit D e si riducevano progressivamente nei restanti 3 gruppi, raggiungendo effetti minimi nel gruppo *low* SLIT no Vit D (Figura 1). Tali effetti persistevano e si accentuavano dopo 12 mesi di trattamento (Figura 1). Analoghi risultati sono stati riscontrati anche nell'utilizzo degli antistaminici. Le riduzioni maggiori, infatti, erano riscontrate nel gruppo *high* SLIT + Vit D, mentre vi erano effetti minimi nel gruppo *low* SLIT no Vit D. Analoghi andamenti sono stati osservati anche nell'utilizzo dei corticosteroidi nasali e inalatori, mentre in tutti i sottogruppi nessuna significatività statistica era raggiunta nella riduzione dell'utilizzo degli antileucotrienici. Il dato nuovo di questo studio è stato la caratterizzazione delle cellule Treg e dei loro sottotipi (*activated*, *resting* e *secreting*) nei gruppi *high* SLIT + Vit D e *high* SLIT no Vit D (Figura 2 A e B). Non abbiamo documentato variazioni statisticamente significative né delle cellule Treg totali, né della sottopopolazione *activated* Treg dopo 12 mesi di SLIT in alcuno dei 2 gruppi, mentre abbiamo dimostrato una riduzione delle *resting* Treg in entrambe le popolazioni (*high* SLIT + Vit D, $p < 0.001$; *high* SLIT no Vit D, $p = 0.001$) (Figura 2 A). Come dato ancora più interessante, abbiamo riscontrato un aumento della sottopopolazione di cellule Treg *secreting* esclusivamente nel gruppo *high* SLIT + Vit D dopo 12 mesi di trattamento ($p = 0.001$) (Figura 2 A). Tali risultati erano ancora più evidenti andando a valutare i *delta changes* tra le 2 popolazioni. In particolare, non vi erano differenze significative nei *delta changes* delle cellule Treg totali e della sottopopolazione *activated* tra i 2 gruppi, mentre i *delta changes* risultavano essere maggiori nelle restanti sottopopolazioni nel gruppo *high* SLIT + Vit D (Treg *resting*, $p = 0.01$; Treg *secreting*, $p = 0.006$) (Figura 2 B). Questi risultati nel complesso dimostrano che la supplementazione con Vit D nel gruppo ad alto dosaggio di SLIT induce l'attivazione della sottopopolazione di cellule Treg secernenti, che potrebbe svolgere un ruolo fondamentale nell'attivazione delle risposte immunologiche che sono alla base dell'immunoterapia.

Tab. 1: Andamento longitudinale dei dati clinici e laboratoristici nei 2 gruppi studiati.

	Low SLIT				High SLIT			
	Baseline	6 mesi	12 mesi	P	Baseline	6 mesi	12 mesi	P
Eventi avversi		1 (2.85)	0			2 (6.4)	0	
Esami laboratoristici								
IgE totali (KU/L)	605.6±416.7		891.1±1487.6		618.5±650.3		423.9±358.0	
IgE per Df (kUA/L)	49.3±36.3		38.8±13.5		47.6±31.3		45.9±33.5	
IgE per Dp (kUA/L)	64.2±35.9		65.7±34.5		53.3±31.3		56.2±34.2	
Funzionalità respiratoria								
FEV1 (%pred)	103.4±12.5	107.3±17.8	109.0±12.1		102.7±14.3	108.2±14.8	104.5±12.8	*
FEV1 (%pred post bd)	107.8±11.2	107.5±20.6	110.8±12.0		109.1±14.1	110.8±13.7	109.2±12.7	
Farmaci sintomatici								
Antistaminici (n. %)	35 (50)	19 (55.8)	24 (68.5)		35 (50)	6 (17.6)	3 (11.1)	* #
Corticosteroidi nasali (n. %)	13 (18.5)	16 (47)	11 (31.4)		12 (17.1)	1 (3)	1 (3)	* #
Corticosteroidi inalatori (n. %)	25 (35.7)	15 (44.1)	18 (51.4)		22 (31.4)	8 (30.7)	2 (7.1)	#
Antileucotrieni (n. %)	11 (15.7)	7 (21.2)	3 (9)		7 (10)	1 (3)	0 (0)	*

* baseline vs 6 mesi, $p < 0.05$.

baseline vs 12 mesi, $p < 0.05$.

Tab. 2: Andamento longitudinale dei dati clinici e laboratoristici nei 4 sottogruppi studiati.

	Low SLIT + Vit D				Low SLIT no Vit D			
	Baseline	6 mesi	12 mesi	P	Baseline	6 mesi	12 mesi	P
Esami laboratoristici								
Vitamina D (ng/ml)	20.1±2.2		35±2.2	#	22.4±4.8		23.4±2.8	
IgE totali (KU/L)	707.7±435.9		850.2±135.5		527.1±400.6		261.8±243.4	
IgE per Df (kU/L)	65.7±37.7		88.0±17.3		62.4±34.9		37.9±30.2	
IgE per Dp (kU/L)	68.0±35.9		42.2±23.9		30.6±36.9		36.5±7.8	
Funzionalità respiratoria								
FEV1 (%pred)	103.9±11.9	102.2±13.1	110.1±13.0		102.9±13.7	110.3±21.0	107.9±11.8	
FEV1 (%pred post bd)	110.9±9.8	101.2±10.8	113.2±13.5		100.8±11.5	115.2±27.1	108.3±9.9	
Score clinici								
ARIA	3.6±0.6	1.6±0.9	1.1±0.7	* #	3.5±0.7	2.5±0.8	2.1±1.1	* #
ACT	18.5±2.0	21.7±2.9	23.0±3.1	* #	20.8±2.6	21.5±5.3	21.8±5.1	* #
VAS	7.3±1.6	4.7±1.8	3.5±2.0	* #	7.3±1.7	5.2±1.8	4.8±1.9	* #
	High SLIT + Vit D				High SLIT no Vit D			
	Baseline	6 mesi	12 mesi	P	Baseline	6 mesi	12 mesi	P
Esami laboratoristici								
Vitamina D (ng/ml)	20.1±4.2		36.1±2.8	#	23.8±5.7		25.2±2.4	
IgE totali (KU/L)	692.3±723.2		444.9±366.8	#	492.0±529.4	110.0±17.2	385.0±366.2	
IgE per Df (kUA/L)	60.0±32.1		56.9±36.4		44.7±29.0		55.3±32.6	
IgE per Dp (kUA/L)	61.1±32.9		40.9±36.0		35.4±25.4		52.4±31.6	
Funzionalità respiratoria								
FEV1 (%pred)	101.6±11.6	106.7±12.2	104.6±12.4		104.0±17.2	110.1±17.8	104.3±13.9	
FEV1 (%pred. post bd)	108.1±10.7	111.3±10.7	109.9±12.4		110.4±17.5	113.4±15.5	108.3±13.6	
Score clinici								
ARIA	3.5±0.6	1.4±0.9	0.9±0.4	* #	3.5±0.6	1.4±0.7	1.5±1.0	* #
ACT	20.7±3.8	24.1±1.6	25.1±0.7	* #	21.1±4.6	24.8±2.0	25.2±1.1	* #
VAS	8.2±1.1	3.7±2.7	1.7±1.2	* #	7.5±1.7	4.1±2.4	3.2±2.2	* #

* baseline vs 6 mesi, $p < 0.05$.

baseline vs 12 mesi, $p < 0.05$.

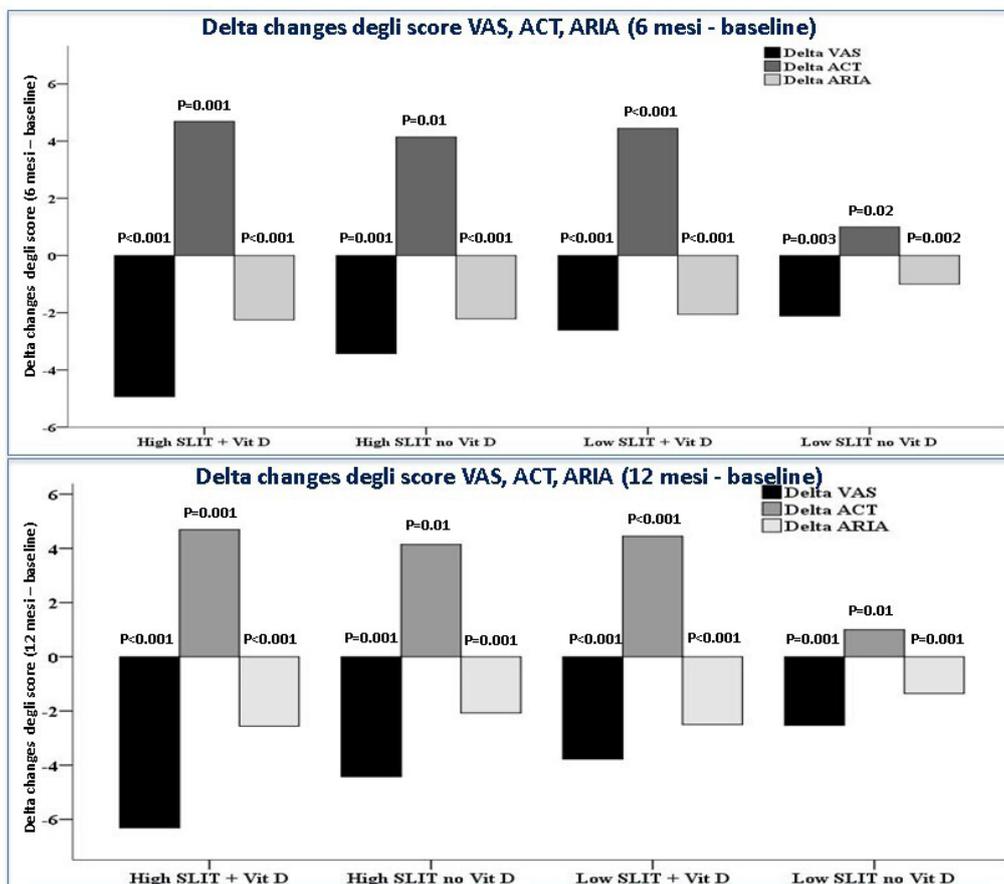


Fig. 1: Delta changes degli score VAS, ACT, ARIA.

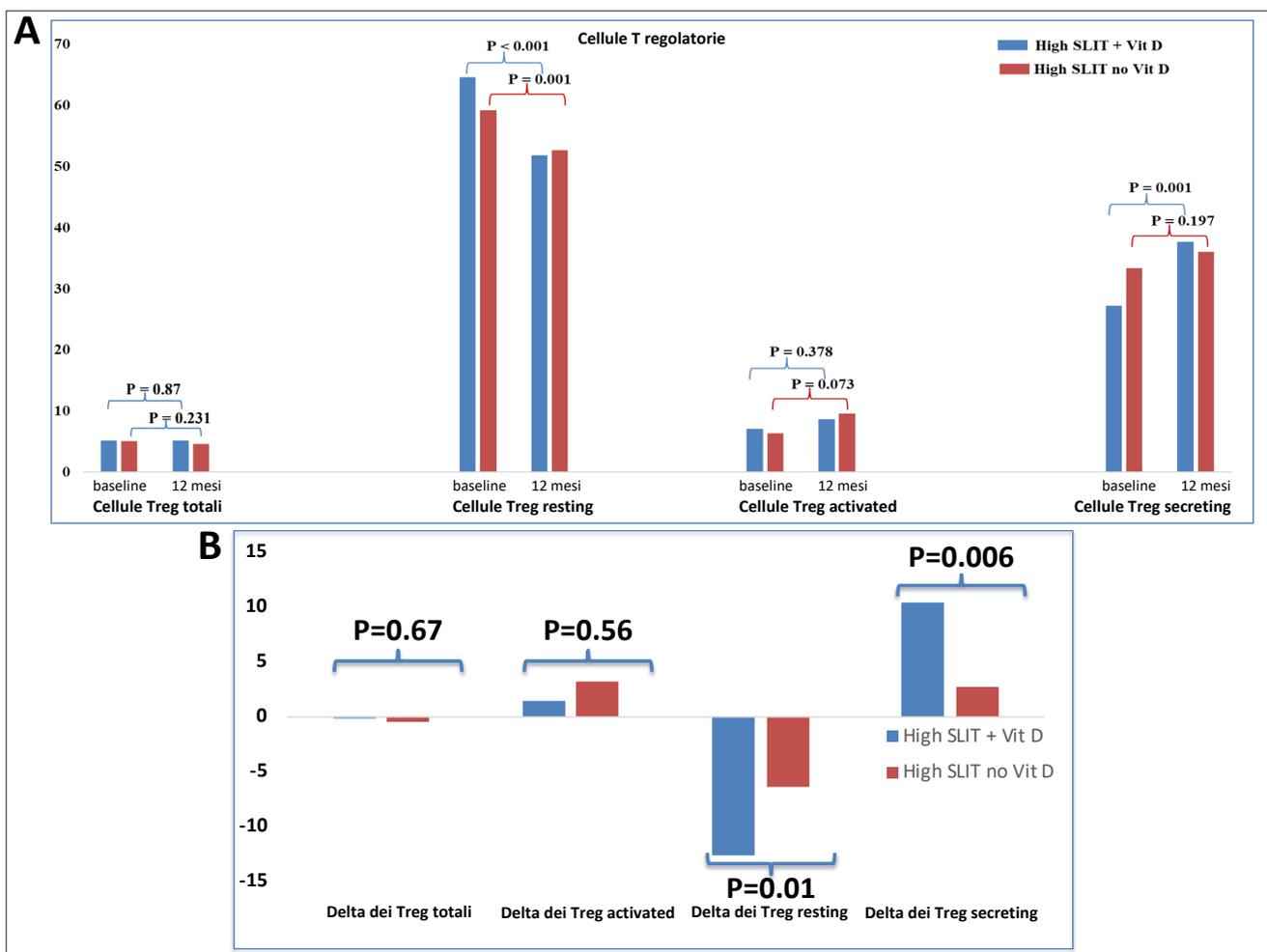


Fig. 2: A: Cellule T regolatorie e sottopopolazioni, confronto tra high SLIT + Vit D e high SLIT no Vit D; B: Delta changes delle cellule T regolatorie e sottopopolazioni.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel nostro studio vi sono diversi punti di forza e limiti. I punti di forza sono rappresentati dal fatto che è stata reclutata una popolazione numerosa e altamente selezionata, che includeva solo bambini. La valutazione dell'eventuale effetto additivo indipendente della supplementazione di Vit D è stata inclusa nel disegno dello studio. Infine, questo è il primo studio che valuta le risposte delle sottopopolazioni di cellule Treg alla SLIT nei bambini sensibilizzati agli acari. I limiti dello studio sono rappresentati dal piccolo campione di soggetti inclusi in ciascuno dei 4 sottogruppi e dal fatto che non sono stati valutati i livelli di citochine nella popolazione studiata, né sono state monitorate le cellule Treg nel gruppo a basso dosaggio di SLIT. Concludendo, questo studio ha documentato che la SLIT ad alto dosaggio (4000 AU) presenta un profilo di sicurezza comparabile al basso dosaggio (2000 AU). La SLIT ad alto dosaggio, inoltre, è più efficace nel migliorare gli *score* clinici (VAS, ARIA e ACT) e nel ridurre l'uso di farmaci rispetto al basso dosaggio. La supplementazione con Vit D ha un effetto aggiuntivo su questo regime di trattamento, migliorando gli *score* sia dell'asma, sia della rinite, e riducendo l'uso di farmaci; inoltre, migliora l'efficacia clinica della risposta delle cellule Treg alla SLIT attraverso la ridistribuzione delle sue sottopopolazioni e successivamente aumentando le cellule *secreting*, che potrebbero svolgere un ruolo chiave nell'attivazione delle risposte immunologiche che sostengono l'immunoterapia.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Calderon MA, Casale TB, Nelson HS, et al. *An evidence-based analysis of house dust mite allergen immunotherapy: A call for more rigorous clinical studies.* J Allergy Clin Immunol 2013; 132: 1322-1336.
- (2) Akdis CA, Akdis M. *Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens.* World Allergy Organ J 2015; 8: 17.
- (3) Głobińska A, Boonpiyathad T, Satitsuksanoa P, et al. *Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Diverse mechanisms of immune tolerance to allergens.* Ann Allergy Asthma Immunol 2018; 121: 306-312.
- (4) Bohle B, Kinaciyan T, Gerstmayr M, et al. *Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation.* J Allergy Clin Immunol 2007; 120: 707-713.
- (5) Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, et al. *Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor.* Immunity 2009; 30: 899-911.
- (6) Urry ZL, Richards DF, Black C, et al. *Depigmented-polymerised allergoids favour regulatory over effector T cells: enhancement by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃.* BMC Immunol 2014; 15: 21.
- (7) Leonardi S, Castro A, Lanzafame A, et al. *Safety and efficacy of sublingual specific immunotherapy to house dust mite using a different dosage: A pilot study.* J Biol Regul Homeost Agents 2015; 29: 103-107.