



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina - DIMED

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CLINICHE E SPERIMENTALI

CURRICULUM: SCIENZE EMATOLOGICHE E GERIATRICHE

CICLO XXX

I LINFOCITI TREG E TH17 NEI PAZIENTI CON ORTICARIA CRONICA SPONTANEA

Coordinatore: Ch.mo Prof. Paolo Angeli

Supervisore: Ch.mo Prof. Sandro Giannini

Dottorando : Dr. Riccardo Senter

Indice

Riassunto.....	3
Introduzione.....	4
• Orticaria ed angioedema.....	4
○ Inquadramento nosologico.....	4
○ Classificazione.....	5
• Orticaria cronica spontanea.....	7
○ Ipotesi autoimmunitaria.....	7
○ Ipotesi alternative.....	13
▪ Il sistema del complemento.....	13
▪ La cascata della coagulazione.....	14
▪ IgE autoreattive.....	14
○ Omalizumab.....	15
• Orticaria cronica spontanea e linfociti Treg/TH17.....	17
Scopo dello studio.....	22
Materiali e metodi.....	23
• Casistica.....	23
• Test cutaneo con siero autologo.....	23
• Preparazione delle sospensioni cellulari a partire dal sangue periferico.....	25
• Analisi citofluorimetrica.....	25
• Analisi statistica dei dati.....	27
Risultati.....	28
Discussione e conclusioni.....	35
Bibliografia.....	39

Riassunto

Introduzione: la reattività cutanea nei riguardi del siero autologo (SA) e la presenza di anticorpi anti-IgE ed anti-recettore per le IgE che caratterizzano alcuni pazienti con orticaria cronica spontanea (CSU) hanno suggerito una patogenesi autoimmunitaria della malattia, ma l'effettivo meccanismo causale resta oscuro. E' comunque noto che i mastociti rivestono un ruolo fondamentale nella patogenesi, e recenti lavori suggeriscono un loro probabile ruolo di polarizzazione dei linfociti T helper in senso TH1 e TH17.

Scopo dello studio: valutare l'andamento di Treg e TH17 nei pazienti con CSU rispetto a controlli sani nelle diverse fasi cliniche e in relazione alla reattività cutanea nei confronti del siero autologo.

Metodi: l'espressione degli antigeni di superficie e intracitoplasmatici di Treg e TH17 sulle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) dei pazienti con CSU e dei controlli è stata valutata mediante citometria a flusso. Per identificare i Treg sono stati utilizzati anticorpi monoclonali (AcM) rivolti verso CD4, CD25 e il fattore di trascrizione Forkhead box P3 (FOXP3), mentre per identificare i TH17 sono stati utilizzati AcM rivolti verso CD4, il recettore per l'Interleuchina 23 (IL23R) e l'Interleuchina 17 (IL17).

Risultati: non sono emerse differenze significative tra i due gruppi per quanto riguarda il numero di linfociti Treg circolanti, la loro espressione di FOXP3 e il rapporto Treg/TH17. Per quanto riguarda i TH17 non sono emerse differenze significative nei gruppi cellulari analizzati (IL23R+CD4+, IL23R+CD4+IL17+, IL17+CD4+), ma abbiamo osservato un rilevante aumento della percentuale di cellule IL17+CD4+ nei pazienti affetti da CSU rispetto ai controlli, con una significativa correlazione tra % di cellule IL17+CD4+ e grado di severità di malattia calcolata con l'*Urticaria Activity Score* (UAS).

Conclusioni: L'aumento di cellule IL17+CD4+ correla con il grado di attività di malattia e suggerisce un coinvolgimento dei TH17 nella patogenesi della CSU.

Introduzione

1. Orticaria ed angioedema

1.1 Inquadramento nosologico

L'orticaria è una delle patologie cutanee più frequenti, interessando con almeno un episodio nell'arco della vita circa il 25% della popolazione generale.¹ Consiste nella comparsa di pomfi, ovvero lesioni eritematose rilevate di dimensioni variabili, intensamente pruriginose, che regrediscono senza lasciare reliquati nell'arco di 24 ore. La sintomatologia è determinata da vasodilatazione ed incremento della permeabilità vascolare a livello degli strati più superficiali del derma; il medesimo fenomeno a carico del derma profondo o del tessuto sottocutaneo determina invece una lesione distinta, denominata angioedema, che può interessare anche le mucose ed è costituita da rigonfiamenti molto più voluminosi e persistenti dei pomfi, che provocano una sensazione di tensione e di dolore anziché di prurito.² Le due condizioni possono presentarsi in maniera isolata o, più di frequente, associate fra loro in modo variabile nel medesimo paziente; sono generalmente indotte dal rilascio di istamina e di altri mediatori derivati prevalentemente dall'attivazione mastocitaria.²

Esistono anche forme di orticaria e angioedema che costituiscono entità nosologiche a sé stanti:³⁻⁵ tra esse le malattie auto-infiammatorie, la mastocitosi, l'orticaria vasculitica e gli angioedemi bradichininergici, ovvero mediati da un'iperattivazione del sistema da contatto. Tali patologie, assai più rare, sono legate storicamente all'orticaria "classica" per una certa somiglianza delle manifestazioni cliniche, ma presentano meccanismi patogenetici peculiari e ben distinti

1.2 Classificazione

L'orticaria "classica" si distingue tradizionalmente in acuta e cronica; è definita cronica quando presente quotidianamente per più di sei settimane.³⁻⁵ La classificazione è del tutto arbitraria, ma la suddivisione è importante: la maggior parte delle forme acute è determinata da reazioni allergiche (ipersensibilità immediata) o pseudoallergiche (non IgE mediate) nei confronti di fattori scatenanti specifici quali farmaci o alimenti, che a volte possono essere identificati grazie ad una chiara relazione temporale (Tab.1); nei quadri cronici al contrario le forme secondarie a determinati stimoli, dette "inducibili", sono una minoranza, e perlopiù scatenate da fattori fisici (Tab.1). La maggioranza delle forme croniche viene pertanto definita "spontanea" (CSU). In una frazione molto piccola di questi pazienti viene identificata un'esposizione subcontinua a stimoli allergici o pseudo allergici, oppure la presenza di patologie infiammatorie o neoplastiche, peraltro solitamente caratterizzate da significativi sintomi concomitanti (Tab.1);⁵ negli altri pazienti non viene identificato un vero e proprio fattore causale, anche se l'orticaria può essere transitoriamente peggiorata dai farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) e da vari alimenti.⁵⁻¹⁵

Se da un lato ciò determina un acceso dibattito in merito alla reale patogenesi dell'orticaria cronica spontanea,¹⁶ dall'altro contribuisce a rendere tale condizione particolarmente frustrante per il paziente, con pesanti ripercussioni su lavoro, studio e relazioni sociali, che frequentemente sfociano in quadri clinici di ansia o depressione conclamati.^{1,17-19}

Tabella 1: *Classificazione dell'orticaria "classica" (modificata da Zuberbier et al)⁵*

Orticaria Acuta:

Reazioni allergiche (ipersensibilità immediata di tipo I)

Reazioni pseudoallergiche (non IgE-mediate)

Infezioni

Orticaria Cronica:

Orticaria spontanea

- idiopatica
- infezioni (virus epatitici, H. Pylori, parassiti intestinali)
- neoplasie
- patologie autoimmunitarie
- reazioni allergiche e pseudoallergiche*

Orticaria inducibile*:

- "fisica":
 - o dermografismo
 - o colinergica
 - o da freddo
 - o da caldo
 - o solare
 - o da pressione
 - o acquagenica
 - o angioedema vibratorio
- da contatto

*se persiste l'esposizione allo stimolo scatenante

2. Orticaria cronica spontanea

2.1 Ipotesi autoimmunitaria

I pazienti con CSU non presentano caratteristiche cliniche ed ematochimiche peculiari, salvo una maggiore prevalenza di autoanticorpi anti-tiroide²⁰⁻²⁵ ed una frequente refrattarietà alle terapie tradizionali (antistaminici, steroidi a basso dosaggio) rispetto ad altre forme di orticaria ad eziologia identificabile.^{17,26} Non vi sono inoltre alterazioni istopatologiche patognomoniche, ed il riscontro di una aumentata concentrazione mastocitaria non è costante.²⁷⁻²⁹

L'infiltrato infiammatorio è di tipo linfo-monocitario cronico e comprende una quota variabile di granulociti eosinofili e basofili in relazione alla fase della malattia. Il pattern citochinico sembra essere di tipo misto TH1 e TH2.³⁰⁻³⁴

Un notevole impulso all'approfondimento dei meccanismi patogenetici dell'orticaria cronica spontanea è giunto dal riscontro in questi pazienti di una reattività cutanea nei riguardi del siero autologo (SA):³⁵ l'inoculazione intradermica (i.d.) di siero autologo provoca infatti, in circa il 40% dei pazienti affetti da CSU in fase attiva, la comparsa di un pomfo cutaneo circondato da un alone eritematoso.³⁵⁻³⁸ La reazione si verifica quasi esclusivamente nell'orticaria cronica e sembra essere strettamente correlata all'andamento clinico della malattia.^{35,36,38,39} Con la remissione dei sintomi si osserva infatti una graduale perdita della reattività cutanea dei sieri prelevati in tale fase, mentre la risposta nei confronti del SA raccolto durante il periodo sintomatico rimane positiva.³⁵ La reattività cutanea dei sieri è stata attribuita alla presenza di "histamine-releasing factors" (HRF) solubili in grado di indurre l'attivazione e la degranolazione dei mastociti cutanei, ma la natura di questi fattori rimane al momento controversa; secondo le teorie attualmente prevalenti almeno una parte delle orticarie croniche spontanee riconoscerebbe una patogenesi di tipo autoimmunitario.^{6,40-43}

Diversi autori hanno infatti identificato nel siero di pazienti con CSU autoanticorpi di classe IgG diretti contro le IgE o contro la catena α del recettore ad alta affinità per le IgE (Fc ϵ RI),^{36,44-47} un recettore di membrana

che lega con alta affinità le IgE circolanti e che nell'uomo è presente sia in forma completa tetrameric [αβγ₂], sia in forma trimerica [αγ₂]. La parte extracellulare della catena α lega la catena pesante delle IgE, mentre le catene β e γ trasducono il segnale e mediano l'attivazione cellulare. Basofili e mastociti esprimono la forma tetrameric del recettore, che partecipa alle reazioni allergiche IgE mediate di I tipo inducendo il rilascio di istamina e di altre molecole pro-infiammatorie.

Anche gli eosinofili e le piastrine esprimerebbero in forma completa l'FcεRI, mentre i fagociti mononucleati, le cellule di Langherans e quelle dendritiche possiedono solo la forma recettoriale αγ₂ che, mancando della catena β, interverrebbe nella presentazione di alcuni antigeni o nella clearance delle IgE circolanti senza indurre una risposta cellulare completa.^{48,49}

Gli anticorpi anti-IgE e anti-FcεRIα possono avere attività funzionale e determinare l'attivazione in vitro di basofili e mastociti di soggetti sani, con un meccanismo che sembra coinvolgere il sistema del complemento.^{37,46,47,50-56} Perciò la capacità dei sieri di pazienti con CSU di indurre il rilascio di istamina da basofili o da mastociti di soggetti sani è considerato il test di scelta per documentare la presenza di autoanticorpi funzionali circolanti. Solitamente il test viene eseguito sui basofili, più semplici da reperire rispetto ai mastociti, strutturalmente simili e anch'essi coinvolti nella patogenesi della CSU, in quanto si ritrovano in gran numero nei pomfi e contribuiscono alla produzione di mediatori infiammatori.⁵⁷ Tale metodica si è ulteriormente semplificata negli ultimi anni, quando al dosaggio dell'istamina si è affiancata la determinazione citofluorimetrica dell'espressione di CD203 come marker di attivazione di basofili e mastociti.⁵⁸

Con l'intento di spiegare perché questi autoanticorpi non inducano le manifestazioni tipiche dell'anafilassi, quali broncospasmo e ipotensione, Fiebiger e collaboratori hanno suggerito che le IgG anti-FcεRIα siano in realtà rivolte verso la forma solubile del recettore, che solo i mastociti cutanei sarebbero in grado di rilasciare in vivo. Si formerebbero in tal modo immunocomplessi a livello locale, e la degranolazione dei mastociti sarebbe mediata dall'attivazione in situ del complemento, ed in particolare

dall'anafilotossina C5a.⁵⁰ Tale ipotesi tuttavia non è stata ulteriormente indagata in studi successivi.

I fautori della "teoria autoimmunitaria" traggono ulteriore sostegno alle loro tesi dalla prevalenza della CSU nel sesso femminile in età fertile, dalla correlazione tra CSU e autoanticorpi tiroidei^{20-25,59} e dalla aumentata frequenza di alcuni alplotipi HLA di classe II,⁶⁰ condizioni che indicherebbero una generica predisposizione di questi pazienti all'autoimmunità.

Anche l'efficacia terapeutica di procedure quali la somministrazione di immunoglobuline per via endovenosa,^{61,62} la plasmferesi⁶³ e l'impiego di immunosoppressori come la ciclosporina A⁶⁴⁻⁶⁶ e la ciclofosfamide⁶⁷ sembrerebbe rafforzare l'ipotesi di una patogenesi autoimmunitaria della CSU, ma i risultati di questi studi si prestano in realtà a numerosi rilievi.

Per quanto concerne il trattamento con immunoglobuline per via sistemica, esso riguarda pochi casi sporadici,^{61,62,68} e la supposta efficacia può essere confusa facilmente con una remissione spontanea del tutto casuale, visto l'andamento a volte intermittente della malattia. Anche i risultati conseguiti con la plasmferesi⁶³ si riferiscono a casistiche molto limitate; inoltre, i presidi impiegati per la plasmferesi contengono abitualmente eparina. Tale sostanza possiede, oltre che un'attività anticoagulante, anche proprietà antinfiammatorie, che le derivano sia dalla capacità di interferire con l'attivazione cellulare sia dalla capacità di legare molte proteine plasmatiche, tra cui alcune frazioni del complemento.⁶⁹⁻⁷¹ I benefici temporanei indotti dalla plasmferesi potrebbero dipendere, più che dalla riduzione dei livelli di immunoglobuline patogene, proprio dalla rimozione di HRF circolanti da parte dell'eparina, come suggeriscono alcune osservazioni di Fagiolo e collaboratori: in alcuni pazienti con positività cutanea nei confronti di siero autologo e di plasma autologo anticoagulato con EDTA l'inoculazione i.d. di plasma eparinato non era in grado di riprodurre la reazione pomfo-eritematosa; lo stesso accadeva dopo aggiunta di eparina sodica al siero o dopo adsorbimento del siero su eparina legata a sefarosio;³⁸ l'incubazione dei sieri con eparina in fase solida non modificava le concentrazioni di IgG presenti nei sieri. La risposta positiva di alcuni pazienti alla somministrazione orale di sulodexide, una miscela di

frazioni epariniche e di dermatan-solfato pressoché priva di attività anticoagulante madotata come l'eparina di una forte carica negativa che le consente di legare molecole cationiche, supporta indirettamente tale ipotesi.⁷² Gli effetti degli immunosoppressori sull'orticaria, infine, potrebbero derivare più dalla loro attività antinfiammatoria che dalla azione immunosoppressiva. I trial clinici finora condotti hanno infatti evidenziato come la presenza di anticorpi funzionali anti-FcεRIα non costituisca un fattore predittivo essenziale per la risposta al trattamento con ciclosporina.^{64,65}

I dati più sostanziali a favore di una patogenesi immunitaria, riguardanti la correlazione tra orticaria e presenza nei sieri dei pazienti di autoanticorpi anti-IgE o anti-FcεRIα, si prestano a loro volta a numerosi rilievi.

La discrepanza tra il numero complessivo di casi di CSU con un test cutaneo positivo^{35-38,46} e quelli in cui è possibile dimostrare anticorpi dotati di attività funzionale è notevole.^{36,37,46,47,50,51} Hide et al, in particolare, hanno riscontrato la presenza di anticorpi circolanti anti-FcεRIα o anti-IgE attivi in vitro sui basofili rispettivamente nel 46% e nel 20% di 26 sieri selezionati in base alla loro capacità di indurre una reazione pomfo-eritematosa in vivo.⁴⁶ Niimi et al, in seguito, in una larga coorte comprendente 163 casi di CSU hanno identificato 98 pazienti (60%) che rispondevano positivamente all'inoculazione i.d. di siero autologo. Solo 38/98 sieri (39%), tuttavia, contenevano anticorpi anti-recettore dotati di attività funzionale in vitro sui basofili o sui mastociti, mentre autoanticorpi funzionali anti-IgE erano presenti in un numero ancora più esiguo di pazienti (9/98).³⁷

Per superare tali incongruenze è stato proposto che il test cutaneo con SA rappresenti più un marker di "autoreattività" che una metodica in grado di identificare le forme autoimmunitarie di orticaria, e che solo alcune sottoclassi di IgG anti-FcεRIα siano in realtà funzionali in vitro e, di conseguenza, verosimilmente anche in vivo.^{73,74} E' tuttavia sorprendente considerare al riguardo come non sia stato finora pubblicato alcun dato in merito alla eventuale presenza e all'attività funzionale di anticorpi anti-IgE o anti-FcεRIα nel siero di pazienti in fase di remissione clinica o

definitivamente guariti dall'orticaria, benché sia noto da lungo tempo che in queste condizioni il test cutaneo diviene negativo.³⁵ Per quanto inoltre gli aspetti istologici dell'orticaria cronica siano stati ripetutamente investigati, nessuno studio ha dimostrato a tutt'oggi il deposito di IgG nei vasi cutanei o nel derma dei pazienti affetti da orticaria cronica sintomatica, e neppure nelle lesioni indotte dal siero autologo.^{30,32,75,76} Infine, Bossi e collaboratori hanno dimostrato che linee mastocitarie leucemiche umane possono degranulare quando incubate con il siero di pazienti affetti da CSU anche se non esprimono FcεRI in quantità significativa.⁷⁷

Le malattie autoimmuni croniche, del resto, una volta insorte tendono a persistere per l'intera durata della vita, richiedendo una somministrazione prolungata di farmaci sostitutivi, antinfiammatori o immunosoppressori. L'orticaria, al contrario, dopo periodi prolungati di attività caratterizzati da fasi sintomatologiche altalenanti, va incontro nella maggior parte dei casi a guarigione spontanea.

Altri due riscontri molto comuni nell'CSU non sono tipici delle malattie autoimmunitarie. Innanzitutto l'aumento della permeabilità intestinale ed il ruolo degli additivi alimentari nella progressione delle forme croniche di orticaria, tanto che una dieta priva per quanto possibile di additivi alimentari influenza favorevolmente il decorso della malattia in una percentuale significativa di casi.^{7-10,78-83} In secondo luogo, ma ancora più rilevante, la ben nota associazione fra orticaria cronica ed intolleranza ai FANS.^{11,12,15,16} Non solo questi farmaci tendono ad esacerbare la CSU, ma una reazione avversa nei loro confronti può precedere, e forse favorire, l'insorgenza dell'orticaria cronica.¹³ Le intolleranze ai FANS, tuttavia, anche se non ancora completamente caratterizzate dal punto di vista fisiopatologico, sembrano essere mediate da alterazioni enzimatiche in cui il sistema immunitario non viene coinvolto.^{12,14} Ed anche la segnalazione da parte di Asero et al di una reattività verso il SA nei pazienti con intolleranza ai FANS,⁸⁴ di problematica interpretazione clinica, non è stata confermata da altri autori. E' stato anzi confutato che la reattività cutanea al SA caratterizzi i pazienti con reazioni avverse ai FANS, dimostrando anche che il siero prelevato in fase sintomatica durante test di provocazione positivo con FANS non è in grado di indurre alcuna reazione pomfo-eritematosa.⁸⁵

Queste considerazioni, suffragate dai dati inerenti l'azione inibitoria dell'eparina sulla reattività dei sieri e dalla dimostrazione che la deplezione delle IgG dai sieri di pazienti con CSU ne modifica l'attività funzionale in vitro ma non quella in vivo,^{38,86} suggeriscono che HRF di natura non-immunoglobulinica possano essere presenti in pazienti diversi o anche in uno stesso paziente. Il riscontro, da parte del gruppo di Stadler,^{87,88} di anticorpi funzionali anti-recettore nel siero di soggetti sani solleva ulteriori dubbi sul significato reale degli autoanticorpi anti-FcεRIα nell'orticaria cronica spontanea, ove potrebbero esercitare un ruolo patogenetico, rappresentare dei semplici "markers" di malattia o rivelarsi addirittura protettivi. Sono stati infatti identificati anticorpi anti-FcεRIα che, fissandosi alla base del dominio extracellulare della catena α, impediscono la degranolazione dei basofili in vitro da parte di anticorpi monoclonali anti-recettore normalmente in grado di indurre il rilascio di istamina (F. Kricek, Novartis Vienna, comunicazione personale). Un recente lavoro di Auyeung et al ha riportato in auge l'ipotesi autoimmunitaria introducendo l'ipotesi di una ipersensibilità cellulo-mediata: in circa il 50% dei pazienti con CSU sarebbero presenti linfociti T CD4+ in grado di attivarsi in vitro se incubati con FcεRIα ricombinante. Le citochine da essi prodotte richiamavano un fenotipo TH1, con elevate concentrazioni di IFN .⁸⁹ Nella stessa coorte di pazienti non è stata individuata alcuna correlazione tra i pazienti portatori di tali linfociti autoreattivi e i pazienti positivi per autoanticorpi circolanti anti FcεRIα e anti IgE. Il coinvolgimento di un'ipersensibilità di tipo cellulo-mediata nell'orticaria non è supportato dal quadro clinico, che non suggerisce la presenza di un'inflammatione locale cronica; la discussione in merito ad una possibile patogenesi autoimmunitaria della CSU rimane comunque aperta.

2.2 Ipotesi alternative

2.2a Il sistema del complemento

Nell'ipotesi che fattori di natura non immunoglobulinica possano effettivamente partecipare all'eziopatogenesi della CSU attivando i mastociti o agendo direttamente sul microcircolo cutaneo,⁸⁶ fra i vari mediatori cellulari e umorali del processo infiammatorio⁹⁰ apparirebbe innanzitutto verosimile un coinvolgimento del complemento. Questo sistema può infatti essere attivato da molteplici stimoli, sia immunologici (via classica) che di origine diversa (vie alternativa e delle lectine leganti il mannosio). Alcune sue frazioni, inoltre, sono in grado tanto di stimolare fagociti, basofili e mastociti, quanto di contrarre la muscolatura liscia ed aumentare la permeabilità vasale legandosi a recettori specifici (C3a, C4a e soprattutto C5a).⁹⁰ Proprio il C5a, come già sottolineato, sembra rappresentare un cofattore indispensabile, se non addirittura l'effettore terminale, dell'attivazione di basofili e mastociti in vitro da parte dei sieri di pazienti con CSU.^{47,50,51} Ed anche se lo scomplementamento dei sieri e la deplezione di C5a preformato non ne modificano, pur interferendo con la loro capacità funzionale in vitro, la reattività cutanea,^{86,91} non si può escludere che l'esecuzione del TC con SA comporti comunque, a prescindere dai meccanismi, una generazione locale di C5a. Nell'orticaria cronica spontanea non sono presenti differenze nella concentrazione plasmatica di C3a, C5a, C5b-9 tra pazienti con CSU in fase attiva e controlli sani (dati non pubblicati). Ciò risulta tuttavia facilmente comprensibile poiché, se così non fosse, l'orticaria sarebbe accompagnata da reazioni sistemiche eclatanti specie a carico del distretto cardiovascolare. E' in ogni caso possibile che alterazioni modeste, anche transitorie e comunque non ancora investigate, dell'insieme di proteasi e di proteine regolatorie circolanti che controllano il sistema del complemento, possano determinare nella CSU una labilità del sistema complementare non documentabile in vitro, ma tale da contribuire alle manifestazioni pomfo-eritematose tipiche dell'orticaria.

2.2b La cascata della coagulazione

Una serie di articoli pubblicati da Asero et al. ha dimostrato l'attivazione della cascata estrinseca della coagulazione nei pazienti con CSU, evidenziando valori plasmatici elevati di Fattore VIIa, di frammento protrombinico 1+2 e di D-dimero, dovuti all'azione del Fattore tissutale (FT). La cute orticarioide presenterebbe inoltre una reattività nei confronti del FT non riscontrabile nei soggetti sani, e le concentrazioni di D-dimero e di frammento protrombinico 1+2 correlerebbero con l'intensità dell'orticaria.⁹¹⁻⁹⁴ E' plausibile che ciò sia privo di rilevanza patogenetica, come suggerito da Kaplan e Greaves,⁶ e che rifletta semplicemente una attivazione endoteliale localizzata con rilascio di FT, attivazione della cascata estrinseca della coagulazione e successiva fibrinolisi, analogamente a quanto riportato in pazienti con vasculite sistemica e sclerodermia; è stato comunque osservato che la trombina è potenzialmente in grado di stimolare il mastocita interagendo con specifici recettori di membrana⁹¹ ed il suo ruolo di possibile amplificatore dei segnali pro-infiammatori deve quindi essere tenuto in considerazione.

2.2c IgE autoreattive

Recentemente Maurer e collaboratori hanno identificato IgE rivolte verso la tireoperossidasi tiroidea (antiTPO) in circa metà di un gruppo di pazienti con CSU, ed hanno suggerito un meccanismo "auto-allergico": i mastociti e i basofili sarebbero stimolati da antigeni *self*. Data l'accertata associazione tra CSU e tiroidite di Hashimoto, gli antigeni tiroidei sono stati i primi ad essere ricercati ed identificati; comunque, qualsiasi tipo di antigene *self* potrebbe essere virtualmente coinvolto, e ciò potrebbe spiegare lo scatenamento dell'orticaria anche nei pazienti prive di IgE antiTPO. Tuttavia, IgE antiTPO sono presenti in un numero considerevole di soggetti sani e l'effettiva capacità di questi anticorpi di indurre la degranulazione cellulare non è stata indagata.⁹⁵

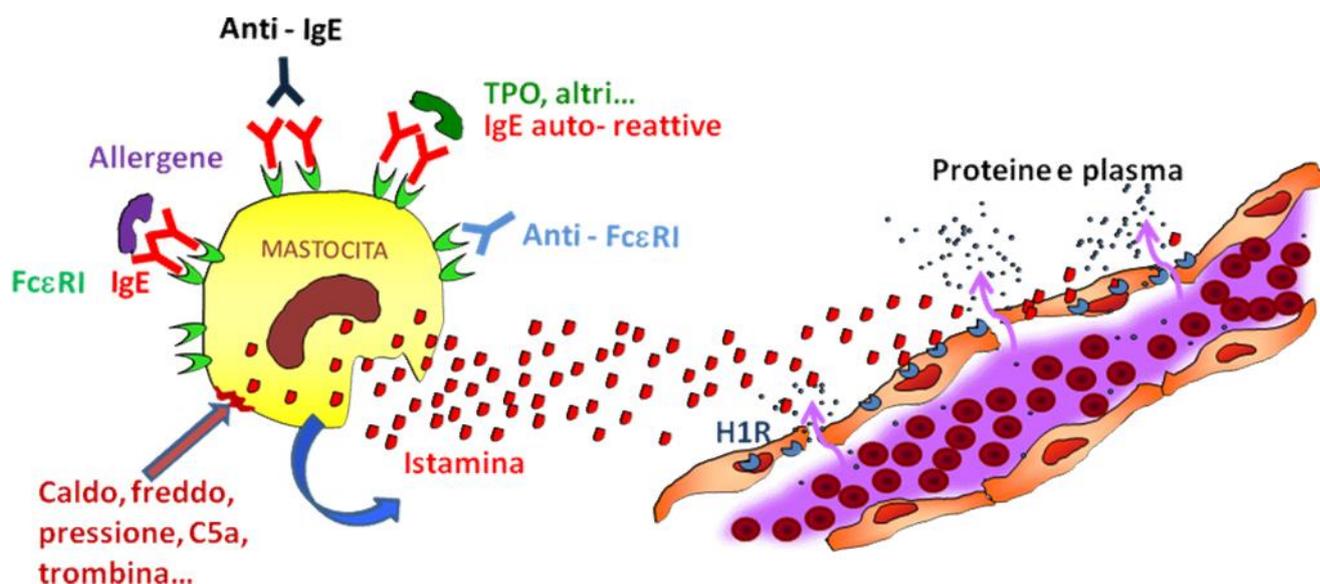


Figura 1: Degranulazione mastocitaria indotta da vari stimoli. FcεRI: recettore ad alta affinità per le IgE. TPO: Tireoperossidasi. H1R: recettore dell'Istamina di tipo1

2.3 Omalizumab

L'introduzione di Omalizumab, un anticorpo di classe IgG monoclonale umanizzato anti IgE, ha da qualche anno modificato l'approccio al problema della patogenesi della CSU. Esso è in grado di formare complessi con le IgE circolanti, favorendone quindi la rimozione dal circolo; inoltre, fissandosi al dominio che media il legame tra IgE e Fc RI, non provoca la degranulazione di mastociti e basofili perché non interagisce con le IgE esposte sulla loro membrana, in cui tale dominio non è accessibile.⁹⁶ Multipli trial randomizzati controllati hanno dimostrato la sua efficacia nell'orticaria cronica;⁹⁷⁻¹⁰⁰ sebbene l'esatto meccanismo d'azione non sia ancora del tutto chiaro, la positività del test al siero autologo o la presenza di anticorpi anti IgE e anti Fc RI non sembra condizionarne l'effetto in modo sostanziale.⁹⁶

Omalizumab era stato inizialmente sviluppato come trattamento dell'asma allergico, patologia in cui tuttora rappresenta una valida opzione terapeutica. In tale contesto, la dose del farmaco viene aggiustata in base al peso del paziente ed alla concentrazione sierica delle IgE, con il proposito di rimuovere dal circolo la maggior parte delle IgE rivolte verso gli allergeni.^{101,102}

Sebbene la CSU non sia per definizione causata da una reazione allergica nei confronti di un antigene esogeno, né la concentrazione delle IgE appaia superiore a quella presente nella popolazione generale,¹⁰³ sicuramente Omalizumab potrebbe rimuovere eventuali IgE autoreattive rivolte verso antigeni *self*. Comunque, come segnalato in precedenza, tali anticorpi sono stati identificati solo in una parte dei pazienti, e, soprattutto, la loro presenza non è un fattore predittivo dell'efficacia del farmaco.⁹⁶

E' noto inoltre che Omalizumab, sequestrando la maggior parte delle IgE circolanti, riduce anche il numero delle IgE legate al FcεRI sulla membrana cellulare di mastociti e basofili; ne consegue una down-regulation del recettore, che incrementa la soglia di attivazione e degranolazione della cellula in risposta agli allergeni.¹⁰⁴ Tale meccanismo, che contribuisce all'azione terapeutica nell'asma, è stato osservato anche nel contesto della CSU: la down-regulation di FcεRI interessa sia i basofili sia, con maggiore latenza, le cellule FcεRI+ e IgE+ dermiche.^{105,106} Una ridotta espressione di FcεRI potrebbe ostacolare la degranolazione di basofili e mastociti sia di per sé, sia riducendo i siti di legame per eventuali anticorpi anti FcεRI e anti IgE. A supporto di questa teoria, la densità di espressione di FcεRI sui basofili rappresenta un fattore predittivo di risposta ad Omalizumab.¹⁰⁶

Diverse altre osservazioni sono però in contrasto con questa ipotesi: anzitutto manca una chiara correlazione tra risposta clinica e riduzione dell'esposizione di FcεRI e IgE sulla membrana plasmatica;^{105,106} la presenza di anticorpi anti FcεRI o IgE funzionali non rappresenta un fattore predittivo di efficacia del farmaco, anzi i pazienti con positività di ASST e HRA dei basofili tendono a rispondere più lentamente;^{96,107} l'iperespressione di CD203c sui basofili, generalmente associata alla presenza di anticorpi anti FcεRI e IgE circolanti e funzionali, rappresenta un fattore predittivo negativo di risposta ad Omalizumab;¹⁰⁸ infine, alcuni dati mostrano che Omalizumab

potrebbe paradossalmente aumentare la suscettibilità dei basofili all'attivazione da parte degli allergeni.¹⁰⁹

In effetti una percentuale variabile ma cospicua (circa il 50%) dei pazienti risponde all'Omalizumab entro una settimana, prima di una significativa down-regulation cellulare del FcεRI, suggerendo che altri meccanismi d'azione siano coinvolti.⁹⁶ La ricerca in questo ambito è attualmente molto attiva e non si può escludere la presenza in diversi pazienti di diversi meccanismi patogenetici, che convergono sullo stesso fenotipo clinico.⁹⁶ Va inoltre considerata la possibilità che Omalizumab espliciti un effetto modulatore a livello di altre cellule esprimenti FcεRI o comunque potenzialmente sensibili alla deplezione delle IgE libere circolanti, fra le quali gli eosinofili e le cellule dendritiche.⁹⁶

3. Orticaria cronica spontanea e linfociti Treg/TH17

A prescindere dagli ipotetici meccanismi associati alla patogenesi dell'orticaria cronica spontanea fin qui citati, è nozione ampiamente condivisa che i mastociti interpretino un ruolo da protagonisti nel mediare le manifestazioni cliniche dell'orticaria: sono presenti nelle lesioni pomfoidi, degranulano in risposta a svariati stimoli, liberano numerosi mediatori preformati o neoformati come istamina, leucotrieni, IL6, TNFα, VEGF, PAF ed altri^{6,57,110} in grado di attivare l'endotelio ed indurre vasodilatazione, incremento della permeabilità plasmatica, prurito ed espressione di proteine di adesione endoteliale che mediano la diapedesi di granulociti, linfociti ed altre cellule infiammatorie dal sangue al derma.¹¹⁰ L'impiego terapeutico di antistaminici e, quando non sufficienti, di steroidi ed immunosoppressori, conferma da un lato il coinvolgimento delle mast cell, principale fonte di istamina, e dall'altro come spesso la CSU sia caratterizzata da una spiccata componente flogistica.^{63-69,111} Oltre a rilasciare un gran numero di mediatori, si è osservato che i mastociti esercitano un effetto immunomodulatore: in topi infettati sperimentalmente da *Leishmania major*, essi favoriscono la maturazione delle cellule dendritiche ed inducono la proliferazione dei linfociti T helper naive stimolandoli a produrre citochine

tipiche delle popolazioni TH1 e TH17, quali IFN γ , IL17 e GM-CSF. La capacità della mast cell di orientare la differenziazione linfocitaria è stata confermata osservando come topi Kit^{W-sh}/ Kit^{W-sh}, pertanto con deficit mastocitario, se infettati da *L. major* mostrino una ridotta produzione di IFN γ e IL17, esprimano una risposta immunitaria di tipo prevalentemente TH2 e siano meno resistenti all'agente patogeno.¹¹² La potenzialità del mastocita di modulare e polarizzare la risposta linfocitaria in senso TH1 e TH17 ci ha portato a focalizzare l'attenzione sull'asse TH17/Treg, il cui ruolo nella patogenesi di numerose patologie infiammatorie è stato da poco svelato. Esistono del resto validi presupposti per ipotizzare un ruolo di queste cellule nella patogenesi della CSU.

I linfociti TH17 rappresentano una sottopopolazione linfocitaria T helper recentemente identificata¹¹³⁻¹¹⁵ e che nell'uomo deriva da cellule T helper naive in risposta all'azione di un milieu citochinico di tipo flogistico, comprendente in particolare IL1 e IL6, in presenza di TGF β . L'espansione e la sopravvivenza dei TH17 dipende invece da IL23. Dal punto di vista fenotipico queste cellule sono caratterizzate da diversi marcatori di membrana quali CD45RO, CD161, il recettore IL23R e recettori per chemochine fra cui CCR7, CXCR5, CCR4, CCR5, CXCR6 e CCR6. I TH17 sono inoltre contraddistinti dalla produzione del fattore di trascrizione ROR γ t e dalla secrezione di interleuchine 17 (IL17A), IL17F, IL6, TNF α e IL22.^{116,117} Il loro ruolo è prevalentemente pro infiammatorio, essendo in grado di reclutare granulociti neutrofili, di stimolare la produzione di citochine coinvolte nella flogosi e di condizionare in tal senso il sistema immunitario.¹¹⁸⁻¹²⁰ La risposta TH17 viene innescata da diversi patogeni, tipicamente extracellulari, fra cui batteri (*Propionibacterium a*, *Klebsiella p*, *Streptococcus p*) e miceti come *Candida Albicans*,¹²⁰⁻¹²⁴ nei confronti dei quali questi linfociti costituiscono un fondamentale meccanismo di difesa. Soggetti con deficit congenito di sviluppo della linea TH17 presentano infezioni cutanee e polmonari recidivanti, nonché candidosi muco cutanea cronica, con un peculiare aumento di eosinofili ed IgE (Sindrome da IperIgE o Sindrome di Giobbe).¹²⁵

IL17 è la citochina che caratterizza l'attività pro-infiammatoria dei TH17: tra le altre funzioni, attiva cellule epiteliali, stimola l'espressione di molecole di adesione e amplifica la risposta infiammatoria promuovendo la

produzione di IL6 e prostaglandina E2.¹²⁶ Il coinvolgimento dei TH17 è stato documentato in numerose patologie autoimmuni tra cui artrite reumatoide, LES, vasculiti ANCA associate, dermatomiosite, sclerosi multipla, rettocolite ulcerosa e morbo di Crohn.¹²⁷⁻¹³¹ Per quanto riguarda le patologie allergiche, i livelli sierici di IL17 correlano con la severità clinica della rinite moderata/severa,¹³² mentre nell'asma IL17 amplifica il quadro infiammatorio specialmente reclutando neutrofili nell'albero bronchiale.¹³³

I linfociti regolatori derivano anch'essi da precursori T helper naive in presenza di TGFβ e IL2 e impediscono un'eccessiva attivazione del sistema immunitario regolandone l'omeostasi e la tolleranza verso auto-antigeni, contrastando di fatto gli effetti pro-infiammatori ed autoimmunitari di altri T helper¹¹⁷. Nel corso degli anni sono stati classificati in più sottogruppi, differenziabili in base ad origine, funzione ed espressione di marcatori di superficie e del fattore di trascrizione forkhead box P3 (FOXP3); tale classificazione non può ancora considerarsi definitiva, stante la mole di nuove osservazioni che vengono continuamente pubblicate in quest'ambito, e sono descritti significativi overlap tra i diversi gruppi. Si distinguono:¹³⁴⁻¹³⁶

- Le cellule TR1 (T regolatorie di tipo 1), che vengono prodotte in periferia e sopprimono la proliferazione delle cellule T specialmente attraverso la produzione di IL-10; non hanno un marcatore cellulare unico.

- Le cellule TH3 (T helper 3), che originano in periferia, e secernono, quale principale mediatore, TGF ; anch'esse non hanno un marcatore cellulare specifico.

- I linfociti T regolatori CD4 + CD25 + FOXP3 + (Treg), che rappresentano il gruppo meglio caratterizzato. Essi possono essere a loro volta suddivisi in due gruppi: Treg di derivazione timica (nTreg) e Treg indotti in periferia (iTreg). Entrambe le popolazioni esprimono FOXP3 e sopprimono la risposta immunitaria attraverso un duplice meccanismo di interazione recettoriale e rilascio di fattori solubili quali TGF , IL10 e IL35.¹¹⁷ Le cellule nTreg vengono prodotte nel timo durante la linfopoiesi, mentre le iTeg si sviluppano nei tessuti periferici per esposizione a TGF e IL2.¹³⁷ In varie malattie autoimmuni quali LES, sclerosi multipla, malattie infiammatorie croniche intestinali e diabete mellito tipo I è stata documentata una alterazione nel numero e/o funzionalità delle cellule Treg, dovuta a molteplici meccanismi: inadeguata espressione di molecole di superficie

con perdita dell'interazione cellulare diretta, deficit secretorio di TGF β , IL10 e IL35, alterazione della composizione del milieu citochinico locale.¹³⁸⁻¹⁴⁰

Il rapporto tra Treg e TH17 non è ancora pienamente conosciuto. E' probabile che lo shift differenziativo nell'uno o nell'altro senso dipenda fortemente dal milieu citochinico del microambiente tissutale, dove, in presenza di TGF β , una elevata concentrazione di citochine pro infiammatorie come IL6, IL21, IL1 β e TNF promuove la differenziazione in senso TH17, mentre una concentrazione di citochine pro-infiammatorie relativamente bassa, in presenza di IL2, induce lo sviluppo del linfocita CD4+ naive in senso Treg.^{117,139,140} Da un lato è evidente un meccanismo competitivo tra i rispettivi fattori trascrizionali ROR γ t e FOXP3, dall'altro i due programmi cellulari TH17 e Treg mostrano una notevole plasticità differenziativa.¹⁴¹

Lo sbilanciamento tra TH17 e Treg in favore dei primi determina, in condizioni fisiologiche, una corretta risposta immunitaria a molte infezioni; quando è inappropriato provoca invece la perdita dell'omeostasi immunitaria e conduce allo sviluppo di patologie autoimmuni.¹⁴²

E' di peculiare interesse in relazione all'orticaria lo studio di Chen et al, che nel 2008 ha riscontrato una aumentata percentuale di cellule CD4+CD25^{hi} sul totale delle cellule CD4+ circolanti nel sangue periferico di 19 soggetti affetti da CSU, indipendentemente dalla reattività al siero autologo, rispetto ai controlli sani. Anche l'attività regolatoria soppressiva delle cellule Treg su CD4+CD25- omologhi differiva fra pazienti e controlli: le cellule T regolatorie di questi ultimi presentavano una normale attività soppressiva, mentre in una parte dei pazienti l'attività regolatoria dei Treg risultava depressa.¹⁴³ Una successiva analisi citofluorimetrica condotta da Sun et al su 36 pazienti affetti da CSU è pervenuta a risultati opposti, evidenziando una significativa riduzione di linfociti CD4+CD25+FOXP3+ nelle orticarie rispetto ai controlli sani. La riduzione sembrava inoltre più marcata in 12 pazienti con autoanticorpi anti Fc ϵ RI funzionali, documentati mediante immunoblot e HRA dei basofili.¹⁴⁴ Entrambi gli studi erano limitati dalla scarsa sintomaticità dei pazienti, che non permetteva di studiare l'eventuale correlazione tra dato laboratoristico e gravità clinica.

Per quanto riguarda i TH17 nella CSU, i dati presenti in letteratura sono piuttosto scarsi: Lopes e collaboratori hanno osservato una riduzione della proporzione di cellule CD4+IL17+ sul totale delle cellule CD4+ circolanti rispetto ai controlli sani, sempre peraltro prendendo in considerazione pazienti poco sintomatici e senza verificare la presenza di una correlazione clinica;¹⁴⁵ Moy e collaboratori hanno rilevato un aumento della percentuale dei TH17 nelle biopsie cutanee di un gruppo limitato di pazienti, identificando come TH17 le cellule esprimenti CD3 e il fattore di trascrizione relativamente specifico STAT3.¹⁴⁶ Più forti sono le evidenze che indicano un aumento della concentrazione plasmatica di IL17 nei pazienti con CSU,¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ in particolare nei soggetti con test al plasma¹⁴⁷ ed al siero¹⁴⁸ autologo positivi. I linfociti dei pazienti sembrano inoltre produrre più IL17 in risposta al mitogeno.¹⁵⁰ Il livello di IL17 nei pazienti con CSU si colloca nel contesto di un generale aumento delle citochine infiammatorie, in particolare IL6 e TNF α ,¹⁰³ che sono tra l'altro coinvolte nella differenziazione del linfocita T naive in senso TH17.^{117,120}

Scopo dello studio

Lo studio ha riguardato 15 pazienti con orticaria cronica spontanea ed un gruppo di 9 controlli sani; scopo del lavoro è stato determinare la proporzione di cellule Treg e TH17 circolanti rispetto al totale dei linfociti CD4+ in tutti i soggetti, e quindi verificare:

- eventuali differenze tra pazienti e gruppo di controllo
- eventuali differenze tra pazienti con test cutaneo al siero autologo positivo e negativo
- la correlazione con il grado di severità della malattia nel gruppo dei pazienti

Materiali e metodi

1. Casistica

15 casi (10 femmine, 5 maschi; età media: 49.3 ± 17.1 DS) di CSU in differenti fasi di attività della malattia sono stati reclutati in maniera consecutiva tra i pazienti afferenti all'Ambulatorio di Allergologia ed Immunologia della Clinica Medica 1 dell'Università degli studi di Padova (Tab 2). L'orticaria è stata classificata come spontanea dopo avere escluso la presenza di possibili fattori scatenanti di natura fisica, allergica o pseudoallergica, nonché di altre patologie sottostanti. I pazienti erano in trattamento continuativo con antistaminici associati o meno ad antileucotrienici e/o steroide. Nessun paziente era in terapia con immunosoppressori. L'intensità della sintomatologia è stata calcolata in base al numero di pomfi e alla severità del prurito in accordo con l'*Urticaria Activity Score* (UAS), strumento proposto dalle linee guida EAACI⁵ (Tab 3). Tutti i pazienti avevano preliminarmente espresso il proprio consenso informato allo studio.

Sono stati inoltre selezionati 9 controlli sani (3 femmine, 6 maschi; età media: 32.75 ± 8.56 DS) con anamnesi familiare e personale negativa per orticaria fra il personale medico dell' Azienda Ospedaliera - Università degli studi di Padova.

2. Test cutaneo con siero autologo

Campioni di sangue venoso periferico prelevati a digiuno con aghi da 19 G in provette sterili siliconate (Becton-Dickinson, Marlan, Francia) sono stati lasciati coagulare per 30' a temperatura ambiente (TA) e quindi centrifugati per 15' a 350g in centrifuga WCS 4236 (ALC, Milano, Italia). Aliquote di 30 μ l di siero autologo sono state immediatamente inoculate per via intradermica (i.d.) sulla superficie volare dell'avambraccio, impiegando 30 μ l di soluzione fisiologica (SF) i.d. come controllo negativo ed un prick test standard con istamina come controllo positivo (Stallergenes, Milano). L'assunzione di antistaminici e di antileucotrienici era stata sospesa da

almeno 48 ore, quella di steroidi da almeno 7 giorni. Le risposte cutanee sono state osservate nei 60' seguenti l'esecuzione dei test, esprimendone l'intensità come la media tra il diametro maggiore della reazione pomfo-eritematosa (D1) ed il diametro perpendicolare ad esso (D2), secondo la formula $D1 + D2 / 2$, e considerando come positive quelle di diametro uguale o superiore al pomfo indotto dal prick test con istamina. Reazioni di diametro $< 0,5$ cm sono state comunque interpretate come negative.

Paziente	Sesso	Età	Clinica	SA	UAS
1	M	53	U	ND	4
2	F	47	U	-	0
3	F	47	U	-	2
4	M	34	U+AE	-	5
5	F	73	U	+	4
6	F	61	U	+	4
7	F	28	U+AE	+	4
8	M	31	U+AE	-	6
9	F	61	U+AE	-	2
10	F	77	U	-	5
11	M	54	U+AE	-	5
12	F	37	U+AE	+	5
13	M	60	U	-	2
14	F	17	U	+	3
15	F	59	U	-	4

Tabella 2: Caratteristiche dei pazienti. U orticaria, AE angioedema, SA test al siero autologo, UAS Urticaria Activity Score, ND non disponibile.

Score	Pomfi	Prurito
0	Nessuno	Non presente
1	$< 20 / 24h$	Lieve
2	20-50/24h	Moderato
3	$>50/24h$ o aree di pomfi confluenti	Intenso

Tabella 3: Urticaria Activity Score (UAS)

3. Preparazione delle sospensioni cellulari a partire dal sangue periferico

I prelievi sono stati eseguiti contemporaneamente a quelli utilizzati per l'esecuzione del test cutaneo con siero autologo, e pertanto nelle stesse condizioni di wash out farmacologico. Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state ottenute da campioni di sangue fresco eparinato mediante centrifugazione su gradiente di Ficoll/HypaqueTM (F/H, *GE Healthcare*, Uppsala, Svezia).

Il sangue periferico è stato dapprima diluito in rapporto 1:3 con SF a temperatura ambiente ed agitato delicatamente; in seguito è stato stratificato lentamente sopra la soluzione di F/H. Si è proceduto ad una centrifugazione a 900g per 20 minuti a 20°C, senza freno. L'anello di cellule mononucleate formatosi all'interfaccia F/H è stato aspirato e sottoposto a due lavaggi successivi con SF mediante centrifugazione a 400g per 10 minuti a 20°C con freno; il pellet cellulare è stato risospeso in una quantità adeguata di SF e le cellule sono state contate in camera di Burker, utilizzando il liquido di Türk diluito 1:25.

4. Analisi citofluorimetrica

L'espressione degli antigeni di superficie e intracitoplasmatici su PBMC dei pazienti con CSU e dei controlli è stata valutata mediante citometria a flusso.

Sono stati utilizzati i seguenti fluorocromi: Fluoresceina Isotiocianato (FITC), Ficoeritrina (PE) e Ficoeritrina-Cianina5 (PE-Cy5), che vengono eccitati alla lunghezza d'onda di 488 nm del laser ad Argon, ed Allofococianina (APC) che viene eccitata alla lunghezza d'onda di 633 nm dal laser RED 635. I rispettivi spettri di emissione sono: per FITC nel verde a 530±30 nm, per PE nell'arancio a 575±42 nm, per PE-Cy5 e APC nel rosso profondo, rispettivamente a 670 nm e a 660 nm (*Becton Dickinson Mountain View, CA, USA*).

L'analisi è stata condotta su aliquote pari a $0,5 \times 10^6$ cellule per ciascuna marcatura di superficie ed a 2×10^6 cellule per ciascuna marcatura intracitoplasmatica.

Discriminate le popolazioni cellulari che compongono il campione in esame in base alle loro caratteristiche morfologiche (dimensione e granulosità) mediante analisi contemporanea del *Forward Scatter* (FSC) e del *Side Scatter* (SSC) e il relativo *dot plot* (diagramma a punti), è stata scelta come regione di analisi (*gate*) quella linfocitaria.

I dati sono stati generati mediante il software dedicato CellQuest® (*Becton Dickinson*), dopo standardizzazione di ciascun valore con il valore del controllo isotipico; abbiamo ricavato, per ogni paziente, il valore percentuale di cellule esprimente un determinato marcatore rispetto al totale delle cellule, e l'intensità media di fluorescenza (MFI) di tale marcatore nelle cellule considerate.

Per la caratterizzazione immunofenotipica è stato utilizzato un pannello di Anticorpi monoclonali (AcM) coniugati con fluorocromi, comprendente anti-CD4 (FITC e PE-Cy5), anti-CD25 (APC), anti-IL23R (FITC), anti-IL17 intracitoplasmatico (PE) e anti-FOXP3 intra-citoplasmatico (PE).

Per l'identificazione dei Treg è stato utilizzato lo *Human Regulatory T Cell Staining Kit* (*eBioscience*), che prevede una pre-marcatura con AcM anti-CD4 (FITC) e anti-CD25(APC) umani, la fissazione e permeabilizzazione con il *FOXP3-staining buffer* e la successiva marcatura con anti-FOXP3 umano (PE) o controllo isotipico (PE).

Per l'identificazione dei TH17, dopo la marcatura di superficie con AcM anti IL23R e anti CD4, le cellule sono state fissate con una soluzione contenente formaldeide Fix and PERM (Medium A) per 10 minuti a temperatura ambiente, successivamente lavate e permeabilizzate con Fix and PERM (Medium B) e colorate con l'anticorpo anti IL17 PE o controllo isotipico (PE) per 30 minuti in ghiaccio. Al termine i campioni sono stati lisati con una soluzione a base di cloruro d'ammonio, centrifugati, risospesi in PBS e letti al citofluorimetro.

Come detto, le analisi sono state condotte su un *gate* morfologico linfocitario; è stato poi utilizzato un *gate* immunologico per CD4 per quanto riguarda i TH17 e un *gate* per CD4+CD25^{hi} per quanto riguarda i Treg.

Lo studio delle cellule TH17 ha consentito di individuare tre popolazioni cellulari: cellule CD4+IL23R+, cellule CD4+IL23R+IL17+ e cellule CD4+IL17+. Ogni dato è stato prodotto sia come valore assoluto che come percentuale dei linfociti CD4+.

L'analisi dei Treg ha invece considerato l'unica popolazione cellulare CD4+CD25+FOXP3+ ed i dati sono stati prodotti come valore assoluto, percentuale rispetto al totale dei CD4+ ed MFI di FOXP3.

5. Analisi statistica dei dati

I dati sono rappresentati come media \pm deviazione standard (DS); il confronto tra i gruppi è stato effettuato utilizzando il test t di Student per dati non appaiati o il test di Wilcoxon quando appropriato; per lo studio delle correlazioni lineari sono stati usati il test di Spearman o il test di Pearson quando appropriato. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato come significativo.

Risultati

L'analisi sui linfociti T helper totali CD4 e CD8 non ha mostrato differenze significative tra il gruppo dei pazienti affetti da CSU e il gruppo di controllo (Media \pm DS %CD4: 39.47 \pm 9.52 vs 42.78 \pm 6.74, p=0.33; Media \pm DS %CD8: 30.53 \pm 10.19 vs 31.33 \pm 6.02, p=0.81).

I dati immunofenotipici riguardanti l'espressione di Treg e TH17 nel gruppo di pazienti affetti da CSU sono riportati rispettivamente in tabella 4 e 5:

Paziente	%FOXP3+CD25+CD4+	N.Assoluto FOXP3+CD25+CD4+	MFI FOXP3	UAS
1	3,44	10635	81,1	4
2	1,79	7442	39,42	0
3	1,36	4974	41,9	2
4	1,64	4922	137,26	5
5	ND	ND	ND	4
6	4,97	10636	78,75	4
7	2,6	9232	110,87	4
8	4,01	9750	58,55	6
9	1,81	4436	54,23	2
10	2,88	8760	107,05	5
11	1,88	4226	41,57	5
12	1,37	5416	25,25	5
13	2,39	6082	50,43	2
14	1,75	3930	39,56	3
15	2,56	6408	48,49	4
MEDIA	2,460714286	6918	65,32	
DS	1,06	2449,42	32,99	

Tabella 4: analisi citofluorimetrica dell'espressione dei marcatori Treg. DS: Deviazione Standard, ND: non disponibile.

Pazienti	IL23R+CD4+		IL23R+CD4+IL17+		IL17+CD4+		UAS
	%	N.assoluto	%	N.assoluto	%	N.assoluto	
1	1,65	6154	0,26	970	0,7	2590	4
2	1,52	5926	0,25	970	0,34	1342	0
3	3,96	13674	2,1	7250	18,89	65286	2
4	1,9	3716	1,08	2106	14,03	27486	5
5	3,39	10202	0,43	1304	0,75	2260	4
6	3,08	6616	2,16	4646	51,72	111160	4
7	2,27	7100	1,25	3902	19,26	60262	4
8	3,98	10528	2,48	6560	34,6	91474	6
9	2,59	5588	1,1	2370	5,08	10976	2
10	1,76	5164	1,3	3860	53,64	153020	5
11	4,26	9064	2,4	5096	31,52	67018	5
12	1,4	5932	0,79	3346	12,02	50772	5
13	4,91	8764	2,35	3938	4,58	7694	2
14	2,11	5338	0,93	2354	16,49	41800	3
15	1,67	3939	0,85	1992	33,72	78588	4
MEDIA	2,70	7180,33	1,32	3377,60	19,82	51448,53	
DS	1,15	2746,09	0,79	1927,26	17,68	44936,42	

Tabella 5: analisi citofluorimetrica dell'espressione dei marcatori TH17.
DS: Deviazione Standard.

Per quanto riguarda i linfociti Treg, l'analisi delle cellule FOXP3+CD25+CD4+ circolanti non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra gruppo di pazienti con CSU e controlli sani, né in termini di percentuale né di numero assoluto (Media±DS %FOXP3+CD25+CD4+: 2.46±1.06 vs 2.05±0.83, p=0.31; Media±DS n.assoluto FOXP3+CD25+CD4+: 6918±2449.42 vs 5884±3018.13, p=0.4) (Fig.2); anche il confronto dell'MFI di FOXP3 tra i due gruppi non è risultato significativo (Media±DS 65.32±32.99 vs 54.7±22.97, p=0.36). (Fig.2).

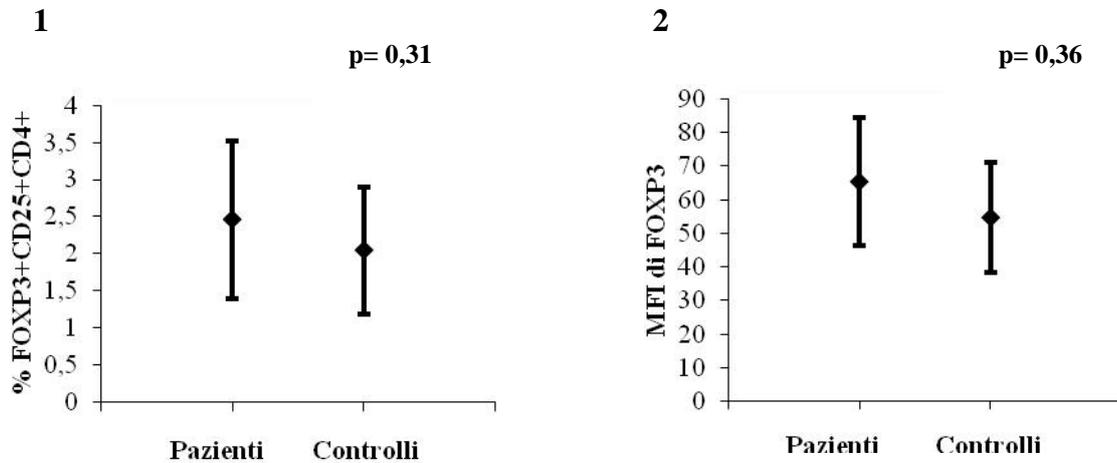


Figura 2: Confronto della % di cellule FOXP3+CD25+CD4+ sul totale dei CD4+ (1) ed MFI di FOXP3(2) tra pazienti e controlli.(media±DS)

Anche il rapporto tra cellule FOXP3+CD25+CD4+ e ciascuna delle tre popolazioni cellulari riferibili ai TH17 non si è dimostrato differente tra pazienti e controlli (Fig.3):

1. % FOXP3+CD25+CD4+ / %IL23R+CD4+: 1.05 ± 0.51 vs 1.13 ± 0.99 , $p=0.82$
2. % FOXP3+CD25+CD4+ / %IL23R+CD4+IL17+: 2.91 ± 3.36 vs 2.81 ± 1.94 , $p=0.92$
3. % FOXP3+CD25+CD4+ / %IL17+CD4+: 0.85 ± 1.79 vs 0.44 ± 0.81 , $p=0.16$

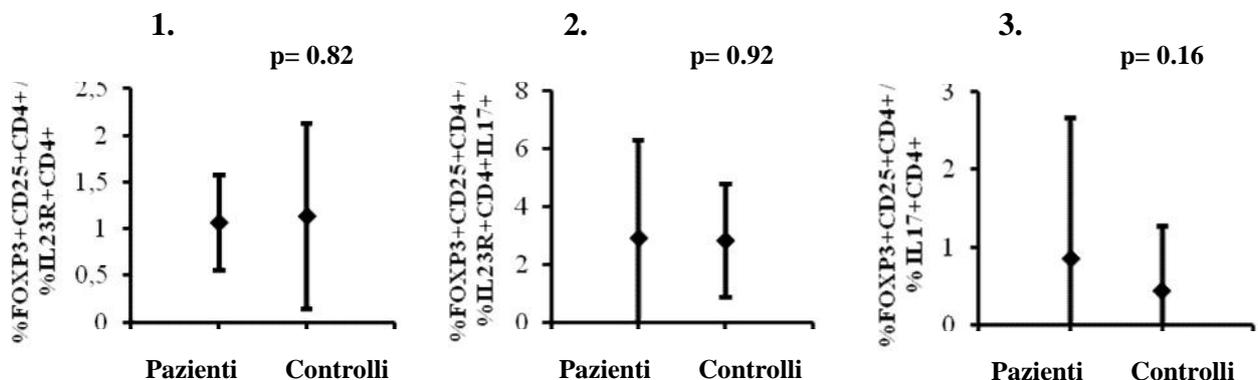


Figura 3: Confronto del rapporto tra % di cellule FOXP3+CD25+CD4+ e, rispettivamente, % di cellule IL23R+CD4+ (1), IL23R+CD4+IL17+ (2) e IL17+CD4+ (3), sul totale dei CD4+, tra pazienti e controlli.(media±DS)

Infine, non è stata evidenziata una correlazione significativa tra la percentuale di cellule FOXP3+CD25+CD4+ e l'attività di malattia espressa come UAS (p=0.10).

L'analisi citofluorimetrica dei linfociti TH17 ha identificato tre gruppi cellulari distinti. (Tab.5) L'analisi delle cellule IL23R+CD4+, IL23R+CD4+IL7+ e IL17+CD4+ non ha dimostrato differenze significative tra pazienti e controlli (Fig.4):

1. %IL23R+CD4+: 2.69 ± 1.14 vs 2.60 ± 1.16 , p=0.85
2. %IL23R+CD4+IL7+: 1.31 ± 0.78 vs 1.01 ± 0.53 , p=0.27
3. %IL17+CD4+: 19.82 ± 17.67 vs 12.05 ± 7.55 , p=0.15

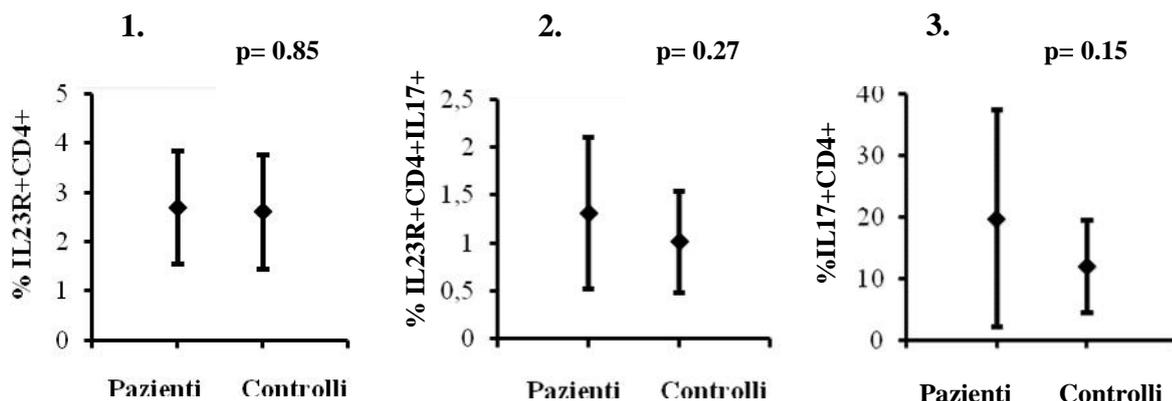


Figura 4: confronto della % di cellule IL23R+CD4+(1), IL23R+CD4+IL7+(2) e IL17+CD4+(3) sul totale dei CD4+ tra pazienti e controlli. (media±DS)

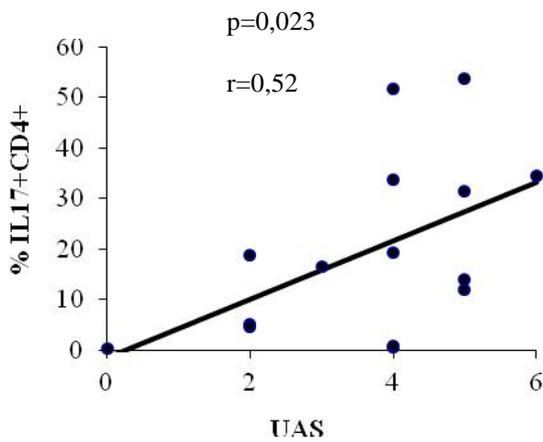
L'analisi eseguita sui linfociti IL17+CD4+ ha dimostrato un rilevante aumento di questa popolazione cellulare nei pazienti rispetto ai controlli, anche se non è stata raggiunta la significatività statistica (fig.4):

% di cellule IL17+CD4+: 19.82 ± 17.67 vs 12.05 ± 7.55 , p=0.15.

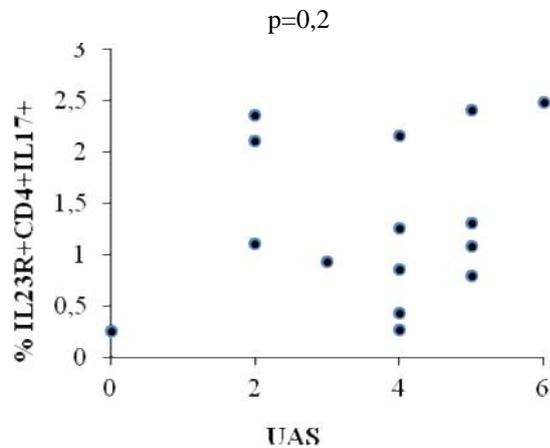
Tale popolazione cellulare dimostra una grande variabilità numerica all'interno del gruppo dei pazienti con CSU, particolarmente marcata rispetto al gruppo di controllo (Fig.4), e tale variabilità risulta fortemente legata al grado di malattia, con una correlazione statisticamente significativa tra *Urticaria Activity Score* e percentuale di cellule

%IL17+CD4+ ($r=0,52$; $p=0,023$) (Fig.5). Le due popolazioni IL23R+CD4+IL17+ e IL23R+CD4+ considerate singolarmente non mostrano invece alcuna correlazione con il grado di malattia (rispettivamente $p=0,20$ e $0,48$) (Fig.5). Coerentemente, non è evidente alcuna correlazione tra le popolazioni IL17+CD4+ e IL23R+CD4+ nei pazienti con CSU ($p= 0,41$) (Fig5)

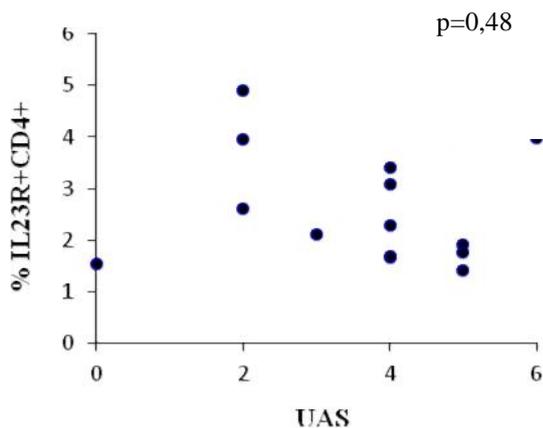
1.



2.



3.



4.

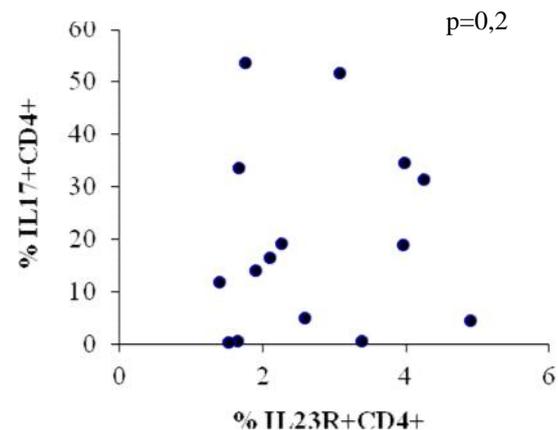


Figura 5: correlazione tra UAS e % di cellule IL17+CD4+(1), IL23R+CD4+IL17+(2) e IL23R+CD4+(3) sul totale dei CD4+ nei pazienti; correlazione tra % di cellule IL17+CD4+ e cellule IL23R+CD4+ nei pazienti(4).

Considerando tutte le cellule IL17+, ovvero unificando le popolazioni IL17+CD4+ e IL23R+CD4+IL17+ in un'unica sola (IL17+CD4+IL23R±) si mantiene la correlazione con la gravità di malattia espressa con l'UAS. (Fig.6) Distinguendo poi, seppur arbitrariamente, tra pazienti con orticaria grave (UAS 4) e lieve (UAS 3) e confrontando tali gruppi con la popolazione di controllo appare evidente che le cellule IL17+CD4+ IL23R± sono presenti in quantità superiore nei pazienti con orticaria grave, sebbene la differenza sia al limite della significatività statistica. (Fig.6)

1. %IL17+CD4+ IL23R± UAS≥4: 26.50±19.54
2. %IL17+CD4+ IL23R± UAS≤3: 10.42±8.48
3. %IL17+CD4+ IL23R± Controlli: 13.07±7.48

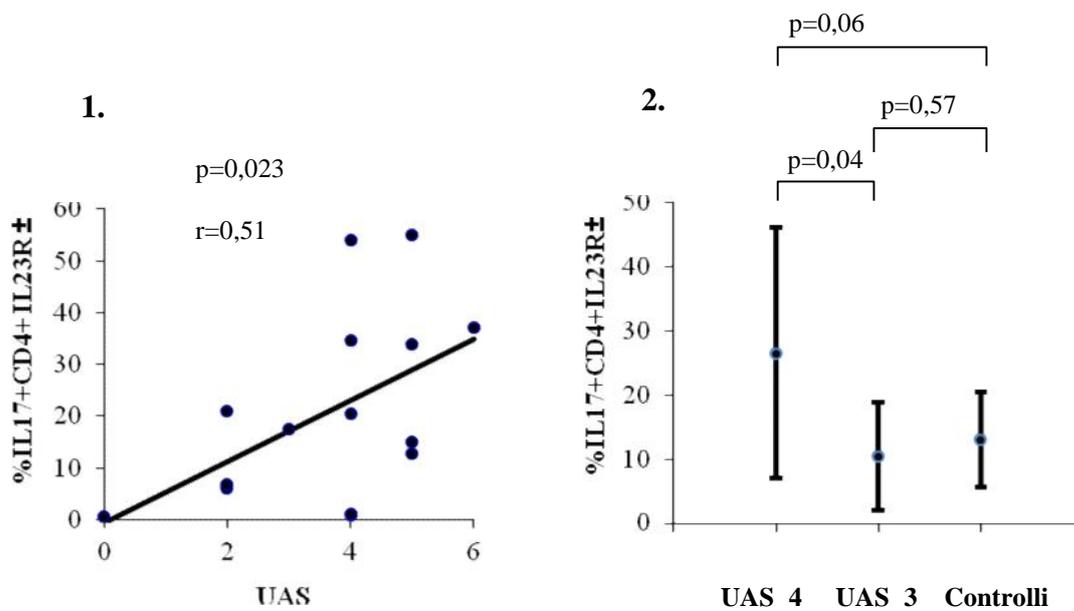


Figura 6: correlazione tra % di cellule IL17+CD4+IL23R± sul totale dei CD4+ e UAS nei pazienti (1); confronto tra % di cellule IL17+CD4+IL23R± sul totale dei CD4+ tra pazienti con orticaria grave (UAS 4), lieve (UAS 3) e controlli (2). (media±DS)

Nessuna delle popolazioni cellulari studiate (FOXP3+CD25+CD4+, IL23R+CD4+, IL23R+CD4+IL17+ e IL17+CD4+) è risultata significativamente associata ad uno specifico esito del test con siero autologo. (Fig.7)

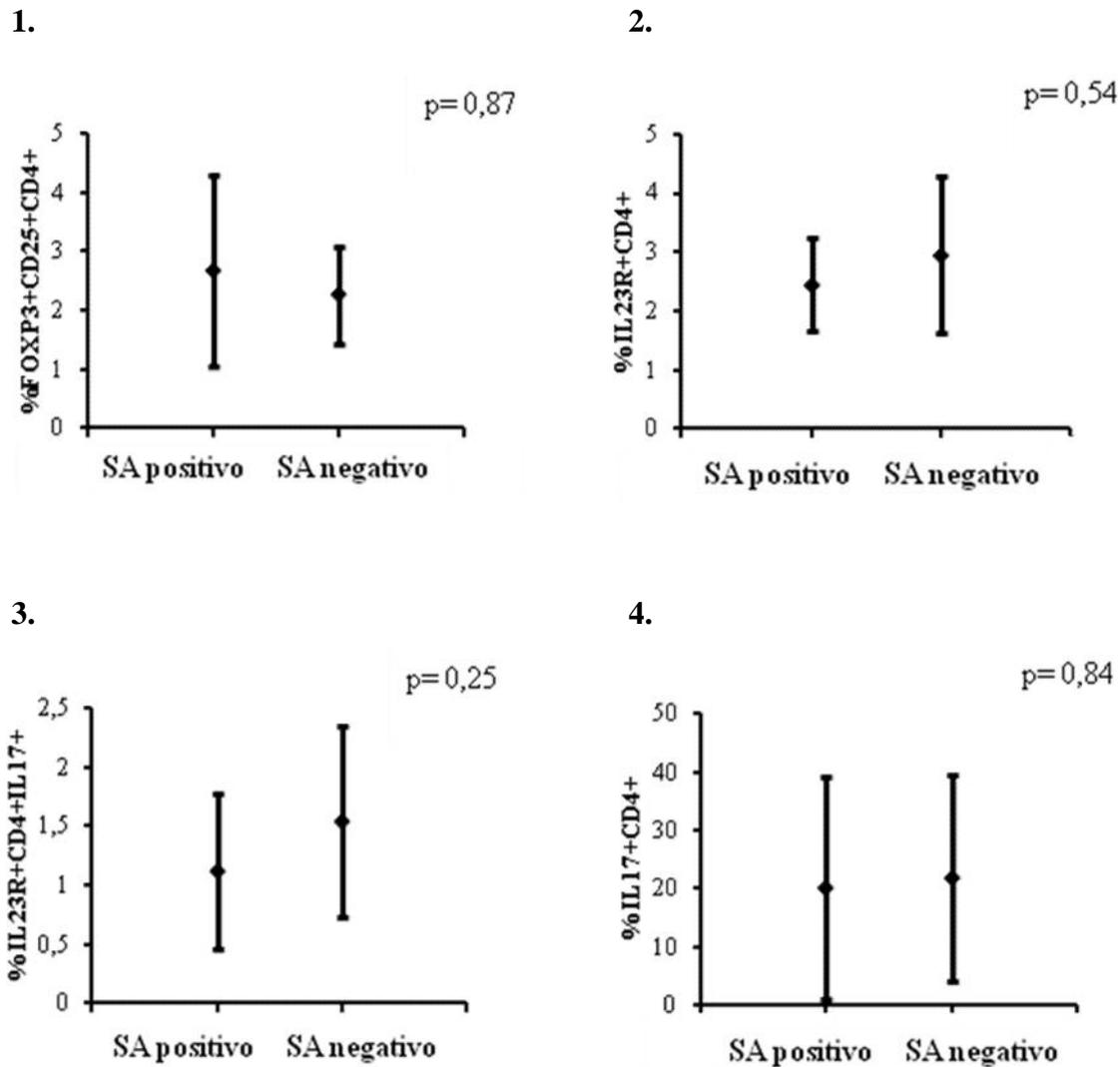


Figura 7: confronto tra i pazienti con test al siero autologo (SA) positivo e negativo in merito alla % di cellule FOXP3+CD25+CD4+(1), IL23R+CD4+(2), IL23R+CD4+IL17+(3) e IL17+CD4+(4) sul totale dei CD4+. (media±DS)

Nessuna correlazione è stata infine identificata tra le popolazioni cellulari studiate e le altre caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti considerate (età, sesso, presenza o meno di angioedema).

Discussione e conclusioni

Quando l'orticaria persiste per più di sei settimane viene definita cronica, e nella grande maggioranza dei casi manca uno stimolo scatenante identificabile, per cui si parla di orticaria cronica spontanea (CSU).⁵ La patogenesi di questa patologia non è ancora stata chiarita: la dimostrazione della reattività cutanea nei riguardi del siero autologo ed il riscontro di anticorpi circolanti anti-IgE ed anti-FcεRIα in grado di degranulare mastociti e basofili in una significativa proporzione di pazienti hanno indotto ad ipotizzare un meccanismo di tipo autoimmunitario.⁶ Gli studi si sono inoltre focalizzati su altri possibili fattori di attivazione di mastociti e basofili, il cui ruolo centrale nella patogenesi è universalmente riconosciuto: sistema del complemento,⁹⁰ cascata della coagulazione,⁹¹ IgE rivolte verso antigeni *self*.⁹⁵ Più recentemente, l'efficacia di Omalizumab ha aperto un nuovo fronte di ricerca, centrato da una parte sulle note azioni biologiche del farmaco, ovvero il sequestro delle IgE circolanti e la down-regulation del FcεRI sulla superficie di mastociti e basofili, e dall'altra sulle caratteristiche dei pazienti che rispondono a tale terapia, in cui la presenza di autoanticorpi funzionali anti-IgE ed anti-FcεRI non sembra determinante.⁹⁶ Recenti dati hanno dimostrato inoltre una potenziale funzione immunomodulatoria dei mastociti, capaci di polarizzare la differenziazione di linfociti T naive in senso TH1 e TH17.¹¹²

Dato che le popolazioni linfocitarie TH17 e Treg, tra loro strettamente interconnesse, rappresentano sottoclassi T helper particolarmente importanti nel controllare la reazione infiammatoria, tanto nella fisiologica risposta alle infezioni che in molti fenomeni autoimmunitari, abbiamo deciso di approfondire la relazione tra queste cellule e la CSU.¹¹⁷ I dati presenti in letteratura al riguardo sono frammentari e discordanti.

In quest'ottica, il nostro studio ha confrontato mediante analisi citofluorimetrica il livello di Treg e TH17 circolanti in 15 pazienti affetti da CSU in fase sintomatica ed in 9 controlli sani, correlando i dati con il grado di attività della malattia.

Per quanto riguarda i linfociti Treg, non sono emerse differenze tra pazienti e controlli, né in termini percentuali, né di numero assoluto, né confrontando l'intensità di espressione di FOXP3 (MFI). Anche il rapporto Treg/TH17 non è risultato differente tra pazienti e controlli, e non è stata individuata alcuna correlazione tra Treg e UAS (Figg 2-3). Questi dati sono in contrasto con i precedenti studi, che avevano mostrato in una serie di pazienti¹⁴³ un incremento delle cellule CD4+CD25^{hi} ed in un'altra serie¹⁴⁴ una riduzione delle cellule CD4+CD25+FOXP3+. Comunque, a parte la già segnalata scarsa rappresentatività dei pazienti considerati in tali studi, dati contraddittori riguardo la proporzione dei Treg circolanti sono emersi anche in patologie autoimmuni come l'artrite reumatoide,¹⁴⁰ e non sono, ad oggi, di facile interpretazione. Nel presente studio non è stata valutata l'attività funzionale, che in alcune patologie autoimmuni è alterata a fronte di un livello plasmatico simile a quella dei controlli sani.^{140,151}

L'analisi dei linfociti TH17 non ha evidenziato differenze significative tra pazienti con CSU e controlli in termini percentuali di cellule IL23R+CD4+, IL23R+CD4+IL7+ e IL17+CD4+; tuttavia si è osservata una grande variabilità delle cellule IL17+CD4+ nei pazienti rispetto al gruppo di controllo e il loro livello correla significativamente con il grado di severità di malattia ($r=0,52$; $p=0,023$) (Figg. 4-5). Al contrario, le cellule contraddistinte dalla positività a IL23R, altro marker specifico dei TH17, non appaiono affatto correlate con la gravità di malattia (Fig. 5), mentre la correlazione si mantiene se si considerano insieme le due popolazioni IL17+ (IL23R+CD4+IL17+ e IL17+CD4+: Fig.6). Il dato è rafforzato dal confronto tra pazienti con orticaria lieve (UAS 3), pazienti con orticaria grave (UAS 4) e controlli, che mostra un netto aumento della popolazione IL17+CD4+IL23R± nei pazienti con orticaria grave nei confronti delle altre due popolazioni, sebbene ai limiti della significatività statistica (Fig. 6).

Per spiegare questi dati, non privi di apparenti contraddizioni, si possono formulare diverse ipotesi. Anzitutto, nonostante i linfociti TH17 siano considerati la principale fonte di IL17 nell'organismo umano¹⁵² e tale citochina caratterizzi la loro funzione secretoria, va tenuto conto della loro notevole plasticità: essi sono in grado di riprogrammare la propria espressione genica se esposti a diversi milieu citochinici. E' descritta in particolare la potenziale conversione dei TH17 verso un fenotipo Treg e

viceversa, fenomeno facilitato dall'analogia degli iniziali step di sviluppo tra questi due sottotipi linfocitari, e che potrebbe essere importante per la regolazione dell'infiammazione dopo la clearance dello stimolo flogistico;^{140,153} inoltre è stata osservata la conversione dei TH17 in cellule TH1-like, IFN secernenti, quando sottoposte a specifici stimoli quale un'alta concentrazione di IL12. Questo meccanismo pare essere implicato in diverse patologie autoimmuni quali artrite reumatoide, malattie infiammatorie croniche intestinali, sclerosi multipla.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ E' stata descritta infine, sebbene in minor dettaglio, una linea linfocitaria TH17/TH2, coesprimente IL17 e IL4.¹⁵⁷ Risulta quindi possibile ipotizzare la presenza di cellule con grado intermedio di differenziazione IL23R-IL17+, che tuttavia nell'attuale studio non abbiamo caratterizzato ulteriormente.

Un'altra possibile spiegazione deriva dall'azione biologica di IL23, che secondo la maggior parte degli autori non è di per sé indispensabile per indirizzare la differenziazione a TH17, ma rappresenta piuttosto un'importante fattore di stabilizzazione ed espansione: i linfociti IL17+CD4+IL23R- potrebbero rappresentare una popolazione TH17 giovane, non ancora stabilizzata e in continuo rinnovamento.¹⁵⁸ Sebbene si tratti di un parallelismo puramente speculativo, tale andamento sarebbe coerente con il comportamento biologico dell'orticaria, che si caratterizza per l'intermittente comparsa delle lesioni pomfoidi, che regrediscono completamente entro 24 ore per ricomparire in altre sedi senza mai lasciare esiti permanenti a livello cutaneo.

L'apparente aumento dei TH17 è coerente con la capacità dei mastociti di indirizzare i linfociti naive verso tale sottoclasse;¹¹² a supporto di ciò, nelle lesioni orticarioidi è presente un'aumentata quantità di cellule CD3+ STAT3+ compatibili con linfociti TH17.¹⁴⁶ Si può quindi ipotizzare che tali cellule attivate rappresentino da una parte la conseguenza dell'attivazione mastocitaria, e dall'altra un loro potenziale fattore di amplificazione: i TH17 infatti sono fonte di numerosi mediatori pro infiammatori, anzitutto IL17, ma anche IL6 e TNF, la cui concentrazione plasmatica è aumentata nella CSU.¹⁰³ I nostri dati sono in netto contrasto con quanto riportato da Lopes e collaboratori, che rilevavano una significativa riduzione dei TH17 nei pazienti con CSU; va però ribadito, come accennato prima, che la maggior

parte dei pazienti coinvolti in tale studio erano sostanzialmente asintomatici, e non era stata eseguita alcuna correlazione con la gravità clinica.¹⁴²

Il livello dei Treg e delle diverse popolazioni riferibili ai TH17 non sembra significativamente diverso tra pazienti positivi e negativi al test al siero autologo (Fig. 7). Le cellule IL17+CD4+IL23R± apparirebbero quindi correlati alla gravità clinica, piuttosto che ad un'ipotetica specifica eziologia, in particolare di natura autoimmune. Il campione di pazienti è però estremamente limitato, con soltanto 5 soggetti con test al siero autologo positivo, e non permette di suffragare alcuna conclusione in merito.

In ogni caso, per quanto limitati dalla bassa numerosità campionaria, i risultati preliminari del nostro studio sembrano evidenziare una relazione tra TH17 e Orticaria Cronica Spontanea, con particolare riferimento alla correlazione fra severità dei sintomi e livelli di cellule IL17+CD4+ circolanti. Se tale dato verrà confermato si potranno caratterizzare ulteriormente i pazienti in relazione alla presenza di autoanticorpi anti-IgE od anti-Fc RI, alla risposta terapeutica ad Omalizumab, a comorbidità autoimmunitarie quali la tiroidite di Hashimoto e ad altri possibili fattori.

Bibliografia

1. Maurer M, Weller K, Bindslev-Jensen C, Gimenez-Arnau A, Bousquet PJ, Bousquet J, Canonica GW, Church MK, Godse KV, Grattan CEH, Greaves MW, Hide M, Kalogeromitros D, Kaplan AP, Saini SS, Zhu XJ, Zuberbier T: Unmet clinical needs in chronic spontaneous urticaria. A GA2LEN task force report. *Allergy* 2011; 66: 317–330.
2. Cancian M, Bortolati M, Fagiolo U: Urticaria e angioedema. *Ann Ital Med Int* 2003; 18: 16-23
3. Powell RJ, Du Toit GL, Siddique N, Leech SC, Dixon TA, Clark AT, Mirakian R, Walker SM, Huber PA, Nasser SM, British SCSUety for Allergy and Clinical Immunology (BSACI): BSACI guidelines for the management of chronic urticaria and angio-oedema. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 631-50
4. Grattan CE, Humphreys F, British Association of Dermatologists Therapy Guidelines and Audit Subcommittee: Guidelines for evaluation and management of urticaria in adults and children. *Br J Dermatol* 2007; 157: 1116-23
5. Zuberbier T, Aberer W, Asero R, Bindslev-Jensen C, Brzoza Z, Canonica GW, Church MK, Ensina LF, Giménez-Arnau A, Godse K, Gonçalo M, Grattan C, Hebert J, Hide M, Kaplan A, Kapp A, Abdul Latiff AH, Mathelier-Fusade P, Metz M, Nast A, Saini SS, Sánchez-Borges M, Schmid-Grendelmeier P, Simons FE, Staubach P, Sussman G, Toubi E, Vena GA, Wedi B, Zhu XJ, Maurer M; European Academy of Allergy and Clinical Immunology; Global Allergy and Asthma European Network; European Dermatology Forum; World Allergy Organization: The EAACI/GA(2)LEN/EDF/WAO Guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria: the 2013 revision and update. *Allergy*. 2014 Jul;69(7):868-87

6. Supramaniam G, Warner JO: Artificial food additive intolerance in patients with angio-oedema and urticaria. *Lancet* 1986; 8512: 907-9
7. Zuberbier T, Czarnetzki BM: High response to additive-free diet in chronic urticaria. *Br J Dermatol* 1996; 134: 1159
8. Ehlers I, Niggemann B, Binder C, Zuberbier T: Role of nonallergic hypersensitivity reactions in children with chronic urticaria. *Allergy* 1998; 53: 1074-7
9. Gibson A, Claucy R: Management of chronic urticaria by the identification and the exclusion of dietary factors. *Clin Allergy* 1998; 10: 699-704
10. Setticone RA, Constantine HP, Setticone GA: Aspirin intolerance and recurrent urticaria in normal adults and children. *Allergy* 1980; 35: 149-54
11. Grattan CEH: Aspirin sensitivity and urticaria. *Clin Exp Dermatol* 2003; 28: 123-7
12. Asero R: Intolerance to nonsteroidal anti-inflammatory drugs may precede by years the onset of chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 1095-8
13. Stevenson DD: Aspirin and NSAID sensitivity. *Immunol Allergy Clin N Am* 2004; 24: 491-505
14. Warin RP: The effect of aspirin in chronic urticaria. *Br J Dermatol* 1960; 72: 350-1

15. Grzelewska-Rzymowska M, Szmidt M, Rozniecki J: Urticaria/angioedema type sensitivity to aspirin and other non steroidal anti-inflammatory drugs: diagnostic value of anamnesis and challenge test with acetylsalicylic acid. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1992; 2: 191-5
16. Kaplan AP, Greaves M: Pathogenesis of chronic urticaria. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 777-87
17. O'Donnell BF, Lawlor F, Simpson J, Morgan M, Greaves MW: The impact of chronic urticaria on the quality of life. *Br J Dermatol* 1997; 136: 197-201
18. Pasaoglu G, Bavbek S, Tugcu H, Abadoglu O, Misirligil Z: Psychological status of patients with chronic urticaria. *J Dermatol.* 2006; 33: 765-71
19. Ozkan M, Oflaz SB, Kocaman N, Ozseker F, Gelincik A, Büyüköztürk S, Ozkan S, Colakolu B: Psychiatric morbidity and quality of life in patients with chronic idiopathic urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007; 99: 29-33
20. Leznoff A, Josse RG, Denburg J, Dolovich J: Association of chronic urticaria and angioedema with thyroid autoimmunity. *Arch Dermatol* 1983; 119: 636-40
21. Leznoff A, Sussman GL: Syndrome of idiopathic chronic urticaria and angioedema with thyroid autoimmunity: a study of 90 patients. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 66-71
22. Turktas I, Gokcora N, Demirsoy S, Cakir N, Onal E: The association of chronic urticarial and angioedema with autoimmune thyroiditis. *Int J Dermatol* 1997; 36:187-90

23. Toubi E, Kessel A, Avshovich N, Bamberger E, Sabo E, Nusem D, Panasoff J: Clinical and laboratory parameters in predicting chronic urticaria duration: a prospective study of 139 patients. *Allergy* 2004; 59: 869-73
24. Verneuil L, Leconte C, Ballet JJ, Coffin C, Laroche D, Izard JP, Reznik Y, Leroy D: Association between chronic urticaria and thyroid autoimmunity: a prospective study involving 99 patients. *Dermatology* 2004; 208: 98-103
25. Doutre MS: Chronic urticaria and thyroid auto-immunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 2006; 30: 31-7
26. Tharp MD: Chronic urticaria: pathophysiology and treatment approaches. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: S325-30
27. Elias J, Boss E, Kaplan A: Studies of the cellular infiltrate of chronic idiopathic urticaria: prominence of T-lymphocytes, monocytes, and mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 914-8
28. Nettis E, Dambra P, Loria MP, Cenci L, Vena GA, Ferrannini A, Tursi A: Mast-cell phenotype in urticaria. *Allergy* 2001; 56: 915-9
29. Smith CH, Kepley C, Schwartz LB, Lee TH: Mast cell number and phenotype in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 360-4
30. Natbony S, Phillips M, Elias J, Godfrey H, Kaplan A: Histologic studies of chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 71: 177-83

31. Haas N, Toppe E, Henz B. Microscopic morphology of different types of urticaria. *Arch Dermatol* 1998; 134: 41–6
32. Sabroe R, Poon E, Orchard GE, Lane D, Francis DM, Barr RM, Black MM, Black AK, Greaves MW: Cutaneous inflammatory cell infiltrate in chronic idiopathic urticaria: comparison of patients with and without anti-IgE or anti-IgG autoantibodies. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 484–93
33. Peters M, Schroeter A, Kephart G, Gleich G: Localization of eosinophil granule major basic protein in chronic urticaria. *J Invest Dermatol* 1983; 81: 39–43
34. Ying S, Robinson DS, Meng Q, Barata LT, McEuen AR, Buckley MG, Walls AF, Askenase PW, Kay AB: C-C chemokines in allergen induced late-phase cutaneous responses in atopic subjects: association of eotaxin with early 6-hour eosinophils, and of eotaxin-2 and monocyte chemoattractant protein-4 with the later 24-hour tissue eosinophilia, and relationship to basophils and other C-C chemokines (monocyte chemoattractant protein-3 and RANTES). *J Immunol* 1999; 163: 3976–84
35. Grattan CE, Wallington TB, Warin RP, Kennedy CT, Bradfield JW: A serological mediator in chronic idiopathic urticaria--a clinical, immunological and histological evaluation. *Br J Dermatol* 1986; 114: 583-90
36. Grattan CE, Francis DM, Hide M, Greaves MW : Detection of circulating histamine releasing autoantibodies with functional properties of anti-IgE in chronic urticaria. *Clin Exp Allergy* 1991; 21: 695-704

37. Niimi N, Francis DM, Kermani F, O'Donnell BF, Hide M, Kobza-Black A, Winkelmann RK, Greaves MW, Barr RM: Dermal mast cell activation by autoantibodies against the high affinity IgE receptor in chronic urticaria. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 1001-6

38. Fagiolo U, Cancian M, Bertollo L, Peserico A, Amadori A: Inhibitory effect of heparin on skin reactivity to autologous serum in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 1143-7

39. Sabroe RA, Grattan CEH, Francis DM, Barr RM, Kobza Black A, Greaves MW: The autologous serum skin test: a screening for autoantibodies in chronic idiopathic urticaria. *BrJ Dermatol* 1999; 140: 446-52

40. Greaves MW: Pathophysiology of chronic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;127:3-9

41. Grattan CEH: Autoimmune urticaria. *Immunol Allergy Clin N Am* 2004; 24: 163-81

42. Kozel MMA, Sabroe RA: Chronic urticaria. *Drugs* 2004; 64: 2515-36

43. Kaplan AP: Chronic urticaria: pathogenesis and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 465-7

44. Gruber BL, Baeza ML, Marchese MJ, Agnello V, Kaplan AP: Prevalence and functional role of anti-IgE autoantibodies in urticarial syndromes. *J Invest Dermatol* 1988; 90: 213-7

45. Fagiolo U, Quinti I, Ossi E, Scala E, Cancian M, Carmini D, Paganelli R: Auto-anti-IgE antibodies and immunocomplexes in chronic urticaria-angioedema syndrome with and without joint symptoms. *Ital J Allergy Clin Immunol* 1991; 1: 147-51
46. Hide M, Francis DM, Grattan CE, Hakimi J, Kochan JP, Greaves MW: Autoantibodies against the high-affinity IgE receptor as a cause of histamine release in chronic urticaria. *N Engl J Med* 1993; 328: 1599-604
47. Fiebiger E, Maurer D, Holub H, Reininger B, Hartmann G, Woisetschläger M, Kinet JP, Stingl G: Serum IgG autoantibodies directed against the alpha chain of Fc epsilon RI: a selective marker and pathogenetic factor for a distinct subset of chronic urticaria patients? *J Clin Invest* 1995; 96: 2606-12
48. Bieber T: FcεRI on antigen presenting cells. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 773-7
49. Kinet JP: The high affinity IgE receptor (FcεRI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 931-72
50. Fiebiger E, Hammerschmid F, Stingl G, Maurer D: Anti-FcεRIα autoantibodies in autoimmune-mediated disorders. *J Clin Invest* 1998; 101: 243-51
51. Ferrer M, Kinét JP, Kaplan AP: Comparative studies of functional and binding assays for IgG anti-Fc(epsilon)RIalpha (alpha-subunit) in chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 672-6
52. Ferrer M, Nakazawa K, Kaplan AP: Complement dependence of histamine release in chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 169-72

53. Zuberbier T, Henz BM, Fiebiger E, Maurer D, Stingl G: Anti-FcεRIα serum antibodies in different subtypes of urticaria. *Allergy* 2000; 55: 951-4
54. Ferrer M, Luquin E, Sanchez-Ibarrola A, Moreno C, Sanz ML, Kaplan AP: Secretion of cytokines, histamine and leukotrienes in chronic urticaria. *Int Arch Allergy Clin Immunol* 2002; 129: 254-60
55. Kikuchi Y, Kaplan AP: A role for C5a in augmenting IgG-dependent histamine release from basophils in chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 114-8
56. Asero R, Lorini M, Chong SU, Zuberbier T, Tedeschi A: Assessment of histamine-releasing activity of sera from patients with chronic urticaria showing positive autologous skin test on human basophils and mast cells. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1111-14
57. Grattan CEH, Dawn G, Gibbs S, Francis DM: Blood basophil number in chronic ordinary urticaria and healthy controls: diurnal variation, influence of loratadine and prednisolone and relationship to disease activity. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 337-41
58. Lapolla W et al: Clinical utility of testing for autoimmunity in chronic idiopathic urticaria. *J Am Acad Dermatol* 2012; volume 66, number 3.
59. Cancian M, Bendo R, Bertollo L, Tomsic M, Paganelli R, Peserico A, Fagiolo U: Clinical, biochemical and immunologic findings in chronic urticaria with skin reactivity to autologous serum. *Ital J Allergol Immunol* 1998; 8: 518-22
60. O'Donnell BF, O'Neill CM, Francis DM, Niimi N, Barr RM, Barlow RJ, Kobza Black A, Welsh KI, Greaves MW: Human leucocyte antigen class II associations in chronic idiopathic urticaria. *Br J Dermatol* 1999; 140: 853-8

61. O'Donnell BF, Barr RM, Kobza Black A, Francis DM, Kermani F, Niimi N, Barlow RJ, Winkelmann RK, Greaves MW: Intravenous immunoglobulin in autoimmune chronic urticaria. *Br J Dermatol* 1998; 138: 101-6
62. Kroiss M, Vogt T, Landthaler M, Stolz W: The effectiveness of low-dose intravenous immunoglobulin in chronic urticaria. *Acta Derm Venereol* 2000; 80: 225
63. Grattan CEH, Francis DM, Slater NGP, Barlow RJ, Greaves MW: Plasmapheresis for severe unremitting chronic urticaria. *Lancet* 1992; 339: 1078-80
64. Barlow RJ, Kobza Black A, Greaves MW: Treatment of severe, chronic urticaria with cyclosporin A. *Eur J Dermatol* 1993; 3: 273-5
65. Toubi E, Blant A, Kessel A, Golan TD: Low-dose cyclosporin A in the treatment of severe chronic idiopathic urticaria. *Allergy* 1997; 52: 312-16
66. Grattan CEH, O'Donnell BF, Francis DM, Niimi N, Barlow RJ, Seed PT, Kobza Black A, Greaves MW: Randomized double-blind study of cyclosporin in chronic idiopathic urticaria. *Br J Dermatol* 2000; 143: 365-72
67. Bernstein JA, Garriamone SM, Lower GE: Successful treatment of autoimmune chronic idiopathic urticaria with intravenous cyclophosphamide. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89: 212-14
68. Puech-Plottova I, Michel J, Rouchouse B, Perrot J, Dzvinga C, Cambazard F: Solar urticaria: one case treated by intravenous immunoglobulin. *Ann Dermatol Venereol* 2000; 127: 831-5

69. Sahu A, Pangburn MK: Identification of multiple sites of interaction between heparin and the complement system. *Mol Immunol* 1993; 30: 679-84
70. Kalpaklioglu AF, Demirel YS, Saryal S, Misirligil Z: Effect of pretreatment with heparin on pulmonary and cutaneous response. *J Asthma* 1997; 34: 337-43
71. Tyrrell DJ, Horne AP, Holme KR, Preuss JM, Page CP: Heparin in inflammation: potential therapeutic applications beyond anticoagulation. *Adv Pharmacol* 1999; 46: 151-208
72. Cancian M, Bendo R, Caltarossa E, Peserico A, Fagiolo U: Sulodexide in the treatment of chronic idiopathic urticaria. *It J Allergy Clin Immunol* 2000; 10: S184
73. Konstantinou GN, Asero R, Maurer M, Sabroe RA, Schmid-Grendelmeier P, Grattan CE: EAACI/GALEN task force consensus report: the autologous serum skin test in urticaria. *Allergy* 2009; 64(9):1256-68
74. Soundararajan S, Kikuchi Y, Joseph K, Kaplan AP: Functional assessment of pathogenic IgG subclasses in chronic autoimmune urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 815-21
75. Grattan CEH, Boon AP, Eady RAJ, Winkelmann RK: The pathology of the autologous serum skin test response in chronic urticaria resembles IgE-mediated late-phase reactions. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; 93: 198-204
76. Barlow RJ, Ross EL, MacDonald DM, Kobza Black A, Greaves MW: Mast cells and T lymphocytes in chronic urticaria. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 317-22

77. Bossi F, Frossi B, Radillo O, Cugno M, Tedeschi A, Riboldi P, Asero R, Tedesco F, Pucillo C: Mast cell are critically involved in serum-mediated vascular leakage in chronic urticarial beyond high-affinity Ige receptor stimulation. *Allergy* 2011;66:1538-1545.
78. Paganelli R, Fagiolo U, Cancian M, Scala E: Intestinal permeability in patients with chronic urticaria angioedema with and without arthralgia. *Annals Allergy* 1991; 66:181-4
79. Buhner S, Reese I, Kuehl F, Lochs H, Zuberbier T: Pseudoallergic reactions in chronic urticaria are associated with altered gastroduodenal permeability. *Allergy* 2004; 59: 1119-23
80. Pfrommer C, Bastl R, Vieths S, Ehlers I, Henz BM, Zuberbier T: Characterization of naturally occurring pseudoallergens causing chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 367
81. Zuberbier T, Chantraine-Hess S, Hartmann K, Czarnetzki BM: Pseudoallergen free diet in the treatment of chronic urticaria - prospective study. *Acta Derm Venereol* 1995; 75: 484-7
82. Zuberbier T: Role of allergens and pseudoallergens in urticaria. *J Invest Dermatol symp Proc* 2001; 6: 132-4
83. Chong SU, Worm M, Zuberbier T: Role of adverse reactions to food in urticaria and exercise-induced anaphylaxis. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129: 19-26
84. Asero R, Tedeschi A, Lorini M: Autoreactivity is highly prevalent in patients with multiple intolerance to NSAIDs. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 88: 468-72

85. Cancian M, Bendo R, Ossi E, Realdi G: Skin reactivity to autologous serum and safety of COX-2 inhibitors in NSAID-intolerant patients with urticaria and/or angioedema. Abstract Book World Allergy Congress, Bangkok 2007; n. 58
86. Fagiolo U, Kricek F, Ruf C, Peserico A, Amadori A, Cancian M: Effects of complement inactivation and IgG depletion on skin reactivity to autologous serum in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 567-72
87. Horn MP, Gerster T, Ochensberger B, Derer T, Kricek F, Jouvin MH, Kinet JP, Tschernig T, Vogel M, Stadler BM, Miescher SM: Human anti-FcεRIα autoantibodies isolated from healthy donors cross-react with tetanus toxoid. *Eur J Immunol* 1999; 29: 1139-48
88. Pachlopnik JM, Horn MP, Fux M, Dahinden M, Mandallaz M, Schneeberger D, Baldi L, Vogel M, Stadler BM, Miescher SM: Natural anti-FcεRIα autoantibodies may interfere with diagnostic tests for autoimmune urticaria. *J Autoimmunity* 2004; 22: 43-51
89. Auyeung P, Mittag D, Hodgkin PD, Harrison LC. Autoreactive T cells in chronic spontaneous urticaria target the IgE Fc receptor I subunit. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 138(3):761-768
90. Cancian M: Il processo infiammatorio. In: Trattato di Medicina Interna. Crepaldi G and Baritussio A eds, Piccin Editore Publ, Padova, 2003, pp. 4274-4311
91. Asero R, Tedeschi A, Riboldi P, Cugno M: Plasma of patients with chronic urticaria shows signs of thrombin generation, and its intradermal injection causes wheal-and-flare reactions much more frequently than autologous serum. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 1113-7

92. Asero R, Tedeschi A, Riboldi P, Griffini S, Bonanni E, Cugno M: Severe chronic urticaria is associated with elevated plasma levels of D-dimer. *Allergy* 2008; 63: 176-80
93. Asero R, Tedeschi A, Coppola R, Griffini S, Paparella P, Riboldi P, Marzano AV, Fanoni D, Cugno M: Activation of the tissue factor pathway of blood coagulation in patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 705-10
94. Asero R, Cugno M, Tedeschi A: Activation of blood coagulation in plasma from chronic urticaria patients with negative autologous plasma skin test. *JEADV* 2011, 25, 201-205.
95. Altrichter S, Peter HJ, Pisarevskaja D, Metz M, Martus P, Maurer M. IgE mediated autoallergy against thyroid peroxidase--a novel pathomechanism of chronic spontaneous urticaria? *PLoS One*. 2011 12;6(4): e14794
96. Kaplan AP, Giménez-Arnau AM, Saini SS. Mechanisms of action that contribute to efficacy of omalizumab in chronic spontaneous urticaria. *Allergy*. 2017 Apr;72(4):519-533.
- 97 Saini S, Rosen KE, Hsieh HJ, Wong DA, Conner E, Kaplan A, Spector S, Maurer M.: A randomized, placebo-controlled, dose-ranging study of single-dose omalizumab in patients with H1-antihistamine-refractory chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Sep;128(3):567-73
98. Maurer M, Rosén K, Hsieh HJ, Saini S, Grattan C, Giménez-Arnau A, Agarwal S, Doyle R, Canvin J, Kaplan A, Casale T.: Omalizumab for the treatment of chronic idiopathic or spontaneous urticaria. *N Engl J Med*. 2013 Mar 7;368(10):924-35.

99. Kaplan A, Ledford D, Ashby M, Canvin J, Zazzali JL, Conner E, Veith J, Kamath N, Staubach P, Jakob T, Stirling RG, Kuna P, Berger W, Maurer M, Rosén K.: Omalizumab in patients with symptomatic chronic idiopathic/spontaneous urticaria despite standard combination therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Jul;132(1):101-9.
100. Zhao ZT, Ji CM, Yu WJ, Meng L, Hawro T, Wei JF, Maurer M. Omalizumab for the treatment of chronic spontaneous urticaria: A meta-analysis of randomized clinical trials. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Jun;137(6):1742-1750
- 101 Shields RL, Whether WR, Zioncheck K, O'Connell L, Fendly B, Presta LG, Thomas D, Saban R, Jardieu P. Inhibition of allergic reactions with antibodies to IgE. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995 May-Jun;107(1-3):308-12
102. Holgate ST, Djukanovi R, Casale T, Bousquet J. Anti-immunoglobulin E treatment with omalizumab in allergic diseases: an update on anti-inflammatory activity and clinical efficacy. *Clin Exp Allergy*. 2005 Apr;35(4):408-16
103. Kolkhir P, André F, Church MK, Maurer M, Metz M.: Potential blood biomarkers in chronic spontaneous urticaria. *Clin Exp Allergy*. 2017 Jan;47(1):19-36
104. MacGlashan DW Jr, Bochner BS, Adelman DC, Jardieu PM, Togias A, McKenzie-White J, Sterbinsky SA, Hamilton RG, Lichtenstein LM. Down-regulation of Fc(epsilon)RI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *J Immunol*. 1997 Feb 1;158(3):1438-45.
105. Metz M, Staubach P, Bauer A, Brehler R, Gericke J, Kangas M, Ashton-Chess J, Jarvis P, Georgiou P, Canvin J, Hillenbrand R, Erpenbeck VJ, Maurer M. Clinical efficacy of omalizumab in chronic spontaneous urticaria is associated with a reduction of Fc RI-positive cells in the skin. *Theranostics*. 2017 Mar 6;7(5):1266-1276

106. Deza G, Bertolín-Colilla M, Pujol RM, Curto-Barredo L, Soto D, García M, Hernández P, Gimeno R, Giménez-Arnau AM. Basophil Fc RI Expression in Chronic Spontaneous Urticaria: A Potential Immunological Predictor of Response to Omalizumab Therapy. *Acta Derm Venereol.* 2017 Jun 9;97(6):698-704

107. Gericke J, Metz M, Ohanyan T, Weller K, Altrichter S, Skov PS, Falkencrone S, Brand J, Kromminga A, Hawro T, Church MK, Maurer M.: Serum autoreactivity predicts time to response to omalizumab therapy in chronic spontaneous urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Mar;139(3):1059-1061

108. Palacios T, Stillman L, Borish L, Lawrence M. Lack of basophil CD203c-upregulating activity as an immunological marker to predict response to treatment with omalizumab in patients with symptomatic chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2016 May-Jun;4(3):529-30

109. MacGlashan DW Jr, Savage JH, Wood RA, Saini SS. Suppression of the basophil response to allergen during treatment with omalizumab is dependent on 2 competing factors. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Nov;130(5):1130-1135

110. Cardamone C, Parente R, Feo GD, Triggiani M. Mast cells as effector cells of innate immunity and regulators of adaptive immunity. *Immunol Lett.* 2016 Oct;178:10-4.

111. Borriello F, Granata F, Varricchi G, Genovese A, Triggiani M, Marone G. Immunopharmacological modulation of mast cells. *Curr Opin Pharmacol.* 2014 Aug;17:45-57.

112. Dudeck A, Suender CA, Kostka SL, von Stebut E, Maurer M: Mast cells promote Th1 and TH17 response by modulating dendritic cell maturation and function. *European Journal of Immunology* 2011, 41(7):1883-1893

113. C.B. Schmidt-Weber, M. Akdis, C.A. Akdis. TH17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:247-54
114. Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005; 6:1133-41
115. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005; 6:1123-32
116. Waite JC, Skokos D. TH17 response and inflammatory autoimmune diseases. *Int J Inflam*. 2012;2012:819467
117. Fasching P, Stradner M, Graninger W, Dejaco C, Fessler J. Therapeutic Potential of Targeting the TH17/Treg Axis in Autoimmune Disorders. *Molecules*. 2017 Jan 14;22(1)
118. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med*. 2008; 14:275-81
119. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008; 28:454-67
120. Hoe E, Anderson J, Nathanielsz J, Toh ZQ, Marimla R, Balloch A, Licciardi PV. The contrasting roles of TH17 immunity in human health and disease. *Microbiol Immunol*. 2017 Feb;61(2):49-56

121. Chung DR, Kasper DL, Panzo RJ, et al. CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J Immunol* 2003; 170:1958-63
122. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, et al. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 2000; 165:6107-15
123. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol* 2007; 8:369-77
124. Huang W, Na L, Fidel PL, et al. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J Infect Dis* 2004; 190:624-31
125. Mogensen TH. Primary Immunodeficiencies with Elevated IgE. *Int Rev Immunol*. 2016;35(1):39-56.
126. Murdaca G, Colombo BM, Puppo F: The role of TH17 lymphocytes in the autoimmune and chronic inflammatory diseases. *Intern Emerg Med* 2011; 6:487–495
127. Peck A, Mellins ED: Breaking old paradigms: TH17 cells in autoimmune arthritis. *Clin Immunol* 2009; 132(3):295–304
128. Nalbandian A, Crispin JC, Tsokos GC: Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. *Clin Exp Immunol* (2009) 157(2):209–215] + [Zhang Z, Kyttaris VC, Tsokos GC: The role of IL-23/IL-17axis in lupus nephritis. *J Immunol* 2009; 183(5):3160316–3160319

129. Bennett JL, Stüve O: Update on inflammation, neurodegeneration, and immunoregulation in multiple sclerosis: therapeutic implications. *Clin Neuropharmacol* 2009; 32(3):121–132
130. Brand S: Crohn's disease: Th1, TH17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate TH17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 2009; 58(8): 1152–1167
131. Han L, Yang J, Wang X, Li D, Lv L, Li B. TH17 cells in autoimmune diseases. *Front Med.* 2015 Mar;9(1):10-9.
132. Ciprandi G, Filaci G, Battaglia F, Fenoglio D: Peripheral Th-17 cells in allergic rhinitis: new evidence. *Int Immunopharmacol* 2010;10(2):226–229
133. Lajoie S, Lewkowich IP, Suzuki Y, Clark JR, Sproles AA, Dienger K et al: Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. *Nat Immunol* 2010;11(10):928–935
134. Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol.* 2003 Dec 15;171(12):6323-7
135. Sasaki N, Yamashita T, Takeda M, Hirata K. Regulatory T cells in atherogenesis. *J Atheroscler Thromb.* 2012;19(6):503-15
136. Gagliani N, Amezcu Vesely MC, Iseppon A, Brockmann L, Xu H, Palm NW, de Zoete MR, Licona-Limón P, Paiva RS, Ching T, Weaver C, Zi X, Pan X, Fan R, Garmire LX, Cotton MJ, Drier Y, Bernstein B, Geginat J, Stockinger B, Esplugues E, Huber S, Flavell RA. TH17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature.* 2015 Jul 9;523(7559):221-5

137. Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol.* 2008 Sep;29(9):429-35.

138. Buckner JH: Mechanism of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(12):849–859

139. Diller ML, Kudchadkar RR, Delman KA, Lawson DH, Ford ML. Balancing Inflammation: The Link between TH17 and Regulatory T Cells. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:6309219.

140. Noack M, Miossec P. TH17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev.* 2014 Jun;13(6):668-77.

141. Yadav M, Stephan S, Bluestone JA. Peripherally induced tregs - role in immune homeostasis and autoimmunity. *Front Immunol.* 2013 Aug 7;4:232.

142. Lee KY, Mukasa R, Hatton RD, Weaver CT: Developmental plasticity of TH17 and Treg cells. *Current Opinion in Immunology* 2009; 21:274-280

143. W.C. Chen et al: Defective function of circulating CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells in patients with chronic ordinary urticaria. *Journal of dermatological science* 2008;51, 121-130

144. R.S. Sun et al. Detection of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in peripheral blood of patients with chronic autoimmune urticaria. *Australasian Journal of Dermatology* 2011;52, e15-e18

145. Lopes A, Machado D, Pedreiro S, Henriques A, Silva I, Tavares B, Inácio MJ, Chieira C, Martinho A, Pais ML, Pereira C, Paiva A. Different frequencies of Tc17/Tc1 and TH17/Th1 cells in chronic spontaneous urticaria. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161(2):155-62.
146. Moy AP, Murali M, Nazarian RM. Identification of a Th2- and TH17-skewed immune phenotype in chronic urticaria with Th22 reduction dependent on autoimmunity and thyroid disease markers. *J Cutan Pathol*. 2016 Apr;43(4):372-8
147. Chandrashekar L, Rajappa M, Munisamy M, Ananthanarayanan PH, Thappa DM, Arumugam B. 25-Hydroxy vitamin D levels in chronic urticaria and its correlation with disease severity from a tertiary care centre in South India. *Clin Chem Lab Med*. 2014 Jun;52(6):e115-8
148. Atwa MA, Emara AS, Youssef N, Bayoumy NM. Serum concentration of IL-17, IL-23 and TNF- α among patients with chronic spontaneous urticaria: association with disease activity and autologous serum skin test. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014 Apr;28(4):469-74.
149. Grzanka A, Damasiewicz-Bodzek A, Kasperska-Zajac A. The relationship between circulating concentrations of interleukin 17 and C reactive protein in chronic spontaneous urticaria. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2017 May 10;13:25
150. L.C. dos Santos et al. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and imbalanced regulatory T-cell cytokines production in chronic idiopathic urticaria. *International immunopharmacology* 2008; 1433-1440
151. Valencia X, Lipsky PE. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007 Nov;3(11):619-26

152. Song X, Gao H, Qian Y. Th17 differentiation and their pro-inflammation function. *Adv Exp Med Biol.* 2014;841:99-151.
153. Du R, Zhao H, Yan F, Li H. IL-17+Foxp3+ T cells: an intermediate differentiation stage between Th17 cells and regulatory T cells. *J Leukoc Biol.* 2014 Jul;96(1):39-48.
154. Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Jan;1183:211-21.
155. Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Rossi MC, Querci V, Mazzoni A, Cimaz R, De Palma R, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Cosmi L, Annunziato F. Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells. *Eur J Immunol.* 2012 Dec;42(12):3180-8
156. Harbour SN, Maynard CL, Zindl CL, Schoeb TR, Weaver CT. Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Jun 2;112(22):7061-6
157. 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 Jan;125(1):222-30
158. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, McClanahan TK, O'Shea JJ, Cua DJ. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol.* 2009 Mar;10(3):314-24.