



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA

Curriculum TECNOLOGIE BIOLOGICHE

***RUOLO DEL FATTORE ATTIVANTE LE PIASTRINE
(PAF) NELL'ANAFILASSI***

***THE ROLE OF PLATELET-ACTIVATING FACTOR
(PAF) IN ANAPHYLAXIS***

Tesi di Laurea Magistrale di:

DENISE DAMIANI

Denise Damiani

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa

ARIANNA VIGNINI

Arianna Vignini

Correlatore:

Chiar.ma Prof.ssa

MARIA BEATRICE BILÒ

Maria Beatrice Bilò

Sessione Estiva

Anno Accademico 2020/ 2021

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
1.1 L'anafilassi	6
1.1.1 <i>Epidemiologia</i>	7
1.1.2 <i>Eziologia</i>	8
1.1.2.1 <i>Triggers</i>	9
1.1.3 <i>Fisiopatologia</i>	10
1.1.4 <i>Sintomatologia</i>	16
1.1.5 <i>Diagnosi</i>	17
1.1.5.1 <i>Tests diagnostici e biomarcatori</i>	19
1.1.6 <i>Trattamento</i>	22
1.1.6.1 <i>Trattamenti primari</i>	22
1.1.6.2 <i>Trattamenti secondari</i>	23
1.1.6.3 <i>Trattamenti terziari</i>	24
1.1.6.4 <i>Misure aggiuntive (in ospedale/UTI) per complicazioni respiratorie</i>	26
1.2 Il fattore attivante le piastrine (PAF)	28
1.2.1 <i>Storia</i>	28
1.2.2 <i>Definizione</i>	29

1.2.3	<i>Struttura chimica e meccanismi biochimici-molecolari</i>	31
1.2.4	<i>PAF e SNPs</i>	33
1.2.5	<i>PAF e malattie cardiovascolari</i>	35
1.2.6	<i>PAF e trombosi da Covid-19</i>	37
1.2.7	<i>PAF e cancro</i>	38
1.2.8	<i>PAF e malattie della riproduzione</i>	41
1.2.9	<i>PAF e malattie renali</i>	41
1.3	<i>Il ruolo del fattore attivante le piastrine (PAF) nell'anafilassi</i>	43
2	SCOPO DELLA TESI	45
3	MATERIALI E METODI	49
3.1	<i>Caratterizzazione dei pazienti</i>	50
3.2	<i>Analisi pre-reclutamento</i>	53
3.3	<i>Separazione del plasma</i>	53
3.4	<i>Concentrazione del campione di plasma</i>	53
3.5	<i>Dosaggio dell'attività del PAF-AH</i>	54
3.6	<i>Analisi statistica</i>	54

4	<i>RISULTATI</i>	55
	<i>4.1 Pazienti</i>	56
	<i>4.2 Attività del PAF-AH</i>	56
5	<i>DISCUSSIONE</i>	61
6	<i>CONCLUSIONI</i>	67
7	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	69
8	<i>RINGRAZIAMENTI</i>	78

1. INTRODUZIONE

1.1 L'ANAFILASSI

L'anafilassi è una malattia sistemica potenzialmente letale innescata da mediatori rilasciati da mastociti e basofili attivati con i meccanismi della via allergica (Ig E-mediata) o non allergica (non Ig E-mediata). È un processo multisistemico in rapida evoluzione che coinvolge l'apparato tegumentario, sistema polmonare, gastrointestinale e cardiovascolare. Anafilassi e angioedema sono gravi disturbi che possono portare a ostruzione fatale delle vie aeree e culminare in arresto cardio-respiratorio, con conseguente ipossiemia e/o shock (Simons et al., 2014; Lo Verde et al., 2017; Campbell et al., 2014). Spesso, questi disturbi possono essere adeguatamente gestiti in ambito ambulatoriale; tuttavia, queste condizioni possono essere abbastanza gravi da giustificare la valutazione del paziente in pronto soccorso e in alcuni casi ricovero e gestione in un management di terapia intensiva. I rapporti suggeriscono che la sottodiagnosi e il sottotrattamento dell'anafilassi sono comuni (Sclar et al., 2014). Condizioni come sindrome da tachicardia ortostatica posturale, sindrome carcinoide, stridore di Munchausen, e l'anafilassi fittizia possono presentarsi in modo simile e devono essere inclusi nella diagnosi differenziale. L'anafilassi è una diagnosi clinica, ma i livelli di triptasi plasmatica e di istamina urinaria sono spesso elevati, consentendo la conferma diagnostica; tuttavia, i test diagnostici non dovrebbero ritardare il trattamento poiché i risultati potrebbero non essere immediatamente disponibili. La condizione sine qua non del trattamento è evitare qualsiasi fattore scatenante noto e l'adrenalina, che non dovrebbe mai essere ritardata, se si sospetta questo disturbo. I trattamenti secondari includono liquidi, broncodilatatori, antistaminici e glucocorticoidi. I pazienti con arresto cardiopolmonare o compromissione delle vie aeree o vascolare richiedono ventilazione meccanica, vasopressori e altri supporti vitali avanzati in terapia intensiva.

L'anafilassi è presumibilmente una malattia antica, anche se diversi sviluppi nel secolo passato hanno portato a enormi intuizioni e progressi del trattamento. Nel recente ventesimo secolo, il fisiologo francese Charles Richet, insieme a Paul Portier, intraprese uno studio sull'ipnotossina, una tossina che induce l'orticaria e altre tossine derivate da *Physalia* (uomo di guerra portoghese o "terrore fluttuante" trovato negli oceani Atlantico, Indiano e Pacifico) (Ring et al., 2004). Richet ha definito la condizione "anafilassi" al contrario della profilassi ed ha ricevuto il Premio Nobel in Medicina per questo lavoro nel 1913. Eventi storici hanno portato alla nostra attuale comprensione dell'anafilassi.

Come già detto, l'anafilassi è definita come una sistematica, immediata reazione di ipersensibilità mediata da Ig E e risultante nel rilascio dei mastociti e dei mediatori basofili. Questo risulta in molteplici effetti clinici che portano alla diagnosi. Quando le reazioni anafilattiche derivano dal rilascio di mediatori dai mastociti e basofili attivati sia da Ig E vengono definite "immunologiche"; quando invece si sviluppano per attivazione diretta di queste cellule da parte di alcuni agenti, vengono denominate "non immunologiche". Sebbene il termine "anafilattoide" sia stato in precedenza utilizzato per descrivere l'anafilassi non mediata dalle Ig E, questa terminologia non è più consigliata (Lo Verde et al., 2018).

1.1.1 EPIDEMIOLOGIA

Sono stati individuati tre modelli di sindromi anafilattiche descritti in base all'espressione della malattia: *unifasico*, *bifasico* e *protratto*. Quelle di tipo unifasico sono dal 70% al 90% dei casi di anafilassi, con picchi da 30 a 60 min, e si risolvono nell'ora successiva senza che i sintomi si ripetano. L'anafilassi bifasica è definita dalla ricorrenza dei sintomi ore dopo la risoluzione dell'evento iniziale in assenza di riesposizione al trigger. Il tipo

bifasico è stato riportato in modo variabile e si verifica in pochissime reazioni, nel 3% degli adulti. In anticipo la somministrazione di adrenalina può essere utile per prevenire reazioni bifasiche; il ruolo dei glucocorticoidi nel prevenire questo tipo non è chiaro, ma fisiologicamente ragionevole. L'anafilassi protratta o persistente si riferisce alla rara reazione che dura per giorni o addirittura settimane. Jerschow e collaboratori hanno esaminato i tassi di anafilassi fatale negli Stati Uniti tra il 1999 e il 2010 (Jerschow et al., 2014). Utilizzando la classificazione internazionale delle malattie (versione 10) e i codici diagnostici sui certificati di morte, hanno identificato 2.458 decessi correlati all'anafilassi in un periodo di 11 anni con una prevalenza di 0,69 persone per milione. In questa popolazione in studio (>96% adulti), i decessi per anafilassi indotti da farmaci sono stati i più frequenti (58,8%), seguito da "non specificato" (19,3%), veleno (15,2%) e cibo (6,2%). L'anafilassi fatale in ambito ambulatoriale era più comunemente anafilassi indotta dal cibo, mentre l'anafilassi indotta da farmaci era più frequente nell'ambito ospedaliero. Il tempo mediano riportato a seguito di due serie di eventi, dalla manifestazione clinica alla morte, variava da 30 a 35 min per il cibo, da 10 a 15 minuti per il veleno di insetti e 5 minuti per i farmaci (Lo Verde et al., 2018).

1.1.2 EZIOLOGIA

L'anafilassi immunologica Ig E mediata può essere scatenata da alimenti, da punture di imenotteri e da farmaci. L'anafilassi immunologica non mediata da Ig E coinvolge il sistema del complemento, il sistema di contatto oppure il sistema di coagulazione, e quella Ig G-mediata è causata da farmaci, emoderivati, etc. L'anafilassi idiopatica invece è la diagnosi di esclusione (**Figura 1**, Simons et al., 2011).

1.1.2.1 TRIGGERS

Reazioni immunologiche Ig E-mediate: includono reazioni allergiche a cibo; allergeni presenti nell'aria come polline, peli di animali, e alimenti aerosolizzati; lattice; farmaci (orali o parenterali), e indotte dall'esercizio fisico dipendente dal cibo e anafilassi; allergia agli zuccheri dei mammiferi come galattosio-1,3-alfa-galattosio (alfa-gal); anafilassi da liquido seminale e ormoni (cioè, anafilassi catameniale o anafilassi correlata al progesterone); e, raramente, reazioni dei mezzi di contrasto in ambito radiologico.

Gli alimenti che scatenano l'anafilassi includono latte, uova, grano, soia, pesce con pinne, crostacei e noci (Iweala Ol et al., 2016; Jarvinen et al., 2011). Veleni come imenotteri o formiche del fuoco (importate) sono cause comuni di anafilassi (Iweala et al., 2011).

I recenti progressi nella fisiopatologia hanno delineato nuove eziologie, inclusa l'attivazione dei disturbi dei mastociti, sindromi da sensibilità agli ormoni (inclusa anafilassi catameniale) e allergia all'alfa-gal. I disordini di attivazione dei mastociti possono essere primari (compresi disturbi clonali come mastocitosi sistemica e sindrome da attivazione dei mastociti monoclonali), secondaria (attivazione dei mastociti da reazioni allergiche Ig E-mediate), o idiopatica (come la sindrome di attivazione del mastocita idiopatico, orticaria idiopatica e anafilassi idiopatica). I pazienti con mastocitosi hanno più probabilità di sviluppare reazioni anafilattiche alle punture di imenotteri (**Figura 1**).

Reazioni anafilattiche non immunologiche: triggers non immunologici per l'anafilassi includono fattori fisici (esercizio fisico, freddo, caldo) e agenti iatrogeni (compresi mezzi di contrasto e oppiacei) che possono stimolare la degranolazione diretta dei mastociti (Krishnaswamy et al., 2006; Modena et al., 2016). Nei disturbi dei mastociti primari, i mastociti possono degranulare sia indipendentemente che in risposta ad allergeni come

cibi e farmaci. Ci sono sindromi specifiche e disturbi associati con anafilassi. Vari gradi di anafilassi possono accompagnare l'esercizio in alcuni individui. Il primo prodromo durante gli esercizi include un senso di stanchezza e calore, vampate di calore o prurito generalizzato seguito in sequenza da orticaria, angioedema, broncospasmo, ostruzione delle vie aeree e collasso vascolare. Alcuni pazienti sperimentano anafilassi da cibo indotta dall'esercizio, in cui l'anafilassi si verifica solo se preceduta dall'ingestione di cibo, in particolare cibi a cui l'individuo è allergico. Individui con gravi reazioni avverse all'oligosaccaride, alfa-gal, presente nelle carni dei mammiferi e nel farmaco chemioterapico cetuximab sono stati descritti di recente. Questi pazienti presentano orticaria o reazioni anafilattiche ritardate alla carne rossa e spesso hanno una storia precedente di morsi di zecca (**Figura 1**, Reber et al., 2017).

1.1.3 FISIOPATOLOGIA

A causa del pericolo di vita dell'anafilassi e ovvie preoccupazioni etiche, sono disponibili soltanto dati limitati sui meccanismi immunologici dell'anafilassi da soggetti umani. Gli anticorpi Ig E possono svolgere un ruolo importante nel conferire specificità immunologica all'attivazione delle cellule effettrici nei pazienti con anafilassi e altre malattie allergiche (Galli et al., 2012; Oettgen et al., 2016; Gould et al., 2008). L'Ig E è l'isotipo trovato alle concentrazioni di gran lunga più basse nella circolazione (50-200 ng/mL di Ig E circolanti totali in soggetti sani vs. circa 10 mg/mL per Ig G) (Dullaers et al., 2012); tuttavia, è possibile trovare l'Ig E a livelli molto più elevati nei pazienti con malattie allergiche (Galli et al., 2012; Platts-Mills et al., 2016). L'Ig E si lega al recettore ad alta affinità FcεRI sulla superficie dei basofili del sangue e mastociti tissutali (in soggetti umani in misura maggiore rispetto ai topi) e altri tipi di cellule, tra cui neutrofili,

eosinofili, monociti e cellule dendritiche, e piastrine. In caso di esposizione ad un allergene bivalente o multivalente, il cross-linking delle Ig E legate a FcεRI induce l'attivazione dei mastociti e basofili e il rilascio immediato di mediatori preformati, come istamina e varie proteasi, nonché la sintesi *de novo* di molti mediatori infiammatori, come alcuni leucotrieni (LT), prostaglandine e citochine. L'importanza di quella reazione è stata dimostrata 50 anni fa, quando diversi gruppi si sono resi conto che le Ig E purificate erano in grado di trasferire la reattività cutanea (Stanworth et al., 1967; Ishizaka et al., 1966; Ribatti et al., 2016; Oettgen et al., 2016). Dalla scoperta che le Ig E possono trasferire reattività all'allergene, gli anticorpi Ig E antigene-specifici sono stati considerati come un fattore di rischio chiave per lo sviluppo di allergia, di anafilassi, o entrambe alla successiva esposizione all'antigene. Alcuni pazienti possono sperimentare anafilassi quasi fatale nonostante i livelli bassi o non rilevabili di Ig E allergene-specifiche circolanti. Al contrario, gli allergeni Ig E specifici possono essere rilevati nel plasma di molti soggetti che non hanno sintomi clinici se esposti a quell'allergene. È probabile che i mastociti possano svolgere un ruolo dominante o ruoli ampiamente ridondanti nell'anafilassi e che il ruolo dei mastociti possa essere potenziato o mascherato a seconda di fattori, come l'esatto modello, l'adiuvante e l'allergene utilizzati. I basofili umani esprimono anche alti livelli di alta affinità del recettore di Ig E, FcεRI, ed esprimono il recettore attivante le Ig G, FcγRIIA e il recettore inibitorio delle Ig G, FcγRIIB. Diverse prove suggeriscono che i basofili partecipano all'anafilassi (Schroeder et al., 2011). Ad esempio, l'attivazione Ig E-dipendente dei basofili umani è associato ad un aumento dei livelli di marcatori sulla superficie cellulare dei basofili, come CD203c o CD63, e questo costituisce la base del test di attivazione dei basofili, infatti possono essere utilizzati per diagnosticare o confermare la sensibilizzazione agli allergeni e monitorare gli effetti degli sforzi per

trattare queste condizioni con l'immunoterapia. Tuttavia, è difficile accertare quanto sia importante il contributo che i basofili possano dare alla patologia dell'anafilassi nei soggetti umani, a causa dell'attivazione concomitante dei mastociti. Monociti e macrofagi esprimono alti livelli di attivazione di FcγRs, che può anche rispondere alle anafilotossine. La misura in cui monociti/macrofagi possano contribuire all'anafilassi nell'uomo non è ancora stata determinata. Le potenziali funzioni dei neutrofili nei pazienti con anafilassi sono state recentemente esaminate in dettaglio. Inoltre, secondo quanto riferito, i neutrofili umani possono esprimere FcεRI, in particolare in alcuni pazienti con asma (Gounni et al., 2001). Il maggiore enzima immagazzinato nei neutrofili è la mieloperossidasi (MPO). Un recente rapporto mostra che i livelli di MPO circolanti sono aumentati nei pazienti con anafilassi rispetto a quelli dei donatori sani (Francis et al., 2017). Tuttavia, questi risultati non forniscono una prova definitiva di attivazione dei neutrofili nell'anafilassi perché la MPO potrebbe anche essere potenzialmente rilasciata da altre popolazioni cellulari, tra le quali i macrofagi. L'anafilassi nei soggetti umani è associata all'attivazione delle piastrine, presumibilmente in risposta al fattore attivante le piastrine (PAF) e/o altri meccanismi e le piastrine attivate possono rilasciare mediatori, come il fattore piastrinico 4 e la serotonina, che possono contribuire alla fisiopatologia dell'anafilassi. Inoltre, le piastrine, nell'uomo, possono esprimere FcεRI, FcεRII e FcγRIIA, e le piastrine possono essere attivate *ex vivo* dopo incubazione con siero di pazienti allergici e successiva esposizione al relativo allergene. Due recenti studi (Mukai et al., 2017; Tordesillas et al., 2016) hanno dimostrato che durante i tests di attivazione dei basofili eseguiti nei campioni di sangue *ex vivo*, i basofili (una potenziale fonte del PAF) possono formare associazioni con le piastrine, identificando questa interazione come un qualcosa che dovrebbe essere indagato ulteriormente nel contesto dell'anafilassi.

L'istamina è stata a lungo considerata un importante mediatore di anafilassi. Esistono 4 recettori dell'istamina noti, denominati da H 1 a H 4 (MacGlashan et al., 2003). Studi con antagonisti dei recettori suggeriscono che alcuni degli effetti sistemici dell'istamina, inclusa l'ostruzione delle vie aeree e la tachicardia, sono principalmente mediate dal recettore H 1, considerando che altri effetti, tra cui l'arrossamento cutaneo e il mal di testa, sembrano essere mediati sia da recettori H 1 che H 2. Antistaminici H 1 sono comunemente usati come coadiuvanti del trattamento dell'anafilassi acuta e delle reazioni anafilattoidi. Mastociti e basofili rappresentano probabilmente le principali fonti di istamina in pazienti con anafilassi. CysLTs è una terza classe di potenziali mediatori dell'anafilassi ed era originariamente chiamato sostanza a reazione lenta di anafilassi e consiste di 3 CysLTs bioattivi: LTB 4, LTC 4 e LTD 4. I CysLTs sono sintetizzati a partire dall'acido arachidonico, da una varietà di cellule, tra le quali mastociti, basofili e macrofagi. I CysLTs e i loro metaboliti possono essere misurati utilizzando la spettrometria di massa, e diversi studi mostrano come i livelli di alcuni di questi prodotti, vale a dire LTE 4, 2,3-dinor-9a, 11b-PGF 2, e9a,11b-PGF 2, sono aumentati durante l'insorgenza dell'anafilassi (Higashi et al., 2010; Hono et al., 2009; Denzlinger et al., 1995). Sebbene questi studi indichino che i CysLTs e i loro metaboliti potrebbero essere buoni biomarcatori di anafilassi, non lo dimostrano questi composti che danno un importante contributo alle manifestazioni di anafilassi. Tuttavia, molteplici osservazioni suggeriscono che i CysLTs possano promuovere reazioni allergiche acute (Soter et al., 1983).

Per quanto riguarda l'anafilassi cutanea passiva Ig E-mediata, l'anafilassi induce cambiamenti nei livelli di molti altri mediatori, che potrebbero contribuire (positivamente o negativamente) a segni e sintomi clinici. Questo include le triptasi, le prostaglandine, e

le citochine/chemochine. La deplezione del precursore della bradichinina, il chininogeno, ad alto peso molecolare è stata osservata in pazienti con anafilassi, probabilmente attraverso attivazione del sistema di contatto con plasma e callacreina. I pazienti con anafilassi possono anche sperimentare l'esaurimento dei fattori di coagulazione, compresi i fattori V e VIII, e in casi estremi sperimentare la coagulazione intravascolare disseminata. Sebbene la maggior parte dei pazienti prontamente trattati per anafilassi guarisca senza evidenti sequele, alcuni hanno segni ricorrenti e sintomi che richiedono un trattamento continuato con adrenalina e per i quali vengono somministrati corticosteroidi. Tali sequele si pensa che riflettano le conseguenze "tardive" di alcuni dei mediatori rilasciati da effettori dell'anafilassi, come CysLTs, citochine e chemochine, o da cellule strutturali attivate in questa ambientazione. Infine, i mastociti possono rilasciare adenosina: l'attivazione Ig E-dipendente e l'adenosina possono avere effetti complessi mediati da vari recettori dell'adenosina con distinte funzioni, che hanno il potenziale per influenzare la fisiopatologia dell'anafilassi. Tuttavia, è necessario più lavoro per definire l'importanza della maggior parte di questi mediatori nell'anafilassi, soprattutto nell'uomo (Reber et al., 2017).

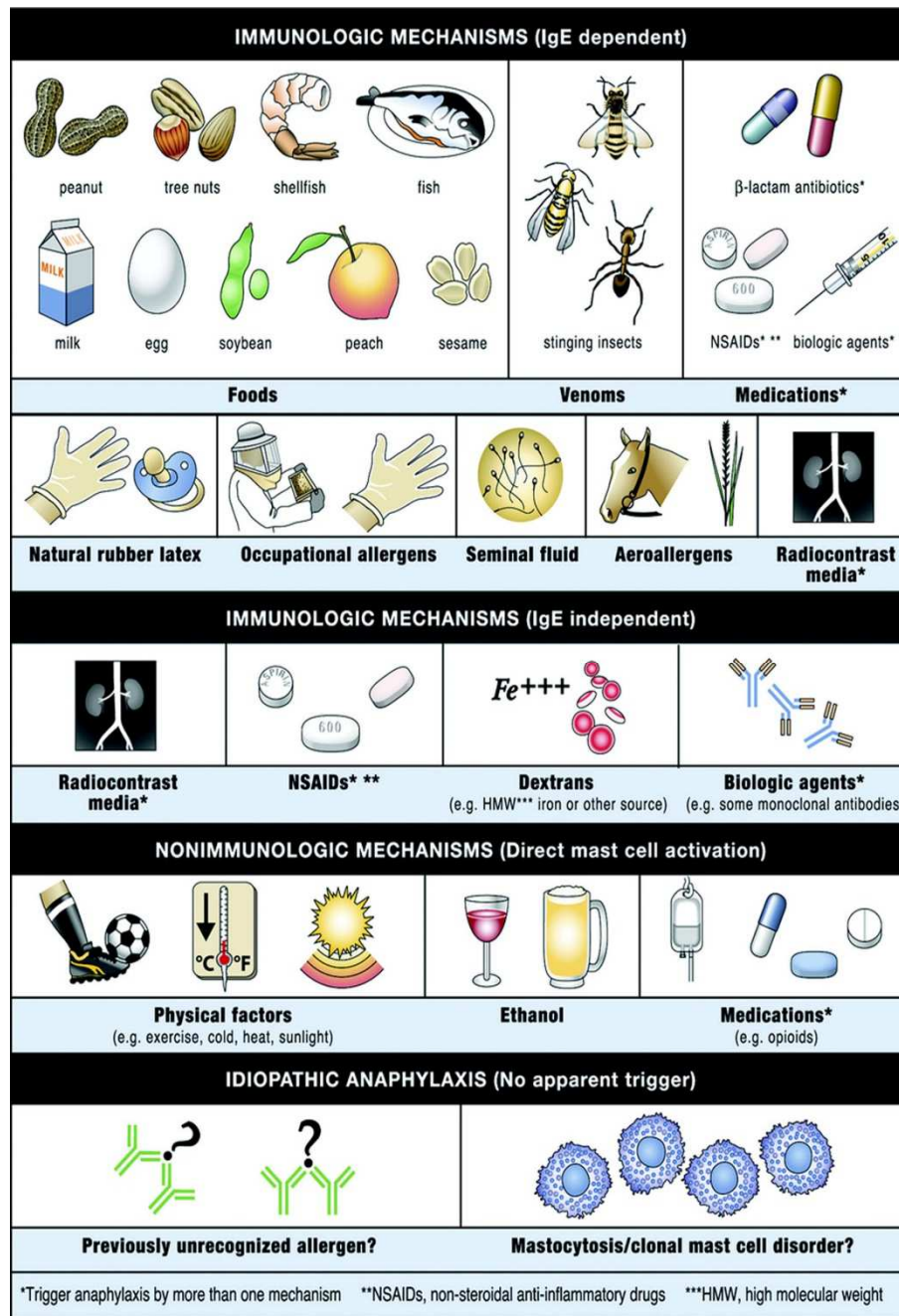


Figura 1: Fattori del paziente che contribuiscono all'anafilassi. Fattori legati ad età, a malattie e farmaci concomitanti, potenzialmente potrebbero contribuire all'anafilassi grave o fatale. Molteplici fattori e cofattori probabilmente contribuiscono ad alcuni episodi anafilattici, in particolare i cofattori potenzialmente amplificano l'anafilassi. Le malattie atopiche rappresentano un fattore di rischio nel caso di anafilassi innescata da cibo, da esercizio fisico o da lattice, ma non per l'anafilassi innescata da punture di insetti e farmaci (Simons et al., 2011). Beta-bloccanti: beta-bloccanti adrenergici; ACE-inibitori: inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina.

1.1.4 SINTOMATOLOGIA

Uno studio ha definito "probabile" anafilassi come segnalazioni di sintomi allergici che coinvolgono due o più sistemi di organi con malattie respiratorie e/o cardiovascolari (Wood et al., 2014). L'anafilassi deriva da meccanismi di attivazione di percorsi infiammatori da parte dei mastociti e/o degranulazione dei basofili (Krishnaswamy et al., 2006).

Per lo shock anafilattico e depressione miocardica, l'inizio dello shock nell'anafilassi è spesso rapido e sfaccettato, comprendente caratteristiche da cardiogeno, stati di shock ipovolemico e distributivo. L'ipovolemia e lo shock distributivo provocano quella che è storicamente definita "sindrome del cuore vuoto". Il massiccio rilascio di citochine provoca un'estesa perdita capillare e fluido del terzo spazio con deplezione del volume intravascolare. L'istamina, il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α), i prostanoidei, e le interleuchine possono anche produrre vasoplegia con sequestro di liquidi venosi. Presi insieme, questi processi riducono il ritorno venoso e producono basse pressioni di riempimento cardiaco. Normalmente, in questi tipi di shock, si ha tachicardia e aumento della gittata sistolica per preservare il sistema (Lo Verde et al., 2018).



Figura 2: Lo shock anafilattico è una reazione allergica pericolosa causata dall'esposizione a diversi tipi di sostanze. Avviene in pochi secondi o minuti dopo il contatto, è grave e potenzialmente letale. Se non si agisce tempestivamente dopo una serie di sintomi che avvengono in successione rapida, il paziente può perdere conoscenza sino alla morte. Sono varie le sostanze chimiche che possono indurre lo shock anafilattico o anafilassi: il veleno degli insetti, farmaci, alimenti, latte (Cottone, 2016).

1.1.5 DIAGNOSI

La conferma della diagnosi si basa sulla valutazione del midollo osseo e/o delle biopsie del tessuto extracutaneo. Indicazioni per la valutazione del midollo osseo includono pazienti adulti con orticaria pigmentosa, atriptasi basale >20 ng/mL, ricorrenti episodi ipotensivi o sincopali indipendentemente dai livelli di triptasi, anafilassi di imenotteri con triptasi $>11,4$ ng/mL, e secondo un network spagnolo, punteggio di mastocitosi ≥ 2 che è basato su sesso, sintomi clinici e livelli di triptasi. La gestione dei disturbi di attivazione dei mastociti è simile alla gestione dell'anafilassi in generale e si discute la valutazione dell'attivazione dei disturbi dei mastociti. L'ipersensibilità al progesterone può causare sintomi che vanno dalla dermatite all'anafilassi ciclica durante la fase luteale del ciclo mestruale (Snyder et al., 2003). I pazienti sono di solito giovani donne con ricorrenti

eventi anafilattici perimestruali (Bauer et al., 2013). Reazioni allergiche al fluido seminale umano sono stati descritti nelle donne, si manifestano con orticaria locale e prurito da anafilassi florida fino alla morte, e può essere coinvolto quasi ogni sistema (Lee et al., 2008; Friedman et al., 1984). Presentazioni severe di anafilassi caratterizzata da ipotensione e/o ipossiemia che indicano compromissione cardiovascolare e respiratoria sono stati associate con invecchiamento, malattie polmonari preesistenti e farmaci antipertensivi in uno studio prospettico di anafilassi. Sebbene le manifestazioni mucocutanee si verificano nella maggior parte dei pazienti, sono assenti nel 10%-20% di essi, compresi quelli che si presentano con anafilassi fatale o quasi fatale. Per la diagnosi differenziale, molte condizioni possono simulare l'anafilassi o essere accompagnate da manifestazioni sistemiche che somigliano ad allergia e devono essere considerate nella diagnosi differenziale. Disturbi importanti che richiedono considerazione includono perdita capillare, sindrome da tachicardia ortostatica posturale, sindrome da carcinoide, tumori neuroendocrini, anafilassi fittizia, e anafilassi somatoforme indifferenziata (Lo Verde et al., 2018).

Nella diagnosi, l'anafilassi è altamente probabile se una delle seguenti tre condizioni è soddisfatta: insorgenza acuta di malattia con coinvolgimento muco-cutaneo (prurito, rossore, orticaria, angioedema) e uno dei seguenti: complicanze respiratorie (respiro affannoso, stridore, ipossiemia/cianosi); ipotensione o danno d'organo (encefalopatia, danno renale, ecc.); due o più dei seguenti eventi che si verificano rapidamente dopo l'esposizione ad allergeni noti o probabili: coinvolgimento muco-cutaneo (prurito, rossore, orticaria, angioedema); complicanze respiratorie (respiro affannoso, stridore, ipossiemia/cianosi); ipotensione o evidenza di ipoperfusione d'organo (encefalopatia, danno renale, ecc.); sintomi gastrointestinali persistenti (dolore, nausea, vomito). Si ha

una pressione ridotta subito dopo l'esposizione a un allergene noto. L'ipotensione negli adulti è considerata come una pressione sistolica <90 mm Hg o superiore a una diminuzione del 30% della pressione sistolica rispetto al valore basale del paziente (Lo Verde et al., 2018).

Criteria clinici per la diagnosi di anafilassi

L'anafilassi è altamente probabile quando è soddisfatto UNO dei seguenti tre criteri

1. Insorgenza acuta di una malattia (da pochi minuti a diverse ore) con coinvolgimento della pelle, del tessuto mucoso o di entrambi (ad es. orticaria generalizzata, prurito o arrossamento, gonfiore delle labbra-lingua-ugola)

E ALMENO UNO DEI SEGUENTI:

A) Compromissione respiratoria (p. es., dispnea, respiro sibilante-broncospasma, stridore, PEF ridotto, ipossiemia)

B) Pressione sanguigna ridotta o sintomi associati di disfunzione d'organo (es. ipotonia [collasso], sincope, incontinenza)

OPPURE

2. DUE o PIÙ dei seguenti eventi che si verificano rapidamente dopo l'esposizione a un probabile allergene per quel paziente (da minuti a diverse ore)

A) Coinvolgimento del tessuto cutaneo-mucoso (p. es., orticaria generalizzata, prurito-arrossamento, labbra-lingua-ugola gonfie)

B) Compromissione respiratoria (p. es., dispnea, respiro sibilante-broncospasma, stridore, PEF ridotto, ipossiemia)

C) Pressione sanguigna ridotta o sintomi associati (p. es., ipotonia [collasso], sincope, incontinenza)

D) Sintomi gastrointestinali persistenti (p. es., crampi addominali, vomito)

OPPURE

3. Pressione sanguigna ridotta dopo l'esposizione ad allergeni noti per quel paziente (da minuti a diverse ore)

A) Neonati e bambini: pressione sanguigna sistolica bassa (specifica per età) o diminuzione superiore al 30% della pressione sanguigna sistolica

B) Adulti: diminuzione della pressione sanguigna sistolica inferiore a 90 mmHg o superiore al 30% rispetto al valore basale di quella persona

PEF= picco di flusso espiratorio.

(Simons et al., 2011)

1.1.5.1 TESTS DIAGNOSTICI E BIOMARCATORI

Si effettuano test:

in vivo: test cutanei e/o orali

in vitro: test sierologici (Ig E specifiche per estratti allergenici e/o allergeni ricombinanti)
(Bilò et al., 2005).



Figura 3: Due indagini fondamentali in Allergologia sono: il prick test e i tests che dosano le Ig E nel sangue dirette verso un particolare allergene (impropriamente chiamato RAST test).

Il prick test è il primo passo nella diagnostica allergologica e si esegue ponendo sulla superficie anteriore dell'avambraccio una goccia di allergene in forma liquida, per poi “scalfire” leggermente la cute del braccio con una lancetta sterile. Nel caso in cui il paziente sia allergico all'allergene testato, dopo circa 10 minuti, si avrà una reazione di arrossamento, di gonfiore, ovvero un pomfo, e prurito nella sede della puntura.

Il test allergologico su sangue (una volta effettuato con la metodica RAST, che però si basava su reattivi radiomarcanti, con le conseguenti difficoltà e problematiche di smaltimento, e quindi oggi è stata abbandonata) consiste nel dosaggio delle Ig E specifiche per un determinato allergene, nel siero del paziente. Si esegue con un normale prelievo del sangue ed è considerata una indagine di secondo livello, in quanto dovrebbe essere eseguita soltanto se necessaria, soltanto dopo aver eseguito il prick test. Con quest'ultimo, possono essere dosate le IgE dirette contro allergeni inalanti e alimenti, e anche su determinanti allergenici molecolari, ad esempio LTP o profilina (Allegro, 2015).

TRIPTASI: La triptasi sierica totale è il biomarcatore più utilizzato per confermare retrospettivamente una diagnosi di anafilassi (Waterfield et al., 2016). Piccole quantità

della forma immatura di triptasi (β -protriptasi) sono costitutivamente secreti nel sistema circolatorio. A seguito di mastociti e degranolazione dei basofili, i livelli di triptasi sierica totale aumentano significativamente a causa del rilascio di β -triptasi matura. Idealmente, la triptasi sierica dovrebbe essere misurata entro 1-2 ore dopo l'insorgenza dei sintomi perché i livelli di triptasi tipicamente raggiungono un picco entro 60-90 min dopo l'insorgenza dei sintomi, ma può persistere per 6 h (Vitte et al., 2015). I livelli di istamina plasmatica aumentano da 5 a 10 minuti dopo l'insorgenza di anafilassi e possono anche essere testati. Tuttavia, i livelli di istamina nel plasma sono solo transitoriamente elevati, ritornando alla normalità entro 60 min, rendendoli di scarsa utilità se il paziente viene valutato più di 1 h dopo l'esordio dei sintomi.

ISTAMINA: Il livello dei metaboliti dell'istamina urinaria nelle 24 ore può essere elevato fino a 24 ore dopo l'evento.

Vadas e colleghi (Vadas et al., 2008) hanno dimostrato che i livelli di istamina nel siero e di triptasi non sono sempre elevati, anche in pazienti con gravi manifestazioni di anafilassi inclusa quella cutanea, gastrointestinale e compromissione respiratoria o cardiovascolare. Inoltre, i livelli sierici di triptasi non sono sempre elevati durante l'anafilassi indotta da cibo. Di conseguenza, sta crescendo l'interesse nell'identificare biomarcatori sierici alternativi come fattore di attivazione piastrinica o carbossi-peptidasi A3, i quali confermano più accuratamente la diagnosi di anafilassi e correlano con la gravità, ma questi non sono ancora stati sviluppati per uso clinico. Altri test diagnostici da considerare sono quelli che aiutano a valutare le imitazioni di anafilassi.

Se si sospetta l'anamnesi per anafilassi Ig E-mediata, test allergologici (siero o epicutaneo) sono indicati per identificare l'innesco e spesso richiede rinvio a un allergologo-immunologo certificato (Lo Verde et al., 2018).

1.1.6 TRATTAMENTO

Farmaci associati alle anafilassi Ig E-mediate includono β -lattamici, cefalosporine, vancomicina, chinoloni e sulfonamidi, farmaci anestetici come suxametonio, sono stati implicati anche pancuronio e atracurio nell'anafilassi perioperatoria. Raramente, antidolorifici non steroidei, farmaci infiammatori (FANS) possono causare anafilassi con un meccanismo Ig E-mediato. 40 reazioni allergiche fatali e quasi fatale si verificano dallo 0,1% allo 0,4% di tutte le iniezioni somministrate di immunoterapia sottocutanea con tassi più elevati osservati in protocolli accelerati o urgenti. Sono state descritte reazioni più recenti ad agenti biologici e ad anticorpi monoclonali. Per le reazioni immunologiche non Ig E-mediate, l'anafilassi è stata segnalata a immunoglobuline, 42 a FANS, 40 alle membrane per dialisi, 43 a destrani e ferro, 44 agenti biologici ed eparina. Nel caso di anafilassi associata alla dialisi, la maggior parte delle reazioni di ipersensibilità ai componenti della dialisi sono dovuti all'ossido di etilene o al complemento nel caso delle membrane bio-incompatibili. Sono stati registrati anche casi di anafilassi dovuta a eritropoietina, lattice, eparina e farmaci (Reber et al., 2017).

1.1.6.1 TRATTAMENTI PRIMARI

La conditio sine qua non del trattamento è evitare qualsiasi fattore scatenante noto e somministrare adrenalina, che non dovrebbe mai essere ritardata se si sospetta questo disturbo (Reber et al., 2017).

È necessaria la somministrazione immediata da 0,3 a 0,5 mg di epinefrina (1:1.000) nel lato medio-esterno della coscia (vasto laterale anterolaterale, ventre medio-muscolare [VLM]) e questo rappresenta l'intervento essenziale. Questo potrebbe essere necessario

ripeterlo ogni 5-15 min (Simons et al., 2014; Sclar et al., 2014; Lieberman et al., 2015; Simons et al., 2011).

Gli studi dimostrano che l'assorbimento è più veloce in un tessuto e sono più alti i livelli plasmatici quando iniettato nel VLM, rispetto ad altri muscoli o a seguito di somministrazione tattica. In caso di emergenza, può essere utilizzato l'autoiniettore di adrenalina, considerando che la dose è fissa (0,3 mg negli adulti). Negli individui obesi, la lunghezza dell'ago dell'autoiniettore potrebbe non essere sufficiente per la somministrazione intramuscolare di adrenalina (Lo Verde et al., 2018).

1.1.6.2 TRATTAMENTI SECONDARI

La rimozione del potenziale antigene scatenante, può essere effettuata, ponendo il paziente in posizione supina. La posizione del paziente anafilattico può avere importanti implicazioni. Prevalgono vasodilatazione e ipovolemia in anafilassi, pertanto, i pazienti sono estremamente sensibili a spostamenti di fluidi e si possono avere improvvisi cambiamenti posturali nell'arresto cardiaco fatale. Nonostante la mancanza di dati prospettici, vi è un accordo uniforme sul fatto che i pazienti dovrebbero essere posti in posizione supina a meno che non sia controindicato da vomito attivo, distress respiratorio o gravidanza; in tal caso, la posizione di decubito laterale sinistro è più adeguata. L'elevazione delle gambe (o posizione Tren-delenburg, utilizzando una tavola inclinabile) rimane controversa. Questa posizione può svolgere un ruolo inizialmente mentre il paziente è sottoposto a rianimazione con liquidi, se non sono disponibili vasopressori (Brown et al., 2005; Lo Verde et al., 2018).

I trattamenti secondari includono liquidi, broncodilatatori, antistaminici e glucocorticoidi. Diversi studi hanno concluso che l'uso dell'anticorpo terapeutico anti-Ig E, omalizumab,

come coadiuvante nel trattamento durante l'immunoterapia nei casi di anafilassi da cibo o veleno, può diminuire i rischi di gravi reazioni allergiche, inclusa l'anafilassi, e in alcuni, ma non in tutti gli studi, è stato riportato che migliora la rapidità ed efficacia dell'immunoterapia nel raggiungimento della desensibilizzazione. Inoltre, dati clinici limitati suggeriscono anche che omalizumab potrebbe prevenire episodi spontanei di anafilassi nei pazienti con mastocitosi sistemica, una malattia caratterizzata da marcato aumento del numero e dell'attività dei mastociti (Reber et al., 2017).

Terapie aggiuntive con antistaminici (antagonisti H 1 e H 2) e i corticosteroidi sono considerati trattamenti aggiuntivi; alcune linee guida le considerano terapie "facoltative". La somministrazione di questi trattamenti non dovrebbe mai ritardare la somministrazione di epinefrina. Purtroppo uno dei motivi più comuni per il ritardo della somministrazione dell'adrenalina è che "aspettano di vedere se l'antistaminico funzionerà". Questo può essere un fatale errore di gestione. Durante l'anafilassi, gli antistaminici sono efficaci solo nel trattamento dei sintomi della cute come prurito e orticaria. Un recente studio retrospettivo canadese ha dimostrato che utilizzare antagonisti di H 1, su pazienti che hanno avuto una reazione allergica senza evidenza di anafilassi, ha ridotto la probabilità che quei pazienti progredissero all'anafilassi. I limiti di questo studio dovrebbero essere riconosciuti, e l'epinefrina resta ancora il primo e unico trattamento farmacologico efficace per anafilassi effettiva (Lo Verde et al., 2018).

1.1.6.3 TRATTAMENTI TERZIARI

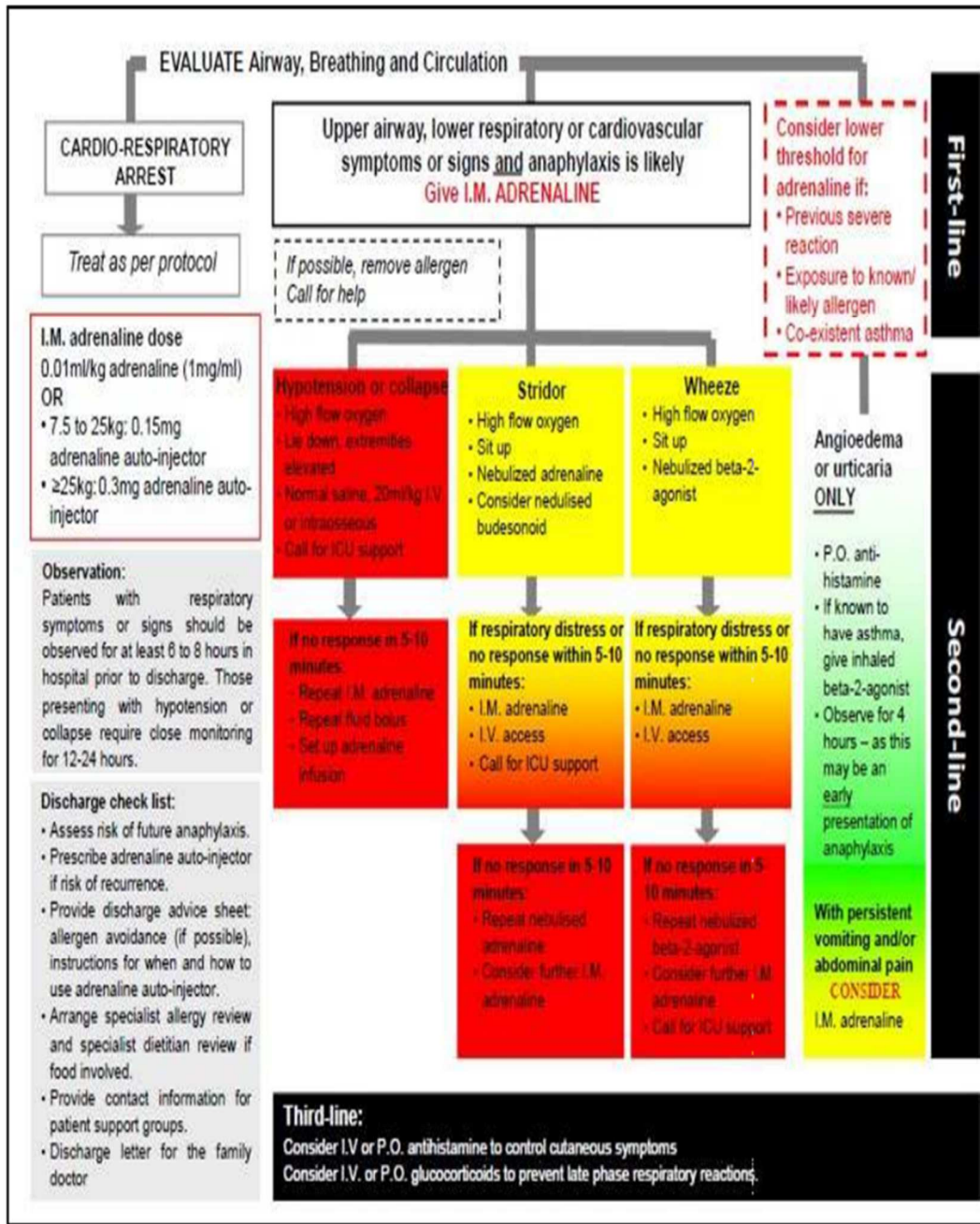
I pazienti con arresto cardiopolmonare o compromissione delle vie aeree o vascolare richiedono ventilazione meccanica, vasopressori e altri supporti vitali avanzati in terapia intensiva. Anafilassi e angioedema sono gravi disturbi che possono portare a ostruzioni

fatali delle vie aeree e culminano in arresto cardiorespiratorio, con conseguente ipossiemia e/o shock, che richiedono la gestione in un ambiente di terapia intensiva. I rapporti suggeriscono che la sottodiagnosi e il sottotrattamento dell'anafilassi sono comuni. Questo potrebbe essere realizzato in emergenza in terapia intensiva o come ambulatoriale dopo la dimissione: la gestione dell'anafilassi è considerata un'emergenza medica con la sua insorgenza immediata (da secondi a minuti) e rapida progressione al collasso cardiovascolare e/o respiratorio con conseguente morte entro pochi minuti dall'inizio. I principi di gestione iniziale sono gli stessi se il paziente viene gestito in ambulatorio, pronto soccorso, sala operatoria, o in ambiente ospedaliero perché l'anafilassi può verificarsi in qualsiasi di questi luoghi. Pazienti con più gravi complicanze cardiorespiratorie sono gestiti al meglio in terapia intensiva. I farmaci comunemente usati nella gestione dell'anafilassi, dovrebbero essere prontamente disponibili in tutte le strutture mediche e unità di terapia intensiva. È importante notare che la posizione con l'elevazione delle gambe (o posizione Tren-delenburg), è usata raramente in terapia intensiva (diversa da quella durante le procedure) in quanto vasopressori e fluidi sono più efficaci e facilmente disponibili. In caso di distress respiratorio, il paziente deve essere posto in una posizione di comfort e l'abbigliamento restrittivo deve essere rimosso o allentato. A breve il broncodilatatore agonista (albuterolo) deve essere somministrato come 2,5 o 5 mg in 3 ml nebulizzati o due soffi di inalatore dosato ogni 2-4 h fino alla sintomatologia di sollievo o quando il paziente raggiunge un livello di cura più elevato. L'accesso deve essere stabilito praticando un foro con grandi cateteri e fluidi somministrati il più rapidamente possibile. L'accesso intraosseo (IO) è un'alternativa accettabile (Lo Verde et al., 2018).

1.1.6.4 MISURE AGGIUNTIVE (IN OSPEDALE/UTI) PER COMPLICANZE RESPIRATORIE

In caso di asfissia/compromissione respiratoria, qualsiasi paziente con insufficienza respiratoria imminente, evidenza di ostruzione orofaringea o edema laringeo dovrebbe sottoporsi a pronta intubazione endotracheale, con strumenti avanzati per le vie aeree, disponibili per personale specializzato addestrato (sarebbe meglio non utilizzare un farmaco paralitico, in modo che il paziente respiri ancora spontaneamente).

Gli studi in letteratura supportano formalmente questa pratica, ma si sconsiglia vivamente un'intubazione con fibre ottiche da svegli se si sospetta edema laringeo. L'intubazione a fibre ottiche richiede attrezzature speciali e un operatore esperto per questa tecnica. Il limite maggiore di questa modalità è che richiede attrezzature avanzate e personale addestrato al suo corretto uso, che può essere disponibile solo in centri di assistenza terziaria. Il supporto vitale extracorporeo (ECLS) richiede anche l'uso di eparina e forse protamina, che sono stati entrambi collegati ad anafilassi grave (LoVerde et al., 2018).



Second-line

If no response in 5-10 minutes:

- Repeat I.M. adrenaline
- Repeat fluid bolus
- Set up adrenaline infusion

If respiratory distress or no response within 5-10 minutes:

- I.M. adrenaline
- I.V. access
- Call for ICU support

If respiratory distress or no response within 5-10 minutes:

- I.M. adrenaline
- I.V. access

Third-line:

Consider I.V. or P.O. antihistamine to control cutaneous symptoms

Consider I.V. or P.O. glucocorticoids to prevent late phase respiratory reactions

Figura 4: Schema di una gestione iniziale di anafilassi, tratto dalle linee guida EAACI (Muraro et al. 2014).

1.2 IL FATTORE ATTIVANTE LE PIASTRINE (PAF)

1.2.1 STORIA

Alla fine degli anni '60, Barbaro e Zvaifler descrissero una sostanza che causava il rilascio di istamina, indotto dall'antigene, dalle piastrine di coniglio, producendo anticorpi nell'anafilassi cutanea passiva (Barbaro et al., 1966). Successivamente, Henson ha descritto un "fattore solubile", rilasciato dai leucociti, che ha indotto il rilascio di ammine vasoattive nelle piastrine. Ulteriori osservazioni di Siraganuan e Osler hanno mostrato l'esistenza di una sostanza diluita che aveva la capacità di provocare l'attivazione piastrinica. Nel 1972, il termine fattore di attivazione delle piastrine (PAF) è stato coniato da Benveniste, Henson e Cochrane. La struttura del PAF è stata successivamente chiarita da Demopoulos, Pinckard e Hanahan nel 1979. Questi studi hanno introdotto nel mondo della ricerca il PAF, che è ora riconosciuto come un potente mediatore fosfolipidico. Dalla sua introduzione in letteratura, la ricerca sul PAF è cresciuta grazie all'interesse per le sue funzioni vitali di segnalazione cellulare e, soprattutto, al suo ruolo di molecola pro-infiammatoria in diverse malattie croniche tra cui malattie cardiovascolari e cancro. Il PAF media un'ampia varietà di funzioni cellulari e interazioni cellula-cellula. Pertanto, è coinvolto in diversi processi fisiologici tra cui apoptosi, infiammazione fisiologica, guarigione delle ferite, riproduzione, angiogenesi, potenziamento a lungo termine e segnalazione potenzialmente retrograda. È noto che il PAF svolge le sue ampie azioni fisiopatologiche a concentrazioni fino a 10^{-12} M e quasi sempre entro 10^{-9} M, come messaggero intercellulare. Gli effetti biologici del PAF possono essere modulati dalla dieta, dallo stile di vita e da fattori ambientali. Ciò significa che il PAF potrebbe essere un potenziale bersaglio terapeutico per molte malattie croniche e quindi il suo studio

risulta di notevole importanza e valore per i ricercatori di diverse discipline (Lordan et al., 2019).

1.2.2 DEFINIZIONE

Il PAF è un importante mediatore dell'anafilassi negli animali, e gli interventi che bloccano il PAF prevengono l'anafilassi fatale. Sono importanti i ruoli del PAF e del PAF acetilidrolasi (PAF-AH), l'enzima che inattiva il PAF, nell'anafilassi umana. Il PAF-AH è il principale enzima che idrolizza il PAF nella forma biologicamente inattiva, il LysoPAF (Vadas et al., 2008). Il PAF è un fosfolipide proinfiammatorio sintetizzato e secreto da mastociti, monociti e macrofagi tissutali fissati. I livelli circolanti del PAF sono, in parte, controllati dall'attività del PAF-AH, che come abbiamo detto, è l'enzima che degrada il PAF. La trasduzione di segnali biologici dopo il legame del PAF al suo recettore sulle piastrine, sui monociti, macrofagi e neutrofili risulta in molte delle manifestazioni di anafilassi. L'inattivazione del PAF, da parte del PAF-AH, protegge anche dall'anafilassi. I soggetti con livelli bassi di PAF-AH avrebbero una ridotta capacità di inattivazione del PAF circolante e quindi avrebbero più gravi manifestazioni di anafilassi rispetto a persone con livelli più elevati del PAF-AH. Quando i livelli circolanti del PAF aumentano l'attività del PAF-AH circolante diminuisce in proporzione alla gravità della reazione allergica che può essere innescata da alimenti, farmaci, o punture di insetti. È stato così dimostrato che esiste una correlazione inversa tra i livelli del PAF e l'attività del PAF-AH, e che la proporzione di pazienti con bassi valori del PAF-AH risulta aumentata proporzionalmente alla gravità dell'anafilassi. Abbiamo detto che il PAF è un mediatore biologico molto potente, attivo già a basse concentrazioni (fino a

10^{-12} M), ma a causa della sua rapida inattivazione da parte del PAF-AH, ha una emivita breve, compresa tra 3 e 13 minuti.

Nel loro studio, Vadas e collaboratori hanno mostrato come i livelli del PAF siano correlati con la gravità dell'anafilassi e come possa essere considerato un importante determinante dell'outcome. Il PAF non agisce in maniera isolata; infatti, ci sono interazioni indubbiamente importanti con altri mediatori che si formano durante i fenomeni di anafilassi, così come la presenza di malattie cardiovascolari coesistenti o l'asma. I ricercatori suggeriscono anche che il deficit del PAF-AH sia un fattore di rischio indipendente per l'anafilassi con esito fatale. Tuttavia, il deficit del PAF-AH da solo non è sufficiente a predisporre all'anafilassi con esito fatale; infatti, un soggetto deve essere sensibilizzato all'allergene ed avere anche altri fattori clinici.

In un altro studio (Pravettoni et al., 2014) sono stati valutati i livelli plasmatici basali del PAF-AH nei pazienti con allergia al veleno di imenotteri (HVA) e le eventuali correlazioni con diversi gradi di anafilassi, fattori demografici, livelli di Ig E veleno-specifiche, valori di triptasi, presenza di malattie croniche e l'uso di farmaci. I ricercatori hanno visto come l'attività basale del PAF-AH era normalmente distribuita e diminuiva in base alla gravità dell'anafilassi. Infatti, pazienti con il grado III o IV hanno avuto la più bassa attività enzimatica basale, mentre nessun controllo sano e solo un paziente di grado I e due pazienti di grado II hanno avuto un valore del PAF-AH al di sotto di questo livello. Inoltre, hanno notato differenze significative nell'attività del PAF-AH tra pazienti con grado I e II, tra pazienti con grado II e III, e tra i pazienti con grado II e IV, ma non c'erano differenze significative tra controlli e pazienti con grado I o tra pazienti con grado III e IV.

Il merito di questo studio è quello di essere stato il primo ad aver esaminato i livelli basali del PAF-AH in un'ampia popolazione di pazienti con HVA, che avevano reazioni sistemiche, trovando che l'unico fattore ad essere significativamente correlato con il livello basale del PAF-AH era il grado di anafilassi.

1.2.3 STRUTTURA CHIMICA E MECCANISMI BIOCHIMICI-MOLECOLARI

Il PAF (1-O-alcil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina) per sua natura chimica, appartiene alla classe dei fosfolipidi eteri. A rigor di termini, il PAF non è un'entità singola, ma un generico termine che indica una classe eterogenea di specie molecolari, catene alchiliche con diversi gruppi alchilici, acilici, che a loro volta possono essere saturi, mono poli-insaturi attaccati tramite legame etero. La diversità strutturale si traduce in differenze biologiche, con le predominanti specie attive del PAF contenenti gruppi alchilici C16:0, C18:0 o C18:1.

Il PAF ha un ruolo proinfiammatorio (può essere considerato un ormone locale con effetti paracrini pleiotropici). Infatti, il termine fattore di attivazione piastrinica è un termine improprio, perché l'effetto del PAF sui processi fisiologici non è limitato e va ben oltre la degranolazione delle piastrine, che rappresenta il primo effetto ad essere documentato. Chimicamente, il PAF esercita i suoi effetti in una varietà di cellule e tessuti. Per quanto riguarda la biosintesi e la degradazione del PAF, due sono le vie enzimatiche attraverso le quali il PAF viene biosintetizzato, che implicano anche il rimodellamento *de novo*. Nel cervello e nel rene, la sintesi del PAF è solitamente effettuata per via *de novo*. Quindi, il PAF sintetizzato attraverso questa via, ha un ruolo importante nel sostenere l'omeostasi del corpo. Inoltre, questa via mantiene il livello del PAF durante il normale funzionamento delle funzioni cellulari. Al contrario, la via che prevede il rimodellamento

è considerata come la principale via enzimatica per la sintesi del PAF, che implica una modifica strutturale di un fosfolipide preesistente, che funge da elemento strutturale, componente della membrana. Il precursore per la sintesi del PAF è un fosfolipide, tipicamente la fosfatidilcolina (PC). Anche leucociti polimorfonucleati, monociti e cellule endoteliali attivate, secernono il PAF principalmente attraverso questa via che rappresenta il meccanismo dominante per la sintesi del PAF in vari disturbi infiammatori e allergici. La quantità del PAF, presente nei fluidi biologici, è controllata da un equilibrio di anabolismo e catabolismo. Due sono gli enzimi che modulano l'attività del PAF, il PAF acetiltransferasi e il PAF acetilidrolasi. Mentre il PAF acetil transferasi è necessario per la formazione del PAF dalla sua forma inattiva (Lyso-PAF), il PAF-AH degrada il PAF nella sua forma inattiva. Il PAF-AH è prodotto in gran parte da epatociti e macrofagi ed è ampiamente distribuito nel plasma umano e nelle cellule del sangue. Questo enzima rimuove il gruppo acetato dalla molecola e quindi forma il Lyso-PAF. Il Lyso-PAF neofornatosi manca di attività PAF ed ha natura citotossica. A questo punto, il Lyso-PAF viene quindi riconvertito in PAF mediante introduzione del gruppo acetile nel suo secondo carbonio; in questo modo il ciclo biologico del PAF è spontaneamente regolato (Evangelou et al.,1994).

Per quanto riguarda il recettore del PAF (PAFR), il PAF si lega a un'unica proteina G accoppiata al recettore transmembrana e attiva molteplici segnali e percorsi intracellulari. Il gene per il PAFR umano si trova nel cromosoma 1. Questi recettori sono principalmente presenti in cellule muscolari lisce, nei cardiomiociti, nei neutrofili, nei macrofagi, nei monociti, negli eosinofili e nelle cellule endoteliali. Il PAFR nelle cellule endoteliali si trova sia sulla superficie cellulare sia su grandi compartimenti endosomiali. Il PAFR è

avere i gemelli monozigoti). Ogni circa 1000 basi del genoma, esiste una possibile variazione e l'elemento che si modifica viene chiamato appunto SNP (single nucleotide polymorphism). La presenza di SNPs non è in grado di predire esattamente il momento in cui si potrebbe sviluppare un disturbo della salute, ma comunque potrebbe predire il rischio individuale di svilupparlo. Se il rischio fosse noto, saremmo in grado di prevenire le conseguenze e per ciascuna malattia il momento in cui si interviene è cruciale. Se il profilo genetico di una persona venisse analizzato con un certo anticipo, le contromisure potrebbero avere una maggiore possibilità di successo (Manzini and Vitiello, 2019).

Negli ultimi anni sono state descritte numerose alterazioni nei geni PAF-AH, PLA2G7, LpPLA2. Questi includono mutazioni inattivanti, polimorfismi nella regione codificante e altri cambiamenti genetici situati nel promotore e nelle regioni introniche del gene. Le conseguenze associate a queste variazioni genetiche sono state valutate da diverse prospettive, inclusi studi biochimici e molecolari *in vitro* e analisi cliniche sull'uomo. Numerose sono le mutazioni con conseguente perdita di funzione del PAF-AH e diversi SNPs sono stati identificati e studiati in varia misura con l'obiettivo di chiarire il loro impatto sia nella fisiologia sia nella patologia. Queste analisi hanno fornito nuove evidenze meccanicistiche e cliniche che possono avere un'importante utilità traslazionale, compreso il potenziale per le applicazioni diagnostiche e terapeutiche personalizzate. Negli esseri umani, il gene PAF-AH presenta una serie di mutazioni e polimorfismi all'interno delle regioni codificanti e non. Dal momento che il PAF-AH ha una funzione importante nella patogenesi dell'ictus ischemico, è stato effettuato uno studio per indagare la correlazione tra la variazione dei diversi polimorfismi presenti nel gene che codifica per il PAF-AH e tale patologia (Huang et al., 2018).

Il polimorfismo G994T nel gene del PAF-AH è associato al rischio di sindrome dell'ovaio policistico (PCOS). È stato visto come l'aumento dell'attività del PAF-AH e dell'apo B-PAF-AH nei pazienti con allele H di R92H, sia correlato alla variazione R92→H, ai cambiamenti nei livelli di lipoproteine plasmatiche, alla resistenza all'insulina, all'invecchiamento e all'aumento di peso, e quindi potrebbe essere coinvolto nella patogenesi della PCOS e nei maggiori rischi di malattie cardiovascolari (Zhang et al., 2017).

L'aneurisma aortico addominale (AAA) ha un tasso di prevalenza per gli uomini di età superiore ai 65 anni dell'1,7%-7,2% in varie popolazioni. Infatti, gli individui con un parente di primo grado con AAA, hanno fino a 12 volte un maggiore rischio di sviluppare la patologia. Diversi studi hanno indagato la presenza di SNPs in pazienti con AAA. Infiammazione e proteolisi, insieme alla perdita di cellule muscolari lisce, aumento dello stress ossidativo, e frammentazione dell'elastina, costituiscono i segni distintivi della fisiopatologia della formazione di AAA. Vari SNPs funzionali infiammatori e proteolitici sono stati segnalati finora, per lo più in coorti che presentano malattie cardiovascolari (Saratzis et al., 2013).

1.2.5 PAF E MALATTIE CARDIOVASCOLARI

Nel sistema cardiovascolare, il PAF ha dimostrato avere un ruolo importante nell'aggregazione piastrinica e dei neutrofili, nella permeabilità vascolare, nella perdita microvascolare, nella formazione di trombi, nell'adesione dei leucociti alle cellule endoteliali e nell'inizio e progressione dell'aterosclerosi (Reber et al., 2017).

La patologia maggiormente responsabile della sindrome coronarica acuta (SCA) coinvolge fosfolipidi proinfiammatori come il PAF, che svolge un ruolo centrale nel

processo infiammatorio. Il PAF contribuisce all'aterogenesi, attraverso vari meccanismi come l'infiammazione, la reattività piastrinica, lo stress ossidativo e nitrosativo e la disfunzione endoteliale.

Il PAF sembra avere un ruolo nel meccanismo patologico dell'aterosclerosi dal momento che svolge un ruolo importante nella fisiopatologia delle reazioni infiammatorie e viene prodotto in grandi quantità dalle cellule infiammatorie in risposta a stimoli specifici. Il PAF, i lipidi simili al PAF, le prostaglandine (PG), l'istamina, la bradichinina, le fosfolipasi A2 e le citochine sono potenti mediatori infiammatori. Siccome il TNF- α accelera lo sviluppo di aterosclerosi e aggrava l'aterogenesi, questo insieme all'interferone è in grado di inibire la secrezione dell'enzima PAF-AH, e proteggere le LDL dall'ossidazione da parte dei radicali liberi, svolgendo così un ruolo anti-aterogeno nell'aterosclerosi. Per quanto riguarda invece l'attività piastrinica, le piastrine attivate stimolano la progressione della placca aterosclerotica, con la formazione di trombi che rappresentano i principali meccanismi patologici coinvolti in vari disturbi cardiovascolari. La reattività piastrinica è associata ad un aumento del rischio trombotico e al rilascio di mediatori proinfiammatori. Poiché il PAF è sintetizzato dalle piastrine, esso consente l'aggregazione piastrinica con il conseguente rilascio di mediatori dell'attività piastrinica e infiammatoria.

Durante i fenomeni di trombosi, il PAF è sintetizzato localmente nelle vicinanze del sito delle cellule endoteliali danneggiate e si deposita nella placca aterosclerotica. Il PAF, derivato dalle cellule endoteliali, promuove l'interazione endoteliale attraverso il legame al suo PAFR. Essendo un importante regolatore fisiologico e un fattore che influenza le fasi iniziali del processo aterosclerotico, il PAF potrebbe essere migliore rispetto ad altri biomarcatori nei pazienti con malattie coronariche, anche se sono necessarie ulteriori

ricerche per comprendere il suo ruolo proprio nelle malattie cardiovascolari (Ramakrishnan et al., 2015)

1.2.6 PAF E TROMBOSI DA COVID-19

In un recentissimo studio è stata messa in relazione la presenza di microtrombosi con il PAF, in corso di Coronavirus SARS-CoV-2, causa della pandemia del 2019. In letteratura sono documentati livelli elevati di coagulazione, danno endoteliale e microtrombosi nei polmoni di pazienti deceduti per COVID-19. Le piastrine sono fondamentali nella formazione di trombi, e questa è promossa proprio dal PAF. Ackermann e collaboratori (Ackermann et al., 2020) hanno recentemente riportato la presenza di un grave danno endoteliale e polmonare, una diffusa microtrombosi accompagnata ad una aumentata angiogenesi nei polmoni di pazienti deceduti a seguito del COVID-19. Questi risultati supportano altre pubblicazioni in cui si è dimostrato che alcuni marcatori segnalano la presenza di elevata coagulazione e microtrombosi nei polmoni ed in altri organi di pazienti affetti da COVID-19. Attivazione e aggregazione piastrinica sono stati riportati in pazienti con grave patologia da COVID-19, e sicuramente l'innescò più potente dell'aggregazione piastrinica è il PAF. È stato recentemente riportato che le piastrine, tramite il rilascio del PAF, innescano l'attivazione dei mastociti perivascolari, che portano all'infiammazione. Inoltre, la degranolazione dei mastociti associata ad edema interstiziale ed immunotrombosi è stata segnalata in setti alveolari di pazienti deceduti a seguito del COVID-19. I mastociti sono una ricca fonte di PAF e sono abbondanti nei polmoni, dove possono contribuire alla malattia COVID-19. In questo contesto, l'immunità innata al COVID-19 sembra coinvolga cellule T attivate e anticorpi specifici, considerando anche i reperti patologici polmonari osservati in casi acuti gravi. La

sindrome respiratoria associata a COVID-19 è causata da un rilascio di una tempesta di citochine proinfiammatorie. I mastociti sono una delle fonti più ricche di tali citochine, in particolare l'IL-6 che è stata implicata direttamente nel COVID-19. Alla luce di questi risultati, avrebbe senso provare ad inibire l'azione del PAF, grazie all'azione di inibitori di neo sintesi. Purtroppo tali inibitori non sono disponibili per uso clinico, ad eccezione della rupatadina, che mostra specificatamente attività anti-PAF. È stato segnalato che la rupatadina è in grado di inibire anche l'attivazione dei mastociti umani in risposta al PAF. La rupatadina potrebbe, quindi, essere proposta almeno per la profilassi anti COVID-19. È interessante notare che alcuni flavonoidi naturali hanno anche attività anti-PAF, oltre ad avere azioni antinfiammatorie e la capacità di bloccare il legame del SARS-CoV-2 con le cellule bersaglio. Il trattamento con istamina e rupatadina potrebbe limitare o addirittura impedire il nascere della tempesta citochinica (Theoharides et al., 2020).

1.2.7 PAF E CANCRO

Elevate quantità di trascritti PAFR1 e 2 sono stati trovati nel carcinoma epatocellulare umano e adenocarcinoma gastrico. Nelle cellule tumorali, l'attivazione del PAFR attraverso proteine G e tirosin-chinasi viene trasdotta in percorsi a valle, inclusi NFκB, MAPK, AKT, PI3-chinasi e Src. Insieme, questi percorsi attivati dal PAFR giocano un ruolo centrale nei processi oncogeni inducendo proliferazione delle cellule tumorali.

Il PAF è stato descritto nella promozione, progressione e metastasi del carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) che portano ad un ciclo a feedback positivo tra PAFR e STAT3. L'attivazione del PAFR inibisce anche l'attività di PTEN, la fosforilazione delle vie PI3K ed ERK che sono segnali critici per la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione delle cellule tumorali.

Il ruolo del PAF nella sopravvivenza delle cellule tumorali, nella proliferazione e nella migrazione è stato mostrato anche nel cancro ovarico. Aponte e collaboratori (Aponte et al., 2008) hanno riscontrato un aumento dei livelli di PAFR nei tumori ovarici sierosi rispetto ai tumori mucinosi e benigni. Gli autori hanno dimostrato che nelle cellule tumorali ovariche sierose, il PAF promuove la proliferazione cellulare e, a livello molecolare, l'attivazione di PAFR è stata accompagnata dalla fosforilazione di EGFR, Src, FAK e paxillina.

In un altro studio, sempre degli stessi autori, si è verificato che sia le vie di segnalazione PAFR ed EGFR promuovono la sopravvivenza delle cellule tumorali e migrazione in questo tipo di tumore e che il targeting combinato di entrambi i recettori ha ridotto significativamente la crescita del tumore e la progressione in un modello murino.

Nelle cellule umane del carcinoma orale squamoso primario (OSCC), l'enzima responsabile della sintesi del PAF, LPCAT1, è sovraespresso rispetto a quello di un tessuto normale e il suo silenziamento ha ridotto la proliferazione delle cellule tumorali e la loro invasività, indicando che PAF/PAFR è responsabile della sopravvivenza prolungata e segnalazione proliferativa nelle cellule maligne.

Il blocco della via PAFR inibisce la crescita tumorale del cancro al seno, cancro alla prostata e Sarcoma di Kaposi. Questi effetti sono stati associati all'inibizione dell'angiogenesi tumorale. I meccanismi molecolari alla base di questo fenomeno sono stati studiati, e nel 2011 Huang e collaboratori hanno mostrato che nelle cellule tumorali in fase di apoptosi, dopo la radioterapia, la caspasi 3 attivata, attiva cPLA2, portando alla sintesi di PGE2 e al ripopolamento tumorale (Huang et al., 2011)

Diversi gruppi hanno anche dimostrato il cosiddetto ruolo nel cancro delle cellule staminali (CSC) che sono responsabili del ripopolamento del tumore. Evidenze da studi

preclinici hanno mostrato come durante la chemioterapia, vi sia un aumento di una sottopopolazione di cellule tumorali quiescenti (definite CSC) che rientrano nel ciclo cellulare, contribuendo al ripopolamento del tumore. L'attivazione di queste cellule a ciclo lento è causata dal rilascio di fattori diversi da parte delle cellule morenti, come la PGE2. Uno studio di Kurtova e collaboratori ha mostrato che il blocco di PGE 2 sopprime il ripopolamento del tumore in risposta alla chemioterapia negli xenotrapianti di carcinoma uroteliale della vescica (Kurtova et al., 2015). Tuttavia, non è chiaro se il PAF possa indurre direttamente il fenomeno della staminalità o il mantenimento della CSC in risposta al trattamento genotossico, contribuendo così al ripopolamento del tumore e al fallimento del trattamento. Inoltre, anche le cellule tumorali stressate e morenti possono rilasciare fattori di stress pro-ossidante che possono agire direttamente sulla GPC per produrre GPC ossidato (ox-GPC), potente ligando di PAFR. La produzione di queste molecole "PAF-simili" non è sotto il controllo del processo enzimatico per la produzione del PAF. Simili al PAF nativo, questi ox-GPCs possono aumentare la proliferazione delle cellule tumorali rimanenti, contribuendo al ripopolamento tumorale. Recentemente, sono stati riportati dati a supporto del concetto secondo cui la presenza di ligandi di PAFR nel microambiente tumorale sia un possibile meccanismo alla base del ripopolamento tumorale dopo chemio e radioterapia. L'associazione della radioterapia con agonisti anti-PAFR, potrebbe essere una nuova ed efficiente alternativa terapeutica nel trattamento del cancro. Quindi, gli antagonisti del PAFR sarebbero in grado di migliorare l'efficacia della chemio e radioterapia a livello sperimentale (Alves et al., 2018).

1.2.8 PAF E MALATTIE DELLA RIPRODUZIONE

Numerosi sono anche gli studi che mettono in relazione il PAF, il PAF-AH e le malattie della riproduzione. In particolare Fan e collaboratori hanno studiato la PCOS (Fan et al., 2012). Da questo studio è emerso che la concentrazione sierica di malondialdeide (MDA) è associata a PCOS, e iperandrogenismo, insulino-resistenza e ipertrigliceridemia in pazienti con PCOS. La diminuzione delle attività di HDL-PAF-AH totali e contenenti apoE e l'aumento della concentrazione sierica di MDA possono contribuire alla patogenesi della PCOS e potenzialmente collegarsi a complicanze correlate, responsabili di stress ossidativo e infiammazione, come l'aumentato rischio di diabete mellito di tipo 2 e/o future malattie cardiovascolari in pazienti con PCOS.

1.2.9 PAF E MALATTIE RENALI

Il PAF sembra anche svolgere un ruolo nella fisiopatologia del rene, l'organo che è sia una fonte, sia un bersaglio del PAF. Le cellule mesangiali renali sono responsabili per la generazione del PAF glomerulare e, in ultima analisi, sono oggetto della sua eccessiva produzione. È ampiamente riconosciuto che la patologia mesangiale riflette il danno glomerulare, che culmina nella glomerulosclerosi e proteinuria. Pertanto, la modulazione delle risposte delle cellule mesangiali, offrirebbe un approccio terapeutico fisiopatologico basato sulla prevenzione del danno glomerulare. Tuttavia, le modalità della terapia attualmente disponibili non consentono interventi mirati in questi processi. Una comprensione più profonda dei meccanismi che regolano il metabolismo e la segnalazione del PAF nelle cellule mesangiali potrebbe essere importante, perché potrebbe facilitare la ricerca di migliori terapie per i pazienti con disturbi renali aventi il PAF come bersaglio farmacologico. Recentemente, è stato anche identificato un gene che,

quando sovraespresso nelle cellule mesangiali, porta ad un aumento del PAF e dell'espansione della matrice mesangiale. All'interno del nefrone, il glomerulo mostra la più alta espressione di PAFR, seguita dal tubulo prossimale, con gli altri segmenti tubolari che presentano livelli inferiori. In un modello di ostruzione unilaterale dell'uretere, l'espressione del PAFR aumenta di quasi 70 volte e la mancanza di PAFR (per knockout genico) in questo modello riduce la segnalazione profibrotica, la deposizione di collagene e l'albuminuria. È stato visto come l'infusione esogena del PAF sia in grado di influire sull'emodinamica renale e sulla permeabilità glomerulare, con conseguente variazione della velocità di filtrazione e proteinuria. Il PAF, inoltre, è un importante mediatore di anticorpi e danno glomerulare mediato dal complemento, come mostrato in esperimenti *in vitro* ed *in vivo*. L'inibitore proteinasi-A1 sopprime l'induzione della sintesi del PAF nelle cellule mesangiali, prevenendo l'attivazione dei suoi enzimi chiave, come la fosfolipasi A2 e l'acetil-CoA:Lyso-PAF acetil transferasi. L'iperinsulinemia indotta sperimentalmente, riduce i livelli del PAF, diminuendone la sintesi renale e aumentandone la degradazione plasmatica attraverso l'inibizione dell'attività dell'acetiltransferasi e aumentando, di conseguenza, l'attività della acetilidrolasi. In questo contesto, il PAF e l'ossido nitrico (NO), hanno un effetto bidirezionale sulla sintesi reciproca nelle cellule mesangiali; infatti, l'inibizione dell'NO sintasi induce la sintesi del PAF, che è invece inibito dalla produzione di NO. Pertanto, il PAF promuove l'infiltrazione infiammatoria del glomerulo.

In ultimo, il PAF è in grado di aumentare l'espressione del recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDLR) e dei recettori scavenger nelle cellule mesangiali. Questo provoca un aumento dell'assorbimento di lipidi con conseguente accumulo nelle cellule

mesangiali, e ciò porta alla formazione di cellule schiumose (Reznichenko and Korstanje, 2014).

1.3. IL FATTORE ATTIVANTE LE PIASTRINE (PAF) NELL'ANAFILASSI

Abbiamo più volte detto che il PAF è un potente mediatore derivato dai fosfolipidi, implicato nell'aggregazione piastrinica, che svolge un ruolo importante in una varietà di risposte immunitarie e infiammatorie. Il PAF può essere rilasciato da una varietà di cellule umane, compresi i mastociti polmonari purificati e i basofili del sangue, dopo stimolazione *ex vivo* con anticorpi anti-Ig E e neutrofilo purificati dopo incubazione *in vitro* con Ig G. Molte delle cellule che producono il PAF possono anche rispondere al PAF; parliamo di piastrine, mastociti, neutrofilo e macrofagi.

Il PAF ha dimostrato di essere un importante mediatore nell'anafilassi (Pałgan and Bartuzi, 2015). Il livello sierico del PAF è correlato con la gravità delle reazioni sistemiche. Il PAF è anche coinvolto nella broncocostrizione dei pazienti asmatici, nell'ipersecrezione di muco e nell'infiammazione dei bronchi. Inoltre, sono stati riportati livelli plasmatici aumentati del PAF in pazienti con orticaria. Gli studi hanno dimostrato che il PAF aumenta la permeabilità dei capillari della pelle e induce lo sviluppo di pomfi, arrossamenti, e reazioni infiammatorie della pelle. Il PAF svolge anche un'azione sugli eosinofili e sui mastociti.

A livello fisiopatologico il PAF svolge un ruolo importante nell'anafilassi dell'asma bronchiale e dell'orticaria. Le principali cellule coinvolte nell'anafilassi allergica sono i mastociti e i basofili, che rilasciano istamina, serotonina, enzimi proteolitici, citochine e lipidi inibitori come la prostaglandina D₂ (PGD₂), l'LTB₄, la cisteinil LT, l'LTC₄, l'LTD₄, l'LTE₄ e proprio il PAF. Negli ultimi anni il PAF ha attirato una grande

attenzione e interesse, in quanto è stato visto essere un elemento molto importante nelle reazioni anafilattiche gravi. Nel loro studio, (Vadas et al., 2008) hanno valutato la concentrazione del PAF sierico in individui che sviluppano anafilassi. Gli autori hanno notato che, rispetto al gruppo di controllo, il PAF è notevolmente più alto e correla positivamente con la gravità della reazione anafilattica. Gli individui sani mostrano una concentrazione del PAF nel siero di circa 23,8 pg/mL, mentre nelle persone con grave anafilassi può raggiungere 805 ± 595 pg/ml. È stato inoltre osservato che i livelli sierici del PAF in pazienti con grado I, II e III di anafilassi erano 2.5, 5 e 10 volte superiori rispetto al gruppo di controllo, rispettivamente. Sono stati inoltre svolti studi sull'attività del PAF-AH, enzima volto a diminuire i livelli del PAF in circolo. Tali ricerche hanno rivelato un'attività significativamente inferiore di questo enzima in persone con anafilassi molto grave (causata dal consumo di arachidi) (Zheng et al. 2012). In generale, è stato dimostrato che gli individui che mostravano bassa attività del PAF-AH, avevano una maggiore concentrazione del PAF sierico rispetto ai soggetti con normale attività acetilidrolasica.

Gli studi sulla biologia di questo enzima hanno mostrato caratteristiche molto interessanti; infatti, è stato dimostrato che il 70% del PAF-AH sierico risulta legato alle LDLs, mentre il restante 30% è legato alle HDLs. Inoltre è stato visto che abbassare i livelli di LDL prolunga l'emivita del PAF. Di qui, la terapia con lovastatina o fenofibrati, oltre ad abbassare i livelli di LDL, porta ad una riduzione proporzionale dell'attività del PAF-AH con conseguente aumento del rischio di anafilassi. La concentrazione sierica del PAF è stata dimostrata essere molto maggiore nel 100% dei pazienti con anafilassi grave (Pałgan and Bartuzi, 2015).

2. SCOPO DELLA TESI

L'anafilassi rappresenta una sistematica, immediata reazione di ipersensibilità mediata dalle Ig E. Questo porta al rilascio dei mastociti e dei mediatori basofili, ed ha come conseguenza numerosi effetti clinici. Le reazioni anafilattiche derivano dal rilascio di mediatori da mastociti e basofili attivati dalle Ig E, attraverso un meccanismo immunologico indiretto, o con un meccanismo non immunologico diretto dell'anafilassi, che porta all'attivazione di queste cellule da parte di alcuni agenti, come le Ig G (Lo Verde et al., 2018).

Il PAF è un mediatore dell'anafilassi, quindi gli interventi in grado di bloccare il PAF prevengono l'anafilassi fatale. Sono importanti i ruoli del PAF e del PAF-AH, l'enzima che inattiva il PAF. Il PAF-AH è il principale enzima che idrolizza il PAF nella forma biologicamente inattiva (Lyso-PAF), mentre il PAF è un fosfolipide proinfiammatorio sintetizzato e secreto da mastociti, monociti e macrofagi tissutali fissati. I livelli circolanti del PAF sono, in parte, controllati dall'attività dell'enzima che degrada il PAF stesso (Vadas et al., 2008).

Il PAF è un potente mediatore implicato nell'aggregazione piastrinica, e svolge un ruolo importante in una varietà di risposte immunitarie e infiammatorie, e quindi in varie patologie (Lo Verde et al., 2017).

Il livello sierico del PAF, è stato correlato alla gravità delle reazioni sistemiche. Il PAF è anche coinvolto nella broncocostrizione dei pazienti asmatici, nell'ipersecrezione di muco e infiammazione dei bronchi. Inoltre, in pazienti con orticaria aumentano i livelli plasmatici del PAF. Il PAF aumenta la permeabilità dei capillari della pelle e induce lo sviluppo di pomfi, arrossamenti, e reazioni infiammatorie della pelle. Il PAF svolge un'azione sugli eosinofili e sui mastociti, e per quanto concerne la fisiopatologia, il PAF

partecipa al meccanismo dell'anafilassi nell'asma bronchiale e nell'orticaria (Pałgan and Bartuzi, 2017).

I pazienti allergici al veleno degli imenotteri hanno reazioni di diversa gravità, fino allo shock anafilattico, anche nel caso condividano lo stesso profilo immunologico, come la presenza di simili livelli di Ig E totali e specifiche.

Dal momento che in letteratura esistono solo due studi che prendono in considerazione i livelli di attività del PAF-AH nel paziente con anafilassi da imenottero, lo scopo del presente studio osservazionale, prospettico, non interventistico è quello di individuare indicatori sierologici e/o clinico-strumentali che consentano di discriminare, nell'ambito dei soggetti con anafilassi da puntura di imenotteri, quelli a rischio delle reazioni più gravi caratterizzate da ipotensione arteriosa.

In letteratura si trovano anche dati contrastanti riguardo al cut-off dell'attività del PAF-AH, nei soggetti sani (Vadas et al., 2008; Pravettoni et al., 2014; Bacchetti et al., 2015; Brown et al., 2013).

In particolare, l'obiettivo primario è quello di confermare il ruolo dell'enzima PAF-AH, come test di routine nella pratica clinica, dal momento che sembra avere un ruolo nel prevedere il livello di gravità della reazione allergica, nel caso di punture di imenotteri.

Si valuteranno inoltre le differenze nei valori delle concentrazioni del PAF-AH tra il campione di pazienti allergici ad imenotteri e i soggetti con allergopatia respiratoria da rinite e/o asma.

Gli obiettivi secondari prevedono la valutazione di un'eventuale correlazione del PAF nei sottogruppi, all'interno della popolazione che presenta reazione sistemica al veleno di imenotteri, con altre condizioni come comorbidità, medicazioni concomitanti, reazione

sistemica, reazione al veleno di imenotteri con ipotensione, tipo di veleno (di ape o di vespa).

Verranno anche correlati i livelli di PAF con le caratteristiche demografiche (genere, età), e con i valori delle Ig E.

In ultimo, si valuteranno poi le differenze dell'attività del PAF-AH tra pazienti rinitici, ma non allergici al veleno di imenotteri, e quelli rinitici, ma allergici al veleno di imenotteri.

3. MATERIALI

E

METODI

3.1 Caratterizzazione dei pazienti

Nel presente studio, prospettico-osservazionale, sono stati reclutati dal 2015 al 2019, 93 pazienti afferenti alla SOD di Allergologia, degli Ospedali Riuniti di Ancona con una storia da reazione sistemica (RS) da puntura di imenotteri. I soggetti reclutati avevano una età media di 50 anni (66 maschi e 27 femmine).

È stata utilizzata la scala di Muller per stimare il livello di gravità dell'anafilassi:

- 7 pazienti di grado I
- 11 pazienti di grado II
- 38 pazienti di grado III
- 37 pazienti di grado IV

Successivamente, sono stati reclutati:

- 10 pazienti allergici ad imenottero che hanno però sviluppato una reazione locale estesa (RLE) con una età media di 48 anni (5 maschi e 5 femmine).

Per quanto riguarda il gruppo dei controlli, questi sono costituiti da:

- 12 soggetti (3 maschi e 9 femmine), con una età media di 52 anni, che non presentavano alcuna forma di allergia.
- 10 soggetti affetti da rinite ed asma bronchiale allergica con una età media di 45 anni
- 13 pazienti affetti da rinite allergica, con una età media di 41 anni

Le caratteristiche cliniche del gruppo dei pazienti che presentavano reazioni sistemiche (RS) sono riportate nella **tabella 1**.

Caratteristiche cliniche	
Età (anni)	50 (14-68)
M:F	66:27
Comorbidità cardiologiche	14%
Iperensione arteriosa	24%
Diabete	4%
Ipercolesterolemia	9%
Terapia con B-bloccanti	11%
Terapia con statine	10%
Terapia con sartanici	12%
Terapia con ACE-inibitori	4%
Terapia con antiaritmici	4%
Terapia con anticoagulanti	13%
Comorbidità allergologiche	10%
Imenottero pungitore	
• Api	26%
• Vespidi	67%

Tabella 1: Caratteristiche cliniche dei pazienti con reazioni sistemiche.

I pazienti (RS) che fanno parte della popolazione presa in esame, presentano una storia clinica caratterizzata da reazione sistemica secondo la classificazione di Mueller, e soddisfacevano i seguenti criteri:

- Età maggiore di 18 anni

- Storia clinica caratterizzata da reazione sistemica di II-III-IV grado (della classificazione di Mueller) da puntura di imenotteri
- Test cutanei (Skin Prick Test - SPT e test intradermici - IDT) e sierologici (dosaggio delle Ig E totali e specifiche con metodica ImmunoCAP) ad esito positivo
- Assenza di malattia dei mastociti e/o livelli basali di triptasi > 11,4 mcg/L
- Assenza di precedente immunoterapia per veleno di imenotteri
- Assenza di malattie cardiovascolari (cardiopatía ischemica o di altra origine in atto o pregressa; portatori di pace-maker cardiaco; affetti da fibrillazione atriale o altre aritmie maggiori; ipertesi in terapia farmacologica)
- Assenza di malattie infiammatorie, autoimmuni, infettive o neoplastiche
- Assenza di terapia con farmaci biologici, corticosteroidi, immunosoppressivi, antistaminici, antibiotici, antinfiammatori, chemioterapici
- Non stato gravidico in atto

Criteri di esclusione:

- Erano stati precedentemente sottoposti ad un'immunoterapia per veleno di imenotteri
- Avevano malattie infiammatorie, autoimmuni, infettive o neoplastiche
- Erano stati sottoposti ad una terapia con farmaci biologici, corticosteroidi, immunosoppressivi, antibiotici, antinfiammatori, chemioterapici, non immunizzati
- Età minore di 18 anni
- Stato di gravidanza

Per quanto riguarda i controlli, questi sono stati divisi in due gruppi:

- 1) 23 soggetti con storia clinica di allergopatia respiratoria, documentata da tests cutanei e/o dosaggio su siero delle Ig E specifiche, suddivisi a loro volta in due gruppi: 10 soggetti affetti da rinite allergica e 13 soggetti affetti sia da rinite che da asma allergica;
- 2) 12 volontari sani, con tests cutanei ad esito negativo verso inalanti, con anamnesi negativa per patologie allergiche, cardiovascolari, dismetaboliche o mastocitarie, in assenza di gravidanza, in assenza di terapie farmacologiche e prick test negativo verso inalanti.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico Regionale delle Marche; per ogni soggetto è stato acquisito un consenso informato che ne ha permesso l'arruolamento.

3.2 Analisi pre-reclutamento

Prima del prelievo del sangue venoso periferico tutti i soggetti reclutati sono stati sottoposti a:

- raccolta anamnestica dei dati e all'esame obiettivo.
- Tests cutanei con veleno di imenotteri eseguiti come da Linee Guida Europee (Bilò et al., 2005).
- Dosaggio su siero delle Ig E totali (PRIST) e specifiche (ImmunoCAP, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia) verso gli estratti di *Apis mellifera*, *Vespula germanica*, *Polistes dominulus*, *Vespa crabro*, rApi m 1, rApi m10, rVes v 1, rVes v 5, rPol d 5 e determinanti del carboidrato cross-reattivo (CCD).
- Dosaggio su siero della triptasi basale (v.n.<11.4 mcg/L) (ImmunoCAP, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia)

3.3 Separazione del plasma

I campioni di sangue, sia per i pazienti sia per i controlli, sono stati ottenuti mediante prelievo venoso periferico (5 mL) a digiuno. Come anticoagulante è stato utilizzato citrato di sodio. La provetta è stata centrifugata a freddo (4 °C) a 1000 rpm per 10 min. Il plasma è stato immediatamente separato dalla parte corpuscolata, contenente globuli rossi, ed è stato poi diviso in aliquote, e conservato a -80 °C fino all'uso. I campioni di sangue sono stati processati entro un'ora dal prelievo. Sia il sangue che i reagenti sono stati processati in condizioni sterili.

3.4 Concentrazione del campione di plasma

Prima di eseguire l'analisi, il plasma è stato concentrato ad un quarto del volume iniziale mediante i concentratori Amicon® Ultra-4 (Millipore, Billerica, MA) aventi un cut off di 30 KDa.

3.5 Dosaggio dell'attività del PAF-AH

La valutazione dell'attività del PAF-AH è stata effettuata usando il kit PAF Acetylhydrolase Assay (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI).

Il test usa il 2-thioPAF, che serve come substrato per la PAF-AH. In seguito all'idrolisi dell'acetil-tioestere legato in posizione sn-2 dalla PAF-AH, i tioli liberi sono rilevati usando l'acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB; reagente di Ellman). Il prodotto finale della reazione è l'Acido 5-tio-2-Nitrobenzoico, la cui assorbanza viene rilevata ad ogni minuto per 15 minuti con una lunghezza d'onda di 412 nm.

Il saggio viene condotto su micropiastre da 96 pozzetti utilizzando un lettore per micropiastre (Synergy HT).

Oltre i campioni in esame, è stata effettuata la lettura di un bianco (privo di enzima) e di un controllo positivo (con 10 µl di PAF-AH). L'attività di tale enzima è stata calcolata con la seguente formula:

$$\text{Attività PAF-AH } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}) = \frac{\Delta A_{412}/\text{min.}}{10.66 \text{ mM}^{-1}} \times \frac{0.225 \text{ ml}}{0.01 \text{ ml}}$$

L'attività viene espressa in U/ml (1U= 1µmol/min)

3.6 Analisi statistica

Le analisi condotte sui campioni di plasma dei pazienti e dei controlli, sono stati eseguiti in doppio. I risultati delle analisi sono stati espressi come Media ± Deviazione Standard (D.S.).

Il test ANOVA è stato utilizzato per valutare la significatività delle differenze tra i diversi gruppi presi in esame, con la correzione di Bonferroni, per la molteplicità e regressione multivariata per confounders.

Il t test di Student (unadjusted) è stato utilizzato per confrontare le medie, e la regressione lineare per le caratteristiche demografiche e per analizzare i livelli di Ig E specifiche (dopo trasformazione logaritmica).

Per le analisi statistiche è stato utilizzato il software STATA v.13 (StataCorp, College Station, Texas, USA) e le differenze sono state considerate significative per p<0,05.

4. RISULTATI

4.1 Pazienti

Nel presente studio sono stati arruolati 93 pazienti allergici agli imenotteri con anamnesi di reazione sistemica (RS) alla puntura di imenottero, che sono stati suddivisi in 4 gruppi secondo gravità, in base alla classificazione di Mueller:

- 7 pazienti di grado I
- 11 pazienti di grado II
- 38 pazienti di grado III
- 37 pazienti di grado IV

Successivamente, sono stati inclusi 10 pazienti allergici ad imenottero che hanno però sviluppato una reazione locale estesa (RLE).

I controlli sani sono costituiti da 12 soggetti che non presentavano alcuna forma di allergia. Al gruppo dei controlli sono stati aggiunti 10 pazienti che soffrono di rinite, ed altri 10 soggetti che soffrono sia di rinite sia di asma (allergopatia respiratoria).

Nel gruppo dei controlli con rinite ed asma bronchiale allergici, un soggetto ha presentato un valore di PAF molto alto, che superava il valore del controllo positivo interno al kit. ed è stato quindi escluso dall'analisi perché considerato un outlier.

Le caratteristiche cliniche del gruppo dei pazienti che presentavano reazioni sistemiche (RS) sono riportate nella **tabella 1**.

4.2 Attività del PAF-AH

Come mostrato nel **grafico 1**, è stata ottenuta una differenza statisticamente significativa ($p < 0.0001$) tra i valori del PAF-AH dei controlli e i soggetti allergici al veleno di imenottero, indipendentemente dal tipo di reazione che ciascun paziente ha avuto (RS e RLE).

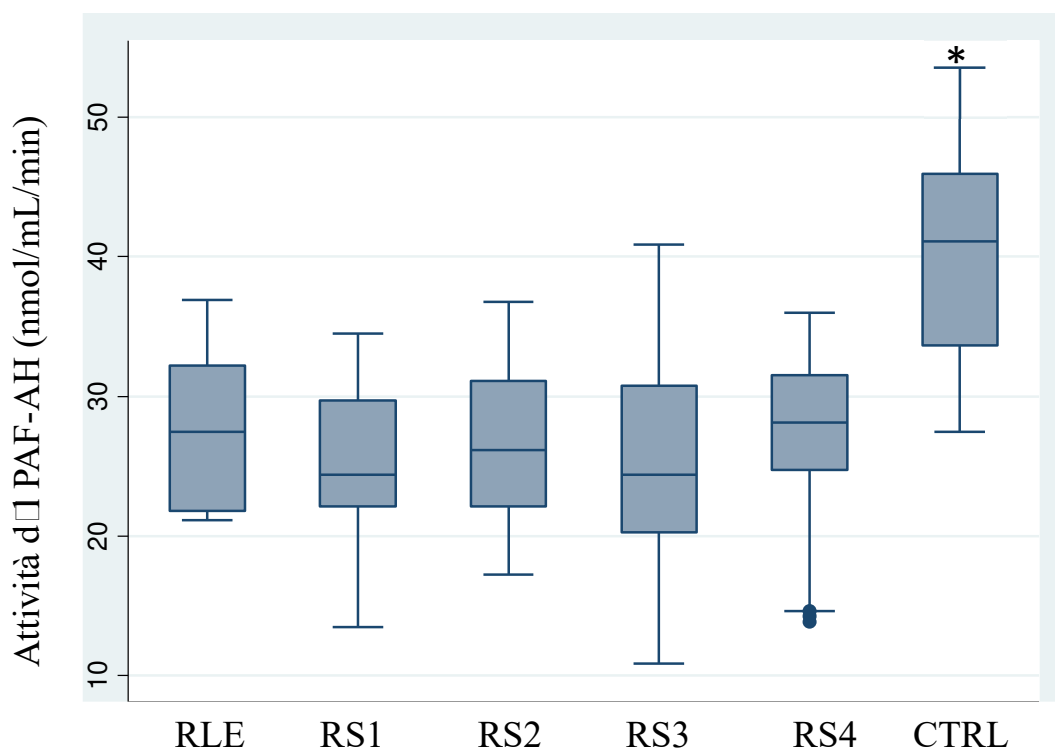


Grafico 1: Valori dell'attività del PAF-AH nei gruppi di soggetti analizzati; i boxplots sono realizzati come mediana (linee in grassetto all'interno del box) \pm quartili (linee verticali superiori ed inferiori). RLE=reazione locale estesa; RS1=reazione sistemica di grado I; RS2=reazione sistemica di grado II; RS3=reazione sistemica di grado III; RS4=reazione sistemica di grado IV; CTRL=controlli

Dal grafico possiamo anche notare che per quanto riguarda la categoria dei pazienti allergici al veleno, non c'è una differenza statisticamente significativa dell'attività del PAF-AH, tra i cinque gruppi analizzati, aventi gravità crescente di anafilassi. Infatti, non si sono trovate differenze statisticamente significative tra i pazienti RLE e i pazienti RS classificati secondo la scala di Mueller da 1 a 4. Non si sono avute differenze statisticamente significative neanche all'interno dei 4 gruppi di pazienti RS. Infatti, la distribuzione dei valori dei vari gruppi è sovrapponibile (**Grafico 1**).

Andando ad analizzare i diversi gruppi applicando la correzione di Bonferroni per test multipli (analisi adjusted per multiplicity), si possono notare una differenza

statisticamente positiva nei valori di attività del PAF-AH, tra i pazienti che presentano allergia agli imenotteri (RS e RLE) ed i soggetti che presentano la rinite allergica ($p < 0.0001$) ed analogamente una differenza statisticamente significativa, tra i pazienti affetti da rinite ed asma allergica ed i controlli sani ($p < 0.002$) (**Grafico 2**).

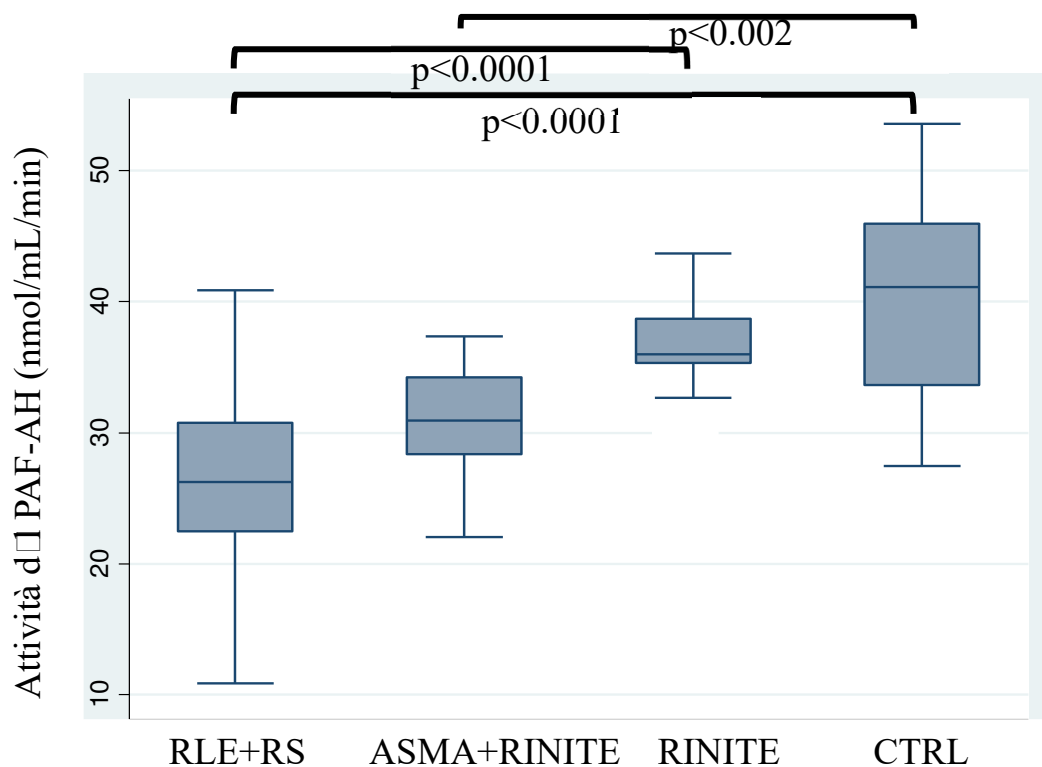


Grafico 2: Valori dell'attività del PAF-AH negli allergici agli imenotteri (RLE+RS), nei controlli con asma e rinite, nei controlli con rinite; nei controlli sani (CTRL); i boxplots sono realizzati come mediana (linee in grassetto all'interno del box) \pm quartili (linee verticali superiori ed inferiori).

Nei soggetti sani il livello dell'attività del PAF-AH è di circa 40 nmol/mL/min, per poi decrescere gradualmente nei soggetti di controllo con rinite, nei soggetti di controllo con asma e rinite, e nei pazienti con allergia al veleno di imenotteri (RLE + RS).

È stato verificato con l'analisi di regressione multivariata (adjusted for confounders), che fattori confondenti, come il genere o l'età, non modificano in modo significativo le differenze tra le varie categorie di soggetti. Quindi, la significatività delle analisi precedenti non è "viziata" dallo sbilanciamento dei gruppi (differente età o sbilanciamento di genere).

Nella successiva analisi statistica, i pazienti con reazione sistemica sono stati suddivisi in due gruppi, in base ai sintomi riportati nella cartella clinica: gruppo 1 (non ha manifestato ipotensione), gruppo 2 (ha manifestato una reazione ipotensiva).

Non è stata trovata una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi nell'analisi dell'attività del PAF-AH (**Grafico 3**).

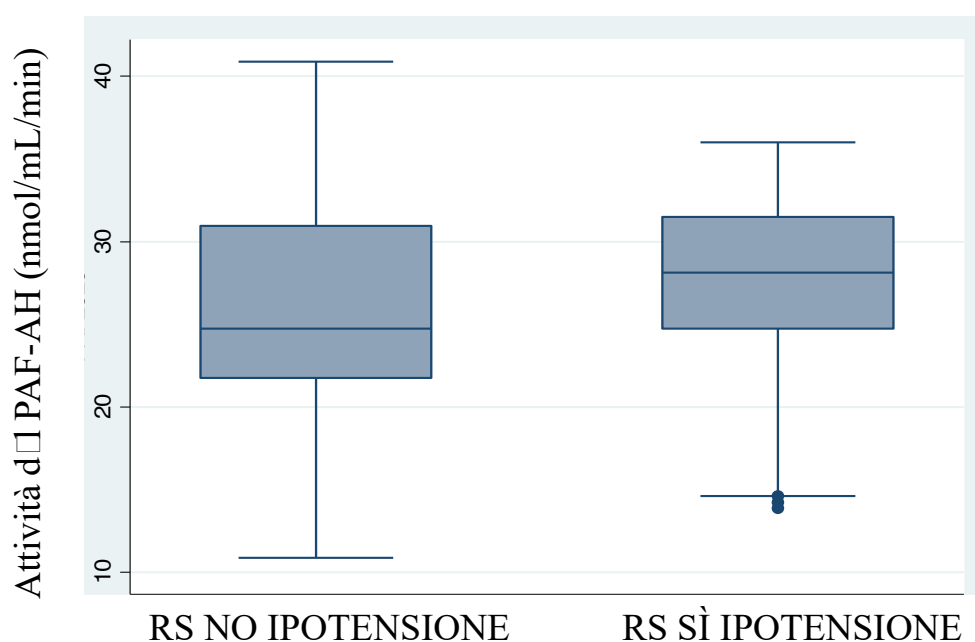


Grafico 3. Attività del PAF-AH nelle RS senza ipotensione e con ipotensione; i boxplots sono realizzati come mediana (linee in grassetto all'interno del box) \pm quartili (linee verticali superiori ed inferiori).

Infine, è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa ($p < 0.01$) tra i due tipi di veleno di imenottero, con i valori medi più alti nei vespidi (differenza +3.6) (Grafico 4).

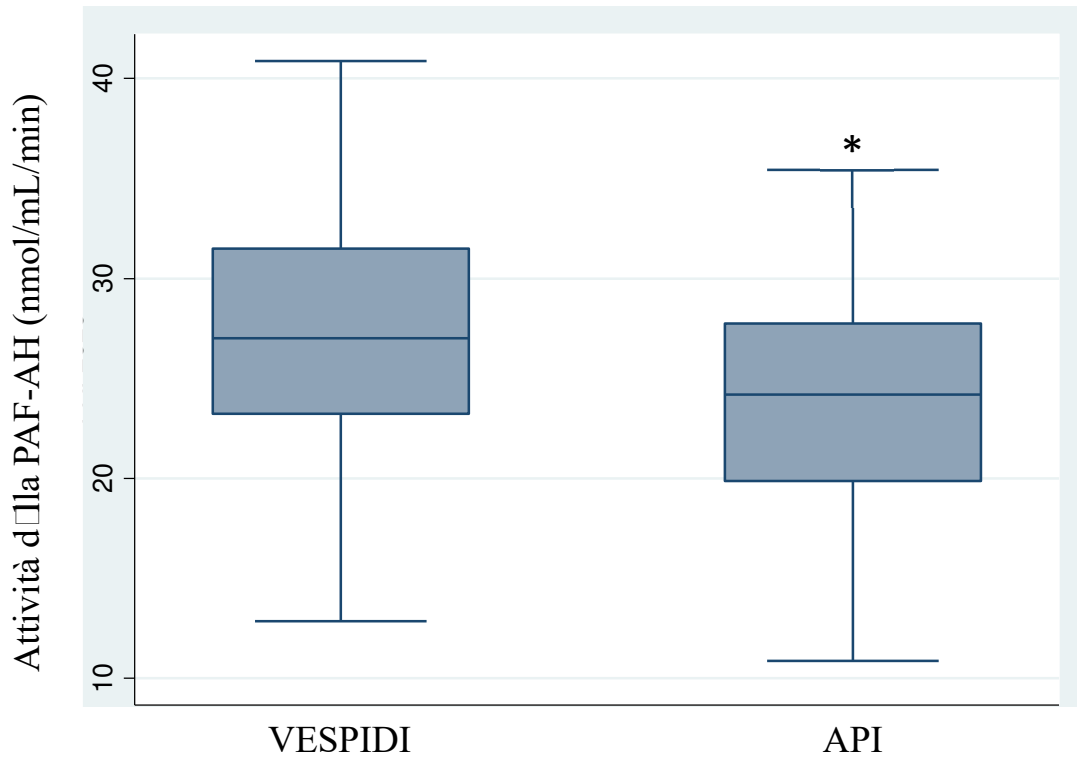


Grafico 4: Attività del PAF-AH nei pazienti RS con puntura di vespidi e puntura di api; i boxplots sono realizzati come mediana (linee in grassetto all'interno del box) \pm quartili (linee verticali superiori ed inferiori).

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata rilevata nell'attività del PAF-AH tra i differenti gradi Mueller se vespidi e api vengono considerati singolarmente.

5. DISCUSSIONE

L'allergia al veleno di imenotteri, presenta vari livelli di gravità, fino ad arrivare allo shock anafilattico, pur avendo i pazienti lo stesso identico profilo immunologico.

La gravità della reazione è condizionata da diversi fattori di rischio, che possono essere:

- **intrinseci**: livelli di triptasi superiori alla norma, malattie cardiovascolari, e concomitanti terapie farmacologiche

- **estrinseci**: per esempio il diverso insetto pungitore, e quindi un diverso tipo di veleno.

Tuttavia, non sono stati finora messi appunto dei tests che possano consentire di predire la gravità dell'anafilassi, ad eccezione del dosaggio basale della triptasi.

È ormai ben noto che il PAF è un mediatore importante dell'anafilassi, e poiché ha una breve emivita, lo si può dosare più facilmente valutando l'attività della PAF-AH, l'enzima che lo degrada, con il quale ha una correlazione inversa (Vadas et al., 2008).

Andare quindi a valutare l'attività del PAF-AH potrebbe rappresentare un biomarker di facile esecuzione nella pratica clinica.

Uno dei primi lavori apparsi in letteratura, nel campo dell'anafilassi da imenotteri, è quello di Vadas (Vadas et al., 2008), seguito poi da quello di Brown del 2013 (Brown et al., 2013). Anche questi ultimi avevano effettuato una valutazione in acuto, utilizzando anche attrezzature diverse. L'articolo più recente è invece quello di Pravettoni e collaboratori (Pravettoni et al., 2014). I ricercatori hanno valutato l'attività del PAF-AH nei pazienti con allergia al veleno di imenotteri, nell'intento di correlare tali valori con la gravità della reazione anafilattica. In questo studio è stata trovata una correlazione inversamente proporzionale: alla minore attività dell'enzima, corrisponde un maggiore gravità della reazione. Per indicare la gravità è stata utilizzata la scala di Mueller: dal valore 0 che corrisponde all'anafilassi soltanto cutanea, fino a valore IV che indica la presenza dell'ipotensione, perdita di coscienza, corrispondente al livello più grave.

Nel presente studio, il prelievo di siero è stato effettuato o durante la prima visita del paziente, oppure dopo un episodio di anafilassi, e comunque prima di iniziare l'immunoterapia.

È stata trovata una differenza statisticamente significativa ($p < 0.0001$), tra i pazienti che hanno sviluppato una reazione sistemica (RS) agli imenotteri e i controlli sani, dati che confermano i risultati dello studio di Pravettoni e collaboratori (Pravettoni et al., 2014).

Si può notare anche come i soggetti sani abbiano un livello di attività del PAF-AH di circa 40 nmol/ml/min, che poi tende a scendere gradualmente nei pazienti allergici affetti da rinite, rinite e asma contemporaneamente, per poi arrivare al livello minimo per i pazienti allergici al veleno degli imenotteri.

È risultata altresì statisticamente significativa la differenza tra i pazienti che presentano asma e i controlli sani ($p < 0.02$); anche questo dato sostanzialmente conferma quello che è scritto in letteratura, e cioè che chi soffre di asma ha livelli di attività del PAF-AH inferiori, e più il livello è basso, maggiormente si correla con un'asma grave.

Ci siamo focalizzati sul fatto che comunque, nel caso degli imenotteri, l'attività del PAF-AH è più bassa, e questo indica che questa popolazione di pazienti sia diversa da tutti gli altri pazienti allergici. Questo accade perché chi è allergico al veleno di imenottero, generalmente non sviluppa altri tipi di allergie, e quindi può essere considerata una popolazione a parte.

Infatti, proprio per questo motivo, gli allergici agli imenotteri non sviluppano cross-reazioni, cosa che invece avviene spesso nei pazienti che presentano allergia e anafilassi da alimenti, i quali possono presentare anche asma e/o rinite.

L'allergia agli imenotteri è scarsamente collegata all'atopia, cioè alle altre allergie e quindi avremmo una popolazione a sé stante, e questo, cioè la grande differenza con i controlli sani e gli atopici, è il risultato principale e rappresenta un elemento innovativo. In ambito allergologico esistono solo due lavori (Vadas et al., 2008; Pravettoni et al., 2014) che hanno individuato il livello di normalità dell'attività del PAF-AH al di sopra dei 20 nmol/ml/min. Vadas e collaboratori (Vadas et al., 2008) per primi, sviluppando una propria metodica in parte diversa da quella in commercio da noi utilizzata, hanno confrontato pazienti con anafilassi da varie cause e soprattutto in fase acuta (di cui solo due con allergia al veleno di imenotteri), ed hanno anche incluso un gruppo di anafilassi ad esito fatale.

Successivamente, Pravettoni e collaboratori (Pravettoni et al., 2014), utilizzando un kit commercialmente disponibile in Italia, cui hanno apportato modifiche in termini di concentrazione di plasma, hanno studiato una popolazione di soli pazienti allergici al veleno di imenotteri non in fase acuta, e hanno confermato i valori di normalità sopracitati. A differenza del nostro studio, però, la popolazione presa in esame nello studio di Pravettoni e collaboratori, non era ben caratterizzata, i loro pazienti presentavano comorbidità sia allergologiche che non, cosa che nell'articolo non viene specificato, e quindi la popolazione è diversa, o comunque non la stessa rispetto a quella considerata nel presente studio.

Già in quell'articolo era stato ipotizzato che potevano essere presenti anche dei polimorfismi del gene del PAF, come documentati in letteratura, dato che quella loro è una popolazione prevalentemente del Nord, mentre quella del presente studio è una popolazione prevalentemente del Centro-Sud.

Diversamente dal presente studio, la ricerca di Vadas e collaboratori (Vadas et al., 2008), è simile a quello di Pravettoni e collaboratori per quanto riguarda i risultati; infatti, si nota una correlazione tra l'attività del PAF-AH e i livelli di gravità. Però, la loro popolazione era diversa perché comprendeva pazienti allergici prevalentemente alimentari, e avevano solo due pazienti con allergia al veleno di imenotteri, e un gruppo di pazienti che hanno avuto anafilassi ad esito fatale.

Inoltre, i ricercatori hanno effettuato il prelievo in acuto, quindi in corso di attacco anafilattico, nel momento in cui il paziente aveva la reazione sistemica e quindi è ipotizzabile che i livelli del PAF siano più bassi, perché durante la reazione, l'enzima PAF-AH deve essere prodotto per ridurre la concentrazione del PAF, che aumenta notevolmente perché è in atto una reazione anafilattica. Risulta quindi giustificabile l'ipotesi secondo la quale la concentrazione del PAF sia più bassa durante la reazione sistemica, rispetto ai livelli basali di controllo. Dal momento che i livelli dell'attività del PAF-AH nel nostro lavoro sono diversi rispetto a quelli dello studio di Pravettoni, potrebbe essere quindi ipotizzato che probabilmente la metodica non sia così standardizzata e riproducibile in laboratori diversi.

In ultima analisi, non è stata descritta alcuna variazione statisticamente significativa tra i due gruppi di pazienti affetti da anafilassi con ipotensione e senza ipotensione.

Il presente studio è stato condotto con l'intento di trovare biomarkers clinici e/o sierologici, che permettano di comprendere quali siano i pazienti maggiormente a rischio di coinvolgimento vascolare, all'interno del gruppo di pazienti che presentano allergia al veleno di imenotteri. Il PAF-AH rappresenta quindi un biomarker importante nella pratica clinica anche per la facilità con la quale è possibile misurare la sua attività. Potrebbe

essere necessario rivalutare la metodica e/o i tempi di rilevazione, nel caso in cui, ampliando la casistica, i dati del presente studio sul PAF-AH, fossero confermati.

6. CONCLUSIONI

Questo studio dimostra come sia necessario individuare biomarkers di anafilassi, per quanto questo sia complesso, e metodi che, nella pratica clinica, permettano la loro misurazione.

Sono indispensabili ulteriori studi per comprendere il ruolo del PAF e di eventuali polimorfismi presenti nella popolazione, o comunque la causa che ha confutato i risultati dell'unico studio presente in letteratura sull'allergia al veleno da imenotteri (Pravettoni et al., 2014).

Questo permetterebbe di approfondire i meccanismi patogenetici nell'anafilassi e l'eventuale ruolo del background genetico, o di altri fattori, in un campo, quello dell'Allergologia, nel quale sono stati effettuati pochi studi.

Il presente studio presenta dei limiti in quanto sarebbe interessante andare a verificare la presenza di polimorfismi e la loro influenza, ma servirebbero grandi numeri e quindi un campione di popolazione molto ampio, difficile da reclutare.

Sono in corso ulteriori studi volti a valutare, sempre all'interno del gruppo degli allergici al veleno degli imenotteri, l'esclusione di tutti i pazienti con comorbidità, ed includere soltanto pazienti puri, quindi senza alcuna comorbidità.

7. Bibliografia

- Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. *Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19*. N Engl J Med. 2020; 383:120-128
- Allegro E. *Allergie, diagnosi e terapia rinite allergica. La diagnosi delle allergie: quali differenze ci sono tra i test cutanei e quelli su sangue?* Magazine di Allergologia, 2015 Tribunale della Stampa di Milano. n. 101, 2013, Direttore responsabile: Viviana Vischi, Editore: UpValue srl
- Alves I, Nogueira L, Chammas S, Jancar R, Silva A, Andrade LN, Jancar S, Chammas R. *Platelet activating factor receptor antagonists improve the efficacy of experimental chemo- and radiotherapy*. Clin. 2018 ; 73 (suppl 1): e792s
- Bacchetti T, Vignini A, Giulietti A, Nanetti L, Provinciali L, Luzzi S, Mazzanti L, Ferretti G. *Higher Levels of Oxidized Low Density Lipoproteins in Alzheimer's Disease Patients: Roles for Platelet Activating Factor Acetyl Hydrolase and Paraoxonase-1*. J Alz Dis. 2015; 46(1):179-86
- Barbaro JF, Zvaifler NJ. *Antigen induced histamine release from platelets of rabbits producing homologous PGA antibody*. Proc Soc Exp Biol Med. 1966; 122: 1245–1247
- Bauer CS, Kampitak T, Messieh ML, et al. *Heterogeneity in presentation and treatment of catamenial anaphylaxis*. Ann All Asth Imm. 2013; 111(2):107-111
- Biló BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JN. *EAACI Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity*. Diagn of Hym Vven Aall. 2005; 60(11):1339-49
- Bilò MB, Simons FER, Arduzzo LRF. *International consensus on (ICON) anaphylaxis*. W All Org J. 2014; 7:9

- Brown SG, Stone SF, Fatovich DM, Burrows SA, Holdgate A, Celenza A, Coulson A, Hartnett L, Nagree Y, Cotterell C, Isbister GK. *Anaphylaxis: clinical patterns, mediator release, and severity*. J Allergy Clin Immunol. 2013; 132(5):1141-1149
- Campbell RL, Li JT, Nicklas RA, et al. *Emergency department diagnosis and treatment of anaphylaxis: a practice parameter*. Ann All Asth Imm, 2014; 113(6):599-608
- Cottone C. *Shock anafilattico*. Il Blog di Carlo Cottone. Har Doc N, Medicina & Ricerca. 2016, Ok Medicina.it
- Denzlinger C, Haberl C, Wilmanns W. *Cysteinyl leukotriene production in anaphylactic reactions*. Int Arch All Imm. 1995; 108:158-64
- Dullaers M, De Bruyne R, Ramadani F, Gould HJ, Gevaert P, Lambrecht BN. *The who, where, and when of IgE in allergic airway disease*. J All Clin Imm. 2012; 129:635-45
- Evangelou AM. *PAF- Implications for coronary heart and vascular disease review*. Pr Leuk Ess Fatt Ac. 1994; 50:1–28
- Fan P, Hongwei L, Wang Y, Zhang F, Bai H. *Apolipoprotein E-containing HDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activities and malondialdehyde concentrations in patients with PCOS*. Repr Bio Med Online. 2012; 24: 197– 205
- Francis A, Bosio E, Stone SF, Fatovich DM, Arendts G, Nagree Y, et al. *Neutrophil activation during acute human anaphylaxis: analysis of MPO and sCD62L*. Clin Exp All. 2017; 47:361-70
- Friedman SA, Bernstein IL, Enrione M, et al. *Successful long-term immunotherapy for human seminal plasma anaphylaxis*. JAMA.1984; 251(20):2684-2687
- Galli SJ, Tsai M. *IgE and mast cells in allergic disease*. Nat Med. 2012; 18: 693-704

- Golden D.B. *Anaphylaxis to Insect Stings*. Imm All Clin N Am. 2015; 35, 287–302
- Gould HJ, Sutton BJ. *IgE in allergy and asthma today*. Nat Rev Imm, 2008; 8: 205-17
- Gounni AS, Lamkhioued B, Koussih L, Ra C, Renzi PM, Hamid Q. *Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI): role in asthma*. Fas J. 2001; 15:940-9
- Higashi N, Mita H, Ono E, Fukutomi Y, Yamaguchi H, Kajiwara K, et al. *Profile of eicosanoid generation in aspirin-intolerant asthma and anaphylaxis assessed by new biomarkers*. J All Clin Imm. 2010; 125:1084-91
- Huang E, Changhui L, Jingjing Z, Xiaolong H, Weian D, Yuanjian H, Chengshi L, Xiaoguang W, Dayue T, Xueling O, Hongyu S, Zhaoshu Z, Chao L. *Genome-wide screen for universal individual identification SNPs based on the HapMap and 1000*. Gen dDat Sc Rep. 2018; 8: 5553-5559
- Huang Q, Li F, Liu X, Li W, Shi W, Liu FF, et al. *Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy*. Nat Med. 2011;17(7):860-6
- Ishizaka K, Ishizaka T, Richter M. *Effect of reduction and alkylation on allergen-combining properties of reaginic antibody*. J All. 1966; 37:135-44
- Jerschow E, Lin RY, Scaperotti MM, et al. *Fatal anaphylaxis in the United States, 1999-2010: temporal patterns and demographic associations*. J All Clin Imm. 2014; 134(6):1318-1328
- Johnson AD, Zhang Y, Papp AC, Pinsonneault JK, Jeong-Eun L, Saffen D, Zunyan D, Wang D, Sadée W. *Polymorphisms affecting gene transcription and mRNA processing in pharmacogenetic candidate genes: detection through allelic expression imbalance in human target tissues*. Phgen Gen. 2008; 18(9):781-91

- Kostadinova A, Topouzova-Hristova T, Tzoneva AR, Berger MR. *Struttura del fattore attivante le piastrine (PAF). Antitumor Lipids-Structure, Functions, and Medical Applications*. *Advs Prot Chem Str Biol*. 2015; 42: 27-66
- Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi DS. *The human mast cell: an overview*. *Meth Mol Biol*. 2006; 315:13-34
- Krzysztof P, Bartuzi Z. Letter to the editor *Platelet activating factor in allergies*. *Int Journal of Imm and Phys*. 2015; 28(4): 584–589
- Kurtova AV, Xiao J, Mo Q, Pazhanisamy S, Krasnow R, Lerner SP, et al. *Blocking PGE2-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance*. *Nat*. 2015; 517(7533):209-13
- Lee J, Kim S, Kim M, et al. *Anaphylaxis to husband's seminal plasma and treatment by local desensitization*. *Clin Mol Allergy*. 2008; 6:13
- Lieberman P, Nicklas RA, Randolph C, et al. *Anaphylaxis—a practice parameter update*. *Ann All Asth Imm*. 2015; 115(5): 341-384
- Lo Verde D, Files DC, Krishnaswamy G. *Angioedema*. *Crit Ca Med*. 2017; 45(4): 725-735
- Lo Verde D, Iweala OI, Eginli A, and Krishnaswamy G. Contemporary Reviews in Critical Care Medicine, *Anaphylaxis*. Ch. 2018;153(2):528-543
- Mac Glashan D. Jr. *Histamine: a mediator of inflammation*. *J All Clin Imm*. 2003; 112(suppl): S53-9
- Manzini A and Vitiello L. *La medicina predittiva e il dibattito etico sui test genetici*. *Quest di vita: Intr alla bio*. 2019; 15 367-388, Franco Angeli

- Modena BD, Dazy K, White AA. *Emerging concepts: mast cell involvement in allergic diseases*. *Transl Res*. 2016; 174: 98-121
- Mukai K, Gaudenzio N, Gupta S, Vivanco N, Bendall SC, Maecker HT, et al. *Assessing basophil activation by using flow cytometry and mass cytometry in blood stored 24 hours before analysis*. *J All Clin Imm*. 2017; 139: 889-99
- Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Beyer K, Bindslev-Jensen C, Cardona V, et al. *EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy*. *Akdis CA; EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group*. *All*. 2014;69 (8): 1008- 2510
- Nomikos TN, Iatrou C, Demopoulos CA. *Acetyl-CoA:1-O-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase (lyso-PAF AT) activity in cortical and medullary human renal tissue*. *Eur J Biochem*. 2003; 270: 2992-3000
- Oettgen HC. *Fifty years later: Emerging functions of IgE antibodies in host defense, immune regulation, and allergic diseases*. *J All Clin Imm*. 2016; 137: 1631-45
- Ono E, Taniguchi M, Mita H, Fukutomi Y, Higashi N, Miyazaki E et al. *Increased production of cysteinyl leukotrienes and prostaglandin D2 during human anaphylaxis*. *Clin Exp All*. 2009; 39:72-80
- Platts-Mills TA, Schuyler AJ, Erwin EA, Commins SP, Woodfolk JA. *IgE in the diagnosis and treatment of allergic disease*. *J Allergy. Clin Imm*. 2016; 137: 1662-70
- Pravettoni V, Piantanida M, Primavesi L, Forti S, Pastorello EA. *Basal platelet activating factor acetylhydrolase: prognostic marker of severe Hymenoptera venom anaphylaxis*. *J All Clin Imm*. 2014; 133(4):1218-20

- Pravettoni V. *Dosaggio dell'attività enzimatica della PAF-AH plasmatica*. PAF-AH dosaggio completo, 2014.
- Ramakrishnan AVKP, Varghese TP, Vanapalli S, Nair NK, Mingate MD. *Platelet activating factor: A potential biomarker in acute coronary syndrome?* Card Th. 2017; 35: 64–70
- Ramírez-Bello J, Vargas GA, Tovilla-Zárate C, Fragoso JM. *Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rSNP) and structural RNA (srSNPs) in complex diseases*. Gac Med Mex. 2013; 149(2): 220-8
- Reber LL, Hernandez JD, Galli SJ, Calif Glossary, Daniel Searing. *Mechanisms of allergic diseases: The pathophysiology of anaphylaxis*. J All Clin Imm. 2017; 140:335-48
- Reznichenko A and Korstanje R. *The Role of Platelet-Activating Factor in Mesangial Pathophysiology*. PAF and Mes C. 2015; 185(4): P888-896
- Ribatti D. *The discovery of immunoglobulin E*. Imm Lett. 2016; 171: 1-4
- Ring J, Brockow K, Behrendt H. *History and classification of anaphylaxis*. Nov F Sy. 2004; 257: 6-16
- Ronan L, Tsoupras A, Zabetakis I, Constantinos AD. *Forty Years Since the Structural Elucidation of Platelet-Activating Factor (PAF): Historical, Current, and Future Research Perspectives*. Mol. 2019; 24 (23): 4414, Ferdinando Nicoletti Academic Editor
- Saratzis A, Bown MJ, Wild B, Nightingale P, Smith J, Johnson C, Melas N, Kitas GD. *Association between seven single nucleotide polymorphisms involved in inflammation and proteolysis and abdominal aortic aneurysm*. M-An J Vasc Surg. 2015; 61(5):1120-8

- Schlondorff D, Goldwasser P, Neuwirth R, Satriano JA, Clay KL. *Production of platelet-activating factor in glomeruli and cultured glomerular mesangial cells.* Am J Physiol. 1986; 250(6): F1123-F1127
- Schroeder JT. *Basophils: emerging roles in the pathogenesis of allergic disease.* Immunol. Rev. 2011; 242: 144-60
- Schwender H, Ruczinski I, Ickstadt K. *Testing SNPs and sets of SNPs for importance in association studies Comparative Study.* Biostatistics. 2011; 12 (1): 18-32
- Sclar DA, Lieberman PL. *Anaphylaxis: underdiagnosed, underreported, and undertreated.* Am J Med. 2014; 127 (1 Suppl): S1-S5
- Simons FE, Arduzzo LR, Bilò MB, et al. *International consensus on (ICON) anaphylaxis.* WAOJ. 2014; 7 (1): 9
- Simons FER, Arduzzo LRF, Bilò MB, El-Gamal YM, Ledford DK, Ring J, Sanchez-Borges M, Senna GE, Sheikh A, and Thong BY. *World Allergy Organization Guidelines for the Assessment and Management of Anaphylaxis.* WAO J. 2011; 4:13–37
- Sokol J, Skerenova M, Ivankova J, Simurda T, Stasko J. *Association of Genetic Variability in Selected Genes in Patients With Deep Vein Thrombosis and Platelet Hyperaggregability.* Clin Appl Thromb Hemost. 2018; 24 (7): 1027-1032
- Soter NA, Lewis RA, Corey EJ, Austen KF. *Local effects of synthetic leukotrienes (LTC₄, LTD₄, LTE₄, and LTB₄) in human skin.* J Inv Derm. 1983; 80:115-119
- Stanworth DR, Humphrey JH, Bennich H, Johansson SG. *Specific inhibition of the Prausnitz-Kustner reaction by an atypical human myeloma protein.* Lan. 1967; 290 (7511): 330-332

- Theoharides TC, Smaragdi A, and Constantinos AD. *Coronavirus 2019, Microthromboses, and Platelet Activating Factor*. *CI Th*. 2020; 42:1850-1852.
- Tordesillas L, Rahman AH, Hartmann BM, Sampson HA, Berin MC. *Mass cytometry profiling the response of basophils and the complete peripheral blood compartment to peanut*. *J All Clin Imm*. 2016; 138: 1741-4 e 9
- Vadas P, Gold M, Perelman B, Liss GM, Lack G, Blyth T, et al. *Platelet activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis*. *N Engl J Med*. 2008; 358:28-35
- Vadas P, Perelman B, Liss G. *Platelet-activating factor, histamine, and tryptase levels in human anaphylaxis*. *J All Clin Imm*. 2013; 131 (1):144-148
- Vitte J. *Human mast cell tryptase in biology and medicine*. *Mol Imm*. 2015; 63(1):18-24
- Waterfield T, Dyer E, Wilson K, et al. *How to interpret mast cell tests*. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2016; 101(5): 246-251
- Zhang R, Qi S, Hongwei L, Huai B, Zhang Y, Qingqing L, Guan L, Fan P. *Effect of the R92H and A379V genotypes of platelet-activating factor acetylhydrolase on its enzyme activity, oxidative stress and metabolic profile in Chinese women with polycystic ovary syndrome*. *Reproductive BioMedicine Online*. 2012; 24: 197- 205
- Zheng GH, Xiong SQ, Mei LJ, et al. *Elevated plasma platelet activating factor, platelet activating factor acetylhydrolase levels and risk of coronary heart disease or blood stasis syndrome of coronary heart disease in Chinese: A case control study*. *Inflamm*. 2012; 35: 1419–1428

9. Ringraziamenti

*Un ringraziamento speciale alla mia relatrice, prof.ssa Arianna Vignini,
per avermi guidata in questo percorso
con la sua grande disponibilità ed i suoi preziosi consigli per la stesura della tesi.*

*Grazie alla mia correlatrice, prof.ssa Maria Beatrice Bilò,
e alla dott.ssa specializzanda Alice Corsi,
per aver messo a disposizione materiale utile ad approfondire l'argomento.*

*Grazie a chi ha lavorato per questo progetto di ricerca
nonostante la pandemia di Covid-19, in particolare
alla dott.ssa Sonila Alia
e alla dott.ssa Alice Di Paolo.*