

ABSTRACT

Leptin is involved in the lung epithelial homeostasis. Its role in the nasal tract is largely unknown. Allergic rhinitis (AR) is induced by the allergen exposure leading to a consequential structural abnormalities in the nasal epithelium. Topical corticosteroids are recommended as first-line therapy in AR. Parietaria pollen is one of the most important allergenic sources in the southern Europe. *In vitro* on human nasal epithelial cell line RPMI 2650, we aimed to determine whether allergen stimulation acts on leptin/leptin receptor pathway and how Fluticasone Furoate (FF) influences this pathway. The effects of the major allergen rPar j 1, of FF, of leptin and of $TGF\beta_1$ on cell proliferation and on leptin/leptin receptor expression and modulation (by clonogenic test, by RT-q-RT-PCR, by immunocytochemistry and by flow-cytometry, respectively) and on STAT-3 activation (assessing nuclear translocation by western blot analysis) were assessed. We found that *rPaj1* and $TGF\beta_1$ significantly decreased cell proliferation and down-regulated the leptin/leptin receptor pathway whereas leptin and FF reverted them, alone and together combined. Furthermore, rPar j 1 reduces while leptin and FF increases STAT-3 activation. In conclusion, leptin and FF are able to preserve nasal epithelial homeostasis restoring the leptin/leptin receptor pathway altered by rParj 1 exposure.

1. INTRODUZIONE

Nell'ultimo decennio, nei paesi industrializzati si è verificato un rapido incremento di prevalenza di patologie allergiche (rinite ed asma) e dell'obesità. Diversi studi sperimentali dimostrano una stretta correlazione tra rinite allergica, asma e obesità grazie ad un modello infiammatorio comune. Infatti, l'aumento del tessuto adiposo potrebbe determinare una condizione infiammatoria tale da influenzare anche la fisiologica funzionalità delle vie aeree, peggiorando una malattia allergica preesistente o stimolando l'evoluzione di una sensibilizzazione a una forma di allergia respiratoria (Ciprandi G, et al, 2011).

L'aumento dell'indice di massa corporea, potrebbe determinare cambiamenti nella meccanica delle vie aeree e nell'infiammazione sistemica.

Nel soggetto obeso si riscontrano nel circolo sanguigno una serie di mediatori, conosciuti come adipochine, che possono indurre uno stato di infiammazione in organi distanti dal tessuto adiposo. Tra queste emergono la leptina, con funzione prevalentemente infiammatoria e l'adiponectina, con funzione prevalentemente anti-infiammatoria. In particolare, è stato dimostrato che nell'asma queste adipochine rilasciano fattori chemio tattici per cellule infiammatorie, oltre ad altri mediatori, inclusi il TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*), l'IL-6 (Interleuchina 6) e l'IL-10 (Shore SA, et al, 2008; 2006).

La leptina, considerata all'inizio della sua scoperta come l'ormone "anti-obesità", il cui ruolo principale era quello di segnalare lo stato nutrizionale all'ipotalamo, inducendo il senso di sazietà, nel corso degli anni, attraverso molteplici studi

sperimentali, è stata rivalutata come una molecola pleiotropica in grado di svolgere funzioni regolatorie in diversi organi e sistemi (Matarese G, et al, 2010). Nell'apparato respiratorio, è coinvolta nella modulazione dello sviluppo polmonare ed è considerata un marcatore fisiologico di maturità polmonare (Vernooy JH, et al, 2013); regola l'omeostasi e la riparazione tissutale dell'epitelio bronchiale (Goren I, et al, 2003; Bruno A, et al, 2005; Bruno A, et al, 2009; Bruno A, et al, 2011); ed è coinvolta nei processi infiammatori a carico delle vie aeree superiori (Taideman J, et al, 2010). Pertanto la leptina svolge un ruolo chiave nei processi patologici a carico delle alte e basse vie respiratorie come broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) (Bruno A, et al, 2005), asma bronchiale (Bruno A, et al, 2009), poliposi nasale (Taideman J, et al, 2010; Song SY, et al, 2010) e adenocarcinoma polmonare (Bruno A, et al, 2011).

In particolare è stato identificato il ruolo della leptina nel mantenimento dell'omeostasi e della proliferazione epiteliale bronchiale. Infatti, studi sperimentali caso-controllo condotti *ex-vivo* su biopsie bronchiali di pazienti affetti da BPCO (Bruno A, et al, 2005) e da asma di varie entità (Bruno A, et al, 2009) dimostrano che il pathway leptina/leptina recettore è diminuito nell'epitelio di questi pazienti rispetto alle categorie controllo. Nell'epitelio del paziente asmatico, l'espressione sia della leptina che del suo recettore si ripristina in presenza del trattamento farmacologico con corticosteroidi ed è inversamente correlato con la presenza di marker del rimodellamento (*Transforming Growth Factor beta - TGF- β ₁* e spessore della lamina basale) (Bruno A, et al, 2009).

La relazione fra asma e rinite allergica negli ultimi anni è diventata sempre più evidente. Si ritiene che il 20-50% dei pazienti con rinite allergica hanno l'asma e oltre l'80 % dei pazienti con l'asma hanno rinite, spesso non diagnosticata e non trattata (Bousquet J, et al, 2012). Queste due patologie, presentano similitudini anatomiche, fisiologiche, immunopatologiche, fisiopatologiche e terapeutiche.

E' stato inoltre dimostrato che l'infiammazione nasale e bronchiale si influenzano a vicenda attraverso un effetto sistemico (Braunstahl GJ, et. Al 2003). Per tutte queste ragioni, è stato coniato il termine "*United Airway Diseases*" (UAD) per sottolineare la presenza di una continuità fra i processi patologici a carico delle alte (naso e seni paranasali) e delle basse (albero bronchiale) vie respiratorie (Passalacqua G, et al, 2001).

Sebbene la relazione fra patologie allergiche ed obesità, asma e leptina e fra asma e rinite siano note, resta inesplorato il ruolo della leptina nella rinite allergica.

Attualmente, recenti studi sperimentali dimostrano la presenza della leptina e del suo recettore nelle cavità nasali, sia nella mucosa respiratoria (Taideman J, et al, 2010) che in quella olfattiva (Lacroix MC, et al, 2011) suggerendo un possibile ruolo di questa adipochina nei processi patologici a carico delle prime vie aeree. Tuttavia, ad oggi risulta ancora inesplorato il ruolo della leptina nell'epitelio nasale dei soggetti affetti da rinite allergica.

Obiettivo di questo studio sperimentale è stato quello di dimostrare un possibile ruolo del pathway leptina/leptina recettore sull'omeostasi dell'epitelio nasale umano.

1.1 La leptina

Identificata per la prima volta nel 1994, a seguito di clonazioni posizionali, come il prodotto del gene *ob* localizzato sul cromosoma 6 di topo, la leptina (dal Greco “ληπτος” che significa “magro”) funziona



principalmente da molecola segnale che, in relazione ai depositi di grasso ed allo stato nutrizionale dell'organismo, limita a livello centrale l'assunzione di cibo ed aumenta a livello periferico il dispendio energetico, svolgendo quindi un ruolo chiave nel mantenimento di un peso corporeo stabile. Mutazioni genetiche nella espressione di tale proteina o del suo recettore determinano l'insorgenza di obesità ed infertilità nei roditori *ob/ob* (Zhang Y, et al, 1994).

La leptina dei mammiferi è un ormone proteico di 167 aminoacidi con una sequenza segnale secretoria di 21 aminoacidi. La traslocazione della leptina verso l'esterno della cellula è mediata dal taglio proteolitico della sequenza segnale e dalla successiva immissione nel circolo sanguigno della proteina (Zhang Y, et al, 1994; Considine RV, et al, 1997) (**Figura 1**).

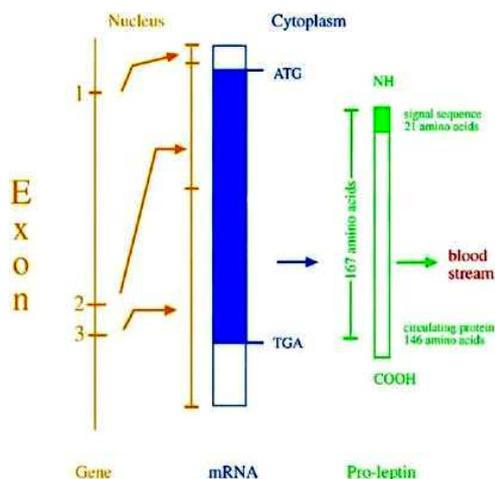


Figura 1: Sintesi della leptina. Il gene *ob* consiste di 2 esoni e 2 introni. Dalla trascrizione del gene *ob* (marrone) si ottiene mRNA (blue) di 3.5 kb, il quale codifica per un pro-ormone di 167 aminoacidi (verde) con una sequenza segnale secretoria di 21 aminoacidi che verrà rimossa prima del rilascio della leptina in circolo.

La leptina circola nel plasma come peptide libero o associato ad altre proteine plasmatiche, o legato alla forma solubile del suo recettore (Horn R, et al, 1996; Houseknecht KL, et al, 1996).

Nell'uomo la leptina è prodotta dal gene *ob* localizzato sul cromosoma 7q31.3 costituito da tre esoni e due introni. Viene secreta principalmente dagli adipociti del tessuto adiposo bianco (Zhang Y, et al, 1994; Maffei M, et al, 1995; Leroy P, et al, 1996; Friedman JM, et al, 1998; Ahima RS, et al, 2000) svolgendo il ruolo di molecola segnale nel controllo neuroendocrino dell'assunzione di cibo. La leptina infatti insieme all'isulina è in grado di stimolare i circuiti ipotalamici responsabili del bilancio tra *food intake* e dell'*energy expenditure* (Wauman J, et al, 2011) (Figura 2).

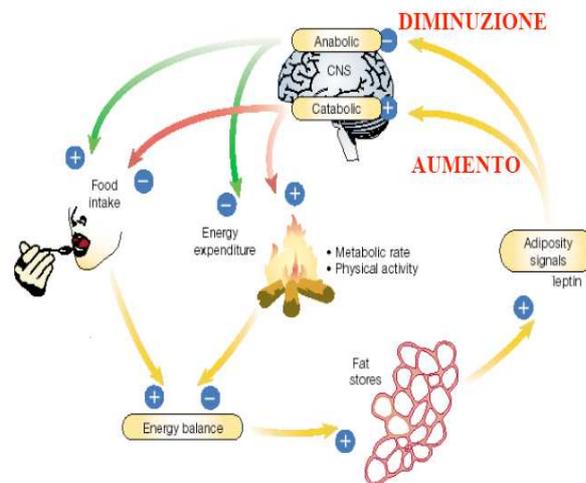


Figura 2: Controllo neuroendocrino dell'assunzione di cibo da parte della leptina.

Nell'uomo la leptina è prodotta dalla mucosa gastrica (Mix H, et al, 2000), dalle cellule dell'epitelio intestinale (Barrenetxe J, et al, 2002), dal colon (Sitaraman S, et al, 2004), dalla placenta (Masuzaki H, et al, 1997), dall'epitelio della ghiandola

mammaria (Smith-Kirwin SM, et al, 1998), dal muscolo scheletrico (Ur E, et al, 2002), dall'ipotalamo (Morash B, et al, 1999), dall'ipofisi (Jin L, et al, 2000), dall'osso (Reseland JE, et al, 2001), dal midollo osseo (Laharrague P, et al, 1998), dalle cellule epiteliali bronchiali (Bruno A, et al, 2011), dagli pneumociti di tipo II (Vernooy JH, et al, 2009), dai lipofibroblasti (Torday JS, et al, 2002).

La struttura terziaria della leptina, è caratterizzata da un *left twisted helical bundle* formato da 2 coppie di α -eliche antiparallele stabilizzate da un unico ponte disolfuro tra le porzioni C-terminali delle eliche. Struttura di questo tipo è caratteristica comune alle *citochine di classe I a catena lunga* come: l'interleuchina (IL)-6, l'IL-11, l'IL-12, il LIF) (Taga T, et al, 1997) (**Figura 3**).

Inoltre, è stato dimostrato, che il ponte disolfuro, che coinvolge due residui di cisteina (Cys96 e Cys146) del C-terminale della leptina e la parte iniziale di uno degli anelli, è fondamentale per la formazione della corretta struttura tridimensionale della proteina oltre che per il legame al recettore. La mutazione di uno dei due residui di cisteina rende infatti la proteina biologicamente inattiva (Prolo P, et al, 1998).

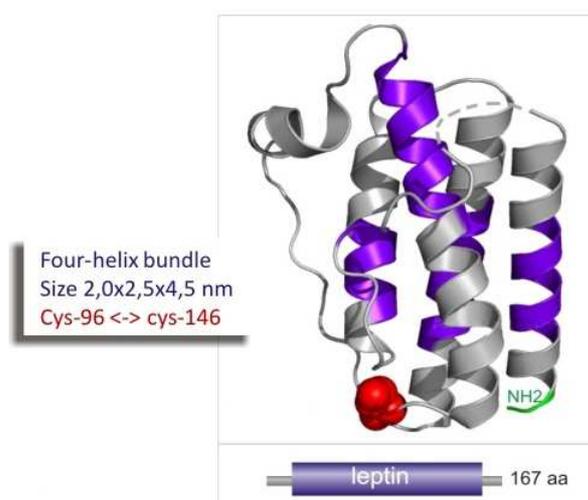


Figura 3:
Rappresentazione
schematica della
struttura della leptina

Gli effetti biologici della leptina sono mediati da specifici recettori localizzati sulle membrane citoplasmatiche delle cellule degli organi bersaglio.

Il recettore della leptina è espresso nei tessuti periferici e nelle cellule compreso: polmone, rene, ghiandola surrenale, precursori delle cellule ematopoietiche e midollo osseo, neutrofili, monociti, e linfociti T (Fantuzzi G, et al, 2000).

Nell'apparato respiratorio, il recettore della leptina è stato individuato: nelle cellule epiteliali bronchiali (Bruno A, et al, 2005; 2009; 2011); nelle cellule muscolari lisce (Nair P, et al, 2008); nelle cellule epiteliali alveolari, compresi gli pneumociti di tipo II (Tsuchiya T, et al, 1999; Vernoooy JH, et al. 2009); nella mucosa nasale di pazienti sani e affetti da poliposi nasale (Taldeman J, et al, 2010); nella mucosa olfattiva (Lacroix MC, et al, 2011). Il recettore della leptina (Ob/R) è stato isolato come prodotto del gene *db* (Tartaglia LA, et al, 1995).

Questo recettore consta di un singolo motivo transmembrana che presenta una stretta omologia con alcuni recettori delle citochine di classe I come la componente gp-130 del recettore dell'IL-6. Sono note 6 diverse isoforme del recettore della leptina ottenute per *splicing* alternativo del gene *db* (Lee GH, et al, 1996): **Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd,**

Ob-Re, Ob-Rf.

In base alla lunghezza del dominio intracellulare, le isoforme vengono classificate in tre gruppi: isoforma lunga (Ob/Rb), isoforme brevi (Ob-Ra, c, d, f) e isoforma solubile (OB-Re) (**Figura 4**).

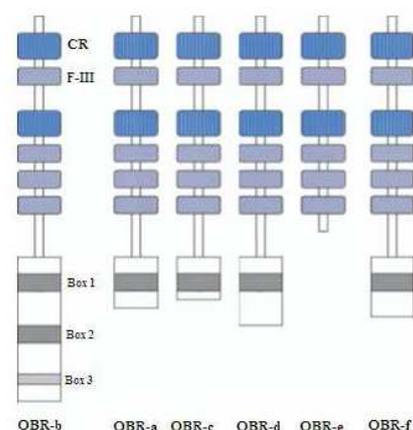


Figura 4: rappresentazione schematica delle diverse isoforme del recettore della leptina.

Tutte le isoforme hanno in comune uno dominio extracellulare di oltre 800 amminoacidi e un dominio transmembrana di 34 aminoacidi ad eccezione della forma solubile che è formata dal solo dominio extracellulare e costituisce il *carrier* della leptina circolante.

Le isoforme brevi e l'isoforma lunga condividono i primi 29 aminoacidi del dominio intracellulare, definito *box1*, tale dominio, ricco in prolina, è necessario per l'interazione e l'attivazione con le tirosin chinasi JAKs (*Janus Kinase*). L'isoforma lunga, possiede altre due sequenze intracellulari consenso, *box 2* e *box 3* responsabili dell'attivazione della principale via di trasduzione del segnale mediato dalla leptina, la via *JAK/STAT* (Baumann H, et al, 1996; Bahrenberg G, et al, 2002; Pathak RR, et al, 2013). L'isoforma lunga, espressa a livelli elevati nell'ipotalamo, ma anche a livello periferico nella milza, nelle cellule CD34⁺, nei linfociti CD4⁺ e CD8⁺, nelle piastrine, nelle cellule endoteliali, nel rene, nelle cellule β del pancreas, negli adipociti bianchi e bruni, negli enterociti, nella ghiandola mammaria (durante la gravidanza e l'allattamento) e nella placenta e polmone (Jensen MD, et al, 1999) è stata considerata, per lungo tempo, l'unica variante funzionalmente attiva. Recentemente, è stato dimostrato che le isoforme brevi, predominanti nei tessuti periferici, nonostante manchino di una parte del dominio intracellulare, sono in grado di trasdurre il segnale mediato dalla leptina (Russo VC, et al, 2004; Cirillo D, et al, 2008; Wauman J, et al, 2011). La leptina infatti è in grado di attivare dei pathway alternativi come quello delle MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) e del PI3K (*Phosphoinositide 3- kinases*) (Wauman J, et al, 2011).

La via di trasduzione *JAK/STAT* comprende quattro tirosine chinasi JAKs (*Janus Kinase*) e sette fattori di trascrizione STATs (*Signal transducer and activators of transcription*) i quali sono regolati dalla fosforilazione in specifici residui di serina e tirosina. In assenza del legame tra la leptina ed il suo recettore, quest'ultimo si presenta come un omodimero non funzionale. La formazione di un dimero, in seguito all'interazione con la leptina, è fondamentale per l'attivazione delle diverse vie di trasduzione del segnale. Infatti, quando la leptina interagisce con il suo recettore, causa un cambiamento conformazionale del recettore che espone il dominio di legame per la tirosinchinasi JAK2 che si lega al recettore, si autofosforila e fosforila il recettore su due residui tirosinici essenziali: Y985 e Y1138. Alla tirosina fosforilata in posizione 1138 si lega STAT3 che viene fosforilato da JAK2, dimerizza, trasloca nel nucleo e va ad attivare l'espressione di numerosi geni deputati alla regolazione di crescita, differenziazione, proliferazione, sopravvivenza e apoptosi cellulare. Alla tirosina fosforilata in posizione 985 si lega la tirosin fosfatasi SHP2 che è fosforilata da JAK2 e va ad attivare la via di segnale delle MAP chinasi attraverso l'attivazione di Ras (Bjorbaek C, et al, 2001). Inoltre STAT3 nel nucleo induce la trascrizione di STAT stesso e delle SOCS3 (*Suppressor of Cytokine Signaling Proteins*), una famiglia di regolatori a *feedback* negativo, indotti da segnali citochinici. Le SOCS3, legandosi al sito di fosforilazione del recettore sulla tirosina in posizione 1138, inibiscono la trasmissione del segnale mediato dalla leptina tramite la via *JAK/STAT* (Bjorbak C, et al, 2000) controllando un'eccessiva stimolazione che potrebbe portare ad un'attivazione inappropriata di STAS ed ad un suo conseguente comportamento da oncogene (**Figura 5**).

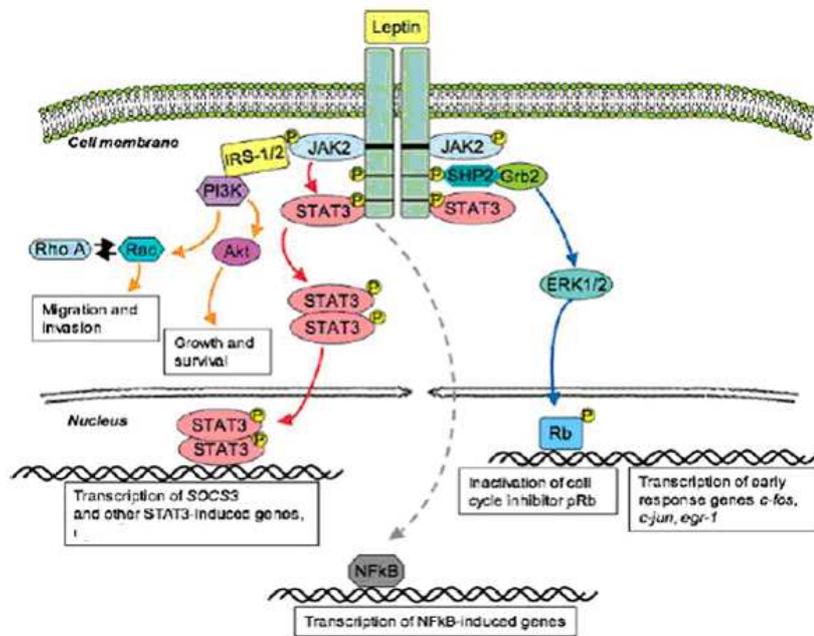


Figura 5: rappresentazione schematica delle due principali vie di trasduzione del segnale attivate dal pathway leptina/ leptina recettore (OBR-b).

La leptina, sin dalla sua scoperta è stata oggetto di numerosi studi sperimentali che dimostrano la presenza del pathway leptina/ leptina recettore in diversi organi e sistemi come polmone, sistema infiammatorio ed immunitario. Le diverse evidenze sperimentali attribuiscono a questa adipochina un ruolo proliferativo, anti-apoptotico, e di mantenimento dell'omeostasi tissutale.

In un recente studio sperimentale sugli effetti del flavonoide apigenina sul pathway leptina/leptina recettore in cellule di adenocarcinoma polmonare umano (A549), è stato dimostrato *in vitro* che da un lato la leptina, se associata all'apigenina come stimolo in coltura ne potenzia il ruolo anti-proliferativo e pro-apoptotico, anche in presenza del liquido pleurico di pazienti affetti da adenocarcinoma polmonare, dall'altro la leptina se presente come unico stimolo in

coltura svolge un ruolo proliferativo su questa linea cellulare (Bruno A, et al, 2011).

Diversi studi sperimentali sottolineano il ruolo proliferativo di questa adipochina, infatti la leptina promuove anche la crescita di cellule vascolari endoteliali (Bouloumie A, et al, 1998; Parck HJ, et al, 2001), cellule muscolari (Oda A, et al, 2001), cellule neoplastiche del colon (Zou H, et al, 1997; Hardwick JC, et al, 2001), e della mammella (Dieudonne MN, et al, 2002; Laud K, et al, 2002) e cellule epiteliali bronchiali (Bruno A, et al, 2009). In cellule normali e tumorali infatti la leptina è in grado di promuovere proliferazione, crescita e migrazione cellulare, insieme a meccanismi di neo-angiogenesi, suggerendo un'azione pro-cancerogena di questa adipochina (Somasundar P, et al, 2002).

Negli ultimi anni, l'interesse dei ricercatori sul ruolo svolto dalla leptina sul sistema respiratorio è cresciuto in maniera esponenziale. Infatti, numerosi sono gli studi sperimentali che hanno dimostrato il ruolo del pathway leptina/leptina recettore sui vari disordini delle alte e basse vie respiratorie. In particolare, studi sperimentali condotti *ex-vivo* su biopsie bronchiali di pazienti affetti da BPCO (Bruno A, et al, 2005) o da asma severo di varie entità (Bruno A, et al, 2009) e soggetti controllo, dimostrano che il pathway leptina/leptina recettore è diminuito nell'epitelio dei pazienti rispetto ai soggetti controllo. Nell'epitelio del soggetto asmatico, l'espressione sia della leptina che del suo recettore è ridotta, mentre si ripristina in presenza del trattamento farmacologico con il Fluticasone Propionato, suggerendo un ruolo protettivo del pathway leptina/leptina recettore nel mantenimento dell'omeostasi dell'epitelio bronchiale (Bruno A, et al, 2009).

A supportare ulteriormente questa ipotesi, nello stesso studio sperimentale, è l'espressione del pathway leptina/leptina recettore che correla inversamente con l'espressione della citochina fibrogenica $TGF\beta_1$ (*Transforming Growth Factor beta*). Il $TGF\beta$ esiste in tre isoforme pleiotropiche differenti ($TGF\beta_1$, $TGF\beta_2$, $TGF\beta_3$) ognuna delle quali svolge un ruolo importante nell'infiammazione, nella crescita cellulare e nel differenziamento cellulare. Nell' asma bronchiale l'espressione del $TGF\beta_1$ è correlata ad un rimodellamento ed ispessimento della lamina basale. Infatti, l'espressione epiteliale del $TGF\beta_1$ aumenta in maniera significativa in pazienti asmatici rispetto a soggetti controllo (Vignola AM, et al, 1997), nei quali invece la sua espressione si riduce significativamente in seguito al trattamento con i corticosteroidi (Profita M, et al, 2004). *In vitro*, su cellule epiteliali bronchiali (16 HBE) è stato dimostrato che il $TGF\beta_1$ riduce l'espressione del recettore della leptina e la leptina riduce il rilascio spontaneo del $TGF\beta_1$ supportando ulteriormente l' ipotesi di un possibile ruolo protettivo del pathway leptina/leptina recettore nel mantenimento dell'omeostasi dell'epitelio bronchiale (Bruno A, et al, 2009).

I numerosi studi sperimentali sul ruolo della leptina nei processi patologici delle basse vie aeree pongono le basi per un possibile ruolo di questa molecola pleiotropica nei processi patologici a carico della mucosa nasale. Infatti, mentre nell'uomo l'epitelio e le ghiandole della mucosa olfattiva e nasale rappresentano un potenziale sito di produzione della leptina, lo specifico ruolo del pathway leptina/leptina recettore sull'omeostasi dell'epitelio nasale umano è ancora sconosciuto. Nel ratto invece, è stato dimostrato che la mucosa olfattiva controlla la trascrizione del pathway leptina/leptina recettore attraverso lo stato nutrizionale

(Baly C, et al, 2007). In particolare, uno studio caso-controllo, su pazienti affetti da rinosinusite cronica con poliposi nasale, ha dimostrato la presenza del recettore della leptina nella mucosa nasale dei soggetti sani e nei polipi nasali dei soggetti affetti da rinosinusite cronica (Song SY, et al, 2010).

Il medesimo studio, ha messo in evidenza un aumento del il pathway leptina/leptina recettore nei pazienti con poliposi nasale rispetto alle categorie controllo, suggerendo un possibile ruolo della leptina nella poliposi nasale (Song SY, et al, 2010).

Tuttavia, ad oggi il ruolo della leptina nell'epitelio nasale in un contesto di rinite allergica, patologia oggi in costante aumento, è ancora inesplorato.

1.2 La rinite allergica

La rinite allergica è una patologia in costante aumento, colpisce 400 milioni di persone in tutto il mondo (Greiner AN, et al, 2011). Su base clinica, è definita come un disturbo sintomatico del naso, provocato da un'inflammatione IgE-mediata, che segue al contatto della mucosa nasale con l'allergene, il quale determina l'attivazione del *pathway* delle cellule *T helper 2*.



La risposta IgE-mediata, è stata osservata con esclusiva localizzazione al tessuto linfoide della mucosa nasale senza evidenza della componente sistemica (Rondòn C, et al, 2012). I sintomi classici di tale interessamento, reversibili spontaneamente o in seguito a terapia farmacologica sono: rinorrea, starnutazione, prurito e ostruzione nasale. Questi hanno gravi ripercussioni sulle prestazioni scolastiche, lavorative e sulla vita sociale del paziente (Brozek JL, et al, 2010) e costi socio sanitari rilevanti. La rinite si associa spesso all'asma e costituisce fattore di rischio per la sua insorgenza. La forma allergica è quella associata al rischio maggiore. Ciò si verifica con maggiore incidenza nella sensibilizzazione ad allergeni perenni rispetto a quella ad allergeni stagionali. Oltre all'asma possono associarsi alla rinite numerose altre co-morbilità come sinusite, congiuntivite, poliposi nasale e otite media. La rinite allergica era definita, sulla base dell'esposizione all'allergene, come **perenne**, **stagionale** od **occupazionale** (Dykewicz MS, et al, 1998; Van-Cauwemberge P, et al, 2000).

La **rinite perenne** è principalmente causata da allergeni *indoor* come acari, muffe, scarafaggi, epiteli di animali; mentre **la rinite stagionale** è associata ad una grande varietà di allergeni *outdoor*, come ad esempio i pollini.

Tuttavia, tale classificazione è risultata spesso insoddisfacente, poiché:

- in alcune zone geografiche pollini e muffe sono perenni (le Graminacee in California e florida e la Paritaria nelle zone mediterranee) (Bucholtz GA, et al, 1991; D'Amato G, et al, 1992);
- i sintomi di rinite perenne possono non essere presenti per tutto l'arco dell'anno;
- la maggior parte dei pazienti è sensibilizzata a multipli allergeni e quindi può avere sintomi durante tutto l'anno(Sibbald B, et al, 1991);
- i pazienti con rinite perenne spesso hanno riesacerbazioni stagionali dovute a pollini;
- molti pazienti allergici ai pollini sono anche allergici alle muffe, pertanto risulta difficile stabilire la stagionalità;
- a causa dell'*effetto priming* e della infiammazione minima persistente (Ciprandi G, et al, 1995) mantenuti anche da concentrazioni minime di allergeni, i sintomi possono comparire in modo non estremamente correlato alla stagione pollinica.

Per tutti questi motivi, un comitato internazionale ha rivisitato la tradizionale classificazione della rinite allergica distinguendo, sulla base della durata, la rinite in "*intermittente*" o "*persistente*" e , sulla base della gravità della sintomatologia, in "*lieve*" o "*moderata/grave*" (**Figura 6**).

<p>Intermittente <4 die/sett o < 4settimane</p> <p>Lieve</p> <p>sonno conservato nessuna limitazione delle attività quotidiane Normale attività lavorativa/scolastica Sintomi non fastidiosi</p>	<p>Intermittente <4die/sett o <4settimane</p> <p>moderata grave (uno o più dei seguenti)</p> <p>Alterazioni del sonno Limitazione delle attività quotidiane Riduzione delle prestazioni lavorative/scolastiche Sintomi gravi</p>
<p>Persistente >4die/sett o >4 settimane</p> <p>Lieve</p> <p>Sonno conservato Nessuna limitazione delle attività quotidiane Normale attività lavorativa o scolastica Sintomi non fastidiosi</p>	<p>Persistente >4die/sett o >4 settimane</p> <p>moderata-grave (uno o più dei seguenti)</p> <p>Alterazioni del sonno Limitazione delle attività quotidiane Riduzione delle prestazioni lavorative o scolastiche Sintomi gravi</p>

Figura 6: nuova classificazione della rinite allergica secondo il comitato internazionale A.R.I.A. 2008.

Tale documento, in sintonia con le linee guida per l'asma, redatto sotto l'egida dell'OMS con l'acronimo di A.R.I.A (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*), sottolinea l'importanza di una visione anatomofunzionale unitaria tra alte e basse vie respiratorie permettendo un approccio terapeutico "a gradini" adeguando il trattamento alla gravità della patologia. La rinite oltre a presentare problemi di comorbilità con l'asma, ne costituisce anche un fattore di rischio. È stato infatti dimostrato che il rischio di sviluppare asma nei soggetti rinitici è circa 3 volte superiore ai soggetti normali indipendentemente dalla presenza o meno di atopia (Guerra S, et al, 2002); in realtà non tutti i rinitici svilupperanno asma per cui è importante individuare i fattori predittivi per instaurare un maggior controllo nei

soggetti a maggior rischio, tenendo presente che esistono evidenze che il trattamento della rinite nel soggetto asmatico ne riduce la gravità delle manifestazioni cliniche, e che il trattamento precoce della rinite potrebbe prevenire la comparsa di asma. Rinite allergica e asma presentano similitudini anatomiche, fisiologiche, immunopatologiche, fisiopatologiche e terapeutiche. Infatti, l'epitelio ciliato pluristratificato che riveste l'intero albero respiratorio è lo stesso dalle cavità nasali fino ad i bronchioli terminali; il naso ed i bronchi condividono la stessa innervazione adrenergica e colinergica; gli stipiti cellulari che infiltrano le vie aeree superiori ed inferiori sono gli stessi (mastociti, linfociti T, eosinofili) (Casale TB, et al, 2001); la riduzione del flusso aereo è la principale caratteristica fisiopatologica sia della rinite allergica che dell'asma bronchiale; gli antistaminici, antileucotrienici, i corticosteroidi e l'immunoterapia possono essere prescritti con dimostrata efficacia sia della rinite allergica che dell'asma bronchiale. Per queste ragioni, qualche anno fa Passalacqua ha coniato il termine "United Airway Diseases" (UAD) per sottolineare la presenza di una continuità fra i processi patologici a carico delle alte (naso e seni paranasali) e delle basse (albero bronchiale) vie respiratorie (Passalacqua G, et al, 2001).

Fattori di rischio per lo sviluppo di rinite allergica sono: la genetica e la familiarità (Barne K, et al, 1998; Bahama SL, et al, 1992); l'inquinamento *outdoor* e *indoor* (Lebowitz MD, et al, 1996), la classe sociale e lavorativa (Frosh AC, et al, 1999) e l'esposizione all'allergene (Boulet LP, et al, 1997).

Gli allergeni, sono antigeni che inducono la produzione di IgE e con queste reagiscono. Dal punto di vista chimico sono proteine o glicoproteine contenute in

allergeni inalatori, veleni di insetti, cibi e farmaci. Il nome degli allergeni deriva dalla tassonomia della sua sorgente di origine. Ad ogni allergene della stessa specie viene attribuito un numero secondo l'ordine cronologico di identificazione. Inoltre gli allergeni vengono definiti "maggiori" o "minori" in base alle IgE prodotte contro di esso. Un allergene è definito "maggiore" se almeno il 50% degli individui testati ha specifiche IgE contro di esso (King TP, et al, 1995).

Gli allergeni inalatori sono ritenuti una delle principali cause di rinite allergica (Platts-Mills TA, et al, 1998) e sono rappresentati essenzialmente da acari della polvere, i pollini, epiteli animali. I pollini sono stati i primi allergeni ad essere identificati. Il granulo pollinico è, nelle specie vegetali il gametofita maschile e asseconda di come vengono trasportati si distinguono in anemofili (trasportati dal vento) e entomofili (trasportati dagli insetti). La concentrazione dei pollini nell'atmosfera dipende dal tipo di vegetazione di una determinata zona, ciò determina notevoli differenze regionali. I pollini più frequentemente causa di rinite allergica sono: *Graminacee*, *Urticacee*, *Betullacee*, *Oleacee* e *Cupressacee*. Le specie appartenenti alla famiglia delle *Urticacee*, inducono reazioni IgE mediate in circa 10 milioni di persone. Tra queste, la *Parietaria judaica* è considerata la più frequente causa di allergia, soprattutto nell'area mediterranea dove è considerata un allergene perenne (Colombo P, et al, 2003).

L'identificazione di allergeni per mezzo di strategie indipendenti suggerisce che l'allergene della *Parietaria judaica*, oltre ad essere altamente cross-reattivo, mostra un peso molecolare compreso tra 10 e 14 kD. L'analisi biochimica e la clonazione molecolare hanno permesso l'isolamento e la caratterizzazione immunologica dei

due principali allergeni del polline di *Parietaria judaica*, *Parj1* e *Parj2* (Colombo P, et al, 2006). L'analisi immunologica ha dimostrato che *Parj1* e *Parj2* sono in grado di impegnare la maggior parte delle IgE *Parietaria Judaica*-specifiche, attivando la relativa risposta immunitaria. Allergeni ricombinanti *Parj1* e *Parj2* hanno dimostrato di possedere proprietà immunologiche equivalenti alla controparte naturale e la loro disponibilità rappresenta uno strumento fondamentale per la diagnosi e terapia dell'allergia al polline di *Parietaria* (Colombo P, et al, 2006).

Il momento iniziale della reazione allergica è il contatto della mucosa nasale con l'allergene. Tale meccanismo determina l'attivazione di una serie di eventi biochimici a catena che culminano con il rilascio di istamina e altri mediatori (leucotrieni, prostaglandine e prostaciline). L'istamina è in grado di generare tutti i segni ed i sintomi tipici della reazione rinitica: prurito, starnuti, rinorrea e ostruzione a livello nasale; iperemia, prurito e lacrimazione a livello oculare. Nella fase precoce della reazione allergica, si ha una riduzione del flusso nasale, starnuti e un'infiltrazione infiammatoria estremamente eterogenea (chinine, molecole di adesione, citochine). Nella fase tardiva, che in genere si manifesta dopo 4-5 ore dall'esposizione all'allergene, prevale l'ostruzione nasale e l'infiltrato infiammatorio è costituito da neutrofili, eosinofili, basofili, cellule T CD4+, macrofagi, citochine e chemochine. Se lo stimolo allergenico si ripete nel tempo od è continuo la fase tardiva del processo cronicizza e si determina un danno infiammatorio cronico della mucosa nasale. Pertanto la rinite allergica, come l'asma, deve essere considerata una malattia infiammatoria cronica. Su

questi presupposti fisiopatologici si fonda la strategia terapeutica del soggetto affetto da rinite allergica.

La diagnosi di rinite allergica comprende: l'anamnesi del paziente, esame obiettivo dei sintomi e segni clinici; prick tests; dosaggio dell'IgE sieriche, e analisi della citologia nasale.

L'approccio terapeutico alla rinite allergica è coordinato su più livelli in base alla natura dell'allergene in causa e alla gravità della sintomatologia. Comunemente prevede, laddove possibile, una profilassi ambientale tesa a ridurre il contatto con l'allergene in causa, e l'igiene nasale come intervento coadiuvante la terapia farmacologica, che riconosce negli antistaminici per via orale e negli steroidi nasali topici e sistemici i due cardini principali della terapia (Greiner AN, et al, 2011). Si predilige la somministrazione intranasale poiché questa presenta numerosi vantaggi: elevata concentrazione di farmaco nel sito di azione; ridotti effetti collaterali sistemici; più rapida insorgenza di azione; Tuttavia esistono dei problemi connessi con la somministrazione intranasale: distribuzione intranasale del farmaco non ottimale; effetto tossico o irritativo sulle ciglia dovuto agli additivi, conservanti e propellenti presenti nelle forme di dosaggio; sanguinamento e raramente perforazione del setto in seguito all'uso prolungato dei corticosteroidi; impossibilità di somministrazione quando il naso è completamente ostruito; la compliance del paziente, il quale preferisce la monosomministrazione orale rispetto alle diverse somministrazioni topiche nell'arco della giornata.

1.3 Il Fluticasone Furoato

I corticosteroidi nasali sono considerati i farmaci di elezione per il controllo dei sintomi nasali della rinite allergica *intermittente* o *persistente*, da *moderata* a *grave*, specie quando il sintomo principale è l'ostruzione nasale (Brozek JL, et al, 2010).

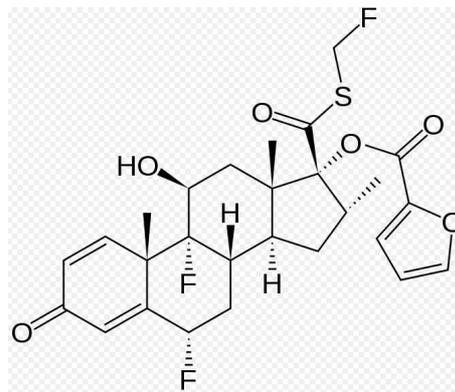


Figura 7: Formula di struttura del Fluticasone Furoato

Le prerogative farmacologiche e farmacocinetiche di queste molecole coniugano, infatti, una potente attività antinfiammatoria a livello della mucosa nasale alla virtuale assenza degli effetti collaterali tipici dei corticosteroidi a fronte di un ridotto assorbimento sistemico. Tra questi il Fluticasone Furoato (**Figura 7**) si contraddistingue per la sua efficacia terapeutica.

Questi farmaci sono noti in letteratura per la specifica azione sulla componente immunoflogistica della rinite allergica (Cipriandi G, et al, 2001; Cassano P, et al, 2002) infatti, diversi studi sperimentali dimostrano l'attività dei corticosteroidi nasali nella cura delle più frequenti rinopatie (Meltzer EO, et al, 1994; Fokkens WJ, et al, 1998; Petty DA, et al, 2013).

Grazie all'elevata lipofilia, il corticosteroide penetra all'interno della cellula e si lega a specifici recettori inattivi presenti nel citoplasma (*Glucocorticoid Receptor/GR*). Questi, presenti in elevate concentrazioni nell'epitelio nasale (Pujols L, et al, 2001) una volta complessati con gli steroidi cambiano conformazione, staccandosi dalle molecole chaperone che li mantengono nel citoplasma e migrano nel nucleo cellulare dove esplicano il loro effetto

farmacologico a livello molecolare attivando o inibendo la trascrizione dei geni che codificano per mediatori infiammatori e citochine tramite processi di transattivazione e transrepressione. La transattivazione è causata dal legame del complesso steroide-recettore ad una specifica sequenza di DNA (*Glucocorticoid Receptor Elements/GREs*) con conseguente aumento o riduzione della trascrizione di alcuni geni.

La transrepressione è mediata invece da interazioni inibitorie tra il complesso steroide-recettore e specifici fattori di trascrizione che codificano per mediatori infiammatori e citochine (Salter M, et al, 2007).

Tutto ciò determina una diminuzione della progressione della cascata infiammatoria grazie alla riduzione: del richiamo delle cellule infiammatorie; delle citochine e chemochine; della proliferazione dei fibroblasti e della sintesi di proteine della matrice extracellulare. Gli steroidi nasali sono in grado di ridurre anche il rilascio di mediatori preformati come le prostaglandine ed i leucotrieni così come inibiscono il rilascio di istamina. Tali proprietà di azione si traducono in una riduzione della sintomatologia rinitica, ed in particolare della congestione nasale (Barnes PJ, 2005).

Purtroppo molti pazienti non sono soddisfatti di questo trattamento farmacologico (Volovirta E, et al, 2008) e di conseguenza sono alla ricerca di un nuovo farmaco. Tra i vari corticosteroidi nasali, il Fluticasone Propionato emerge in letteratura oltre che per la sua attività antinfiammatoria, anche per la sua attività di riparazione del danno tissutale in risposta alle lesioni dovute all' infiammazione cronica. Infatti, è stato dimostrato che il trattamento con Fluticasone Propionato per 1 anno aumenta lo spessore dell'epitelio nasale e non genera atrofia (Baroody

FM, et al, 2001). Dal Fluticasone Propionato deriva chimicamente il Fluticasone Furoato, nuovo corticosteroide per inalazione nasale, ampiamente utilizzato nella terapia farmacologia della rinite allergica e dell'asma bronchiale (Salter M, et al, 2007) (**Figura 8**).

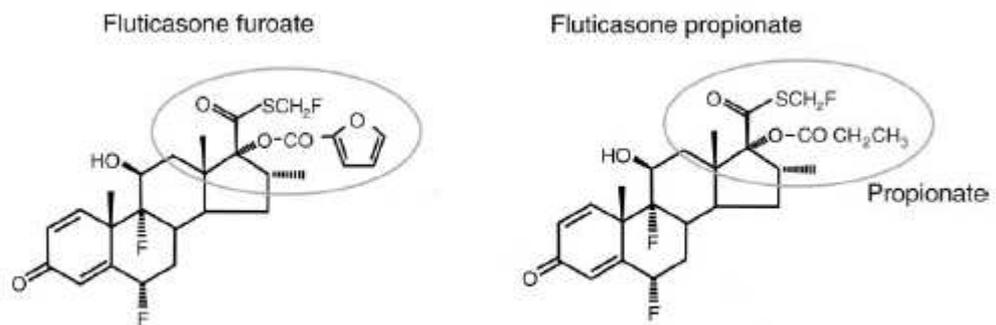


Figura 8: Formule di struttura del Fluticasone Furoato e del Fluticasone Propionato.

Questo farmaco presenta proprietà farmacodinamiche e fisicochimiche innovative che lo contraddistinguono dagli altri corticosteroidi e lo rendono il farmaco di elezione nel trattamento della rinite allergica. Infatti, rispetto a Budesonide, Flunisolide e Fluticasone Propionato, possiede una elevata lipofilia, una prolungata permanenza a livello della mucosa nasale e una scarsa biodisponibilità sistemica che ne riduce al minimo gli effetti collaterali.

L'attività farmacologica del Fluticasone Furoato, a differenza degli altri corticosteroidi, dipende dall'intera molecola, che mostra elevata affinità e selettività nei confronti del recettore dei glucocorticoidi. È noto, infatti, che l'attività di uno steroide dipende dall'affinità con il recettore, mentre la sua durata d'azione dipende dal tempo di dissociazione e dalla sua capacità di rimanere nel tessuto bersaglio. Studi sperimentali su cellule epiteliali respiratorie umane, hanno

permesso di evidenziare come il Fluticasone Furoato ha una maggiore affinità per il tessuto bersaglio rispetto a Mometasone Furoato, Fluticasone Propionato e Budesonide (McCormack PL, et al, 2007). Questo dettaglio è particolarmente importante poiché ciò può prolungare il tempo di permanenza nel tessuto stesso e aumentare la durata degli effetti antinfiammatori al sito di destinazione. Inoltre, una maggiore affinità per il tessuto permette, soprattutto a livello nasale, di ridurre la perdita di steroide dovuta all'elevata eliminazione di fluidi presenti nel naso del paziente con rinite allergica (McCormack PL, et al, 2007). Tra tutti i corticosteroidi, è considerato il più potente inibitore del fattore di trascrizione NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) principale responsabile della sintesi di un elevato numero di citochine pro-infiammatorie (Karin M, et al, 2004) ed è risultato particolarmente attivo nel preservare la funzione di barriera dell'epitelio respiratorio riducendo la permeabilità epiteliale indotta dagli stimoli pro-infiammatori (Salter M, et al, 2007). Tuttavia, ad oggi risulta poco chiaro se l'efficacia clinica del Fluticasone Furoato sia dovuta al blocco del processo pro-infiammatorio innescato dall'allergene o all'induzione di specifici processi riparativi.

2. DISEGNO E OBIETTIVO DELLO STUDIO

Diversi studi sperimentali dimostrano il ruolo del pathway leptina/leptina recettore nel mantenimento dell'omeostasi dell'epitelio bronchiale. Tuttavia risulta ancora inesplorato il ruolo svolto dalla leptina sull'omeostasi e i processi di rimodellamento delle cellule epiteliali nasali nella rinite allergica.

Obiettivo di questo studio sperimentale è stato quello di dimostrare un possibile ruolo del pathway leptina/leptina recettore sull'omeostasi dell'epitelio nasale umano in presenza di stimoli allergici (*Parietaria judaica*) e farmacologici (*Fluticasone Furoato*).

Lo studio, è stato svolto presso il Consiglio Nazionale delle Ricerche di Palermo, all'interno dell'Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare ed è stato articolato in due fasi:

- *in vitro* su cellule epiteliali nasali umane in cui è stato valutato:
 - espressione di base della leptina e del suo recettore;
 - modulazione dell'espressione della leptina e del suo recettore in presenza di stimoli allergici (allergene maggiore di *Parietaria judaica/rParj1*), farmacologici e antinfiammatori (*Fluticasone Furoato*); marker di rimodellamento epiteliale (*TGFβ₁*); e della stessa leptina;

- proliferazione cellulare in presenza di stimoli allergici (allergene maggiore di *Parietaria judaica/rParj1*), farmacologici e antinfiammatori (*Fluticasone Furoato*); marker di rimodellamento epiteliale ($TGF\beta_1$); e della stessa leptina;
 - modulazione dei livelli di m-RNA del recettore della leptina in presenza stimoli allergici (allergene maggiore di *Parietaria judaica/rParj1*), farmacologici e antinfiammatori (*Fluticasone Furoato*); marker di rimodellamento epiteliale ($TGF\beta_1$); e della stessa leptina;
 - studio del meccanismo d'azione della leptina e del Fluticasone Furoato mediante la valutazione dell'espressione del fattore di trascrizione STAT-3 tramite analisi Western Blotting;
- *ex vivo* su biopsie di turbinati nasali di soggetti allergici e non allergici in cui è stato valutato:
- espressione della leptina e del suo recettore.

3. DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA SVOLTA

3.1 MATERIALI E METODI

3.1.1 Colture Cellulari

Come modello sperimentale *in vitro* sono state usate le RPMI 2650 (ATCC-CCL-30; Rockville, Md), cellule epiteliali nasali umane (*Human nasal septum carcinoma cell line*).

La coltura primaria di RPMI 2650 fu isolata e stabilizzata nel Giugno del 1962 da G.E. Moore e A.A. Sandberg (Moore et al 1964) dal versamento pleurico di paziente affetto da tumore maligno del setto nasale. Pur essendo cellule tumorali, in letteratura le RPMI 2650 vengono considerate come cellule epiteliali nasali, poiché mantengono molte delle caratteristiche delle cellule epiteliali normali: crescono in adesione formando colture monostratificate, presentano una morfologia fusiforme, crescono e si duplicano nell'incubatore ad una temperatura di 37°C, in un'atmosfera con il 90% di umidità e 5% di CO₂.

Il terreno di coltura utilizzato per questo tipo di cellule è il *Minimum Essential Medium* (MEM) addizionato con: siero fetale bovino FCF (10 % V/V); HEPES 1% (acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazinil-etansolfonico); MEM aminoacidi non essenziali 0,5 %; glutammina 2 mM; gentamicina 50 mg/ml e sodio piruvato 1nM, tutti forniti dalla Gibco, Life Technologies.

Le colture cellulari delle RPMI 2650 sono state allestite in fiasche da 75 cm² e incubate a 37°C, in un'atmosfera con il 95% di umidità e 5% di CO₂.

Le cellule sono state controllate giornalmente all'invertoscopio al fine di cambiare il terreno di coltura, qualora fosse necessario, per eliminare le cellule morte non adese e assicurare i nutrienti necessari alla sopravvivenza cellulare. Quando la coltura cellulare ha raggiunto la confluenza, le cellule sono state tripsinizzate dal substrato e contate con il metodo del *Trypan Blue* tramite il quale è stata valutata anche la vitalità, che è stata sempre maggiore o uguale al 90 %. Il *Trypan Blue*, infatti è un colorante vitale che penetra all'interno delle cellule morte e le colora, consentendone la loro identificazione ed esclusione dalla conta cellulare. Per lo svolgimento di questo studio sperimentale occorrono colture separate in cui analizzare le diverse condizioni di stimolazione, pertanto le cellule sono state seminate in piastre da 6 e 12 wells.

3.1.1.2 Conta cellulare

La conta delle cellule consente di determinare la concentrazione di una sospensione cellulare. Per effettuare la conta sono necessari: la *camera di Burker*, il *Trypan Blue 0,5%* (Euroclone), e un *microscopio ottico*. Le cellule sono state diluite secondo la seguente proporzione: 80µl di colorante per 20µl di sospensione cellulare (diluizione 1:5). Tenendo conto che la camera di conta ha un volume pari a 0.1mm³ (= 10⁻⁴ cm³) e che 1cm³ è uguale ad 1ml, per ottenere il numero di cellule/ml è stato effettuato il seguente calcolo:

Concentrazione cellulare/ml = n° di cellule contate in 3 campi della *camera di Burker* /3 x 5 x 10⁴.

3.1.1.3 Trattamenti cellulari

Le cellule RPMI 2650, sono state seminate in terreno MEM completo con FBS al 10% alla densità di $0,15 \times 10^6$ /ml e sono state poste in incubatore ad una temperatura di 37°C, in un'atmosfera con il 95% di umidità e 5% di CO₂. Ciò permette alle cellule di aderire al substrato, accrescersi e moltiplicarsi. Dopo 24 ore, la coltura cellulare raggiunge un grado di confluenza pari all'80% che permette di procedere con i diversi trattamenti cellulari.

In questo studio sperimentale si sono volute ricreare *in vitro* le condizioni che promuovono la comparsa della rinite allergica *in vivo* al fine di valutare l'effetto della leptina sull'omeostasi e sui processi di rimodellamento delle cellule epiteliali nasali nella rinite allergica. Pertanto sono stati utilizzati come stimoli:

- **Recombinant Par j 1 (rParj1):**

[Par j 1.0201 EMBL accession number X85012 (Bonura A, et al, 2013a)]

In letteratura sono note due diverse isoforme dell' allergene maggiore di Parietaria judaica: *Parj 1.0101* (139 AA) e *Parj 1.201* (102 AA), la cui composizione amminoacidica differisce principalmente per la presenza, nella regione carbossi-terminale della prima isoforma, di una sequenza di 37 amminoacidi denominata PAR 37 dotata di LPS-binding activity (Bonura A et al 2013a).

In questo studio sperimentale è stato utilizzato come stimolo allergico il *Parj 1.201* purificato presso i laboratori dell'IBIM-CNR di Palermo. Questo ha un contenuto di endotossine endogene quasi impercettibile (\leq LPS 0.003 ng/g di proteina ricombinante) (Bonura A, et al, 2013b) e mancando della coda amminoacidica PAR 37 non può essere attivato dalla presenza del LPS.

Il *Parj 1.201* è stato fornito dalla Dott.ssa Bonura alla concentrazione madre di $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ed è stata conservata a -20°C . Per gli studi sperimentali è stata utilizzata la concentrazione finale di $1\mu\text{g}/\text{ml}$.

- **Fluticasone Furoato (FF):**

[GlaxoSmithKline, GW685698X]

Il Fluticasone Furoato è stato fornito come polvere dalla GlaxoSmithKline. La polvere è stata risospesa in N,N dimethyl-acetamide (D5511 Sigma Aldrich) in modo da ottenere una soluzione madre 10^{-2} M che è stata aliquotata e conservata in contenitori in vetro a -20°C . La concentrazione ottimale è stata ottenuta a partire dalla soluzione madre con diluizioni intermedie in terreno MEM attraverso prove di tossicità cellulare e dose-risposta.

Sono state testate diverse concentrazioni di Fluticasone Furoato (10^{-6} M; 10^{-7} M; 10^{-8} M) e diversi diluenti (dimetilsolfossido; dimetilacetamide e acido acetico). Le concentrazioni testate, dopo 24 ore di stimolazione, davano il medesimo effetto sul pathway leptina/leptina recettore; pertanto è stata scelta come concentrazione ottimale, la più bassa, ovvero 10^{-8} M; e come diluente la dimetilacetamide poiché non è stata tossica per le cellule e non ha mostrato alcun effetto sull'espressione del pathway leptina/leptina recettore.

- **Recombinant Human Leptin (Leptin):**

[R&D systems, 398-LP-01M/CF]

La leptina, è stata fornita dalla R&D systems, come polvere (1 mg) ed è stata risospesa in 1 ml di una soluzione sterile 20 mM di Tris-HCl a pH 8.0, in modo da

ottenere una soluzione madre di concentrazione 62,5 μM , che è stata aliquotata e conservata a -80°C . Per gli studi sperimentali è stata utilizzata la concentrazione finale di 0,5 μM (Bruno A, et al, 2009).

- **Recombinant Human TGF- β_1 ($TGF-\beta_1$):**

[R&D systems, 240-B-002/CF]

Il $TGF-\beta_1$ è stato fornito dalla R&D systems, come polvere (2 μg) ed è stato risospeso in 1ml di una soluzione sterile 4 mM di HCl contenente lo 0,1 % di siero albumina bovina modo da ottenere una soluzione madre di concentrazione 20 $\mu\text{g/ml}$, che è stata aliquotata e conservata a -80°C . Per gli studi sperimentali è stata utilizzata la concentrazione finale di 2 ng/ml (Bruno A, et al, 2009).

Tutte le soluzioni sono state sterilizzate mediante filtrazione con filtri da 0,22 μm (CelbioS.r.l., Milano).

3.1.2 Biopsie incluse in paraffina

Come modello sperimentale *ex vivo* sono state usate biopsie di turbinati nasali di soggetti allergici e non allergici incluse in paraffina. Queste sono state fornite dal Prof. Lipari, dalla Dott.ssa Gallina e dalla Dott.ssa Ballacchino dell'Azienda ospedaliera Universitaria Policlinico "Paolo Giaccone" di Palermo.

Le biopsie incluse in paraffina, dopo il taglio al microtomo e la colorazione delle sezioni con ematossilina ed eosina sono state sottoposte ad una prima analisi microscopica al fine di valutare e selezionare le sezioni di biopsie che

possedevano uno strato epiteliale integro e pertanto valutabile ai fini del nostro studio sperimentale.

3.2 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE E MODULAZIONE DEL PATHWAY LEPTINA/LEPTINA RECETTORE

La valutazione dell'espressione e modulazione del pathway leptina/leptina recettore sulle RPMI 2650 è stata effettuata tramite: *immunocitochimica* e *citofluorimetria* impiegando gli stessi anticorpi primari.

3.2.1 Valutazione dell' espressione della leptina e del suo recettore mediante immunocitochimica.

L'immunocitochimica è una tecnica immuno-enzimatica che si basa sul principio del legame di uno specifico anticorpo ad uno specifico antigene, il tutto rilevato da un sistema enzimatico-colorimetrico sulla base dell'affinità delle molecole biotina-streptavidina. Questo metodo di rivelazione è basato sulla capacità della streptavidina di legare in maniera non immunologica la vitamina biotina. Pertanto, l'anticorpo secondario coniugato con biotina lega l'anticorpo primario specifico per l'antigene di interesse. Il complesso streptavidina-fosfatasi alcalina si lega all'anticorpo secondario tramite i siti liberi della molecola di streptavidina, permettendo la visualizzazione dell'antigene con il cromogeno fucsina che produrrà una colorazione rosso vivo permanente nelle immediate vicinanze del punto in cui è avvenuta la reazione.

Per realizzare questa metodica, è necessario preparare dei vetrini con delle cellule adese: i citospin. Questi ultimi si ottengono utilizzando dei vetrini portaoggetti coattati con polilisina che permette una maggiore adesione delle cellule ad esso. In una microcentrifuga (*Shandon II citocentrifuga*) sono stati posizionati i vetrini con 100 µl di sospensione cellulare contenente 100.000 cellule nel proprio terreno di coltura (cellule RPMI 2650 non trattate). Quindi è stata avviata una centrifugazione a 700 giri per 5 minuti. Successivamente, i preparati dopo breve asciugatura sono stati fissati, prima con una soluzione di paraformaldeide al 4% per 15 minuti e, dopo lavaggio in tampone, con acetone freddo (-20°C) per 10 minuti. Dopo 40 minuti, quando i preparati sono completamente asciutti si procede con l'esperimento.

Le cellule, sono state idratate con un tampone fosfato (pH 7.6) e incubate:

- *overnight* a 4°C con l'anticorpo primario policlonale anti-recettore della leptina (diluizione 1:50) [polyclonal goat anti-leptin receptors (*Ob-R*, *M-18:sc-1834*, *Santa Cruz, Biotechnology, USA*)] specifico sia per l'isoforma lunga che per l'isoforma breve del recettore della leptina;
- 1 h a temperatura ambiente con l'anticorpo primario policlonale anti-leptina (diluizione 1:40) [polyclonal rabbit anti-leptin (*Ob*, *A-20:sc-842*, *Santa Cruz, Biotechnology, USA*)] specifico per la porzione C-terminale della leptina.

Per controllo negativo sono stati utilizzati i citospin delle cellule incubate solo con il diluente degli anticorpi primari.

Per rilevare l'eventuale marker presente nelle RPMI 2650, ovvero la reazione antigene-anticorpo avvenuta, è stato utilizzato il sistema "*Labelled avidin streptavidin biotin*" (*LSAB KIT phosphatase method* DAKO Glostrup, Danimarca) che utilizza un sistema enzimatico in fosfatasi e la "*new fucscin*" come substrato cromogeno. Il colore ottenuto, laddove c'è stata la reazione antigene-anticorpo, è il rosso.

Dopo breve lavaggio in tampone, le cellule sono state incubate con l'anticorpo secondario biotinilato, per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo il lavaggio in tampone, avviene l'incubazione con il sistema enzimatico avidina-fosfatasi, per 10 minuti a temperatura ambiente, quindi seguono lavaggio in tampone e incubazione con il substrato cromogeno "*new fucsin*" (30 minuti a temperatura ambiente). Quindi segue lavaggio in acqua corrente, acqua distillata e controcolorazione dei nuclei cellulari, che vengono colorati con ematolissina (un colorante acidofilo affine con il DNA che conferisce al nucleo un colore violetto). Infine è stato effettuato il montaggio del vetrino portaoggetti con il vetrino coprioggetto e successiva analisi al microscopio ottico (*Leica, Wetzlar, Germany*), ingrandimento finale 100 X.

Le immagini vengono acquisite con il sistema di analizzatore di immagine, collegato al microscopio (*Quantimet 500 MC software, Leica*).

3.2.2 Valutazione della modulazione di espressione della leptina e del suo recettore mediante citofluorimetria a flusso

La citofluorimetria a flusso è una tecnica di misurazione multiparametrica che permette di valutare alcuni parametri fisici e chimici di particelle contenute in una sospensione all'interno di un fluido di trasporto. Le cellule passano allineate attraverso un sistema di rilevazione ottico/elettronico.

Il tipo di parametri attualmente rilevabili in citofluorimetria a flusso è molto ampio: volume e complessità morfologica delle cellule, contenuto di pigmenti, DNA, RNA, proteine, flussi di Ca^{2+} , antigeni di superficie ed intracellulari, pH. Aspetto peculiare della citofluorimetria a flusso, strettamente connesso alla possibilità di analizzare contemporaneamente più fluorescenze, è quello di raccogliere e memorizzare molti parametri per ogni singola cellula analizzata, parametri che correlati tra loro permettono di individuare e studiare sottopopolazioni (anche rare) di cellule.

All'interno della cella a flusso, grazie al principio di focalizzazione idrodinamica, le particelle vengono messe in fila una dietro l'altra, grazie alla differenza di pressione tra il campione e il fluido di trasporto. Le particelle così disposte passano davanti al raggio laser di forma ellittica, focalizzato in modo da colpire le cellule al centro del canale di conteggio formato dal fluido di trasporto.

Colpite dal laser le particelle emettono diversi segnali: FS relativo alle dimensioni e SS relativo alla granularità.

Se le particelle sono marcate con una sostanza fluorescente emettono un colore; in caso di impiego di più di una sostanza fluorescente, le diverse emissioni di colore

vengono separate attraverso un sistema di filtri ottici, in modo da poter analizzare separatamente tutte le diverse fluorescenze (FL1, FL2, FL3, FL4).

L'ampiezza del segnale viene misurata in volts (da 0 a 10), per dare una visione grafica il voltaggio viene trasformato in canali di conta (da 0 a 1023). Questo passaggio viene definito come conversione analogico-digitale. Gli impulsi così convertiti incrementano la conta per ogni canale. Il diagramma delle conte rispetto ai canali fornisce l'istogramma.

Le sostanze fluorescenti o marcatori, hanno la capacità di assorbire certe lunghezze d'onda quando vengono eccitate, e di emettere un'altra lunghezza d'onda diversa da quella di assorbimento.

Tra le sostanze più diffuse in citofluorimetria abbiamo i fluorocromi, con i quali vengono coniugati gli anticorpi monoclonali in modo da poter identificare una determinata popolazione.

Originariamente si lavorava prevalentemente con due fluorocromi, FITC (isotiocianato di fluorescina) e PE (ficoeritrina) ai quali si sono aggiunti in tempi recenti i fluorocromi Tandem ECD (energy coupled dye) e PC5 (ficoeritrina cianina). Tutti questi fluorocromi vengono eccitati con un laser ad Argon con una lunghezza d'onda di 488 nm.

Le rispettive emissioni sono:

FITC = 525 nm

PE = 575 nm

ECD = 620 nm

PC5 = 675 nm

Nel nostro caso il fluorocromo utilizzato è l'isoticianato di fluorescina (*FITC*) che è coniugato all'anticorpo secondario: quest'ultimo, se trova nel campione l'anticorpo primario legato (il che indica la presenza del marker) vi si lega, ed emette il segnale come intensità di fluorescenza.

Questo segnale viene prima raccolto e poi convertito in un segnale elettronico e rappresentato in grafico.

3.2.2.1 Stimolazione delle RPMI 2650

Per la valutazione della modulazione della leptina e del suo recettore sulle RPMI 2650 sono state usate piastre a 12 pozzetti. In ciascun pozzetto sono state piastrate 150.000 cellule in 1 ml di terreno MEM completo con FBS al 10%. Le piastre sono state poste in incubatore a 37°C, in atmosfera umidificata con il 5% CO₂ e 95 % di O₂. Dopo 24 ore, quando la coltura cellulare ha raggiunto un grado di confluenza pari all'80%, è stato possibile procedere con la stimolazione secondo lo schema seguente:

- **Pozzetto 1 (*Controllo*):** cellule RPMI 2650 non trattate, da queste è stata valutata l'espressione di base della leptina e del suo recettore;
- **Pozzetto 2 (*rPar1*):** alla coltura viene aggiunta Parietaria judaica ricombinante alla concentrazione di 1 µg/ml;
- **Pozzetto 3 (*Fluticasone Furoato/FF*):** alla coltura viene aggiunto Fluticasone Furoato alla concentrazione di 10⁻⁸ M;
- **Pozzetto 4 (*Leptina/Leptin*):** alla coltura viene aggiunta leptina ricombinante umana alla concentrazione di 0,5 µM;

- **Pozzetto 5 (*FF + rPar1*):** alla coltura viene aggiunto Fluticasone Furoato alla concentrazione di 10^{-8} M e Parietaria judaica ricombinante alla concentrazione di 1 μ g/ml;
- **Pozzetto 6 (*FF + Leptin*):** alla coltura viene aggiunto Fluticasone Furoato alla concentrazione di 10^{-8} M e Leptina ricombinante umana alla concentrazione di 0,5 μ M;
- **Pozzetto 7 (*TGF β ₁*):** alla coltura viene aggiunto *TGF β ₁* alla concentrazione di 2 ng/ml
- **Pozzetto 8 (*Bianco*):** cellule RPMI 2650 non trattate. Al momento della marcatura alle cellule non verrà aggiunto nessun tipo di anticorpo poiché il campione verrà utilizzato per settare i parametri fisici delle cellule e per escludere l'autofluorescenza intrinseca delle cellule stesse.
- **Pozzetto 9 (*Controllo negativo*):** cellule RPMI 2650 non trattate. Al momento della marcatura, alle cellule marcate per la valutazione del recettore della leptina verrà aggiunto al posto dell'anticorpo primario un anticorpo che riconosce immunoglobuline aspecifiche di capra (Goat Serum IgG); alle cellule marcate per la valutazione della leptina verrà aggiunto un anticorpo che riconosce immunoglobuline aspecifiche di coniglio (Rabbit Serum IgG). I due anticorpi verranno usati alla stessa concentrazione dell'anticorpo primario al fine di eliminare eventuali aspecificità di legame dovute all'anticorpo secondario.

Per impedire il rilascio della leptina endogena nel mezzo di coltura, dopo l'aggiunta dei vari stimoli, alle cellule che saranno trattate per la valutazione del

rilascio di leptina, è stata aggiunta una soluzione 1mM di Monensina (*M-5273 Sigma*).

Le cellule dopo la stimolazione sono state poste in incubatore per 24 ore.

3.2.2.2 Marcatura extracellulare

Una volta scadute le 24 ore necessarie per la stimolazione si procede con la marcatura. Dopo la tripsinizzazione delle colture cellulari presenti nei diversi pozzetti, sono state prelevate 300.000 cellule per condizione che sono state trasferite nei rispettivi tubi da citofluorimetria, lavate con in 1 ml di PBS 1X e centrifugate a 1100 rpm per 5 minuti. Dopo aver eliminato il surnatante, si è proceduto con la marcatura per la valutazione della modulazione di espressione del recettore della leptina seguendo il seguente protocollo sperimentale:

- Risospendere tutti i campioni, escluso bianco e negativo (nei quali devono essere messi 50 µl di PBS 1X freddo) in 48 µl di PBS 1X freddo;
- Aggiungere in ogni campione, escluso bianco e negativo, 2 µl di anticorpo primario anti-recettore della leptina (*Ob-R, M-18:sc-18134, Santa Cruz, Biotechnology, USA*);
- Vortexare delicatamente;
- Incubare per 1 h a 4 °C;
- Aggiungere in ciascun campione 1 ml di PBS 1X freddo;
- Centrifugare i campioni a 4 °C per 5 minuti a 1100 rpm;
- Risospendere tutti i campioni, escluso il bianco (nel quale devono essere messi 50 µl di PBS 1X freddo) in 48 µl di PBS 1X freddo;

- Aggiungere in ogni campione, escluso il bianco e negativo, 5 µl di anticorpo secondario anti-goat (*Policlonal swine anti-goat immunoglobulins Fitec, DAKO*);
- Vortexare delicatamente;
- Incubare per 30 minuti a 4 °C al buio;
- Lavare con 1 ml di PBS 1X freddo;
- Risospendere ciascun campione in 300 µl di PBS 1X freddo;
- Procedere con la lettura dei campioni e successiva analisi citofluorimetrica (FACScalibur™/FACStation FACStar Plus, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

3.2.2.3 Marcatura intracellulare

Una volta scadute le 24 ore necessarie per la stimolazione si procede con la marcatura. Dopo la tripsinizzazione delle colture cellulari presenti nei diversi pozzetti, sono state prelevate 300.000 cellule per condizione che sono state trasferite nei rispettivi tubi da citofluorimetria, lavate con in 1 ml di PBS 1X e centrifugate a 1100 rpm per 5 minuti. Dopo aver eliminato il surnatante, si è proceduto con la marcatura intracellulare per la valutazione della modulazione di espressione della leptina

I *reagenti* necessari sono:

- **Staining buffer:** utilizzato per i lavaggi; 100 ml di soluzione contengono 90ml di PBS 1X, 10ml di siero di vitello fetale (FBS) al 10%, 100mg di sodio azide (NaN₃) 0.1%; La soluzione, una volta preparata deve essere filtrata e conservata a 4°C.

- **Paraformaldeide al 4%:** utilizzata per la fissazione delle cellule sottoposte alla marcatura. Preparata solubilizzando 4g di paraformaldeide in 100 ml di PBS 1X a 50°C; La soluzione, una volta pronta, viene filtrata e conservata a 4°C al riparo dalla luce.
- **Permeabilization buffer:** utilizzato per la permeabilizzazione delle cellule; 100 ml di soluzione contengono 90ml di PBS 1X, 10ml di siero di vitello fetale (FBS) al 10%, 100 mg di sodio azide (NaN₃) 0.1%, 100 mg di saponina 0.1% (agente permeabilizzante). La soluzione presenta un pH 7.4-7.6, una volta preparata deve essere filtrata e conservata a 4°C.

È stato seguito il seguente protocollo sperimentale:

- Fissare le cellule con 100 µl di paraformaldeide al 4%;
- Incubare per 20 minuti al buio a 4°C;
- Effettuare due lavaggi con 1 ml di permeabilization buffer centrifugando a 1100 rpm per 5 minuti a 4°C;
- Risospendere tutti i campioni, escluso bianco e negativo (nei quali devono essere messi 50 µl di permeabilization buffer) in 48 µl di permeabilization buffer;
- Aggiungere in ogni campione, escluso bianco e negativo, 2 µl di anticorpo primario anti-leptina ovvero: (*Ob, A-20:sc-842, Santa Cruz, Biotechnology, USA*);
- Vortexare delicatamente;
- Incubare per 1 h a 4°C;
- Aggiungere in ciascun campione 1 ml di staining buffer per il lavaggio;

- Centrifugare i campioni a 4°C per 5 minuti a 1100 rpm;
- Eliminare il surnatante;
- Risospendere tutti i campioni, escluso il bianco (nel quale devono essere messi 50 µl di staining buffer) in 48 µl di staining buffer;
- Aggiungere in ogni campione, escluso il bianco e il negativo, 2 µl di anticorpo secondario anti-rabbit (*Policlonal swine anti-rabbit immunoglobulins Fitec, DAKO*);
- Vortexare delicatamente;
- Incubare per 30 minuti a 4°C al buio;
- Lavare con 1 ml di staining buffer;
- Risospendere ciascun campione in 300 µl di staining buffer;
- Procedere con la lettura dei campioni e successiva analisi citofluorimetrica (*FACScaliburTM/FACStation FACStar Plus, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA*)

3.2.2.4 Analisi citofluorimetrica

Una volta acceso il citofluorimetro e aperto il software CELL QUEST per la visualizzazione e l'analisi dei risultati, si precede con l'acquisizione dei campioni. Il primo campione ad essere acquisito è il bianco. Questo, serve per settare i parametri fisici delle cellule e per escludere l'autofluorescenza intrinseca delle stesse.

Per l'acquisizione dei campioni si procede nel seguente modo: si inserisce il tubo da citofluorimetria nell'apposito supporto collegato alla camera di flusso e tramite il software si creano due finestre, una relativa al *dot plot* avente come ascisse il

forward scatter (FSC) e come ordinate il side scatter (SSC) e l'altra è un *istogramma* che ha come ascisse l'intensità di fluorescenza e come ordinate il numero di cellule. Si seleziona come canale per la fluorescenza FL1, che è il canale della fluorescenza verde poiché i fluorocromi utilizzati sono FITC e pertanto emettono ad una lunghezza d'onda di 525 nm. Una volta settati i parametri corretti, si crea sul *dot plot*, una finestra che racchiude la popolazione più omogenea in modo da escludere dall'acquisizione i detriti cellulari che possono interferire con l'analisi successiva. Si procede con il controllo negativo, che ci consente di escludere la fluorescenza dovuta a legami aspecifici dell'anticorpo secondario. Di seguito vengono acquisiti i campioni diversamente stimolati. Per ogni campione si ha un istogramma rappresentante la curva della fluorescenza del nostro campione su cui viene sovrapposta la curva del controllo negativo.

3.3 VALUTAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE: SAGGIO CLONOGENICO

Per osservare la crescita a lungo termine delle cellule epiteliali nasali RPMI 2650 è stato eseguito il saggio clonogenico. Questo test permette di seguire la crescita di cellule che sono state precedentemente trattate con opportuni stimoli. Il saggio clonogenico viene eseguito in piastre da coltura a 6 pozzetti (diametro 35 mm). Ogni pozzetto viene precedentemente coattato con 2 ml di terreno di coltura arricchito dal 10% di siero e allo 0.5% di Agar. Dopo solidificazione vengono aggiunti 2 ml della sospensione cellulare di cui si vuole valutare la proliferazione. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato. Per definizione una colonia

cellulare è quella composta da almeno 40 cellule. Lo strumento d'indagine per la conta delle colonie è l'invertoscopio (*phase-contrast microscope Leitz, Wetzlar, Germany*).

3.3.1 Stimolazione delle RPMI 2650

Per la valutazione della proliferazione cellulare delle RPMI 2650, occorrono colture separate in cui analizzare le diverse condizioni di stimolazione. Quindi le cellule, appena staccate dalla fiasca di mantenimento sono state seminate in piastra a 12 pozzetti. In ciascun pozzetto sono state piastrate 150.000 cellule in 1 ml di terreno MEM completo con FBS al 10%. Le piastre sono state poste in incubatore a 37°C, in atmosfera umidificata con il 5% CO₂ e 95% di O₂. Dopo 24 ore, quando la coltura cellulare ha raggiunto un grado di confluenza pari all'80% è stato possibile procedere con la stimolazione secondo lo schema seguente:

- **Pozzetto 1 (Controllo):** cellule RPMI 2650 non trattate, da queste è stata valutata l'espressione di base della leptina e del suo recettore;
- **Pozzetto 2 (rParj1):** alla coltura viene aggiunta *Parietaria judaica* ricombinante alla concentrazione di 1 µg/ml;
- **Pozzetto 3 (Fluticasone Furoato/FF):** alla coltura viene aggiunto Fluticasone Furoato alla concentrazione di 10⁻⁸ M;
- **Pozzetto 4 (Leptina/Leptin):** alla coltura viene aggiunta leptina ricombinante umana alla concentrazione di 0,5 µM;
- **Pozzetto 5 (FF + rParj1):** alla coltura viene aggiunto Fluticasone Furoato alla concentrazione di 10⁻⁸ M e *Parietaria judaica* ricombinante alla concentrazione di 1 µg/ml;

- **Pozzetto 6 (*FF + Leptin*):** alla coltura viene aggiunto Fluticasone Furoato alla concentrazione di 10^{-8} M e Leptina ricombinante umana alla concentrazione di 0,5 μ M;
- **Pozzetto 7 (*TGF β_1*):** alla coltura viene aggiunto *TGF β_1* alla concentrazione di 2 ng/ml;
- **Pozzetto 8 (*FF + rParj1 + TGF β_1*):** alla coltura viene aggiunto Fluticasone Furoato alla concentrazione di 10^{-8} M, Parietaria judaica ricombinante alla concentrazione di 1 μ g/ml e *TGF β_1* alla concentrazione di 2 ng/ml;

Le cellule dopo la stimolazione sono state poste in incubatore per 24 ore.

3.3.2 Preparazione dell'agar

Per coattare i pozzetti è stata preparata una soluzione madre di Agar al 3% sciogliendo in autoclave (Temperatura: 170°C e Pressione 1 atm) 6 g di Bacto-Agar DIFCO in 200 ml di acqua distillata. Poiché ciascun pozzetto, deve essere coattato con 2 ml di terreno di coltura al 10% di siero e allo 0.5% di Agar, è stata effettuata una diluizione 1:6 della soluzione madre di Agar al 3% con MEM completo con FBS al 10%. Le piastre preparate sono state opportunamente sigillate, al fine di mantenere la sterilità, e poste a 4°C per 24 ore per favorire la solidificazione dell'Agar.

3.3.3 Semina delle cellule

Una volta scadute le 24 ore necessarie per la stimolazione, si procede con la semina delle RPMI 2650 sui pozzetti coattati con l'Agar. Per prima cosa è stata effettuata la tripsinizzazione delle colture cellulari presenti nei diversi pozzetti. Le

sospensioni cellulari ottenute da ogni pozzetto sono state raccolte nei falcon sterili da 15 ml. I tubi sono stati centrifugati a 1100 rpm per 5 min, dopodiché è stato eliminato il surnatante e le cellule sono state risospese in 1 ml di PBS 1X. Per effettuare il saggio clonogenico sono necessarie 50.000 cellule per condizione di stimolazione in 2 ml di terreno di coltura al 10% FBS allo 0,3% Agar. Pertanto è stata effettuata la conta cellulare di ogni condizione. Poiché è necessario ottenere una soluzione di Agar allo 0,3% partendo da una soluzione madre di Agar al 3%, è stata effettuata una diluizione 1:10 della soluzione madre di Agar al 3%. Prima della solidificazione dell'Agar, si dispensano per condizione 2 ml della sospensione cellulare allo 0,3% di Agar (50.000 cellule) nel rispettivo pozzetto coattato. Avvenuta la solidificazione dell'Agar, le piastre sono state incubate a 37°C, in atmosfera umidificata con il 5% CO₂ e il 95% O₂ per 21 giorni. Alla fine del periodo, è stata effettuata, da due investigatori indipendenti in cieco, la conta delle colonie cellulari formatesi.

3.4 REAL-TIME QUANTITATIVE RT-PCR DELLA LEPTINA E DEL SUO RECETTORE

La modulazione di espressione della leptina e del suo recettore nelle cellule epiteliali nasali è stata valutata a livello di mRNA mediante *Real-time quantitative RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)*.

Quest'ultima è una tecnica di amplificazione genica in cui la quantificazione della sequenza target viene eseguita nel momento stesso in cui avviene la reazione di

amplificazione, che viene seguita e monitorata nel tempo. Nella PCR in real-time, il segnale che va monitorato è la fluorescenza.

La real-time quantitative PCR del gene della leptina e del suo recettore è stata realizzata utilizzando la chimica TaqMan che si avvale dell'impiego di sonde oligonucleotidiche (specifiche per una parte interna della regione che si vuole amplificare) marcate alle due estremità con due fluorofori e dell'attività 5'-3' esonucleasica della Taq DNA polimerasi.

3.4.1 Stimolazione delle RPMI 2650

Per l'estrazione dell'RNA totale le cellule sono state seminate in dischi da coltura di 10 cm² di superficie; in ciascun disco sono state piastrate 300.000 cellule in 2 ml di MEM completo con FBS al 10%. Successivamente le cellule sono state poste in incubatore a 37°C, in atmosfera umidificata con il 5% CO₂ e 95% di O₂.

Dopo 24 ore, quando la coltura cellulare ha raggiunto un grado di confluenza pari all'80% è stato possibile procedere con la stimolazione secondo lo schema seguente:

- **Pozzetto 1 (*Controllo*):** cellule RPMI 2650 non trattate, da queste è stata valutata l'espressione di base della leptina e del suo recettore;
- **Pozzetto 2 (*rParj1*):** alla coltura viene aggiunta Parietaria judaica ricombinante alla concentrazione di 1 µg/ml;
- **Pozzetto 3 (*Fluticasone Furoato/FF*):** alla coltura viene aggiunto Fluticasone Furoato alla concentrazione di 10⁻⁸ M;
- **Pozzetto 4 (*Leptina/Leptin*):** alla coltura viene aggiunta Leptina ricombinante umana alla concentrazione di 0,5 µM;

- **Pozzetto 5 (*FF + rParj1*):** alla coltura viene aggiunto Fluticasone Furoato alla concentrazione di 10^{-8} M e Parietaria judaica ricombinante alla concentrazione di 1 µg/ml;
- **Pozzetto 6 (*FF + Leptin*):** alla coltura viene aggiunto Fluticasone Furoato alla concentrazione di 10^{-8} M e leptina ricombinante umana alla concentrazione di 0,5 µM;
- **Pozzetto 7 (*TGFβ₁*):** alla coltura viene aggiunto *TGFβ₁* alla concentrazione di 2 ng/ml;

Dopo 8 ore dalla stimolazione, l'RNA totale è stato estratto direttamente dal monostrato di cellule epiteliali nasali.

3.4.2 Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto mediante l'utilizzo del kit RNAzol B (*Biotech Italia, Roma, Italia*), seguendo le istruzioni della ditta fabbricatrice, in accordo con il metodo di Chomczynski e Sacchi (Chomczynski P, et al, 1987). L'RNAzol B, contenente tiocianato di guanidinio e fenolo, possiede la proprietà di promuovere la formazione di complessi di RNA con il guanidinio e con le molecole di acqua e di abolire le interazioni idrofiliche del DNA e delle proteine.

Dopo la rimozione del terreno di coltura, il monostrato cellulare è stato lavato due volte con PBS 1X e le cellule sono state lisate direttamente nel disco di coltura, mediante l'aggiunta dell'RNAzol B (1 ml per ogni 10 cm² di superficie del disco di coltura) pipettando ripetute volte. Dopo aver omogeneizzato i campioni, questi sono stati trasferiti nei rispettivi eppendorf da 1,5 ml e a ciascun omogenato sono stati aggiunti 100 µl di cloroformio (*Merck, Gibbstown, N.J.*). Ogni campione è

stato agitato vigorosamente per 15 sec, lasciato in ghiaccio per 5 minuti e successivamente centrifugato a 12.000 g per 15 minuti a 4°C. Dopo l'aggiunta del cloroformio e la centrifugazione, l'omogenato forma due fasi: una fase inferiore di colore blu, contenente fenolo e cloroformio, e la fase superiore acquosa incolore, contenente l'RNA. Il DNA e le proteine sono invece nell'interfase e nella fase organica. La fase acquosa superiore è stata trasferita in un nuovo eppendorf da 1,5 ml e l'RNA è stato precipitato mediante l'aggiunta di un volume di isopropanolo (*Merck, Gibbstown, N.J.*) uguale al volume di fase acquosa raccolta. Il campione è stato incubato per 15 minuti a 4°C e successivamente centrifugato a 12.000 g per 15 minuti a 4°C. L'RNA precipita nel fondo dell'eppendorf come pellet gelificato di colore bianco-giallo. Il surnatante è stato rimosso delicatamente ed eliminato, i pellet contenenti l'RNA sono stati lavati aggiungendo 1 ml di etanolo al 75% (*Merck, Gibbstown, N.J.*). Ciascun campione è stato quindi vortexato e centrifugato a 7.500 g per 8 minuti a 4°C. Alla fine della centrifugazione, il surnatante è stato scartato e il pellet di RNA è stato asciugato all'aria e risospeso vortexando in 25 µl di acqua bidistillata trattata con DEPC (dietilpirocarbonato) (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO*), al fine di prevenire le contaminazioni da RNasi. L'RNA totale estratto è stato quantificato misurando l'assorbanza del campione diluito, a 260 nm di lunghezza d'onda, in uno spettrofotometro (*DU-65; Beckman Coulter, Inc.*) e applicando la seguente formula:

$$\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \mathbf{A \times 40 \times 200/1.000}$$

dove **A** è l'assorbanza del campione misurata a 260 nm; **40** sono i µg di RNA che presentano un coefficiente di estinzione corrispondente a 1 unità di assorbanza;

200 è il fattore di diluizione della soluzione di lettura; diviso **1.000** al fine di ottenere la concentrazione di RNA in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Dalla lettura spettrofotometrica, per stimare la purezza dei campioni, si ottiene anche il rapporto (A_{260}/A_{280}), ovvero il rapporto tra l'assorbanza del campione misurata a 260 nm e quella misurata a 280 nm.

La principale fonte di contaminazione del campione sono le proteine che assorbono a 280 nm. Una preparazione di RNA pura ha un valore A_{260}/A_{280} vicino a 2. Tutti i campioni, come aspettato, possedevano un valore A_{260}/A_{280} vicino a 2. In fine l'integrità dell'RNA estratto è stata analizzata mediante visualizzazione delle bande di RNA ribosomiale di 28S e 18S, dopo elettroforesi di aliquote di RNA su un gel di agarosio all'1% (w/v), denaturante, con il 5% (v/v) di formaldeide. L'RNA totale estratto, non utilizzato subito, è stato conservato a -80°C .

3.4.3 Trascrizione inversa

La trascrizione inversa permette di ottenere molecole di DNA complementari (cDNA) ad una specifica popolazione di RNA. L'enzima chiave è la Transcriptasi Inversa, di origine virale, che permette la sintesi conservativa di DNA, utilizzando come stampo l'RNA. Come innesco della reazione si utilizzano degli Oligo(dT) *primers*, i quali si ibridano alle estremità poliadenilate della maggior parte degli mRNA, il cDNA ottenuto dalla reazione risulta complementare alla popolazione degli mRNA.

Dettagliatamente, 4 μg di RNA totale per ogni campione sono stati retrotrascritti a cDNA. La trascrizione inversa è stata effettuata a 37°C per 1 ora, in un

termociclizzatore (*Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400*), in eppendorf da 0,2 ml, in una miscela di reazione dal volume finale di 25 µl, contenente 4 µg di RNA totale per campione, 250 ng di Oligo(dT)₁₂₋₁₈ *primer*, 10 mM di Ditiotreitolo (DTT), 20 U di Rnasina inibitore della ribonucleasi, 0.5 mM di trifosfodesossiribonucleotidi (dNTPs) e 200 U di *Moloney-Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) in tampone, previo riscaldamento a 70°C per 10 minuti dell'RNA totale e degli Oligo(dT)₁₂₋₁₈ *primer*, al fine di permetterne l'ibridazione. La miscela di reazione è stata quindi riscaldata a 98°C per 5 minuti al fine di inattivare la trascrittasi inversa, e poi raffreddata a 4°C. Il cDNA ottenuto, non utilizzato subito, è stato conservato a -20°C. Tutti i reagenti sono stati acquistati alla Ditta *Invitrogen SRL, Milano, Italia*.

3.4.4 Real-time quantitative PCR

La *real-time quantitative PCR* del gene della leptina e del gene del recettore della leptina è stata realizzata utilizzando la chimica TaqMan che si avvale dell'impiego di sonde oligonucleotidiche (complementari alla sequenza bersaglio che si vuole amplificare) marcate alle due estremità con due fluorofori (il *reporter* e il *quencher*) e dell'attività 5'-3' esonucleasica della Taq DNA polimerasi.

Sono stati usati *primers* (senso e antisenso) e una sonda TaqMan specifici per la leptina ed il recettore della leptina (*Applied Biosystems, TaqMan Assays on Demand*). La sonda TaqMan conteneva: il fluoroforo *reporter* (R) 6-FAM legato all'estremità 5'; un *quencher* non fluorescente (NFQ) legato all'estremità 3'; una codina MGB (*minor groove binder*) in corrispondenza dell'estremità 3', che si lega specificamente al solco minore della doppia elica di DNA, permettendo

l'impiego di temperature di *annealing* più elevate, a favore di una maggiore specificità. Durante l'amplificazione, la sonda si è ibridata specificamente alla sequenza complementare compresa tra i siti dei *primers senso e antisenso*. Quando la sonda è intatta, la vicinanza tra *reporter* e *quencher* determina lo spegnimento della fluorescenza del *reporter* (principio del trasferimento dell'energia di Forster). Infatti, il *reporter* è un fluorocromo ad alta energia che emette fluorescenza, il *quencher* è un fluorocromo a bassa energia che assorbe la fluorescenza del *reporter*. Quando *reporter* e *quencher* si trovano vicini, il *quencher* spegne la fluorescenza del *reporter* perché l'energia emessa dal *reporter* viene assorbita dal *quencher*.

Durante l'estensione dell'amplificato da parte dell'Ampli Taq Gold DNA polimerasi (P), l'enzima incontra la sonda TaqMan e, grazie alla sua attività 5'-3' esonucleasica, stacca il *reporter* che libera la sua fluorescenza. Questo processo si verifica ad ogni ciclo di amplificazione. All'aumentare dei cicli di amplificazione, il segnale fluorescente è sempre maggiore, fino a raggiungere la soglia prefissata. L'amplificazione è stata effettuata in uno Step One Plus Real-time PCR System (*Applied Biosystems*) (Haslett JN, et al, 2002), in piastre a 96 pozzetti, in una miscela di reazione dal volume finale di 50 µl, contenente, oltre il cDNA (circa il 10% del prodotto dell'RT) e la miscela costituita dai *primers* (0,9 µM ognuno) e dalla sonda (0,25 µM), la *TaqMan Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*) contenente l'enzima Ampli Taq Gold DNA polimerasi e l'AmpErase UNG. La miscela di reazione è stata portata a volume con acqua bidistillata sterile. Per l'amplificazione è stato adottato il seguente profilo: una fase iniziale di 2 minuti a 50°C, per attivare l'AmpErase UNG, seguita da una fase di

denaturazione di 10 minuti a 95°C; quindi la reazione è andata avanti per 40 cicli, ognuno dei quali costituito da una fase di denaturazione a 95°C per 15 sec e da una successiva fase di ibridazione/estensione a 60°C per 1 minuto.

I livelli di mRNA sono stati calcolati con un metodo di quantizzazione relativa, il metodo comparativo dei C_T (cicli soglia). Per ciclo soglia si intende un numero frazionario di cicli di amplificazione in cui la reazione di PCR supera una soglia prefissata di fluorescenza. La relazione quantitativa esiste tra numero di cicli soglia e quantità di sequenza *target* presente nel campione. Più sequenza *target* è presente nel campione, prima si avrà il raggiungimento del ciclo soglia.

Come controllo endogeno (*gene Housekeeping*), per la normalizzazione è stata usata l'espressione del gene della GAPDH (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi) espressa costitutivamente nelle cellule.

Per ogni campione, è stato calcolato il valore del ΔC_T (C_T del target meno C_T del controllo endogeno) e del $\Delta\Delta C_T$ (ΔC_T del campione in esame meno ΔC_T del campione di riferimento).

I livelli di mRNA sono stati quindi determinati con la formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak KJ e Schmittgen TD, 2001) e rappresentati graficamente come “*fold-change*” del livello di mRNA in ogni condizione sperimentale rispetto alle cellule non trattate, scelte come campione di riferimento.

Ogni campione è stato testato in triplicato. La validità di questo metodo è stata confermata amplificando diluizioni seriali (di un fattore 10) del target (recettore della leptina e leptina) e del controllo endogeno (GAPDH). Utilizzando questo approccio, l'efficienza di amplificazione dei geni della leptina/leptina recettore e GAPDH è risultata uguale.

3.5 VALUTAZIONE DEL PATHWAY LEPTINA/LEPTINA RECETTORE SU SEZIONI DI BIOPSIE DI TURBINATI NASALI DI SOGGETTI ALLERGICI E NON ALLERGICI

La prima fase della valutazione del pathway leptina/leptina recettore *ex vivo* prevede: taglio al microtomo delle biopsie (di 5 μm di spessore fissate in paraformaldeide ed incluse in paraffina), di turbinati nasali inferiori di soggetti allergici e soggetti controllo non allergici; deparaffinizzazione e reidratazione mediante passaggio delle sezioni prima in Xylene al fine di allontanare la paraffina e successivamente in una scala decrescente di alcoli per ridare gradualmente acqua; colorazione delle sezioni ottenute con ematossilina ed eosina; analisi microscopica al fine di valutare e selezionare le sezioni di biopsie che possedevano uno strato epiteliale integro. Nella quasi totalità delle biopsie in nostro possesso è stata riscontrata la presenza di uno strato epiteliale integro e pertanto valutabile ai fini del nostro studio.

3.5.1 Immunoistochimica

L'immunoistochimica è una tecnica immuno-enzimatica che si basa sul principio del legame di uno specifico anticorpo ad uno specifico antigene rilevato da un sistema enzimatico-colorimetrico sulla base dell'affinità delle molecole biotina-streptavidina.

Dopo il processo di deparaffinizzazione e reidratazione, i vetrini sono stati asciugati con carta assorbente e le sezioni sono state delimitate con la pap-pen. Prima di incubare le sezioni con gli anticorpi primari anti-leptina e anti-recettore

della leptina, queste sono state poste in un bagno con un appropriato tampone, il Tris Buffer Saline 1X (TBS 1X) per 10 minuti. Il tampone è stato preparato mescolando 100 ml di TRIS-HCl 10X 0,05 M pH 7,6 e 100 ml di NaCl 10 X 1,5 M, portando la soluzione al volume di 1 litro con acqua distillata. Dopo la rimozione dei vetrini dal bagno di lavaggio, per evitare l'essiccazione dei campioni, i vetrini sono stati adagiati in posizione orizzontale con il campione rivolto verso l'alto in una camera umida allestita usando dei contenitori per vetrini porta oggetto con coperchi sulla cui base è stata posta della carta assorbente inumidita con dell'acqua distillata. Prima di incubare le sezioni con gli anticorpi primari, sono stati saturati i siti di legame aspecifici, al fine di evitare una colorazione positiva del campione che non deriva dal legame antigene-anticorpo. Pertanto, dopo il lavaggio in TBS 1X, le sezioni sono state incubate per 30 minuti a temperatura ambiente con la proteina bloccante albumina bovina (soluzione 0,5 % di BSA in TBS 1X). Eliminato l'eccesso di proteina inerte le sezioni sono state incubate:

- *overnight* a 4°C con l'anticorpo primario policlonale anti-recettore della leptina (diluizione 1:50) [polyclonal goat anti-leptin receptors (*Ob-R*, *M-18:sc-1834*, *Santa Cruz, Biotechnology, USA*)] specifico sia per l'isoforma lunga che per l'isoforma breve del recettore della leptina;
- 1 h a temperatura ambiente con l'anticorpo primario policlonale anti-leptina (diluizione 1:40) [polyclonal rabbit anti-leptin (*Ob*, *A-20:sc-842*, *Santa Cruz, Biotechnology, USA*)] specifico per la porzione C- terminale della leptina.

Per il controllo negativo della seduta sono state utilizzate due sezioni di biopsie incubate con il solo diluente degli anticorpi primari. Per rilevare l'eventuale marker presente nell'epitelio, ovvero la reazione antigene-anticorpo avvenuta, è stato usato il sistema Dako Universal "*Labelled avidin streptavidin biotin*" kit (*Universal LSAB™+ Kit/HRP, Rabbit/Mouse/Goat: K0690 Dako*). Un kit per immunocitochimica e immunoistochimica che utilizza un sistema enzimatico in fosfatasi e la "*new fucsin*" come substrato cromogeno che colora in rosso le cellule nelle quali c'è stata la reazione antigene-anticorpo. Dopo breve lavaggio in tampone, le sezioni, poste in camera umida, sono state incubate con l'anticorpo secondario biotinilato per 15 minuti a temperatura ambiente. È stato effettuato un lavaggio in tampone, e dopo aver asciugato i vetrini, le sezioni sono state incubate per 15 minuti a temperatura ambiente con il sistema enzimatico avidina-fosfatasi. Seguono lavaggio in tampone e incubazione con il substrato cromogeno "*new fucsin*".

La colorazione specifica più intensa e l'intensità di fondo più bassa è stata ottenuta, dopo 15 minuti di incubazione a temperatura ambiente con il substrato cromogeno, per la valutazione del recettore della leptina, e dopo 25 minuti per la valutazione del della leptina. Segue lavaggio in acqua corrente, acqua distillata e contro-colorazione dei nuclei cellulari, che vengono colorati con ematolissina (un colorante acidofilo affine con il DNA che conferisce al nucleo un colore violetto). Infine si effettua montaggio del vetrino portaoggetti con il vetrino coprioggetto e successiva analisi al microscopio ottico (*Leica, Wetzlar, Germany*).

3.6 VALUTAZIONE DELL' ESPRESSIONE DEL FATTORE DI TRASCRIZIONE STAT-3 TRAMITE WESTERN BLOTTING

Allo scopo di valutare la presenza di proteine specifiche coinvolte nel *pathway* di proliferazione cellulare, sono stati condotti esperimenti di *Western blotting*, che prevedono una serie di procedure sperimentali:

- Preparazione degli estratti cellulari;
- Dosaggio proteico;
- Elettroforesi su gel di poliacrilammide con immunoblot;

3.6.1. Stimolazione delle RPMI 2650

Per preparare gli estratti cellulari, occorrono colture separate in cui analizzare le diverse condizioni di stimolazione. Quindi le cellule, appena staccate dalla fiasca di mantenimento sono state seminate in fiasche da 25 cm². In ciascuna fiasca sono state piastrate 1 x 10⁶ cellule in 6 ml di terreno MEM completo con FBS al 10%. Le fiasche sono state poste in incubatore a 37°C, in atmosfera umidificata con il 5% CO₂ e 95% di O₂. Dopo 24 ore, quando la coltura cellulare ha raggiunto un grado di confluenza pari all'80% è stato possibile procedere con la stimolazione secondo lo schema seguente:

- **Pozzetto 1 (Controllo):** cellule RPMI 2650 non trattate, da queste è stata valutata l'espressione di base della leptina e del suo recettore;
- **Pozzetto 2 (rParj1):** alla coltura viene aggiunta Parietaria judaica ricombinante alla concentrazione di 1 µg/ml;
- **Pozzetto 3 (Fluticasone Furoato/FF):** alla coltura viene aggiunto Fluticasone Furoato alla concentrazione di 10⁻⁸ M;

- **Pozzetto 4 (*Leptina/Leptin*):** alla coltura viene aggiunta leptina ricombinante umana alla concentrazione di 0,5 μ M;
- **Pozzetto 5 (*FF + rParj1*):** alla coltura viene aggiunto Fluticasone Furoato alla concentrazione di 10^{-8} M e Parietaria judaica ricombinante alla concentrazione di 1 μ g/ml;

Le cellule dopo la stimolazione sono state poste in incubatore per 24 ore.

3.6.2 Preparazione degli estratti cellulari nucleo/citoplasma

Dopo incubazione per 24 ore con le 5 condizioni sperimentali prima descritte, e dopo trattamento con tripsina e lavaggio, sono stati preparati gli estratti nucleo/citoplasma mediante l'utilizzo del kit di estrazione *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Thermo Scientific; Waltham, MA-USA) seguendo le istruzioni della ditta fabbricatrice. Questo kit è composto da:

- CER I (Cytoplasmic Extraction Reagent I)
- CER II (Cytoplasmic Extraction Reagent II)
- NER (Nuclear Extraction Reagent)

Al fine di impedire la degradazione enzimatica delle proteine alla soluzione di CER I e di NER sono stati aggiunti il *cocktail* degli inibitori di proteasi e fosfatasi (Roche).

I pellet asciutti sono stati risospesi in 100 μ l di soluzione di CER I, sono stati vortexati alla massima velocità per 15 secondi e posti in ghiaccio per 10 minuti. Sono stati aggiunti 5,5 μ l di CER II in ogni eppendorf, i pellet sono stati vortexati

per 5 secondi e posti in ghiaccio per 1 minuto. Successivamente sono stati vortexati per 5 secondi e centrifugati a 16.000 g per 5 minuti a 4°C. I surnatanti, contenenti l'estratto di proteine citoplasmatiche sono stati trasferiti nei rispettivi eppendorf conici da 1,5 ml, posti in ghiaccio e poi conservati a – 80°C. A ciascun pellet, sono stati aggiunti 50 µl di soluzione di NER, sono stati vortexati alla massima velocità per 15 secondi e messi in ghiaccio per 10 min. Questo trattamento è stato ripetuto per altre 3 volte. I campioni in fine sono stati centrifugati a 16.000 g per 10 minuti a 4°C e i surnatanti, contenenti l'estratto di proteine nucleari, sono stati trasferiti nei rispettivi eppendorf conici da 1,5 ml, posti in ghiaccio e poi conservati a – 80°C.

3.6.3 Dosaggio delle proteine

La quantificazione delle proteine presenti negli estratti citoplasmatici e nucleari, è stata eseguita utilizzando il metodo di *Bradford*. Questo metodo utilizza il colorante *Coomassie Blue* il quale forma composti colorati in “blu” con le proteine, tramite legami elettrostatici proteina-gruppi sulfonici del colorante in soluzione acida.

Per valutare la concentrazione proteica incognita nei campioni si è costruita una curva di taratura, utilizzando concentrazioni crescenti di Albumina di Siero Bovino 0,1% (BSA).

Tutte le misurazioni, compresa la curva di taratura, sono state compiute in duplicato. Le aliquote dei campioni sono state diluite con acqua distillata e a ciascuno di essi è stata aggiunta una aliquota di 200 microlitri di reattivo di *Bradford* che reagisce con le proteine a temperatura ambiente.

La presenza di proteine viene indicata dallo sviluppo di un colore blu, direttamente proporzionale alla concentrazione proteica e analizzata allo spettrofotometro, tramite lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 595 nm. La quantità di proteine da caricare nel gel di poliacrilammide, pari a 40 µg di proteine per condizione, è stata calcolata mediante l'utilizzo di un foglio di calcolo Excel.

3.6.4. Elettroforesi su gel di poliacrilammide con *Immuno blot*

È stata effettuata una separazione proteica mediante elettroforesi in verticale su gel di poliacrilammide, in presenza del detergente anionico sodio dodecil solfato ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_2\text{OSO}_3\text{-Na}^+$, SDS). L'SDS si lega a ciascuna proteina. Poiché le cariche negative dell'SDS si respingono, le proteine multimeriche si dissociano nelle loro subunità e tutte le catene polipeptidiche sono forzate in conformazioni estese con carica simile.

Poiché il trattamento con SDS elimina le differenze di forma, la lunghezza della catena polipeptidica, che riflette la massa, è l'unico determinante della velocità di migrazione.

Il saggio viene condotto utilizzando un sistema discontinuo, costituito da due diversi gel di poliacrilammide: il gel di impaccamento, o *stacking gel (upper gel)*, e il gel di corsa, o *running gel (lower gel)*. Lo *stacking gel* è posto al di sopra del *running gel* ed in esso si formano i pozzetti, nei quali vengono caricati i lisati cellulari contenenti le proteine. Il suo scopo è quello di permettere la concentrazione delle proteine in una banda sottile, prima che entrino nel gel di separazione (o di corsa). Questo risultato si ottiene utilizzando una forza ionica e

un pH differente tra il tampone elettroforetico e il gel di impaccamento. Lo *stacking gel* presenta pori molto grandi, dato che la concentrazione di acrilamide in esso usata è bassa, ciò consente alle proteine di muoversi liberamente e di impaccarsi. Inoltre va ricordato che nei campioni è presente un colorante, il blu di bromofenolo, e il glicerolo, che rendono la soluzione del campione più densa in modo da facilitarne la stratificazione sul fondo del pozzetto di caricamento. Nel *running gel*, la concentrazione di acrilammide è maggiore, ciò permette la separazione delle proteine in base al loro peso molecolare apparente. Ai lisati cellulari vengono aggiunti il β -mercaptoetanololo, che riduce i ponti disolfuro e l'SDS, carico negativamente, che si lega ogni 2 residui amminoacidici, permettendo la migrazione elettroforetica delle proteine.

L'ammonio persolfato (APS) e l'N,N,N',N',tetrametilendiamina (TEMED) vengono utilizzati rispettivamente come iniziatore e come catalizzatore della polimerizzazione del gel. In base ai diversi pesi molecolari delle proteine di interesse, si possono usare differenti concentrazioni di poliacrilammide.

In questo studio sperimentale, è stata analizzata la presenza del fattore di trascrizione STAT-3 negli estratti proteici nucleari e citoplasmatici delle RPMI dopo 24 h di stimolazione. Questa proteina esiste in due diverse isoforme, STAT 3 α con un peso molecolare di 91 kDa e STAT 3 β di 86 kDa pertanto è stato utilizzato un gel al 10%.

La composizione dei due gel è la seguente:

- ***Stacking gel (upper)***
 - 0,5 M Tris HCl pH 6,8 (*Sigma-Aldrich*)
 - 10% SDS (*Sigma-Aldrich*)

- 30% Acrilamide mix (*Fluka BioChemika*)
 - 10% APS (ammonio persolfato) (*EuroClone*)
 - TEMED (*Sigma-Aldrich*)
 - H₂O
- ***Running gel (lower):***
- 1,5 M Tris HCl pH 8,8 (*Sigma-Aldrich*)
 - 10% SDS (*Sigma-Aldrich*)
 - 30% Acrilamide mix (*Fluka BioChemika*) 6 mL
 - 10% APS (*EuroClone*)
 - TEMED (*Sigma-Aldrich*)
 - H₂O

La camera per l'elettroforesi è stata riempita con il tampone di corsa *Running Buffer* 10 X (soluzione acquosa contenente: glicina, Tris ed SDS) e collegata ad un impianto di raffreddamento.

Gli estratti citoplasmatici e nucleari sono stati caricati, alla concentrazione di 40 µg di proteine per pozzetto. Come marcatore dei pesi molecolari è stato utilizzato lo standard della BIORAD. Alla camera elettroforetica è stato applicato un amperaggio di 90 V per ogni gel per 15-20 minuti, al fine di favorire l'impaccamento delle bande nello *stacking gel* e, successivamente, una corrente di 150 V per 1 ora e 30 minuti, allo scopo di indurre la separazione delle proteine nel *running gel*.

Il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana di nitrocellulosa è stato effettuato mediante *elettro-blotting*, ovvero un sistema continuo assemblato in un

apposito apparato (*Semi-dry Protein Blotter System, Pharmacia LKB Multiphor II*).

È stato allestito un *sandwich* costituito, nell'ordine: dall'anodo al catodo, da un foglio di carta da filtro (*Electrode Paper Novablot PKG/500, Pharmacia*), dal gel di poliacrilammide, dalla membrana di nitrocellulosa (*Trans-Blot® Transfer Medium, BioRad*) e da un altro foglio di carta da filtro.

I fogli di carta da filtro, il gel e la membrana sono stati precedentemente immersi per qualche minuto nel tampone di trasferimento costituito da: 10% di *transfer-buffer* (Trizma base e glicina) al 20% metanolo. La procedura di trasferimento viene eseguita applicando una corrente di 400 mA per 1 ora e 30 minuti circa. La membrana, alla fine della corsa, viene incubata in agitazione per 1 ora a temperatura ambiente nella *Blocking Solution*: questa soluzione è costituita dal tampone T-TBS (0.5 M Trizma base, 3 M NaCl + 1% di Tween 20 poliossietilene-sorbitanmonolaurato, Sigma) con il 5% di latte in polvere.

Questo tampone di blottaggio è una soluzione che permette la fissazione delle proteine sulla membrana, prevenendo la formazione di legami aspecifici da parte dell'anticorpo primario.

Successivamente, la membrana è stata posta ad incubare a 4 C° *overnight* in agitazione con l'anticorpo primario monoclonale legante la porzione N-terminale di STAT-3 [mouse monoclonal (*Stat-3, F-2:sc-8019; Santa Cruz Biotechnology, USA*)] diluito 1:100 in *blocking solution*.

Il giorno successivo la membrana, dopo 3 lavaggi con T-TBS, è stata incubata con l'anticorpo secondario anti-mouse (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) diluito 1:1000 in *blocking solution*, per 1 ora in temperatura ambiente. Dopo altri

3 lavaggi di 10 minuti in T-TBS, i complessi antigene-anticorpo vengono analizzati per mezzo della reazione di chemiluminescenza.

Questa reazione avviene al riparo dalla luce bagnando la membrana con una soluzione di ECL Plus (*Amersham, USA*). I prodotti chemiluminescenti di questa reazione sono stati visualizzati tramite autoradiografia su lastre *Kodak® BioMax LightFilm*.

Come controllo delle quantità di proteine caricate sul gel si valuta la concentrazione di proteine cellulari costitutive: la β -actina per gli estratti citoplasmatici e la lamina B1 per gli estratti nucleari. Per valutare ciò, la membrana è stata sottoposta a “*stripping*” (per allontanare il precedente legame antigene-anticorpo) ponendo la membrana a 65° C per 30 minuti nella *stripping solution*, una soluzione costituita da: TBS 1X (Tris-HCl 20 Mm, NaCl 137 mM e H₂O); β -mercaptoetanolo e H₂O. Successivamente, la membrana è stata incubata prima con l’anticorpo monoclonale anti-actina diluito 1:500 in *blocking solution* [*mouse monoclonal anti- β -actina Ac-15 (Signa-Aldric)*] e dopo con l’anticorpo monoclonale anti-lamina diluito 1:200 in *blocking solution* [*mouse monoclonal anti-lamin B1 Ac-11 (Santa Cruz Biotchnology)*]. Infine, è stata effettuata una seconda incubazione con un anticorpo secondario *ECL mouse IgG (HRP-Linked NA931, GE Healthcare)*.

3.7 ANALISI STATISTICA

I dati ottenuti sono riportati come la media rappresentativa \pm SD (standard deviation) e sono il risultato di test effettuati almeno in triplicato per ogni condizione sperimentale. La significatività statistica dei dati è stata calcolata applicando il test non parametrico *Unpaired t-test* (StatView program 5.0.1). Un valore di $p < .05$ è stato considerato significativo.

4. RISULTATI

4.1 Espressione della leptina e del suo recettore nelle cellule epiteliali nasali RPMI 2650 e nelle biopsie di turbinati nasali di soggetti allergici e non allergici

I dati *in vitro* relativi agli studi di *immunocitochimica* e *citofluorimetria* sull'espressione della leptina e del suo recettore nelle cellule epiteliali nasali e nelle biopsie di turbinati nasali di soggetti allergici e non allergici sono riportati nelle **Figure 9** e **10**. I risultati ottenuti indicano che questa linea cellulare esprime il recettore della leptina (**Figura 9**) e produce leptina (**Figura 10**).

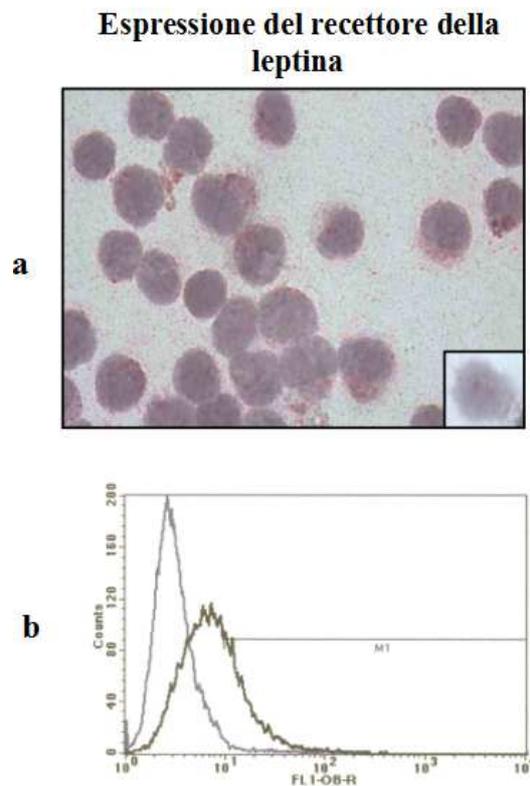


Figura 9: Espressione del recettore della leptina nelle RPMI 2650. Immagine (a): *immunocitochimica*, ingrandimento 1000 X della condizione controllo e nel riquadro in basso a destra, il controllo negativo della seduta; Immagine (b): *citofluorimetria a flusso*, istogramma relativo all'*overlay* dell'intensità di fluorescenza (FL1) della condizione controllo (grigia) rispetto al controllo negativo (blu).

Espressione della leptina

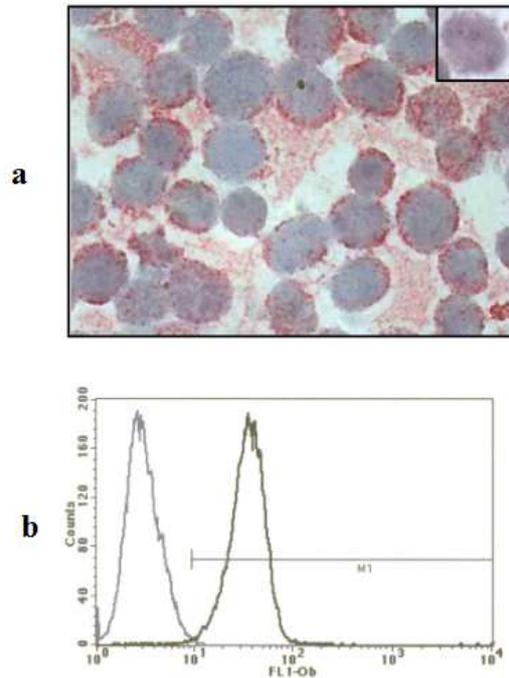


Figura 10: Espressione della leptina nelle RPMI 2650. Immagine (a): *immunocitochimica*, ingrandimento 1000 X della condizione controllo e nel riquadro in alto a destra, il controllo negativo della seduta; Immagine (b): *citofluorimetria a flusso*, istogramma relativo all'*overlay* dell'intensità di fluorescenza (FL1) della condizione controllo (grigia) rispetto al controllo negativo (blu).

Le **Figure 11** e **12** riportano i dati *ex vivo* relativi agli studi di *immunoistochimica* sulle biopsie nasali di turbinati inferiori di tre soggetti controllo non allergici sani e tre pazienti affetti da rinite allergica cronica.

I risultati ottenuti hanno dimostrato la presenza della leptina e del suo recettore sia nei controlli che nei pazienti affetti da rinite allergica cronica. L'analisi ottenuta mediante l'analizzatore di immagine dello strato epiteliale ha messo in evidenza un trend di riduzione dell'espressione del pathway leptina/leptina recettore nell'epitelio dei pazienti allergici rispetto ai controlli.

Espressione del recettore della leptina

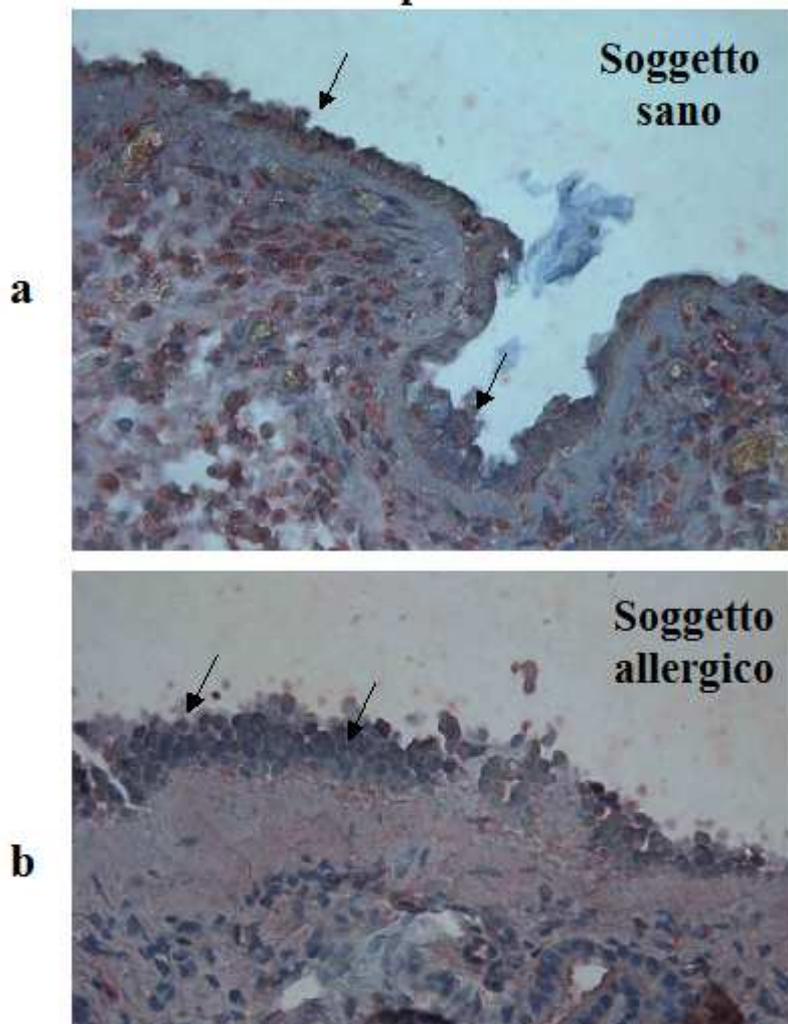


Figura 11: Espressione del recettore della leptina nelle sezioni di biopsie nasali di turbinati inferiori di soggetti allergici e non allergici. Immagine (a): *immunoistochimica*, ingrandimento 400 X di un soggetto sano; Immagine (b): *immunoistochimica*, ingrandimento 400 X di un soggetto con rinite allergica cronica. Le frecce indicano le cellule epiteliali.

Espressione della leptina

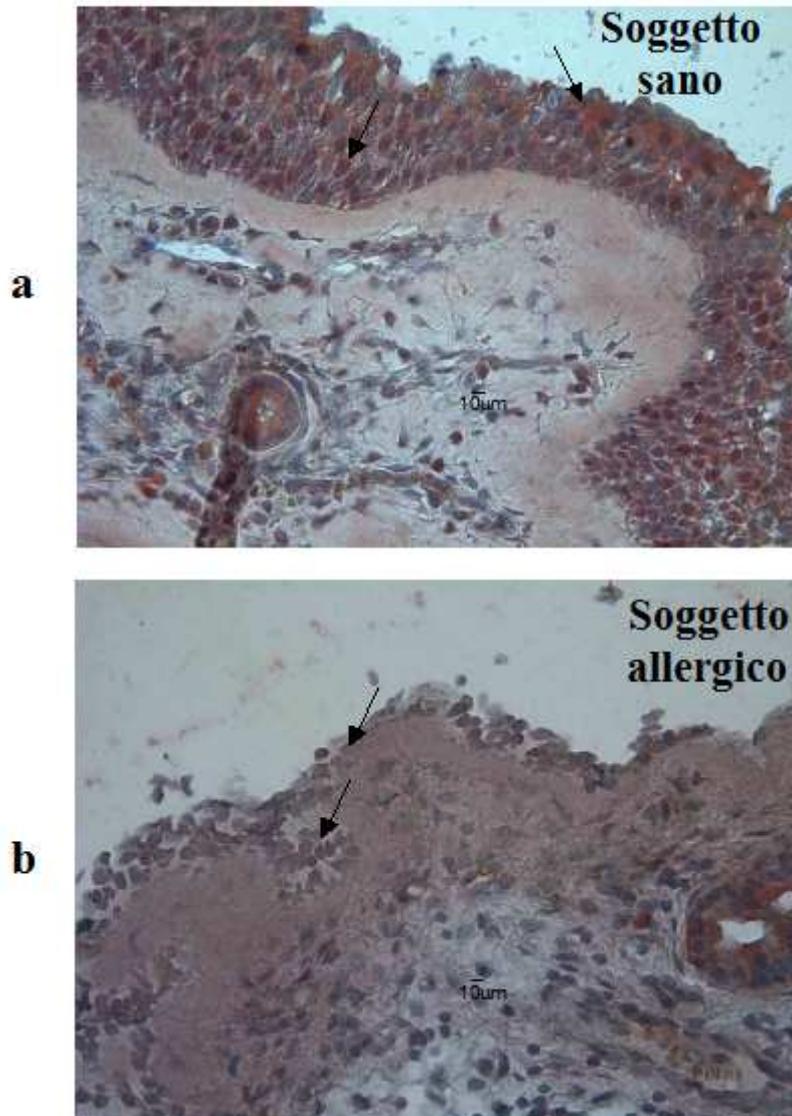


Figura 12: Espressione della leptina nelle sezioni di biopsie nasali di turbinati inferiori di soggetti allergici e non allergici. Immagine (a): *immunoistochimica*, ingrandimento 400 X di un soggetto sano; Immagine (b): *immunoistochimica*, ingrandimento 400 X di un soggetto con rinite allergica cronica. Le frecce indicano le cellule epiteliali.

4.2 Effetto dei trattamenti cellulari sull'espressione del recettore della leptina nelle cellule epiteliali nasali

I dati relativi agli studi di *citofluorimetria* sull'espressione del recettore della leptina nelle cellule epiteliali nasali RPMI 2650 sono riportati nella **Figura 13**.

I risultati ottenuti mostrano:

- un **aumento** statisticamente significativo dell'espressione del recettore della leptina, rispetto al controllo, in seguito al trattamento con:
 - Leptina ricombinante umana ($p < .03$);
 - Fluticasone Furoato a concentrazioni terapeutiche ($p < .006$);
 - Leptina in associazione con il farmaco ($p < .0001$).

- una **riduzione** statisticamente significativa dell'espressione del recettore della leptina, rispetto alla condizione controllo, in seguito al trattamento con:
 - il ricombinante *rParj1* ($p < .002$);
 - il $TGF\beta_1$ ($p < .0006$);

- un **aumento** statisticamente significativo dell'espressione del recettore della leptina, rispetto alla condizione controllo, nell'associazione del Fluticasone Furoato con il ricombinante *rParj1* ($p < .003$).

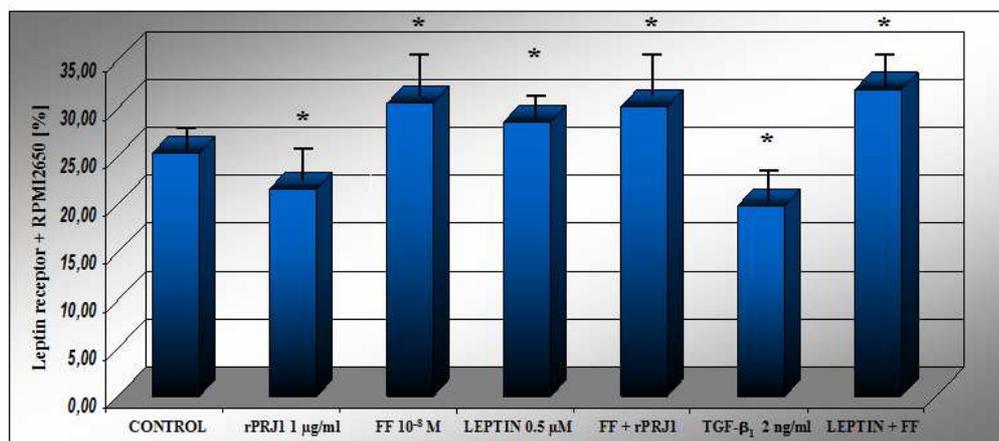
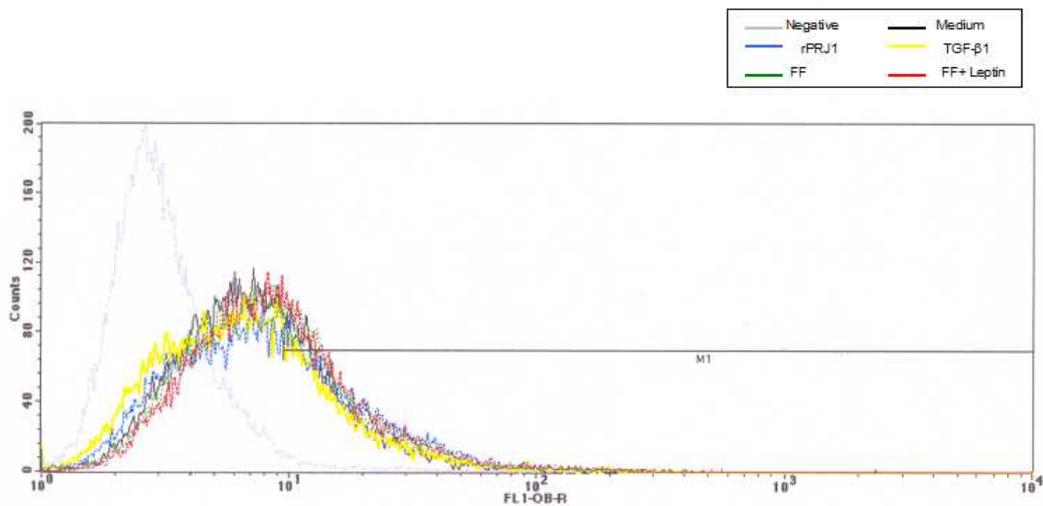


Figura 13: Effetto dei trattamenti cellulari sulla modulazione dell'espressione del recettore della leptina. In alto, l'istogramma di citometria a flusso, relativo all'overlay dell'intensità di fluorescenza (FL1) della condizione controllo (grigia) rispetto ai trattamenti cellulari. In basso, gli istogrammi rappresentano la % gated positiva dell'analisi citofluorimetrica. I dati riportati sono la media di otto esperimenti indipendenti \pm DS. Valori di significatività rispetto al controllo * : $p < .05$ (unpaired t-test).

4.3 Effetto dei trattamenti cellulari sull'espressione della leptina nelle cellule epiteliali nasali

I dati relativi agli studi di *citofluorimetria* sull'espressione della leptina nelle cellule epiteliali nasali RPMI 2650 sono riportati nella **Figura 14**.

I risultati ottenuti mostrano:

- un **aumento** statisticamente significativo dell'espressione della leptina, rispetto al controllo, in seguito al trattamento con:
 - Leptina ricombinante umana ($p < .03$);
 - Fluticasone Furoato a concentrazioni terapeutiche ($p < .04$);
 - Leptina in associazione con il farmaco ($p < .02$).
- una **riduzione** statisticamente significativa dell'espressione della leptina, rispetto al controllo, in seguito al trattamento con il ricombinante *rParj1* ($p < .0007$).
- un **aumento** statisticamente significativo dell'espressione del recettore della leptina, rispetto al controllo, nell'associazione del Fluticasone Furoato con il ricombinante *rParj1* ($p < .02$).
- nessun effetto statisticamente significativo sull'espressione della leptina in seguito al trattamento con il *TGF β_1* .

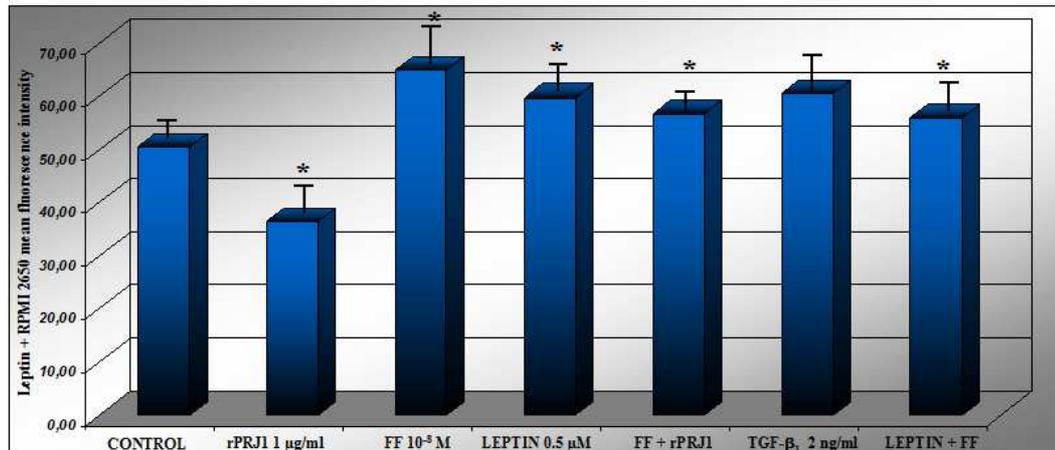


Figura 14: Effetto dei trattamenti cellulari sulla modulazione dell'espressione della leptina. Gli istogrammi rappresentano la *mean* lineare dell'analisi citofluorimetrica. I dati riportati sono la media di otto esperimenti indipendenti \pm DS. Valori di significatività rispetto al controllo * : $p < .05$ (*unpaired t-test*).

4.4 Effetto dei trattamenti cellulari sulla proliferazione a lungo termine delle cellule epiteliali nasali

I dati relativi alla conta delle colonie cellulari di RPMI 2650 del saggio clonogenico a 21 giorni sono riportati nella **Figura 15**.

I risultati ottenuti mostrano:

- un **aumento** statisticamente significativo della proliferazione cellulare, rispetto al controllo, in seguito al trattamento con:
 - Leptina ricombinante umana ($p < .04$);
 - Fluticasone Furoato a concentrazioni terapeutiche ($p < .009$);
 - Leptina in associazione con il farmaco ($p < .0007$).
- una **riduzione** statisticamente significativa della proliferazione cellulare, rispetto al controllo, in seguito al trattamento con:

- il ricombinante *rParj1* ($p < .002$);
 - il trattamento con il $TGF\beta_1$ ($p < .0007$);
- un **aumento** statisticamente significativo della proliferazione cellulare, rispetto al controllo, in seguito al trattamento con:
- Fluticasone Furoato in associazione con il ricombinante *rParj1* ($p < .0003$);
 - Fluticasone Furoato in associazione con il $TGF\beta_1$ ($p < .03$);
 - Fluticasone Furoato in associazione con il ricombinante *rParj1* e con il $TGF\beta_1$ ($p < .03$).

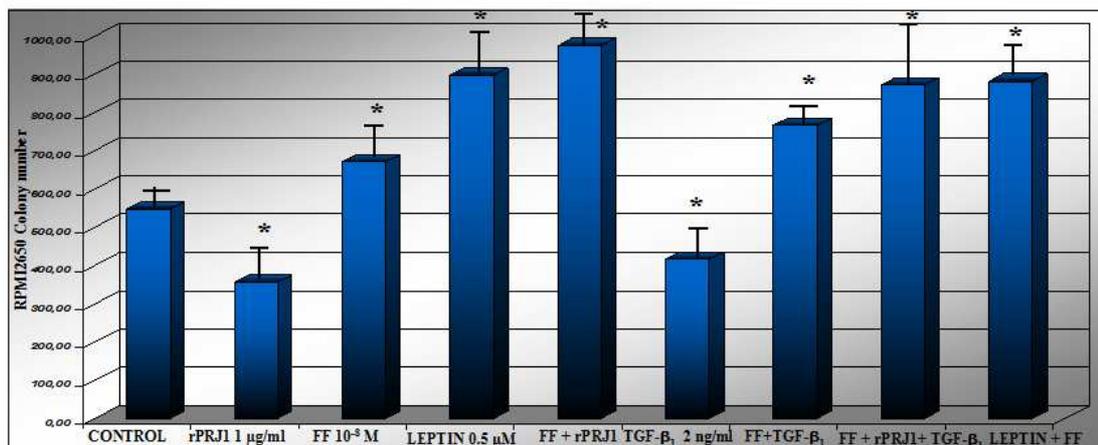


Figura 15: Effetto dei trattamenti cellulari sulla proliferazione a lungo termine delle RPMI 2650. Gli istogrammi rappresentano il numero di colonie cellulari. I dati riportati sono la media di cinque esperimenti indipendenti \pm DS. Valori di significatività rispetto al controllo *: $p < .05$ (*unpaired t-test*).

4.5 Effetto dei trattamenti cellulari sulla modulazione dell'espressione della leptina e del suo recettore attraverso la valutazione dei livelli di mRNA nelle cellule epiteliali nasali

I dati relativi agli studi di *Real-time quantitative RT-PCR* dell'effetto dei trattamenti cellulari sulla modulazione di espressione della leptina e del suo recettore sono riportati nella **Figura 16**.

I risultati ottenuti mostrano:

- un **aumento** statisticamente significativo dei livelli di mRNA correlati all'espressione del recettore della leptina, rispetto al controllo, in seguito al trattamento con:
 - Leptina ricombinante umana ($p < .003$);
 - Fluticasone Furoato a concentrazioni terapeutiche ($p < .0006$);
 - Leptina in associazione con il Fluticasone Furoato ($p < .0002$);
 - Fluticasone Furoato in associazione con il ricombinante *rParj1* ($p < .02$).
- nessun effetto statisticamente significativo è stato osservato sui livelli di mRNA correlati all'espressione del recettore della leptina in seguito al trattamento con il ricombinante *rParj1* e con il $TGF\beta_1$;
- gli stimoli testati non sono stati in grado di modulare i livelli di mRNA correlati all'espressione della leptina.

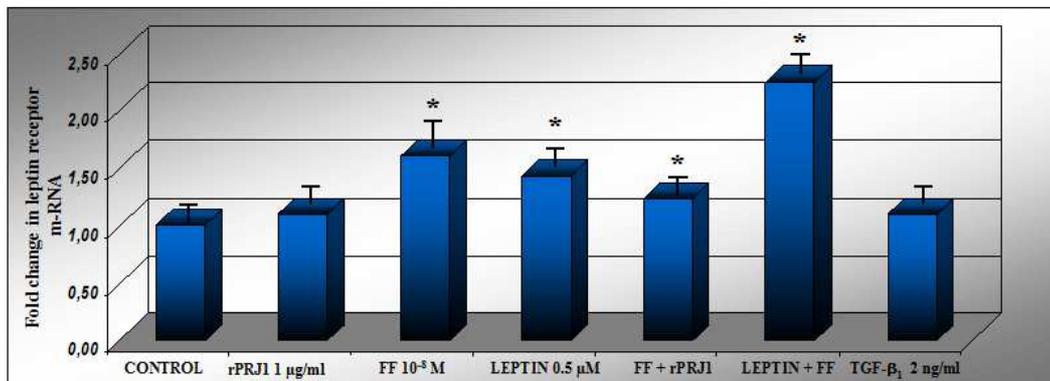


Figura 16: Effetto dei trattamenti cellulari sull'espressione del recettore della leptina a livello di mRNA. I livelli di mRNA sono stati determinati con il metodo comparativo dei C_T e normalizzati utilizzando la GAPDH come controllo endogeno. L'istogramma rappresenta graficamente i livelli di mRNA come "fold-change" del livello di mRNA in ogni condizione sperimentale rispetto alla condizione controllo. I dati riportati sono la media di tre esperimenti indipendenti \pm DS. Valori di significatività rispetto al controllo * : $p < .05$ (*unpaired t-test*).

4.6 Effetto dei trattamenti cellulari sulla traslocazione nucleare del fattore di trascrizione STAT-3 nelle cellule epiteliali nasali

I dati relativi all'analisi *Western Blotting* sull'effetto del trattamento delle RPMI 2650 con leptina, Fluticasone Furoato e *rParj1* a 24 ore sull'espressione del fattore di trascrizione STAT-3 sono riportati nella **Figura 17**.

I risultati ottenuti mostrano:

- un **aumento** dell'espressione di STAT-3, nelle cellule trattate con Fluticasone Furoato a concentrazioni terapeutiche;
- una **riduzione** dell'espressione di STAT-3, nelle cellule trattate con leptina;
- una **riduzione** dell'espressione di STAT-3, nelle cellule trattate con il ricombinante *rParj1*;

- un **ripristino** dell'espressione di STAT-3, nelle cellule trattate con Fluticasone Furoato in associazione con il ricombinante *rParj1*.

I dati relativi all'analisi *Western Blotting* sull'induzione dell'espressione di STAT-3, dopo trattamento con leptina a 4 ore, sono riportati nella **Figura 18** e mostrano un aumento dell'espressione di STAT-3 nelle cellule epiteliali nasali.

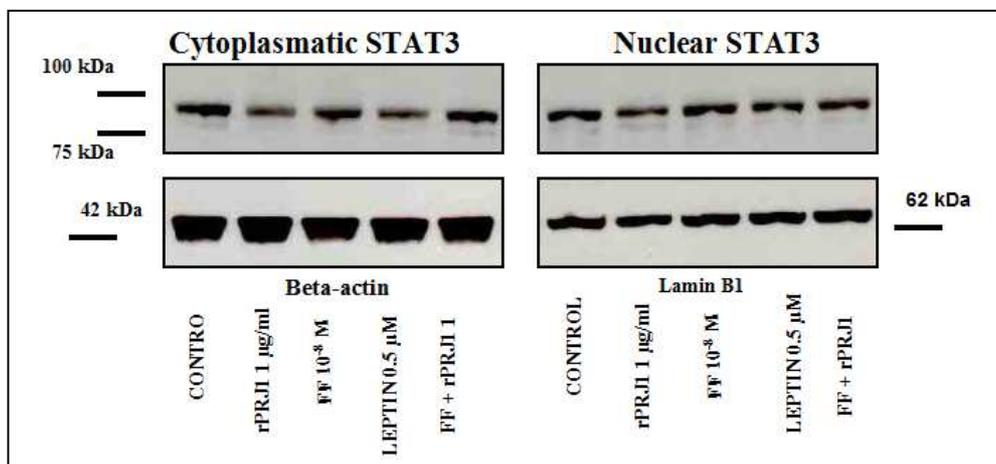


Figura 17: Effetto dei trattamenti cellulari, valutati mediante *Western Blotting*, sulla traslocazione nucleare del fattore di trascrizione STAT-3 nelle RPMI 2650 dopo 24 ore di stimolazione.

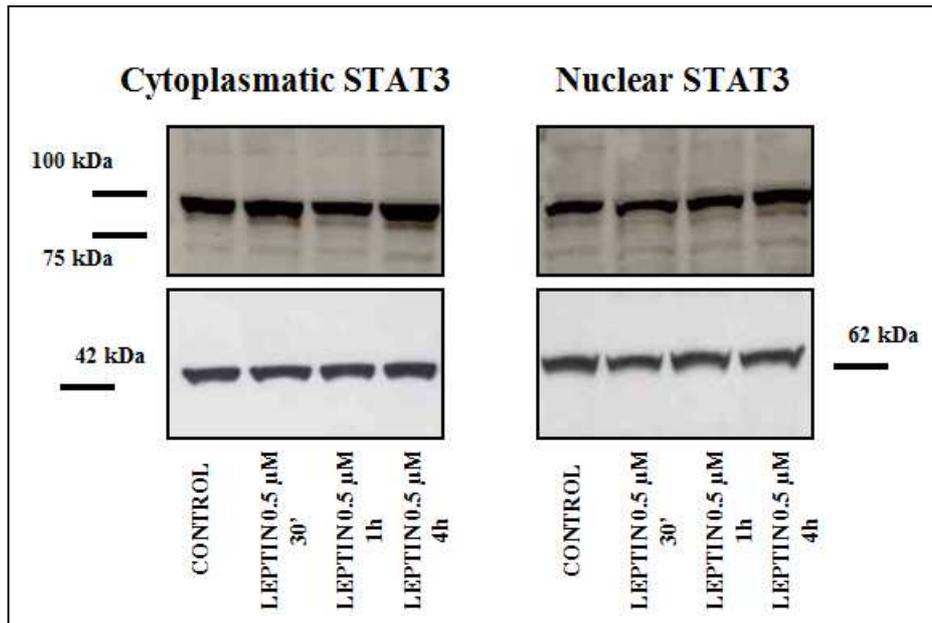


Figura 18: Effetto tempo-dipendente della leptina, valutato mediante *Western Blotting*, sulla traslocazione nucleare del fattore di trascrizione STAT-3 nelle RPMI 2650 dopo 30 min, 1 h e 4 h di stimolazione.

5. DISCUSSIONE

Numerosi studi sperimentali dimostrano il ruolo protettivo della leptina nel mantenimento dell'omeostasi dell'epitelio bronchiale (Bruno A, et al, 2005; Bruno A, et al, 2009; Bruno A, et al, 2011). Sulla base di queste evidenze sperimentali, abbiamo ipotizzato un ruolo protettivo della leptina anche nell'epitelio nasale in un contesto di rinite allergica.

La rinite allergica è un disturbo sintomatico delle alte vie aeree, che segue al contatto della mucosa nasale con l'allergene. Oggi, i corticosteroidi nasali sono considerati i farmaci di elezione per il controllo dei sintomi nasali di questa patologia, specie quando il sintomo principale è l'ostruzione nasale (Brozek JL, et al, 2010; Greiner AN, et al, 2011). Infatti, la terapia inalatoria è legittimata da una fiorente letteratura internazionale che dimostra come il trattamento topico offra diversi vantaggi: elevata concentrazione del farmaco nella sede della flogosi e minore concentrazione sistemica; rapidità d'azione; ridotte dosi terapeutiche e minori effetti collaterali.

Gli effetti antinfiammatori esercitati da questo tipo di terapia includono: diminuzione di eosinofili e basofili negli infiltrati cellulari; riduzione dei mediatori pro-infiammatori e della permeabilità vascolare; riduzione della produzione di muco (Fokkens WJ, et al, 2012).

Inoltre, questi farmaci possono anche esercitare un'attività immunomodulatoria poiché sono in grado di ridurre il numero di linfociti Th2 coinvolti nella risposta immunitaria che segue al contatto della mucosa nasale con l'allergene (Malmhäll C, et al, 2007).

Oltre a contrastare i sintomi della rinite allergica, i corticosteroidi nasali svolgono un ruolo rilevante nel migliorare l'istologia dell'epitelio nasale. Il Fluticasone Propionato, infatti possiede una potente attività antinfiammatoria, e svolge anche un'attività di riparazione del danno tissutale in risposta alle lesioni provocate dalla infiammazione cronica (Baroody FM, et al, 2001).

Inoltre, il trattamento con Fluticasone Propionato per 1 anno aumenta lo spessore dell'epitelio nasale e non genera atrofia (Baroody FM, et al, 2001). Dal Fluticasone Propionato deriva chimicamente il Fluticasone Furoato, nuovo corticosteroide per inalazione nasale, ampiamente utilizzato nella terapia farmacologica della rinite allergica e dell'asma bronchiale (Salter M, et al, 2007). Questo farmaco, per le sue caratteristiche chimiche e farmaceutiche, ha mostrato di essere più efficace rispetto ad altri corticosteroidi nelle somministrazioni topiche sulla mucosa respiratoria.

Studi recenti dimostrano che la terapia farmacologica con Fluticasone Furoato per un anno, oltre a ridurre la flogosi locale aumenta la percentuale di epitelio colonnare della mucosa nasale (Fokkens WJ, et al , 2012).

Ad oggi, in letteratura mancano prove *in vitro* sul ruolo della leptina e del Fluticasone Furoato nell'omeostasi epiteliale nasale, in presenza o assenza di allergeni; è noto, invece, il ruolo protettivo di questa adipochina sul mantenimento dell'omeostasi dell'epitelio bronchiale (Buno A, et al, 2009).

Pertanto, l'obiettivo di questo studio sperimentale è stato quello di dimostrare un possibile ruolo della leptina e del Fluticasone Furoato sull'omeostasi e i processi di rimodellamento delle cellule epiteliali nasali nella rinite allergica ricreando

in vitro le medesime condizioni che determinano la comparsa della rinite allergica *in vivo*.

Questo è il primo studio sperimentale *in vitro*, che valuta il ruolo della leptina e del Fluticasone Furoato sulla proliferazione cellulare a lungo termine e sull'espressione del pathway leptina/leptina recettore nelle cellule epiteliali nasali umane.

L'allergene maggiore di *Parietaria judaica* utilizzato come stimolo allergico in questo studio è il *Parj 1.201*. Sono note due diverse isoforme dell'allergene maggiore di *Parietaria judaica*: *Parj 1.0101* (139 AA) e *Parj 1.201* (102 AA), la cui composizione amminoacidica differisce principalmente per la presenza, nella regione carbossi-terminale della prima isoforma, di una sequenza di 37 amminoacidi denominata PAR 37 dotata di *LPS-binding activity* (Bonura A, et al, 2013a). La presenza di questa coda amminoacidica potrebbe tradursi nell'attivazione di diversi segnali intracellulari, che porterebbero all'attivazione del pathway leptina/leptina recettore (Kim SJ. et al, 2012). Pertanto, il ricombinante utilizzato nel nostro studio sperimentale è l'*rParj 1.201*, il quale manca della sequenza PAR 37 ed ha un contenuto di endotossine endogene quasi impercettibile (\leq LPS 0.003 ng/g di proteina ricombinante) (Bonura A, et al, 2013b).

Sulla base di studi precedenti, che avevano individuato il recettore della leptina nelle cellule epiteliali bronchiali (Bruno A, et al, 2009) e nelle cellule di adenocarcinoma polmonare umano (Bruno A, et al, 2011), per la prima volta

abbiamo dimostrato che le cellule epiteliali nasali RPMI 2650 esprimono la leptina ed il suo recettore. Questo dato ci ha permesso di utilizzare queste cellule come modello sperimentale *in vitro* per studiare il ruolo svolto dalla leptina e del Fluticasone Furoato sull'omeostasi e sui processi di rimodellamento delle cellule epiteliali nasali nella rinite allergica.

Inoltre, negli studi *ex vivo* abbiamo dimostrato la presenza della leptina e del suo recettore nelle biopsie di turbinati nasali di soggetti allergici e non allergici.

Negli studi *in vitro* abbiamo dimostrato per la prima volta che leptina e Fluticasone Furoato sono coinvolti nell'omeostasi epiteliale nasale anche in presenza di stimoli allergici (*rParj1*) e di rimodellamento (*TGFβ₁*).

In particolare, abbiamo dimostrato, attraverso la valutazione citofluorimetrica della modulazione di espressione della leptina e del suo recettore sulle RPMI 2650 in relazione alle condizioni di stimolazione, un aumento statisticamente significativo del pathway leptina/leptina recettore, rispetto alla condizione controllo, in seguito a trattamento con: Fluticasone Furoato a concentrazioni terapeutiche; leptina; e leptina in associazione con il farmaco.

Abbiamo invece messo in evidenza una riduzione statisticamente significativa del pathway leptina/leptina recettore sulle RPMI 2650, rispetto alla condizione controllo, in seguito a trattamento con *rParj1*, dimostrando per la prima volta che il ricombinante *rParj 1.201* è in grado di indurre, nel nostro modello sperimentale *in vitro*, una specifica modulazione del pathway leptina/leptina recettore, diminuendo gli effetti protettivi dell'adipochina leptina.

La riduzione statisticamente significativa dell'espressione del recettore della leptina nelle RPMI 2650, rispetto al controllo, in seguito al trattamento con il $TGF\beta_1$, mostra un possibile coinvolgimento di questa citochina anche nei processi di rimodellamento dell'epitelio nasale in seguito ad insulti di tipo infiammatorio.

Il ruolo del $TGF\beta_1$ è rilevante nella proliferazione a lungo termine di questa linea cellulare. Infatti, abbiamo dimostrato che questa citochina contrasta l'azione proliferativa della leptina e del Fluticasone Furoato, esercitando quindi un'azione anti-proliferativa. La conta delle colonie cellulari del *saggio clonogenico* a 21 giorni mette in evidenza un aumento statisticamente significativo della proliferazione cellulare rispetto al controllo, in seguito al trattamento con leptina, Fluticasone Furoato e con la loro associazione. Il trattamento con *rParj1* e $TGF\beta_1$ mostra invece una riduzione statisticamente significativa della proliferazione cellulare.

Infine, l'associazione del Fluticasone Furoato con il ricombinante *rParj1*, con il $TGF\beta_1$, e con entrambi, determina un aumento statisticamente significativo della proliferazione cellulare rispetto al controllo.

Questi dati dimostrano che il farmaco è in grado di contrastare gli effetti del $TGF\beta_1$ e della *rParj1*, agendo sulla recettività della cellula alla leptina e sulla sua produzione endogena, favorendo quindi il ripristino dell'integrità di barriera dell'epitelio nasale.

La leptina ed il Fluticasone Furoato sono in grado di modulare i livelli di mRNA correlati sia all'espressione della leptina che del suo recettore.

Infatti, i risultati ottenuti, dimostrano un aumento statisticamente significativo dei livelli di mRNA del recettore della leptina, rispetto al controllo, in seguito ai trattamenti con: Fluticasone Furoato a concentrazioni terapeutiche; leptina; associazione leptina con il farmaco; associazione del Fluticasone Furoato con il ricombinante *rPrj1*.

Tutti gli stimoli testati, singolarmente e in associazione, non sono stati in grado di modulare i livelli di mRNA per la leptina, suggerendo che l'aumentata espressione della proteina leptina potrebbe dipendere da eventi post- trascrizionali o da elevato turnover del suo mRNA.

Questi risultati, suggeriscono un possibile ruolo omeostatico del Fluticasone Furoato sull'epitelio nasale umano tramite l'attivazione del pathway leptina/leptina recettore. La leptina, infatti, ad oggi può essere considerata un mediatore fondamentale di ripristino dell'integrità di barriera dell'epitelio respiratorio in seguito a processi infiammatori.

Studi sperimentali caso-controllo condotti *ex-vivo* su biopsie bronchiali di pazienti affetti da broncopneumopatia cronico ostruttiva (BPCO) (Bruno A, et al, 2005) o da asma di varie entità (Bruno A, et al, 2009) e soggetti controllo, dimostrano che il pathway leptina/leptina recettore è diminuito nell'epitelio di questi pazienti rispetto alle categorie controllo.

Nell'epitelio del soggetto asmatico, l'espressione sia della leptina che del suo recettore si ripristina in presenza del trattamento farmacologico con corticosteroidi ed è inversamente correlato con la presenza di marker del rimodellamento ($TGF\beta_1$)

e spessore della lamina basale) (Bruno A, et al, 2009). Nel medesimo studio, *in vitro* è stato dimostrato che le cellule epiteliali bronchiali (16 HBE) esprimono sia la leptina che il suo recettore e che il Fluticasone Propionato aumenta l'espressione del recettore della leptina. Queste evidenze sperimentali dimostrano un possibile ruolo protettivo del pathway leptina/leptina recettore nel mantenimento dell'omeostasi dell'epitelio bronchiale (Bruno A, et al, 2009).

Sulla base di queste evidenze sperimentali, nel nostro studio, mediante immunocitochimica e l'analisi all'analizzatore di immagine dello strato epiteliale di sezioni di biopsie nasali di turbinati inferiori di tre soggetti controllo non allergici sani e tre pazienti allergici, abbiamo dimostrato che vi è un trend di riduzione di espressione del pathway leptina/leptina recettore nell'epitelio dei soggetti allergici rispetto ai controlli, supportando ulteriormente l'ipotesi della leptina come marker dell'integrità dell'epitelio nasale umano.

La carenza di leptina potrebbe portare ad una alterazione delle risposte immunitarie dell'organismo. Infatti, è stato dimostrato, che ridotti livelli di leptina nel plasma determinano una riduzione della risposta immunitaria protettiva, caratterizzata da un'alterazione delle attività T-linfocitarie (rapporto CD4/CD8 ridotto, linfociti T iporesponsivi). Inoltre, tale condizione è caratterizzata da una riduzione dei livelli di *IFN- γ* (*interferon gamma*) e di citochine (IL-10 e IL-4), e da un aumento dei livelli di *TGF β* (Farooqi IS, et al, 2002).

La terapia sostitutiva con leptina, invece, determina da un lato il ripristino delle attività T-linfocitarie e dei livelli del' *IFN- γ* , dall'altro la riduzione del *TGF β* che torna ai livelli normali (Farooqi IS, et al, 2002).

Sulla base di tutte queste evidenze sperimentali, abbiamo effettuato ulteriori esperimenti, al fine di valutare i meccanismi di trasduzione del segnale della leptina e del Fluticasone Furoato attraverso l'identificazione del fattore di trascrizione STAT-3 nelle cellule epiteliali nasali umane.

E' noto in letteratura che la leptina, mediante legame all'isoforma lunga del suo recettore attiva la via *JAK2/STAT-3* (Baumann H, et al, 1996; Bahrenberg G, et al, 2002; Pathak RR, et al, 2013).

Poiché questa via è responsabile dell'espressione di numerosi geni deputati alla regolazione della crescita, della differenziazione, della proliferazione, della sopravvivenza e dell'apoptosi cellulare (Li Z, et al, 2012) abbiamo valutato, mediante analisi Western Blotting, gli effetti *in vitro* di leptina, Fluticasone Furoato e *rParj1* sull'espressione del fattore di trascrizione STAT-3.

I dati ottenuti mostrano, dopo 24 ore di trattamento, un aumento dell'espressione di STAT-3 nelle cellule esposte al Fluticasone Furoato, ed una riduzione in quelle esposte alla *rParj1* o alla leptina. Quando il Fluticasone Furoato viene associato allo stimolo allergico, l'attività del corticosteroide prevale e contrasta attivamente la riduzione mediata dall'*rParj1*.

La riduzione dell'espressione di STAT-3 indotta dalla leptina dopo 24 ore di stimolazione, potrebbe essere spiegata analizzando il meccanismo di regolazione a *feed-back* negativo esercitato dalle SOCS3, una famiglia di regolatori della via *JAK/STAT* che legandosi al sito di fosforilazione del recettore sulla tirosina in posizione 1138, inibisce la trasmissione del segnale mediato dalla leptina (Li Z, et al, 2012).

Pertanto abbiamo ipotizzato che questa riduzione potrebbe essere la conseguenza dell'azione delle SOCS3, già attive nel citoplasma.

Questa nostra ipotesi è stata confermata dalla successiva analisi Western Blotting, nella quale abbiamo valutato l'espressione del fattore di trascrizione STAT-3 dopo trattamento delle cellule con leptina a tempi brevi (30 minuti, 1 h e 4 h).

L'analisi dei risultati mostra un incremento progressivo dell'espressione di STAT-3 nell'intervallo considerato.

6. CONCLUSIONI

Il presente studio fornisce nuove evidenze sperimentali sull'attività della leptina e del Fluticasone Furoato in un contesto di rinite allergica.

I risultati fino ad oggi ottenuti mostrano che la leptina e il Fluticasone Furoato potrebbero rappresentare due molecole chiave nell'omeostasi epiteliale nasale.

Questi dati sottolineano l'importanza dell'impiego del Fluticasone Furoato come farmaco d'elezione nella terapia della rinite allergica non soltanto per la sua azione sulla componente immunoflogistica già nota, ma per il ruolo di ripristino dell'integrità di barriera dell'epitelio nasale mediante l'attivazione del pathway leptina/leptina recettore.

Studi ulteriori sono necessari per approfondire il meccanismo di azione attraverso cui la leptina ed il Fluticasone Furoato aumentano l'espressione del fattore di trascrizione STAT-3.

7. BIBLIOGRAFIA

- Adams RJ, Fuhlbrigge AL, Finkelstein JA**, et al. *Intranasal steroids and the risk of emergency department visits for asthma*. J Allergy Clin Immunol. 2002; 109 (4): 636-42.
- Ahima RS, Saper CB, Flier JS**, et al. *Leptin regulation of neuroendocrine system*. Front Neuroendocrinol. 2000;21: 263-307.
- Bachert C**. *Histamine-a major role in allergy?*. Clin Exp Allergy 1998;6:15-9.
- Bahna SL**. *Factors determining development of allergy in infants*. Allergy Proc. 1992;13:21-5.
- Bahrenberg G, Behrmann I, Barthel A**, et al. *Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers*. Mol Endocrinol. 2002;16:859-72.
- Baly C, Aioun J, Badonnel K, Lacroix MC**, et al. *Leptin and its receptors are present in the rat olfactory mucosa and modulated by the nutritional status*. Brain Res. 2007;1129(1):130-41.
- Barne K, Marsh D**. *The genetics and complexity of allergy and asthma*. Immunol Today 1998;19:325-32.
- Barnes PJ**. *Molecular mechanisms and cellular effects of glucocorticosteroids*. Immunol Allergy Clin North Am. 2005; 25: 451–468.
- Baroody FM, Cheng CC, Moylan B**, et al. *Absence of nasal mucosal atrophy with fluticasone aqueous nasal spray*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2001;127(2):193-9.
- Barrenetxe J, Villano AC, Guembe L**, et al. *Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocitis*. Gut. 2002;50:797-802.
- Baumann H, Morella KK, White DW**, et al. *The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors*. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:8374-8.
- Bjorbaek C, Bucholz RM, Davis SM**, et al. *Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors*. J Biol Chem. 2001; 276, 4747-4755.

- Bonura A, Corinti S, Schiavi E, et al.** *The major allergen of the Parietaria pollen contains an LPS-binding region with immuno-modulatory activity.* Allergy 2013a; 68: 297-303.
- Bonura A, Quarantino S, Gervasi F, et al.** *Innate and adaptive immune responses to the major Parietaria allergen Par j 1 in healthy subjects.* Immunobiology 2013b; 218: 995-1004.
- Boulet LP, Turcotte H, Laprise C, et al.** *Comparative degree and type of sensitization to common indoor and outdoor allergens in subjects with allergic rhinitis and/or asthma.* Clin Exp Allergy 1997;27:52-9.
- Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, et al.** *Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis.* Circ.Res. 1998;83:1059.
- Bousquet J, Schünemann HJ, Samolinski B, et al.** *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA): achievements in 10 years and future needs.* Allergy Clin Immunol 2012;130(5):1049-62.
- Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N.** *Allergic rhinitis and its impact on asthma.* J Allergy Clin Immunol 2001; 108 (5 Suppl): S147-334.
- Braunstahl GJ, Fokkens WJ, Overbeek SE, et al.** *Mucosal and systemic inflammatory changes in allergic rhinitis and asthma: a comparison between upper and lower airways.* Clin Exp Allergy 2003;33(5):579-87.
- Brozek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE.** *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision.* J Allergy Clin Immunol 2010; 126: 466–476.
- Bruce CA, Norman PS, Rosenthal RR, et al.** *The role of ragweed pollen in autumnal asthma.* J Allergy Clin Immunol 1977;59:44-59.
- Bruno A, Chanez P, Chiappara G, et al.** *Does leptin play a cytokine-like role within the airways of COPD patients?.* Eur Respir J. 2005; 26: 398-405.
- Bruno A, Pace E, Chanez P, et al.** *Leptin and leptin receptor expression in asthma.* J Allergy Clin Immunol 2009; 124(2):230-237, 237.
- Bruno A, Siena L, Gerbino S, et al.** *Apigenin affects leptin/leptin receptor pathway and induces cell apoptosis in lung adenocarcinoma cell line.* European Journal of Cancer 2011;47(13): 2042-51.

- Bucholtz GA, Lockey RF, Wunderlin RP, et al.** *A three-year aerobiologic pollen survey the Tampa Bay area, Florida.* Ann Allergy.1991;67:534-40.
- Calderon-Garciduenas L, Roy-Ocotla G.** *Nasal cytology in southwest metropolitan Mexico City inhabitants: a pilot intervention study.* Environ Health Perspect 1993;101:138-44.
- Casale TB, Amin BV.** *Clin Rev Allergy Immunol* 2001;21(1):27–49 Kay AB N Engl J Med 2001;344:30–37.
- Cassano P, Gelardi M, Ricco R, et al.** *Variazioni delle cellule dell'immunoflogosi nelle rinopatie croniche in funzione del trattamento con farmaci antistaminici e corticosteroidi topici.* Giorn It Allergol Immunol Clin. 2002;12:94-100.
- Chen XL, Hausman DB, Dean RG, et al.** *Hormonal regulation of leptin mRNA expression and preadipocyte recruitment and differentiation in porcine primary cultures of S-V cells.* Obes Res 1998;6:164-72.
- Chomczynski P, Sacchi N.** *Single-step method of RNA 381 isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.* Anal Biochem. 1987;162: 156-159.
- Ciprandi G, Buscaglia S, Pesce G, et al.** *Minimal persistent inflammation is present at mucosal level in patients with asymptomatic rhinitis and mite allergy.* J Allergy Clin Immunol. 1995;96:971-9.
- Ciprandi G, Caimmi D, Raschetti R, et al.** *Adipokines and their role in allergies.* Int J Immunopathol Pharmacol. 2011; 24(4 Suppl):13-6.
- Ciprandi G, Tosca MA, Passalacqua G, et al.** *Intranasal mometasone furoate reduces late-phase inflammation after allergen challenge.* Ann Allergy Asthma Immunol 2001;86(4):433-8.
- Cirillo D, Rachiglio AM, La Montagna R, et al.** *Leptin signalling in breast cancer: an overview.* Journal of Cellular Biochemistry 2008; 105,956-964.
- Colombo P, Bonura A, Costa M, et al.** *The allergens of Parietaria.* Int Arch Allergy Immunol 2003 Mar;130(3):173-9. Review.
- Colombo P, Bonura A.** *Parietaria pollen allergens.* Eur Ann Allergy Clin Immunol 2006; 38: 224-225.

- Connell J.** *Quantitative intranasal pollen Challenges II. Effect of daily pollen challenge, environmental pollen exposure and placebo challenge on nasal membrane.* J Allergy 1968;41:123-9.
- Considine RV, Caro JF.** *Leptin and the regulation of body weight.* Int J Biochem Cell Biol. 1997;29: 1255-72.
- D'Amato G, Ruffilli A, Sacerdoti G, et al.** *Parietaria pollinosis: a review.* Allergy 1992;47:443-9.
- David A. Beuther and E. Rand Sutherland.** *Overweight, Obesity, and Incident Asthma A Meta-analysis of Prospective Epidemiologic Studies.* Am J Respir Crit Care Med Vol.2007; 175.pp 661–666.
- De Matteis R, Dashtipour K, Ognibene A, et al.** *Localization of leptin receptor splice variants in mouse peripheral tissues by immunohistochemistry.* Proc Nutr Soc. 1998;57:441-8.
- Dieudonne MN, Machinal-Quelin F, Serazin-Leroy V, et al.** *Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002; 293:622.
- Dykewicz MS, Fineman S.** *Executive Summary of Joint Task Force Practice Parameters on Diagnosis and Management of Rhinitis.* Ann Allergy Asthma Immunol 1998;81:463-8.
- Fantuzzi G, Faggioni R.** *Leptin in the regulation of immunity, inflammation and haematopoiesis.* J Leukoc Biol. 2000;68: 437-446.
- Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, et al.** *Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency.* J Clin Invest.2002; 110: 1093-1103.
- Flaherman V, Rutherford GW.** *A meta-analysis of the effect of high weight on asthma.* Arch Dis Child. 2006;91:334-9.
- Fokkens WJ, Godthelp T, Holm AF, et al.** *Local 41 corticosteroid treatment: the effect on cells and cytokines in nasal allergic inflammation.* Am J Rhinol 1998;12:21-6.
- Friedman JM, Halaas JL.** *Leptin and regulation of body weight in mammals.* Nature. 1998; 395:763-70.

- Frieri M, Therattil J, Chavarria V, et al.** *Effect of mometasone furoate on early and late phase inflammation in patients with seasonal allergic rhinitis.* Ann Allergy Asthma Immunol 1998;81(5 Pt 1):431-7.
- Frosh AC, Sandhu G, Joyce R, et al.** *Prevalence of rhinitis, pillow type and past present ownership of furred pets.* Clin Exp Allergy 1999;29:457-60.
- Gilliland FD, Berhane K, Islam T, et al.** *Obesity and the risk of newly diagnosed asthma in school-age children.* Am J Epidemiol 2003;158:406-15.
- Goren I, Kampfer H, Podda M, et al.** *Leptin and wound inflammation in diabetic ob/ob mice: differential regulation of neutrophil and macrophage influx and a potential role for the scab as a sink for inflammatory cells and mediators.* Diabetes. 2003;52(11):2821-32.
- Greiner AN, Hellings PW, Rotiroti G, et al.** *Allergic rhinitis.* Lancet.2011 ; 378: 2112-2122.
- Guerra S, Sherrill DL, Martinez FD, et al.** *Rhinitis as an independent risk factor for adult-onset asthma.* J Allergy Clin Immunol 2002; 109 (3): 419-25.
- Hardwick JC, Van Den Brink GR, Offerhaus GJ, et al.** *Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells.* Gastroenterology 2001;121(1):79-90.
- Horn R, Geldszus R, Potter E, et al.** *Radioimmunoassay for the detection of leptin in human serum.* Exp Clin Endocrinol Diabetes 1996;104:454-8.
- Houseknecht KL, Mantzoros CS, Kuliawat R, et al.** *Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity.* Diabetes 1996;45:1638-43.
- International Consensus on Diagnosis and Management of Rhinitis.**
International Rhinitis Management Working Group. Allergy 1994; 49 (19 Suppl):1-34.
- Jensen MD, Møller N, Nair KS, et al.** *Regional leptin kinetics in humans.* Am J Clin Nutr. 1999 Jan;69(1):18-21.
- Jin L, Zhang S, Burguera BG, et al.** *Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells.* Endocrinology 2000;141:333-9.
- Karin M, Yamamoto Y, Wang QM.** *The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development.* Nat Rev Drug Discov 3: 17–26, 2004.

- King TP, Hoffman D, Løwenstein H, et al.** *Allergen nomenclature.* *Allergy* 1995;50(9):765-74.
- Lacroix MC, Rodriguez-Enfedaque A, Grébert D, et al.** *Insulin but not leptin protects olfactory mucosa from apoptosis.* *J Neuroendocrinol* 2011;23(7):627-40.
- Laharrague P, Larrouy D, Fontanilles AM, et al.** *High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture.* *Faseb J* 1998;12:747e52.
- Lammert A, Kiess W, Bottner A, et al.** *Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood.* *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;283:982-8.
- Laud K, Gourdou I, Pessemesse L, et al.** *Identification of leptin receptors in human breast cancer: Functional activity in the T47-D breast cancer cell line.* *Mol. Cell Endocrinol* 2002; 188:219.
- Lebowitz MD.** *Epidemiological studies of the respiratory effects of air pollution.* *Eur Respir J.* 1996;9:1029-54.
- Lee GH, Proenca R, Montez JM, et al.** *Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice.* *Nature* 1996;379:632-5.
- Lee MJ, Wang Y, Ricci MR, Sullivan S, et al.** *Acute and chronic regulation of leptin synthesis, storage, and secretion by insulin and dexamethasone in human adipose tissue.* *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292:E858-64.
- Leroy P, Dessolin S, Villageois P, et al.** *Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin.* *J Biol Chem.* 1996;271: 2365-8.
- Li H, Matheny M, Scarpace MJ.** *Beta 3-adrenergic-mediated suppression of leptin gene expression in rats.* *Am J Physiol.* 1997;272: 1031-6.
- Li Z, Shen J, Wu WK, et al.** *Leptin induces cyclin D1 expression and proliferation of human nucleus pulposus cells via JAK/STAT, PI3K/Akt and MEK/ERK pathways.* *PLoS One* 2012; 7 (12):e53176.
- Lin Ry, Nahal A, Lee M, et al.** *Changes in nasal leukocytes and epithelial cells associated with topical beclomethasone treatment.* *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;84:618-22.

- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al.** *Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects.* Nat Med. 1995;1: 1155-61.
- Malmhäll C, Bossios A, Pullerits T, et al.** *Effects of pollen and nasal glucocorticoid on FOXP3+, GATA-3+ and T-bet+ cells in allergic rhinitis.* Allergy 2007;62(9):1007-13.
- Mamun AA, Lawlor DA, Alati R, et al.** *Increaseing body mass index from age 5 to 14 years predicts asthma among adolescents: evidence from a birth cohort study.* Int J Obesity 2007;31:578-83.
- Marple BF, Fornadley JA, Patel AA.** *Keys to successful management of patients with allergic rhinitis: focus on patient confidence, compliance, and satisfaction.* Otolaryngol Head Neck Surg 2007; 136:S107–S124.
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, et al.** *Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans.* Nat Med 1997;3:1029-33.
- Matarese G, Procaccini C, De Rosa V, et al.** *Regulatory T cells in obesity: the leptin connection.* Trends Mol Med. 2010;16(6):247-56.
- McCormack PL, Scott LJ.** *Fluticasone furoate: Intranasal use in allergic rhinitis.* Drugs. 2007;67:1905–1915.
- Meltzer EO, Orgel HA, Rogenes PR, et al.** *Nasal cytology in patients with allergic rhinitis: effects of intranasal fluticasone propionate.* J Allergy Clin Immunol 1994;94:708-15.
- Mix H, Widjaja A, Jandl O, et al.** *Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the human stomach.* Gut. 2000;47:481-6.
- Moore GE, Sandberg AA.** *Studies of a human tumor cell line whith a diploid karyotype.* Cancer. 1964 Feb;17:170-5.
- Morash B, Li A, Murphy PR, et al.** *Leptin gene expression in the brain and pituitary gland.* Endocrinology 1999;140: 5995-8.
- Murad A, Nath AK, Cha ST, et al.** *Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing.* Faseb J. 2003;17(13):1895-7.
- Nair P, Radford K, Fanat A, et al.** *The effects of leptin on airway smooth muscle responses.* Am J Respir Cell Mol Biol. 2008;39(4): 475-481.

- Oda A, Taniguchi T, Yokoyama M.** *Leptin stimulates rat aortic smooth muscle cell proliferation and migration.* Kobe J. Med. Sci. 2001;47:141.
- Parck HY, Kwon HM, Lim HJ, et al.** *Potential role of leptin in angiogenesis: Leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro.* Exp. Mol. Med. 2001;33:95.
- Passalacqua G, Ciprandi G, Canonica GW.** *The nose-lung interaction in allergic rhinitis and asthma: united airway disease.* Curr Opin Allergy Clin Immunol 2001; 1:7-13.
- Pathak RR, Grover A, Malaney P, et al.** *Loss of phosphatase and tensin homolog (PTEN) induces leptin-mediated leptin gene expression: feed-forward loop operating in the lung.* J Biol Chem. 2013;288(41):29821-35.
- Petty DA, Blaiss MS.** *Intranasal corticosteroids topical characteristics: Side effects, formulation, and volume.* Am J Rhinol Allergy 2013 Nov;27(6):510-3.
- Platts-Mills TA.** *The role of allergens in allergic airway disease.* J Allergy Clin Immunol. 1998;101(2 Pt 2):S364-6.
- Profita M, Gagliardo R, Di Giorgi R, et al.** *In vitro effects of flunisolide on MMP-9, TIMP-1, fibronectin, TGF beta 1 release and apoptosis in sputum cells freshly isolated from mild to moderate asthmatics.* Allergy 2004;59:927-32.
- Prolo P, Wong M, Licinio J.** *Leptin.* Int. J. Biochem. Cell Biol. 1998;30, 1285–1290.
- Pujols L, Mullol J, Pérez M, et al.** *Expression of the human glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in human respiratory epithelial cells and their regulation by dexamethasone.* Am J Respir Cell Mol Biol. 2001;24(1):49-57.
- Reseland JE, Syversen U, Bakke I, et al.** *Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization.* J Bone Miner Res 2001;16:1426e33.
- Rondón C, Campo P, Toghias A, et al.** *Local allergic rhinitis: concept, pathophysiology, and management.* J Allergy Clin Immunol 2012 Jun;129(6):1460-7.

- Russo VC, Metaxas K, Kobayaschi M, et al.** *Antiapoptotic Effects of Leptin in Huma Neuroblastoma Cells.* *Endocrinology.* 2004;145(9):4103–12.
- Salter M, Biggadike K, Matthews JL et al.** *Pharmacological properties of the enhanced-affinity glucocorticoid fluticasone furoate in vitro and in an in vivo model of respiratory inflammatory disease.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L660–L667, 2007.
- Shore SA, Johnston RA.** *Obesity and asthma.* *Pharmacol Ther.* 2006;110(1):83-102.
- Shore SA.** *Obesity and asthma: possible mechanisms.* *J Allergy Clin Immunol* 2008;121(5):1087-93;
- Sibbald B, Rink E.** *Epidemiology of seasonal and perennial rhinitis: clinical presentation and medical history.* *Thorax* 1991;46:895-901.
- Sibbald B.** *Epidemiology of allergy rhinitis.* In : *ML B, editor. Epidemiology of clinical allergy.* Monographs in Allergy. Basel: Karger;1993. p. 61-9.
- Sitaraman S, Liu X, Charrier L, Gu LH, et al.** *Colonicleptin: source of a novel proinflammatory cytokine involved in IBD.* *Faseb J.* 2004;18:696-8.
- Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, De Johnston J, et al.** *Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk.* *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1810e3.
- Somasundar P, Yu A, Vona-Davis L, et al.** *Differential responses of leptin on cancer in vitro.* *J. Surg. Res.* 2002;113:50.
- Song Si-Youn, Woo Hyun-Jae, Bae Chang Hoon.** *Expression of Leptin Receptor in Nasal Polyps: Leptin as a Mucosecretagogue.* *Laryngoscope.* 2010;120(5):1046-50.
- Strachan D, Sibbald B, Weiland S, et al.** *Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC).* *Pediatr Allergy Immunol* 1997;8:161-76.
- Svanes C, Jarvis D, Chinn S, et al.** *Childhood environment and adult atopy: results from the European Community Respiratory Health Survey.* *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:415-20.

- Taga T, Kishimoto T.** *Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines.* Annu Rev Immunol 1997;15:797-819.
- Taideman J, Demetter P, Rottiers I, et al.** *Identification of the nasal mucosa as a new target for leptin action.* Histopathology 2010;56(6):789-98.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al.** *Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R.* Cell. 1995;83:1263-71.
- Torday JS, Sun H, Wang L, et al.** *Leptin mediates the parathyroid hormone-related protein paracrine stimulation of fetal lung maturation.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002;282:L405e10.
- Tsuchiya T, Shimizu H, Horie T, et al.** *Expression of leptin receptor in lung: leptin as a growth factor.* Eur J Pharmacol. 1999; 365: 273-9.
- Ur E, Wilkinson DA, Morasch BA, Wilkinson M.** *Leptin immunoreactivity is localized to neurons in rat brain.* Neuroendocrinology. 2002;75:264-77.
- Valovirta E, Myrseth SE, Palkonen S.** *The voice of the patients: allergic rhinitis is not a trivial disease.* Curr Opin Allergy Clin Immunol 2008 Feb;8(1):1-9. Review.
- Valovirta E, Ryan D.** *Patient adherence to allergic rhinitis treatment: results from patient surveys.* Medscape J Med. 2008;10(10):247.
- Van-Cauwemberge P, Bachwert C, Passalacqua G, et al.** *Consensus statement on the treatment of allergic rhinitis. EAACI Position paper.* Allergy 2000;55:116-34.
- Vernooy JH, Drummen NE, Van Suylen RJ, et al.** *Enhanced pulmonary leptin expression in patients with severe COPD and asymptomatic smokers.* Thorax 2009;64 (1): 26-32.
- Vernooy JH, Drummen NE, van Suylen RJ, et al.** *Enhanced pulmonary leptin expression in patients with severe COPD and asymptomatic smokers.* Thorax 2009;64:26e32.
- Vernooy JH, Ubags ND, Brusselle GG, et al.** *Leptin as regulator of pulmonary immune responses: involvement in respiratory diseases.* Pulm Pharmacol Ther. 2013;26(4):464-72.

- Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, et al.** *Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis.* Am J Respir Crit Care Med 1997;156:591-9.
- Wauman J, Tavernier J.** *Leptin receptor signaling: pathways to leptin resistance.* Front Biosci 2011;17:2771e93. J.
- Wyrwoll CS, Mark PJ, Waddell BJ.** *Directional secretion and transport of leptin and expression of leptin receptor isoforms in human placental BeWo cells.* Mol Cell Endocrinol 2005;241:73-9.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al.** *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.* Nature. 1994;372:425-432.
- Zou H, Henzel Wj, Liu X, et al.** *Apaf-1, a human protein homologous to Caenorabditis elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation on caspase-3.* Cell. 1997; 90: 405-13.