

Il ruolo dei basofili nella flogosi allergica

Role of Basophils in Allergic Inflammation

V. FORTE, V. MAGLIONE, E. DI MARO, F. GRANATA, V. CASTALDO, A. GENOVESE

Divisione di Immunologia Clinica e Allergologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli «Federico II»

Parole chiave

Allergia • Basofili • Citochine • Istamina

Key words

Allergy • Basophils • Cytokines • Histamine

Riassunto

I granulociti basofili, identificati da Paul Ehrlich nel 1878, svolgono un ruolo significativo nella flogosi e nel rimodellamento tissutale nelle malattie allergiche. I basofili umani stimolati immunologicamente sintetizzano molteplici mediatori della flogosi allergica come l'istamina, i cisteinil leucotrieni ed il *Platelet Activating Factor* (PAF). Tali mediatori chimici sono responsabili dei molteplici sintomi che caratterizzano le reazioni da ipersensibilità immediata. Inoltre, l'attivazione immunologica dei basofili umani induce la sintesi di citochine (IL-4 e IL-13) che svolgono un ruolo fondamentale nei meccanismi patogenetici delle malattie allergiche. I basofili umani possono essere attivati da stimoli immunologici IgE- (antigene, anti-IgE ed anti-FcεRIα) e non-IgE-mediati (C5a, C3a, FMLP, IL-3, ecc.). Abbiamo inoltre dimostrato che alcuni superallergeni endogeni (proteina Fv), batterici (proteina A e proteina L) o virali (gp 120) possono attivare i basofili interagendo con specifici domini delle IgE. In questa rassegna vengono fornite alcune fondamentali informazioni sugli eventi biochimici conseguenti all'attivazione dei basofili, con particolare enfasi sui meccanismi di regolazione nella produzione di citochine.

Summary

Human basophils were identified by Paul Ehrlich in 1878. These cells and their mediators play a central role in allergic inflammation and tissue remodelling. Immunologic activation of basophils induces the release of histamine and the de novo synthesis of cysteinyl leukotriene C₄ and Platelet Activating Factor (PAF). The immunologic challenge of human basophils also induces the release of IL-4 and IL-13, two important cytokines in the pathogenesis of allergic disorders. Activation of basophils can be induced by antigen, anti-IgE, anti-FcεRIα and by non-IgE-mediated stimuli (C5a, C3a, FMLP, IL-3, etc.). We have also demonstrated that endogenous (protein Fv), bacterial (protein A and protein L) and viral superantigens (gp120) can activate basophils through the interaction with IgE. In this review we examine the basic information supporting a role of basophils and their mediators in the pathogenesis of allergic diseases.

I granulociti basofili maturano nel midollo osseo e vengono immessi in circolo come cellule mature e ben differenziate; essi rappresentano circa l'1% dei leucociti presenti nel sangue periferico¹⁻³. Studi condotti *in vivo* ed *in vitro* hanno dimostrato che i basofili umani derivano da precursori midollari in comune con gli eosinofili^{4,5} e che l'interleuchina 3 (IL-3) è il principale fattore in grado di indurne la maturazione^{6,7}. Il numero dei basofili, degli eosinofili e dei loro progenitori aumenta dopo infusione di IL-3 o di GM-CSF nei primati non umani⁸. Studi *in vitro* hanno dimostrato che da precursori CD34⁺ tenuti in coltura 2-3 settimane in presenza di IL-3,^{6,7} derivano cellule morfologicamente e funzionalmente analoghe ai basofili. Parimenti, è possibile ottenere cellule del tutto simili ai basofili da precursori circolanti nel sangue del cordone ombelicale umano posti in coltura in presenza di IL-3⁹.

Non è stato ancora chiarito il meccanismo che consente ai basofili di sopravvivere a lungo in coltura; infatti, studi precedenti avevano suggerito che la loro emivita fosse di pochi giorni¹⁰. Tuttavia, è ormai accertato che basse concentrazioni di IL-3 consentano la sopravvivenza di queste cellule in coltura per un periodo protratto¹¹. È pertanto ipotizzabile che, *in vivo*, in un microambiente contenente IL-3, i basofili possano sopravvivere per alcune settimane. Infine, è opportuno ricordare che l'incubazione con IL-3 determina un aumento della reattività *in vitro* di tali cellule^{12,13}. Dall'insieme di queste osservazioni deriva che la IL-3 è il principale fattore di crescita dei basofili, è in grado di indurne l'attivazione ed esercita un effetto anti-apoptotico.

Molecole di adesione

Le tecniche citofluorimetriche attualmente disponibili hanno consentito di caratterizzare il fenotipo dei basofili umani ^{14 15}. È attualmente possibile distinguere i basofili da altri leucociti circolanti mediante anticorpi monoclonali specifici per i suoi determinanti (IgE e recettori ad alta affinità per le IgE: Fcε-RI) coniugati direttamente o indirettamente con un fluorocromo. La disponibilità di diverse fluorescenze (FITC, PE, PerCP, APC) consente inoltre di valutare l'espressione di altre molecole di superficie. È ormai evidente che i basofili infiltrano selettivamente le sedi della flogosi allergica a livello cutaneo, polmonare e della mucosa nasale ¹⁶⁻²⁰. Pertanto è del tutto comprensibile che tali cellule esprimano diverse molecole che consentono, a seguito di complessi eventi interattivi, la loro migrazione dal compartimento ematico attraverso la barriera endoteliale. Le molecole di adesione presenti sui basofili includono le selectine, le integrine e molecole appartenenti alla famiglia delle immunoglobuline. La Tabella I riassume i principali recettori ed i relativi ligandi presenti sui basofili umani. Le selectine svolgono un ruolo

fondamentale nel processo di adesione dei basofili all'endotelio vascolare: la L-selectina (CD62L) interagisce con i ligandi CD34, MadCAM-1 e GlyCAM-1 ^{21 22}. L'espressione delle integrine β2, CD11b/CD18 (Mac-1) e CD35 (CR1) è aumentata nella risposta ad alcuni stimoli attivanti ^{21 23-25}. Queste molecole, assieme alle β1 integrine ed alle molecole ICAM, svolgono un ruolo fondamentale nel processo di migrazione transendoteliale: in particolare, la β1 integrina, VLA-4, espressa sui basofili, sugli eosinofili e sui linfociti T, ma non sui neutrofili, interagisce specificamente con il ligando VCAM-1. Le suddette interazioni svolgono un ruolo fondamentale nella migrazione dei basofili nella sede della flogosi allergica a livello polmonare, cutaneo e nasale ¹⁶⁻²⁰. L'espressione di VCAM-1 sulle cellule endoteliali è indotta dalla IL-4 e dalla IL-13 ^{26 27}, citochine sintetizzate dai basofili attivati immunologicamente ^{12 28-32}. Quest'ultima osservazione suggerisce che i basofili possano promuovere la loro stessa migrazione, così come quella di altri tipi cellulari (eosinofili e cellule T), attraverso l'induzione di specifici ligandi di adesione (VCAM-1) mediata da IL-4 e IL-13 con un meccanismo autocrino.

Tab. I. Principali molecole di adesione e ligandi naturali dei basofili umani.

Molecole di adesione (denominazione CD)	Ligandi
<i>Integrine</i>	
LFA-1 (CD11a/CD18)	ICAM-1, ICAM-2
Mac-1, CR3 (CD11b/CD18)	C3bi, ICAM-1
αdβ2 Integrina	VCAM-1, ICAM-3
VLA-4 (CD49d/CD29)	VCAM-1, Fibronettina
VLA-5 (CD49e/CD29)	Fibronettina
α4β7 Integrina	VCAM-1, Fibronectina, MAdCAM-1
<i>Selectine</i>	
L-Selectina (CD62L)	CD34, MAdCAM-1
PECAM-1 (CD31)	PECAM-1, αvβ3
ICAM-1 (CD54)	LFA-1, Mac-1
ICAM-2 (CD102)	LFA-1
ICAM-3 (CD50)	LFA-1, αdβ2
Siglec-3 (CD33)	Sconosciuto
<i>Carboidrati ed altre Molecole di Adesione</i>	
Sialil-Lewis ^x (CD15s)	E-selectina
Sialil-dimerico Lewis ^x	E-selectina
PSGL-1 (CD162)	P-selectina
Lattosilceramide (CD17)	Sconosciuto
Leucosialina (CD43)	Acido ialuronico
Pgp-1 (CD44)	Acido ialuronico

Recettori di membrana per citochine e per chemiochine

È noto che i basofili umani esprimono molteplici recettori di membrana per diverse citochine (Tab. II)¹⁴. Il più importante recettore per le citochine espresso sulla membrana citoplasmatica dei basofili è IL-3R, costituito da una catena α specifica e da una catena β condivisa con il recettore per IL-5 e GM-CSF. IL-3R è espresso preferenzialmente sui basofili rispetto ad altri leucociti^{33,34}.

I basofili umani esprimono anche recettori per le chemiochine, di cui si conoscono quattro grandi famiglie α (CXC), β (CC), γ (C), e δ (CX₃C) comprendenti oltre 40 proteine (Tab. III)³⁵. Queste cellule esprimono recettori prevalentemente per le chemiochine della famiglia CC o β chemochine, la cui formula di struttura è caratterizzata da due molecole di cisteina contigue. L'IL-8 appartiene alla famiglia CXC o α chemiochine, dove le due cisteine sono separate da un altro aminoacido.

Circa l'80% dei basofili umani esprime il recettore CCR3 che ha una specificità per le chemiochine CC (eotassina, eotassina-2 e RANTES)³⁶, in grado di promuovere la chemiotassi dei basofili *in vitro*³⁷⁻³⁹. È ipotizzabile che l'eotassina ed il RANTES, prodotte dalle cellule endoteliali ed epiteliali⁴⁰, contribuiscano attraverso l'attivazione di CCR3 presente sui basofili al loro reclutamento nella sede della flogosi allergica. Inoltre, alcune di queste chemiochine (MCP-3, MCP-4, IL-8, ecc.) inducono anche la secrezione di mediatori chimici dai basofili umani⁴¹⁻⁴³.

Recentemente è stato dimostrato che i basofili umani esprimono un importante recettore (CRTH2) attivato dalla prostaglandina D₂ (PGD₂)⁴⁴ che è selettivamente espresso sui linfociti T_H2⁴⁵ ed induce la chemiotassi degli stessi basofili umani⁴⁴. È importante ricordare che la PGD₂ è il principale metabolita dell'acido arachidonico sintetizzato attraverso la cicloossigenasi dai mastociti umani attivati immunologicamente^{46,47}.

Tab. II. Principali recettori per le citochine espressi dai basofili umani.

Recettori	Ligandi
CD25 (Tac, IL-2B β)	IL-2
CD123 (IL-3R)	IL-3
CD124 (IL-4R)	IL-4
CD125 (IL-5R)	IL-5
CD128 (IL-8R)	IL-8
IL-18R	IL-18
CD116 (GM-CSFR α)	GM-CSF

Tab. III. Principali recettori per le chemiochine espressi dai basofili umani.

Recettori	Ligandi
CCR1	MIP-1 α
CCR2	MCP-1, MCP-3
CCR3	Eotassina, RANTES
CCR5	MIP-1 β
CXCR1	IL-8
CXCR2	GRO- α , NAP-2
CXCR4	SDF-1 α
CRTH2	Prostaglandina D ₂

Fc ϵ RI, Fc γ RII e CD40L

I basofili ed i mastociti umani possiedono sulla loro superficie un recettore ad alta affinità per le IgE (Fc ϵ RI) espresso come un tetramero $\alpha\beta\gamma_2$ ⁴⁸. L'interazione IgE-Fc ϵ RI è mediata dalla subunità α che possiede un'elevata affinità ($K_a > 10^{10}$) per le IgE. La porzione della subunità α che conferisce specificità per le IgE contiene 4 residui di triptofano organizzati in un dominio idrofobico verosimilmente responsabile dell'alta affinità per le IgE⁴⁹⁻⁵¹. Il numero di recettori Fc ϵ RI presente sui basofili varia tra 5×10^3 e 10^6 /cellula⁵².

Malveaux *et al.* hanno dimostrato che la densità di Fc ϵ RI sui basofili è correlata con i livelli di IgE sieriche⁵³. Questa importante osservazione ha condotto all'ipotesi che le concentrazioni sieriche di IgE possano influenzare il numero di recettori per IgE su basofili e su mastociti umani. Tale ipotesi è stata recentemente confermata da studi resi possibili dalla disponibilità di un anticorpo monoclonale umanizzato anti-IgE (E25) che è anche utilizzato nella terapia di alcune malattie allergiche⁵⁴. È stato osservato che la somministrazione e.v. dell'anticorpo anti-IgE (E25) in soggetti allergici determina la riduzione di oltre il 90% dei livelli di IgE sieriche e che la caduta dei livelli sierici di IgE si accompagna alla riduzione della espressione di Fc ϵ RI sui basofili⁵⁵. Questa importante osservazione dimostra che la densità di Fc ϵ RI è modulabile e che i livelli sierici di IgE possono influenzare il numero di Fc ϵ RI sui basofili e, verosimilmente, sui mastociti umani. A tal proposito è stato recentemente dimostrato che l'incubazione *in vitro* dei mastociti con IgE monomeriche aumenta la loro sopravvivenza inibendo l'apoptosi^{56,57}. Quest'ultimo fenomeno è verosimilmente riconducibile alla stimolazione, da parte dell'IgE, della sintesi di citochine dai mastociti. È pertanto ipotizzabile che nei pazienti con malattie allergiche le elevate concentrazioni di IgE possano contribuire all'aumento della densità di mastociti e basofili.

Diversi studi hanno dimostrato che altre cellule del sistema immunitario possono esprimere FcεRI: in particolare, le cellule di Langerhans, i monociti di pazienti atopici e le cellule dendritiche⁵⁸⁻⁶⁰. A tal proposito è interessante segnalare che la subunità β, che svolge un importante ruolo di trasduzione del segnale, non è espressa su queste cellule e che in questo caso i recettori sono di tipo trimero (αγγ). In effetti, le cellule dendritiche ed i monociti di soggetti normali non esprimono un numero significativo di recettori FcεRI, pur possedendo nel citoplasma catene α. Viceversa, le cellule ottenute da soggetti atopici esprimono recettori FcεRI trimerici del tipo αγγ (Fig. 1); infine alcuni autori hanno evidenziato FcεRI su eosinofili isolati da pazienti con ipereosinofilia⁶¹. È comunque opportuno segnalare che la densità di FcεRI su basofili e mastociti umani è 10-100 volte superiore a quella di monociti, cellule dendritiche ed eosinofili di pazienti atopici⁶².

Sui basofili umani è stato identificato il recettore FcγRII (CD32), responsabile del legame con varie sottoclassi di IgG; sebbene il suo ruolo nei basofili umani non sia conosciuto, vi sono evidenze che tale recettore nei roditori possa mediare segnali con effetto inibente su quelli iniziati da FcεRI⁶³. È stato infatti prospettato che nei mastociti dei roditori il legame FcγRII/IgG possa inibire l'attivazione cellulare indotta da FcεRI inibendo in tal modo il rilascio di mediatori chimici⁶⁴.

Evidenze sperimentali hanno documentato che i basofili umani esprimono sulla superficie cellulare il ligando per CD40 (CD40L)²⁸; questo è espresso sui B linfociti e pertanto l'interazione CD40/CD40L rappresenta un elemento importante per stimolare la sintesi di IgE da parte dei B linfociti. In effetti, attraver-

Fig. 1. Rappresentazione schematica della espressione di recettori trimerici (αγγ) per le IgE (FcεR) su monociti, cellule dendritiche e cellule di Langerhans. Le cellule di soggetti atopici esprimono recettori di membrana di tipo trimero (αγγ) privi della catena β. Viceversa, le cellule di soggetti normali non esprimono un numero significativo di recettori FcεR, ma contengono nel citoplasma catene α.

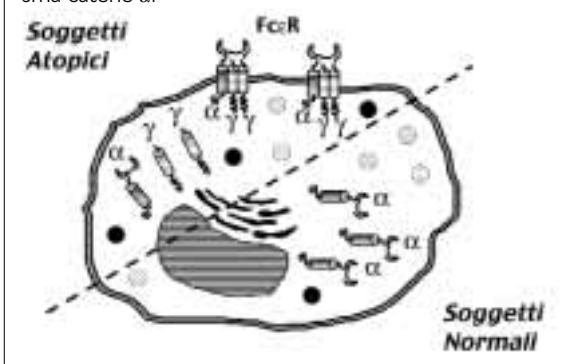
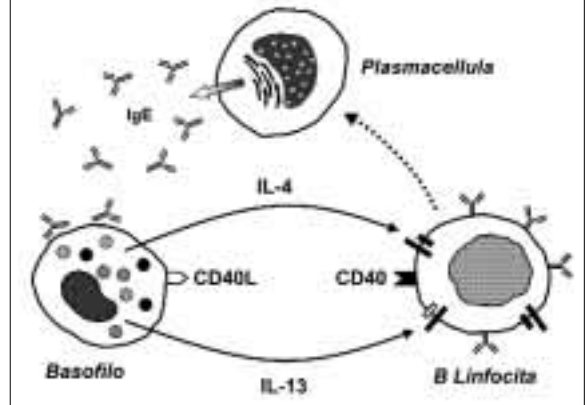


Fig. 2. Rappresentazione schematica del meccanismo attraverso cui i basofili possono di per sé stimolare la sintesi di IgE dai B linfociti. La stimolazione immunologica dei basofili induce la sintesi e la secrezione di IL-4 ed IL-13, due citochine fondamentali per lo switch isotipico IgE. Inoltre, i basofili esprimono sulla membrana citoplasmatica CD40L che interagendo con CD40 presente sui B linfociti fornisce un ulteriore stimolo necessario alla sintesi di IgE.



so la secrezione di IL-4 e IL-13 e l'espressione di CD40L, i basofili possono fornire segnali necessari e sufficienti alle cellule B per indurre la produzione di IgE²⁸ (Fig. 2).

Recentemente sono stati descritti tre anticorpi monoclonali in grado di identificare epitopi specifici espressi solo sui basofili o sui loro progenitori. Il primo, definito anticorpo 2D7 identifica una proteina associata a granuli di 72 kDa⁶⁴, il secondo (BB1) identifica una molecola citoplasmatica che è anche secreta e potrebbe rappresentare un nuovo mediatore⁶⁶, l'ultimo (97A6), infine, interagisce con un antigene di superficie presente sui progenitori dei basofili e sulle cellule mature⁶⁷. L'impiego di tali anticorpi ha già consentito mediante tecniche di immunocisto-chimica di identificare i basofili nelle diverse sedi della flogosi allergica; in particolare essi sono stati individuati a livello cutaneo e polmonare durante le reazioni allergiche di tipo ritardato^{19 20} ed in pazienti con orticaria cronica⁶⁸. Inoltre, in pazienti con sensibilizzazione allergica⁶⁹ dopo stimolazione antigenica è stato possibile documentare la presenza di basofili nel liquido di lavaggio bronchiale (BAL).

Mediatori della flogosi allergica

ISTAMINA E TRIPTASI

I basofili ed i mastociti umani sintetizzano significative quantità di istamina (1 e 3 pg/cellula, rispettivamente) attraverso la reazione di decarbossilazione

della L-istidina. L'istamina presente nei granuli citoplasmatici dei basofili è complessata con un proteoglicano, il condroitin solfato, mentre nei mastociti umani forma un complesso con l'eparina. Essa possiede molteplici effetti fisiopatologici ed agisce attivando specifici recettori (H_1 , H_2 , H_3 ed H_4) presenti selettivamente in diversi tessuti e cellule umane⁷⁰⁻⁷⁴. Gli effetti immediati dell'istamina (vasodilatazione, aumento della permeabilità vascolare e broncocostrizione) sono in gran parte mediati dall'attivazione dei recettori H_1 presenti sulle fibrocellule muscolari lisce dell'apparato respiratorio e cardiovascolare e sulle cellule endoteliali⁷⁵⁻⁷⁷.

Studi condotti negli ultimi anni hanno consentito di evidenziare che l'istamina è anche in grado di attivare molteplici cellule immunocompetenti umane; ad esempio, modula in maniera complessa la sintesi di citochine dai monociti⁷⁸⁻⁸⁴, dai linfociti⁸⁵⁻⁸⁸ e dai macrofagi polmonari umani⁸⁹⁻⁹¹. L'attivazione del recettore H_2 attraverso l'aumento delle concentrazioni intracellulari di AMP ciclico, inibisce la produzione di IL-1, IFN γ , TNF- α e IL-12^{78-80,82,83} e potenzia quella di IL-10^{82,90} e di IL-18 dai monociti⁸⁴. Al contrario, l'attivazione del recettore H_1 espresso sui macrofagi polmonari umani induce, attraverso l'aumento delle concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare, l'espressione e la secrezione di IL-6 e l'esocitosi⁹¹. L'istamina è inoltre in grado di modulare l'attività dei linfociti T citotossici e delle cellule NK, verosimilmente attraverso i recettori H_2 ^{87,92-94}. Il recettore H_3 espresso prevalentemente a livello del sistema nervoso centrale^{70,71} e dell'apparato cardiovascolare⁹⁵⁻⁹⁷, è stato identificato anche sulle cellule dendritiche umane⁹⁸ e sui macrofagi alveolari⁷³. Il recettore H_4 , infine, recentemente clonato nell'uomo^{74,99-102}, è espresso in maniera funzionalmente attiva sugli eosinofili⁷² ed è in via di identificazione sui monociti umani e sulle cellule dendritiche umane (Triggiani e Granata, comunicazione personale).

Queste osservazioni sono di supporto all'ipotesi che l'istamina non sia soltanto un mediatore della fase acuta della flogosi allergica, ma che sia in grado di modulare anche l'evoluzione a lungo termine della risposta immune ed il rimodellamento tissutale in corso di flogosi allergica.

La triptasi è una proteasi neutra contenuta prevalentemente nei granuli secretori dei mastociti umani¹⁰³. Sono state recentemente identificate almeno 5 isoforme di triptasi sintetizzate dai mastociti umani. Recenti osservazioni hanno dimostrato che nei basofili sono presenti piccole concentrazioni di triptasi e che queste possono esserne secrete a seguito di attivazione immunologica¹⁰⁴.

CISTEINIL LEUCOTRIENE C_4 (LTC $_4$)

I basofili ed i mastociti umani attivati immunologicamente sintetizzano *de novo* diversi metaboliti del-

l'acido arachidonico: in particolare, i basofili sintetizzano attraverso la 5-lipossigenasi (5-LO) il cisteinil leucotriene C_4 (LTC $_4$); i mastociti umani sintetizzano attraverso la 5-LO LTC $_4$, ed, attraverso la cicloossigenasi, la prostaglandina D_2 (PgD $_2$)^{47,105}. Il LTC $_4$ viene sintetizzato *de novo* a partire dall'acido arachidonico che è liberato dai fosfolipidi di membrana attraverso l'azione di fosfolipasi A_2 (PLA $_2$). I basofili umani contengono almeno due tipi di PLA $_2$, una citosolica ad alto peso molecolare (cPLA $_2$) ed una secretoria a basso peso molecolare (sPLA $_2$), presente in forma inattiva all'interno dei granuli secretori. L'attivazione immunologica dei basofili umani induce la fosforilazione della cPLA $_2$ che è l'enzima prevalentemente responsabile della mobilitazione dell'acido arachidonico destinato alla sintesi di LTC $_4$ che a sua volta viene successivamente convertito in LTD $_4$ ed LTE $_4$. L'insieme, LTC $_4$, LTD $_4$ ed LTE $_4$, costituisce funzionalmente la cosiddetta *Slow Reacting Substance of Anaphylaxis* (SRS-A)¹⁰⁶.

La sPLA $_2$ è verosimilmente secreta nell'ambiente extracellulare dai basofili umani attivati e svolge funzioni di mediatore proinfiammatorio, indipendentemente dalla sua attività enzimatica, interagendo con specifici recettori espressi su macrofagi, monociti, eosinofili e neutrofili umani^{107,108}.

L'inalazione di cisteinil leucotriene C_4 , D_4 ed E_4 induce una marcata broncocostrizione nel paziente asmatico^{109,110}. In particolare, LTC $_4$ è circa 6.000 volte più potente dell'istamina nell'indurre la contrazione della muscolatura liscia bronchiale; inoltre, i cisteinil leucotrieni aumentano la produzione di muco ed inducono il reclutamento degli eosinofili¹¹¹. Il ruolo dei cisteinil leucotrieni nella patogenesi dell'asma bronchiale e della rinite allergica è confermato dall'effetto terapeutico degli inibitori della loro sintesi e degli antagonisti recettoriali di queste molecole nel trattamento delle malattie allergiche¹¹².

PLATELET ACTIVATING FACTOR (PAF)

Il *Platelet Activating Factor* (PAF) è un mediatore fosfolipidico che possiede molteplici effetti biologici¹¹³. Isolato e caratterizzato inizialmente nei soprannati di basofili di coniglio attivati immunologicamente¹¹³, induce l'aggregazione delle piastrine e la loro degranulazione; inoltre, è un potente agente broncocostrittore, potenzia la secrezione di muco ed induce il reclutamento di eosinofili e basofili nelle vie aeree¹¹⁴. L'attivazione IgE-mediata dei basofili umani stimola la sintesi di PAF e di un altro fosfolipide strutturalmente simile al PAF, l'1-acil-2-acetil-glicerofosfocolina (acil-PAF)¹¹⁵ che interagisce con lo stesso recettore del PAF, ma è circa 1000 volte meno potente¹¹⁶. Risultati ottenuti in diversi modelli sperimentali indicano che l'acil-PAF possa svolgere, *in vivo* ed *in vitro*, funzioni di antagonista del PAF.

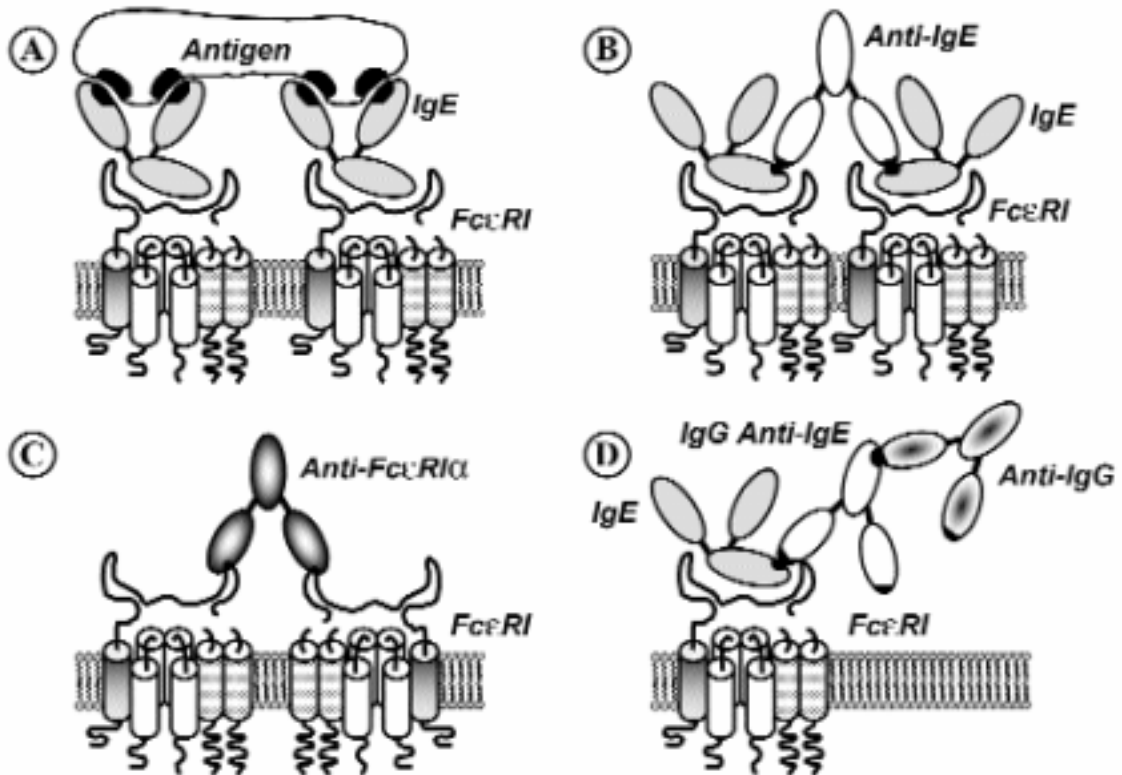
CITOCHINE

È ormai documentato in maniera convincente che i basofili umani stimolati immunologicamente sintetizzano due citochine (IL-4 ed IL-13) di fondamentale importanza nella patogenesi delle malattie allergiche^{12 28-32}. Entrambe sono presenti nella sede della flogosi allergica e le proprietà immunomodulanti mediate da ciascuna di esse hanno un ruolo centrale nella patogenesi dell'infiammazione e nel rimodellamento tessutale in corso di malattie allergiche. In particolare, IL-4 e IL-13 sono le uniche citochine sinora identificate in grado di indurre uno *switch* isotipico nei linfociti B da IgM ad IgE²⁸. Per entrambe le citochine, questo effetto è mediato dalla attivazione del fattore di trascrizione STAT6^{117,118}. Inoltre, IL-4 ed IL-13 attivano le cellule endoteliali aumentando l'espressione di VCAM-1 e promuovendo la selettiva migrazione transendoteliale di eosinofili, basofili e linfociti T^{26 119}. Infine, l'espressione del fenotipo Th2 dei linfociti è dipendente dall'esposizione all'IL-4¹²⁰.

Non vi sono evidenze che i basofili siano in grado di sintetizzare citochine di tipo T_H1 (IFN- γ) o T_H2 diverse da IL-4 e IL-13; è stato dimostrato che essi sintetizzano anche la chemiochina MIP-1 α , suggerendo un loro ruolo addizionale nel reclutamento cellulare¹²¹.

È stato calcolato che i basofili rappresentano la fonte predominante di IL-4 ed IL-13 anche in colture miste di leucociti (circa 1% di basofili) stimolate con specifici allergeni¹²². In passato si riteneva che cellule T antigene-specifiche fossero la fonte primaria di queste due citochine nella risposta allergica: in effetti, la frequenza di basofili antigene-specifici (esprimenti IgE antigene-specifiche) è maggiore di quella di cellule T allergene-specifiche che è al massimo di 1 su 1000-5000 linfociti T. È stato pertanto calcolato che anche una piccola percentuale di basofili può secernere IL-4 e IL-13 fino a 10 volte di più rispetto ai linfociti. È lecito pertanto prospettare che i basofili rappresentino quantitativamente la maggiore risorsa di tali citochine nelle diverse fasi delle reazioni allergiche.

Fig. 3. Rappresentazione schematica dei 4 principali meccanismi di attivazione del complesso di Fc ϵ RI-IgE sui basofili umani. A) Interazione tra almeno due determinanti antigenici con la porzione Fab delle IgE. B) Interazione a ponte tra un anticorpo anti-Fc ϵ ed il rispettivo epitopo della porzione Fc ϵ delle IgE. C) Interazione a ponte tra un anticorpo anti-Fc ϵ RI α ed il rispettivo epitopo della catena α di Fc ϵ RI. D) Aggregazione di complessi immuni contenenti IgG anti-IgE ed anti-IgG. Le cellule Fc ϵ RI umane possono essere attivate anche da superantigeni endogeni (proteina Fv), batterici (proteina A e proteina L) e virali (gp120).



L'osservazione, inoltre, che i basofili presenti nella mucosa bronchiale dopo broncoprovocazione segmentale specifica esprimono mRNA per la IL-4¹²³, dimostra che i basofili secernono citochine anche nella sede della flogosi allergica.

Sebbene molteplici evidenze *in vitro* dimostrino che mastociti umani isolati^{28 124-133} possono sintetizzare diverse citochine, alcuni aspetti di tale fenomeno sono tuttora controversi. È stato dimostrato, comunque, che i mastociti umani contengono *Stem Cell Factor* (SCF) sia nei granuli secretori, sia in forma libera^{134 135} e non si può escludere l'ipotesi, infine, che la sintesi di citochine dai mastociti umani richieda la presenza di una o più componenti di origine tessutale o umorale.

Attivazione immunologica dei basofili umani

L'attivazione immunologica dei basofili umani può avvenire attraverso molteplici meccanismi IgE- e non IgE-mediati. I meccanismi non IgE-mediati sono attivati da frazioni del complemento (le anafilatossine C5a e C3a) che stimolano specifici recettori di membrana (C5aR e C3aR)¹³⁶⁻¹³⁸. Inoltre, sui basofili umani sono espressi almeno due recettori per i peptidi formilati (FMLP) denominati FPR e FPR-L1 (de Paulis et al., comunicazione personale).

L'attivazione del complesso FcεRI-IgE dei basofili si può realizzare attraverso almeno 4 meccanismi illustrati, nella Figura 3. Il classico meccanismo antigenico prevede l'interazione a ponte di almeno due IgE contigue con i determinanti antigenici dell'allergene. La seconda modalità prevede l'interazione a ponte di due frammenti Fcε da parte di un anticorpo anti-IgE^{31 139}; recentemente è stato prospettato un meccanismo di tipo autoimmune basato sulla dimostrazione nel siero di pazienti allergici di autoanticorpi diretti contro un epitopo della catena α di FcεRI¹⁴⁰; infine, è stata documentata la possibilità di attivazione dei basofili attraverso complessi immuni contenenti IgE. Sono questi, in sintesi, i classici meccanismi immunologici in grado di indurre l'attivazione dei basofili ed il rilascio di mediatori della flogosi e citochine.

Attivazione superallergenica

Abbiamo recentemente identificato nuovi stimoli in grado di attivare i basofili ed i mastociti umani con un meccanismo immunologico di tipo «superallergenico»¹⁴¹. In tal senso, abbiamo identificato una proteina endogena (proteina Fv)^{31 103}, alcune proteine batteriche (proteina A dello *Staphylococcus aureus* e proteina L del *Peptostreptococcus magnus*) ed una glicoproteina virale (gp120 di HIV-1)^{32 47 139}, ovvero,

proteine di varia origine che hanno la capacità di interagire con elevata affinità con le IgE umane adese alle cellule FcεRI⁺. In particolare, la proteina Fv è sintetizzata dal fegato umano e la sua sintesi è stimolata da virus (HAV, HBV ed HCV) dell'epatite virale. In corso di tale malattia le concentrazioni di proteina Fv nei liquidi biologici aumentano significativamente¹⁴². Essa possiede 6 siti di legame per una regione delle immunoglobuline (Ig) umane comune alla famiglia V_H3^{143 144} che, come è noto rappresenta circa il 50% delle Ig umane, cosicché la probabilità che la proteina Fv interagisca con IgE V_H3⁺ è particolarmente elevata. Abbiamo dimostrato che la proteina Fv (1-10 ng/ml) rappresenta il più potente stimolo IgE-mediato dei basofili umani in quanto induce la secrezione di istamina e la sintesi di LTC₄, di IL-4 e di IL-13^{31 103}, comportandosi, in definitiva, come un superallergene immunoglobulinico in grado di attivare le cellule FcεRI⁺ umane.

Anche la proteina A dello *Staphylococcus aureus* e la gp120 di HIV attivano i basofili umani con analoghe modalità, ovvero, interagendo con le IgE V_H3⁺ ed inducono in tal modo sia la secrezione di mediatori preformati (istamina), sia la sintesi *de novo* di LTC₄ e di citochine (IL-4 ed IL-13)^{32 141}.

Un ulteriore meccanismo superallergenico di tipo immunoglobulinico è mediato dalla interazione di almeno 4 siti presenti sulla proteina L del *Peptostreptococcus magnus* con le catene leggere di tipo k delle Ig umane. L'interazione proteina L-IgE induce infatti la secrezione di metaboliti della flogosi allergica sia dai basofili sia dai mastociti umani^{47 145}.

Abbiamo, quindi, identificato almeno tre stimoli superallergenici immunoglobulinici: di tipo endogeno (proteina Fv), batterico (proteina A e proteina L) e virale (gp 120) in grado di attivare le cellule FcεRI⁺ umane. Non si può escludere, pertanto, l'ipotesi che l'aumento delle IgE sieriche e le manifestazioni allergiche che si verificano o si riacutizzano in corso di alcune infezioni batteriche (*S. aureus*) o virali (infezioni HAV, HBV, HCV ed HIV-1) possano essere attribuite almeno in parte a tale meccanismo superallergenico.

Caratteristiche dell'attivazione IgE-dipendente dei basofili

La secrezione di mediatori e di citochine IgE-dipendente si verifica quando un allergene interagisce con almeno due IgE specifiche presenti sulle cellule FcεRI⁺. L'interazione IgE-FcεRI⁺ è estremamente complessa ed il grado di reattività cellulare è in gran parte dipendente dalla sensibilità della cellula (i.e. il concetto di *releasability*)¹⁴⁶. La *releasability* dei basofili è controllata geneticamente¹⁴⁷ ed è aumentata in pazienti con malattie allergiche^{148,149}. Inoltre, la

sensibilità tra i basofili di diversi donatori è estremamente variabile, richiedendo l'aggregazione di un minimo di 200 fino ad un massimo di 30.000 recettori FcεRI per indurre il 50% della risposta massimale ⁵².

Il rilascio IgE-mediato di istamina è completo entro 20 minuti dallo stimolo; la produzione ed il rilascio di LTC₄ seguono una cinetica simile, mentre la secrezione di citochine è significativamente più lenta ³². Infine la secrezione di IL-4 inizia 60-90 minuti dopo l'attivazione immunologica ed è completa dopo circa 4 ore. Da notare che basse concentrazioni di IL-4 (< 10 pg/10⁶ basofili) possono essere rilevate già 5-10 min dopo lo stimolo e che tali livelli rappresentano solo una piccola frazione (circa 1%) di quella prodotta nelle 4 ore successive ¹⁵⁰. A differenza della IL-4, la sintesi di IL-13 segue una cinetica più lenta e prolungata: abbiamo infatti dimostrato che la secrezione IgE-mediata di IL-13 inizia diverse ore dopo il rilascio di IL-4 e che raggiunge il picco circa 20 ore dopo l'attivazione immunologica dei basofili ³².

La cinetica dell'accumulo di mRNA per IL-4 e IL-13 conferma i dati sulle differenti modalità di secrezione delle due citochine. Inoltre, piccole quantità di mRNA per IL-4 sono costitutivamente espresse nei basofili in condizioni basali e l'attivazione immunologica di questi ultimi stimola la sintesi di mRNA per IL-4 a partire da 30 minuti con livelli massimi tra i 90-120 minuti. Infine la cinetica dell'mRNA per la IL-13 ha andamento più tardivo rispetto a quello della IL-4 ¹⁵¹.

Attivazione IgE-indipendente dei basofili

È noto che i basofili umani possono essere attivati da una serie di stimoli IgE-indipendenti ¹⁻³. Le anafilatossine C5a e C3a ed alcuni peptidi batterici come FMLP, uno stimolo monovalente che attiva i recettori di membrana accoppiati alle proteine G ¹⁵², sono in grado di indurre il rilascio di istamina dai basofili interagendo con specifici recettori di membrana ^{136-138,152}. Le anafilatossine interagiscono con specifici recettori (C5aR e C3aR) presenti sui basofili e sui mastociti cutanei e cardiaci ¹³⁴. È stato osservato che in opportune condizioni sperimentali, C5a e FMLP sono anche in grado di attivare la produzione di LTC₄ e di indurre la secrezione di IL-4 o IL-13 dai basofili, ma solo in presenza di IL-3 ^{30,153}. Anche il *Platelet Activating Factor* (PAF) e la *Major Basic Protein* (MBP), sintetizzati rispettivamente dai mastociti e dagli eosinofili, sono in grado di indurre il rilascio di istamina dai basofili ^{154,155}, mentre proteine cationiche degli eosinofili come *Eosinophils Cationic Protein* (ECP) e la stessa *Major Basic Protein* (MBP) inducono il rilascio di istamina selettivamente dai mastociti cardiaci umani ¹⁵⁶.

È noto che molte chemiochine possono attivare i basofili umani: in particolare, MCP-1, MCP-3 e l'IL-8 possono indurre il rilascio di istamina dai basofili ¹⁵⁷⁻¹⁶⁰ mentre l'eotassina, il RANTES e MIP-1α, hanno un effetto soltanto marginale sul rilascio di tale mediatore, ma inducono una risposta più vigorosa se i basofili sono preincubati con IL-3. Infine nessuna di queste chemiochine sembra in grado di stimolare la produzione di IL-4 o di IL-13 dai basofili.

de Paulis e Collaboratori hanno recentemente dimostrato che la proteina Tat di HIV-1 induce il rilascio di istamina dai basofili umani interagendo con il recettore CCR3 ³⁸. In realtà, Tat agisce come analogo di origine virale di una β chemiochina (virochina). La sola chemiochina CXC che induce il rilascio di istamina dai basofili è IL-8 ¹⁵⁷.

Molteplici citochine sono in grado di potenziare la secrezione immunologica di mediatori dai basofili umani: per esempio IL-1α, GM-CSF, IL-5, IL-3, e NGF aumentano la secrezione IgE-mediata di istamina e di LTC₄ ^{153 158-160}. In particolare, il NGF potenzia la produzione di IL-4 ed IL-13 dai basofili umani con un meccanismo mediato dalla attivazione del recettore trkA.

Trasduzione del segnale e controllo farmacologico della secrezione di mediatori dai basofili

Studi condotti su linee cellulari di basofili e di mastociti o su mastociti di roditori hanno consentito di accumulare una notevole serie di informazioni concernenti i segnali intracellulari che regolano la secrezione di mediatori. Tuttavia, è ormai evidente che i meccanismi di trasduzione del segnale nei modelli murini hanno una scarsa rilevanza per le cellule FcεRI⁺ umane. Inoltre, le due linee cellulari umane, HMC-1 e KU812, derivate rispettivamente da mastociti e basofili umani, non esprimono recettori FcεRI rendendo in tal modo precaria l'estrapolazione dei risultati ai modelli di attivazione IgE-mediata delle cellule FcεRI⁺ umane. Infine, esistono tuttora problemi metodologici che rendono difficile lo studio biochimico ed immunologico dei mastociti purificati da tessuti umani, a differenza di quanto avviene per i basofili, che sono facilmente isolabili dal sangue periferico di soggetti normali o di pazienti allergici. È infatti possibile isolare dal sangue periferico un numero di basofili sufficiente per delineare i processi di trasduzione del segnale che sono alla base del rilascio di istamina, di LTC₄, di IL-4 e di IL-13. In tal senso, intendiamo accennare ai risultati di recenti esperienze volte a chiarire i meccanismi di regolazione del rilascio di queste tre classi di mediatori dai basofili umani.

Lyn è una tirosina chinasi appartenente alla famiglia Src, un gruppo di chinasi che svolgono un ruolo fondamentale come adattatori tra i recettori di membrana e la catena di trasduzione del segnale intracellulare. Studi condotti in animali con deficit parziale di *lyn* hanno evidenziato alterazioni della funzione dei B linfociti e dei mastociti^{160 161} e nel caso di deficit totale è stata documentata una significativa riduzione delle reazioni IgE-mediate a livello cutaneo¹⁶².

L'aggregazione di FcεRI sui basofili umani induce l'attivazione di tirosine-chinasi, p53/56*lyn* e p72*syk* la cui espressione e fosforilazione possono essere rilevate nei basofili pochi minuti dopo l'attivazione IgE-mediata. Gli inibitori di tirosine chinasi inibiscono la fosforilazione di *lyn* e la successiva attivazione di alcune proteine, tra cui *syk*¹⁶³ con conseguente marcata riduzione della secrezione di tutte le classi di mediatori, suggerendo che l'attivazione di *lyn* e *syk* costituisca un evento metabolico precoce che regola la secrezione IgE-mediata. Infine, recenti studi suggeriscono che il fenotipo di basofili non responsivi a stimoli IgE-mediati è caratterizzato da una carenza di espressione di *syk*¹⁶⁴.

Studi farmacologici indicano che alcuni eventi metabolici precoci (*lyn* e *syk*) partecipano alla secrezione delle tre classi di mediatori generati in risposta a stimoli IgE-mediati. Non è attualmente noto se altri eventi metabolici tardivi intervengano nel controllo della liberazione dei tre tipi di mediatori chimici.

La sintesi di LTC₄ dai basofili umani sembra essere fortemente dipendente dall'attivazione della cPLA₂ che avviene principalmente da parte delle chinasi ERK1 ed ERK2. Queste proteine, appartenenti alla famiglia delle MAP-chinasi, sono serin-treonina chinasi verso le quali converge il segnale intracellulare trasdotto dalle chinasi *lyn* e *syk* via p21 ras. La fosforilazione sequenziale delle ERK1/2 e della cPLA₂ si associa al rilascio IgE-dipendente di LTC₄ dai basofili mentre l'inibizione della fosforilazione di ERK1/2, mediante un inibitore selettivo, determina una conseguente inibizione della fosforilazione della cPLA₂ e del rilascio di LTC₄^{165 166}. È interessante notare che l'inibitore ha scarso effetto sulla secrezione di istamina e di IL-4 suggerendo che gli eventi intracellulari che regolano il rilascio di tali mediatori siano a monte dell'attivazione di ERK1/2. Una via metabolica potenzialmente coinvolta sia nella sintesi delle citochine sia nel rilascio di mediatori potrebbe essere quella della chinasi PI₃, proteina a valle di *lyn* e *syk* che sembra essere associata ad una diversa via metabolica di trasduzione. Da ricordare che alcuni inibitori della chinasi PI₃ inibiscono la secrezione delle varie classi di mediatori¹⁶⁷.

Molteplici evidenze sperimentali dimostrano che il calcio citosolico e la proteina chinasi C (PKC) svolgono un ruolo preminente nella risposta secretoria dei basofili^{168 169}. Infatti, sia stimoli univalenti

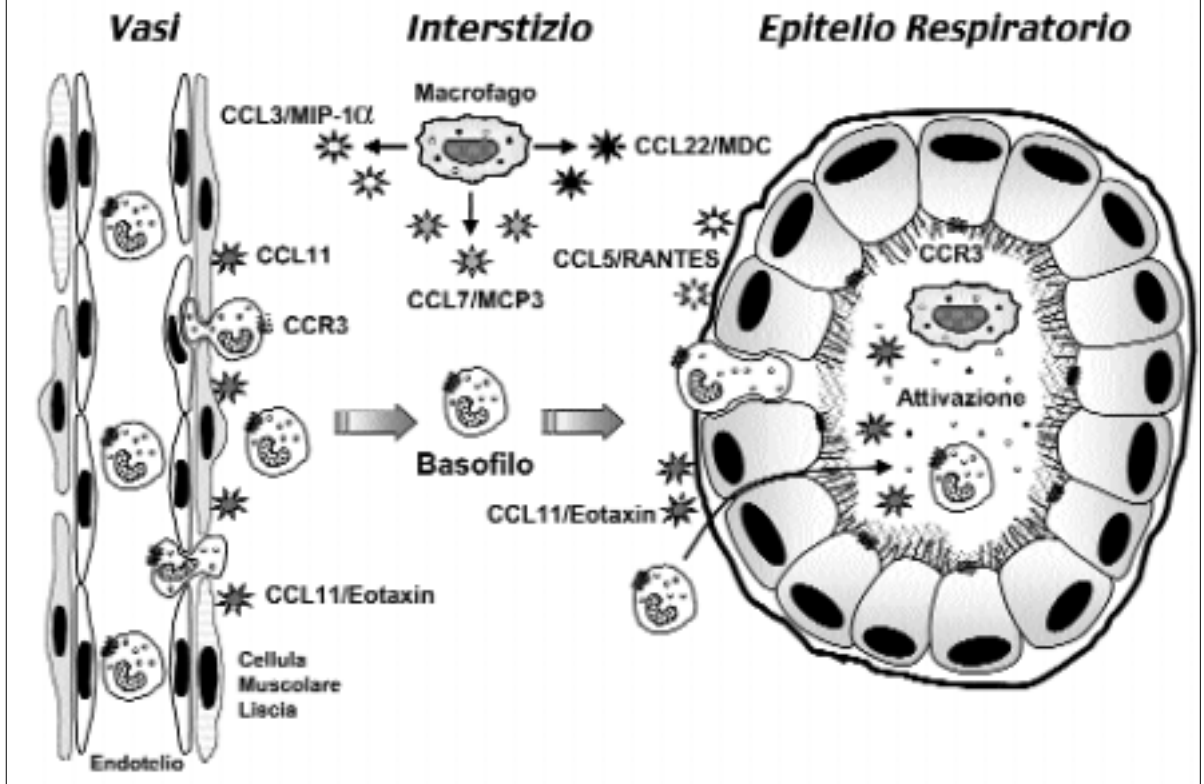
(FMLP e C5a) sia stimoli interagenti con FcεRI attivano la PLC rispettivamente attraverso una proteina legante il GTP oppure una tirosina chinasi (*syk*). Una delle conseguenze dell'attivazione di entrambe le vie è che si formano due messaggeri: uno di questi è il diacilglicerolo (DAG), un importante regolatore della PKC, l'altro è costituito dagli inositoli trifosfati (derivati dal metabolismo del fosfatidilinositolo, IP), che hanno un ruolo nella regolazione dei livelli di calcio libero in quanto inducono il rilascio dello ione dai depositi intracellulari.

Sebbene l'attivazione della PKC sia ben documentata nel controllo della secrezione di mediatori dalle cellule RBL¹⁷⁰, il suo ruolo negli eventi secretori dei basofili umani, conseguenti all'attivazione IgE-mediata, è in parte controverso¹⁷¹. Infatti, sono stati identificati nei basofili diversi isoenzimi della PKC (β1 e β2 e δ) la cui attivazione, dimostrata dalla loro traslocazione sulle membrane cellulari, è stata osservata solo a seguito della stimolazione con forbolo miristato (PMA), un diretto attivatore delle PKC, o con FMLP. Viceversa, l'attivazione dei basofili con anti-IgE non è associata alla traslocazione della PKC. In effetti, è stato dimostrato che gli inibitori della PKC potenziano il rilascio di istamina indotto da anti-IgE, suggerendo che l'attivazione della PKC potrebbe svolgere un ruolo inibente la secrezione IgE-mediata dai basofili. È importante notare che la staurosporina (SP), inizialmente utilizzata come inibitore della PKC, inibisce il rilascio di istamina IgE-mediato, ma non quello FMLP-mediato¹⁷². Tali risultati sono difficilmente interpretabili in quanto la staurosporina inibisce anche l'attivazione precoce e tardiva delle tirosine chinasi associate con l'attivazione di FcεRI.

L'attivazione delle PKC svolge un ruolo ancor più complesso nella sintesi delle citochine dai basofili, in quanto possiede sia attività inibente che stimolante. Il forbolo miristato (PMA) è un potente attivatore della secrezione di istamina dai basofili¹⁷³, ma non induce il rilascio di IL-4; in realtà PMA inibisce la secrezione di IL-4 indotta da uno ionoforo del Ca²⁺ (composto A23187). In queste condizioni sperimentali la PKC influenza negativamente la produzione di IL-4 dai basofili¹⁶⁹ mentre PMA esercita un effetto opposto sulla secrezione di IL-13 dagli stessi. In questo caso PMA stimola la secrezione di IL-13 e questo effetto è inibito dagli inibitori della PKC. Pertanto, l'attivazione della PKC sembra svolgere un duplice ruolo nella produzione di citochine dai basofili regolando negativamente la sintesi di IL-4 e positivamente la secrezione di IL-13.

È noto che l'aumento delle concentrazioni di Ca²⁺ citosolico svolge un ruolo fondamentale negli eventi secretori dei basofili¹⁶⁸ e che stimoli IgE-mediati ed univalenti possono indurre un aumento del Ca²⁺ che si associa alla degranulazione di tali cellule. Sebbene

Fig. 4. Rappresentazione schematica dei meccanismi mediati dalle chemiochine che determinano l'infiltrazione di granulociti basofili a livello del parenchima polmonare e dei bronchi nei pazienti asmatici. I basofili circolanti aderiscono alle cellule endoteliali attraverso l'interazione tra specifiche molecole di adesione ed i rispettivi ligandi. La presenza di chemiochine (CCL11/Eotassina, CCL5/RANTES, etc.) che attivano i rispettivi recettori (CCR3, ecc.) presenti sulla membrana citoplasmatica dei basofili favorisce la loro attivazione e migrazione, attraverso gli spazi endoteliali, nel parenchima polmonare. I macrofagi residenti nel parenchima polmonare (circa 80% delle cellule residenti) ed a livello alveolare sintetizzano CCL3/MIP-1 α , CCL7/MCP-3 e CCL22/MDC. Altre chemiochine come CCL11/Eotassina e CCL5/RANTES sono sintetizzate dalle cellule epiteliali dei bronchi. I recettori CCR3 sono anche espressi sulle cellule dell'epitelio ciliato dei bronchi. Le concentrazioni locali di queste chemiochine favoriscono la migrazione dei basofili attraverso le cellule epiteliali nel lume bronchiale, la loro attivazione ed il rilascio di mediatori della flogosi allergica.



molti studi abbiano evidenziato una buona correlazione tra l'incremento del Ca^{2+} citosolico libero ed il rilascio di istamina dai basofili, la relazione tra questi fenomeni è molto più complessa di quanto inizialmente prospettato. Anche la secrezione IgE-mediata di IL-4 è fortemente influenzata dagli aumenti del Ca^{2+} libero citosolico. Infatti l'aggiunta di un chelante del Ca^{2+} (EGTA) blocca la secrezione di citochine indotta da anti-IgE e gli ionofori del Ca^{2+} sono i più potenti attivatori della sintesi di IL-4 e IL-13. D'altra parte, la scarsa efficacia di FMLP e di C5a sulla sintesi di IL-4 e di IL-13 potrebbe riflettere il fatto che questi stimoli univalenti inducono aumenti soltanto transitori del Ca^{2+} citosolico nei basofili.

Vi sono molteplici evidenze che il Ca^{2+} possa agire anche attraverso l'interazione con il complesso della calcineurina. A tal proposito appare di grande rilievo l'osservazione del nostro gruppo che il composto

FK-506 e la ciclosporina A sono potenti inibitori della secrezione di IL-4 in risposta all'attivazione IgE-mediata^{31,32}. Tali composti sono inibitori dell'attività fosfatase della calcineurina e a basse concentrazioni^{31,32} prevengono la secrezione di IL-4 e IL-13.

Esistono molte somiglianze ed alcune significative differenze nei meccanismi che controllano la sintesi di IL-4 e IL-13 nei basofili umani; infatti la produzione delle due citochine a seguito di stimoli che inducono una risposta sostenuta dal Ca^{2+} è inibita sia da FK-506 sia dalla ciclosporina A. Viceversa, la sintesi di IL-13 indotta da IL-3 è resistente a questa classe di farmaci. Gli inibitori della PKC prevengono la secrezione di IL-13 indotta da PMA, ma non quella stimolata da IL-3. Inoltre, i glucocorticoidi inibiscono sia la sintesi di IL-4 sia quella di IL-13 indotta da tutti gli stimoli finora testati^{174,175}. Da sottolineare infine che questi ultimi farmaci richiedono un breve tem-

po di esposizione per inibire la secrezione di citochine in confronto a quello necessario per prevenire il rilascio d'istamina dai basofili ¹⁷⁴.

Il ruolo dei basofili nelle malattie allergiche

Molteplici evidenze cliniche e sperimentali suggeriscono che i basofili ed i loro mediatori svolgono un ruolo preminente nella patogenesi delle malattie allergiche. Studi *in vitro* eseguiti oltre 30 anni orsono hanno dimostrato in pazienti esposti a specifici allergeni che il rilascio di istamina dai basofili è correlato con la severità dei sintomi respiratori ¹⁷⁶. Esiste, inoltre, una correlazione clinica tra la presenza di malattie come asma e orticaria, il numero di basofili circolanti e la loro capacità di degranulazione (*releasability*) in risposta a vari stimoli immunologici ^{148 149}.

Un'ulteriore evidenza a supporto del ruolo dei basofili nelle malattie allergiche deriva dalla dimostrazione della loro presenza, insieme con gli eosinofili e i linfociti T_H2, nelle sedi della flogosi allergica a livello cutaneo ^{19 20 66} e dell'apparato respiratorio ^{20 67}. Koshino et al. hanno documentato in biopsie polmonari

ottenute da pazienti deceduti per asma bronchiale un incremento della densità dei basofili paragonabile a quella dei mastociti ¹⁷⁷. Inoltre l'impiego di anticorpi monoclonali ha consentito l'identificazione immunostochimica di basofili in biopsie polmonari di pazienti con asma bronchiale e con malattie allergiche cutanee ^{19 20 66}. Infine, recenti esperienze hanno confermato la presenza di basofili nel BAL anche nelle fasi tardive delle reazioni allergiche.

Si ritiene attualmente che l'infiltrazione di basofili nelle diverse sedi della flogosi allergica sia dovuta anche al loro reclutamento nei tessuti da parte di specifici fattori chemiotattici (Eotassina, RANTES, PGD₂) interagenti con specifici recettori (rispettivamente CCR3 e CRTH2) (Fig. 4).

È noto, inoltre, che IL-4 e IL-13 svolgono un ruolo fondamentale nella patogenesi delle malattie allergiche e che esse sono sintetizzate dai basofili attivati da stimoli immunologici e superallergenici.

In definitiva, appare evidente che i basofili sono in grado di contribuire alla produzione di IL-4 ed IL-13 e di svolgere un ruolo preminente nell'indurre ed amplificare la risposta allergica: attraverso la sintesi di tali citochine, infatti, i basofili promuovono la migrazione e l'attivazione di eosinofili, linfociti B e T_H2 e contribuiscono al rimodellamento tissutale.

Bibliografia

- Marone G, Lichtenstein LM, Galli SJ. *Mast Cells and Basophils*. London: Academic Press 2000.
- Marone G. *Human Basophils and Mast Cells. Biological Aspects*. Basel: Karger 1995.
- Marone G. *Human Basophils and Mast Cells. Clinical Aspects*. Basel: Karger 1995.
- Denburg JA, Telizyn S, Messner H, Lim B, Jamal N, Ackerman SJ, et al. *Heterogeneity of human peripheral blood eosinophil-type colonies: evidence for a common basophil-eosinophil progenitor*. Blood 1985;66:312-8.
- Denburg J. *The origins of basophils and eosinophils in allergic inflammation*. J Allergy Clin Immunol 1998;102:S74-6.
- Kirshenbaum AS, Goff JP, Kessler SW, Mican JM, Zsebo KM, Metcalfe DD. *Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34⁺ pluripotent progenitor cells*. J Immunol 1992;148:772-7.
- Saito H, Hatake K, Dvorak AM, Leiferman KM, Donnenberg AD, Arai N, et al. *Selective differentiation and proliferation of hematopoietic cells induced by recombinant human interleukins*. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:2288-92.
- Dvorak AM, Saito H, Estrella P, Kissel S, Arai N, Ishizaka T. *Ultrastructure of eosinophils and basophils stimulated to develop in human cord blood mononuclear cell cultures containing recombinant human interleukin-5 or interleukin-3*. Lab Invest 1989;61:116-32.
- Valent P, Schmidt G, Besemer J, Mayer P, Zenke G, Liehl E, et al. *Interleukin-3 is a differentiation factor for human basophils*. Blood 1989;73:1763-9.

- Murakami I, Ogawa M, Amo H, Ota K. *Studies on kinetics of human leukocytes in vivo with ³H-thymidine autoradiography. 3. Lymphocytes, plasma cells, and monocytes*. Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi 1969;32:391-6.
- MacGlashan DW Jr, McKenzie-White J, Chichester K, Bochner BS, Davis FM, Schroeder JT, et al. *In vitro regulation of FcεR1α expression on human basophils by IgE antibody*. Blood 1998;91:1633-43.
- Brunner T, Heusser CH, Dahinden CA. *Human peripheral blood basophils primed by interleukin 3 (IL-3) produce IL-4 in response to immunoglobulin E receptor stimulation*. J Exp Med 1993;177:605-11.
- MacGlashan DW Jr, Hubbard WC. *IL-3 alters free arachidonic acid generation in C5a-stimulated human basophils*. J Immunol 1993;151:6358-69.
- Valent P. *Immunophenotypic characterization of human basophils and mast cells*. Chem Immunol 1995;61:34-48.
- Bochner BS, Sterbinsky SA, Saini SA, Columbo M, MacGlashan DW Jr. *Studies of cell adhesion and flow cytometric analyses of degranulation, surface phenotype, and viability using human eosinophils, basophils, and mast cells*. Methods 1997;13:61-8.
- Dvorak KF, Mihm MC Jr. *Basophilic leukocytes in allergic contact dermatitis*. J Exp Med 1972;135:235-54.
- Mitchell EB, Chapman MD, Pope MF, Crow J, Jouhal SS, Platts-Mills TAE. *Basophils in allergen-induced patch test sites in atopic dermatitis*. Lancet 1982;1:127-30.
- Charlesworth EN, Kagey-Sobotka A, Schleimer RP, Norman PS, Lichtenstein LM. *Prednisone inhibits the appearance of inflammatory mediators and the influx of eosinophils and basophils associated with the cutaneous late-*

- phase response to allergen. *J Immunol* 1991;146:671-6.
- 19 Irani AMA, Huang C, Xia HZ, Kepley C, Nafie A, Fouda ED, et al. Immunohistochemical detection of human basophils in late-phase skin reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:354-62.
 - 20 Macfarlane AJ, Kon OM, Smith SJ, Zeibecoglou K, Khan LN, Barata LT, et al. Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *J Allergy Clin Immunol* 1999;105:99-107.
 - 21 Bochner BS, Sterbinsky SA. Altered expression of CD11 and Leu-8 during human basophil degranulation. *J Immunol* 1991;146:2367-73.
 - 22 Wimazal F, Ghannadan M, Muller MR, End A, Willheim M, Meidlinger P, et al. Expression of homing receptors and related molecules on human mast cells and basophils: a comparative analysis using multi-color flow cytometry and toluidine blue immunofluorescence staining techniques. *Tissue Antigens* 1999;54:499-507.
 - 23 Bochner BS, Peachell PT, Brown KE, Schleimer RP. Adherence of human basophils to cultured umbilical vein endothelial cells. *J Clin Invest* 1988;81:1355-64.
 - 24 Bochner BS, MacGlashan DW Jr, Marcotte GV, Schleimer RP. IgE-dependent regulation of human basophil adherence to vascular endothelium. *J Immunol* 1989;142:3180-6.
 - 25 Bochner BS, McKelvey AA, Sterbinsky SA, Hildreth JE, Derse CP, Klunk DA, et al. IL-3 augments adhesiveness for endothelium and Cd11b expression in human basophils but not neutrophils. *J Immunol* 1990;145:1832-37.
 - 26 Schleimer RP, Sterbinsky SA, Kaiser J, Bickel CA, Klunk DA, Tomioka K, et al. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J Immunol* 1992;148:1086-92.
 - 27 Bochner BS, Klunk DA, Sterbinsky SA, Coffman RL, Schleimer RP. IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *J Immunol* 1995;154:799-803.
 - 28 Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G, Aubry JP, Brunner T, Blasey H, et al. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 1993;365:340-3.
 - 29 Li H, Sim TC, Alam R. IL-13 released by and localized in human basophils. *J Immunol* 1996;156:4833-8.
 - 30 Ochensberger B, Daepf GC, Rihs S, Dahinden CA. Human blood basophils produce interleukin-13 in response to IgE-receptor-dependent and independent activation. *Blood* 1996;88:3028-37.
 - 31 Patella V, Giuliano A, Bouvet JP, Marone G. Endogenous superallergen protein Fv induces IL-4 secretion from human FcεRI⁺ cells through interaction with the V_H3 region of IgE. *J Immunol* 1998;161:5647-55.
 - 32 Patella V, Florio G, Petraroli A, Marone G. HIV-1 gp120 induces IL-4 and IL-13 release from human FcεRI⁺ cells through interaction with the V_H3 region of IgE. *J Immunol* 2000;164:589-95.
 - 33 Sarmiento EU, Espiritu BR, Gleich GJ, Thomas LL. IL-3, IL-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor potentiate basophil mediator release stimulated by eosinophil granule major basic protein. *J Immunol* 1995;155:2211-21.
 - 34 Yamada T, Sun Q, Zeibecoglou K, Bungre J, North J, Kay AB, et al. IL-3, IL-5, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor α-subunit, and common β-subunit expression by peripheral leukocytes and blood dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:677-82.
 - 35 Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52:145-76.
 - 36 Uguccioni M, Mackay CR, Ochensberger B, Loetscher P, Rhee S, LaRosa GJ, et al. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest* 1997;100:1137-43.
 - 37 Romagnani P, de Paulis A, Beltrame C, Annunziato F, Dentente V, Maggi E, Romagnani S, Marone G. Tryptase-chymase double-positive human mast cells express the eotaxin receptor (CCR3) and are attracted by CCR3-binding chemokines. *Amer J Pathol* 1999;155:1195-204.
 - 38 de Paulis A, De Palma R, Di Gioia L, Carfora M, Prevete N, Tosi G, et al. TAT protein is an HIV-1-encoded β-chemokine homolog that promotes migration and up-regulates CCR3 expression on human FcεRI⁺ cells. *J Immunol* 2000;165:7171-9.
 - 39 de Paulis A, Annunziato F, Di Gioia L, Romagnani S, Carfora M, Beltrame C, et al. Expression of the chemokine receptor CCR3 on human mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;124:146-50.
 - 40 Stellato C, Collins P, Ponath PD, Soler D, Newman W, La Rosa G, et al. Production of the novel C-C chemokine MCP-4 by airway cells and comparison of its biological activity to other C-C chemokines. *J Clin Invest* 1997;99:926-36.
 - 41 Kuna P, Reddigari SR, Komfeld D, Kaplan AR. IL-8 inhibits histamine release from human basophils induced by histamine-releasing factors, connective tissue activating peptide III, and IL-3. *J Immunol* 1991;147:1920-4.
 - 42 Dahinden CA, Geiser T, Brunner T, von Tscharn V, Caput D, Ferrara P, et al. Monocyte chemoattractant protein 3 is a most effective basophil- and eosinophil-activating chemokine. *J Exp Med* 1994;179:751-6.
 - 43 Garcia-Zepeda EA, Combadiere C, Rothenberg ME, Sarafi MN, Lavigne F, Hamid Q, et al. Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J Immunol* 1996;157:5613-26.
 - 44 Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, et al. Prostaglandin D₂ selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* 2001;193:255-61.
 - 45 Cosmi L, Annunziato F, Iwasaki M, Galli G, Manetti R, Maggi E, et al. CRTH2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease. *Eur J Immunol* 2000;30:2972-9.
 - 46 Patella V, Marinò I, Lamparter B, Arbustini E, Adt M, Marone G. Human heart mast cells. Isolation, purification, ultrastructure, and immunologic characterization. *J Immunol* 1995;154:2855-65.
 - 47 Genovese A, Bouvet JP, Florio G, Lamparter-Schummert B, Björck L, Marone G. Bacterial immunoglobulin superanti-

- gen proteins A and L activate human heart mast cells by interacting with immunoglobulin E. *Infect Immun* 2000;68:5517-24.
- 48 Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (FcεRI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 1999;17:931-72.
 - 49 Garman SC, Kinet JP, Jardetzky TS. Crystal structure of the human high-affinity IgE receptor. *Cell* 1998;95:951-61.
 - 50 Garman SC, Kinet JP, Jardetzky TS. The crystal structure of the human high-affinity IgE receptor (FcεRIα). *Annu Rev Immunol* 1999;17:973-6.
 - 51 Hulett MD, Brinkworth RI, McKenzie IF, Hogarth PM. Fine structure analysis of interaction of FcεRI with IgE. *J Biol Chem* 1999;274:13345-52.
 - 52 MacGlashan DW Jr, Lichtenstein LM. Studies of antigen binding on human basophils. Antigen binding and functional consequences. *J Immunol* 1983;130:2330-6.
 - 53 Malveaux FJ, Conroy MC, Adkinson NF Jr, Lichtenstein LM. IgE receptors on human basophils. Relationship to serum IgE concentration. *J Clin Invest* 1978;62:176-81.
 - 54 Milgrom H, Fick RB Jr, Su JQ, Reimann JD, Bush RK, Watrous ML, et al. Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody rhuMab-E25 study group. *N Engl J Med* 1999;341:1966-73.
 - 55 MacGlashan DW Jr, McKenzie-White J, Chichester K, Bochner BS, Davis FM, Schroeder JT, et al. In vitro regulation of FcεRIα expression on human basophils by IgE antibody. *Blood* 1998;91:1633-43.
 - 56 Asai K, Kitamura J, Kawakami Y, Yamagata N, Tsai M, Carbone DP, et al. Regulation of mast cell survival by IgE. *Immunity* 2001;14:791-800.
 - 57 Kalesnikoff J, Huber M, Lam V, Damen J, Zhang JE, Siraganian RP, et al. Monomeric IgE stimulates signaling pathways in mast cells that lead to cytokine production and cell survival. *Immunity* 2001;14:801-11.
 - 58 Bieber T, de la Salle H, Wollenberg A, Hakimi J, Chizzonite R, Ring J, et al. Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (FcεRI). *J Exp Med* 1992;175:1285-90.
 - 59 Wang B, Rieger A, Kilgus O, Ochiai K, Maurer D, Fodinger D, et al. Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via FcεRI. *J Exp Med* 1992;175:1353-65.
 - 60 Maurer D, Fiebiger E, Reininger B, Wolff-Winiski B, Jouvin M, Kilgus O, et al. Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (FcεRI) on monocytes of atopic individuals. *J Exp Med* 1994;179:745-50.
 - 61 Gounni AS, Lamkhieou B, Ochiai K, Tanaka Y, Delaporte E, Capron A, et al. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* 1994;367:183-6.
 - 62 Donnadieu E, Jouvin M, Kinet J. A second amplifier function for the Allergy-Associated FcεRI-β subunit. *Immunity* 2000;12:515-23.
 - 63 Daeron M, Malbec O, Latour S, Arock M, Fridman WH. Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors. *J Clin Invest* 1995;95:577-85.
 - 64 Daeron M, Malbec O, Lienard H, Bruhns P, Fridman W. Immunoreceptor Tyrosine-based inhibition motif-dependent negative regulation of mast cell activation and proliferation. San Diego: Academic Press 2000;185-93.
 - 65 Irani AM, Huang C, Xia HZ, Kepley C, Nafie A, Fouda ED, et al. Immunohistochemical detection of human basophils in late-phase skin reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:354-62.
 - 66 McEuen JLAR, Buckley MG, Compton SJ, Walls AF. Development and characterization of monoclonal antibody specific for human basophils and the identification of a unique secretory product of basophils activation. *Lab Invest* 1999;79:27-38.
 - 67 Buhring HJ, Simmons PJ, Pudney M, Muller R, Jarrossay D, van Agthoven A, et al. The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood* 1999;94:2343-56.
 - 68 Hoskin S, Wilson S, Sabroe R, McEuen A, Grattan C, Greaves MW, et al. Basophil infiltration of weals in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:S87.
 - 69 Guo C, Liu MC, Galli SJ, Bochner BS, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Identification of IgE-bearing cells in the late-phase response to antigen in the lung as basophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;10:384-90.
 - 70 Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H₃) of histamine receptor. *Nature* 1983;302:832-7.
 - 71 Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, Jiang X, Pyati J, Huvar A, et al. Cloning and functional expression of the human histamine H₃ receptor. *Mol Pharmacol* 1999 ;55:1101-7.
 - 72 Raible DG, Lenahan T, Fayvilevich Y, Kosinski R, Schulman ES. Pharmacologic characterization of a novel histamine receptor on human eosinophils. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:1506-11.
 - 73 Sirois J, Menard G, Moses A, Bissonnette E. Importance of histamine in the cytokine network in the lung through H₂ and H₃ receptors: stimulation of IL-10 production. *J Immunol* 2000;164:2964-70.
 - 74 Oda T, Morikawa N, Saito Y, Masuho Y, Matsumoto S. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 2000;275:36781-6.
 - 75 Vigorito C, Russo P, Picotti GB, Chiariello M, Poto S, Marone G. Cardiovascular effects of histamine infusion in man. *J Cardiovasc Pharmacol* 1983;5:531-37.
 - 76 Vigorito C, Poto S, Picotti GB, Triggiani M, Marone G. Effect of activation of the H₁ receptor on coronary hemodynamics in man. *Circulation* 1986;73:1175-82.
 - 77 Vigorito C, Giordano A, De Caprio L, Vitale DF, Maurea N, Silvestri P, et al. Effects of histamine on coronary hemodynamics in humans: role of H₁ and H₂ receptors. *J Am Coll Cardiol* 1987;10:1207-13.
 - 78 Carlsson R, Dohlsten M, Sjogren HO. Histamine modulates the production of interferon-γ and interleukin-2 by mitogen-activated human mononuclear blood cells. *Cellular Immunology* 1985;96:104-12.
 - 79 Dohlsten M, Kalland T, Sjogren HO, Carlsson R. Histamine inhibits interleukin-1 production by lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood monocytes. *Scand J Immunol* 1988;27:527-32.
 - 80 Vannier E, Miller LC, Dinarello CA. Histamine suppresses gene expression and synthesis of tumor necrosis factor α via

- histamine H_2 receptors. *J Exp Med* 1991;174:281-4.
- ⁸¹ Vannier E, Dinarello CA. *Histamine Enhances Interleukin (IL)-1-induced IL-6 gene expression and protein synthesis via H_2 receptors in peripheral blood mononuclear cells.* *J Biol Chem* 1994;13:9952-6.
 - ⁸² Elenkov IJ, Webster E, Papanicolaou DA, Fleisher TA, Chrousos GP, Wilder RL. *Histamine potently suppresses human IL-12 and stimulates IL-10 production via H_2 receptors.* *J Immunol* 1998;161:2586-93.
 - ⁸³ Van der Pouw Kraan TCTM, Snijders A, Boeije LCM, de Groot ER, Alewijnse AE, Leurs R, et al. *Histamine inhibits the production of interleukin-12 through interaction with H_2 receptors.* *J Clin Invest* 1998;102:1866-73.
 - ⁸⁴ Kohka H, Nishibori M, Iwagaki H, Nakaya N, Yoshino T, Kobashi K, et al. *Histamine is a potent inducer of IL-18 and IFN- γ in human peripheral blood mononuclear cells.* *J Immunol* 2000;164:6640-6.
 - ⁸⁵ Lagier B, Lebel B, Bousquet J, Pène J. *Different modulation by histamine of IL-4 and interferon-gamma (INF- γ) release according to the phenotype of human Th0, Th1 and Th2 clones.* *Clin Exp Immunol* 1997;108:545-51.
 - ⁸⁶ Krouwels FH, Hol BEA, Lutter R, Bruiner B, Bast A, Jansen HM, Out TA. *Histamine affects interleukin-4, interleukin-5, and interferon- γ production by human T cell clones from the airways and blood.* *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18:721-30.
 - ⁸⁷ Roszkowski W, Plaut M, Lichtenstein LM. *Selective display of histamine receptors on lymphocytes.* *Science* 1977;195:683-5.
 - ⁸⁸ Jutel M, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OAR, Malolepszy J, et al. *Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H_1 and H_2 receptors.* *Nature* 2001;413:420-5.
 - ⁸⁹ Okamoto H, Nakano K. *Regulation of interleukin-1 synthesis by histamine produced by mouse peritoneal macrophages per se.* *Immunology* 1990;69:162-5.
 - ⁹⁰ Sirois J, Menard G, Moses AS, Bissonnette EY. *Importance of histamine in the cytokine network in the lung through H_2 and H_3 receptors: stimulation of IL-10 production.* *J Immunol* 2000;164:2964-70.
 - ⁹¹ Triggiani M, Gentile M, Secondo A, Granata F, Oriente A, Tagliabata M, et al. *Histamine induces exocytosis and IL-6 production from human lung macrophages through interaction with H_1 receptors.* *J Immunol* 2001;166:4083-91.
 - ⁹² Hellstrand K, Asea A, Hermodsson S. *Role of histamine in natural killer cell-mediated resistance against tumor cells.* *J Immunol* 1990;145:4365-70.
 - ⁹³ Hellstrand K, Asea A, Dahlgren C, Hermodsson S. *Histaminergic regulation of NK cells. Role of monocyte-derived reactive oxygen metabolites.* *J Immunol* 1994;153:4940-7.
 - ⁹⁴ Asea A, Hansson M, Czerkinsky C, Houze T, Hermodsson S, Strannegard O, et al. *Histaminergic regulation of interferon- γ (IFN- γ) production by human natural killer (NK) cells.* *Clin Exp Immunol* 1996;105:376-82.
 - ⁹⁵ Endou M, Poli E, Levi R. *Histamine H_3 -receptor signaling in the heart: possible involvement of G_i/G_o proteins and N-type Ca^{++} channels.* *J Pharm Exp Therap* 1994;269:221-29.
 - ⁹⁶ Silver RB, Mackins CJ, Smith NCE, Koritchneva IL, Lefkowitz K, Lovenberg T, et al. *Coupling of histamine H_3 receptors to neuronal Na^+/H^+ exchange: a novel protective mechanism in myocardial ischemia.* *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2855-9.
 - ⁹⁷ Silver RB, Poonwasi KS, Seyedi N, Wilson SJ, Lovenberg TW, Levi R. *Decreased intracellular calcium mediates the histamine H_3 receptor-induced attenuation of norepinephrine exocytosis from cardiac sympathetic nerve endings.* *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:501-6.
 - ⁹⁸ Mazzoni A, Young HA, Spitzer JH, Visintin A, Segal DM. *Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization.* *J Clin Invest* 2001;108:1865-73.
 - ⁹⁹ Liu C, MA X, Jiang X, Wilson SJ, Hofstra CL, Blevitt J, et al. *Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H_4) expressed in bone marrow.* *Mol Pharmacol* 2001;59:420-6.
 - ¹⁰⁰ Nguyen T, Shapiro DA, George SR, Setola V, Lee DK, Cheng R, et al. *Discovery of a novel member of the histamine receptor family.* *Mol Pharmacol* 2001;59:427-33.
 - ¹⁰¹ Zhu Y, Michalovich D, Wu HL, Tan KB, Dytko GM, Mannan IJ, et al. *Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor.* *Mol Pharmacol* 2001;59:434-41.
 - ¹⁰² Drutel G, Peitsaro N, Karlstedt K, Wieland K, Smit MJ, Timmerman H, et al. *Identification of rat H_3 receptor isoforms with different brain expression and signaling properties.* *Mol Pharmacol* 2001;59:1-8.
 - ¹⁰³ Patella V, Bouvet JP, Marone G. *Protein Fv produced during viral hepatitis is a novel activator of human basophils and mast cells.* *J Immunol* 1993;151:5685-98.
 - ¹⁰⁴ Foster B, Schwartz LB, Devouassoux G, Metcalfe DD, Prussin C. *Characterization of mast-cell tryptase-expressing peripheral blood cells as basophils.* *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:287-93.
 - ¹⁰⁵ Marone G, Triggiani M, Spadaro G, Onorati AM, Genovese A. *Role of basophils in airways inflammation.* In: Page C, Banner KH, Spina D, eds. *Cellular mechanisms of airways inflammation.* Basel: Birkhäuser Publishing Ltd 2000:53-77.
 - ¹⁰⁶ Samuelsson B. *The discovery of the leukotrienes.* *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:S2-6.
 - ¹⁰⁷ Triggiani M, Granata F, Oriente A, De Marino V, Gentile M, Calabrese C, et al. *Secretory phospholipases A_2 induce b-glucuronidase release and IL-6 production from human lung macrophages.* *J Immunol* 2000;164:4908-15.
 - ¹⁰⁸ Triggiani M, Granata F, Oriente A, Gentile M, Petraroli A, Balestrieri B, et al. *Secretory phospholipases A_2 induce cytokine release from blood and synovial fluid monocytes.* *Eur J Immunol* 2002;32:67-76.
 - ¹⁰⁹ Smith LJ, Greenberger PA, Patterson R, Krell RD, Bernstein PR. *The effect of inhaled leukotriene D_4 in humans.* *Am Rev Respir Dis* 1985;131:368-72.
 - ¹¹⁰ Davidson AB, Lee TH, Scanlon PD, Solway J, Mcfadden ER, Ingram RH, et al. *Bronchoconstrictor effects of leukotriene E_4 in normal and asthmatic subjects.* *Am Rev Respir Dis* 1987;135:333-7.
 - ¹¹¹ Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T, Vilkkä V, Spur BW, Lee TH. *Leukotriene E_4 and granulocytic infiltration into asthmatic airways.* *Lancet* 1993;341:989-90.
 - ¹¹² Drazen JM, Israel E, O'Byrne PM. *Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway.* *N Engl J Med* 1999;340:197-206.

- ¹¹³ Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ. *Platelet-Activating Factor*. J Biol Chem 1979;254:9355-8.
- ¹¹⁴ Braquet PL, Touquil L, Shen Y, Vargaftig BB. *Perspectives in platelet-activating factor research*. Pharmacol Rev 1987;39:97-145.
- ¹¹⁵ Triggiani M, Goldman DW, Chilton FM. *Biological effects of 1-acyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine in the human neutrophil*. Biochim Biophys Acta 1991;108:41-7.
- ¹¹⁶ Columbo M, Horowitz EM, Patella V, Kagey-Sobotka A, MacGlashan DW Jr, Chilton FM, et al. *The effects of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAF) and 1-acyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (AAPC) on human basophil mediator release*. J Allergy Clin Immunol 1993;92:325-33.
- ¹¹⁷ Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. *STAT6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells*. Immunity 1996;4:313-9.
- ¹¹⁸ Hill S, Herlaar E, Le Cardinal A, van Heeke G, Nicklin P. *Homologous human and murine antisense oligonucleotides targeting STAT6. Functional effects on germline e-transcript*. Am J Respir Cell Mol Biol 1999;21:728-37.
- ¹¹⁹ Hemler ME. *VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes*. Annu Rev Immunol 1990;8:365-400.
- ¹²⁰ Romagnani S. *The role of lymphocytes in allergic disease*. J Allergy Clin Immunol 2000;105:399-408.
- ¹²¹ Li H, Sim TC, Grant JA, Alam R. *The production of macrophage inflammatory protein-1 α by human basophils*. J Immunol 1996;157:1207-12.
- ¹²² Schroeder JT, MacGlashan DW Jr, Kagey-Sobotka A, White JM, Lichtenstein LM. *IgE-dependent IL-4 secretion by human basophils. The relationship between cytokine production and histamine release in mixed leukocyte cultures*. J Immunol 1994;153:1808-17.
- ¹²³ Nouri-Aria KT, Irani AMA, Jacobson MR, O'Brien F, Varga EM, Till SJ, et al. *Basophil recruitment and IL-4 production during human allergen-induced late asthma*. J Allergy Clin Immunol 2001;108:205-11.
- ¹²⁴ Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf H A, Whitaker D, Murphy GF. *Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor α , which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1*. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:4220-4.
- ¹²⁵ Bradding P, Feather IH, Howarth PH, Mueller R, Roberts JA, Britten K, et al. *Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells*. J Exp Med 1992;176:1381-6.
- ¹²⁶ Ohkawara Y, Yamauchi K, Tanno Y, Tamura G, Ohtani H, Nagura H, et al. *Human lung mast cells and pulmonary macrophages produce tumor necrosis factor- α in sensitized lung tissue after IgE receptor triggering*. Am J Respir Cell Mol Biol 1992;7:385-392.
- ¹²⁷ Moller A, Lippert U, Lessmann D, Kolde G, Hamann K, Welker P, et al. *Human mast cells produce IL-8*. J Immunol 1993;151:3261-6.
- ¹²⁸ Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R, et al. *Interleukin-4, -5, and -6 and Tumor Necrosis Factor- α in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines*. Am J Respir Cell Mol Biol 1994;10:471-80.
- ¹²⁹ Okayama Y, Petit-Frere C, Kassel O, Semper A, Quint D, Tunon-de-Lara MJ, et al. *IgE-dependent expression of mR-NA for IL-4 and IL-5 in human lung mast cells*. J Immunol 1995;155:1796-808.
- ¹³⁰ Burd PR, Thompson WC, Max EE, Mills FC. *Activated mast cells produce interleukine 13*. J Exp Med 1995;181:1373-80.
- ¹³¹ Kruger-Krasagakes S, Moller A, Kolde G, Lippert U, Weber M, Henz BM. *Production of interleukin-6 by human mast cells and basophilic cells*. J Invest Dermatol 1996;106:75-9.
- ¹³² Kaartinen M, Penttila A, Kovanen PT. *Mast cells in rupture-prone areas of human coronary atheromas produce and store TNF- α* . Circulation 1996;94:2787-92.
- ¹³³ Yano K, Yamaguchi M, de Mora F, Lantz CS, Butterfield JH, Costa JJ, et al. *Production of macrophage inflammatory protein-1 α by human mast cells: increased anti-IgE-dependent secretion after IgE-dependent enhancement of mast cell IgE-binding ability*. Lab Invest 1997;77:185-93.
- ¹³⁴ Patella V, Marinò I, Arbustini E, Lamparter-Schummert B, Verga L, Adt M, et al. *Stem cell factor in mast cells and increased mast cell density in idiopathic and ischemic cardiomyopathy*. Circulation 1998;97:971-8.
- ¹³⁵ de Paulis A, Minopoli G, Arbustini E, de Crescenzo G, Dal Piaz F, Pucci P, et al. *Stem cell factor is localized in, released from and cleaved by human mast cells*. J Immunol 1999;163:2799-808.
- ¹³⁶ Siraganian RP, Hook WA. *Complement-induced histamine release from human basophils*. J Immunol 1976;116:639-46.
- ¹³⁷ Bischoff SC, De Weck AL, Dahinden CA. *Interleukin 3 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor render human basophils responsive to low concentrations of complement component C3a*. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:6813-7.
- ¹³⁸ MacGlashan DW Jr, Hubbard WC. *IL-3 alters free arachidonic acid generation in C5a-stimulated human basophils*. J Immunol 1993;151:6358-69.
- ¹³⁹ Florio G, Petraroli A, Patella V, Triggiani M, Marone G. *The immunoglobulin superantigen-binding site of HIV-1 gp120 activates human basophils*. AIDS 2000;14:931-8.
- ¹⁴⁰ Marone G, Spadaro G, Palumbo C, Condorelli G. *The anti-IgE/anti-Fc ϵ R1 α autoantibody network in allergic and autoimmune diseases*. Clin Exp Allergy 1999;29:17-27.
- ¹⁴¹ Patella V, Florio G, Oriente A, Spadaro G, Forte V, Genovese A, et al. *Human mast cells and basophils in immune responses to infectious agents*. In: Marone G, Lichtenstein LM, Galli SJ, eds. *Mast Cells and Basophils*. London: Academic Press 2000:397-418.
- ¹⁴² Bouvet JP, Pires R, Lunel-Fabiani F, Crescenzo-Chaigne B, Maillard P, Valla D, et al. *A novel F(ab)-binding factor, present in normal liver, and largely released in the digestive tract during hepatitis*. J Immunol 1990;145:1176-80.
- ¹⁴³ Silverman GJ, Roben P, Bouvet JP, Sasano M. *Superantigen properties of a human sialoprotein involved in gut-associated immunity*. J Clin Invest 1995;96:417-26.
- ¹⁴⁴ Silverman GJ, Pires R, Bouvet JP. *An endogenous sialoprotein and a bacterial B cell superantigen compete in their V_H family-specific binding interactions with human Igs*. J Immunol 1996;157:4496-502.
- ¹⁴⁵ Patella V, Casolaro V, Bjorck L, Marone G. *A bacterial Ig-binding protein that activates human basophils and mast cells*. J Immunol 1990;145:3054-61.
- ¹⁴⁶ Marone G, Poto S, Giugliano R, Celestino D, Bonini S. *Control mechanisms of human basophil releasability*. J All

- lergy Clin Immunol 1986;78:974-80.
- 147 Marone G, Poto S, Celestino D, Bonini S. *Human basophil releasability. III. Genetic control of human basophil releasability.* J Immunol 1986;137:3588-92.
 - 148 Marone G, Giugliano R, Lembo G, Ayala F. *Human basophil releasability. II. Changes in basophil releasability in patients with atopic dermatitis.* J Invest Dermatol 1986;87:19-23.
 - 149 Casolaro V, Spadaro G, Marone G. *Human basophil releasability. IV. Changes in basophil releasability in patients with allergic rhinitis or bronchial asthma.* Am Rev Respir Dis 1990;142:1108-11.
 - 150 Schleimer RP, Howard BP, Jenkins MK, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, MacGlashan DWJr. *IL-4 secretion and histamine release by human basophils are differentially regulated by protein kinase C activation.* J Leuk Biol 1998;63:692-8.
 - 151 MacGlashan DWJr, White JM, Huang SK, Ono SJ, Schroeder JT, Lichtenstein LM. *Secretion of IL-4 from basophils. The relationship between IL-4 mRNA and protein in resting and stimulated basophils.* J Immunol 1994;152:3006-16.
 - 152 de Paulis A, Ciccarelli A, de Crescenzo G, Cirillo R, Patella V, Marone G. *Cyclosporin H is a potent and selective competitive antagonist of human basophil activation by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine.* J Allergy Clin Immunol 1996;98:152-64.
 - 153 Ochensberger B, Tassera L, Biffrare D, Rihs S, Dahinden CA. *Regulation of cytokine expression and leukotriene formation in human basophils by growth factors, chemokines and chemotactic agonists.* Eur J Immunol 1999;29:11-22.
 - 154 Columbo M, Horowitz EM, Patella V, Kagey-Sobotka A, Chilton FH, Lichtenstein LM. *A comparative study of the effects of 1-acyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocoline and platelet activating factor on histamine and leukotriene C₄ release from human leukocytes.* J Allergy Clin Immunol 1993;92:325-33.
 - 155 O'Donnel MC, Ackerman SJ, Gleich GJ, Thomas LL. *Activation of basophil and mast cell histamine release by eosinophil granule major basic protein.* J Exp Med 1983;157:1981-91.
 - 156 Patella V, Marino I, Lamparter B, Arbustini E, Adt M, Marone G. *Human heart mast cells. Isolation, purification, ultrastructure, and immunologic characterization.* J Immunol 1995;154:2855-65.
 - 157 Geiser T, Dewald B, Ehrenguber MU, Clark-Lewis I, Baggiolini M. *The Interleukin-8-related Chemotactic Cytokines GR0a, GR0b and GROg Activate Human Neutrophil and Basophil Leukocytes.* J Biological Chemistry 1993;268:15419-24.
 - 158 Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, Rot A, Tschanner V, Baggiolini M, et al. *RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors.* Eur J Immunol 1993;23:761-7.
 - 159 Dahinden CA, Geiser T, Brunner T, von Tschanner V, Caput D, Ferrara P, et al. *Monocyte chemotactic protein 3 is a most effective basophil- and eosinophil-activating chemokine.* J Exp Med 1994;179:751-6.
 - 160 Alam R, Forsythe P, Stafford S, Heinrich J, Bravo R, Proost P, et al. *Monocyte chemotactic protein-2, monocyte chemotactic protein-3, and fibroblast-induced cytokine.* J Immunol 1994;153:3155-9.
 - 161 Hibbis ML, Tarlinton DM, Armes J, Grail D, Hodgson G, Maglito R, et al. *Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease.* Cell 1995;83:301-11.
 - 162 Chan VW, Meng F, Soriano P, De Franco AL, Lowell CA. *Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation.* Immunity 1997;7:69-81.
 - 163 Nishizumi H, Yamamoto T. *Impaired tyrosine phosphorylation and Ca²⁺ mobilization, but not degranulation, in lyn-deficient bone marrow-derived mast cells.* J Immunol 1997;158:2350-5.
 - 164 Lavens-Phillips S, MacGlashan DWJr. *The role of p53/56 lyn and p72 syk in IgE-mediated signal transduction in human basophils.* FASEB J 1998;12:A 3432.
 - 165 Kopley CL, Yousself L, Andrews RP, Wilson BS, Oliver JM. *Syk deficiency in nonreleaser basophils.* J Allergy Clin Immunol 1999;104:279-84.
 - 166 Gibbs BF, Grabbe J. *Inhibitors of PI3-kinase and MEK kinase differentially affect mediator secretion from immunologically activated human basophils.* J Leukoc Biol 1999;65:883-90.
 - 167 Miura K, Schroeder JT, Hubbard WC, MacGlashan DWJr. *Extracellular signal-regulated kinases regulate leukotriene C₄ generation, but not histamine release or IL-4 production from human basophils.* J Immunol 1999;162:4198-206.
 - 168 Katsushi M, MacGlashan DWJr. *Phosphatidylinositol-3 kinase regulates p21 ras activation during IgE-mediated stimulation of human basophils.* Blood 2000;96:2199-205.
 - 169 MacGlashan DWJr, Botana LM. *Biphasic Ca²⁺ responses in human basophils. Evidence that the initial transient elevation associated with the mobilization of intracellular calcium is an insufficient signal for degranulation.* J Immunol 1993;150:980-91.
 - 170 Schroeder JT, Howard BP, Jenkins MK, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, MacGlashan DWJr. *IL-4 secretion and histamine release by human basophils are differentially regulated by protein kinase C activation.* J Leukoc Biol 1998;63:692-8.
 - 171 Chang EY, Szallasi Z, Acs P, Raizada V, Wolfe PC, Fewtrell C, et al. *Functional effects of overexpression of protein kinase C- α , - β , - δ , - ϵ , and - η in the mast cell line RBL-2H3.* J Immunol 1997;159:2624-32.
 - 172 Miura K, Hubbard WC, MacGlashan DWJr. *Phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ by IL-3 is associated with increased free arachidonic acid generation and leukotriene C₄ release in human basophils.* J Allergy Clin Immunol 1998;102:512-20.
 - 173 Massey WA, Cohan VL, MacGlashan DWJr, Gittlen SW, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, et al. *Protein kinase C modulates immunoglobulin E-mediated activation of human mast cells from lung and skin. I. Pharmacologic inhibition.* J Pharmacol Exp Ther 1991;258:824-9.
 - 174 Patella V, Casolaro V, Ciccarelli A, Pettit GR, Columbo M, Marone G. *The antineoplastic bryostatins affect human basophils and mast cells differently.* Blood 1995;85:1272-82.
 - 175 Schleimer RP, Derse CP, Friedman B, Gillis S, Plaut M, Lichtenstein LM, et al. *Regulation of human basophil mediator release by cytokines. I. Interaction with antiinflammatory steroids.* J Immunol 1989;143:1310-7.
 - 176 Schreeder JT, MacGlashan DWJr, Kagey-Sobotka A, White

JM, Lichtenstein LM. *IgE-dependent IL-4 secretion by human basophils. The relationship between cytokine production and histamine release in mixed leukocyte cultures.* J Immunol 1994;153:1808-17.

¹⁷⁷ Lichtenstein LM, Osler AG. *Studies on the mechanism of hypersensitivity phenomena:IX. Histamine release from hu-*

man leukocytes by ragweed pollen antigen. J Exp Med 1964;120:507-30.

¹⁷⁸ Koshino T, Teshima S, Fukushima N, Takaishi T, Hirai K, Miyamoto Y, et al. *Identification of basophils by immunohistochemistry in the airways of post-mortem cases of fatal asthma.* Clin Exp Allergy 1993;23:919-25.