



**UNIVERSITÀ
DI PAVIA**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PAVIA

**CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA APPLICATA E
SPERIMENTALE**

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

Decifrare l'eterogeneità dell'asma

Relatrice: Prof.ssa Ilaria Ferrarotti

Correlatrice: Prof.ssa Simonetta Baraldo

Laureanda: Hannioui Jihad

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

Alla mia famiglia

A chi ha lottato per ogni respiro

A chi ha perso la battaglia

RIASSUNTO

L'asma rappresenta una vera e propria sfida diagnostica complessa dovuta alla sua natura episodica. La malattia è generalmente caratterizzata da un aumentato infiltrato infiammatorio delle vie aeree, con un aumento di eosinofili, linfociti e mastociti. Recentemente in un'ottica di medicina di precisione sono state descritte due sottopopolazioni di eosinofili: gli eosinofili infiammatori (iEOS) e gli eosinofili residenti (rEOS)

L'obiettivo principale della tesi è legato alla fenotipizzazione degli eosinofili (iEOS vs rEOS) con biomarcatori e strategie di gating specifici. Per caratterizzare meglio il ruolo degli eosinofili nella patogenesi e nella clinica della malattia sono state inoltre indagate le correlazioni con i parametri antropometrici, clinici e funzionali.

I campioni raccolti sono stati analizzati e processati attraverso la citofluorimetria a flusso seguendo un protocollo sperimentale organizzato in diverse fasi operative: immunomarcatura con anticorpi monoclonali, lisi eritrocitaria in modo tale da isolare la popolazione leucocitaria, diversi step di centrifugazione e lavaggi. La successiva analisi al citofluorimetro ha consentito un'analisi multiparametrica, integrata con un'appropriata strategia di gating. Nel primo step abbiamo effettuato l'isolamento del cluster dei granulociti sfruttando i parametri fisici (Forward e Side Scatter).

Gli eosinofili sono stati successivamente isolati come Siglec8+/CD16- (distinguendoli dai neutrofilo (Siglec8-/CD16+). Sulla base dell'espressione di CD62L sono stati fenotipizzati gli eosinofili infiammatori (iEOS) e gli eosinofili residenti (rEOS). Sono stati impiegati anche i marcatori CCR3 e IL-5R coinvolti rispettivamente nell'attività chemiotattica e nella proliferazione/differenziazione eosinofila.

La percentuale di eosinofili infiammatori è risultata significativamente aumentata nel gruppo di pazienti asmatici rispetto al gruppo di controlli sani (8,19% vs 5,60%, $p=0,021$).

Gli eosinofili infiammatori (iEOS%) sono affiorati come biomarcatori indipendenti non correlati con IgE e FeNO, diversamente hanno mostrato un legame con l'ostruzione delle vie aeree, confermato dalle correlazioni inverse con il rapporto FEV1/FVC ($\rho = -0,26$; $p = 0,029$) e il MEF50 ($\rho = -0,30$, $p = 0,013$). Questi dati preliminari di correlazione, seppur deboli, saranno indagati in maniera più approfondita con ulteriori parametri di funzionalità respiratoria. In conclusione, i risultati raccolti hanno dimostrato che l'asma come patologia diversificata, non si limita soltanto all'aumento degli eosinofili totali, ma ne altera la composizione, validando una variabilità fenotipica già discussa in letteratura. Lo studio supporta e valida la fenotipizzazione degli eosinofili e l'impatto dell'espansione della percentuale di eosinofili infiammatori, definendo e aprendo nuove strade per trattamenti specifici per una medicina sempre più personalizzata e per una migliore gestione del paziente asmatico.

INTRODUZIONE

1.1. Definizione di asma.....8

1.2 Meccanismi immunitari nell'asma allergico.....9

1.3 Citologia e istopatologia delle vie aeree nell'asma.....10

1.4 La triade dell'asma.....13

1.5 Fattori di rischio individuali e trigger di riacutizzazione.....14

1.6 Epidemiologia e impatto globale dell'asma.....16

2.Caratterizzazione biochimica del campione ematico e omeostasi del tessuto fluido.....16

2.1 Emopoiesi.....17

2.2 Eosinofili e la loro scoperta.....19

2.3 Morfologia degli eosinofili.....19

2.4 Gli eosinofili rEos e iEos.....21

2.5 Ruolo degli eosinofili nel corpo.....24

2.6 La degranulazione degli eosinofili.....24

SCOPO DELLO STUDIO25

MATERIALI E METODI

4.1 Componenti del
citofluorimetro.....27

4.2 Sistema di rilevazione e sistema ottico.....28

4.3 Citogramma.....31

4.4 Caratterizzazione immunofenotipica peculiare dei globuli bianchi nel sangue mediante citometria a flusso.....	32
4.5 Protocollo di studio sperimentale.....	36
4.6 Immunomarcatura.....	37
4.7 Lisi degli eritrociti.....	37
4.8 Centrifugazione e lavaggi	37
4.9 Acquisizione.....	38
4.10 Raccolta dati e analisi statistica.....	38

RISULTATI

5.1 Strategia di gating della popolazione leucocitaria.....	39
5.2 Caratteristiche cliniche della popolazione dello studio	46
5.3 Analisi degli eosinofili del sangue e delle sottopopolazioni eosinofile.....	53
5.4 Analisi delle correlazione tra i parametri clinici e la percentuale di eosinofili infiammatori	56

DISCUSSIONE	57
--------------------------	----

CONCLUSIONE	67
--------------------------	----

BIBLIOGRAFIA

1 INTRODUZIONE

1.1 Definizione di asma

L'asma bronchiale è una patologia infiammatoria cronica che colpisce le vie aeree e circa 300 milioni di persone nel mondo. I dati epidemiologici mostrano un trend in costante e lieve aumento con una prevalenza globale del 10 %. Secondo l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità, l'asma causa circa 180 mila decessi all'anno, oltre alla mortalità occorre sottolineare il suo impatto a livello socioeconomico: l'asma (1) rappresenta una delle principali cause di assenteismo sul piano scolastico e lavorativo, gravando sul sistema sanitario nazionale. A livello clinico l'asma è una patologia eterogenea caratterizzata da sintomi respiratori aspecifici che variano nel tempo, mentre a livello fisiopatologico la malattia si manifesta con l'iperreattività bronchiale e infiammazione cronica.

La definizione di asma (1) ha subito diverse rivisitazioni, le definizioni degli anni 70 e 80 consideravano unicamente le variazioni funzionali in cui mancava il ruolo determinante dell'infiammazione nella genesi dei sintomi correlati alle alterazioni funzionali. Le ultime linee guida GINA 2020 (Global Initiative for Asthma- Linee Guida internazionali per la diagnosi e il trattamento dell'asma) dove l'asma viene definito come “una malattia eterogenea, caratterizzata generalmente da infiammazione cronica. È definita da una storia di sintomi respiratori quali respiro sibilante, dispnea, sensazione di costrizione toracica e/o tosse che variano nel tempo e in intensità, insieme a una variabile limitazione al flusso respiratorio”.

I sintomi clinici e funzionali sono spesso legati a fattori scatenanti quali esercizio fisico, allergeni, irritanti, variazioni climatiche e infezioni respiratorie virali.

1.2 Meccanismi immunitari nell'asma allergico e la sua patogenesi

Il cuore della malattia (2) risiede nella disregolazione del sistema immunitario, che rompe la propria omeostasi e innesca risposte esagerate verso sostanze etichettate come estranee al corpo. Questo squilibrio emerge mediante due modi: la reazione allergica classica e meccanismi di natura autoimmune. La reazione allergica è coordinata da un eccesso di anticorpi IgE, i quali, legandosi agli allergeni, innescano il rilascio di mediatori (Fig.1) che infiammano la mucosa e restringono i bronchi. Un ruolo centrale è attribuito agli eosinofili, leucociti specializzati che, una volta selezionati nelle vie respiratorie, liberano sostanze citotossiche responsabili del danno tissutale e della plasticità delle pareti bronchiali. Un prodotto di questa attività infiammatoria è l'ossido nitrico FeNO che si configura come un biomarcatore efficace capace di rilevare la flogosi eosinofila. L'analisi del FeNO (2) si presenta in concentrazioni elevate anche in concomitanza di fumo o inquinamento causando falsi positivi. A livello cellulare, la patogenesi è caratterizzata da uno squilibrio di linfociti T. Si osserva una netta prevalenza delle cellule Th2 rispetto alle cellule T regolatorie (Treg), le quali non riescono a mitigare la risposta immunitaria. Si forma una "tempesta" cellulare coordinata da una rete di messaggeri proteici definiti citochine:

- L'IL-5 fondamentale per l'attivazione degli eosinofili
- L'IL-4 promuove la sintesi degli anticorpi IgE
- L'IL-13 promuove la produzione eccessiva di muco e stimola l'iperattività bronchiale

Oltre alle Th2 (2), le cellule Th17 e il rilascio di IL-17 stimolano il reclutamento dei neutrofili, mentre il TNF-alfa accentua l'infiammazione generale e le trasformazioni strutturali dei polmoni. In questo scompenso, il SI può bersagliare erroneamente i comparti del sistema respiratorio tramite la produzione di autoanticorpi. La componente autoimmune accelera la cronicizzazione della malattia, rendendola più resistente ai trattamenti e più grave. La patogenesi (2) dell'asma deriva dal crosstalk tra marcatori allergici e vie immunitarie alterate.

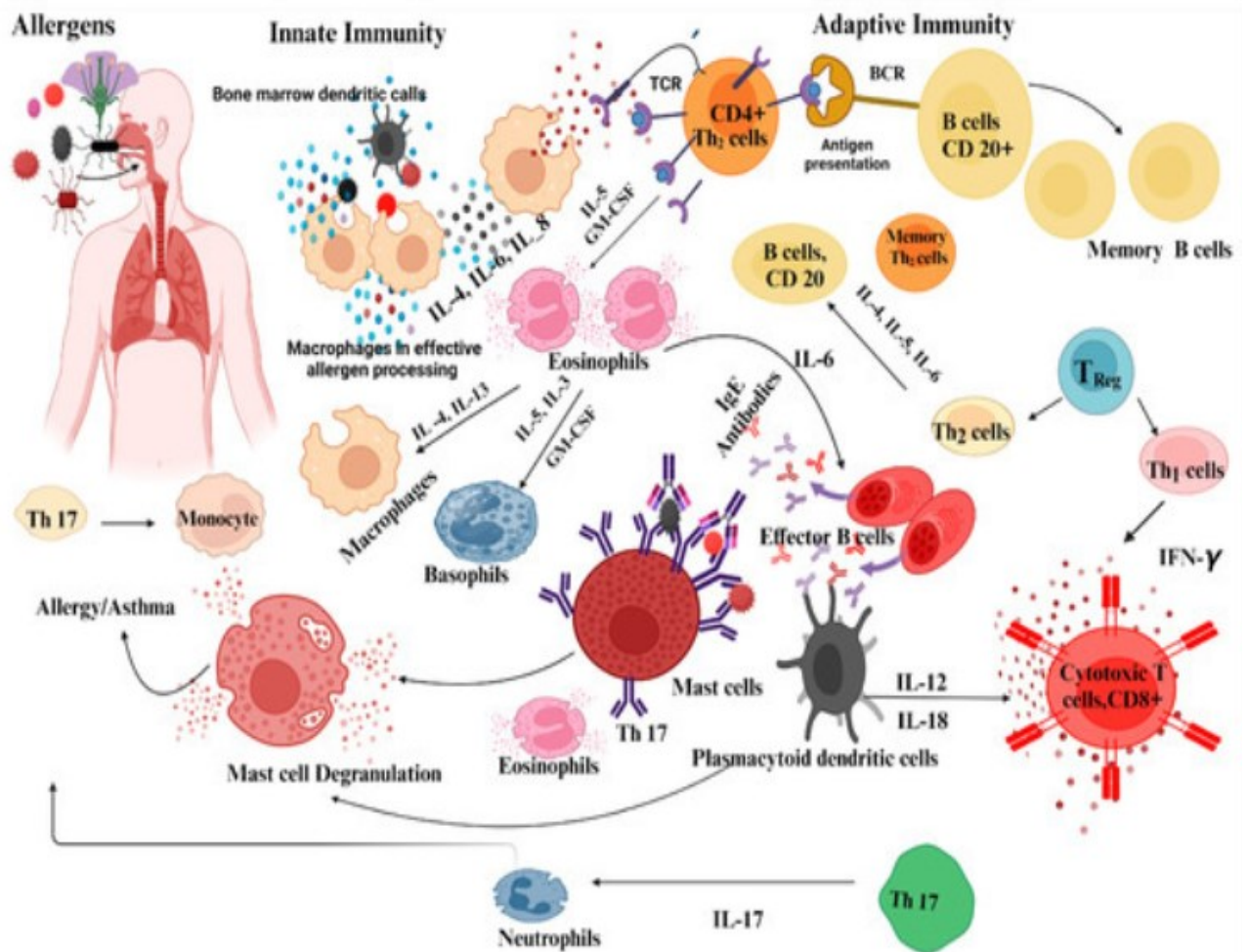


Figura 1. Meccanismo immunitario nell'asma allergico

1.3 Citologia e istopatologia delle vie aeree nell'asma

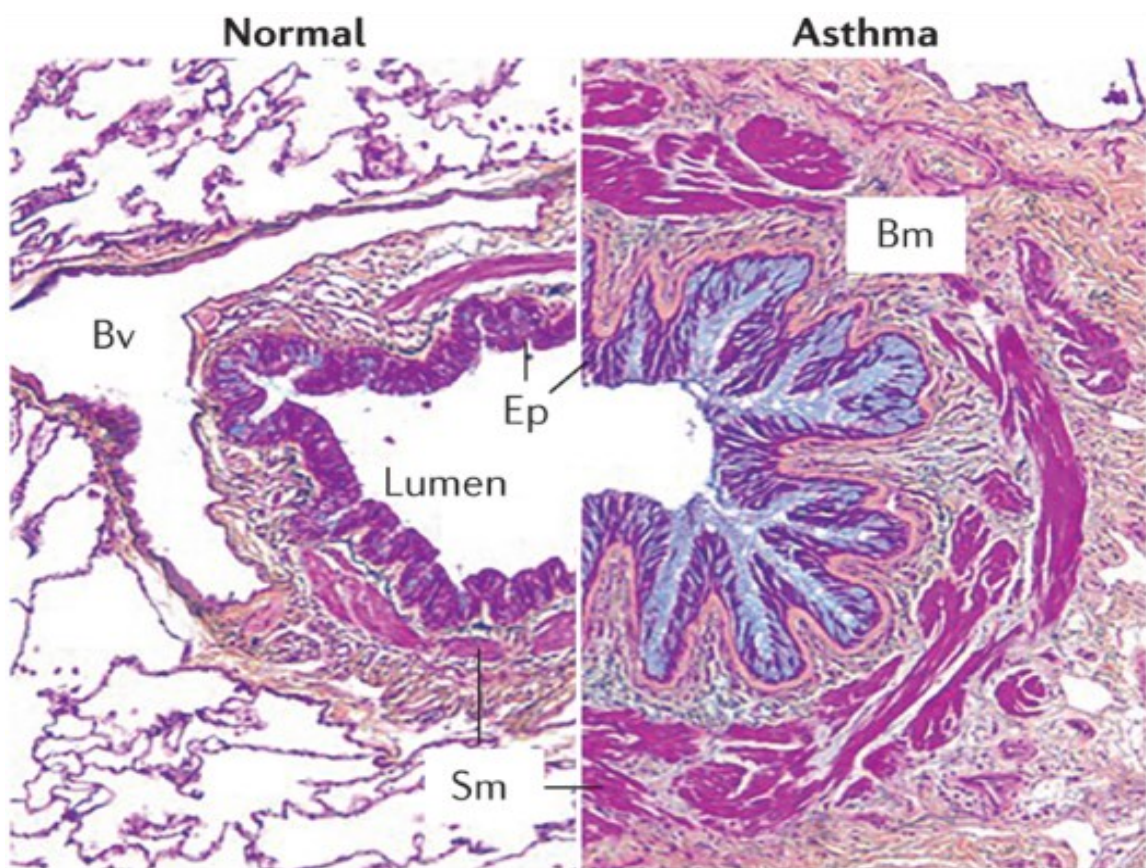
La citologia dell'apparato respiratorio (fig.2) racchiude l'interpretazione delle cellule derivate da trachea, bronchi, bronchioli e alveoli (3) Esistono diversi metodi per raccogliere il materiale citologico tra cui l'espettorato o lavaggio bronchiale.

L'infiltrato infiammatorio, coordinato dai linfociti Th2, è caratterizzato da eosinofili, ma coinvolge anche mastociti, basofili, neutrofilo e macrofagi.

L'attivazione di queste cellule e il conseguente rilascio di mediatori sono rilevati dai processi di degranolazione dei mastociti e di vacuolizzazione degli eosinofili. Un tratto peculiare riguarda la tipologia di mastociti coinvolti: mentre nell'asma allergico lieve-moderato prevalgono i mastociti dipendenti dai Th2 che esprimono solo triptasi (MCT), nelle forme più

gravi e resistenti ai trattamenti prevalgono i mastociti contenenti sia triptasi che chimasasi (MCTC).

L'asma bronchiale presenta caratteristiche distintive nei lavaggi bronchiali e nello sputo (3), in particolare le cellule epiteliali bronchiali sono reattive con nuclei ingrossati, spesso sotto forma di piccole sfere chiamate corpi di Creola (fig.3). Si possono osservare le spirali di Crushmann e gli eosinofili (fig.4). Sono difficili da differenziare dai neutrofili nei campioni colorati con Papanicolaou ma, se sospettati, un vetrino colorato con May Giemsa li dimostrerà chiaramente. I cristalli di Charcot-Leyden (3), che si formano dai granuli degli eosinofili, sono anch'essi comunemente osservati in rosa-arancio brillante con la colorazione di Papanicolaou (Fig.5)



Nature Reviews | **Disease Primers**

Figure - PMC Istopatologia delle vie aeree nell'asma.

La figura 2 mostra il confronto tra una via aerea sana (a sinistra) e una colpita da asma grave (a destra) evidenzia le profonde alterazioni strutturali e infiammatorie

tipiche della patologia. L'asma si traduce in un'inflammazione della mucosa sostenuta principalmente da eosinofili attivati, mastociti e linfociti T, che si sviluppa nel contesto di un evidente rimodellamento bronchiale. Tale processo si manifesta con metaplasia mucosa, fibrosi, neoangiogenesi (Bv) e un significativo aumento della componente muscolare liscia (Sm). L'integrità dell'epitelio (Ep) risulta compromessa e la membrana basale (Bm) appare ispessita, delineando un quadro di cronica ostruzione delle vie aeree.

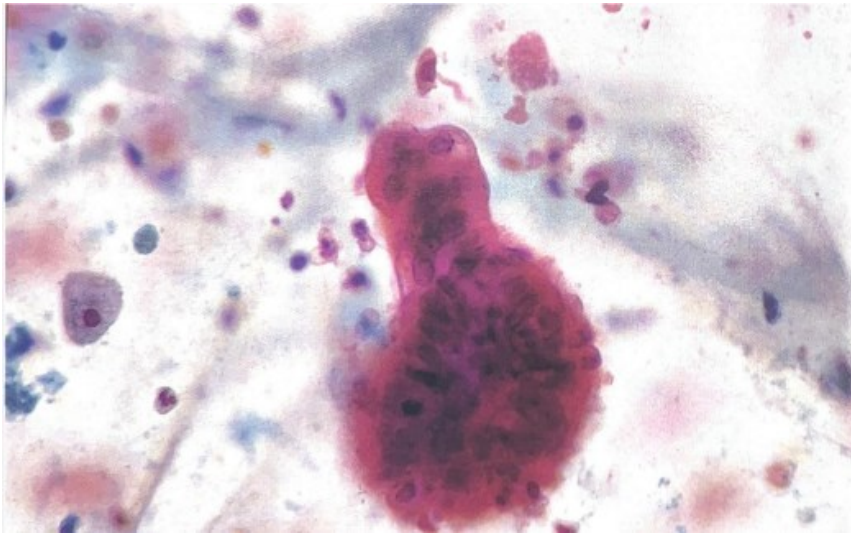


Fig.3 Corpo di Creola X40, disposizione a palla delle cellule epiteliali bronchiali, comune nell'asma bronchiale. Le cellule sono tutte benigne.

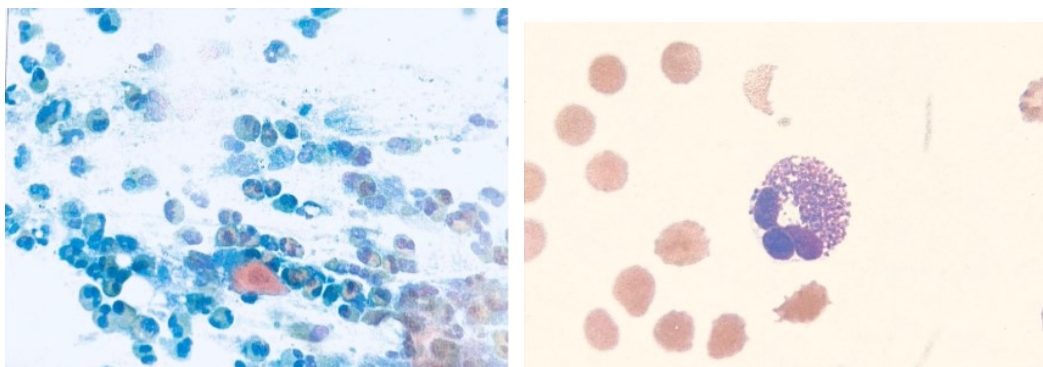


Fig.4 Eosinofili, Pap x40. Questo campo mostra neutrofili ed eosinofili. Gli eosinofili sono generalmente bilobati e mostrano granuli giallo-verdastri.

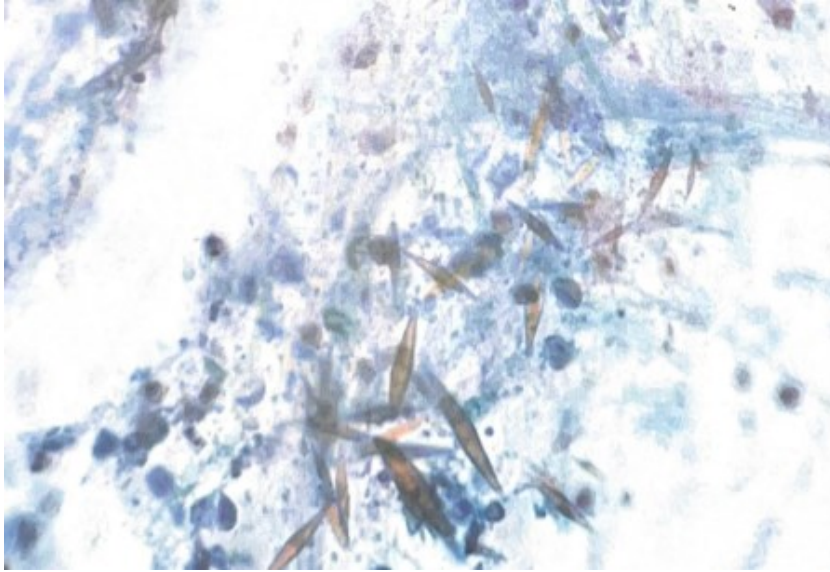


Fig.5 Cristalli di Charcot-Leyden-Pap X40. Qui è illustrata una raccolta di cristalli di Charcot nell'espettorato di un paziente con asma bronchiale.

1.4 La triade dell'asma

La gravità dell'asma (1) è indagata in forma retrospettiva considerando la terapia, i sintomi e le eventuali riacutizzazioni. L'ottica delle linee guida GINA include l'intensità intrinseca della malattia e include il livello di controllo che il paziente asmatico riesce a mantenere sotto terapia. L'asma si dirama in 5 livelli di gravità e si stratifica in lieve, moderato e grave.

-Asma lieve: In questa fase, l'asma è silente e non incide con la quotidianità, è ben controllato con la terapia e il paziente asmatico con riporta sintomi diurni e nemmeno risvegli notturni ma utilizza farmaci solo occasionalmente in stato di necessità e bisogno.

-Asma moderato: L'asma moderato si manifesta con sintomi diurni frequenti e incide sulla qualità del sonno, pertanto il rischio clinico si presenta con la comparsa di attacchi d'asma nell'arco dell'anno.

-Asma grave: Coincide con la fase più rischiosa e severa, si definisce per la frequenza elevata (3 o più volte a settimana) di attacchi d'asma mettendo il paziente in una situazione di costante vulnerabilità.

Il metodo di classificazione dell'asma più autorevole e diffuso a livello internazionale è quello sviluppato dal National Asthma Educational and Prevention Program (NAEPP), basato sulle linee guida dell'Expert Panel Report del National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI). Questo sistema si focalizza sulla gestione clinica dell'asma e sulla sua diagnosi in modo tale da modulare i farmaci alla severità della malattia. La stratificazione tiene in esame la frequenza dei sintomi diurni, l'incidenza dei risvegli notturni e l'esito dei test di funzionalità polmonare. I pazienti vengono classificati in 4 fasi cliniche (Tab.1): si parte dalla fase 1, definita lieve, per passare alla fase 2 di tipo lieve persistente, alla fase 3 moderata persistente fino a raggiungere la fase 4, caratterizzata da un'asma grave e persistente.

Fase	Classificazione	Sintomi Diurni	Sintomi Notturmi	Funzionalità Polmonare
Fase 1	Lieve Intermittente	Meno di 2 giorni a settimana	Meno di 2 volte al mese	Normale (FEV1 > 80%)
Fase 2	Lieve Persistente	> 2 giorni a settimana	3-4 volte al mese	Normale (FEV1 > 80%)
Fase 3	Moderata Persistente	Quotidiani	> 1 volta a settimana	Ridotta (FEV1 60-80%)
Fase 4	Grave Persistente	Continui durante il giorno	Spesso ogni notte	Molto ridotta (FEV1 < 60%)

Tab.1 la suddivisione delle fasi nell'asma

1.5 Fattori di rischio individuali e trigger di riacutizzazione

L'asma è una patologia multifattoriale (1), sono stati individuati dei potenziali o fattori di rischio nello sviluppo dell'asma. Questi possono essere classificati in fattori individuali e fattori ambientali.

Sesso : nei bambini l'asma è più frequente nei maschi (quasi il doppio rispetto alle femmine), probabilmente per il minor calibro delle vie aeree, la maggiore iperreattività bronchiale e la più alta prevalenza di atopia. In età adulta, invece, il rischio, si inverte, è maggiore nel sesso

femminile, soprattutto dopo la menopausa, per l'influenza degli ormoni sessuali, rapida espansione delle dimensioni del torace e forza dei muscoli respiratori.

Familiarità: una predisposizione familiare è presente in circa il 60% dei casi, molti polimorfismi genetici si sono dimostrati associati alla comparsa dell'asma, anche se nessuno di questi, da solo o in combinazione è capace di predire la malattia.

Predisposizione genetica: diversi geni e specifiche regioni cromosomiche sono associati a un aumentato rischio di sviluppare la malattia.

Allergeni: nell'asma allergico gli aeroallergeni sono i principali responsabili delle riacutizzazioni, che si manifestano con peggioramento improvviso di dispnea, respiro sibilante, senso di costrizione toracica e riduzione della funzione respiratoria. Gli episodi sono spesso stagionali (ad esempio nel periodo pollinico). Il meccanismo è un'ipersensibilità di tipo I mediata da IgE, che induce il rilascio di mediatori infiammatori dai mastociti e genera broncocostrizione.

Sensibilizzanti professionali: l'asma professionale è legata all'esposizione lavorativa a sostanze specifiche. I sintomi tendono a ridursi lontano dall'ambiente di lavoro. Si distingue una forma da sensibilizzanti (con periodo di latenza tra esposizione e sintomi) e una forma da irritanti, che può essere acuta (RADS) dopo esposizione massiva.

Abitudine tabagica: l'esposizione al fumo, già in gravidanza o nei primi anni di vita, aumenta il rischio di asma.

Inquinamento atmosferico: l'esposizione a inquinanti come particolato (PM_{2,5} e PM₁₀), ozono (O₃), biossido di azoto (NO₂), biossido di zolfo (SO₂) e monossido di carbonio (CO) è legata a un maggiore rischio di sviluppare asma e a un aumento delle riacutizzazioni nei soggetti già asmatici.

Infezioni respiratorie: le infezioni virali, in particolare da Rhinovirus, sono tra le principali cause di riacutizzazione. Il danno epiteliale indotto dal virus favorisce il rilascio di citochine pro-infiammatorie e aumenta la sensibilità delle vie aeree ad altri fattori scatenanti.

Esercizio fisico: soprattutto nei bambini e nei giovani, l'attività fisica può provocare broncospasmo. L'iperventilazione e il raffreddamento delle vie aeree inferiori sono i principali meccanismi coinvolti.

1.6 Epidemiologia e impatto globale dell'asma

Secondo le stime più recenti, la malattia colpisce 300 milioni circa di persone, solo nel 2019 sono stati censiti 455.000 decessi. L'OMS ha registrato un aumento del 50 % negli ultimi anni per via dei fenomeni di urbanizzazione e il tasso di inquinamento. La diffusione della malattia non è uniforme ma presenta delle differenze a livello territoriale. Oltre al fattore geografico emerge anche un determinante sociale legato alle fasce di popolazione con un minore livello di istruzione (1). L'impatto a lungo termine è destinato a crescere in modo esponenziale e si stima che entro il 2040 l'asma non controllata genererà costi sociali e sanitari danneggiando la produttività e il sistema Welfare.

2.1 Caratterizzazione biochimica del campione ematico e omeostasi del tessuto fluido

Il sangue è un tessuto connettivo (4), fluisce nel sistema cardiovascolare, fornendo ossigeno e nutrienti ai tessuti e eliminando materiali di scarto come anidride carbonica (CO₂) e l'urea.

Il sangue rappresenta circa il 7-8% del peso corporeo totale, protegge contro malattie e infezioni e funge da tampone per l'equilibrio del pH. L'acqua ne costituisce tra il 90 e il 92 %, costituendone il solvente di trasporto mentre il restante 8-10% è formato da proteine plasmatiche, ormoni, elettroliti, enzimi, nutrienti e prodotti di scarto.

Tra le proteine plasmatiche troviamo l'albumina che regola la pressione osmotica e trasporta ormoni e farmaci e il fibrinogeno fondamentale per la coagulazione del sangue.

Il pH del sangue invece risulta controllato da elettroliti quali sodio, potassio, calcio e bicarbonato(4). Il 55% del volume del sangue è formato dal plasma che corrisponde alla matrice liquida di colore giallo paglierino. I globuli rossi (RBC), definiti anche eritrociti, sono i componenti principali e prevalenti nel sangue, responsabili del trasporto di ossigeno e anidride carbonica, sono privi di nucleo e presentano una forma biconcava. Ogni eritrocita racchiude circa 250 milioni di molecole di emoglobina, proteina contenente il ferro che lega e trasporta l'ossigeno dai polmoni ai tessuti. L'eritropoiesi è il processo di produzione dei

globuli rossi avviene nel midollo osseo sotto regolazione ormonale dell'eritropoietina, secreta dai reni.

L'emivita dei globuli rossi è di circa 120 giorni, trascorsi questi giorni vengono rimossi e degradati dai macrofagi nel fegato e nella milza.

I globuli bianchi noti anche come leucociti, sono una componente del sistema immunitario dell'organismo per difenderlo da infezioni, sostanze estranee e cellule anomale.

A differenza degli eritrociti, i leucociti possono ricoprire ruoli complessi perché racchiudono un nucleo e diversi organelli, vengono prodotti nel midollo osseo e si spostano grazie al sistema linfatico e circolatorio. I leucociti si raggruppano in due sottotipi: i granulociti e gli agranulociti. Sulla base della colorazione dei granuli in neutrofili, gli eosinofili e i basofili che sono esempi di granulociti. I neutrofili sfruttano la fagocitosi per inglobare e uccidere batteri e funghi, mentre i basofili rilasciano istamina, gli eosinofili combattono i parassiti e ricoprono un ruolo attivo nelle reazioni allergiche.

2.2 Emopoiesi

L'emopoiesi (4) è un processo fisiologico coordinato che avviene nel midollo osseo, e comporta la produzione di tutte le cellule mature del sangue a partire dall'emocitoblasto, una cellula staminale pluripotente da cui prendono forma i progenitori specifici di ciascuna linea cellulare. Da questo precursore comune si sviluppano i megacarioblasti, che si trasformano in megacariociti polinucleati da cui prendono forma le piastrine attraverso numerose divisioni nucleari senza divisione cellulare. Mentre la linea dei globuli bianchi, si divide in granulociti e agranulociti: i granulociti derivano dal mieloblasto sono caratterizzati da nuclei polilobati e granuli citoplasmatici che si distinguono in neutrofili trilobati, eosinofili bilobati ricchi di istamina e basofili con nucleo strozzato. Gli agranulociti, invece, includono i linfociti B e T e i monociti. L'analisi morfologica del sangue in laboratorio si avvale della colorazione di Giemsa per distinguere i componenti acidi e basici cellulari tra lo striscio midollare e quello periferico. Mentre lo striscio midollare (fig.4) appare caotico e disordinato per la presenza di blasti e i precursori di ogni linea, lo striscio periferico (fig.5) risulta più ordinato e dominato

da globuli rossi. Al termine del loro ciclo vitale, tutte le cellule ematiche vanno in senescenza e apoptosi, mantenendo il turnover cellulare dell'omeostasi.

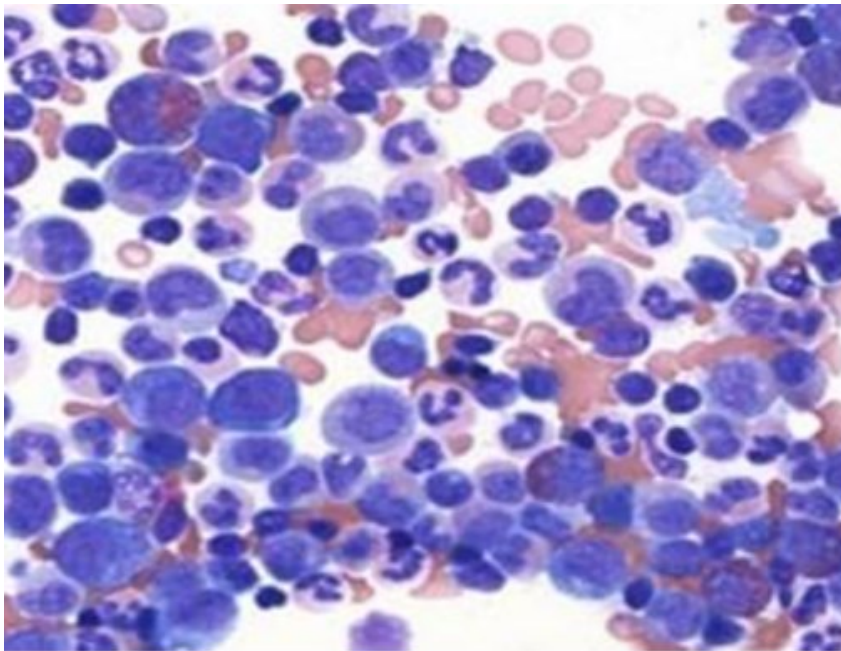


Fig.4 Mostra uno striscio di aspirato midollare con i precursori emopoietici in vari stadi di maturazione.

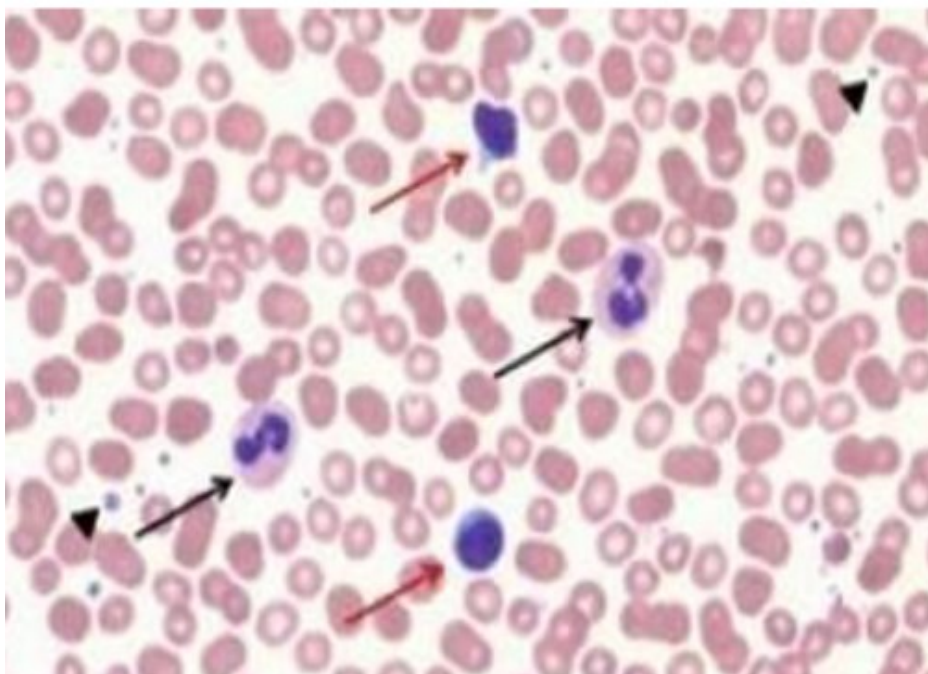


Fig5. Mostra uno striscio di sangue periferico. Le frecce nere indicano i granulociti neutrofili mentre le frecce rosse indicano i linfociti e le punte di freccia nera indicano le piastrine.

2.3 Eosinofili e la loro scoperta

Gli eosinofili sono globuli bianchi (granulociti) che si formano nel midollo osseo, svolgono un ruolo fondamentale nelle fasi croniche delle infiammazioni e nelle reazioni allergiche.

Le tappe della loro scoperta (5):

-1846: Wharton osserva per la prima volta i loro granuli nel sangue senza l'impiego di coloranti

-1879: Paul Ehrlich introduce il termine "eosinofilo", notando come i granuli della cellula si colorino grazie all'eosina.

-Inizio 900:viene documentato il loro legame con la parassitosi, asma e malattie della pelle. Nel 1922, si scopre che i pazienti deceduti per asma presentano una massiccia presenza di queste cellule nei tessuti. Fino agli anni 70 si pensava che gli eosinofili servissero a frenare l'allergia distruggendo le sostanze rilasciate dai mastociti. Solo verso la fine degli anni 80 è stato chiarito il loro ruolo nell'asma e nelle allergie.

2.4 Morfologia degli eosinofili

L'eosinofilo umano maturo si presenta (fig 6) come una cellula leggermente più grande dei neutrofilo, caratterizzata da un diametro compreso tra 12 e 17 μm (5) e da un tipico nucleo bilobato. La sua struttura interna è dominata dalla presenza di granuli specifici, o secondari, avvolti da una membrana a doppio strato. Al microscopio elettronico (5), questi granuli rivelano una struttura sofisticata composta da un core cristallino molto denso, costituito dalla proteina basica maggiore (MBP), immerso in una matrice meno densa che ospita la proteina cationica (ECP), la perossidasi (EPO) e la neurotossina derivata dagli eosinofili (EDN). Oltre a questi organuli principali, la cellula sviluppa durante la sua maturazione dei granuli minori a struttura amorfa, ricchi di enzimi come fosfatasi acida e catalasi, mentre nei precursori (i promielociti) sono visibili granuli primari elettrondensi spesso di dimensioni superiori a quelli specifici.

Un tratto distintivo fondamentale è rappresentato dalla formazione dei cristalli proteici di Charcot-Leyden, strutture derivate dalla lisi o dall'attivazione cellulare. L'eosinofilo funge inoltre da centrale biochimica grazie ai suoi corpi lipidici; questi organuli, che tendono ad aumentare di numero nelle cellule attivate, costituiscono il deposito principale di acido arachidonico e contengono gli enzimi ciclo-ossigenasi e 5-lipo-ossigenasi, necessari per la sintesi dei mediatori dell'infiammazione.

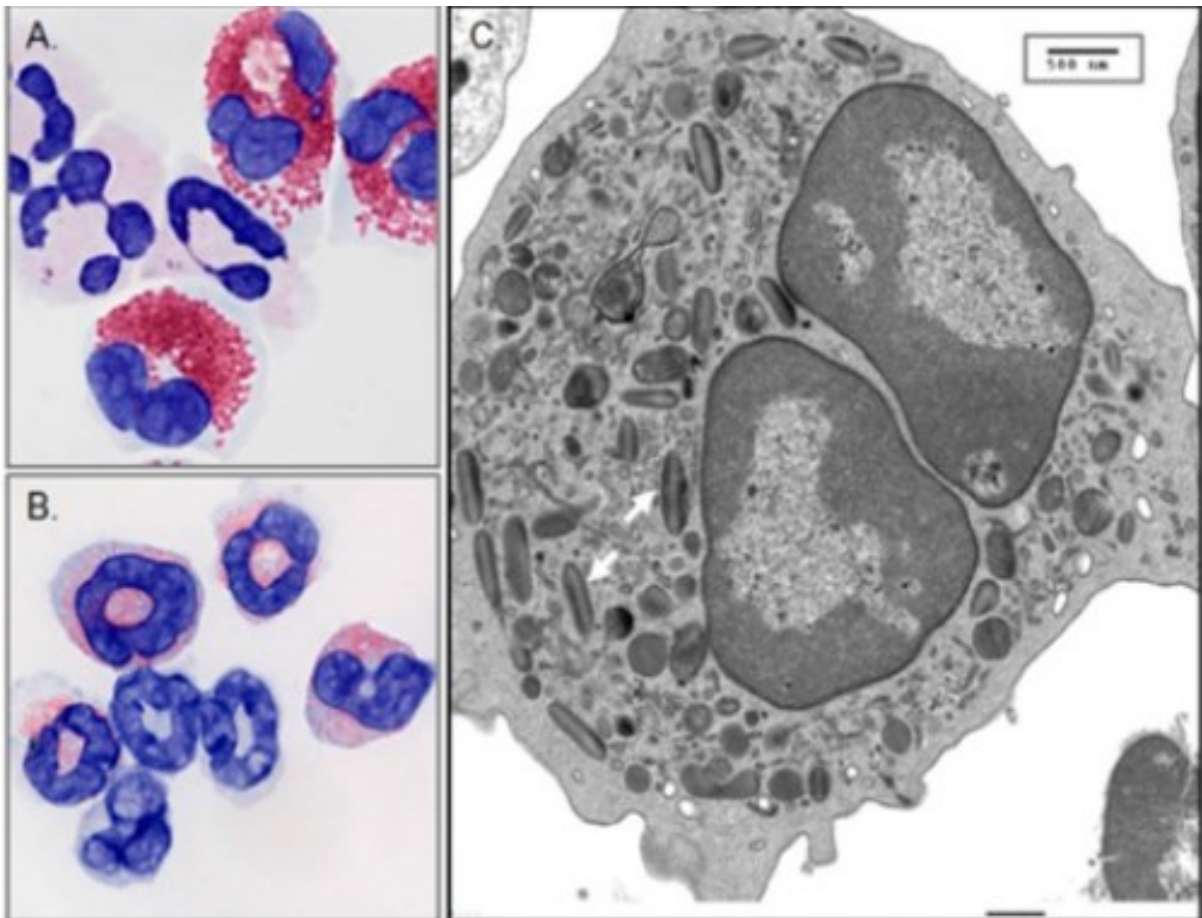


Fig.6 Eosinofili umani. (A) Eosinofili del sangue periferico con nuclei bilobati e granuli citoplasmatici di grandi dimensioni colorati in rosso. (B) Colorazione con protocollo di Giemsa modificato; i neutrofilii, riconoscibili dal nucleo multilobato e dall'assenza di granuli voluminosi, sono indicati a confronto. Ingrandimento originale 100×. (C) Micrografia elettronica a trasmissione di un eosinofilo umano.

2.5 Gli eosinofili rEos e iEos

Gli eosinofili partecipano a diverse funzioni (6) data la loro versatilità da una parte mantengono l'omeostasi e difendono dalle infezioni regolando la risposta immunitaria e dall'altra parte invece sono coinvolti nelle attività antinfiammatorie e antitumorali. L'attivazione esponenziale degli eosinofili comporta il rilascio di mediatori citossiche e proteine granulari (MBO,EDN,ECP,EPO), che accelerano la patogenesi della malattia dell'asma. Il viaggio degli eosinofili parte dal midollo osseo e una volta maturi entrano in circolo dove raggiungono specifici recettori di adesione. La ricerca moderna ha superato la vecchia classificazione fenotipica (5) dettata dalla densità cellulare (normodensi e ipodensi), elaborando una classificazione invece fenotipica basata sulla citometria a flusso e più precisa. Si distinguono due popolazioni principali.

Eosinofili residenti(rEOS):presentano un nucleo ad anello, indipendenti dall'interleuchina-5 e presenti nei tessuti (come polmone) in condizioni normali in cui svolgono un ruolo di omeostasi e regolazione negativa della risposta immunitaria eccessiva.

Eosinofili infiammatori(iEOS):presentano un nucleo frammentato,vengono attivati durante l'infiammazione allergica e si dispongono vicino ai bronchi. Permettono l'amplificazione della risposta immunitaria e sono dipendenti dall'Interleuchina-5.

Mediante l'analisi istologica (6) di biopsie polmonari di soggetti sani e pazienti asmatici (colorante Rosso Congo e MBP), sono stati indagati gli eosinofili residenti (rEos) nelle sezioni di parenchima polmonare, che risultano non influenzati dai processi flogistici a differenza degli iEos che invece si infiltrano nella regione peribronchiale durante gli stati patologici. A livello molecolare i due sottotipi sono simili e morfologicamente indistinguibili con livelli di Sigle8 e CD101 simili. Lo studio di Meslin (6) marca differenze a livello di marcatori di superficie. Infatti gli iEos sono negativi per il CD62L positivi per IL-3R. Mentre, al contrario i rEos esprimono CD62L in un range variabile e bassi livelli di IL-3R. I marcatori IL-3R e CD62L permettono la caratterizzazione fenotipica tra eosinofili residenti e infiammatori. Nello sputo dei pazienti asmatici si nota il profilo CD62L - e IL-3R+, mentre nei donatori ,soggetti sani prevale il profilo CD62L+ e IL-3R-. Gli eosinofili, presentano una notevole versatilità che gli rende protettivi e regolatori oppure pro-infiammatori in casi patologici.

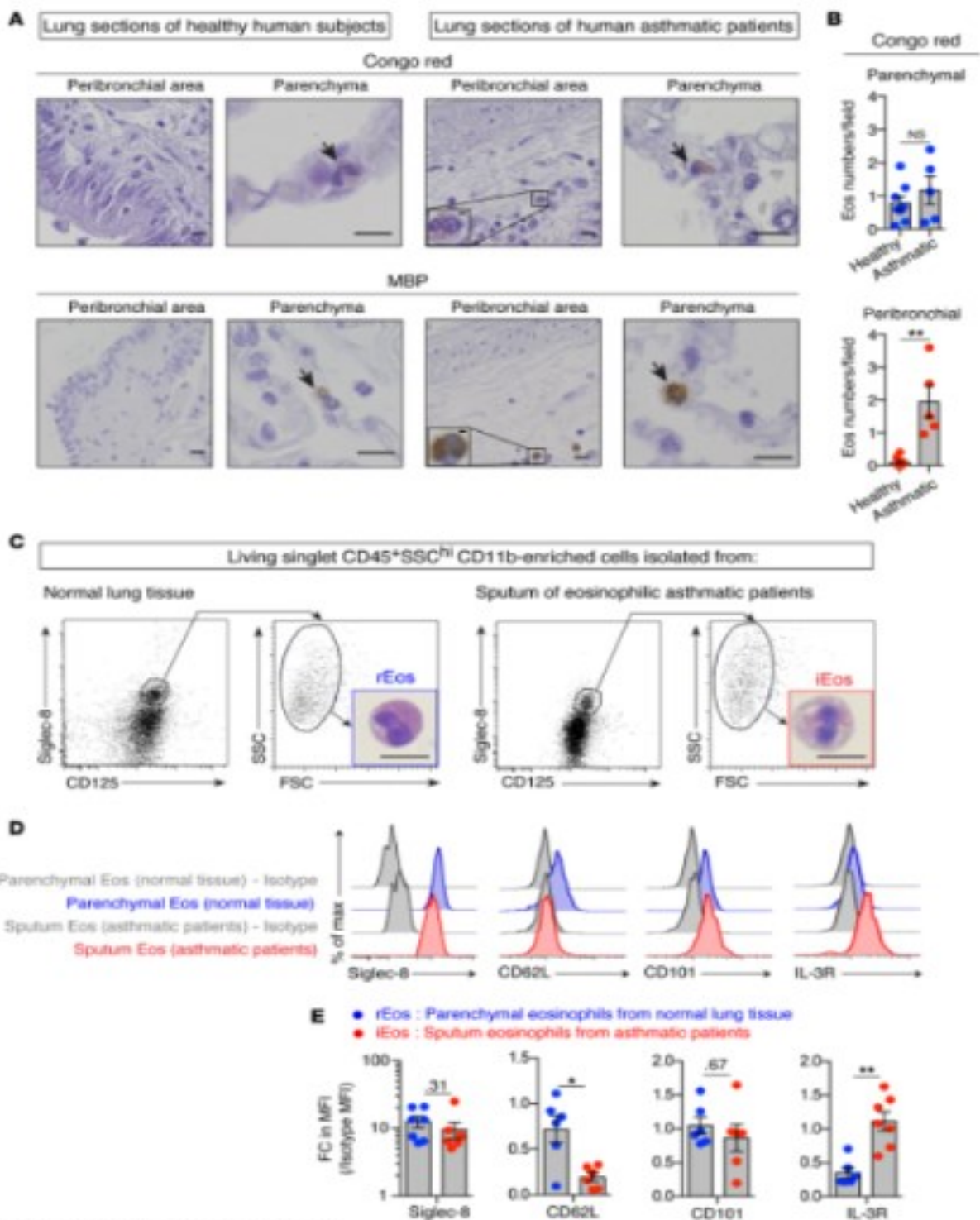


Fig 7. Localizzazione, morfologia e fenotipo dei sottogruppi di eosinofili polmonari (rEos e iEos) nell'uomo. (A) Sezioni rappresentative di tessuto polmonare di donatori

sani e pazienti asmatici, colorate con Rosso Congo e MBP; le frecce indicano gli eosinofili positivi. (B) Quantificazione degli eosinofili nel parenchima e nell'area peribronchiale: si osserva una densità costante di rEos parenchimali in entrambi i gruppi, mentre gli iEos peribronchiali aumentano selettivamente nei pazienti asmatici. (C) Analisi morfologica e citometrica (Siglec-8 e CD125) di rEos isolati da tessuto sano e iEos prelevati da espettorato asmatico; i riquadri mostrano la morfologia sovrapponibile delle due popolazioni dopo sorting cellulare. (D-E) Istogrammi rappresentativi e quantificazione dei livelli di espressione dei marcatori di superficie: rEos e iEos mostrano livelli simili di Siglec-8 e CD101, ma differiscono significativamente per l'espressione di CD62L (assente negli iEos) e IL-3R (sovraespresso negli iEos).

2.6 Ruolo degli eosinofili nel corpo

Gli eosinofili si trovano nei tessuti e in diversi organi (7) tra cui intestino, polmoni, timo, utero e ghiandole mammarie, mentre al di fuori dei vasi sanguigni sono meno del 5 %. L'intestino racchiude la quantità maggiore (5-25% dei leucociti totali), mentre nel tessuto adiposo meno del 4 %. La loro percentuale varia nel tempo e negli organi in cui risente maggiormente delle oscillazioni degli ormoni sessuali. Gli eosinofili rimodellano (fig.8) l'epitelio respiratorio e favoriscono la guarigione, sostengono lo sviluppo delle ghiandole mammarie e mantengono l'equilibrio (7) metabolico. Gli eosinofili nei polmoni sono coinvolti nella difesa contro le infezioni, partecipano anche ai processi di coagulazione, fibrinolisi e regolano la degradazione della fibrina.

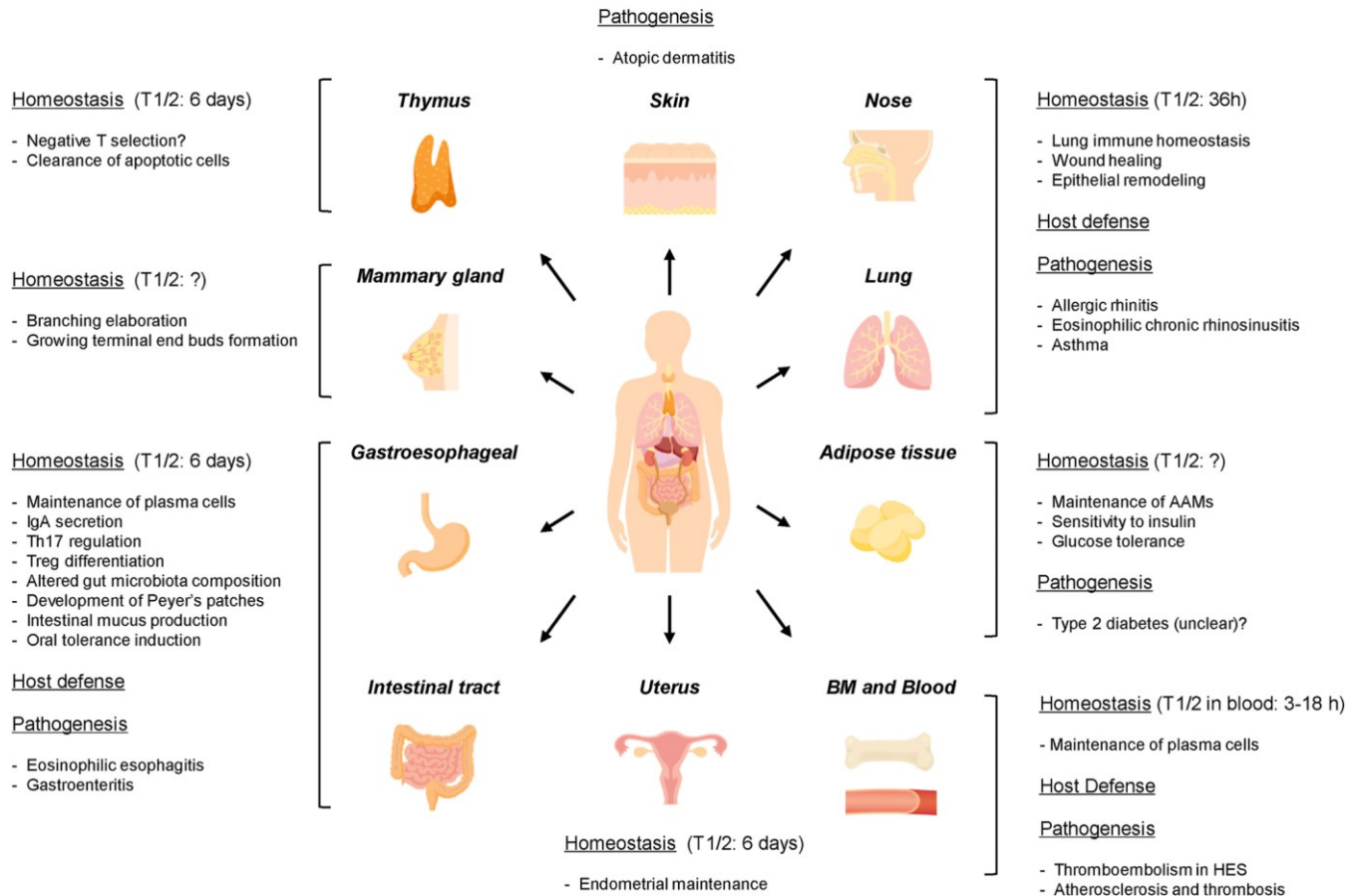


Fig.8 Panoramica schematica delle molteplici funzioni degli eosinofili nei singoli tessuti

2.7 Degranolazione degli eosinofili

La degranolazione (5) è un processo che si verifica in risposta a stimoli specifici, mediante un rilascio di granuli interni alla cellula che liberano sostanze nello spazio extracellulare.

Il rilascio avviene con esocitosi classica, dove un singolo granulo si fonde con la membrana e riversa il contenuto all'esterno. Oppure esocitosi composta, in cui più di un granulo si fonde, generando un massivo rilascio di granuli. Esiste poi la degranolazione a pezzi (PDM), in cui il contenuto di granuli si compatta in piccole vescicole, senza fusione con il granulo originale. La citolisi eosinofila invece porta alla rottura della membrana della cellula e libera sostanze tossiche.

LO SCOPO DELLO STUDIO

Lo studio si propone di comprendere la duplice via clinica e patogenica dell'asma attraverso la tipizzazione immunofenotipica degli eosinofili circolanti, superando la semplice conta cellulare e indagando la distinzione qualitativa e quantitativa tra rEOS e iEOS.

Mediante il coinvolgimento dell'analisi multiparametrica della citofluorimetria e l'analisi di specifici marker molecolari di superficie abbiamo identificato due fenotipi eosinofilici distinti (iEOS e rEOS). L'analisi dei fenotipi eosinofilici è stata applicata ad una coorte ben caratterizzata di pazienti asmatici, confrontati con gruppo di controllo, e senza patologie respiratorie di rilievo. Pertanto l'obiettivo primario era quello di tipizzare i due sottotipi di eosinofili iEOS e rEOS nei soggetti sani e nei pazienti asmatici. Come obiettivo secondario ci siamo posti quello di indagare la relazione tra la percentuale di eosinofili infiammatori iEos e i parametri antropometrici, funzionali e con i biomarcatori di infiammazione.

MATERIALI E METODI

Sono stati arruolati pazienti in età adulta (≥ 18 anni) con diagnosi definita sulla base delle linee GINA (1); sono stati esclusi pazienti con le seguenti caratteristiche:

- riacutizzazione di asma, infezione polmonare nelle 4 settimane precedenti
- altre comorbidità pneumologiche
- neoplasie maligne
- trattamento steroideo cronico

I pazienti sono stati sottoposti a un prelievo di sangue per determinare il quadro allergologico (emocromo, IgE totali e specifiche), processato presso il laboratorio dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Oltre agli esami di routine sono stati raccolti anche 10 mL di sangue a scopo di ricerca. La fase che precede quella analitica è denominata pre-analitica, e in questo caso riguarda il prelievo dei campioni in modo accurato per le analisi da svolgere. In questo caso è previsto l'utilizzo di provette per il prelievo ematico con il tappo lilla, che contiene come additivo l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), sotto forma di sale di potassio.

L'EDTA ha il compito di agire come anticoagulante sfruttando il meccanismo di chelazione degli ioni calcio. Uno dei vantaggi dell'EDTA è quello di conservare i vari componenti cellulari del sangue dai globuli rossi fino alle piastrine, la sua stabilità lo rende perfetto per le analisi di citofluorimetria, in cui occorre mantenere stabile l'integrità strutturale delle cellule. Per questo specifico protocollo di ricerca 100 microlitri di sangue intero sono stati incubati con un cocktail di anticorpi monoclonali per la quantificazione degli eosinofili infiammatori e residenti. La popolazione di eosinofili è stata indagata mediante il profilo fenotipico e l'utilizzo di marker per la distinzione tra eosinofili residenti e infiammatori.

Inoltre, è stata quantificata l'espressione dei recettori di superficie per l'interleuchina 5 (IL-5R) e le chemochine a motivo C-C (CCR3). Per l'acquisizione è stato utilizzato il citometro a flusso CytoFlex (Beckman Coulter), mentre l'analisi e la quantificazione dell'espressione dei recettori di superficie sono state invece effettuate mediante il software CyExpert (Beckman Coulter).

4.1 Citometria a flusso

La citometria a flusso (fig.9) è una metodica multiparametrica di preparati biologici (seminario Prof.ssa Ferraresi Beatrice, Pavia, 2024), rapida e permette un'acquisizione estremamente veloce che in pochi minuti è possibile quantificare e analizzare grandi volumi di eventi in un singolo campione, analizzando popolazioni cellulari eterogenee. Il cuore della tecnica risiede nella capacità di indagare cellule (umane o batteriche) sospese in mezzo liquido. L'analisi si basa su:

-caratteristiche biochimiche: con l'impiego di anticorpi monoclonali coniugati a fluorocromi, è possibile tipizzare e caratterizzare antigeni di membrana

-caratteristiche fisiche: riguardano le dimensioni e la complessità interna (es granulosità)

Mediante il gating, dalla popolazione generale si isolano le specifiche sottopopolazioni, creando sottogruppi. I dati raccolti vengono archiviati in database, permettendo il follow-up e il monitoraggio clinico. Il citofluorimetro presenta una sorgente luminosa, cammino ottico, componenti di flusso e di deflusso, laser, un rotore. Include un sistema computerizzato che richiede un software correlato alla ditta di produzione. La sorgente luminosa raggiunge la camera di flusso, il campione viene spinto e avviene la focalizzazione idrodinamica, con l'utilizzo di fluidi si forma un sistema direzionale come una corrente. La spinta (shear flow) che si crea all'esterno permette di incanalare le cellule del campione che sono disposte in modo disordinato nel fluido in un'unica linea. Mediante le correnti coassiali indirizzano le cellule, il fascio di luce colpisce le cellule da quantificare una alla volta. La camera di conta è il posto in cui passa la cellula che viene poi colpita dal fascio di luce. Il flusso generato dal campione viene guidato da un flusso esterno in modo tale da indirizzare le cellule all'interno del sistema fluidico.

4.2 Sistema di rilevazione e sistema ottico

Il sistema di rilevazione citometrico è un complesso apparato costituito da sorgenti luminose (laser), un sistema ottico di precisione e una serie di rilevatori. Il principio cardine risiede nell'interazione tra fascio laser incidente e la singola cellula: questo legame forma segnali luminosi che, a sua volta vengono trasformati dal sistema in forma digitale discreta, favoriscono l'identificazione dei parametri fisici e biochimici dell'evento studiato.

La morfologia cellulare viene indagata mediante la diffusione della luce (scattering).

Il segnale (fig.10) raggiunto a basso angolo rispetto al fascio incidente, denominato Forward Scatter (FSC), fornisce informazioni sulle dimensioni cellulari. Parallelamente, invece, la luce rifratta a 90 gradi e riflessa denominata Side scatter (SSC), trasmette dati inerenti alla complessità interna come il rapporto nucleo/citoplasma e la densità dei granuli citoplasmatici.

L'incrocio di questi due parametri permette di distinguere le popolazioni leucocitarie (linfociti, monociti e granulociti) e di separarle dalla componente eritrocitaria. Oltre ai parametri fisici, il citofluorimetro rileva anche la fluorescenza che viene emessa dagli anticorpi monoclonali (fig.11) coniugati a fluorocromi. Ciascuna molecola fluorescente, eccitata dal laser emette segnali (fig.12) in uno spettro definito che vengono poi deviati con il percorso ottico tramite specchi diecrici e filtri selettivi:

-filtri long pass: trasmettono lunghezze d'onda superiori al cut-off

-filtri short pass: isolano le lunghezze d'onda inferiori al cut-off

-filtri band pass: selezionano una banda ristretta e specifica

Occorre monitorare e considerare anche l'autofluorescenza intrinseca del campione, un rumore di fondo che potrebbe interferire con il segnale reale.

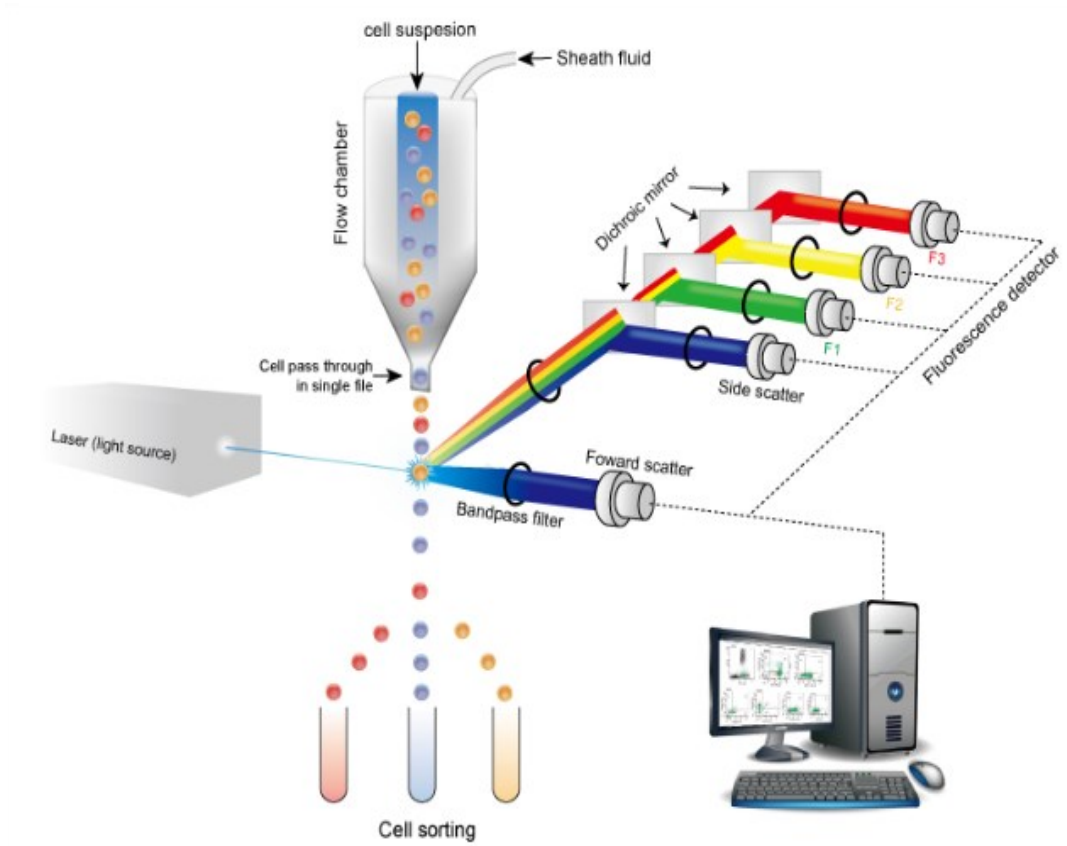


Fig.9 Illustra le componenti del citofluorimetro

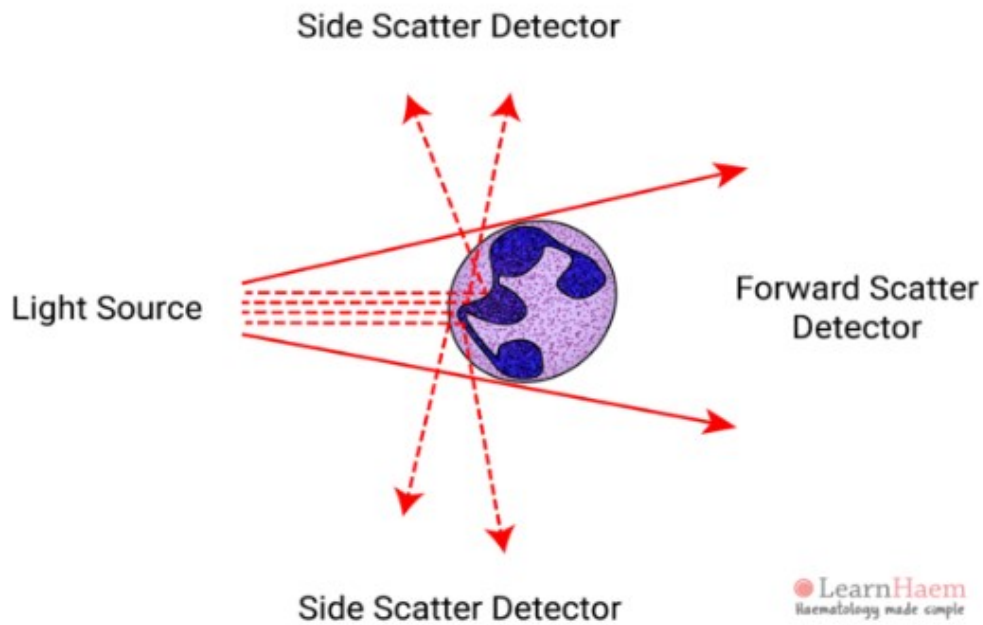


Fig.10 Illustra il Forward scatter e il Side scatter detector

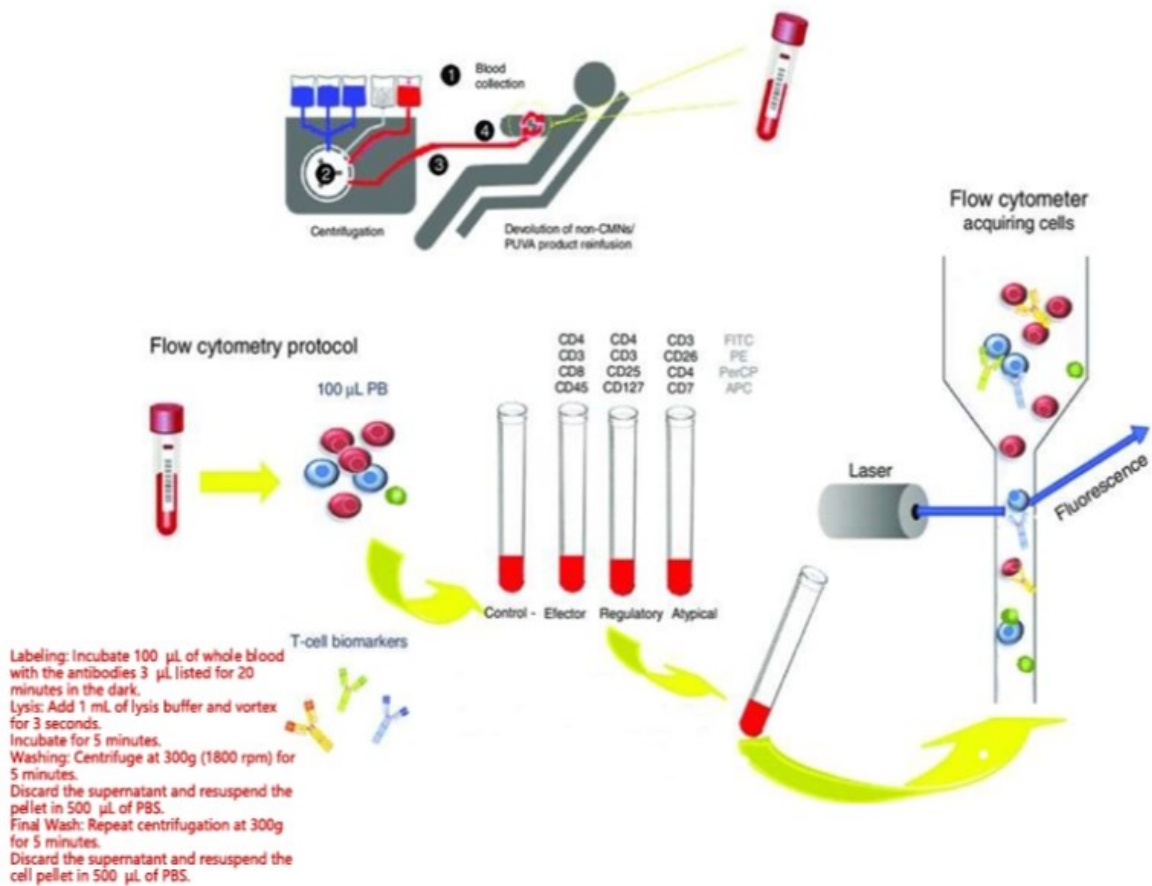


Fig. 11 mostra un diagramma di flusso con le fasi di prelievo,marcatura con anticorpi coniugati a fluorocromi,i passaggi di lisi con lavaggio e successiva acquisizione con la citometria a flusso per la caratterizzazione fenotipica delle cellule ricercate.

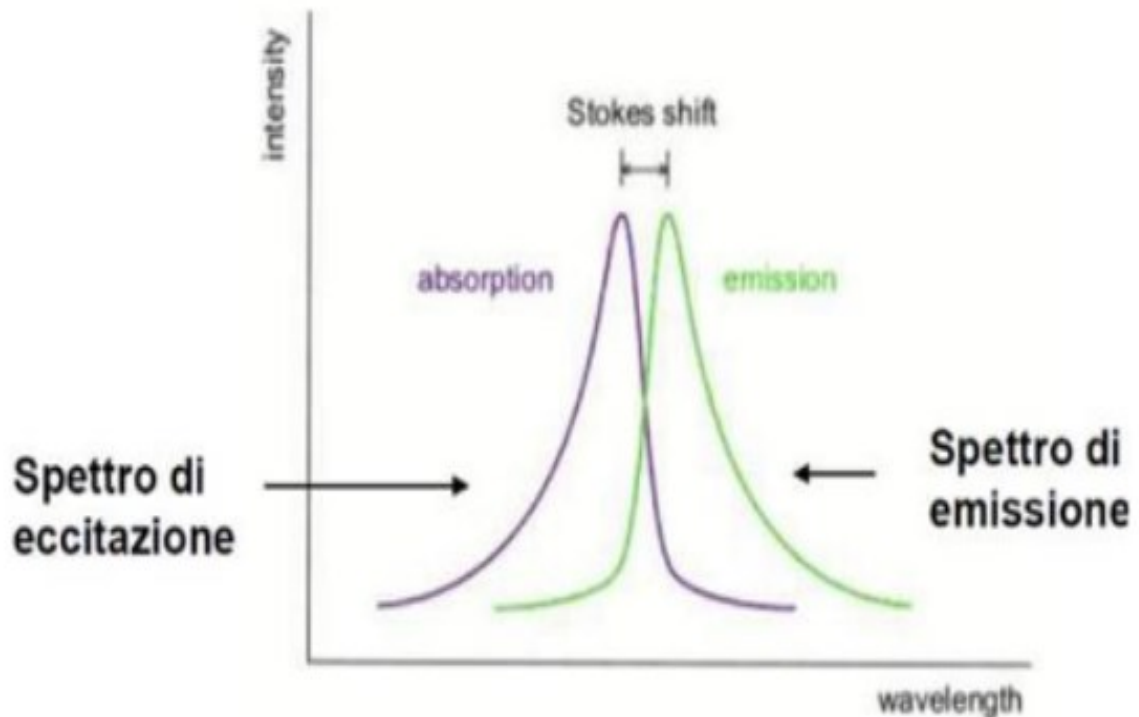


Fig.12 mostra lo Stokes shift e lo spettro di eccitazione ed emissione

4.3 Il citogramma

I dati acquisiti vengono poi visualizzati con istogrammi o citogrammi (fig.13), dove ogni punto rappresenta una cellula, dato che gli spettri di emissione dei fluorocromi tendono a sovrapporsi spesso (overlap), si applica un sistema di compensazione. Attraverso algoritmi e software il sistema corregge le eventuali interferenze spettrali per garantire che il segnale appartenga solo al fluorocromo d'interesse. Infine, con il processo di gating, l'operatore seleziona le popolazioni cellulari e ne attribuisce un codice di colore. L'analisi potrebbe indurre ad una compensazione errata e quindi a falsi positivi o negativi rendendo inaccurato il dato clinico finale.

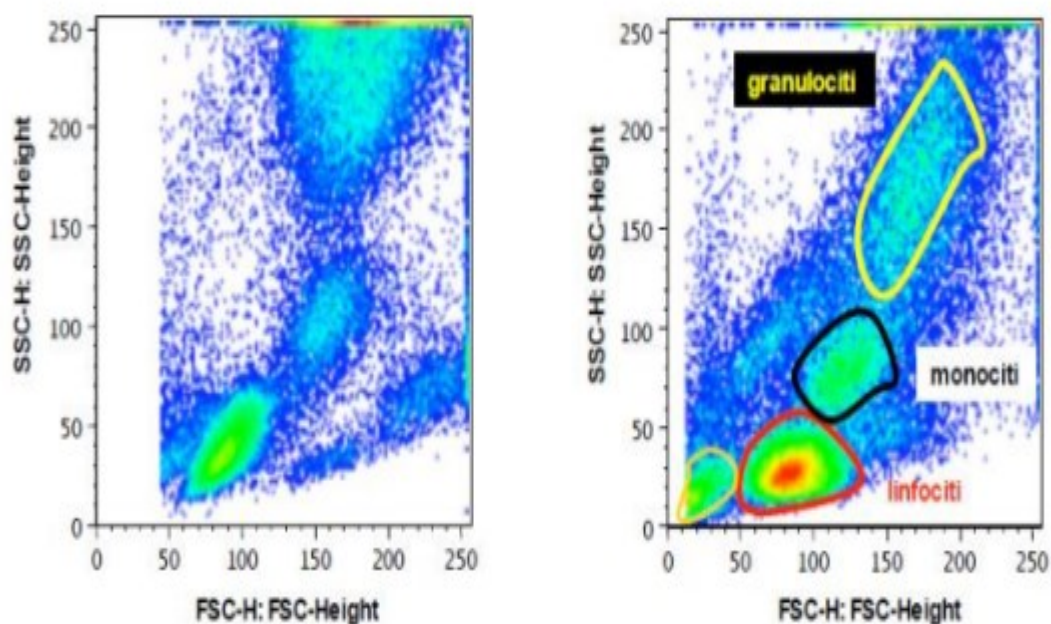


Fig.13 Mostra un diagramma bidimensionale ottenuto attraverso la combinazione del forward e side scatter. Permette di isolare le varie popolazioni sulla base delle caratteristiche fisiche.

4.4 Caratterizzazione immunofenotipica peculiare degli eosinofili nel sangue mediante citometria a flusso

Le popolazioni cellulari vengono identificate in base alle loro caratteristiche morfologiche in linfociti (piccoli, con scarso citoplasma e situati nel grafico FSC/SSC in basso a sinistra), i monociti (sono leggermente più grandi dei linfociti, presentano un citoplasma e un nucleo voluminoso) e i granulociti (cellule caratterizzate da un'elevata granularità interna). Oltre al dot plot, l'analisi utilizza gli istogrammi, dove l'asse delle ordinate (y) indica il numero di eventi (cellule) e l'asse x delle ascisse indica l'intensità di fluorescenza. Mentre in microscopio l'immagine a colori deriva dal merge, in citometria la colorazione è il risultato dei gating. L'obiettivo di questa analisi è stato duplice da una parte monitorare l'espressione dei marcatori specifici della linea eosinofila (CD45 e Siglec-8) e monitorare l'assetto dei recettori funzionali (CCR3, CD62L e IL-5r). Per ogni condizione un'aliquota del campione è stata risospesa in PBS e incubata per 20 min a temperatura ambiente, al buio, con anticorpi monoclonali specifici (riportati in Tabella 2 e Tabella 3).

Secondo quanto riportato da Hassani et al.2020 (8), la caratterizzazione della linea eosinofila richiede l'integrazione dei dati riguardanti marcatori specifici che ne riflettono l'origine e lo stadio maturativo. L'identificazione di queste cellule richiede l'esclusione dei neutrofilo tramite il marcatore CD16, che isola la popolazione eosinofila ai primi stadi precursori. All'interno di questo gating, l'impiego simultaneo di Siglec-8 e CCR3 aumenta la specificità analitica, dato che l'espressione di queste proteine viene sovraregolata durante il processo di differenziamento cellulare. La maturazione è definita dal marcatore (CD62L), la cui espressione aumenta passando da livelli bassi a positivi nelle cellule mature. Parallelamente lo studio dimostra come il recettore IL-5R sia espresso nell'intero ciclo vitale della cellula e raggiunga poi un picco nella fase di maturazione. L'insieme di questi parametri, inseriti nel protocollo sperimentale è possibile distinguere l'identità cellulare. Lo studio condotto da Matucci et al. 2021 (9) evidenzia la classificazione della popolazione leucocitaria e i due sottogruppi di eosinofili divergenti. La chiave di questa distinzione è l'espressione del marcatore CD62L che definisce gli eosinofili residenti (rEOS) dagli eosinofili infiammatori (iEOS). L'integrazione di questi marcatori nel presente lavoro, è suddivisa tra lo Stain 1 e lo Stain 2, al fine di monitorare non solo l'identità cellulare ma anche il potenziale migratorio della linea eosinofila in risposta all'asma.

Tabella 2: Pannello di anticorpi monoclonali impiegati per la caratterizzazione citofluorimetrica.

Anticorpo	Antigene riconosciuto	Fluorocromo	Significato funzionale
FITC anti-human CD16 (SONY)	CD16	FITC	è tipicamente espresso da neutrofilo e monociti: la sua assenza aiuta a escludere queste popolazioni dal gating

Brilliant Violet 510 anti-human CD193 (CCR3) (SONY)	CCR3	BV510	è un recettore per chemochine fortemente espresso negli eosinofili attivati, ed è indicativo della loro capacità chemiotattica
PE anti-human Siglec-8 (SONY)	Siglec8	PE	è una lectina specificamente espressa dagli eosinofili maturi e consente una loro identificazione selettiva
IL5RA Monoclonal Antibody (26815) APC (Invitrogen)	IL5RA	APC	(recettore alfa per l'interleuchina-5) è fondamentale per la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione eosinoflica
APC anti-human CD62L (SONY)	CD62L	APC	(L-selectina) è coinvolto nella migrazione leucocitaria e la sua espressione è generalmente associata a eosinofili residenti nei tessuti

PE/Cy7 anti-human CD45 (SONY)	CD45	PE/Cy7	è un marcatore pan-leucocitario che permette di distinguere le cellule del sistema immunitario da altre componenti cellulari
-------------------------------	------	--------	--

Ab CITOFLUORIMETRIA	Antigen	Manufacturer	Fluorochrome	REF#	Clone	Isotype
FITC anti-human CD16	CD16	SONY	FITC	2110030/10 0 tests	3G8	Mouse IgG1, k
Brilliant Violet 510 anti-human CD193 (CCR3)	CD193	SONY	BV510	2153610/10 0 tests	clone: 5E8	Mouse IgG2b, k
PE anti-human Siglec-8	Siglec8	SONY	PE	2335520/10 0 tests	7C9	Mouse IgG1, k

IL5RA Monoclonal Antibody (26815) APC	IL5RA	Invitrogen	APC	MA5-23581		
APC anti-human CD62L	CD62L	SONY	APC	2124050/10 0 tests	DREG-56	Mouse IgG1, k
PE/Cy7 anti-human CD45	CD45	SONY	PE/Cy7	2120080/10 0 tests	HI30	Mouse IgG1, k

Tab.3 Pannello di anticorpi monoclonali utilizzati per l'analisi in citofluorimetria a flusso. Per ciascun target sono indicati l'antigene, il produttore, il fluorocromo coniugato, il codice identificativo (REF#), il clone anticorpale e l'isotipo corrispondente.

4.5 Il protocollo di studio sperimentale

Il protocollo di marcatura dei campioni condotto è stato articolato nelle seguenti fasi operative:

1. **Immunomarcatura:** Un'aliquota di sangue intero (100µL) è stata incubata con 3 µL di ciascun anticorpo monoclonale (come specificato in Tab 2 e 3). La reazione è avvenuta per 20 min a temperatura ambiente al buio per proteggere la stabilità dei fluorocromi.

2-**Lisi eritrocitaria** : Per isolare solo la popolazione leucocitaria, è stato aggiunto il tampone di lisi, lasciandolo per 5 min per l'eliminazione della componente eritrocitaria che potrebbe interferire con il segnale del citofluorimetro.

3-Centrifugazione e Lavaggi: La sospensione è stata sottoposta a una prima centrifugazione a 260 g che corrispondono a 1800 rpm per 5 min. Dopo l'eliminazione del surnatante, il pellet è stato poi risospeso con PBS ed eseguito poi un secondo ciclo di centrifugazione in modo tale da eliminare eventuali residui di lisi oppure anticorpi non legati.

4-Acquisizione : Il pellet finale è stato risospeso di nuovo in 500 µL di PBS e i campioni sono stati poi analizzati al citofluorimetro.

4.6 Immunomarcatura

Esistono molti anticorpi specifici per diversi antigeni delle membrane dei leucociti, le proteine superficiali essendo degli antigeni per gli anticorpi a cui si legano sono classificati e studiati con i cosiddetti "CD", che sta per "cluster di differenziazione" che hanno permesso l'elaborazione di una tassonomia di leucociti. Le proteine di membrana permettono di distinguere le varie sottopopolazioni tramite una colorazione anticorpale. Alcuni CD definiscono lo sviluppo o la struttura cellulare, in questo caso la classificazione tra gli eosinofili.

4.7 Lisi degli eritrociti

L'analisi di citofluorimetria richiede la lisi dei globuli rossi, come riportato da Cossarizza et al (10), il processo metodologico richiede lo shock ipotonico infatti gli eritrociti tendono a scoppiare facilmente in un liquido ipotonico. Per questo studio è stato utilizzato un buffer lisi (ACK), in 1 L di acqua H₂O e titolato ad un Ph di 7.3, formato da 8,02 g di Cloruro d'Ammonio (NH₄Cl, 155 mM), 1 g di Bicarbonato di Potassio (KHCO₃, 10 mM) e 0,037g di EDTA (0.1 mM). L'impiego di un buffer e l'esposizione per 5 min in temperatura ambiente permette la rimozione di eritrociti senza danneggiare i granulociti. Come alternativa alla lisi chimica utilizzata, esiste anche la centrifugazione su gradiente (es per densità con Ficoll) che permette la separazione delle (PBMC) ovvero delle cellule mononucleate dal resto dei granulociti ed eritrociti. Il Ficoll, come sottolineato nelle linee guida (10) porta alla perdita spesso di cellule target dell'analisi in questo caso degli eosinofili, che rischierebbero di essere rimosse con gli altri granulociti. La lisi chimica con buffer rappresenta il metodo più idoneo per rimuovere detriti e conservare il fenotipo originale.

4.8 Centrifugazione e lavaggi

La stratificazione cellulare deriva dalla centrifugazione differenziale che applica la legge di Stokes, questa legge lega la velocità di sedimentazione di una particella è proporzionale alla sua densità e al quadrato del suo raggio. In questo protocollo, l'applicazione di una forza centrifuga pari a 260 giri, consente ai leucociti di densità inferiore al plasma di concentrarsi nel pellet cellulare. Nel caso in cui si applicassero forze maggiori, si induce la rottura delle cellule e il rilascio del DNA alternando le successive risospensioni. La fase di lavaggio stabilizza il campione e si esegue con PBS, che facilita il ritorno alla condizione isotonica e un PH di 7.4 in modo da prevenire la morte accidentale delle cellule.

L'obiettivo e il senso del ciclo di centrifugazione e la risospensione è quello di eliminare l'emoglobina libera, i residui proteici e gli interferenti molecolari. Queste due fasi garantiscono l'ottimizzazione del segnale incrementando la precisione.

4.9 Acquisizione

L'analisi immediata è utile a prevenire la sedimentazione spontanea, capace di alterare la concentrazione del campione, impattando il conteggio e la rappresentatività. Per garantire l'omogeneità dei campioni sono stati risospesi mediante un pipettamento manuale prima dell'analisi. L'acquisizione dei dati è stata eseguita tramite il numero degli eventi e il gating per escludere i doppietti e aggregati cellulari che potrebbero falsare i risultati. L'analisi statistica è stata poi condotta su cellule singole vitali chiamate "singoletti".

4.10 Raccolta dati e analisi statistica

Le indagini statistiche sono state eseguite sfruttando i comandi del software Jamovi.

La distribuzione della popolazione è stata verificata con il test di normalità di Shapiro-Wilk con il fine di definire il tipo di test parametrico o non parametrico. In particolare per le variabili che hanno mostrato una distribuzione normale ($p > 0,05$), il confronto tra il gruppo dei controlli e quello degli asmatici è stato indagato mediante il test t di Student per campioni indipendenti. Diversamente per le variabili che hanno mostrato una distribuzione non gaussiana ($p < 0,05$), è stato applicato un test non parametrico U di Mann-Whitney.

Per tutte le analisi di confronto; il valore di $p < 0,05$ è stato considerato come soglia critica per definire il dato come statisticamente significativo.

RISULTATI

5.1 Strategia di gating della popolazione leucocitaria

Le sottopopolazioni leucocitarie sono state identificate con la metodica citofluorimetrica ,sfruttando i due parametri fisici , SSC-A per la complessità interna e la granularità cellulare e il FSC-A inerente alle dimensioni cellulari attraverso il software CytExpert. Come illustrato nel dot plot (fig.14), la strategia di gating impiegata nell'analisi di routine ha consentito l'individuazione dei 3 cluster cellulari. Il gating rappresentato in viola (granulo), è stato individuato in base all'aumentata intensità del segnale Side scatter e corrisponde ai granulociti che hanno dimensioni maggiori e una notevole complessità cellulare data dalla numerosa presenza di granuli citoplasmatici e da nuclei plurilobati; questo primo cluster rappresenta la maggior parte degli eventi che sono stati acquisiti. Il gating in azzurro (mono) rappresenta i monociti caratterizzati da dimensioni cellulari simili a quella dei granulociti, ma con una minore complessità cellulare. Infine il gating in arancione (linfo), rappresenta i linfociti, con dimensioni e complessità minori per cui si localizzano nella regione a basso Forward scatter e Side scatter. L'isolamento del cluster dei granulociti rappresenta un passaggio essenziale per la caratterizzazione fenotipica della sua componente eosinofila.

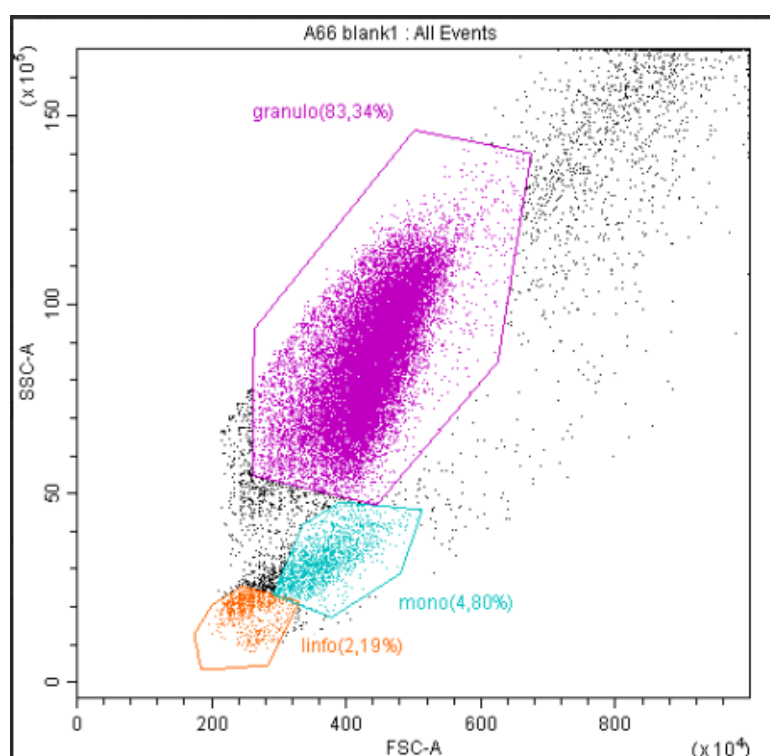


Fig.14 Illustra l'identificazione delle popolazioni leucocitarie basata su FSC-A e SSC-A

Questa acquisizione è stata effettuata in un campione di sangue senza marcatura con anticorpi specifici (controllo negativo). Inizialmente per escludere i potenziali artefatti legati all'aggregazione cellulare, il cluster dei granulociti è stato filtrato selezionando i singoli (eventi cellulari che passano singolarmente davanti al laser). Per escludere gli eventi (fig.15) di autofluorescenza, di seguito è stato realizzato un dot plot con i due fluorocromi di interesse PE (ficoeritrina) vs FITC-A (fluoresceina isotiocianato). La localizzazione di tutti gli eventi nel quadrante negativo (Q1-LL) permette di escludere segnali aspecifici dovuti ad autofluorescenza.

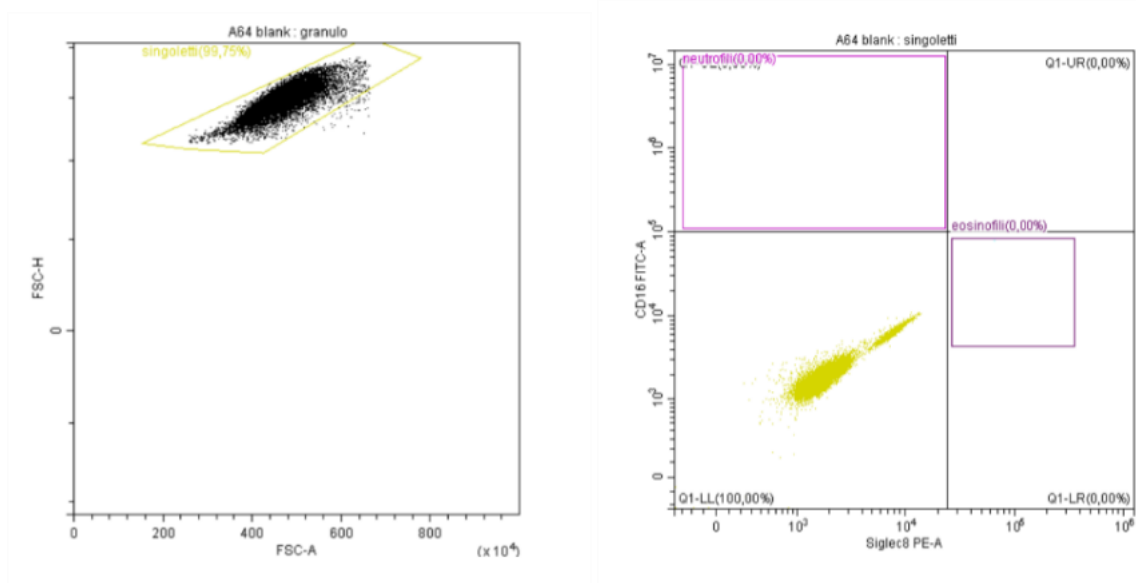


Fig.15 Nel pannello A mostra il gating per selezionare i singoli e il pannello B illustra un dot plot per verificare l'assenza di autofluorescenza.

L'analisi successiva mostra la strategia di gating per l'identificazione degli eosinofili. La marcatura indicata nel protocollo sperimentale come stain 1 ha permesso la discriminazione delle sottopopolazioni dei granulociti in eosinofili e neutrofili, sfruttando la doppia marcatura CD16 FITC e Siglec8 PE. Come illustrato (fig.16) nel dot plot gli eosinofili sono stati identificati come eventi Siglec-8 + e CD16 -. Al contrario la popolazione dei neutrofili è stata discriminata per l'espressione del CD16 e assenza di Siglec-8.

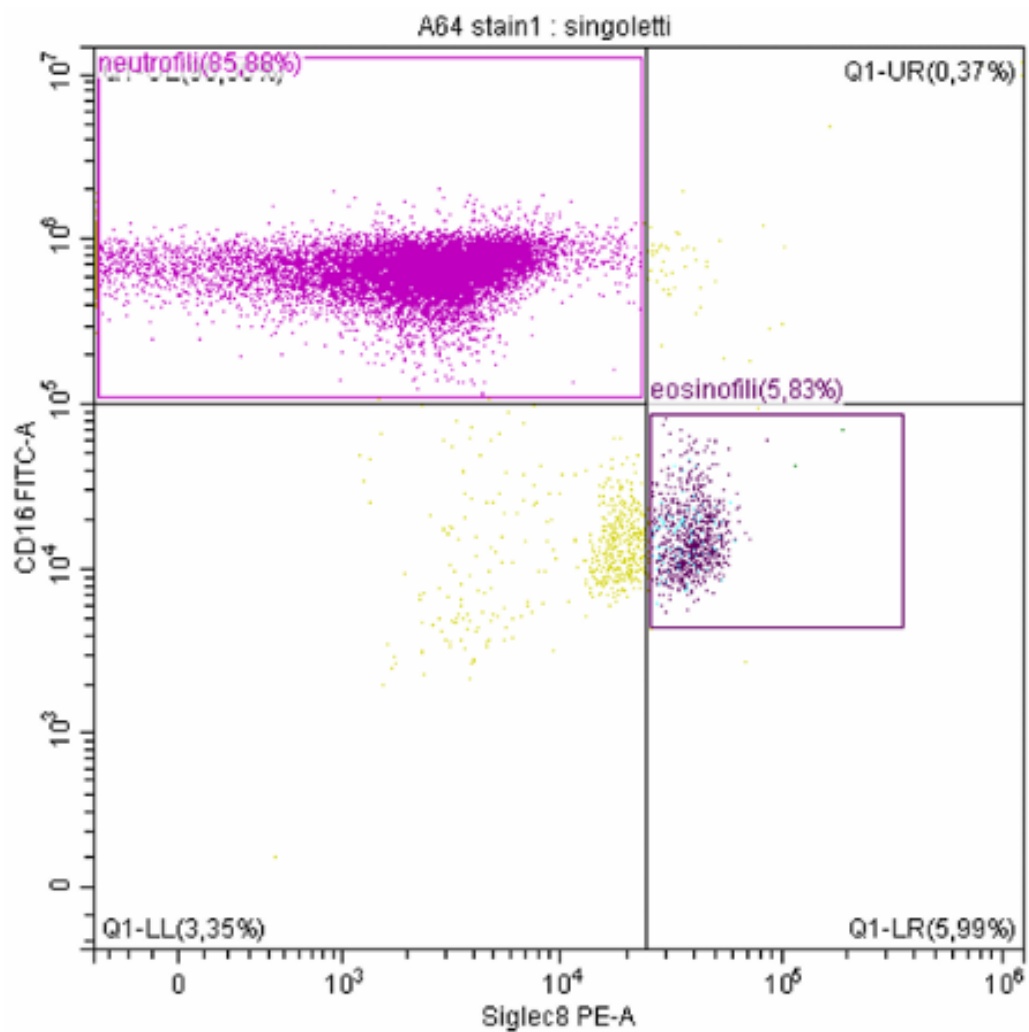


Fig.16 Illustra un dot plot per la suddivisione dei granulociti in eosinofili e neutrofilii con marker selettivi CD16 e Siglec8.

Successivamente abbiamo identificato i due sottotipi (fig.16) di eosinofili infiammatori (iEOS) e residenti (rEOS): la frazione cellulare Siglec-8 +/CD 16 - è stata suddivisa in 2 sottopopolazioni sulla base della densità di espressione di CD62L.

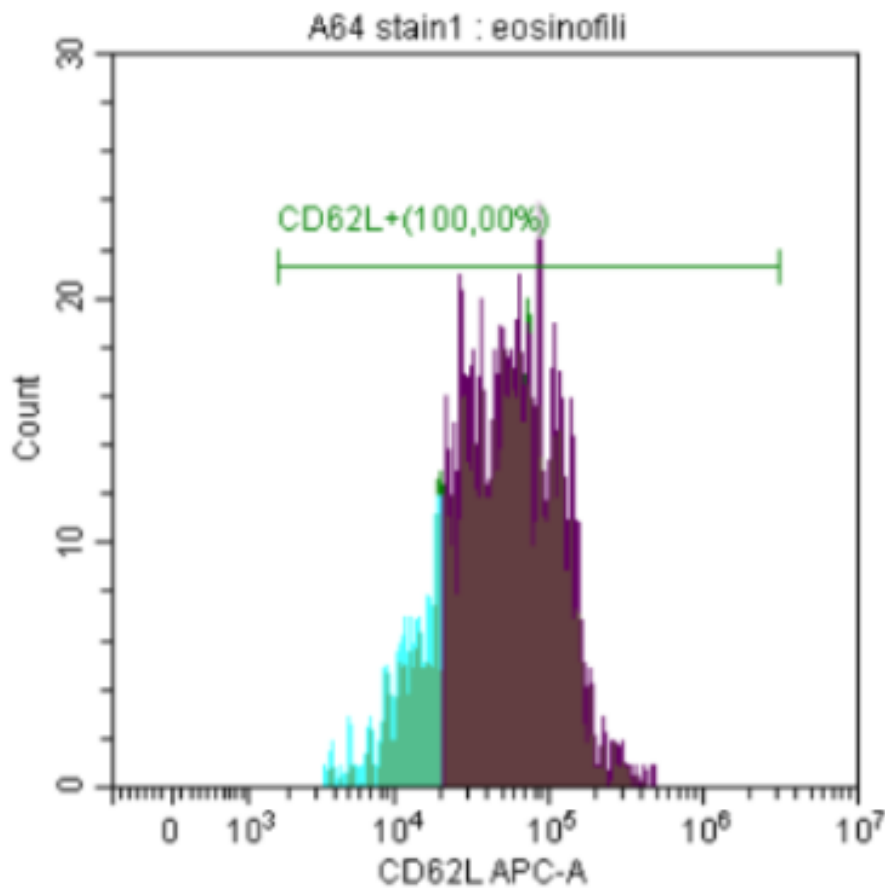


Fig.17 Mostra l'istogramma della fluorescenza per il marker CD62L sulla popolazione isolata di eosinofili.

Sono stati valutati gli istogrammi (fig.17) relativi all'integrità fenotipica della popolazione eosinofila studiata. La distribuzione del marker CD62L presenta un picco definito centrato attorno alla prima decade del 10^4 che abbiamo usato per stabilire il cut-off di CD62L che permette di distinguere tra eosinofili infiammatori ($CD62L^{low}$) e residenti ($CD62L^{high}$).

La figura (18) mostra un esempio di un dot plot con la suddivisione della popolazione degli eosinofli Siglec-8 + nei due sottotipi iEOS ($CD62L^{low}$) e rEOS ($CD62L^{high}$).

La maggior parte degli eventi è rappresentata da eosinofili residenti, mentre la percentuale di iEos risulta più bassa.

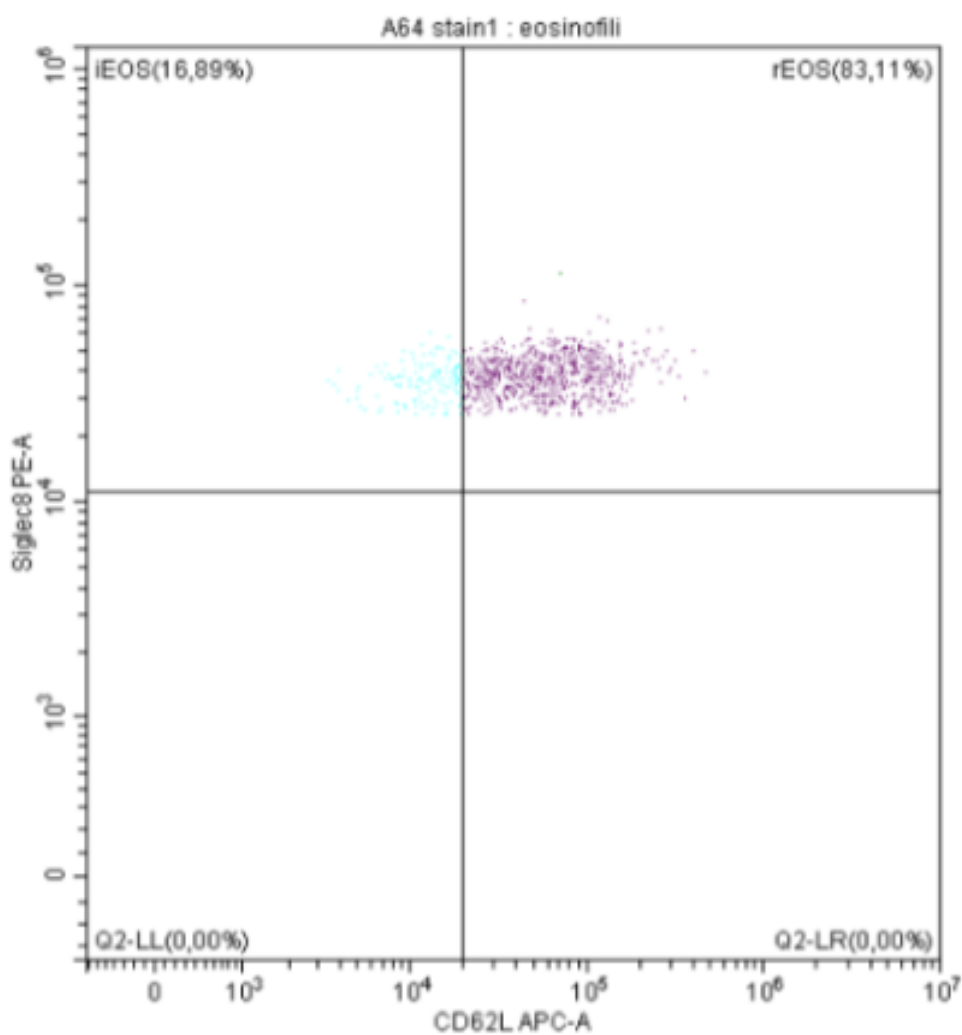


Fig.18 il dot plot illustra l'analisi dell'espressione di CD62L sulla popolazione degli eosinofili isolati con Siglec-8, evidenziando gli eosinofili infiammatori (16.89%) in azzurro Siglec-8+ e CD62L^{low} e residenti (83.11%) in viola Siglec-8 + e CD62L^{high}.

Abbiamo inoltre valutato l'espressione di due ulteriori marcatori fenotipici rilevanti per gli eosinofili :il recettore per le chemochine CCR3 (coinvolto nella chemiotassi degli eosinofili) e il recettore ILR-5 (coinvolto nella maturazione,attivazione e sopravvivenza degli eosinofili). I dati dell'istogramma (fig.19) mostrano un'elevata positività per CCR3, con picchi definiti ed omogenei centrati nella prima decade di 10^5 . Non è stata rilevata alcuna differenza nell'espressione di CCR3 tra EOS totali, iEOS e rEOS.

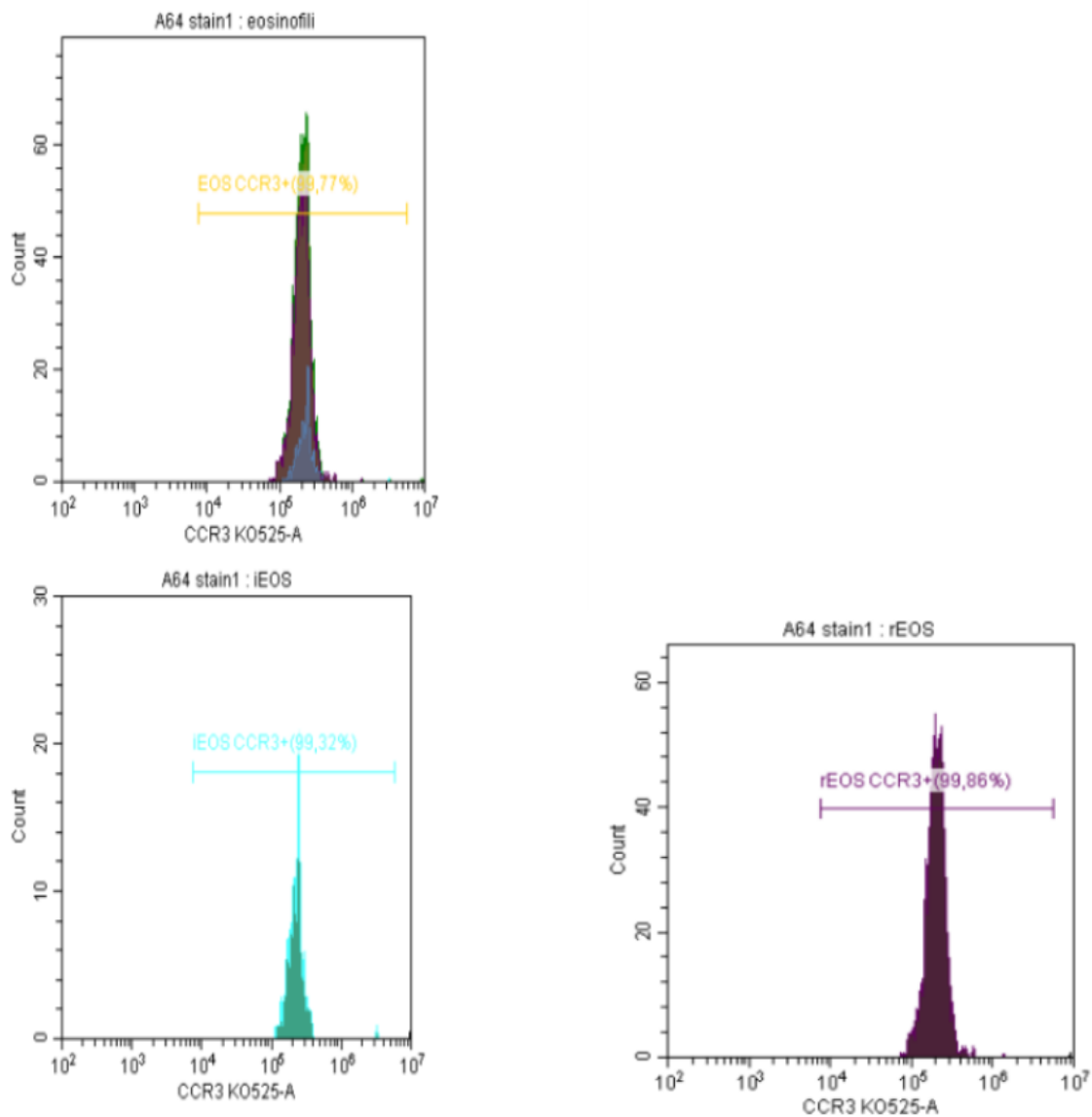


Fig.19 riporta l'espressione di CCR3 di stain 1 sulla popolazione totale degli eosinofili e sulle frazioni iEos e rEos del campione.

Per quanto riguarda l'espressione dell'IL5-R (fig.20) è stato osservato una bassa espressione di questo marcatore che mostra un picco definito ed omogeneo centrato su 10^3 , di nuovo senza differenza tra eosinofili totali, iEOS e rEOS.

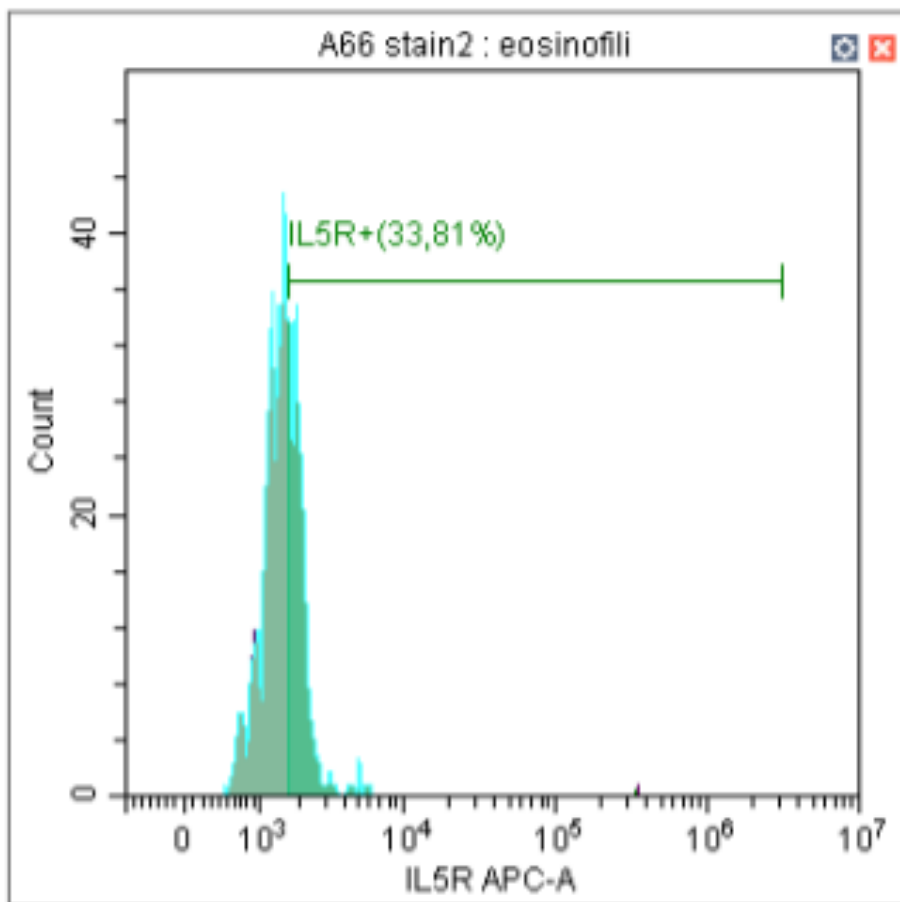


Fig.20 riporta l'espressione di IL5R di stain 2 sulla popolazione totale degli eosinofili .

5.2.Caratteristiche cliniche della popolazione dello studio

All'interno dello studio, a partire da marzo 2024, è stata reclutata una coorte di 53 pazienti asmatici, unitamente ad un gruppo di 17 controlli sani, non affetti da asma, BPCO o altre patologie respiratorie. I soggetti inclusi nello studio sono stati arruolati tra i pazienti afferenti agli ambulatori dell'U.O.C. di Pneumologia dell'Azienda Ospedale-Università di Padova. I controlli sani sono stati reclutati tra il personale afferente al Dipartimento di Scienze Cardio Toraco Vascolari e Sanità Pubblica dell'Università di Padova.

La popolazione oggetto dello studio è stata studiata applicando un confronto tra il gruppo di soggetti affetti da asma e il gruppo di controllo i cui profili sono sintetizzati e riportati in tabella (tab.5). Nel set dei dati sono presenti variabili demografiche e antropometriche, quali età e indice di massa corporea (BMI) nonché lo stato tabagico. Il profilo immunologico e clinico dei pazienti asmatici è stato delineato mediante il dosaggio delle IgE totali sieriche e la misurazione di ossido nitrico (FeNO), in modo da inquadrare lo stato infiammatorio delle vie aeree. Sono elencati in tabella i principali indici di funzionalità respiratoria ottenuti con l'indagine spirometrica, come il volume espirato massimo (FEV1), il rapporto di Tiffaneau (FEV1/FVC) e i flussi nelle piccole vie aeree (MEF50). Per le variabili numeriche sono stati tabulati i descrittori della tendenza centrale (mediana) e gli indici di dispersione (scarto interquartile).

<i>Variabile</i>	<i>CONTROLLI- Mediana (IQR 25-75)</i>	<i>ASMATICI Mediana (IQR 25- 75)</i>	<i>p</i>
<i>N soggetti (70)</i>	17	53	//
<i>età (yrs)</i>	44,5 (34-52)	54,1 (44-68)	0.032
<i>SESSO F (%)</i>	12 (75)	31 (59)	0.373
<i>BMI (Kg/m2)</i>	24 (23-26)	25 (22.2-30.0)	0.241
<i>FUMO (Non fumatori/ fumatori/ex fumatori) (%)</i>	0	31 (60)/ 1 (2) / 20 (38)	0.421
<i>IgE tot (KUA/L)</i>	//	175 (155-585)	//

<i>FeNO (ppb)</i>	//	64 (36-136)	//
<i>FEV1 (% pred)</i>	114 (110-118)	87 (69-98)	< 0.001
<i>FVC (%)</i>	114 (107-125)	97 (85-109)	< 0.001
<i>FEV1/FVC (%)</i>	84 (80-90)	73 (66-79)	< 0.001
<i>MEF50 (%)</i>	103 (90-111)	56 (31-70)	< 0.001

Tab.5 caratteristiche demografiche, biomarcatori infiammatori e parametri funzionali respiratori della popolazione in studio.

Per tutte le variabili abbiamo verificato con il test di normalità di Shapiro-Wilk la distribuzione dei dati, con l'obiettivo di definire il tipo di test da applicare parametrico o non parametrico. In particolare, per le variabili che hanno mostrato una distribuzione normale ($p > 0.05$), il confronto tra il gruppo dei controlli e quello degli asmatici è stato indagato mediante il test t di Student per campioni indipendenti. Al contrario per le variabili che hanno mostrato una distribuzione non normale ($p < 0,05$), è stato applicato un test non parametrico U di Mann-Whitney. La distribuzione di età (Fig.21) mostra un gap di età tra i due gruppi. Il gruppo di controllo presenta un'età media di 44.5 ± 11.7 con una mediana di 50 anni. Il gruppo degli asmatici riporta un'età media di 54.1 ± 17.8 e una mediana di 60 anni. Il range di età per gli asmatici è molto ampio, oscillando da un minimo di 18 a un massimo di 82 anni, a

differenza dei controlli in cui il range è più ristretto (28-61). Il test di Mann Whitney ha confermato che la differenza tra i due gruppi è significativa ($p= 0,016$).

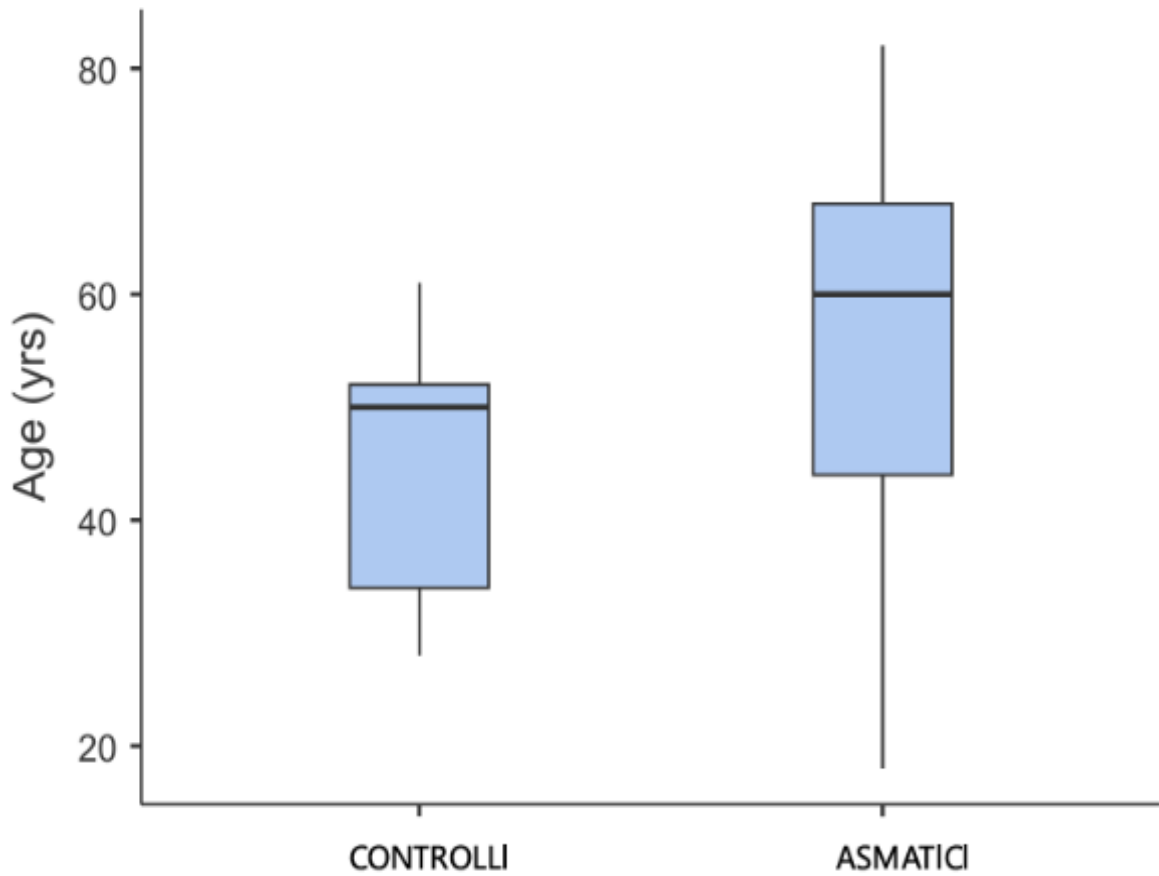


Figura.21 Il box plot mostra la distribuzione dell'età per il Gruppo 1 (controlli, N=17) e il Gruppo 2 (asmatici, N=53).

La distribuzione è stata ulteriormente indagata con il grafico a Q-Q (fig.22) dei residui standardizzati che mostra la distribuzione dell'età reale nei due gruppi rispetto ad una distribuzione ideale rappresentata dalla retta.

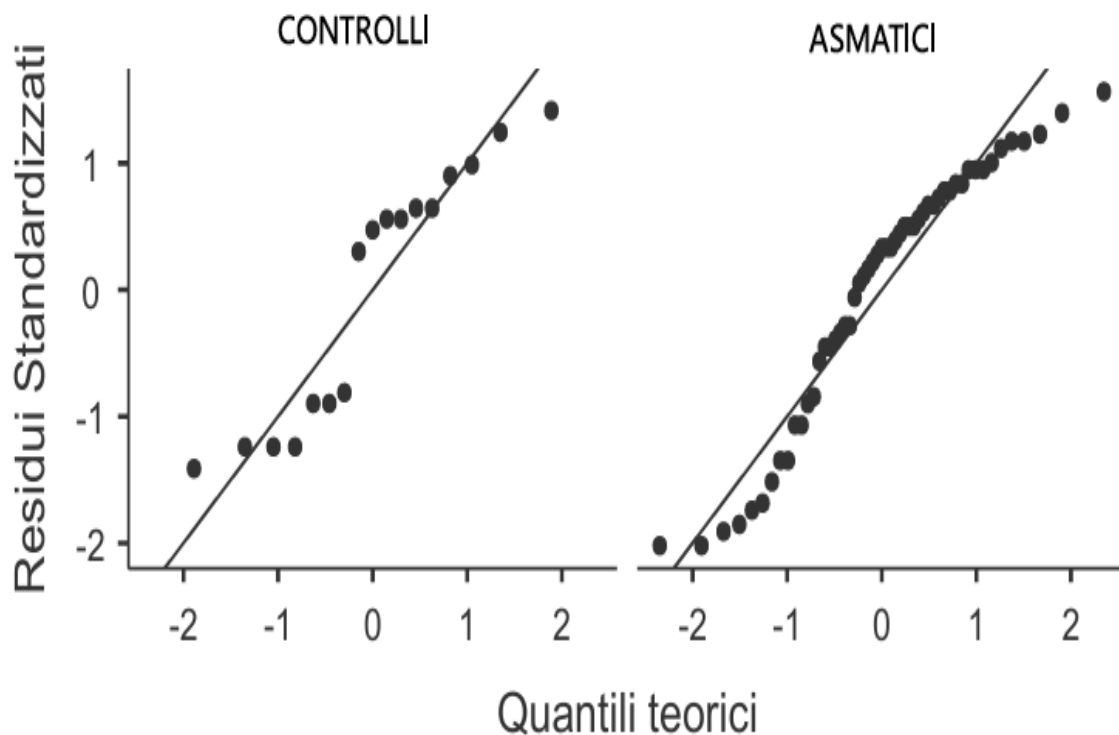


Fig.22 illustra due grafici Q-Q per la variabile età nei due gruppi sperimentali, la linea diagonale rappresenta la distribuzione teorica.

In seconda istanza alla valutazione dell'età (fig.21), è stata valutata la composizione del campione sulla base del sesso (fig.23) tramite una tabella di contingenza. Il campione totale presenta una prevalenza femminile (n=43;61,4%) rispetto a quella maschile (n=27,38,6%). Nei controlli si rileva una netta maggioranza di soggetti di sesso femminile (70,8%) rispetto ai maschi (29,4%); un andamento simile si osserva negli asmatici (58,5%) vs (41,5%). Tale prevalenza del sesso femminile si riscontra sia nel gruppo dei controlli che negli asmatici, senza differenza significativa tra i due gruppi.

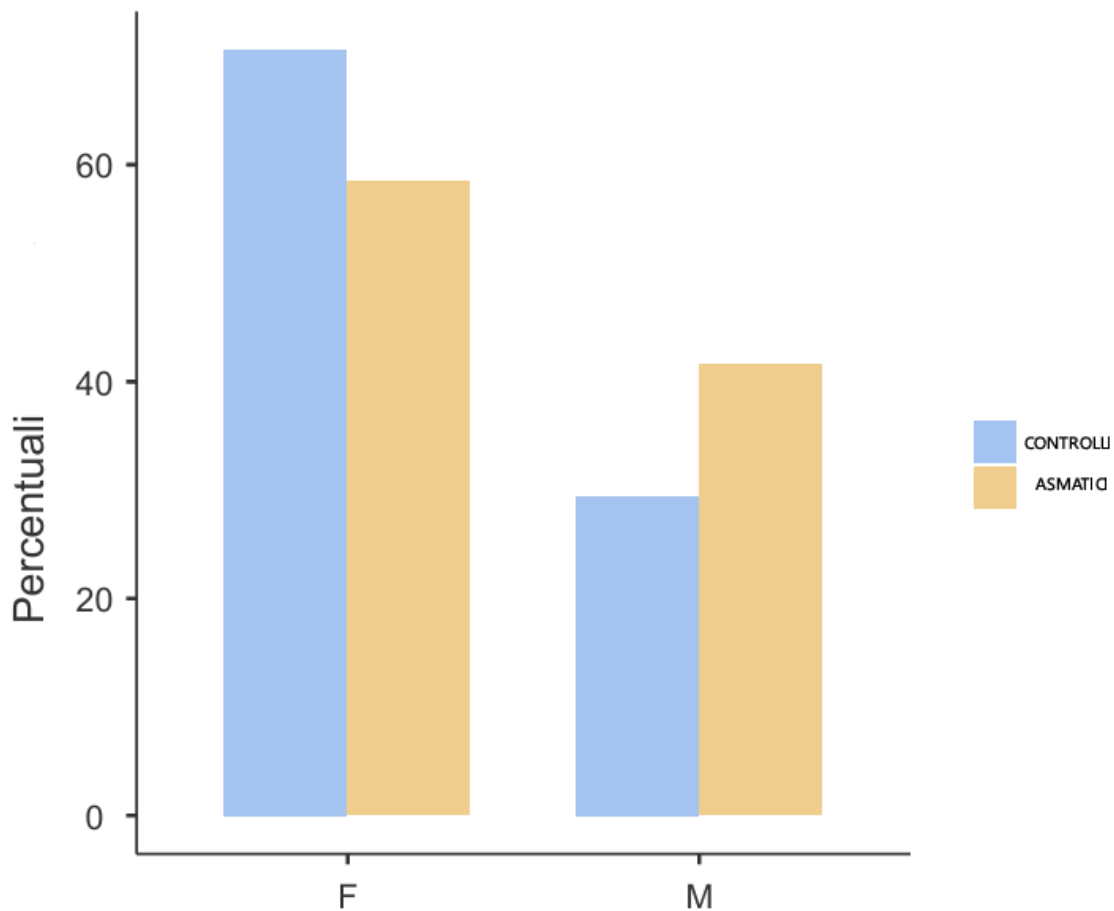


Fig. 23 Il grafico a barre illustra la composizione del campione suddivisa per sesso e gruppo di appartenenza.

Oltre al genere sono state valutate le caratteristiche antropometriche in particolare il BMI (fig.24) i soggetti del gruppo di controllo riportano un BMI medio di $23.9 \pm 2,64 \text{ Kg/m}^2$, dato che rientra nel range di normopeso. Il gruppo degli asmatici mostra una tendenza verso il sovrappeso, con un valore di $26.1 \pm 5,32 \text{ Kg/m}^2$ e una mediana di $25,2 \text{ Kg/m}^2$. Il confronto fra i due gruppi eseguito con il test di Mann Whitney non ha dimostrato differenze statisticamente significative. Tuttavia dall'osservazione dei valori della deviazione standard si può osservare che il gruppo degli asmatici manifesta una variabilità superiore ai controlli. Il grafico in basso dimostra la distribuzione di BMI nei due gruppi con un intervallo più ampio nei soggetti asmatici, in cui si rilevano valori di BMI nel range dell'obesità (fino a $44,1 \text{ Kg/m}^2$).

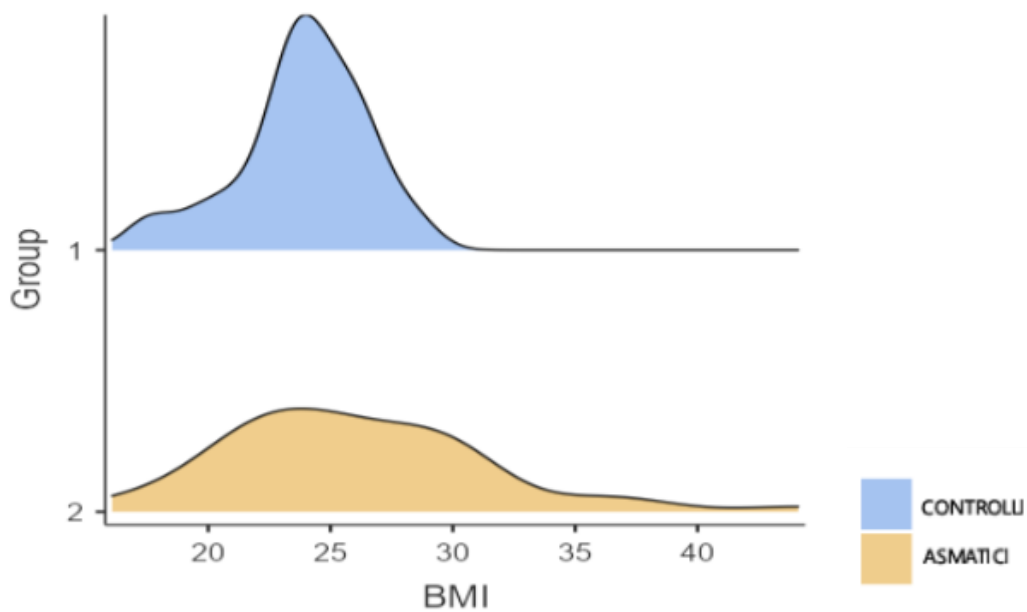


Figura 24 Il grafico mostra la distribuzione del BMI per il gruppo 1 dei controlli e il gruppo 2 con gli asmatici

Di seguito sono stati considerati i valori delle immunoglobuline IgE e il FeNO disponibili solo nei soggetti asmatici. I livelli di IgE totali presentano una mediana di 175,0 KUA/L con picchi che raggiungono i 2010 KUA/L, dimostrando una spiccata sensibilizzazione allergica nel gruppo asmatico. Parallelamente, la frazione di FeNO rileva valori mediani di 64 ppb, segnale di un'infiammazione eosinofila attiva a livello dell'epitelio bronchiale. Attraverso la spirometria sono stati raccolti i dati della funzionalità respiratoria che riportano una compromissione funzionale nei soggetti asmatici. Per il FEV1%, i dati seguono una distribuzione normale; il test t di Student rileva una differenza statisticamente significativa ($p < 0,001$) tra i valori dei controlli e quelli degli asmatici. Al contrario, per il rapporto FEV1/FVC e il MEF50, la distribuzione non è risultata normale; in questo caso, abbiamo applicato il test di Mann Whitney che è risultato significativamente diverso ($p < 0,001$), confermando l'ostruzione delle vie aeree, e in particolare, il coinvolgimento delle piccole vie negli asmatici (mediana MEF50 56,5 vs 103 dei sani). Per concludere sono stati raccolti anche i dati delle abitudini tabagiche che mostrano una prevalenza del 60,4% di non fumatori, mentre gli ex-fumatori, rappresentano il 37,7%. Al contrario, i fumatori attivi risultano

pressoché assenti, rappresentando solo l'1,9% del gruppo. Tutti i soggetti di controllo erano non fumatori.

5.3 Analisi degli eosinofili del sangue e delle sottopopolazioni eosinofile

Il profilo infiammatorio dei soggetti è stato indagato mediante la conta degli eosinofili (fig.25) sul prelievo di sangue periferico espressa in cells/ μ l. I dati tabulati mostrano una differenza tra le medie dei due gruppi: il gruppo degli asmatici riporta una media di 510 cells/ μ l \pm 398 e una mediana 360 cells/ μ l, mentre il gruppo di controlli registra un valore medio di 114 cells/ μ l \pm 75,6 e una mediana di 100 cells/ μ l.

Il test di normalità ha evidenziato una distribuzione non gaussiana, per cui abbiamo applicato un test non parametrico, che ha evidenziato un incremento degli eosinofili negli asmatici rispetto ai controlli ($p < 0,001$). È importante sottolineare la notevole dispersione dei dati nel gruppo di soggetti asmatici, che riflette l'eterogeneità interna della coorte di questi pazienti.

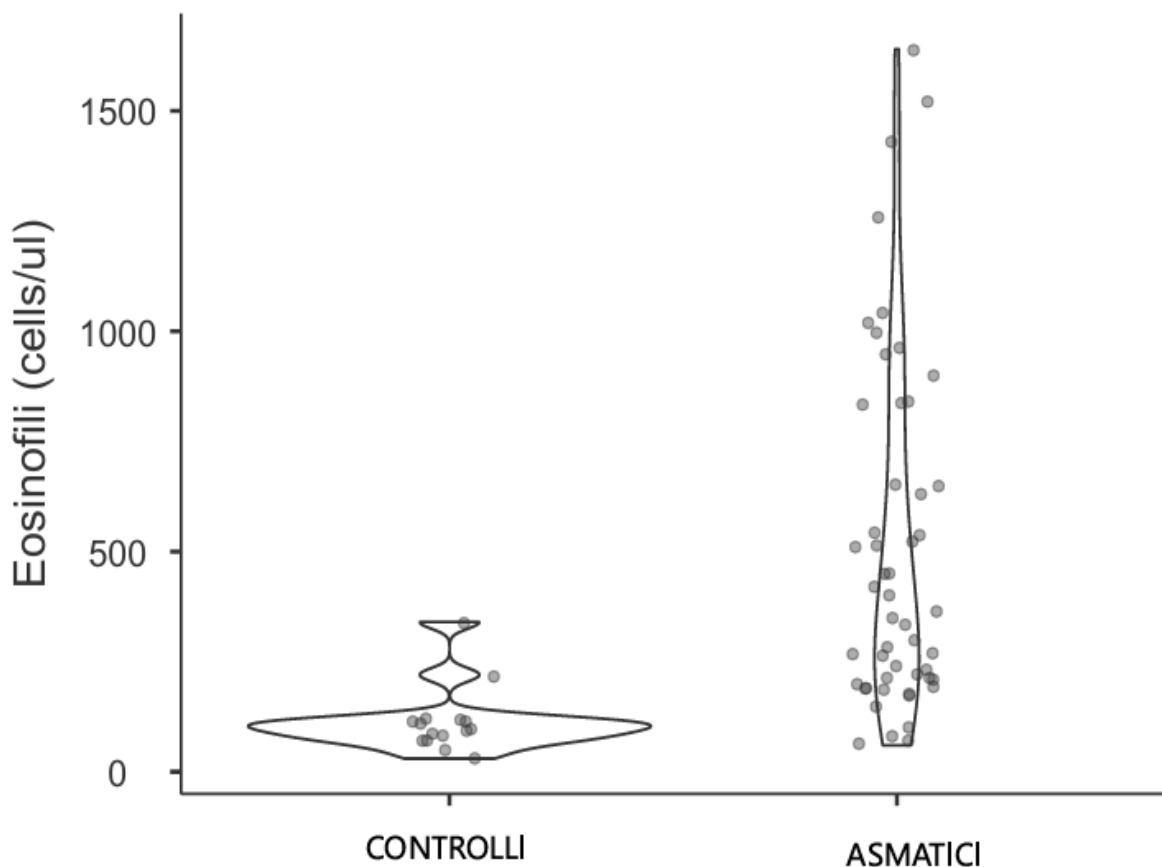


Fig.25 Illustra i livelli di eosinofili tra il gruppo di controllo e il gruppo di asmatici mediante un violin plot, che evidenzia una marcata eterogeneità intergruppo statisticamente significativa ($p=0,001$). In particolare, il gruppo degli asmatici presenta una distribuzione traslata verso l'alto con una forte variabilità, a differenza del gruppo di controllo che riporta valori bassi e una distribuzione molto più omogenea.

Per caratterizzare meglio questa eterogeneità abbiamo condotto una fenotipizzazione degli eosinofili distinguendo tra eosinofili infiammatori iEOS e residenti rEOS sulla base dell'espressione del marcatore CD62L come descritto in precedenza. Abbiamo espresso (fig.26) la sottopopolazione degli eosinofili infiammatori in percentuale (iEos %) osservando una media negli asmatici di 8,19% contro 5,60% e una mediana di 5,72% contro 3,19%, con picchi massimi che raggiungono il 39,5% negli asmatici. Dopo la verifica della normalità con Shapiro (distribuzione non normale) ho applicato il test di Mann-Whitney rilevando una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi ($p=0,021$).

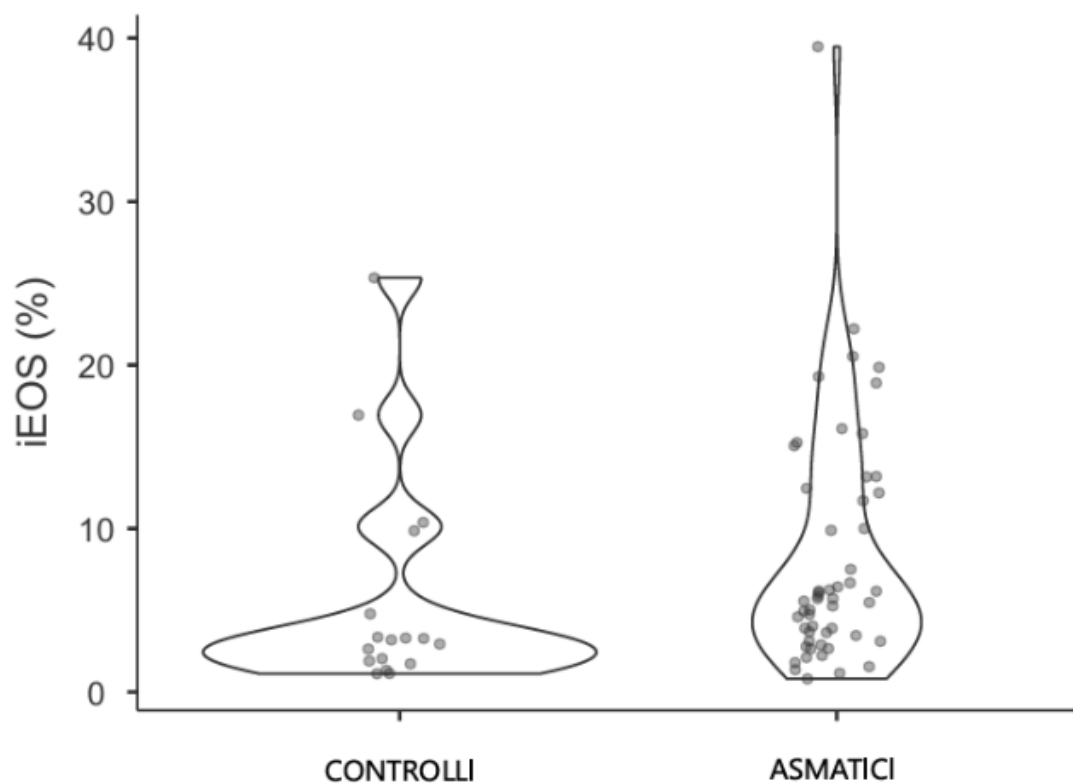


Fig. 26 Confronto della percentuale di eosinofili infiammatori (iEOS %) tra il gruppo di asmatici e il gruppo di controllo con un violin plot. La percentuale degli iEOS è risultata significativamente aumentata ($p = 0,021$) rispetto ai controlli.

Lo studio ha preso in considerazione anche la sottopopolazione degli rEos %, (fig.27) il cui valore viene calcolato matematicamente come il reciproco della percentuale infiammatoria rispetto al totale della popolazione eosinofila ($100 - iEos\%$). La percentuale di rEos nei controlli presenta una media del $94,4 \pm 6,60$ rispetto al $91,8\% \pm 7,28$ dei pazienti asmatici. Tale andamento è confermato anche dalle mediane, $96,8\%$ e al $94,3\%$, con un range di distribuzione che negli asmatici scende fino a un minimo del $60,5\%$, a testimonianza di una marcata variabilità fenotipica legata alla patologia asmatica (fig.27). Il test di Mann-Whitney ha restituito una significatività statistica ($p = 0,021$), validando una differenza rilevante tra il gruppo degli asmatici rispetto al controllo.

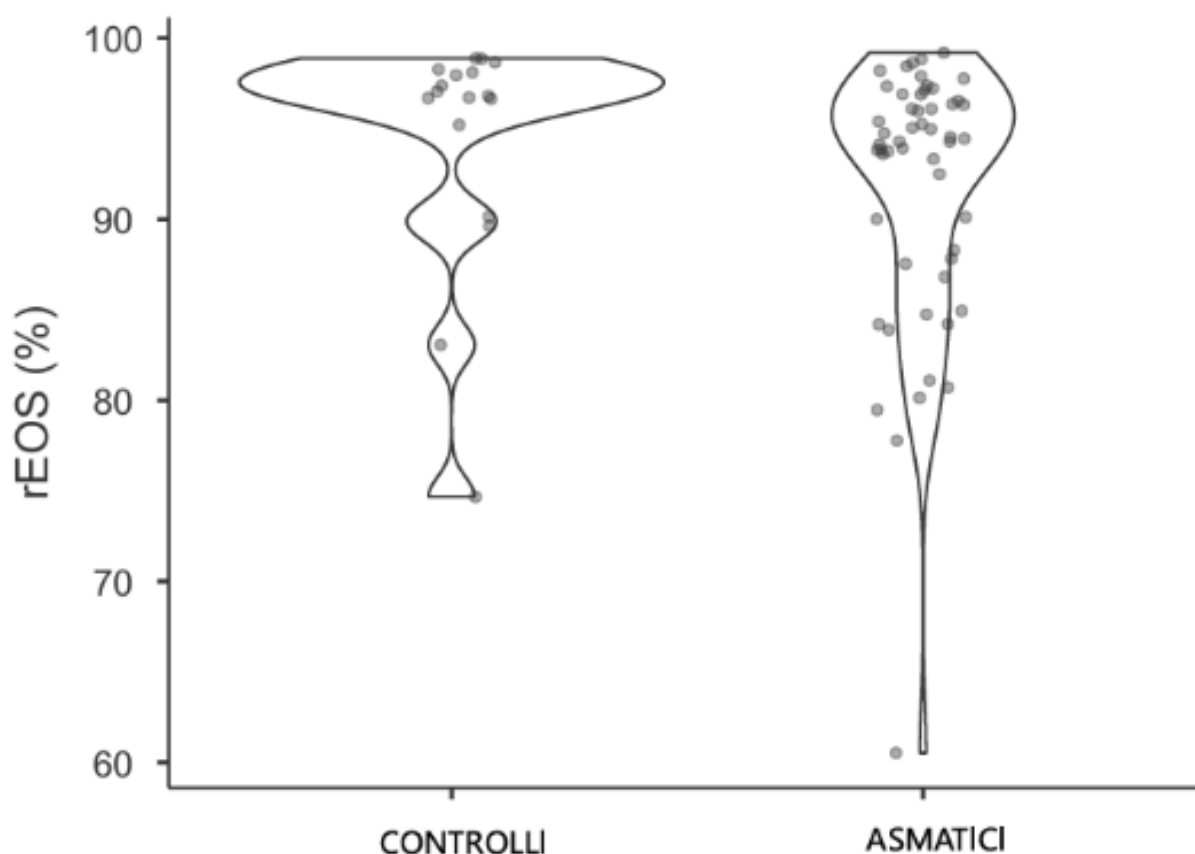


Fig.27 Confronto della percentuale di eosinofili residenti (rEOS %) tra il gruppo di asmatici e il gruppo di controllo con un violin plot. La percentuale degli rEOS è risultata significativamente aumentata ($p=0,021$) rispetto ai controlli.

5.4 Analisi delle correlazione tra i parametri clinici e la percentuale di eosinofili infiammatori

L'eventuale relazione tra iEOS% e variabili demografiche, cliniche, infiammatorie o funzionali è stata indagata mediante confronto o matrici di correlazione. In particolare, per quanto riguarda il genere non abbiamo osservato alcuna differenza significativa negli iEOS% tra maschi ($1,71 \pm 0,47$) e femmine ($1,58 \pm 0,49$) ($p=0,60$). Anche per quanto riguarda l'età non abbiamo osservato correlazioni statisticamente significative tra iEOS% ed età, né tra i soggetti asmatici né tra i soggetti di controllo. Inoltre non sono state individuate correlazioni significative tra iEOS% e il BMI.

Per quanto riguarda il profilo infiammatorio, abbiamo osservato una correlazione positiva tra iEOS% e eosinofili totali (cellule/ μ l) ($\rho=0,26$; $p=0,030$).

Per quanto significativa, tale correlazione è debole, con valore di $\rho < 0,40$, che conferma la diversità fenotipica degli eosinofili infiammatori rispetto agli eosinofili totali. Infine, negli asmatici non sono state individuati relazioni significative tra iEOS% e i parametri infiammatori come FeNO ($\rho=0,16$; $p=0,263$) e IgE ($\rho=-0,07$; $p=0,627$), che ci permette di ipotizzare che gli eosinofili infiammatori rappresentino un indicatore indipendente, che suggerisce vie di attivazione e reclutamento diverse dalla cascata allergica o dall'aumento della concentrazione di ossido nitrico a livello bronchiale. Infine, non abbiamo osservato correlazioni statisticamente significative degli iEOS% né con il marcatore CCR3 né con IL5R.

Per quanto riguarda la funzionalità respiratoria, gli iEOS% non correlavano con il FVC% e FEV1%. È stata rilevata una correlazione negativa statisticamente significativa tra iEOS% e il rapporto FEV1/FVC (%), ($p=0,029$ e $\rho = - 0,267$). Questa correlazione indica che all'aumentare della percentuale di iEOS si verifica contemporaneamente una riduzione del rapporto di Tiffeneau (FEV1/FVC), suggerendo un legame diretto tra la proliferazione di iEOS e il grado di ostruzione delle vie aeree. Infine è rilevata una correlazione negativa

statisticamente significativa tra iEOS% e il MEF50 ($\rho=-0,307$; $p=0,013$), suggerendo un legame tra l'aumento di iEOS e il grado di ostruzione delle piccole vie aeree.

DISCUSSIONE

L'asma è una malattia eterogenea (11) di natura episodica e con sintomi diversificati, che prende forma da complessi “meccanismi biopatogenetici”. La patologia coinvolge una vasta rete di molecole nella patogenesi come IgE, IL-4, IL-5, IL-13 e recettori considerati dei bersagli strategici per le terapie antiasmatiche.

L'asma è una patologia caratterizzata da (12) un'inflammazione delle vie aeree innescata in parte all'accumulo nella parete bronchiale di cellule quali eosinofili, mastociti e linfociti. In questa condizione si verifica un rimodellamento della parete bronchiale con un marcato aumento della deposizione di collagene e vascolarizzazione, che porta al declino della funzione respiratoria.

È necessario un inquadramento clinico che possa intrecciare i sintomi analizzati con la gestione della terapia; pertanto, l'assenza di un approccio standardizzato comporta spesso una errata diagnosi che conduce il paziente asmatico a terapie sbagliate o danni irreversibili per la salute. La diagnosi di asma viene identificata con sintomi tipici come respiro sibilante, tosse, oppressione toracica e dispnea, eventualmente associati a cambiamenti nei flussi d'aria espirata ed inspirata. La spirometria rileva volumi d'aria che riflettono spesso la fisiologia dei polmoni (13), riconoscendo casi di ostruzione anche in fasi precoci della sintomatologia. In questo contesto la spirometria eseguita dai medici dell'Azienda ospedaliera di Padova è risultata indispensabile per monitorare la funzionalità polmonare.

Nell'asma i risultati della spirometria oscillano tra condizioni normali e situazioni di ostruzione, tale ostruzione è caratterizzata da un rapporto tra il volume espiratorio forzato in un secondo (FEV1%) e la capacità vitale forzata (FVC%) al di sotto della soglia normale con una riduzione del FEV1% con una parziale conservazione di FVC%.

Uno dei segnali di questa situazione instabile è la concavità del grafico flusso/volume espirato. Un aspetto distintivo della spirometria nell'asma è quindi la variabilità della curva del flusso d'aria espiratorio.

Oltre alla spirometria, per monitorare i pazienti asmatici si eseguono diversi test tra cui l'esame emocromocitometrico in modo tale da raccogliere dati utili per ricostruire il controllo generale della malattia.

È fondamentale prendere in considerazione l'intero iter di questo studio che prende forma dalla selezione del campione, raccolta del campione di sangue su cui si eseguirà poi l'indagine citofluorimetrica, fino all'analisi dei dati e la loro interpretazione.

Le analisi in laboratorio sono spesso condizionate dalla variabilità preanalitica che ricopre un ruolo cruciale nel processo. Oggi la variabilità preanalitica è considerata la causa principale di errori non casuali nei laboratori di analisi e di ricerca.

Siamo stati attenti a escludere fattori esterni di variabilità escludendo dallo studio soggetti con riacutizzazione recente, infezioni polmonari, BPCO, neoplasie oppure soggetti che seguivano terapie con steroidi orali.

Il fatto che tutti i campioni siano stati prelevati nell'Azienda ospedaliera di Padova, a partire da marzo 2024, ha permesso di controllare eventuali errori di strumentazioni diverse oppure tempi di conservazione errati. In aggiunta, la vicinanza spaziale tra gli ambulatori della U.O.C di Pneumologia e i laboratori di analisi ha ridotto i tempi di trasporto dei campioni. Inoltre, tutte le analisi sono state condotte entro il limite massimo di 3 ore dal prelievo di sangue, mantenendo i campioni a temperatura ambiente (senza refrigerazione).

Considerare questo aspetto nella variabilità preanalitica corrisponde a salvaguardare l'integrità delle cellule delle proteine di membrana che verranno poi processate.

I campioni di sangue raccolti dai soggetti oggetto dello studio si basano su delle tecniche di raccolta e su kit che influenzano l'attendibilità finale del risultato. In questo contesto il sangue prelevato è stato conservato con EDTA (provetta con un tappo viola per sangue intero), storicamente (14) considerato un anticoagulante impiegato nei test ematologici, poiché permette la conservazione della morfologia cellulare e blocca l'attività delle nucleasi presenti nel sangue (14), garantendo l'integrità del campione durante la fase preanalitica.

È indispensabile durante la raccolta del campione verificare il rapporto tra il volume di sangue e l'anticoagulante aggiunto per evitare interferenze o artefatti.

Dopo la raccolta del campione, quest'ultimo è stato processato con la citometria a flusso che data la sua tecnologia particolarmente informativa (15) permette di distinguere nello stesso istante un complesso di parametri di cellule sospese in un mezzo liquido, permettendo rapidità dei tempi di analisi, riproducibilità delle letture ed elevata sensibilità, rendendo possibile la valutazione di migliaia di cellule in breve tempo.

Il citofluorimetro è costituito da un sistema fluidico per il trasporto del campione, un sistema di eccitazione costituito da una sorgente luminosa (laser) che genera un fascio di luce, un sistema ottico di rilevazione dei segnali luminosi e un sistema elettronico per l'elaborazione dati. Il principio cardine su cui si basa è la focalizzazione idrodinamica in cui le cellule del campione una volta aspirate in camera da flusso, vengono disposte in linea in modo tale da intersecare e comunicare con il fascio luminoso.

Mediante l'utilizzo di marcatori fluorescenti che emettono segnali a diverse lunghezze d'onda nello spettro di luce, tali fluorocromi (es. APC, PE-A, KO525) sono stati coniugati ad anticorpi specifici per proteine e recettori di membrana. Questa metodologia permette di analizzare diversi parametri contemporaneamente per questo definita multiparametrica. Oltre alla fluorescenza, i citofluorimetri utilizzano il fascio di luce per caratterizzare le proprietà morfologiche delle cellule: il forward scatter (FSC) corrisponde alla luce dispersa in avanti restituisce informazioni sulla dimensione della cellula, diversamente lo scatter side (SSC), luce riflessa a 90 gradi, riflette la complessità interna, il rapporto nucleo/citoplasma e la granularità del citoplasma, che risulta elevata in cellule ricche di granuli, come i neutrofili e gli eosinofili, a differenza di altre popolazioni cellulari.

I parametri acquisiti contemporaneamente per ogni singolo evento, sono stati acquisiti e correlati di seguito permettendo un confronto tra popolazioni cellulari.

Negli ultimi anni la metodica ha raggiunto una rapida diffusione nei laboratori di ricerca e clinici, perché consente di analizzare cellule e processarle senza perdere la loro vitalità.

Tuttavia, presenta dei limiti in parte pubblicati nella ricerca condotta da Rees et al 2022 (16) pubblicata su Nature reviews methods primers, che mette in rilievo come la citometria moderna debba affrontare dei limiti strutturali dettati dall'assenza di automazione completa nel "workflow operativo" (16).

Le procedure di laboratorio e in modo particolare le fasi manuali come la marcatura dei campioni, i cicli di centrifugazione e i lavaggi, introducono una variabilità analitica di tipo operatore-dipendente, che non è stata ancora risolta con sistemi robotizzati.

La manipolazione manuale dei campioni richiede supervisione sia per il gating che la raccolta dei dati tramite la selezione e l'estrapolazione del segnale, poiché la tecnologia è nata per analizzare singole cellule in sospensione senza indagare però le interazioni cellulari. Per superare alcuni dei limiti sono state rafforzate le strategie di gating, che permettono la selezione delle varie popolazioni, separando il segnale sulla base dell'intensità di fluorescenza e sulla base delle proprietà fisiche delle cellule. Per potenziare la qualità dei dati ricavati dalle singole cellule (17) vengono esclusi gli aggregati cellulari all'inizio di ogni indagine di tipizzazione cellulare.

Sulla base di questi principi tecnici e metodologici, si discute di seguito la strategia di gating adottata nel presente studio.

È stato utilizzato un pannello di citometria a flusso finalizzato a rilevare i 2 fenotipi di eosinofili (iEOS e rEOS), fulcro di questo studio di caratterizzazione dell'asma.

Il concetto di eosinofili infiammatori (iEOS) ed eosinofili residenti (rEOS), è stato proposto in anni recenti mediante una serie di studi (6,18,19) condotti su modelli murini sperimentali e sull'uomo, riscontrando in soggetti asmatici una percentuale di iEOS indipendente dal numero totale di eosinofili. L'indagine di distinti fenotipi di eosinofili implicati nella patologia asmatica, potrebbe fornire risultati interessanti e utili per una migliore gestione della malattia.

L'esistenza però di fenotipi degli eosinofili risale agli anni 80 con la suddivisione degli eosinofili in normodensi e ipodensi (5). Quest'ultimi sono presenti in una percentuale maggiore (18) nei pazienti con asma grave, e hanno una maggiore sopravvivenza e altre caratteristiche, tra cui: attività di adesione, metabolismo dell'ossigeno, citotossicità anticorpo-dipendente, produzione di superossido rispetto agli eosinofili residenti. Non è tuttora noto il livello di corrispondenza tra questi fenotipi di eosinofili basati sulla determinazione della densità cellulare e quelli più recenti basati sulla determinazione di marcatori cellulari mediante citofluorimetria.

Gli eosinofili restano nel torrente circolatorio (20) per breve tempo (in media 6-12 ore, fino ad un massimo di 18 ore) e la loro vitalità è bassa, ma non è noto se queste caratteristiche restano costanti nei due fenotipi (rEOS e iEOS).

Gli eosinofili residenti (rEOS) sono localizzati principalmente nei tessuti dell'intestino, tessuto adiposo, utero, timo, ghiandola mammaria e nei polmoni, ma espressi in modo differente. Diversamente dagli eosinofili residenti, gli eosinofili infiammatori si configurano come dei promettenti biomarcatori per monitorare lo stato di infiammazione dei tessuti polmonari e nasali e come potenziali indicatori dell'attività di malattia (19).

Uno dei punti salienti del dibattito sulla natura di iEOS e rEOS, è capire se i due fenotipi di eosinofili siano distinti e indipendenti oppure corrispondano a diversi stati di attivazione. Mesnil (6) e collaboratori hanno dimostrato inizialmente con un modello preclinico che gli eosinofili residenti sono fenotipicamente stabili e diversi dagli eosinofili infiammatori.

Invece, l'analisi condotta da Vultaggio e collaboratori su granulociti umani isolati da sangue periferico (18) introduce l'ipotesi che i due fenotipi rappresentino diversi stati di attivazione delle stesse cellule, e non come due fenotipi differenti e separati. Questa ipotesi è basata da un'osservazione in vitro a favore della trasformazione degli eosinofili residenti in eosinofili infiammatori, mediante l'aggiunta in vitro di IL-5 e altre citochine che hanno ridotto l'espressione di CD62L innescando la trasformazione degli eosinofili residenti in eosinofili infiammatori. Rimane aperta la domanda se questa plasticità dei fenotipi degli eosinofili sia presente anche in vivo nei pazienti, e sia modulabile dalla terapia.

Nella nostra analisi abbiamo utilizzato una strategia di gating accurata per la discriminazione dei due fenotipi. Abbiamo iniziato applicando un filtro alle singole cellule (singoletti) in modo tale da escludere possibili artefatti causati dall'aggregazione cellulare, propedeutica alla realizzazione di un dot plot PE-FITC-A con la localizzazione degli eventi acquisiti nel quadrante negativo (Q1-LL) confermando l'efficacia della procedura nell'escludere eventuali interferenze legate alle autofluorescenza.

Per l'identificazione delle popolazioni cellulari d'interesse sono stati analizzati i risultati del protocollo sperimentale ottenuto con lo stain 1, che ha consentito l'individuazione nel gate dei granulociti degli eosinofili, sfruttando la doppia marcatura Siglec-8+/CD16-, mentre la popolazione dei neutrofili è stata distinta per l'espressione del CD16+ in assenza di Siglec-8 -

L'analisi dell'integrità fenotipica e l'aspetto funzionale è stata realizzata con gli istogrammi di espressione, dove in ascissa viene riportata l'intensità media di fluorescenza mentre l'ordinata restituisce il numero di eventi cellulari che esprimono il recettore target. A questo punto dell'analisi abbiamo applicato un cut-off per il marcatore CD62L (molecola di adesione selectina implicata (9) nella migrazione delle cellule tra cui gli eosinofili) centrato attorno alla decade (10^4) che delimita le aree di interesse della quantificazione degli eventi cellulari acquisiti. Questo cut-off, seppure stabilito arbitrariamente, è stato posto in corrispondenza di un chiaro differenziamento del picco di espressione di CD62L, presente in maniera riproducibile su vari esperimenti analizzati sia nei soggetti asmatici che nei controlli sani.

La soglia di cut-off è stata importante per separare i due fenotipi cellulari: gli eosinofili residenti (rEOS), caratterizzati da un'elevata espressione di CD62L^{high} a differenza degli eosinofili infiammatori (iEOS), identificati da una bassa espressione, ma non da una completa assenza, di CD62L^{low} sulla superficie della membrana.

Infine è stata valutata l'espressione dei recettori CCR3 e IL-5R. Si sottolinea di seguito il significato funzionale di questi due recettori. Il CCR3 è un recettore per chemochine riconducibile all'attività chemiotattica ed espresso negli eosinofili attivati. Mentre il IL5R (recettore alfa per interleuchina-5) è indispensabile per la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione degli eosinofili.

I dati raccolti hanno dimostrato un'elevata positività per CCR3, con molto picchi omogenei centrati sulla decade 10^5 dell'istogramma, a differenza del IL-5R in cui si è osservata una scarsa espressione con picchi incentrati sulla decade 10^3 . In entrambi i casi non sono emerse divergenze significative nei livelli di espressione tra eosinofili totali, iEOS, rEOS sia per CCR3 e che per IL-5R.

L'integrazione di questi markers ha consentito il passaggio dalla conta cellulare quantitativa alla valutazione qualitativa e funzionale, in linea con le più recenti strategie di gating adottate in letteratura. In particolare, ci siamo confrontati con le analisi come quelle descritte nello studio di Matucci e collaboratori (9) che hanno identificato mediante la citofluorimetria a flusso, la presenza dei due fenotipi in una coorte che comprendeva soggetti sani, pazienti con rinite allergica, e pazienti con asma grave (SEA) e non grave (NSA). Lo studio ha inoltre dimostrato un incremento degli eosinofili infiammatori (iEOS) soprattutto nei pazienti con asma grave (SEA) che avevano anche una storia di poliposi nasale.

La tipizzazione fenotipica eseguita da Matucci e collaboratori (9), ha marcato gli iEOS con CD62L, in maniera simile alla nostra strategia. Gli autori hanno inoltre evidenziato un aumento di CCR3 e del marcatore di attivazione CD69, mentre ha mostrato un calo di espressione di IL-5R, CD28 e VLA-4, CRTH2 e di molecole di adesione come CD86, CD28 e VLA-4 negli eosinofili infiammatori rispetto agli eosinofili residenti (rEOS). Non sono state rilevate differenze nell'espressione di CD123 tra i due gruppi di asmatici e soggetti sani. In conclusione, lo studio di Matucci utilizza una gamma più vasta di marcatori rispetto al nostro studio ma conferma l'espressione di alcuni marcatori, tra cui il CD62L, CD45, CCR3 e l'IL-5R. Anche dal punto di vista delle percentuali i risultati sono abbastanza sovrapponibili ai nostri con valori medi di iEOS attorno al 8%, un range interquartile tra il 3 e il 15% con un picco massimo vicino al 30%.

Pertanto, i dati ottenuti hanno messo in rilievo la ripartizione fenotipica tra i gruppi, validando la differenza significativa, aprendo nuove strade per trattamenti personalizzati. Si possono confrontare i dati raccolti del presente studio anche con la ricerca (19) di Cabrera-Lopez, in modo tale da validare la coerenza biologica, nonostante le variazioni tra le popolazioni eosinofile.

La differenza della ripartizione fenotipica è differente: lo studio (19) rileva una percentuale di eosinofili infiammatori iEOS% negli asmatici molto elevata (25,59 %) con una deviazione standard del 26%, mentre nei nostri dati la media corrisponde a 8,19% nel gruppo di asmatici.

Va considerato che gli studi differiscono anche per quanto riguarda la conta assoluta degli eosinofili. Lo studio di Cabrera Lopez (19) riporta valori di 607 ± 429 cells/ μ l, mentre i nostri dati mostrano 510 ± 398 vs $114 \pm 75,6$ cells/ μ l e quelli di Matucci 400 ± 200 cells/ μ l. La conta assoluta più alta e l'ampia deviazione standard nello studio di Cabrera Lopez indicano che sono stati reclutati pazienti con una eosinofilia periferica molto marcata, a differenza dello studio nostro e di Matucci. Inoltre, il lavoro di Cabrera-Lopez ha reclutato soltanto 10 pazienti asmatici, mentre quello di Matucci (9) ne ha reclutati 15. Il nostro studio ha quindi una numerosità campionaria molto più elevata che rafforza il valore dei nostri risultati.

La scelta e la selezione del campione di questo studio ha avuto un aspetto determinante per il confronto tra controlli e asmatici. Il confronto tra il gruppo di pazienti asmatici (n=53) e il gruppo di controllo (n=17) ha permesso di indagare alcune delle caratteristiche infiammatorie e immunologiche raccolte dalle analisi.

Al fine di preservare la rappresentatività del campione di partenza è stata prestata attenzione alla selezione dei soggetti dello studio. Sono stati arruolati soggetti in età adulta con una diagnosi di asma definita dalle linee guida GINA e reclutati dagli ambulatori dell'U.O.C di Pneumologia di Padova. In parallelo sono stati reclutati i controlli su base volontaria tra i lavoratori afferenti al Dipartimento di Scienze Cardio Toraco Vascolari e Sanità Pubblica che ci hanno permesso di eseguire un confronto coerente intergruppo riducendo bias individuali e limitando variabili che avrebbero potuto condizionare i parametri immunologici.

Per quanto riguarda l'analisi delle caratteristiche cliniche ed antropometriche, dall'analisi dei dati emerge una lieve discrepanza in termini di età tra i due gruppi con il campione degli asmatici significativamente più anziano e meno omogeneo rispetto ai controlli ($p=0,016$).

Per caratterizzare meglio la casistica abbiamo realizzato un grafico Q-Q per evidenziare l'oscillazione dei dati attorno alla retta ideale. In quest'analisi abbiamo dimostrato che la distribuzione di età non erano diverse, ma c'era un gap dovuto ad una minor numerosità nel gruppo dei controlli. Inoltre, l'applicazione delle correlazioni di Spearman ha dimostrato l'assenza di una relazione statisticamente significativa tra la percentuale di eosinofili infiammatori iEOS% e l'età dei soggetti. In definitiva, si può affermare che l'età non rappresenta un bias, nonostante la discrepanza anagrafica intergruppo, perché non condiziona il parametro preso in considerazione.

Dai dati raccolti è emersa una prevalenza femminile in modo predominante sia nel gruppo di controlli (70,8%) che in quello degli asmatici (58,5%), ma senza presentare una differenza statisticamente significativa. Anche in questo caso, come con l'età, le nostre analisi hanno dimostrato che il genere non condiziona la percentuale degli iEOS nel nostro studio.

Allo stesso modo, il confronto del BMI con Mann Whitney non ha mostrato differenze rilevanti, nonostante la variabilità intragruppo del gruppo dei soggetti asmatici, e con una tendenza al sovrappeso rispetto all'omogeneità incentrata sulla soglia normopeso riscontrata nel gruppo di controllo. È stata presa in considerazione anche l'abitudine tabagica quasi assente nel gruppo di asmatici (fumatori ed ex-fumatori).

Abbiamo quindi condotto un'analisi delle caratteristiche cliniche e funzionali della nostra coorte. Il gruppo di asmatici presenta uno spiccato profilo infiammatorio a carico delle vie aeree, verificato con valori mediani di FeNO pari a 64 ppb con picchi di 300 ppb. Dal punto di vista del fenotipo allergico, 33 su 53 soggetti asmatici erano allergici (61%), con valori mediani di IgE totali pari a 175 e picchi fino a 2010 KUA/L.

Nella nostra coorte abbiamo documentato una riduzione significativa del FEV1/FVC e del MEF50 nei soggetti asmatici rispetto ai controlli, dimostrando l'insorgenza dell'ostruzione delle vie aeree che interessa soprattutto le piccole vie.

Sono state di seguito approfondite le correlazioni tra la percentuale di eosinofili infiammatori e i parametri clinico funzionali, che mostrano come questa popolazione cellulare rappresenti un biomarcatore indipendente, slegato da variabili antropometriche.

È stata riscontrata una debole correlazione positiva con la conta degli eosinofili totali, ma il basso coefficiente di correlazione ($\rho = 0,40$; $p < 0,001$,) dimostra la segregazione fenotipica degli iEOS, distinguendoli dal semplice dato globale della conta degli eosinofili totali.

Inoltre, nel nostro studio non abbiamo osservato correlazioni significative tra iEOS% e le IgE o il FeNO. L'indipendenza della percentuale degli eosinofili infiammatori dai valori di FeNO e IgE raccolti, apre le strade a vie di attivazione e reclutamento diverse dalla cascata allergica o ai processi di produzione di ossido nitrico a livello bronchiale.

Infine, dal nostro studio emergono correlazioni statisticamente significative e negative tra iEOS% e il rapporto FEV1/FVC ($\rho = -0,26$) e con il MEF50 ($\rho = -0,30$). Queste correlazioni stabiliscono un legame per cui all'aumentare del grado di ostruzione delle vie aeree aumentano gli iEOS. In linea con quanto riportato in letteratura (18) in cui l'aumento dei marcatori infiammatori correla con parametri ricavati dalla spirometria, i nostri dati confermano che l'incremento di iEOS è inversamente proporzionale alla funzionalità respiratoria in quanto associata assieme ad altri fattori alla sua compromissione.

Tuttavia, bisogna sottolineare che anche in questo caso si tratta di correlazioni molto deboli (valori di $\rho < 0,4$). Lo studio sta proseguendo caratterizzando meglio i parametri funzionali con tecniche più innovative (Tecniche delle oscillazioni forzate-Oscillometria) . Il fenotipo di iEOS potrebbe fornire una chiave di lettura dell'ostruzione delle vie respiratorie la cui gravità non emerge dai soli parametri infiammatori, orientando verso una fenotipizzazione di precisione.

CONCLUSIONI

Lo studio ha mostrato una concordanza con dati già presenti in letteratura con discrepanze legate anche allo scopo dello studio e campione, in quanto questo studio si pone l'obiettivo di inquadrare l'asma e di studiare le correlazioni che possono legare gli eosinofili infiammatori espressi in percentuale ad altre variabili nel gruppo di controllo confrontato con il gruppo di asmatici.

Il "take home message" finale corrisponde alla conferma dello shift fenotipico dei due fenotipi di eosinofili, infiammatori e residenti che sono stati marcati con anticorpi specifici e identificati con appropriate strategie di gating. I risultati raccolti hanno dimostrato che l'asma come patologia diversificata, non si limita soltanto all'aumento degli eosinofili totali, ma ne altera la composizione, validando una variabilità fenotipica.

Limiti dello studio

L' utilizzo e la ricerca di biomarcatori per la diagnosi e l'inquadramento clinico dell'asma sono una challenge definita la complessità della patologia e la sua natura episodica.

Il seguente studio anche se condotto con rigore sul lato metodologico e tecnico, presenta dei limiti che vanno sottolineati:

- 1. la dimensione campionaria:** il confronto tra 53 soggetti asmatici e 17 controlli sani, nonostante offra una buona numerosità, risente di una dimensione inferiore soprattutto nel gruppo di controllo.
- 2. l'asimmetria anagrafica,** è stata confermata l'assenza di correlazione con i livelli di iEOS.
- 2. la variabilità analitica e manualità :** come ripreso dalla letteratura (Rees et al.2022), la citofluorimetria a flusso risente di limiti strutturali dovuti alla mancata robotizzazione dell'intero processo di analisi e raccolta di dati. Le fasi di marcatura, centrifugazione e lavaggio assieme alla scelta arbitraria della soglia di cut-off per il CD62L, costituiscono fonti di bias che sono operatore-dipendente.
- 3. la tipologia dello studio:** lo studio condotto è trasversale in quanto ha permesso di scattare delle fotografie ai pannelli in modo da ricostruire la condizione immunologica momentanea dei soggetti in un singolo istante. Se da un lato catturiamo una lettura della situazione degli eosinofili dall'altra parte la tipizzazione dei due fenotipi di eosinofili richiede un monitoraggio continuo a livello longitudinale. Poiché l'asma è una malattia variabile ed

eterogenea con sintomi che mutano nel tempo, che necessitano di un'indagine accurata per la selezione del percorso terapeutico.



Fig.28 Illustra i limiti dello studio

Oltre ai limiti, occorre anche elencare alcune prospettive future che si possono estrapolare dai risultati ottenuti.

1.la messa a punto degli eosinofili infiammatori come biomarcatori di ostruzione

Nei dati raccolti è emersa una correlazione negativa tra iEOS% e il rapporto FEV1/FVC e con il MEF50 che induce a valorizzare questo fenotipo come indicatore critico della compromissione delle vie aeree, che si manifestano con i sintomi tipici dell'asma. In una prospettiva di fenotipizzazione di precisione, lo studio sta proseguendo raccogliendo i parametri funzionali misurati con tecniche più innovative (Tecniche delle oscillazioni forzate-Oscillometria).

2.1'indagine con metodologie genetico-molecolari

Il seguente studio pone le basi per l'approfondimento specifico di un'analisi funzionale e molecolare sulle popolazioni di eosinofili. Si potrebbe indagare e ricostruire il profilo dell'espressione di geni degli eosinofili infiammatori e i meccanismi intrinseci del CD62L o di altri recettori.

In conclusione, nonostante i limiti, lo studio supporta e valida la fenotipizzazione degli eosinofili e l'impatto dell'espansione della percentuale di eosinofili infiammatori, aprendo nuove strade per trattamenti specifici per una medicina sempre più personalizzata.

BIBLIOGRAFIA

1. Oliaro A. e Loizzi M. 2021. Asma bronchiale. In: *Malattie dell'apparato respiratorio Pneumologia e chirurgia toracica* (Oliaro A. e Loizzi M.). Seconda edizione. Torino: Minerva medica, 249-261.
2. Goyal G et al. A Review on Asthma and Allergy: Current Understanding on Molecular Perspectives. *Journal of clinical Medicine*. 2024;13:5775.
3. Grace T. Mckee. 1997. The respiratory system and Mediastinum. In: *Cytopathology*. Prima edizione. Londra: Mosby Wolfe, 238-240.
4. Madhusree et al. Blood Physiology: Composition and Functions. Scientific Collection. 2025;251:144-150.
5. Rossi R et al. 1999. Introduzione, Morfologia e ultrastruttura, Differenziazione e maturazione degli eosinofili. In: *Eosinofili* (Rossi R e Monasterolo G.) .133. Genova: Medical system S.p.a Renato E. e Monasterolo G. *Eosinofili*. Genova: Medical system S.p.a, 5-10
6. Meslin C et al. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J Clin Invest*. 2016;126:3279-95.
- 7 Akira K. et al. The multiple functions and subpopulation of eosinophils in tissues under steady-state and pathological conditions. *Allergology International*. 2021;70:9-18.
8. Hassani M et al. Characterization of the phenotype of human eosinophils and their progenitors in the bone marrow of healthy individuals. *Haematologica*. 2020;105:52-56
9. Matucci A et al. High proportion of inflammatory CD62L^{low} eosinophils in blood and nasal polyps of severe asthma patients. *Clin Exp Allergy*. 2023;53:78-87.
10. Cossarizza A et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *European Journal of Immunology*. 2019; 49:1457-1973.
11. Pelaia G. e Pelaia C. 2021. Fisiopatologia cellulare dell'asma di tipo 2: caratterizzazione endotipica del fenotipo infiammatorio eosinofilo. In: *L'infiammazione di tipo 2 nelle patologie respiratorie* (Batani V. et al). (Supplemento a *On Medicine*) Seconda edizione. Milano: Sintesi InfoMedica, 3-5.

12. Matucci A. et al. 2021. Le citochine di tipo 2 e il rimodellamento nell'asma grave. In:*L'infiammazione di tipo 2 nelle patologie respiratorie* (Batani V. et al). (Supplemento a On Medicine) Seconda edizione.Milano:Sintesi InfoMedica, 8-10.
- 13.Sukhmani B et al. Interpretation of Spirometry, Peak Flow, and Provocation Testing for Asthma, *Otolaryngologic Clinics of North America*. 2024; 57:201-213.
- 14.Benati M et al. Impatto preanalitico del riempimento incompleto del tubo sanguigno K₂EDTA nei test di biologia molecolare. *Diagnostica*.2024;14:1934.
15. Yi-Chu W et al. A comprehensive multiparameter flow cytometry panel for immune profiling and functional studies of frozen tissue, bone marrow, and spleen,*Journal of Immunological Methods*.2023;515:113444.
16. Rees P et al.Imaging flow cytometry. *Nature reviews methods primers*. 2022;2:86.
17. Nolan JP et al.The evolution of spectral flow cytometry. *Cytometry*. 2022;101 :812–817.
18. Vultaggio A. et al. Gli eosinofili infiammatori CD62Llow nel sangue sono correlati alla gravità dell'asma e ridotti dal mepolizumab. *Allergy*. 2023;78:3154-3165.
- 19.Cabrera López et al.Eosinophil Subtypes in Adults with Asthma and Adults with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2023;208 (2):155-162.
20. Januskevicius A et al. Blood Eosinophils Subtypes and Their Survivability in Asthma Patients. *Cells*. 2020;9:1248.

Nell'introduzione ho utilizzato Gemini come strumento AI per definire un filo logico, a partire dal quale ho approfondito i vari argomenti con la consultazione di libri e articoli scientifici. I temi di citofluorimetria ed emopoiesi li ho approfonditi mediante seminari del corso di Metodologie e analisi biochimico cliniche (500742).

RINGRAZIAMENTI

Inizio ringraziando chi mi spronato a concludere questo percorso quando, dentro di me, pensavo di mollare tutto.

Ringrazio **Mia madre**, il mio punto di riferimento, che mi ha sempre lasciata libera di scegliere cosa fare e cosa studiare; tale spazio di libertà mi ha permesso di essere felice. Si preoccupava per me “di nascosto” quando mi allontanavo e mi regalava costantemente pillole di motivazione e di amore. Mi ha insegnato con il suo affetto che i dettagli e il passato possono essere la mia forza, e che non importa ciò che pensa la gente: lei per me ci sarà sempre.

Mio padre mi ha dato il coraggio di cui avevo bisogno attraverso la sua personalità spensierata. Ha tracciato l'inizio del mio percorso e mi ha sostenuta nei momenti di crollo. Amante della scienza, mi ripete spesso di impegnarmi a dare il massimo, perché la realtà è difficile e va indagata oltre i libri. Spero di ripagare gli sforzi che hanno fatto entrambi per me: le sveglie presto per sostenere il peso di un nido intrecciato con amore e sacrifici. **Zineb**, la “prima felicità” della famiglia, leader e comica che rallegra le nostre giornate. Vede in me ciò che vedo in lei: la voglia di raggiungere l'emancipazione e l'indipendenza. Disposta a dare il mondo a chi la circonda. **Kawtar**, la “seconda felicità” della famiglia, delicata e sensibile ai piccoli gesti. La sua dolcezza la porta a prendersi cura di me e di chiunque ami, sempre pronta ad aprire il cuore a chi ne ha bisogno. Ci hai regalato una gioia di nome **Ines**, un piccolo fiore delicato. Sarai una madre fantastica e una brava educatrice.

Maya, l'ultima felicità della famiglia: la tua bellezza, esteriore e interiore, illumina le mie giornate stressanti. La tua vena artistica mi ha fatto capire che con l'arte si comunica e con la fermezza si risolvono i problemi.

Ringrazio i pochi amici stretti che mi ripetevano di non mollare:

Hiba, la mia amica d'infanzia, mi hai aiutato a trovare la mia forza interiore. Custodisco ancora i primi biglietti e regali che mi facevi da piccola. Sei stata la mia prima amica, sono felice di averti conosciuta e ti auguro un felice matrimonio.

Sara, amante della genetica e della cultura: mi hai insegnato a indagare la natura per trovarne le spiegazioni e a creare un dialogo costante con la scienza e i segreti che nasconde.

Beatrice, amante dei fiori, hai saputo tirare fuori la mia creatività, dandomi il coraggio di esprimerla senza vergogna. Mi hai mostrato il potere del viaggio e della immaginazione.

Jasmine, con i tuoi hobby mi hai insegnato a dare priorità alla mia salute mentale e ad ascoltare il mio corpo quando si ribella.

Greta, i tuoi messaggi sono stati una carica di energia nei momenti di stanchezza, ricordandomi sempre l'importanza di studiare e imparare. Spero tu possa trovare la tua serenità e spensieratezza.

Arianna, piena di energia e voglia di viaggiare. Sono felice di averti conosciuta, della nostra amicizia e dei consigli che mi dai.

Gaia, grazie infinitamente del tuo aiuto. Sono riuscita a sostenere molti esami restando serena, mi hai offerto un appoggio e una mano per realizzare il mio sogno.

Un ringraziamento va alla mia **Relatrice**, che mi ha dato coraggio di concludere il percorso e di puntare in alto in un mondo competitivo. Alla **Prof.ssa Simonetta Baraldo**, che con infinita pazienza mi ha guidata ed appoggiata nella stesura di questa tesi e alla Prof.ssa **Bazzan Erica**, che mi ha insegnato alcuni trucchi del mestiere.

Per concludere ringrazio i **miei alunni**. Con i vostri scherzi, i bigliettini nascosti, i cartelloni, le risate ma anche con i vostri pianti, le insicurezze e racconti di vita, mi avete fatto capire quanto sia fondamentale insegnare la scienza per abbattere l'ignoranza e quanto sia essenziale ricordarsi di sorridere.

E infine, ringrazio me stessa: la me babysitter, la me mediatrice culturale, la me assistente d'erbaio, la me operaia, la me consulente in farmacia, la me viaggiatrice, la me insegnante e la me forse futura biologa. Ogni pezzo di questo mosaico è ciò che mi dà la forza di continuare.

GRAZIE A TUTTI.