

# *E.P.D. secondo McEwen: studio clinico, istologico ed immunoistochimico*

C. DI STANISLAO, G. MAZZOCCHETTI,  
G. BOLOGNA, S. CHIMENTI

*Università degli studi dell'Aquila  
Clinica dermatologica  
Direttore: prof. Sergio Chimenti*

The authors have performed a double blind clinic trial using EPD (enzyme potentiated desensitization) on 54 pollinosis patients divided into three omogeneous groups. Ematological, histological, and immunochemical examinations have been performed to evaluate the mechanism of action of this specific hiposensitizing therapy. Even if our first results are interesting, further studies are needed to confirm the efficacy of the use of EPD on pollinosis patients.

Key words: EPD (enzyme potentiated desensitization), PAP (perossidase anti perossidase).

EPD secondo McEwen: studio clinico, istologico ed immunoistochimico

*Riassunto:* Gli AA riportano la loro esperienza, effettuata in uno studio condotto in doppio cieco, circa l'efficacia clinica della metodica EPD (enzyme potentiated desensitization), su 54 pazienti pollinosici suddivisi in tre gruppi omogenei. La ricerca è stata corredata da valutazioni ematochimiche, istologiche ed immunoistochimiche allo scopo di meglio interpretare il meccanismo d'azione di questo tipo di terapia iposensibilizzante specifica. I risultati preliminari vengono definiti interessanti e probativi anche se necessitano di ulteriori conferme e di casistiche più ampie per trarre considerazioni di tipo conclusivo.

*Parole chiave:* EPD (enzyme potentiated desensitization), PAP (perossidasi-immunoperossidasi).

## Introduzione

La immunoterapia specifica (ITS) viene generalmente considerata come l'unica razionale terapia della patologia allergica con disturbi respiratori (1). Tuttavia la ITS classica eseguita per via sottocutanea incontra non poche resistenze da parte di medici e pazienti (2). Per tale motivo sono stati allestiti preparati iposensibilizzanti o modificati (allergoidi) più rapidi e maneggevoli, oppure introdotte vie alternative come quella orale, quella sub linguale e quella endonasale, che paiono altrettanto attive e meglio accettate di quella ipodermica (2). Un trattamento particolare, sia per modalità di somministrazione che per durata degli effetti, è quello EPD (enzyme potentiated desensitization) messo a punto da Leonard McEwen (3). Tale metodica consiste nell'introdurre in sede intradermica una piccolissima quantità di miscela allergenica associata ad una minima dose di betaglicuronidasi. Secondo l'ipotesi di tale autore l'enzima è in grado di potenziare la desensibilizzazione dei pazienti allergici, attraverso una particolare attivazione delle cellule di Langerhans ed una presentazione spaziale allergenica tale da indurre una

risposta di tipo T-suppressor specifica per gli allergeni. Dopo la prima osservazione, una serie di studi clinici hanno dimostrato l'efficacia versus placebo della metodica EPD, anche se il meccanismo d'azione non è ancora del tutto chiarito (5-10) (Fig. 1).

### Scopo della ricerca

Il nostro studio in doppio cieco e con reclutamento dei pazienti randomizzato si è prefisso un duplice scopo: 1) valutare l'efficacia clinica della metodica EPD versus placebo e nei confronti della ITS sottocutanea classica; 2) analizzare le modificazioni indotte da tale metodica sui sistemi di immunomodulazione ematica e cutanea. I parametri clinici sono stati prescelti fra quelli impiegati in precedenti ricerche (5-10) in doppio cieco, in modo da avere confronti diretti e dati più omogenei per eventuali metanalisi finali. Le indagini istologiche ed immunoistochimiche hanno riguardato un gruppo rappresentativo di pazienti

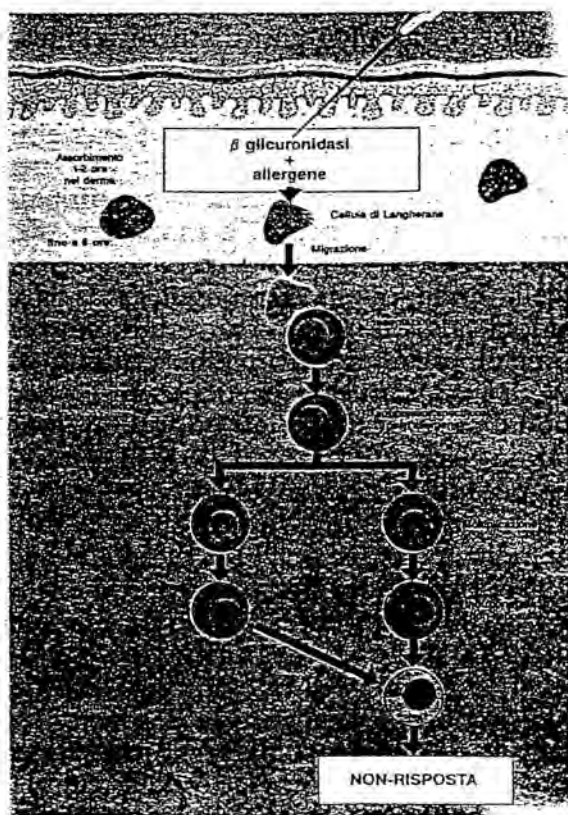


Fig. 1

(dodici nei tre gruppi). Tutti i frammenti bioptici sono stati sottoposti a colorazioni con ematossilina-eosina allo scopo di mettere in evidenza infiltrati di cellule infiammatorie reattive. Le indagini immunoistochimiche, inoltre, sono state eseguite con la tecnica della perossidasi-antiperossidasi in tre passaggi, utilizzando un ampio pannello di anticorpi monoclonali (Fig. 10); in particolare sono stati valutati i linfociti totali, i linfociti B e T, le cellule di Langerhans e le cellule dendritiche dermiche (11-16).

### Materiale e metodi

Sono stati inclusi nello studio 54 pazienti pollinosici con polisensibilizzazione verso Graminacee ed Urticacee. Sono stati invece esclusi pazienti con dermatite atopica in atto o con anamnesi positiva per «eczema costituzionale». Il campione era composto da 31 donne (57.4%) e 23 uomini (46.6%), di età compresa fra i 16 ed i 47 anni (media 31). Tutti i pazienti presentavano oculorinite ad accentuazione stagionale; inoltre 18 (33.3%) crisi di asma bronchiale. La diagnosi allergologica è stata eseguita con test in vivo (Antigeni titolati in unità Noon) ed in vitro (Rast-Ria della ditta Pharmacia-Alk). Le positività sono state valutate fra le classi 2 e 4 degli standard proposti dalla S.I.A.I.C. (2). Tutti i pazienti sono stati informati degli scopi e delle finalità della ricerca e suddivisi «at random» in tre gruppi omogenei di 18 individui ciascuno. I soggetti con rinite ed asma bronchiale sono stati regolarmente suddivisi fra i 3 gruppi.

Il Gruppo A ha ricevuto EPD attivo ed ITS sottocute placebo; il Gruppo B EPD ed ITS sottocute placebo; il Gruppo C EPD placebo ed ITS sottocute attiva. Come EPD attivo è stata somministrata una miscela estemporanea composta da 0,01 ml (pari a 40 unità Fishman) di beta glicuronidasi e 0,04 ml di soluzione allergenica (corrispondente a 0,02 B.U. di ogni singolo allergene). Gli estratti iposensibilizzanti specifici sottocutanei SARM (titolati in U.B.) contenevano concentrazioni equivalenti di Gramina-

cee mix, *Parietaria judaica* e *Parietaria off.* L'EPD placebo era composto da una miscela estemporanea di 0,05 ml, prelevata da due distinti flaconi contenenti soluzione di cloruro di sodio tamponato. Gli estratti sottocutanei di tipo placebo erano contenuti in tre boccette identiche a quelle dei preparati attivi e composti dal solo diluente. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a scrupoloso «wash-out» farmacologico di durata non inferiore alle 4 settimane. La somministrazione di EPD è stata effettuata una sola volta a livello della regione antecubitale anteriore, in sede intradermica, in un periodo compreso fra il 30/3/1994 ed il 6/4/1994. A ciascun paziente è stato fornito un diario giornaliero per la registrazione delle manifestazioni sintomatologiche tramite punteggio quantitativo a quattro livelli (Fig. 2). Nello stesso diario è stato registrato il consumo di farmaci sia topici che di tipo generale. È stato anche richiesto di segnalare effetti collaterali locali e/o sistemici di tipo ritardato (dopo ogni inoculazione il paziente era tenuto in osservazione per 30 minuti in media). Per tutto il periodo dello studio si è monitorato l'andamento pollinico settimanale mediante «pollen-trap» VPPS 2000 della Ditta Lanzoni. Lo studio è stato suddiviso in sei periodi di 20 giorni ciascuno. Per quanto concerne le valutazioni ematochimiche tutti i pazienti sono stati sottoposti a ricerca radioimmunologica sull'IgE totali e specifiche prima dell'inizio dello studio e sei settimane dopo la somministrazione di EPD (durante periodi di forte polluzione pollinica). Parimenti sono state valutate le sottopopolazioni linfocitarie. Gli esami istologici ed immunoistochimici sono stati eseguiti in 12 pazienti (4 per ciascun gruppo) mediante prelievi biotici (su punch da 4 mm) prelevati dalla regione antecubitale, effettuati prima e dopo 6 settimane dalla inoculazione di EPD.

### Risultati

I risultati relativi all'efficacia clinica (Fig. 3 e 4) mettono in chiara evidenza

### Valutazione quantitativa a quattro livelli

Legenda:

- 0 = Sintomo assente
- 1 = Sintomo lieve
- 2 = Sintomo medio
- 3 = Sintomo grave

Fig. 2

le differenze fra EPD e placebo, soprattutto in fase di forte concentrazione pollinica. Anche l'impiego di farmaci topici e generali appare chiaramente diversificato (Fig. 5 e 6). Non vi sono dati circa un maggior successo terapeutico della metodica in esame (almeno in fase precoce) rispetto alla ITS sottocutanea classica; tuttavia il punteggio degli scores clinici in rapporto ai livelli di pollinazione (Fig. 7) sembra dimostrare una efficacia lievemente superiore della metodica EPD. Va inoltre aggiunto che, rispetto ad altri studi (8,9,10) abbiamo registrato un numero maggiore di

### SINTOMO OCULORINITE

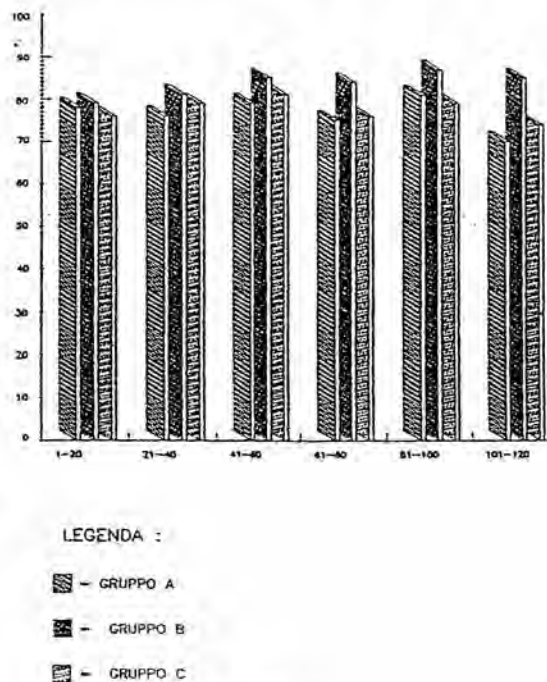
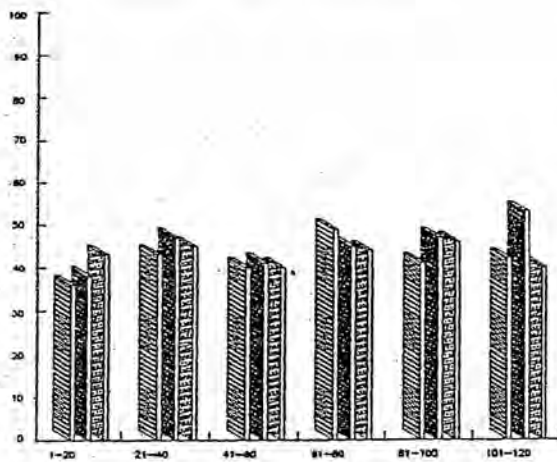


Fig. 3



SINTOMO ASMA BRONCHIALE

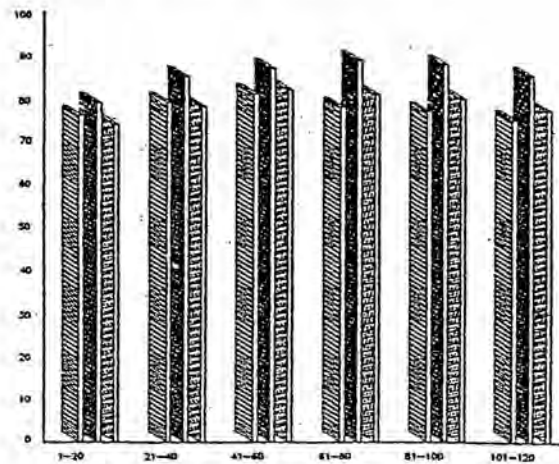


LEGENDA :

- GRUPPO A
- GRUPPO B
- GRUPPO C

Fig. 4

IMPIEGO FARMACI TOPICI

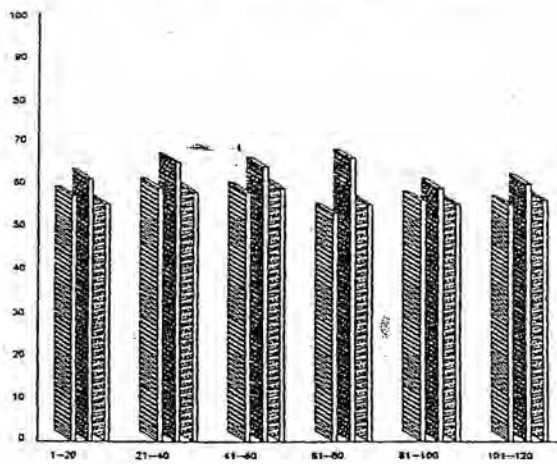


LEGENDA :

- GRUPPO A
- GRUPPO B
- GRUPPO C

Fig. 5

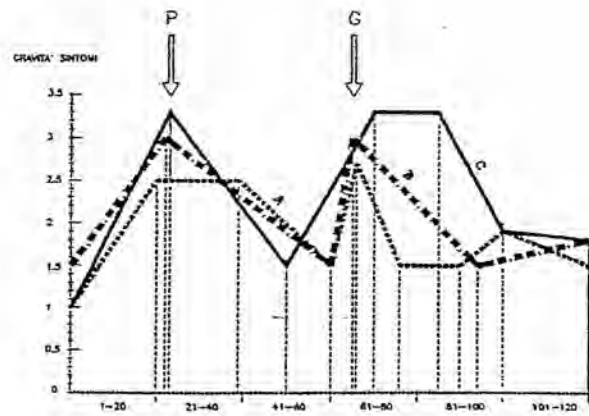
IMPIEGO FARMACI SISTEMICI



LEGENDA :

- GRUPPO A
- GRUPPO B
- GRUPPO C

Fig. 6



LEGENDA :

- PICCO PARIETARIA
- PICCO GRAMINACEE
- GRUPPO A
- GRUPPO B
- GRUPPO C

Fig. 7

pazienti sintomatici nei tre gruppi, probabilmente a causa dell'elevato livello di inquinazione pollinica nel periodo di osservazione, verosimilmente collegato ad un microclima inconsuetamente caldo e secco. Per quanto concerne i dati ematochimici confermiamo i risultati di altri gruppi (10). Nel Gruppo trattato con EPD attivo e ITS sottocute placebo non abbiamo registrato un incremento della quota reaginica, valutata con metodica radioimmunologica Pharmacia CAP-System, in un periodo di intenso stimolo allergenico (Fig. 8). Per quanto riguarda le sottopopolazioni linfocitarie (Ortho Cytofluorograf IIs ed anticorpi monoclonali specifici BD) sono state evidenziate alcune differenze significative (Fig. 9) riguardanti i linfociti T-suppressori. Pertanto è possibile ipotizzare una buona azione induttiva della metodica EPD sulla popolazione CD8<sup>+</sup>, come ipotizzato da McEwen ed evidenziato da altri studi (10). Non abbiamo verificato effetti collaterali di tipo sistemico e solo due pazienti sottoposti a ITS sottocute attiva hanno avuto reazioni pomfoidi locali della durata di circa 6-8 ore. Nessuno dei pazienti sottoposti ad EPD attivo (Gruppo A) ha lamentato disturbi locali intensi (eritema, pomfi, prurito intenso e persistente, ecc.) o sistemici (cefalea, recrudescenza rinitica o asmatica). Per quanto concerne i risultati istologici ed immunocistochimici (Fig. 10) il gruppo trattato con EPD attivo ha evidenziato una più spiccata reazione infiammatoria di tipo prevalentemente linfo-monocitario e, in alcuni casi, una attivazione delle cellule dendritiche dermiche coinvolte nella risposta

#### Livello I.G.E.

<i>Gruppo A</i>	
Inizio:	198,2
Dopo 6 settimane:	195,6
<i>Gruppo B</i>	
Inizio:	191,4
Dopo 6 settimane:	201,5
<i>Gruppo C</i>	
Inizio:	184,3
Dopo 6 settimane:	187,5

Fig. 8

#### Linfociti CD<sub>8</sub>

<i>Gruppo A</i>	
Inizio:	29,8%
Dopo 6 settimane:	31,1%
<i>Gruppo B</i>	
Inizio:	26%
Dopo 6 settimane:	25,4%
<i>Gruppo C</i>	
Inizio:	28,5%
Dopo 6 settimane:	29,3%

Fig. 9

T-soppressiva. Questi dati sembrano confermare quelli di McEwen sul meccanismo d'azione dell'EPD (Fig. 11-12).

#### Conclusioni

I risultati ottenuti consentono di affermare che la metodica EPD secondo McEwen induce una buona risposta sintomatologica in pazienti pollinosici, riducendo «scores» e durata dei sintomi clinici respiratori e, di conseguenza, l'impiego di farmaci in corso di pollinazione. Tale metodica è in grado di determinare modificazioni immunitarie cellulari ed umorali che si attivano in un lasso di tempo di 6-8 settimane. I risultati immunocistochimici sembrano confermare l'ipotesi di McEwen di un meccanismo d'azione potenziato e differenziato rispetto alla ITS classica. Tali dati tuttavia vanno considerati come preliminari, poiché limitati nel numero e nella dura-

	EE	L26	CD3	S-100	MAC387	UCHL1	FVIII	LCA	MT1
CASO N°1 GRUPPO A	+	-	-	+	-	+	-	-	-
CASO N°2 GRUPPO A	+	-	-	+	-	-	-	-	-
CASO N°3 GRUPPO C	+	-	-	-	-	+	-	-	-
CASO N°4 GRUPPO C	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CASO N°5 GRUPPO B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CASO N°6 GRUPPO B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CASO N°7 GRUPPO A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CASO N°8 GRUPPO A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CASO N°9 GRUPPO C	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CASO N°10 GRUPPO B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CASO N°11 GRUPPO C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CASO N°12 GRUPPO B	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Fig. 10

ta dell'osservazione. Va comunque aggiunto che la mono-somministrazione e l'assenza di effetti collaterali rende tale metodica conveniente sotto il profilo economico e valida per la «compliance» del paziente.

Sarebbe auspicabile uno studio più ampio (durata di 12/24 mesi) che coin-

volga anche portatori di allergopatia aperiodica, con ipersensibilità verso gli acari o altri allergeni di tipo perenne e che consenta una valutazione anche delle diverse interleuchine responsabili dei sistemi di sopra e sottoregolazione immunitaria.

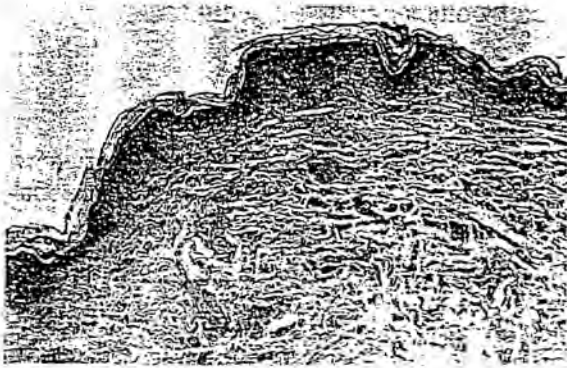


Fig. 11

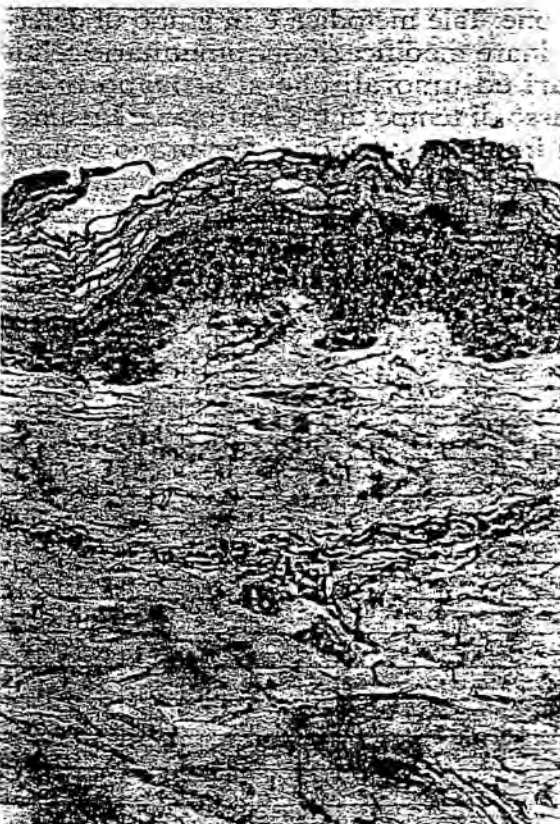


Fig. 12

## Bibliografia

1. Memorandum della Società Italiana di Allergologia ed Immunologia Clinica sulla Immunoterapia Specifica, Fed. Med. 1987; 40:697.
2. Errigo E.: Il Memorandum della S.I.A.I.C. sulla Immunoterapia Specifica, due anni dopo. Atti del XIX Congr. S.I.A.I.C. (Bari, 12-16 dic. 1989), Ed. O.I.C. Med. Press., 1989; 120.
3. McEwen L.M. and Starr M.S.: Enzyme potentiated hyposensitization. I. The effect of pre-treatment with beta-glucuronidase, hyaluronidase and antigen on anaphylactic sensitivity on guinea pigs, rats and mice. *Int. Arch. Allerg.*, 1972; 42:152.
4. McEwen L.M., Nicholson M., Kitchen I, and Sheila W.: Enzyme potentiated hyposensitization. III. Control by sugars and diols of immunological effect of beta-glucuronidase in mice and patients with hay fever. *Ann. Allerg.*, 1973; 31:543.
5. Fell P., Brostoff J.: A single dose desensitization for summer hay fever: result of double blind study, *Eur. J. Pharmacol.*, 1990; 38:77.
6. Longo G., Poli F., Bertoli G.: Efficacia clinica di un nuovo trattamento iposensibilizzante, EPD (Enzyme Potentiated Desensitization) nella terapia delle pollinosi. *Riforma Med.*, 1992; 107:171.
7. Ragno V., Monteleone M.A., Lucenti P., Cantani A., Businco L.: Effectiveness of enzyme-potentiated desensitization (EPD) in asthmatic children with sensitization to *Dermatophagoides pteronyssinus*. A double blinded study, in corso di pubblicazione.
8. Businco L., Ziruolo G., Arcese G.: Aspetti pediatrici dell'Immunoterapia specifica (in corso di pubblicazione).
9. Vena G.A., Curatoli G., D'Argento V., Angelini G.: una nuova Metodica di Immunoterapia.
10. Astarita C., Scala G., Sporniero S., Franzese A.: Efficacia dell'EPD (Enzyme Potentiated Desensitization) nel trattamento della pollinosi, in corso di pubblicazione.
11. Schudler G., Fitsch P.: Sensibilizzazione di cellule T-helper aptene-specifiche da parte delle cellule di Langerhans. *Eczema*, Ed. Martin Dunitz, 1993.
12. Hauser C.: Cultured epidermal Langerhans cells activated effector T cell contact sensitivity, *J. Invest. Dermatol.*, 1990; 95:436.
13. Purè E., Inabita K., Crowley M.T. et al.: Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlated with level biosynthesis of MHC class II molecules and expression of invariant chain, *J. Exp. Med.*, 1990; 172:1459.
14. Duijvenstein A., Harman A.: Mechanisms and regulation of lymphocyte migration, *Immunol. Today*, 1989; 10:23.
15. Schwartz R.H.: A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy, *Science*, 1990; 248:1349.
16. De Panfilis G.: Attività immunologica della Cute. XXX Congresso Nazionale A.D.O.I., Atti, Ed. A.D.O.I., 1991, pag. 8.