



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

“Amedeo Avogadro”

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica - DISIT

*Corso di Laurea Magistrale in Biologia
curriculum Biomedico e Biomolecolare*

Tesi di Laurea

**NAMPT e Autoanticorpi: una possibile associazione per la diagnostica
autoimmune?**

Candidata: Trapani Elisa

Trapani Elisa

Relatrice: Prof.ssa Audrito Valentina

Correlatrice: Dr.ssa Sacchi Maria Cristina

Anno Accademico: 2025/2026

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1. Nicotinammide Adenina Dinucleotide NAD	4
1.1.1. Via di sintesi del NAD	6
1.2. NAMPT	7
1.2.1. eNAMPT	11
1.2.2. Secrezione di eNAMPT	13
1.3. Il ruolo di NAMPT nell' infiammazione	14
1.4. Malattie autoimmuni	16
1.4.1. Tolleranza immunitaria	17
1.4.2. Classificazione	19
1.4.3. Patogenesi	22
1.5. Autoanticorpi	24
1.5.1. Autoanticorpi antinucleo ANA	30
1.6. PCR	36
2. SCOPO DELLA TESI	40
3. MATERIALI E METODI	41
3.1. Popolazione in studio	41
3.2. Saggio ELISA	44
3.3. Immunofluorescenza indiretta IFI (UNIQO)	49
3.4. Atellica Analyzer	52
3.5. Analisi statistica	56
4. RISULTATI	57
4.1. Classificazione per fasce di età della coorte ANA+/-	57
4.2. Classificazione per genere della coorte ANA+/-	58
4.4. Analisi dei livelli di PCR nella coorte ANA+/-	60
4.5. Correlazioni PCR con eNAMPT	61
5. DISCUSSIONE	63
6. CONCLUSIONE	69
7. BIBLIOGRAFIA	71

1. INTRODUZIONE

La nicotinamide fosforibosiltransferasi (NAMPT) è un enzima chiave che possiede due forme, una intracellulare (iNAMPT) e una extracellulare (eNAMPT). La sua forma intracellulare è nota per il ruolo fondamentale che svolge a livello del metabolismo energetico cellulare, in quanto rappresenta l'enzima limitante nella via di biosintesi della nicotinammide adenina dinucleotide (NAD). eNAMPT, invece, possiede un comportamento simile a quello di citochine e adipochine. Queste caratteristiche conferiscono a questo enzima/citochina un duplice ruolo metabolico. Inoltre, è stato dimostrato che eNAMPT viene secreto attivamente dalle cellule in condizioni di malattie metaboliche e infiammatorie [1].

Le patologie autoimmuni sono un gruppo di patologie che si caratterizza per una risposta immunitaria anomala, diretta contro componenti dell'organismo stesso [2].

Le malattie autoimmuni mostrano un'elevata eterogeneità clinica che rende la loro diagnosi complessa e spesso tardiva. La limitata specificità dei *marker* comunemente utilizzati in clinica fa sì che sia molto più complesso diagnosticare tempestivamente una malattia autoimmune [3].

Attualmente, per lo screening viene utilizzato il test di immunofluorescenza (IFI) per identificare gli anticorpi antinucleo (ANA); tuttavia, è noto che la loro presenza, così come la loro assenza, non è sempre indicativa di una patologia autoimmune conclamata, in quanto la positività agli ANA viene osservata anche in soggetti sani o che presentano altre patologie [4].

Allo stesso modo, la proteina C-reattiva (PCR), che viene utilizzata come *marker* di infiammazione, è considerata aspecifica nella diagnostica in ambito autoimmune, in quanto i livelli di questo indicatore tendono ad aumentare durante l'infiammazione e non sempre questi livelli sono correlati ad autoimmunità [5].

Alla luce delle varie difficoltà riscontrate nella tempestività della diagnosi e la necessità di identificare nuovi marcatori molto più specifici, si propone la valutazione dei livelli di eNAMPT come possibile marcatore nella diagnosi delle malattie autoimmuni. Il suo dosaggio, infatti, potrebbe affiancare i test già in uso e permettere una diagnosi più precoce e specifica delle patologie autoimmuni.

1.1. Nicotinammide Adenina Dinucleotide NAD

Il NAD⁺, nicotinammide adenina dinucleotide, è un coenzima fondamentale che agisce come trasportatore di energia, svolge un ruolo essenziale in varie reazioni di ossidazione e riduzione e si può presentare in due forme: NAD⁺, la forma ossidata e NADH, la forma ridotta. In particolare, il NAD⁺ agisce come accettore di ioni idruro (H⁻) in seguito alla trasformazione dalla sua forma ossidata (NAD⁺) alla sua forma ridotta (NADH) mentre il NADH ha la capacità di cedere un idruro riducendo vari substrati e inoltre partecipa alla sintesi di adenosina trifosfato (ATP), sostenendo la catena di trasporto degli elettroni [6], [7], [8]. Inoltre, esiste anche la forma fosforilata di NAD⁺, ovvero NADP⁺, che possiede una funzione simile ma lavora con altri enzimi [8]. Il ruolo di questo enzima è quello di mantenere l'omeostasi energetica della cellula [7], [9]. La nicotinamide adenina dinucleotide è una molecola pleiotropica presente in ogni forma di vita ed è considerato un coenzima chiave in varie vie metaboliche. Svolge diverse funzioni cellulari come, ad esempio, la riparazione del DNA, il rimodellamento della cromatina, la risposta immunitaria, l'infiammazione, la divisione cellulare, il ritmo circadiano, le reazioni redox e la funzione mitocondriale che sono essenziali per il mantenimento dell'omeostasi metabolica [10].

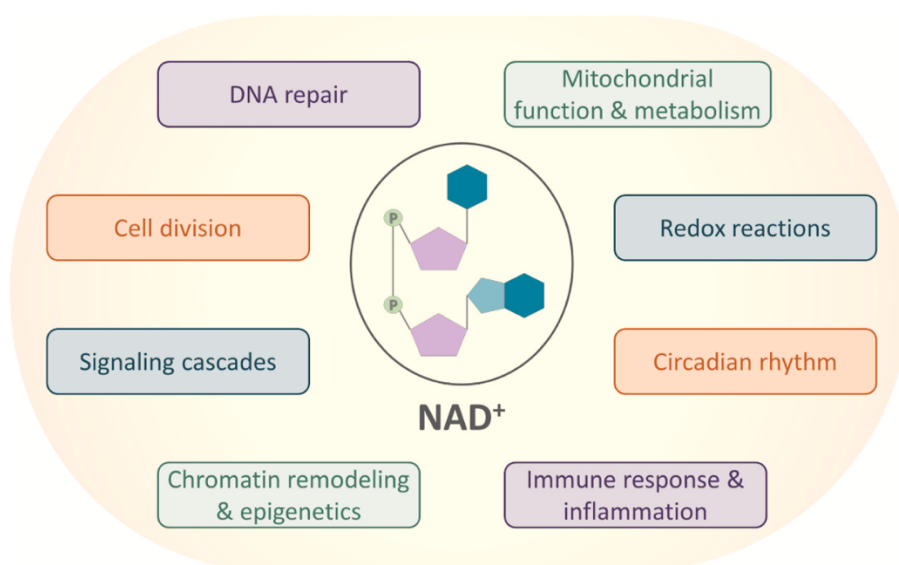


Figura 1: NAD⁺ partecipa a più di 500 reazioni enzimatiche e svolge un ruolo chiave in vari processi [11]

Le due implicazioni principali del NAD⁺ sono quella di cofattore nelle reazioni di trasferimento di elettroni coinvolte nella produzione di energia quali la glicolisi, la fosforilazione ossidativa (OXPHOS) e l'ossidazione degli acidi grassi (FAO). Mentre l'altra, è quella di substrato per enzimi che attraverso delle modificazioni epigenetiche vanno a modificare l'espressione genica di sirtuine (SIRT), agiscono anche sulla riparazione del DNA e che sono in grado di portare modifiche su

determinate proteine, le poli (ADP-ribosio) polimerasi (PARPs). Inoltre, enzimi quali cluster di differenziazione (CD38) e le NAD⁺ idrosilasi utilizzano il NAD⁺ come substrato esercitando diverse funzioni in alcune vie di segnalazione [7] [8], [9].

Durante tutte queste reazioni si osserva la conversione tra le due forme ossidata e ridotta, tuttavia la localizzazione e la concentrazione delle due forme varia a seconda della cellula. Infatti, è noto che la concentrazione della forma ossidata varia a seconda del tipo di cellula e che sia localizzata maggiormente all'interno della cellula stessa, in particolar modo è stata individuata nel nucleo e negli organelli citoplasmatici. La concentrazione di NAD a livello sia citosolico che nucleare risulta essere più o meno 100 μ M, mentre per quanto riguarda il compartimento mitocondriale, questo rappresenta una sorgente indipendente visto che la membrana mitocondriale è impermeabile al NAD; infatti, la concentrazione in questo compartimento è molto maggiore ed è di circa 200-250 μ M. In particolare, in condizioni fisiologiche, il NAD localizzato a livello citosolico e nucleare ha la funzione di mantenere l'attività di PARP e delle Sirtuine che sono enzimi dipendenti da NAD e che svolgono funzioni rispettivamente nella riparazione del DNA e nelle modificazioni epigenetiche [12].

Come precedentemente discusso, i livelli di NAD dentro la cellula non sono uniformi, infatti, l'attivazione delle vie di segnalazione che dipendono dal NAD⁺ avviene in specifici compartimenti cellulari in cui sono presenti determinate concentrazioni di NAD che permettono la corretta funzione di queste vie metaboliche. La limitata abilità di diffondere attraverso la membrana cellulare insieme ad una breve emivita del NAD, di circa un'ora, aumenta la compartimentalizzazione di enzimi con un ruolo nella sintesi e nel consumo di NAD⁺ [9]. Ritornando alla compartimentalizzazione del NAD, questo si trova in distinti organelli, tra cui il citoplasma, il nucleo e i mitocondri (più grande deposito di NAD). Nonostante la localizzazione del NAD⁺ e il fatto che questo possa essere traslocato dal citoplasma ad organelli, è stato osservato che anche le proteine preposte alla sintesi e al consumo di NAD siano compartimentalizzate in organelli specifici, e di conseguenza ogni pool di NAD viene regolato in maniera indipendente dagli altri [6].

Per quanto riguarda la concentrazione di NAD a livello extracellulare, la sua concentrazione extracellulare nel siero dei mammiferi risulta essere tra 0,1 e 0,5 μ M. Tuttavia, è importante sottolineare che esiste una associazione tra la concentrazione extracellulare di NAD direttamente con la concentrazione di NAD intracellulare. Inoltre, è stato dimostrato che alcune cellule (soprattutto quelle tumorali) sono in grado di secernere il NAD intracellulare nel terreno di coltura, sottolineando che il NAD possiede anche un ruolo come molecola di segnalazione autocrina e paracrina verso le cellule vicine [9].

I livelli di NAD possono cambiare sulla base dei ritmi circadiani, ma sono anche modificati a seconda dell'età, dei livelli di glucosio e dell'apporto calorico [9], [13].

Tuttavia, anche durante l'invecchiamento si verifica una diminuzione dei livelli di NAD⁺ e anche una alterazione nelle funzioni delle proteine coinvolte proprio nella produzione e nel consumo di NAD. Diminuiti livelli di NAD vanno a influenzare vari processi, quali la riparazione del DNA conducendo ad un accumulo di mutazioni a livello del genoma, che sono solitamente presenti durante l'invecchiamento [6].

1.1.1. Via di sintesi del NAD

Per quanto riguarda la sua sintesi, il NAD può essere prodotto da alcune cellule nel fegato capaci di sintetizzarlo ex novo da triptofano e inoltre esistono, nella maggior parte delle cellule, più vie di recupero da vitamine come la niacina che mantengono costanti i livelli di NAD. Quindi, il NAD viene continuamente prodotto e catabolizzato, in modo da mantenere costanti le concentrazioni di NAD all'interno della cellula. Inoltre, viene costantemente consumato da tre classi di enzimi: le NAD idrolasi, conosciute come enzimi NAD, le sirtuine e le poli-polimerasi (PARP); viene utilizzato da questi enzimi come substrato mentre la nicotinammide (NAM) principale precursore di NAD.[10] È stato dimostrato che il ricambio di NAD all'interno della cellula segue ritmi circadiani regolati dal complesso dell'orologio centrale CLOCK: BMAL1, infatti questa deacetilasi NAD-dipendente partecipa a un sistema di feedback enzimatico che sincronizza l'orologio molecolare con le fluttuazioni cellulari del NAD⁺ [14] [15].

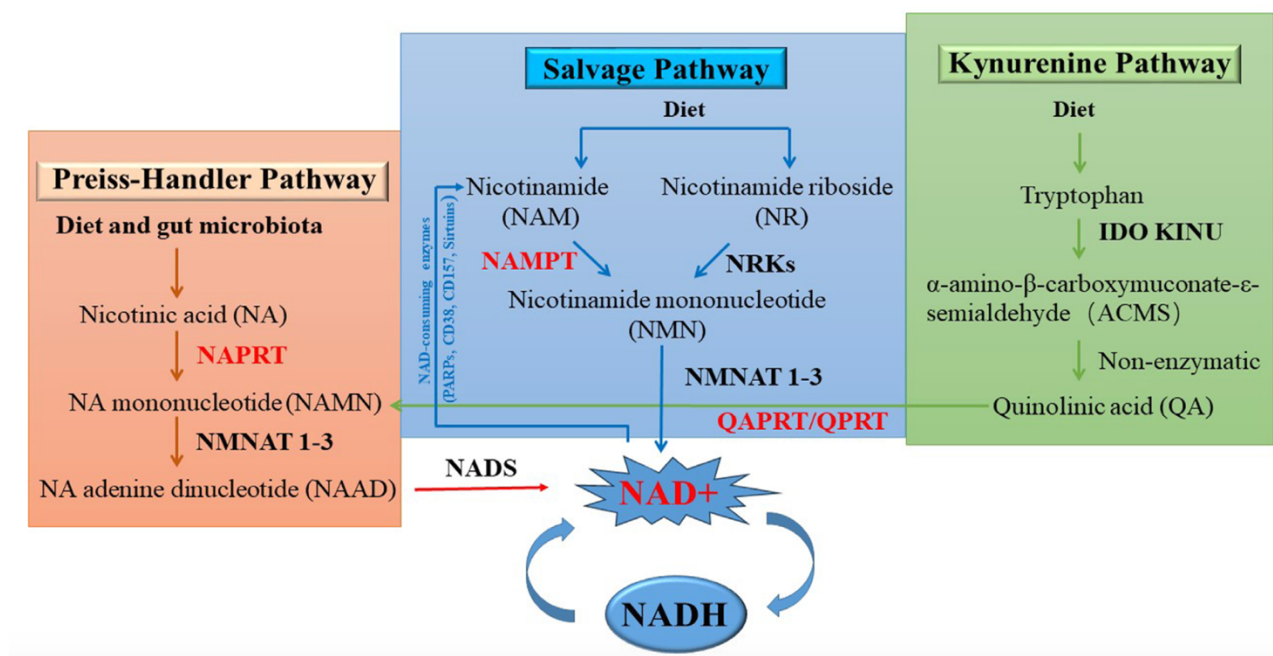


Figura 2: Via di biosintesi del NAD⁺ [10]

Esistono tre diversi percorsi di sintesi del NAD e questi presentano tre precursori: il NAM, il triptofano e l'acido nicotinico (NA); la via scelta dipende dalla disponibilità dei precursori in un determinato tessuto.

- La via de novo (nota anche come percorso di Kyrerunine), ha inizio con il triptofano
- La via di Preiss-Handler, che origina dall'acido nicotinico
- La via di recupero, a partire dalla nicotinammide

La via de novo ha inizio con il triptofano e passa attraverso una serie di reazioni enzimatiche per sintetizzare l'acido chinolinico (QA), che viene poi processato in nicotinammide mononucleotide NAMN a partire dalla chinolinico fosfato ribosiltransferasi (QAPRT).

Nella via di Preiss-Handler, invece, si ha che il gruppo fosforibosilico viene trasferito dalla nicotinico fosforibosiltransferasi (NAPRT) all'acido nicotinico (NA), portando alla sintesi di acido nicotinico mononucleotide (NAMN). Il passaggio finale di questa via consiste nella conversione dell'acido nicotinico adenina dinucleotide (NAAD) in NAD da parte della NAD sintetasi (NADSYN) tramite l'utilizzo di una glutammina come donatore di azoto.

Per quanto riguarda la via di salvataggio, si ottiene il NAD a partire dal NAM. Il NAMPT media la NAM in nicotinammide mononucleotide NMN e rappresenta l'enzima limitante la velocità di sintesi di questa via. Inoltre, il NAMN e l'NMN vengono modificati rispettivamente in NAAD e NAD attraverso l'azione dell'enzima nicotinammide mononucleotide adenosina transferasi (NMNAT 1-3) [10].

1.2. NAMPT

Negli ultimi anni, questa proteina è stata studiata molto, in quanto è protagonista di molti processi biologici. È una proteina pleiotropica, in quanto possiede varie funzioni come adipochina, enzima, citochina e fattore di crescita [16]. Questa proteina possiede tre nomi: nicotinamide fosforibosiltransferasi (NAMPT), Pre-B enhancing factor (PBEF) e visfatina. Nonostante, siano tutti usati in letteratura, il Comitato per la nomenclatura genetica HUGO e il Comitato per la nomenclatura del genoma del topo hanno approvato NAMPT come nome ufficiale della proteina e del gene [17]. NAMPT è stato studiato a partire dal 1994 come PBEF ed è stato originariamente identificato nei supernatanti di linfociti, in quanto possiede la capacità di modificare la differenziazione delle cellule

B. Solo successivamente, la proteina è stata chiamata visfatina e riconosciuta come un'adipochina caratterizzata da proprietà insulino-mimetiche [1].

Per quanto riguarda il gene *NAMPT*, questo si trova sul cromosoma umano 7, tra 7q22.1 e 7q31.33, e possiede una lunghezza totale di 34,7 kilobasi (kb). Inoltre, questa proteina è costituita da 491 aminoacidi e presenta un peso molecolare di circa 52 kDa [16]. NAMPT è una proteina di grosse dimensioni, formata da 491 aminoacidi (nell'uomo) [18]. Dal punto di vista della struttura, questa si compone di 19 catene β e 13 eliche α , che si trovano su due domini separati. Tramite l'analisi ai raggi X della struttura cristallina è stato possibile osservare che NAMPT è una proteina che si presenta come un omodimero e che possiede due siti attivi in cui si legano due molecole di NMN e che fa parte della classe delle fosforibosiltransferasi di tipo II [10].

Sul piano metabolico, NAMPT catalizza la sintesi di nicotinamide mononucleotide (NMN) a partire da nicotinamide e 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP); l'NMN viene poi adenilato in nicotinamide adenina dinucleotide (NAD) dall'enzima NMN adeniltransferasi. Tale reazione rappresenta lo step limitante della via di biosintesi del NAD. Evidenze cliniche mostrano che le concentrazioni extracellulari di NAMPT risultano decisamente aumentate in diverse condizioni patologiche, tra cui malattie metaboliche, infiammatorie e anche neoplastiche [1]. Quindi, NAMPT è uno degli enzimi coinvolto nella sintesi del NAD, ed è considerato una molecola pro-infiammatoria. In particolare, possiamo definire NAMPT come una proteina che possiede un ruolo sia intracellulare che extracellulare. A livello intracellulare, catalizza la sintesi del NAD a partire da NAM; mentre, elevati livelli di eNAMPT a livello extracellulare sembrano essere correlati con condizioni di infiammazione. Cambiamenti nei livelli del NAD possono essere rappresentativi di varie condizioni. In particolare, l'aumento dei valori di NAD è indice di infiammazione o condizioni infiammatorie, incluso il cancro; mentre, la diminuzione delle concentrazioni di NAD sembra essere associata a malattie legate all'età [14].

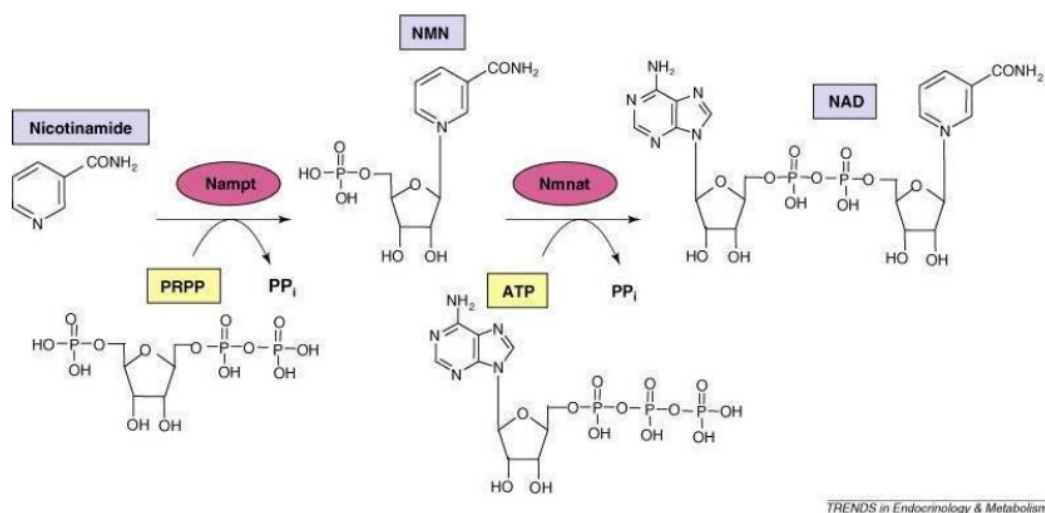


Figura 3: Via di salvataggio della sintesi del NAD catalizzata da NAMPT [19]

L'enzima NAMPT presenta un profilo di espressione ubiquitario, essendo ampiamente distribuito nel midollo osseo, nel fegato, nel tessuto muscolare e in numerosi altri distretti organici. La sua presenza è stata inoltre documentata in cellule, tra cui cellule immunitarie, cardiomiociti, fibroblasti e neuroni; tale distribuzione ne riflette il ruolo biologico cruciale sia in condizioni fisiologiche che patologiche. L'enzima si può presentare in due isoforme distinte: una intracellulare (iNAMPT) e una extracellulare (eNAMPT) [10]. In particolare, iNAMPT si presenta come un omodimero con due subunità identiche, che sono coinvolte nella funzione del sito attivo dell'enzima. Questo sito attivo mostra una tasca di legame che è capace di legare i substrati NAM e PRPP. Inoltre, vista la struttura di NAMPT precedentemente descritta, si pensa che esista un ripiegamento di due monomeri di NAMPT in modo da formare una sorta di tunnel che costituisce una interfaccia tra i due monomeri e che è costituito da diversi residui amminoacidici capaci di legare diversi substrati. È stato dimostrato che NAMPT riesce a svolgere la sua funzione in modo corretto e senza errori in quanto possiede due residui, il residuo Asp219 e il residuo His247, il primo definisce la specificità del substrato del NAMPT; mentre, varie mutazioni sul secondo residuo conducono ad una riduzione o addirittura alla soppressione dell'attività enzimatica dell'enzima [16].

Nell'uomo oltre ai due residui nominati prima, Asp219 e His247, il sito attivo del NAMPT è formato anche da altri residui quali His191, Glu200 e Lys191, tutti residui fondamentali che permettono il legame e il posizionamento del NAM e del PRPP [18]. Inoltre, è stato dimostrato che esistono delle modificazioni in grado di aumentare l'attivazione dell'enzima come la deacetilazione da parte della Sirtuina-6 (SIRT6) [20]. Per quanto riguarda la sequenza, questa è identica in entrambe le forme intracellulare ed extracellulare; tuttavia, recentemente è stata ipotizzato che una modificazione post-

traduzionale potrebbe essere coinvolta nel suo rilascio a livello extracellulare; questa modificazione sembra essere l'acetilazione della lisina 53 presente solo nella forma extracellulare [21].

Per quanto riguarda la localizzazione dell'isoforma iNAMPT, questa si trova prevalentemente nel citoplasma, a livello nucleare e mitocondriale, e anche nei neuroni presenti nell'ippocampo e nella corteccia cerebrale. Inoltre, la presenza di iNAMPT risulta maggiore nel tessuto adiposo bruno, nei reni, nel fegato, mentre i livelli sono più bassi a livello del tessuto adiposo bianco, nella milza, nel muscolo scheletrico e nei polmoni; i livelli sembrano, invece, quasi impercettibili nel tessuto cerebrale e pancreatico. iNAMPT oltre ad essere l'enzima limitante della velocità di sintesi del NAD, svolge funzioni essenziali a livello di molti processi biologici, come i meccanismi di difesa, il metabolismo energetico, i meccanismi antiossidanti, l'apoptosi e la proliferazione cellulare [10]. Livelli elevati sia di iNAMPT che di eNAMPT sono stati riscontrati in diverse condizioni patologiche quali malattie infiammatorie e cancro [21].

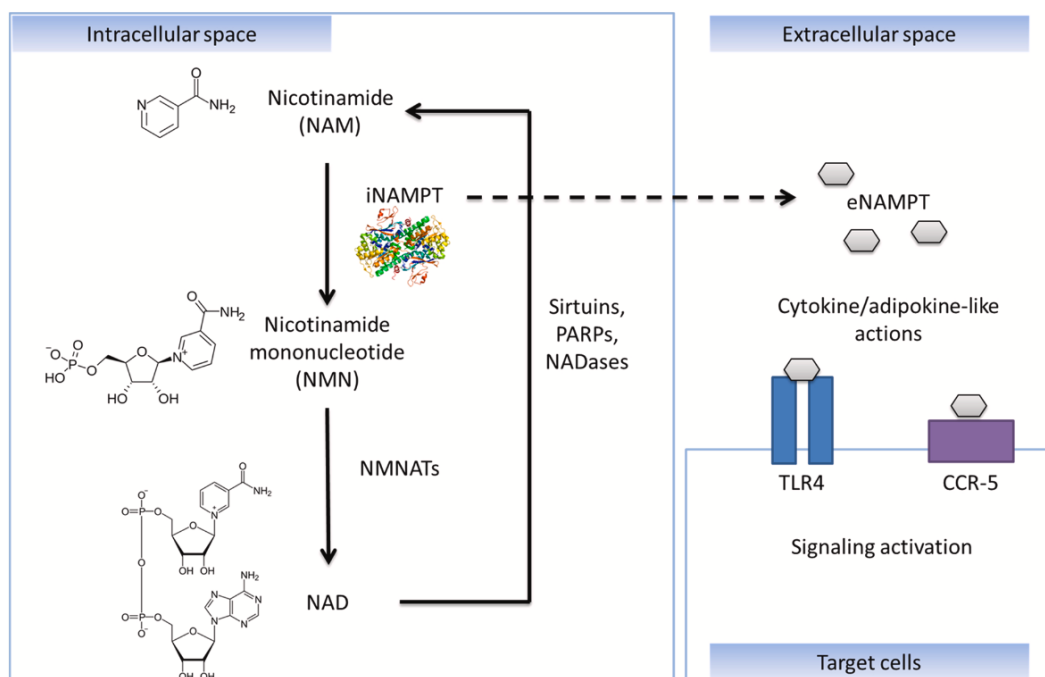


Figura 4: Attività del NAMPT intra ed extra cellulare [22]

In sintesi, iNAMPT svolge un ruolo essenziale nella sintesi del NAD e nel metabolismo energetico; mentre, eNAMPT essendo una citochina, attraverso il legame con i recettori di membrana, riesce a regolare alcune vie di segnalazione intracellulari [22].

1.2.1. eNAMPT

eNAMPT viene secreto da molti tipi cellulari e possiede la capacità di stimolare la secrezione di molte citochine determinando diversi effetti che possono essere fisiologici e patologici. Esistono molte vie di segnalazione intracellulari che vengono attivate da eNAMPT e, inoltre, come è possibile osservare nella figura agisce come citochina su diversi tipi cellulari. Tuttavia, il meccanismo molecolare e l'attivazione di queste vie rimangono ancora poco conosciuti [23]. Mentre in condizioni fisiologiche, all'interno della cellula i substrati del NAMPT sono elevati; all'esterno della cellula i substrati NAM e PRPP, potrebbero non essere molto abbondanti, soprattutto il PRPP. Quindi probabilmente eNAMPT a livello extracellulare non si trova nelle condizioni necessarie per svolgere la sua attività enzimatica; tuttavia, non si può escludere che in alcune situazioni patologiche si sviluppi un ambiente a favore dell'attività di questo enzima [24].

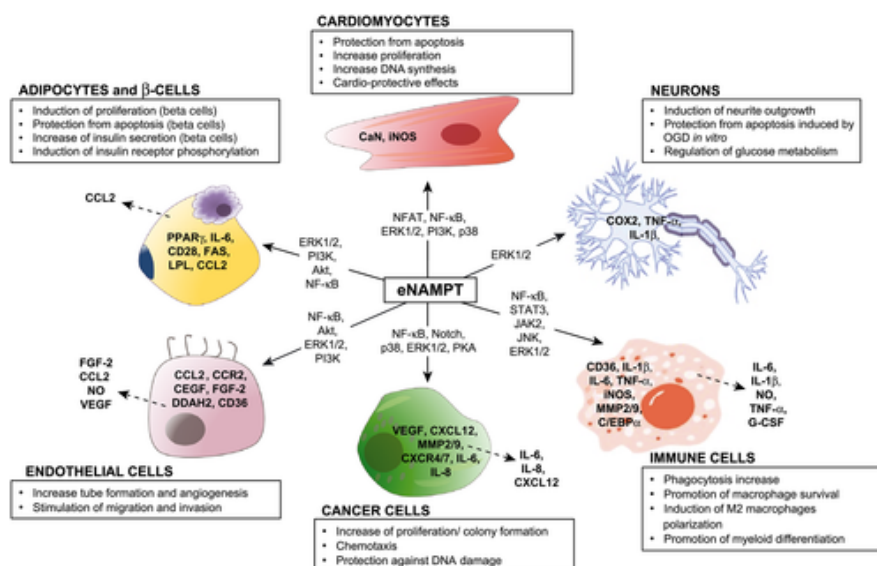


Figura 5: Effetti autocrini e paracrini dell'eNAMPT [23]

Una delle funzioni di questa citochina immunomodulatrice è quella di agire congiuntamente all'interleuchina-7 (IL-7) e al fattore delle cellule staminali (SCF) potenziando la formazione di colonie di cellule [14]. Inoltre, è possibile considerare eNAMPT come un fattore solubile soggetto ad una up-regolazione dall'attivazione di cellule immunitarie coinvolte nell'immunità innata e adattativa, tra cui neutrofili, macrofagi e monociti. L'aumento dell'espressione di NAMPT viene indotta da stimoli infiammatori, sia di origine esogena e quindi da agenti patogeni, sia da stimoli infiammatori endogeni [14]. Nonostante il fatto che la struttura di eNAMPT sia la stessa di iNAMPT, la sua funzione enzimatica a livello extracellulare è ancora da chiarire [17].

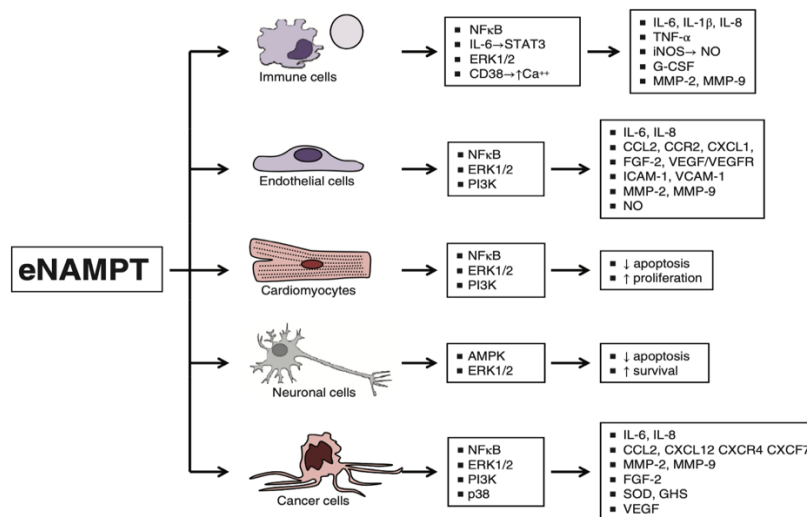


Figura 6: Effetti autocrini/paracrini della nicotinamide fosforibosiltransferasi extracellulare (eNAMPT). eNAMPT agisce come citochina negli ambienti extracellulari ed è in grado di indurre la secrezione di altre citochine e di attivare vie intracellulari fisiologiche e patologiche [17]

eNAMPT svolge diverse funzioni biologiche ed è un importante mediatore dell'infiammazione agendo come una citochina pro-infiammatoria, in grado di modificare la risposta immunitaria. È stato osservato che NAMPT è in grado di up-regolare l'interleuchina 1 beta (IL-1β), l'interleuchina 6 (IL-6) l'interleuchina-10 (IL-10) e il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-α) e ne aumenta la secrezione da parte dei monociti e delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC). Inoltre, eNAMPT esercita un'azione anti-apoptotica sulle cellule immunitarie; ad esempio, favorisce la sopravvivenza dei macrofagi in risposta allo stress, mediando il rilascio di IL-6 e la conseguente attivazione per fosforilazione del trasduttore del segnale e attivatore della trascrizione 3 (STAT3). Inoltre, eNAMPT è un'adipochina che ricopre un ruolo cruciale nella modulazione della secrezione insulinica nelle cellule β del pancreas. Sebbene sia stata esclusa un'interazione diretta con il recettore dell'insulina nel rilascio di citochine, eNAMPT risulta iperespressa nei soggetti obesi e diabetici, risultando particolarmente abbondante nel tessuto adiposo viscerale e secreta attivamente dagli adipociti. In aggiunta, eNAMPT svolge una funzione pro-angiogenica, nella migrazione delle cellule endoteliali e nella promozione della proliferazione. eNAMPT, dunque, stimola la produzione del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e del recettore 2 del fattore di crescita endoteliale (VEGFR2), fondamentale per i processi angiogenici. Oltre a ciò, la citochina induce nelle cellule endoteliali il rilascio di altri fattori pro-angiogenici come il fattore di crescita dei fibroblasti-2 (FGF-2), proteina chemiotattica monocitica-1 (MCP-1) e IL-6. L'efficacia angiogenica di questo fattore è stata ampiamente confermata da studi condotti sia su modelli cellulari *ex vivo* e *in vivo* [14]. Esiste una associazione tra gli enzimi che consumano NAD da quelli coinvolti nella sua sintesi, di conseguenza

esiste una possibile ipotesi, secondo cui la secrezione di eNAMPT sia un processo di regolazione per andare a diminuire i suoi livelli intracellulari. Il trasporto di eNAMPT viene effettuato all'interno di vescicole extracellulari nella circolazione sanguigna e, una volta raggiunto il sito bersaglio, eNAMPT che si trova all'interno di queste vescicole, viene internalizzato nelle cellule per svolgere le sue funzioni. È quindi possibile che eNAMPT fuori dalla cellula funzioni come un enzima che sintetizza il NAD; di conseguenza è probabile che possieda funzioni diverse ancora non note. A sostegno di questa teoria, si ha il fatto che eNAMPT è in grado di legare il recettore Toll-like receptor 4 (TLR4) e il recettore C-C chemokine receptor 5 (CCR5), e questo potrebbe chiarire come questa proteina sia coinvolta nell'amplificazione dell'infiammazione, in quanto questi due recettori sono coinvolti nei meccanismi del sistema immunitario. Dall'altro lato, è stato studiato, che l'associazione di eNAMPT con il suo recettore TLR4 che si trova sui macrofagi, conduce all'attivazione di diverse vie di segnalazione quali STAT3, la proteina chinasi B (Akt) e il fattore nucleare dell'enhancer della catena leggera kappa dei linfociti B attivati (NF-κB) che portano all'innescamento dell'infiammazione con rilascio di citochine pro-infiammatorie. Mentre, per quanto riguarda l'interazione con il recettore CCR5, è stato osservato che eNAMPT può indurre l'attivazione di varie vie di segnalazione quali STAT3, anche senza la presenza di questo ligando [25], [12].

1.2.2. Secrezione di eNAMPT

Sono note le molteplici funzioni di eNAMPT, tuttavia, per quanto riguarda i suoi meccanismi di secrezione, questi rimangono ancora da chiarire; è stato studiato che esistono molti fattori in grado di regolare il rilascio di eNAMPT e che è in realtà un evento che non dipende solo da lisi e morte cellulare [17][24]. In condizioni fisiologiche, il rilascio di eNAMPT viene regolato dal ritmo circadiano e questo enzima è stato rilevato nel siero, nel liquido sinoviale, nella saliva e nel liquido cerebrospinale [24]. Per quanto riguarda il meccanismo di secrezione dell'eNAMPT, nonostante la differenza di molte proteine secrete nella struttura di NAMPT non è presente un peptide N-terminale avente la funzione di segnalazione della via di secrezione Reticolo Endoplasmatico-Golgi; questa proteina viene comunque secreta a livello extracellulare e probabilmente, vista l'assenza di questo peptide, l'escrezione segue una via non classica. Inoltre, è stato dimostrato che eNAMPT possa trovarsi all'interno di esosomi e microvescicole, anche se questo processo sembra caratterizzare solo una minima parte di tutto eNAMPT [23], [11]. Gli stimoli principali che inducono il rilascio di questa citochina possono essere divisi in tre gruppi: fattori di stress, stimoli nutrizionali e stimoli infiammatori. Inoltre, il rilascio di eNAMPT è associato non solo a condizioni di stress ossidativo ma anche a diversi tipi di tumore, in cui risulta sostenere la crescita tumorale. Per quanto riguarda gli

stimoli infiammatori, è stato visto un incremento nella secrezione di eNAMPT a seguito dell'aumento di fattori come TNF- α , IL-1 β , e lipopolisaccaride batterico LPS tramite l'attivazione del recettore TLR4. Sono stati scoperti elementi regolatori dei glucocorticoidi nel promotore del gene NAMPT, sottolineando un ruolo di questi ultimi nella regolazione della trascrizione di NAMPT. Inoltre, non è ancora stato precisato se eNAMPT venga secreto solo in condizioni normali e non senza stimoli [17]. In uno studio, è stato dimostrato che iNAMPT deacetilato da parte di SIRT1 aumenta la sua secrezione a livello extracellulare dagli adipociti e che rilascio di eNAMPT oltre ad essere regolato da stimoli di stress infiammatori risponde anche a fattori nutrizionali, come il glucosio. Inoltre, è stato dimostrato come soggetti con iperglicemia indotta per via endovenosa, hanno mostrato un innalzamento nella concentrazione sierica di eNAMPT; in seguito, *in vitro*, si è osservato che l'esposizione al glucosio di isolotti di cellule umane isolate, ha portato ad una secrezione di NAMPT [11]. Inoltre, NAMPT può essere rilasciato come componente di vescicole extracellulari [26].

1.3. Il ruolo di NAMPT nell'infiammazione

Come precedentemente detto, il NAMPT intracellulare è l'enzima chiave nella via di recupero del NAD che permette il mantenimento dell'omeostasi. Tuttavia, è stato osservato che in presenza di stimoli di stress cellulare e stimoli infiammatori viene indotta la deacetilazione di iNAMPT da parte di SIRT1, che conduce al rilascio di NAMPT da parte del tessuto adiposo. È noto che esista una relazione tra eNAMPT e lo sviluppo di malattie infiammatorie croniche come la psoriasi, in cui si ha l'aumento di NAD e il reclutamento dei recettori di alcune cellule immunitarie quali TLR4 e recettore CCR5; tuttavia, i meccanismi non sono ancora stati chiariti. Una delle differenze fondamentale tra iNAMPT e eNAMPT è che il NAMPT intracellulare porta all'aumento dell'infiammazione nei tessuti lesionati (come in caso di psoriasi); mentre eNAMPT è coinvolto nella patogenesi di alcune condizioni, in quanto permette il rilascio di citochine pro-infiammatorie da parte di macrofagi, cellule endoteliali e neutrofili. Inoltre, essendo eNAMPT un fattore che promuove l'angiogenesi, questo permette anche il reclutamento di altre citochine pro-infiammatorie, che amplificano e sostengono ulteriormente l'infiammazione [11]. eNAMPT potrebbe avere un ruolo come marcatore per alcune malattie in quanto in situazioni di infiammazione quali diabete, obesità, sindromi metaboliche, sono stati osservati aumenti nei livelli prima di iNAMPT che hanno condotto successivamente ad un incremento dei livelli di eNAMPT. Inoltre, sono stati osservati livelli elevati di eNAMPT in diversi tipi di infezioni, ad esempio, la sepsi e patologie autoimmuni quali la artrite reumatoide, la psoriasi, la colite ulcerosa e il morbo di Crohn [14].

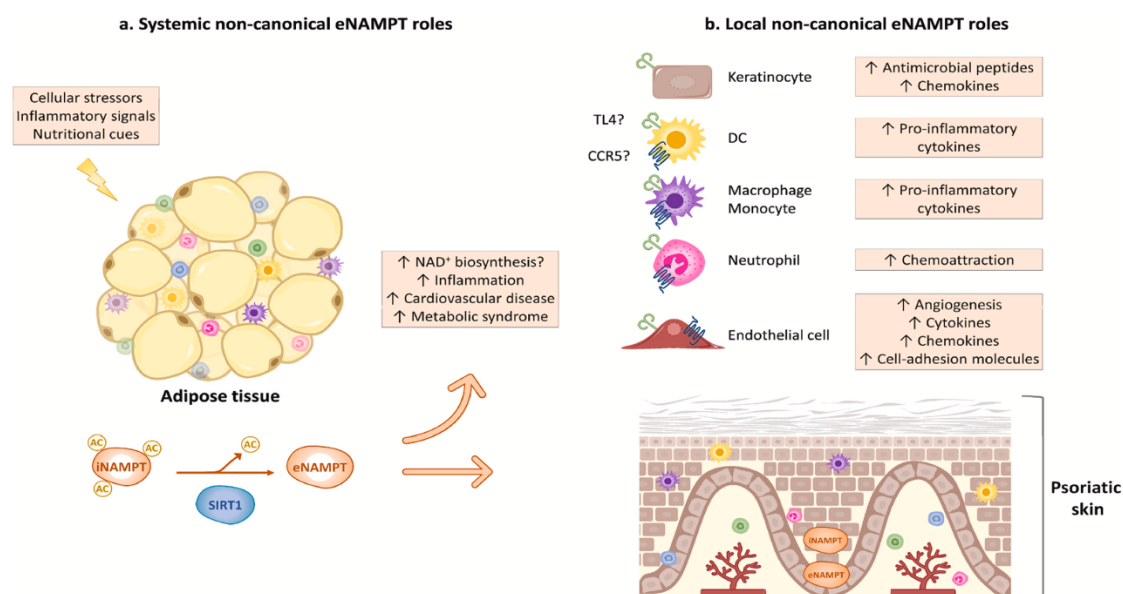


Figura 7: Ruoli dell'eNAMPT nelle malattie infiammatorie croniche [11]

Vista la sua funzione, è noto che NAMPT sia un biomarcatore dell'infiammazione cronica in malattie infiammatorie quali psoriasi, dermatite atopica e artrite reumatoide. Si è visto che la secrezione di NAMPT da parte dei neutrofili viene indotta dall'IL-1 β in condizioni di infiammazione e che allo stesso tempo NAMPT protegge i neutrofili dalla apoptosi. Inoltre, NAMPT è in grado di indurre la secrezione di IL-6, di metalloproteasi della matrice 1 metalloproteinasi della matrice-1 (MMP1) e metalloproteasi della matrice-3 (MMP3) da parte dei fibroblasti sinoviali in malattie quali l'artrite reumatoide. È stata svolta una meta-analisi su pazienti affetti da psoriasi, che ha dimostrato che i livelli di eNAMPT non mostravano differenze significative tra il siero dei pazienti e quello dei controlli; tuttavia, i livelli di eNAMPT erano correlati positivamente con la gravità della psoriasi. Un altro caso, invece, è quello dei pazienti con artrite psoriasica che mostravano nel siero livelli di eNAMPT molto elevati, anche se questi valori non erano direttamente associati alla progressione della patologia [10]. In uno studio recente è stato dimostrato che esiste una associazione tra l'attivazione dei monociti e i livelli di NAD; l'aumento dei livelli di NAD causa l'incremento di IL-1 β mediato dalla proteina 3 contenente il dominio pirinico e i domini LRR (NLRP3) nei monociti precedentemente esposti a LPS ed in presenza di ATP. Inoltre, è stato osservato che in pazienti con sepsi, i neutrofili inducevano una maggiore secrezione di NAMPT. Questa associazione è stata studiata e verificata in vari tipi di infiammazione nei bambini, in cui è stata confermata una correlazione positiva tra i livelli dei neutrofili e i livelli di eNAMPT circolante a prescindere dalla genesi dell'infiammazione [11]. È dunque ampiamente noto che eNAMPT venga up-regolato in varie cellule come macrofagi, monociti e cellule dendritiche e che sia capace di attivare vie pro-infiammatorie andando ad aumentare la trascrizione di Chinasi 1-2 regolate da segnali extracellulari

(ERK1/2), NF- κ B e STAT3; portando alla secrezione di citochine pro-infiammatorie quali IL-6, TNF- α e IL-1 β . Di conseguenza, l'inibizione di iNAMPT agisce sulle cellule T attivate causando una deplezione di NAD, ATP e TNF- α e in seguito alla morte cellulare [17].

1.4. Malattie autoimmuni

Le malattie autoimmuni costituiscono un gruppo eterogeneo di patologie croniche immunomediatae, caratterizzate da risposte anomale dirette contro gli autoantigeni, con conseguente infiammazione persistente e danno tissutale. La perdita di tolleranza immunologica origina dal fallimento dei meccanismi di controllo centrali e periferici, deputati alla delezione o all'inibizione dei linfociti T e B autoreattivi. È dunque la disfunzione di questi processi che innesca la proliferazione patologica delle cellule autoreattive. Ad oggi sono stati identificati oltre 100 disordini autoimmuni, che presentano profonde differenze in termini di organi bersaglio e manifestazioni cliniche [2]. Sebbene esistano diverse interpretazioni del concetto di autoimmunità e malattia autoimmune, tuttora mancano criteri condivisi e precisi accettati. La mancanza di questi criteri e l'incertezza su quali condizioni debbano essere effettivamente classificate come autoimmuni limitano significativamente il progresso scientifico e l'efficacia dell'assistenza ai pazienti. I meccanismi all'origine dello sviluppo dell'autoimmunità e delle malattie autoimmuni rimangono in parte elusivi; nonostante ciò, si sostiene che essi derivino da interazioni gene-ambiente ancora da definire. Grazie al Progetto Genoma Umano è stato possibile identificare vari fattori di rischio genetici per le malattie autoimmuni, ma la comprensione dell'impatto che fattori ambientali potrebbero determinare appare ancora limitata. La difficoltà nel decifrare il ruolo dell'ambiente risiede nell'eterogeneità delle variabili; misurare l'intensità e la durata delle interazioni ambientali nel corso della vita di un soggetto e il loro effetto sulla funzionalità immunitaria rimane una delle principali sfide della ricerca. Nonostante l'aumento dei disturbi autoimmuni rilevato negli ultimi anni, valutarne con esattezza l'incidenza e la prevalenza rimane complesso. In primo luogo, come già evidenziato, persiste l'assenza di un consenso universale sulle definizioni dei criteri diagnostici. Secondariamente, l'eterogeneità e la rarità di queste condizioni autoimmuni portano spesso a una loro sottodiagnosi clinica. La presenza di differenze significative tra diverse popolazioni e aree geografiche complica ulteriormente il calcolo dell'effettivo carico epidemiologico a livello globale. Un ulteriore ostacolo è rappresentato dall'assenza di banche dati adeguate e standardizzate a supportare tali stime, insieme alla distorsione dei dati provenienti prevalentemente da centri specialistici di terzo livello. A questo si aggiunge l'eterogeneità delle tecniche immunologiche, le cui performance analitiche variano costantemente e sono in continua evoluzione. In ultima analisi, l'evoluzione stessa della ricerca ha portato a un periodico aggiornamento dei criteri necessari per definire e diagnosticare molte patologie autoimmuni [27].

1.4.1. Tolleranza immunitaria

La tolleranza immunitaria, distinta in tolleranza periferica e centrale, svolge un ruolo principale nello sviluppo dell'autoimmunità. Il suo funzionamento viene regolato e dipende da varie vie di segnalazione, meccanismi epigenetici e dal metabolismo immunitario. Lo sviluppo della tolleranza centrale delle cellule B ha sede nel midollo osseo e nel fegato [28].

È fondamentale premettere che l'autoreattività rappresenta una caratteristica intrinseca e fisiologica delle cellule T. Per tale ragione, la presenza di cellule autoreattive e di autoanticorpi a basso titolo non è necessariamente patologica: essi vengono infatti comunemente rilevati anche in individui sani e, con frequenza ancora maggiore, tra i familiari di primo grado di pazienti affetti da patologie autoimmuni [2].

I meccanismi di sorveglianza sono rappresentati da diverse cellule che presentano meccanismi di tolleranza capaci di tenere sotto controllo l'autoimmunità. Nonostante la presenza di questa sorveglianza, può succedere che a seguito dell'interazione tra fattori genetici, ambientali e immunologici si sviluppino delle malattie autoimmuni. Tuttavia, il sistema immunitario possiede molti meccanismi a *feedback* negativo capaci di regolare le risposte immunitarie e di andare a rallentare o spegnere una risposta immunitaria cronica [29].

L'autoimmunità insorge nel momento in cui i meccanismi di tolleranza immunologica, deputati a limitare l'autoreattività fisiologica, risultano deficitari. Questo sistema di tolleranza, infatti, è essenziale per impedire alle cellule immunitarie di aggredire erroneamente i tessuti dell'organismo, riducendo il rischio di sviluppo di patologie autoimmuni.

La tolleranza immunitaria è il meccanismo che non permette l'attivazione delle cellule immunologiche da parte di antigeni autologhi, determinando una specifica assenza di risposta immunitaria. Questo processo è fondamentale per proteggere i vari tessuti e organi dall'autodistruzione, senza compromettere la normale capacità di difesa della risposta adattativa contro i patogeni esterni [30].

Si distinguono una tolleranza immunitaria centrale e una periferica, la prima si realizza durante lo sviluppo embrionale e postnatale degli organi linfoide primari, il timo e il midollo osseo in cui avviene l'eliminazione dei linfociti T e B autoreattivi mediante un processo di selezione negativa e delezione clonale. Eventuali inefficienze durante il meccanismo di selezione negativa, agevolano la persistenza di linfociti autoreattivi che mediano l'autoimmunità nell'organismo, aumentando la suscettibilità alle malattie autoimmuni. Nonostante la tolleranza centrale garantisca l'eliminazione della maggior parte delle cellule autoreattive, alcune riescono a sfuggire a questo controllo. Per evitare questa eventualità, ai meccanismi di tolleranza centrale sono affiancati dei meccanismi di tolleranza periferica. La

tolleranza periferica induce la soppressione dei linfociti T e B maturi verso gli antigeni propri, assicurando il controllo delle cellule autoreattive precedentemente sfuggite alla selezione centrale [30].

Inoltre, il meccanismo della tolleranza periferica si basa sulla presenza di una popolazione di cellule soppressive, di cui le principali sono i linfociti T regolatori (Treg). Queste possono essere classificate in Treg naturali e Treg indotte perifericamente; le prime possiedono una funzione immunosoppressiva e la esercitano prevalentemente attraverso il contatto diretto cellula-cellula, mentre le seconde agiscono attraverso la liberazione di varie citochine come l'interleuchina-10 (IL-10) e il fattore di crescita trasformante β (TGF- β) [2].

Tra i segnali scatenanti l'autoinfiammazione e l'autoimmunità e quindi coinvolti nell'attivazione e proliferazione delle cellule B e degli autoanticorpi, riconosciamo antigeni quali cellule in apoptosi e trappole extracellulari dei neutrofili (NET) rilasciate dai neutrofili [28].

L'autoreattività viene considerata e studiata su vari livelli: a livello fisiologico, un basso grado di autoreattività risulta essenziale per la selezione dei linfociti e l'omeostasi del sistema immunitario, mentre, a un livello intermedio è nota la presenza di autoanticorpi circolanti e lievi infiltrati tissutali senza conseguenze cliniche, fino all'autoimmunità patogena associata a lesioni d'organo mediate dal sistema immunitario [31].

Durante la differenziazione, i precursori delle cellule T e dei linfociti B con autoreattività vengono selezionati positivamente rispettivamente nella corteccia, nel timo e nel midollo osseo, mentre quelli con bassa avidità per gli autoantigeni vengono esportati nella periferia. Al contrario, le cellule T autoreattive (aT) con elevata avidità per gli autoantigeni espressi dalle cellule epiteliali del timo midollare (mTEC) sotto il controllo di AIRE (regolatore autoimmune) o FEZF2 (membro 2 della famiglia di proteine a dita di zinco FEZ) vengono eliminate o si differenziano in cellule Treg (TR); mentre le cellule B autoreattive (aB) vengono eliminate o subiscono una modifica del recettore. La tolleranza centrale è tuttavia incompleta e alcune cellule T e B autoreattive vengono esportate nella periferia. Le cellule esportate sono normalmente controllate da meccanismi di tolleranza periferica, tra cui molecole inibitorie, anergia, ignoranza e soppressione da parte delle cellule Treg. Tuttavia, in organismi geneticamente predisposti, il danno tissutale, l'infiammazione e la presentazione di autoantigeni sequestrati potrebbero provocare una rottura della tolleranza e l'insorgenza di autoimmunità [31].

1.4.2. Classificazione

	ORGANO SPECIFICHE	
Tiroiditi croniche	Sindrome di Flier	Pemfigo
Morbo di Graves	Sindrome di Hirata	Pemfigoide
Gastrite cronica atrofica	Adenoipofisite linfocitaria	Sindrome dell'uomo rigido
Anemia perniciosa	Infundibuloneuroipofisite	Sindrome di Guillain-Barrè
Morbo di Addison	Miocarditi idiopatiche	Sclerosi multipla
Insufficienza midollare del surrene	Miastenia grave	Anemia emolitica autoimmune
Insufficienza ovarica	Sindrome di Lambert-Eaton	Porpora trombocitopenica
Infertilità maschile	Morbo celiaco	Leucopenia autoimmune
Ipoparatiroidismo cronico	Vitiligine	Sindrome di Evans
Diabete mellito di tipo I	Alopecia areata	Sindromi pluriendocrine autoimmuni
	INTERMEDIE	
Oftalmia simpatica	Cirrosi biliare primitiva	Colite ulcerosa
Uveite facogenica	Colangite sclerosante primitiva	Morbo di Crohn
Epatite autoimmune (tipo I e II)	Malattia di Sjogren	Policondrite ricorrente
	NON ORGANO-SPECIFICHE	
Lupus eritematoso sistemico	Sclerodermia	Connettivite mista
Lupus eritematoso discoide	Artrite reumatoide	Vasculiti
Dermatomiosite/Polimiosite	Artriti reattive (o sieronegative)	Sindrome da anticorpi antifosfolipidi

Tabella 1: Classificazione malattie autoimmuni organo specifiche, intermedie e non organo specifiche [3]

Una classificazione fondamentale delle malattie autoimmuni si basa sulla distinzione tra forme sistemiche (MAIS) e organo-specifiche (MAO) [32]. Le forme sistemiche mostrano una reattività diretta contro antigeni distribuiti in vari tessuti dell'organismo; mentre quelle organo-specifiche, presentano anticorpi e cellule T che reagiscono agli autoantigeni localizzati in un tessuto specifico [33]. Le organo specifiche colpiscono un singolo organo, infatti presentano sia infiltrati linfocitari localizzati nell'organo bersaglio che autoanticorpi che riconoscono autoantigeni specifici mentre le sistemiche si manifestano con danni in tutto il corpo e autoanticorpi circolanti in grado di identificare diversi autoantigeni non organo-specifici. Tuttavia, esiste una ulteriore categoria oltre a queste due, le malattie autoimmuni intermedie. Questa terza classe presenta caratteristiche intermedie tra le altre due categorie: quindi presenta sia autoanticorpi specifici verso un organo bersaglio che autoanticorpi circolanti capaci di riconoscere autoantigeni non specifici e i danni sono sia cellulo-mediati che anticorpo-mediati, un esempio è la sindrome di Sjogren. È importante sottolineare che i danni ai tessuti sono determinati dall'accumulo di immunocomplessi che vanno ad attivare il sistema del complemento [34]. Nella tabella 2, qui sotto riportata, è possibile osservare che qualsiasi organo o apparato può essere coinvolto in una malattia autoimmune e che i sintomi clinici di queste patologie sono eterogenei e correlati con la sede del loro coinvolgimento; dunque, si nota come si possono presentare svariati disordini anche all'interno della stessa sede ma con il coinvolgimento di diversi autoanticorpi [30].

ORGANO/APPARATO	MALATTIA
Malattie autoimmuni Reumatologiche	Lupus Eritematoso Sistemico (LES), Artrite reumatoide (RA), Sindrome di Sjögren (SS), Sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS), Sclerosi sistemica (SSc)
Muscolo	Miastenia gravis (MG), Sindrome miastenica di Lambert-Eaton (LEMS)
Pelle	Vitiligine, Pemfigo, Epidermolisi bollosa acquisita (EBA)
Sistema digestivo	Cirrosi biliare primaria (PBC), Celiachia, Malattia di Crohn, Gastrite autoimmune (AIG)
Sistema Ematologico	Anemia emolitica autoimmune (AIHA)
Sistema Endocrino	Diabete mellito di tipo 1, Malattia di Addison autoimmune
Sistema Nervoso Centrale	Sclerosi multipla (SM), Sindrome di Guillain-Barré (GBS)
Tiroide	Malattia di Graves (GD), Tiroidite di Hashimoto

Tabella 2: Classificazione malattie autoimmuni [30]

Tra le malattie sistemiche figura il lupus eritematoso sistemico (LES), una patologia multiorgano che può interessare articolazioni, reni, polmoni, cute e cuore; tali manifestazioni sistemiche spesso condividono tratti clinici, immunologici e genetici comuni. Al contrario, nelle forme organo-specifiche, il danno è localizzato, come nel caso del diabete mellito di tipo 1, che colpisce selettivamente le cellule beta del pancreas. Tuttavia, è importante sottolineare che ogni patologia autoimmune mantiene caratteristiche peculiari e distintive [32].

Nella Tabella 3 sottostante sono riportati i criteri storici di Witebsky e colleghi per determinare se una patologia è considerabile autoimmune o meno; tali postulati sono stati successivamente superati e migliorati con l'avanzamento delle conoscenze immunologiche.

	POSTULATI MALATTIE AUTOIMMUNI
Criteri maggiori	- Presenza di infiltrati linfocitari localizzati nell'organo bersaglio o diffusi a livello di diversi apparati o in tutto l'organismo - Presenza di autoanticorpi e/o linfociti autoreattivi circolanti e localizzati a livello dell'organo bersaglio - Identificazione degli autoantigeni implicati nella reazione immunitaria - Possibilità di riprodurre la malattia dell'animale da esperimento, inoculando gli autoantigeni - Possibilità di trasferire passivamente la malattia dell'animale affetto ad uno sano, mediante l'impiego di siero e/o linfociti - Efficacia della terapia immunosoppressiva
Criteri minori	- Familiarità - Associazione con HLA - Sesso (femminile) - Ipergammaglobulinemia - Andamento clinico caratterizzato da esacerbazioni e remissioni - Associazione con altre malattie autoimmuni

Tabella 3: Postulati di Witebsky e colleghi [35]

Nel corso degli anni, tali postulati sono stati essenziali per identificare l'origine autoimmune di patologie precedentemente classificate in modo diverso o la cui patogenesi era sconosciuta.

Tra questi criteri, quelli presi maggiormente in considerazione sono l'infiltrazione linfocitaria nell'organo bersaglio e l'efficacia del trattamento immunosoppressivo. Inoltre, l'identificazione e la determinazione degli autoanticorpi rappresenta un fattore cruciale nella diagnosi di alcuni tipi di patologie autoimmuni [36], [3].

1.4.3. Patogenesi

È noto che le malattie autoimmuni siano l'esito di una complessa interazione tra predisposizione genetica, fattori ambientali e disregolazione immunitaria. Per quanto riguarda la predisposizione genetica esistono diversi polimorfismi, che rappresentano dei fattori di rischio ereditari, spesso presenti all'interno del locus dell'antigene leucocitario umano HLA e che determinano una maggiore suscettibilità allo sviluppo delle patologie autoimmuni; ciò è dovuto al fatto che questo locus è deputato alla presentazione alterata dell'antigene. Inoltre, esistono anche altri loci non HLA che risultano essere coinvolti nella segnalazione delle citochine, nell'attivazione dei linfociti e nella regolazione immunitaria. Studi di associazione genomica (Genome-Wide association Study, GWAS) hanno permesso di identificare e studiare centinaia di loci di suscettibilità correlati allo sviluppo di diverse condizioni autoimmuni. Le associazioni più significative sono state riscontrate nel locus del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC); questi alleli incidono sulla presentazione dell'antigene alle cellule T helper, CD4⁺ e svolgono varie funzioni nel processo di selezione timica. Ad esempio, è noto che le varianti HLA-DRB1 sono correlate all'artrite reumatoide (AR) mentre HLA-DR3 e HLA-DR4 sono legate ad un aumento del rischio di diabete di tipo 1 (T1D). La regione del complesso maggiore di istocompatibilità MHC agisce sia sulla tolleranza centrale che sull'attivazione periferica delle cellule T autoreattive. È stato riscontrato che la predisposizione genetica, nonostante svolga un ruolo fondamentale nella suscettibilità ai disturbi autoimmuni, non è sufficiente a determinare da sola l'insorgenza della malattia. Infatti, nei gemelli omozigoti osservando i tassi di concordanza relativamente bassi (inferiori al 50%) delle malattie autoimmuni, si evidenzia il ruolo dei fattori ambientali nello sviluppo e nella progressione della malattia.

Tra i molteplici fattori ambientali in grado di innescare reazioni autoimmuni, gli agenti patogeni rivestono un ruolo cruciale andando ad esacerbare le risposte autoimmuni mediante meccanismi quale il mimetismo molecolare. Inoltre, anche le alterazioni della composizione del microbiota (disbiosi) possono essere considerate un fattore ambientale, in quanto possono compromettere la funzione regolatoria delle cellule Treg e sostenere l'infiammazione [2].

Dal momento che l'autoreattività è una caratteristica intrinseca delle cellule T e che quindi, ogni cellula T matura possiede un potenziale autoreattivo, la presenza di linfociti autoreattivi da sola è necessaria ma non sufficiente allo sviluppo della malattia. È noto, infatti, che le cellule autoreattive e gli autoanticorpi a basso titolo vengono comunemente rilevati anche in individui sani e con più frequenza nei fratelli di pazienti autoimmuni [2].

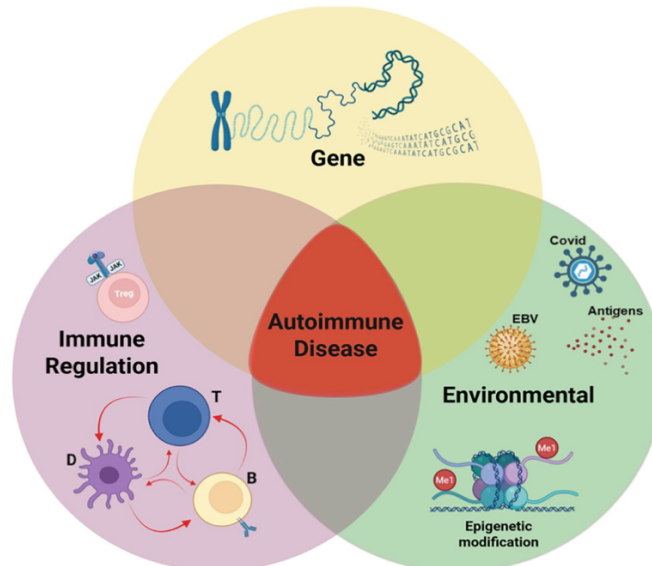


Figura 8: Patogenesi Malattie Autoimmuni: una malattia autoimmune si sviluppa quando convergono tre fattori, predisposizione genetica, esposizione a un fattore ambientale ed errori nella regolazione immunitaria[2]

È stato ampiamente dimostrato che la triade fattori genetico, ambientale e immunitario, influenzano l'insorgenza delle malattie autoimmuni, tuttavia, il peso relativo di ciascun meccanismo rimane ancora da chiarire [2].

L'insorgenza delle malattie autoimmuni è preceduta da una fase preclinica asintomatica che può durare anni prima della manifestazione della patologia, caratterizzata da un'attivazione immunitaria asintomatica e un'inflammatione silente, seguite da sintomi aspecifici. Nonostante la rilevanza di questa fase, le differenze temporali e biologiche tra le diverse patologie non sono ancora state del tutto chiarite. L'elemento distintivo di questo periodo di latenza è l'attivazione del sistema immunitario che, pur con entità diversa tra le varie malattie, risulta già evidente prima della comparsa dei sintomi.

La patogenesi delle malattie autoimmuni è determinata dall'interazione tra la componente cellulare del sistema immunitario e i fattori solubili, i quali regolano la risposta immunitaria attraverso l'attivazione e il reclutamento di cellule immunitarie. Oltre a mediare danni tissutali diretti, i fattori solubili che includono citochine, proteine del complemento e vari marcatori infiammatori, possono fungere da marcatori per monitorare la progressione della malattia [37].

È, ormai, ampiamente nota la correlazione tra autoimmunità e infiammazione. Tuttavia, risulta fondamentale distinguere tra autoimmunità e autoinfiammazione; la differenza principale risiede nel ramo del sistema immunitario che risulta alterato. Per distinguerle, occorre definire i concetti di immunità innata e adattativa. La prima rappresenta la barriera immediata contro lesioni e agenti patogeni; è rapida ma aspecifica, e vede come protagonisti monociti, macrofagi e neutrofili. La seconda, pur richiedendo tempi di attivazione più lunghi venendo innescata proprio dagli stimoli del sistema innato, offre una resistenza più mirata e duratura. È noto che entrambi questi meccanismi vanno ad agire sulla via di segnalazione TNF (fattore di necrosi tumorale), IL (interleuchina) e IFN (interferone) e che una iperattivazione di queste vie può indurre allo sviluppo di autoimmunità e autoinfiammazione. Nonostante entrambi i processi conducano a lesioni sistemiche, i percorsi che determinano il danno tissutale sono distinti: nell'autoinfiammazione il danno è mediato direttamente dal sistema immunitario innato, mentre per quanto riguarda l'autoimmunità è proprio il mantenimento dell'infiammazione che innesca il sistema adattativo con l'attivazione aberrante di linfociti B e T che innesca la produzione di autoanticorpi esacerbando il danno tissutale e sostenendo l'infiammazione [32].

Il trattamento delle patologie autoimmuni è volto al ripristino dell'omeostasi e al mantenimento dell'equilibrio del sistema immunitario, correggendo le risposte anomale. I principali approcci si articolano in quattro punti principali: la variazione della soglia di attivazione immunitaria, la modulazione antigene-specifica, il reset della componente immunitaria, tramite il trapianto di cellule staminali e, infine, la protezione dell'organo bersaglio [32].

1.5. Autoanticorpi

È noto che gli anticorpi prodotti dai linfociti B permettono al sistema immunitario di identificare e neutralizzare gli antigeni estranei. Talvolta, però, questo meccanismo di distinzione fallisce, portando alla produzione di autoanticorpi diretti contro i componenti stessi dell'organismo [38].

È necessario sottolineare che nel contesto delle MAIS, gli anticorpi coinvolti sono di classe IgG; tuttavia, possono anche far parte della classe delle IgM e IgA che sono però associate a peggiori prognosi [3].

Le malattie autoimmuni sono caratterizzate dalla presenza di diversi autoanticorpi circolanti che a seconda dell'antigene che viene riconosciuto, vengono suddivisi in cinque classi: autoanticorpi verso antigeni organo-specifici (enzimi), verso ormoni, verso recettori di membrana, verso antigeni di superfici e verso antigeni non organo-specifici [34].

Inoltre, gli autoanticorpi possono essere classificati in tre gruppi in base al danno che causano: anticorpi patogenetici, anticorpi non patogenetici ed epifenomeni.

Gli anticorpi patogenetici hanno la capacità di provocare lo sviluppo della patologia *in vivo* e *in vitro* e tra questi ritroviamo gli anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina, anti-fattore intrinseco e anti-recettore dell'ormone tireostimolante (TSH). Una loro caratteristica è quella di avere un andamento lineare con la patologia: il loro aumento e la loro persistenza determinano un peggioramento della patologia mentre un loro decremento è indice di remissione e guarigione.

Gli anticorpi non patogenetici, invece, a differenza dei precedenti non sono in grado di causare direttamente la patologia e ne sono due esempi gli anticorpi anti-tireoglobulina e anti-tireoperossidasi. La loro concentrazione non è correlata con l'andamento della patologia; infatti, possono essere identificati anche in soggetti sani che non hanno sviluppato la patologia. [35]

Gli epifenomeni sono anticorpi che tendono ad essere transitori e che hanno origine a seguito di necrosi tessutale che può essere batterica, tossica, traumatica o chirurgica. Le malattie in cui si rilevano non presentano nessun altro dei criteri fondamentali delle patologie autoimmuni. Gli anticorpi che rappresentano questa classe sono gli anticorpi anti-muscolatura liscia nelle epatiti e gli anti-gamma globuline nelle infezioni.[35]

Inoltre, gli autoanticorpi possono essere suddivisi in cinque categorie principali: anticorpi intracellulari citoplasmatici e nucleari (ANA), anticorpi anti-citoplasma dei granulociti neutrofili (ANCA), anticorpi anti-peptidi citrullinati (ACPA), anticorpi anti-immunoglobuline (FR) e anticorpi antifosfolipidi (aPL).

Dal punto di vista clinico, vengono classificati anche in base alla loro funzione come marcatori patogenetici, predittivi, diagnostici e prognostici di malattia.

I marcatori patogenetici svolgono un ruolo diretto e attivo nella patogenesi della malattia, come gli autoanticorpi anti-DNA a doppia elica (anti-dsDNA) nel caso del LES. Invece, i marcatori predittivi sono considerati indicatori, in quanto segnalano il rischio di insorgenza della patologia in soggetti sani, manifestandosi molti anni prima del sorgere della patologia e delle manifestazioni cliniche; tra questi troviamo il FR nell'artrite reumatoide e anti-RNA polimerasi I-III nella sclerosi sistemica SSC. Per quanto riguarda i marcatori diagnostici, questi possiedono un'elevata specificità per determinate malattie reumatiche autoimmuni e risultano poco presenti in soggetti sani o con altre patologie, alcuni esempi sono: anti-antigene Jo-1 nella polimiosite, ACPA nella artrite reumatoide e anti-dsDNA nel LES. Gli autoanticorpi prognostici, infine, indicano l'andamento e il grado di attività della malattia reumatica autoimmune e sono utilizzati come marcatori predittivi del decorso della patologia. Ne

esistono di diversi tipi come gli ANCA nelle vasculiti, gli ACPA per il monitoraggio delle lesioni articolari nell'artrite reumatoide, l'anti-dsDNA nel LES e l'anti-componente 1q del complemento per la riacutizzazione [36].

Il ruolo degli autoanticorpi in alcuni casi è ambivalente, infatti, determinati autoanticorpi possono svolgere un ruolo attivo nella protezione dell'individuo. Nel caso della malaria, ad esempio, sembrano contribuire alla patogenesi di complicanze gravi quali l'anemia, l'insufficienza renale acuta e la sindrome da distress respiratorio. Al contempo, però, la risposta anticorpale stimolata dall'infezione può partecipare alla protezione dell'ospite. È stato, inoltre, osservato che i pazienti affetti da alcune patologie autoimmuni presentano un minor rischio di sviluppare neoplasie. Gli autoanticorpi possono anche essere dei preziosi biomarcatori, offrendo un sostegno fondamentale nella diagnosi, nella prognosi e nel monitoraggio terapeutico delle malattie. La maggiore stabilità degli autoanticorpi in vivo rispetto ai relativi antigeni ne facilita spesso il rilevamento, rendendoli marcatori più efficaci. Mentre molti antigeni circolanti hanno un'emivita di poche ore o giorni, gli autoanticorpi persistono nel sangue per diverse settimane, in particolare rimangono stabili per oltre un anno a -20 °C e per periodi ancora più lunghi se conservati a -80 °C, garantendo una finestra diagnostica e analitica molto più ampia [38].

Questi autoanticorpi da soli non sono considerati sempre diagnostici per la malattia, infatti, in alcuni casi è possibile osservarne la presenza in seguito ad infezioni, traumi, uso di farmaci e lesioni. Tuttavia, nel caso in cui gli autoanticorpi siano persistenti, questi potrebbero rappresentare un possibile sviluppo di malattie autoimmuni [27]. Infatti, in diverse patologie autoimmuni, la diagnosi risulta possibile grazie alla combinazione tra quadro clinico e identificazione di autoanticorpi specifici. Inoltre, tali marcatori possono essere rilevati nel siero con largo anticipo, talvolta molti anni prima, rispetto alla manifestazione dei sintomi clinici. Al contrario, la diagnosi risulta notevolmente più complessa per le patologie autoimmuni sistemiche che presentano autoanticorpi capaci di colpire simultaneamente diversi organi e apparati, come l'artrite reumatoide e il lupus eritematoso sistemico [38].

Le malattie autoimmuni possono essere considerate malattie da anticorpi multipli che presentano fenotipi eterogenei: sono stati sviluppati dei test immunologici multiparametrici che sono capaci di misurare diversi anticorpi in contemporanea. Il profilo anticorpale possiede una sensibilità analitica elevata che permette una classificazione migliore della malattia e dei vari sottotipi a seconda delle manifestazioni cliniche. Un altro ruolo fondamentale di questi test multiparametrici è quello nella medicina personalizzata; infatti, permettono una diagnosi differenziale di diverse malattie con manifestazioni simili [39].

MALATTIA	AUTOANTIGENI
Vascolite associata agli ANCA	MPO, PR3, GBM
Sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi	Cardiolipina, beta2-glicoproteina I, PS/PT
Miosite autoimmune	Jo-1, PL-7, PL-12, EJ, OJ, Ha, Zo, KS, PM-Scl, Ku, Mi-2, MDA-5, TIF1-gamma, NXP2, SAE, particelle di riconoscimento del segnale (SRP), 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA riduttasi, cN1A/NT5c1A/Mup44
Artrite reumatoide	Proteine carbamilate (CarP), peptide citrullinato ciclico (CCP), anti-peptidil-arginina deaminasi 3, fattore reumatoide
Connettiviti	Sm, U1RNP, Ro60, Ro52/TRIM21, La, CENP-B, Topo I, Jo1, PCNA, PM-Scl, RibP, DFS70, dsDNA (DNA a doppio filamento), nucleosomi, istoni
Sclerosi sistemica	CENP-A/B, Topo I, PM-Scl, RNA polimerasi III, Ku, fibrillarina, NOR90, Th/To (hPOP1), PDGFR
Epatite autoimmune / PBC (Cirrosi biliare primitiva)	F-actina, cit P450 IID6 (LKM1), M2/PDC, SLA, LC1, gp210, sp100, esochinasi-1, kelch-like 12
Celiachia	Endomisio, transglutaminasi tissutale, peptidi della gliadina deamidata
Sindrome di Guillain-Barré / Sindrome di Miller-Fisher	GM1-4, GD1-3, GT/Q1
Sindrome neurologica paraneoplastica	Hu, Yo, Ri, CV2, Ma1/2, anfifisina, recoverina, SOX1, titina, Zic4, acido glutammico decarbossilasi da 65-kD, Tr (DNER)
Gastrite autoimmune / Anemia perniciosa	H+/K+ ATPase, fattore intrinseco
Malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI)	Lattoferrina, ASCA, MZGP2

Tabella 4: Elenco delle malattie autoimmuni e dei rispettivi antigeni [39]

Sebbene l'autoreattività verso un singolo antigene, come è possibile notare nella tabella 4, possa offrire informazioni fondamentali, risulta non sufficiente ai fini diagnostici. È pertanto fondamentale ottenere un profilo completo degli autoanticorpi per una diagnosi accurata della malattia autoimmune. Questa strategia si basa sul principio che nonostante la bassa frequenza dei singoli anticorpi, la loro analisi combinata associata poi al profilo, garantisce un'elevata sensibilità diagnostica preservando allo stesso tempo un'alta specificità. Tuttavia, è importante sottolineare che esistono dei limiti di

rilevamento di alcuni antigeni come nel caso di patologie quali il diabete di tipo 1 o le malattie tiroidee autoimmuni. Come precedentemente detto, gli autoanticorpi sierici possono essere presenti molto tempo prima dell'insorgenza clinica di malattie autoimmuni e questo vale per gli anticorpi diretti contro gli antigeni intracellulari. Diversamente, quando ci si riferisce ad anticorpi contro proteine extracellulari è possibile considerare la rilevazione di autoanticorpi direttamente con la diagnosi della patologia [39].

Dunque, è noto che le malattie autoimmuni possono presentare autoanticorpi diretti contro un solo o pochi autoantigeni oppure possono coesistere autoanticorpi che attaccano più bersagli. Nonostante il genoma umano codifichi 20.000 proteine, è noto che circa 100 di queste rappresentano i bersagli antigenici più comuni.

Tuttavia, oltre agli antigeni già noti, lo studio sempre più approfondito di malattie rare, ha riportato un numero sempre maggiore di autoanticorpi, suggerendo che lo spettro delle patologie sostenute da meccanismi autoimmuni potrebbe essere molto più esteso di quanto ipotizzato. Si distinguono autoanticorpi che hanno come bersaglio le proteine extracellulari, intracellulari o una miscela di entrambe. Gli autoantigeni intracellulari sono considerati come biomarcatori autoimmuni per varie malattie reumatologiche, tra cui la sindrome di Sjögren, il Lupus Eritematoso Sistemico, la sclerosi sistemica e la miosite; sono antigeni difficilmente raggiungibili dagli autoanticorpi.

Per quanto riguarda invece gli antigeni extracellulari, a differenza di quelli intracellulari, sono facilmente raggiungibili dagli autoanticorpi e tra i vari bersagli sono presenti proteine secrete, canali di superficie cellulare e diversi recettori. Inoltre, gli anticorpi diretti contro gli antigeni extracellulari sono in grado di portare direttamente allo sviluppo della patologia agendo direttamente sulla funzione delle proteine. È noto che i linfociti T svolgono un ruolo chiave nella distruzione delle cellule e dei tessuti nelle malattie autoimmuni in cui sono presenti autoanticorpi diretti contro le proteine intracellulari. Tuttavia, sono stati studiati altri meccanismi, tra cui il mimetismo molecolare e come le proteine si modifichino in risposta ad una infiammazione, volti a spiegare in quale modo queste proteine diventino il bersaglio dei linfociti B [40].

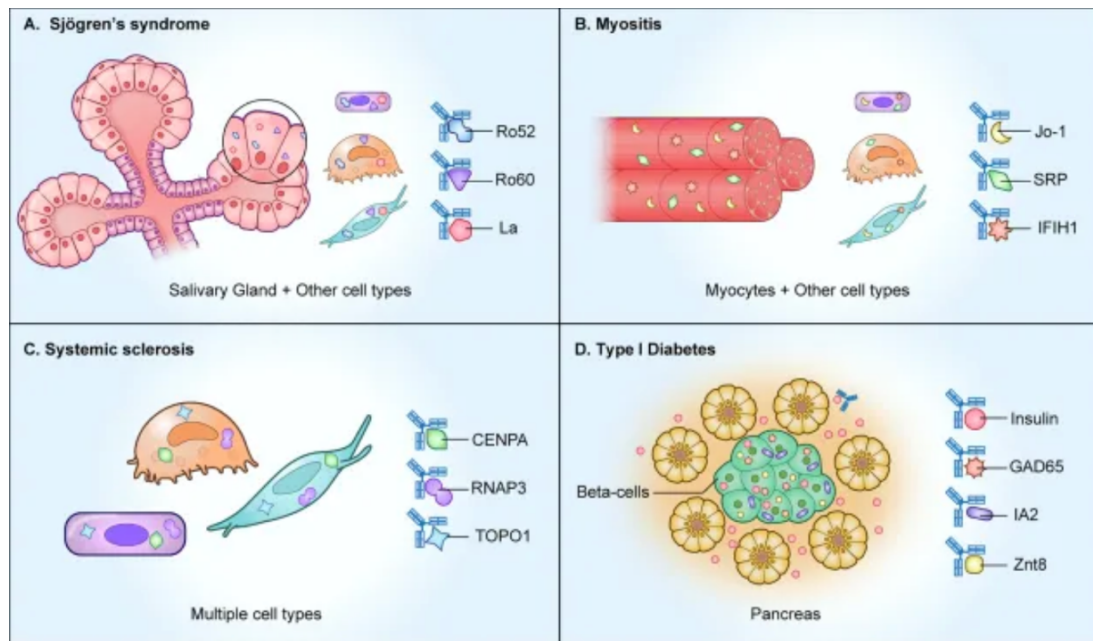


Figura 9: Autoanticorpi diretti contro proteine intracellulari nelle malattie autoimmuni [40]

Per quanto riguarda gli autoanticorpi diretti contro gli antigeni extracellulari questi sono in grado di portare direttamente allo sviluppo della patologia agendo direttamente sul funzionamento delle proteine. Questo meccanismo è indotto dal legame dell'autoanticorpo direttamente alla proteina extracellulare, che modifica la funzione della proteina o di una cascata di segnale e dall'attivazione del sistema del complemento. Affinché un autoanticorpo verso un target extracellulare (anche detto autoanticorpo patogeno) sia classificato come tale, è necessario che presenti 3 diversi requisiti: l'autoanticorpo deve essere assente in individui sani o con altre malattie e allo stesso tempo deve essere correlato con la presentazione clinica della patologia, l'autoantigene a cui si lega l'autoanticorpo deve essere collocato nel tessuto malato e i livelli di autoanticorpi rilevati devono essere associati ai sintomi clinici della malattia. Questi autoanticorpi patogeni contro *target* extracellulari possono essere presenti in diverse malattie autoimmuni come la Miastenia grave, la Malattia di Graves e la Sindrome da immunodeficienza da autoanticorpi anti-interferone-gamma [40].

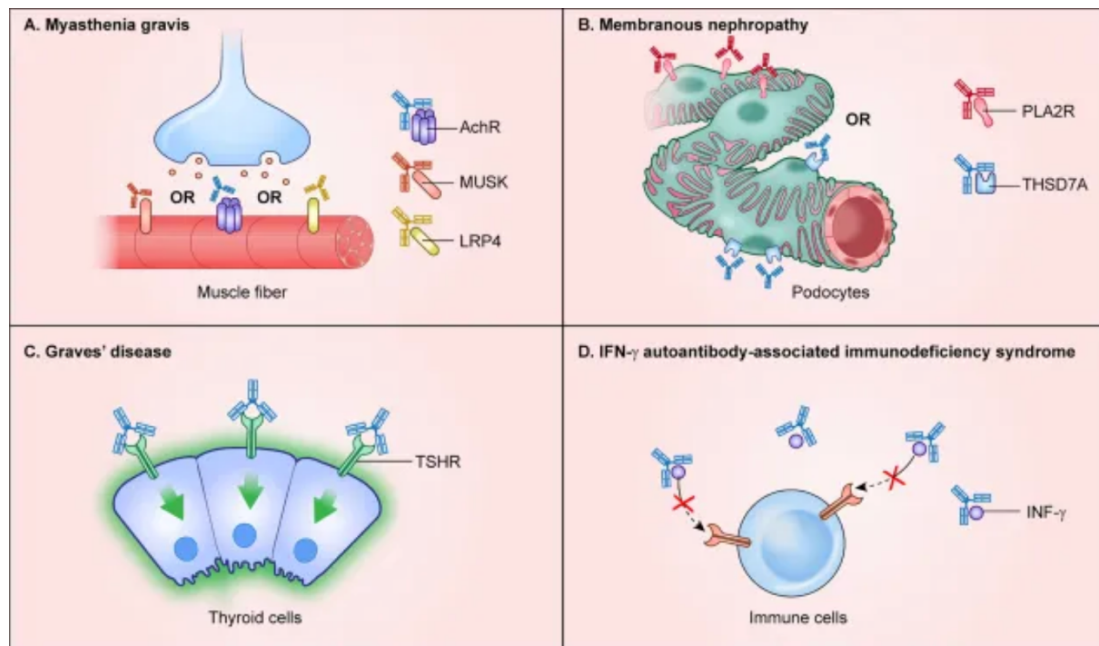


Figura 10: Autoanticorpi diretti contro proteine extracellulari bersaglio in malattie autoimmuni. Gli autoanticorpi che bersagliando proteine extracellulari causano direttamente la patogenesi della malattia [40]

1.5.1. Autoanticorpi antinucleo ANA

Gli autoanticorpi antinucleo (ANA) sono autoanticorpi che attaccano il nucleo delle cellule sane e possono essere considerati marker per vari disordini autoimmuni come il Lupus Eritematoso Sistemico. Gli anticorpi antinucleari, quindi, rappresentano i principali marcatori per la diagnosi di varie malattie autoimmuni sistemiche. Tuttavia, la loro presenza non è esclusiva di queste patologie; è possibile, infatti, riscontrare la loro presenza anche in individui sani, pazienti con infezioni virali e che seguono terapie con farmaci che possono condurre ad un aumento degli ANA. La determinazione di questi anticorpi risulta fondamentale nell'identificazione e nella diagnosi delle malattie autoimmuni. La positività agli ANA da sola non è sufficiente per diagnosticare una determinata patologia; tuttavia, nel momento in cui la positività agli ANA viene associata a determinati sintomi clinici, questa ne permette una diagnosi accurata. Il dosaggio degli ANA ha una significatività in patologie come LES, sclerosi sistemica e sindrome di Sjögren [4].

Il dosaggio degli ANA consente insieme a determinate manifestazioni cliniche, di identificare patologie diverse. Tuttavia, è noto che la presenza di ANA in soggetti sani può essere stimolata da diverse alterazioni immunologiche intrinseche. Studi recenti confermano che una persona su cinque può esprimere questi autoanticorpi. Questi soggetti, di solito, non tendono a sviluppare malattie autoimmuni; tuttavia, non è ancora stato confermato se elevati livelli di questi anticorpi siano in grado di danneggiare direttamente l'organismo [4].

L'analisi degli ANA è considerata il test per lo screening è il test di immunofluorescenza, IFI. Questa metodologia si basa sull'utilizzo delle immunoglobuline antiumane marcate con fluorescenza in

modo da identificare la presenza di ANA nel campione. Il substrato utilizzato per questo test sono le cellule Hep-2 che vengono coltivate in modo tale da rendere i loro nuclei accessibili al legame con gli autoanticorpi; inoltre, gli anticorpi sono marcati in modo da permetterne la visualizzazione al microscopio a fluorescenza [4].

Vengono utilizzate le cellule HEp-2 rispetto ai substrati murini poiché sono caratterizzate da una popolazione cellulare omogenea derivante da carcinoma laringeo. Questo substrato, caratterizzato da strutture nucleari ben definite, offre una fluorescenza chiara in quanto permette l'identificazione di antigeni legati a fasi specifiche del ciclo cellulare e di conseguenza di determinare *pattern* specifici [3].

Questo metodo non solo permette la conferma della presenza degli ANA nel campione, ma tramite il riconoscimento di diversi *pattern* consente un sostegno nella diagnosi di malattie autoimmuni.

Quando il *pattern* di fluorescenza non risulta chiaro nei laboratori è possibile effettuare delle diluizioni singole durante lo screening iniziale, come 1:160, 1:320 e 1:640. Tuttavia, è importante notare che alcuni pazienti possono risultare falsi positivi in quanto può presentarsi un legame aspecifico tra anticorpi e antigeni che possiedono epitopi simili a quelli ricercati [4].

Dunque, i titoli di screening inferiori a 1:80 sono considerati negativi, mentre valori superiori indicano positività. Tuttavia, una reale significatività clinica si riscontra a partire da titoli superiori o pari a 1:160, diluizione oltre la quale è raccomandato eseguire ulteriore analisi in modo da diagnosticare un'eventuale malattia autoimmune [3].

Il test IFA HEp-2 permette l'identificazione di decine di autoanticorpi orientati contro antigeni intracellulari. Il *pattern* di fluorescenza HEp-2 IFA riflette la distribuzione degli autoantigeni nei diversi compartimenti durante le fasi del ciclo replicativo. Tale caratteristica permette di identificare indirettamente i bersagli molecolari. Grazie a questa capacità analitica, il metodo HEp-2 IFA ha permesso di isolare e identificare gli autoanticorpi come, ad esempio, quelli che rivolti contro i centromeri, l'antigene nucleare delle cellule proliferanti, ribonucleoproteina U3/fibrillarina e proteina centromerica F (CENP-F). Questa metodologia si compone di più fasi e un limite è rappresentato da un'alta soggettività nell'interpretazione dei risultati da parte dello specialista. Inoltre, bisogna tenere conto del crescente numero di produttori di dispositivi diagnostici *in vitro* che determinano una maggiore eterogeneità nei pattern ottenuti da questa analisi [41].

A partire dal 2000, numerosi gruppi di esperti hanno formulato linee guida per armonizzare e uniformare le procedure e l'interpretazione del test HEp-2 IFA. In linea con tali indicazioni, il Comitato per la Standardizzazione degli Autoanticorpi, affiliato all'Unione Internazionale delle Società Immunologiche (IUIS), ha promosso il Consenso Internazionale per la definizione e l'identificazione dei *pattern* ANA (ICAP). Il sito web ICAP racchiude un insieme di classificazioni

con circa 30 modelli HEp-2 IFA definiti dall'ICAP. Inoltre, contiene immagini HEp-2 IFA con corrispondenti descrizioni del *pattern*, indicazioni sui bersagli degli autoanticorpi e relativa valenza clinica, documentata da una accurata revisione della letteratura [41].

Dunque, l'obiettivo dell'ICAP è favorire un confronto per definire un'approvazione comune, uniformando l'interpretazione dei *pattern* ANA valutati in immunofluorescenza indiretta su cellule HEp2 [42].

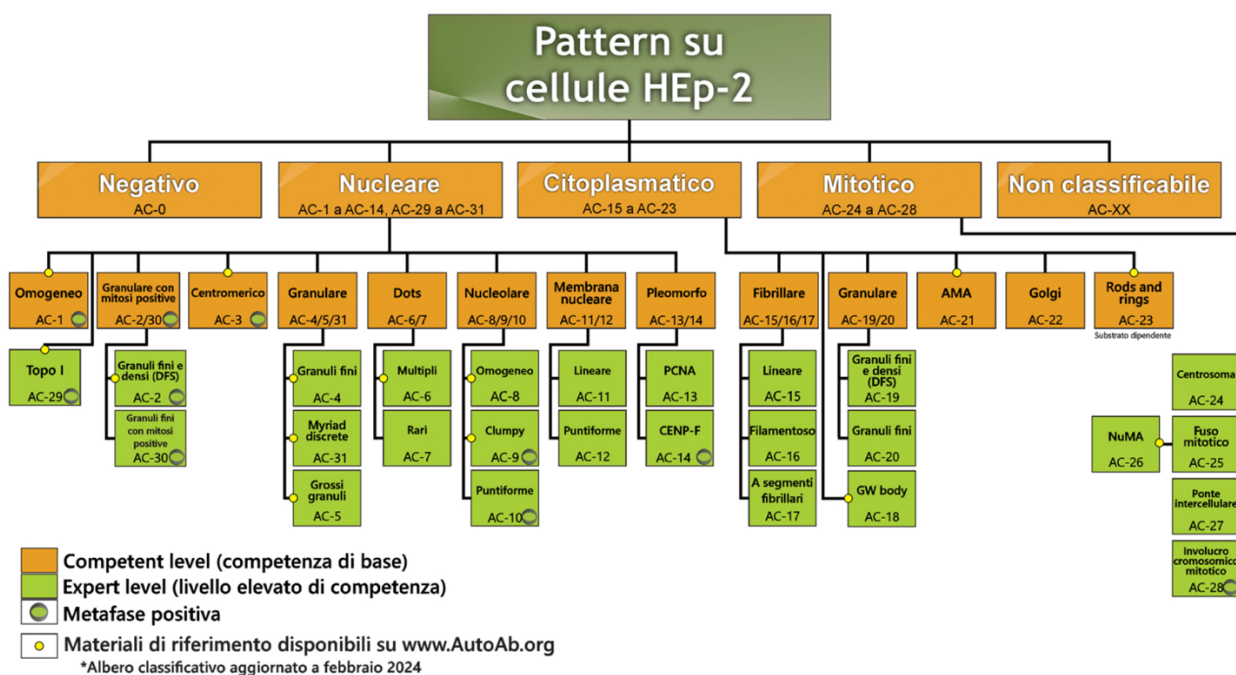


Figura 11: Nomenclatura e classificazione dei pattern HEp-2 [42]

L'analisi al microscopio a fluorescenza permette di identificare differenti *pattern*, i quali mostrano gli specifici antigeni nucleari, citoplasmatici o mitotici bersagliati dagli autoanticorpi. Come precedentemente detto, questa classificazione comprende 30 *pattern* diversi, un *pattern* negativo (AC-0) e 29 varianti positive, catalogate da AC-1 a AC-29 e ripartite in tre gruppi: nucleari, citoplasmatici e mitotici. Ognuno di questi *pattern* permette di identificare il probabile antigene bersaglio e dà informazioni sulla diagnosi della malattia.

Inoltre, esistono dei test di conferma come il saggio immunoenzimatico ELISA o saggio immunoenzimatico fluorescente su fase solida FEIA che determinano l'antigene bersaglio [43].

Nonostante i *pattern* di fluorescenza comuni presentano associazioni clinico-immunologiche ben consolidate si sta cercando di migliorare il grafico di classificazione delle Hep-2 in modo da rendere più semplice l'interpretazione dei risultati [41]. I *pattern* che si osservano più spesso nella pratica clinica sono: *pattern* nucleare omogeneo (AC-1), *pattern* a grossi granuli (AC-5), *pattern* centromerico (AC-3), *pattern* citoplasmatico reticolare/AMA (AC-21).

Il *pattern* nucleare omogeneo (AC-1) presenta una fluorescenza che si distribuisce in modo omogeneo in tutto il nucleoplasma. In particolare, la colorazione dei nucleoli varia a seconda del substrato cellulare impiegato; inoltre, durante le fasi mitotiche è possibile osservare che la cromatina manifesta una fluorescenza di tipo omogeneo. Gli antigeni bersaglio correlati a questo *pattern* sono DNA a doppio filamento (dsDNA), istoni e nucleosomi. Dal punto di vista clinico, questo *pattern* è tipico di patologie quali lupus eritematoso sistemico, epatite cronica autoimmune e artrite idiopatica giovanile [42].

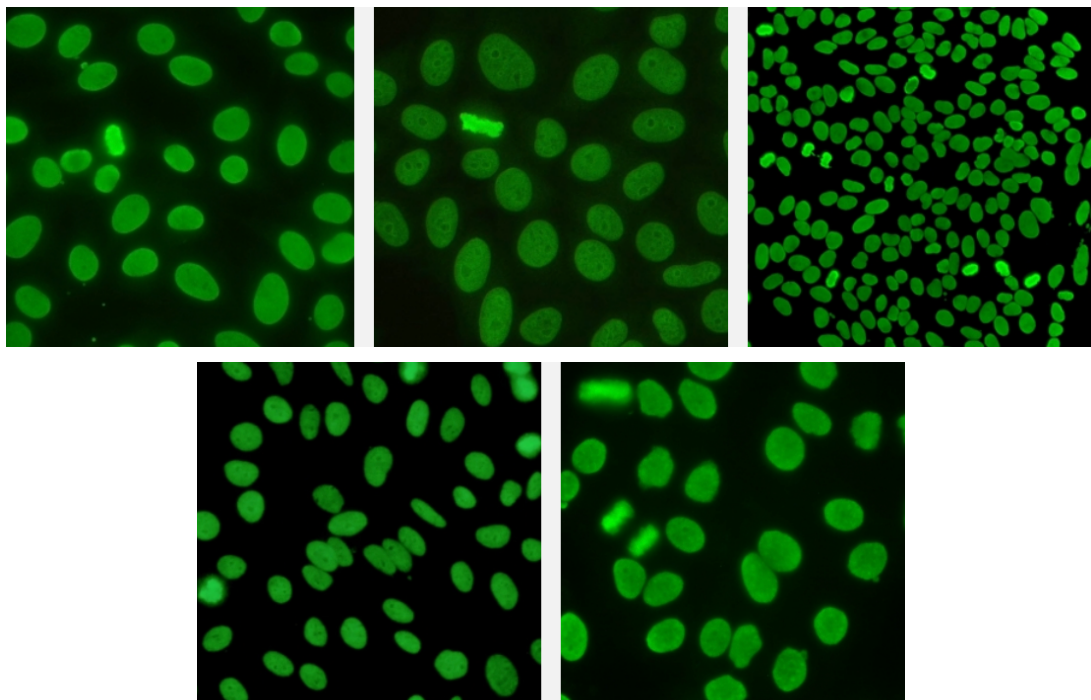


Figura 12: *pattern* nucleare omogeneo (AC-1)

Il *pattern* centromerico (AC-3) è caratterizzato da un nucleoplasma con una fluorescenza puntiforme con 40-80 punti per cellula; durante la mitosi, la fluorescenza si allinea in corrispondenza della cromatina, come si osserva tipicamente in presenza di anticorpi anti-CENP-B. Gli antigeni bersaglio in questo caso sono le proteine centromeriche (CENP-A/B).

Questo *pattern* è spesso riscontrato in pazienti affetti da Sclerosi Sistemica limitata cutanea, soprattutto se associato al fenomeno di Raynaud [42].

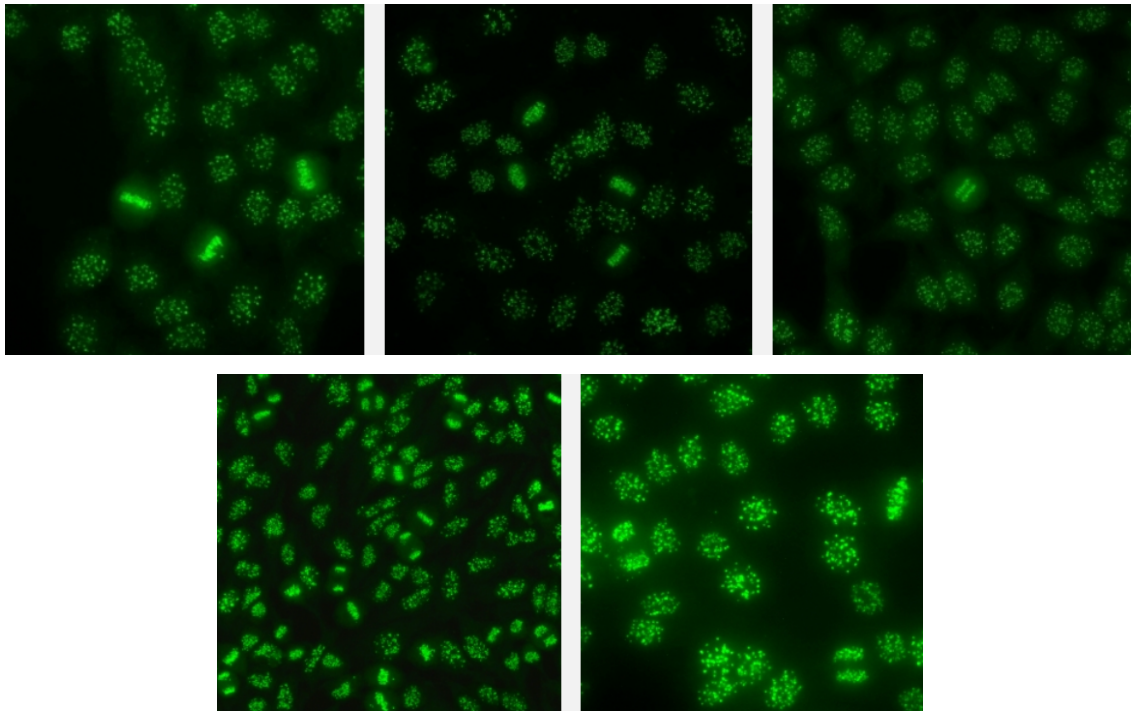
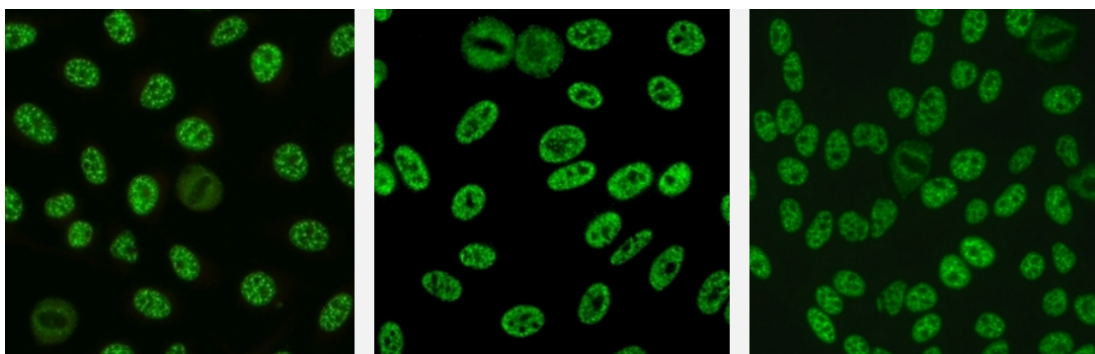


Figura 13: *pattern* centromerico (AC-3)

Per quanto riguarda invece il *pattern* a grossi granuli (AC-5), il nucleoplasma, mostra una marcata fluorescenza di tipo granulare grossolano, mentre, per quanto riguarda i nucleoli questi possono presentare o meno fluorescenza. Al contrario, durante la fase mitotica, la cromatina risulta negativa. Questo *pattern* è associato ad antigeni bersaglio quali ribonucleoproteina nucleare eterogenea (hnRNP), ribonucleoproteina U1 (U1RNP), antigene Smith (Sm) e RNA polimerasi III, riscontrabili in diverse malattie reumatiche autoimmuni sistemiche (SARD). Tale profilo si rileva nel LES, nella sclerosi sistemica (SSc) e nella connettivite mista (MCTD), nelle sindromi di overlap, SSc-AIM e nella connettivite indifferenziata (UCTD) [42].



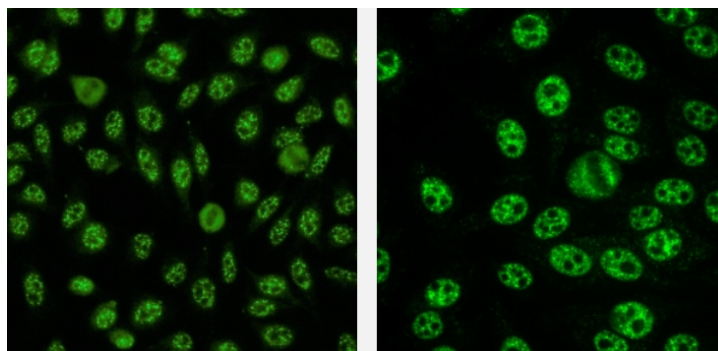


Figura 14: *pattern* nucleare a grossi granuli (AC-5)

Il *pattern* citoplasmatico reticolare AMA (AC-21) presenta una fluorescenza citoplasmatica granulare grossolana e filamentosa; è tipica degli anticorpi anti-mitocondrio (AMA). Gli antigeni bersaglio sono Subunità E2 del complesso della piruvato deidrogenasi (PDC-E2/M2), la subunità E2 del complesso della chetoacido deidrogenasi a catena ramificata (BCOADC-E2), la subunità E2 del complesso dell'alfa-chetoglutarato deidrogenasi (OGDC-E2), la subunità E1 α del complesso della piruvato deidrogenasi (PDC) e la proteina X (E3BP).

Questo profilo si riscontra nella colangite biliare primitiva (CBP), nella sclerosi sistemica (SSc) e in altre malattie reumatiche autoimmuni sistemiche [42].

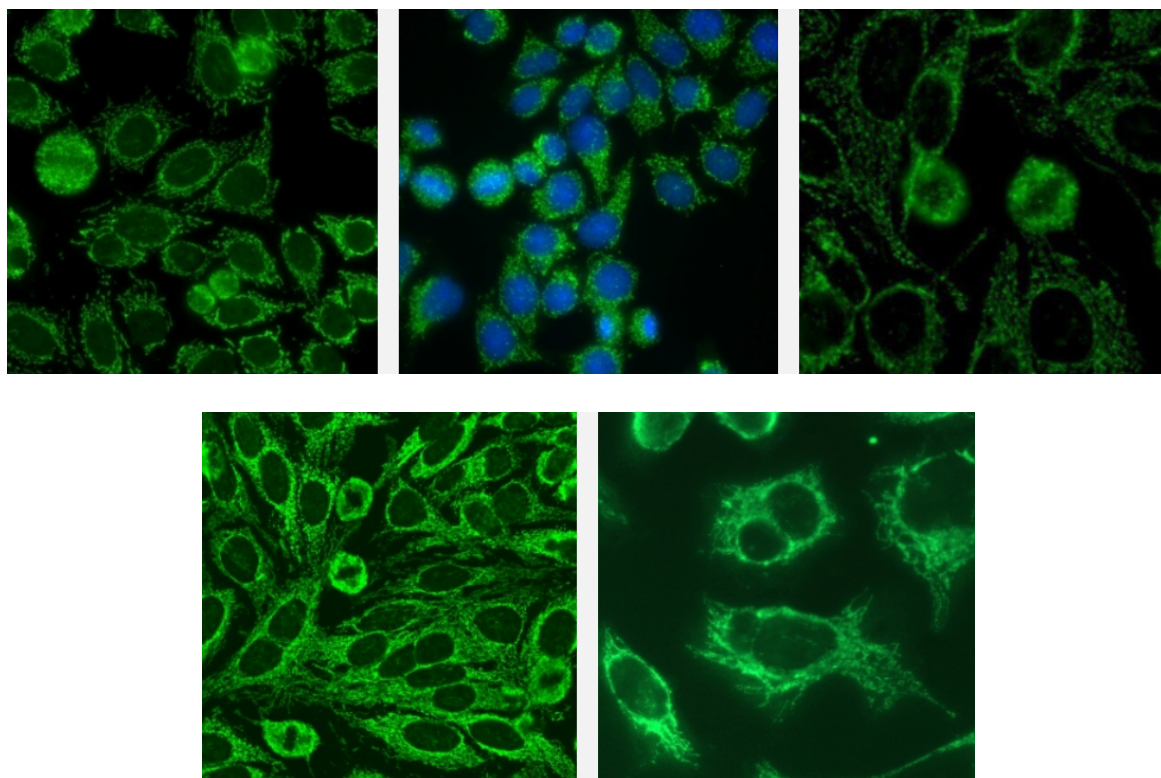


Figura 15: *pattern* citoplasmatico reticolare AMA (AC-21) [42]

Come precedentemente detto, l'obiettivo principale del comitato scientifico internazionale ICAP è quello di standardizzare la diagnostica autoimmune. In particolare, tramite la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta (IFI), è stato possibile superare la semplice divisione netta tra positivo e negativo, in quanto questa analisi esprime un titolo e un *pattern*. Il titolo possiede un valore clinico fondamentale, infatti, a titoli più elevati corrisponde una probabilità più alta di rilevare e quindi di diagnosticare delle malattie reumatiche associate agli ANA. Parallelamente, una concentrazione più elevata di anticorpi incrementa la possibilità di determinare l'antigene specifico [44].

1.6. PCR

La proteina C-reattiva (PCR) è una proteina che viene sintetizzata principalmente nelle cellule epatiche del fegato, ma anche dal tessuto adiposo, dai macrofagi e dalle cellule endoteliali; è una proteina pentamerica (pentraxina) che è altamente conservata ed è inoltre considerata come un biomarcatore per quanto riguarda l'infiammazione e il danno tissutale. Oltre a questo, la PCR è anche coinvolta nella regolazione dei processi fisiologici dell'infiammazione e delle malattie autoimmuni. Il gene CRP è localizzato nel locus 1q23.2 del cromosoma 1 e viene attivato in seguito a danni ai tessuti [45].

Per quanto riguarda il processo di espressione del gene della PCR nella fase acuta dell'infiammazione, questo meccanismo non è stato completamente spiegato; tuttavia, è stato studiato un fattore situato a monte del promotore del gene PCR che sembra essere fondamentale per l'espressione di questa proteina [5].

In caso di infezione, infatti, le cellule immunitarie quali macrofagi e monociti iniziano a secernere citochine pro-infiammatorie, come IL-6, TNF- α e l'interleuchina 1 β (IL-1 β), che una volta secrete queste citochine vanno a legarsi ai rispettivi recettori IL-6R, TNFR1, IL-1R1 attivando e amplificando così la risposta infiammatoria. A seguito del legame, viene attivata una cascata di segnali che conduce all'attivazione di determinati fattori di trascrizione che svolgono diverse azioni sul promotore del gene CRP [45].

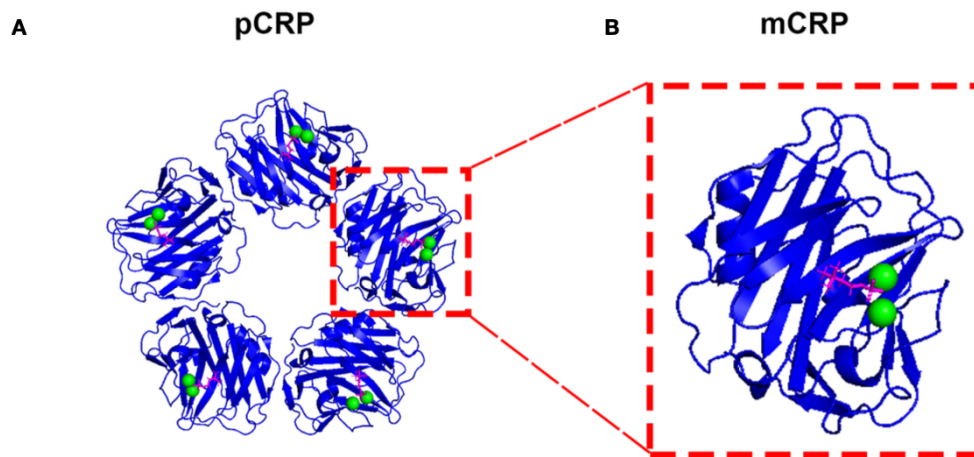


Figura 16: Struttura della CRP [46]

In particolare, la PCR che viene prodotta dal fegato è denominata PCR pentamerica (pCRP) ed è una proteina solubile che possiede una emivita di circa 19 ore. È stato osservato che questa proteina non è localizzata direttamente nella sede del danno tissutale; questo fenomeno è stato spiegato dal fatto che la pCRP è in grado di dissociarsi in subunità monomeriche, le PCR monomeriche (mCRP). Dal punto di vista della struttura, la pCRP presenta cinque subunità uguali disposte a pentamero ciclico e ogni subunità è rappresentata da una mCRP. La denaturazione, la proteolisi e l'ossidazione che inducono la dissociazione della pCRP in mCRP. In sintesi, la pCRP, a seguito del legame con patogeni o componenti cellulari danneggiate, si dissocia in mCRP che sono coinvolte nel reclutamento di cellule coinvolte nell'infiammazione [45].

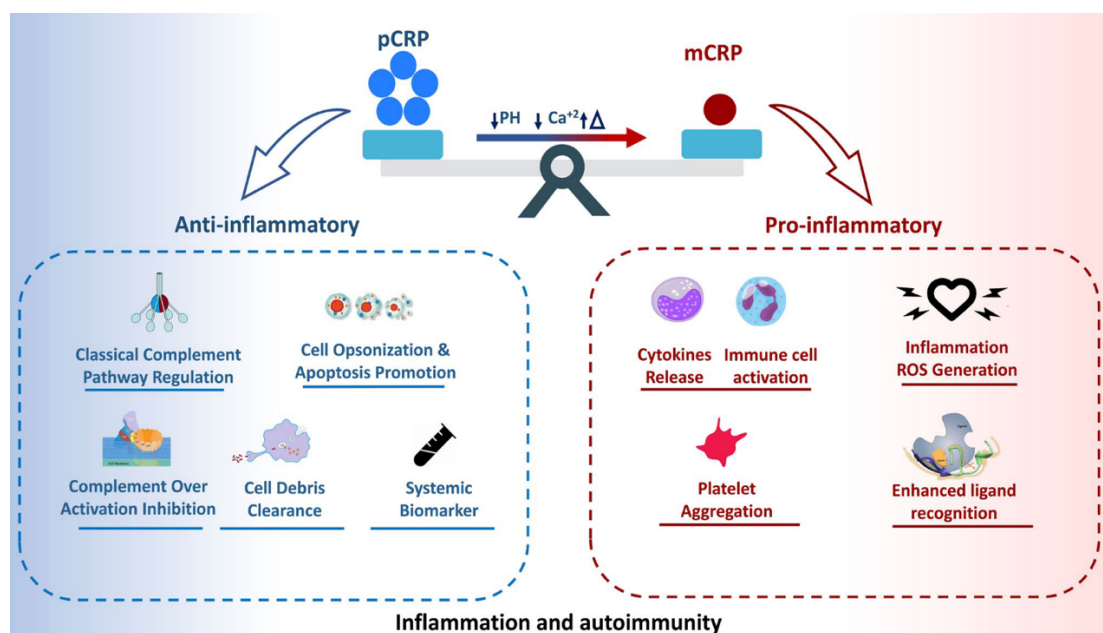


Figura 17: Ruolo della pCRP e della mCRP nelle malattie autoimmuni[45]

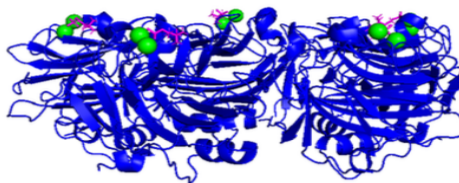
Quindi, la PCR, possiede una doppia funzione a seconda della conformazione che assume: una funzione risulta essere principalmente antinfiammatoria, mentre l'altra partecipa attivamente alla regolazione immunitaria. In presenza di determinate condizioni, avviene un cambiamento conformazionale che porta alla dissociazione della pPCR in mCRP che ha un ruolo attivo sul danno tissutale ed è, inoltre, in grado di amplificare alcune malattie immunitarie. È possibile considerare la proteina C-reattiva da un lato un biomarcatore infiammatorio e dall'altro un mediatore a valle della risposta d'infiammazione di fase acuta. Durante l'infiammazione le citochine proinfiammatorie, aumentano i livelli di PCR mantenendo lo stato d'infiammazione; allo stesso modo una diminuzione dei suoi livelli, indica la remissione dell'infiammazione. Inoltre, esistono alcune isoforme della PCR in grado di attivare l'apoptosi, la via del complemento e la fagocitosi, mentre altre sono capaci di ritardare l'apoptosi e reclutare diverse citochine nei siti di infiammazione [47].

La PCR viene considerata come biomarcatore in quanto possiede tre criteri fondamentali:

- La specificità del legame della PCR con il ligando vale per sostanze contenenti fosfolipina,
- In seguito al legame con il ligando è in grado di attivare la via classica del sistema del complemento.
- È in grado di legarsi con i recettori del frammento cristallizzabile (Fc) anche in assenza del rispettivo ligando [5]

La PCR sierica viene considerata un marcatore non specifico dell'infiammazione nel trattamento delle patologie infiammatorie, in quanto, il suo livello sierico aumenta durante gli stati infiammatori. Inoltre, la PCR presenta tre diverse conformazioni che sono state ampiamente studiate: PCR pentamerica nativa, PCR pentamerica non nativa (conformazione che risulta essere transitoria) e mCRP. Vista la sua forma pentamerica, la PCR mostra due funzioni principali: la prima di riconoscimento, mentre l'altra effettrice. Ed è l'associazione di queste due porzioni che consente l'attivazione dell'infiammazione [5].

Recognition face



Effector face

Figura 18: Immagine della vista laterale della forma pentamerica della PCR. [46]

Come precedentemente detto, sono presenti due porzioni: una denominata “faccia di riconoscimento”, che favorisce il legame con il ligando, mentre l'altra detta “faccia effettrice” che presenta una singola elica α capace di legare ligandi specifici quali il componente 1q del complemento (C1q) [46]. Studi recenti hanno dimostrato che esiste una correlazione tra PCR, mCRP e autoimmunità. È stato dimostrato che normalmente il ruolo della PCR risulta essere benefico nelle condizioni autoimmuni, in quanto aiuta nella rimozione dei complessi immunitari, che hanno finito di svolgere il loro ruolo, tramite l'attivazione del complemento, l'opsonizzazione e della fagocitosi. In particolare, uno studio effettuato sull'artrite infiammatoria ha dimostrato che i topi transgenici che esprimevano livelli aumentati di PCR hanno mostrato una diminuzione significativa dell'infiammazione articolare, mentre i topi che mostravano deficit di PCR, presentavano un peggioramento nella gravità della patologia. Per quanto riguarda, invece, la mCRP questa sembra svolgere un ruolo negativo nelle patologie autoimmuni. Infatti, in alcune malattie autoimmuni, sono stati osservati elevati livelli di mCRP. Infatti, è molto probabile che esista un coinvolgimento di questo monomero nella sintesi di autoanticorpi e nel sostenere l'infiammazione, e questo porterebbe ad un peggioramento nel danno tissutale e alla sintesi di autoantigeni. Quindi, alla luce del fatto che la PCR risulta avere un ruolo protettivo mentre la mCRP svolge un ruolo negativo nell'autoimmunità, è proprio la conversione di pCRP in mCRP che svolge un ruolo chiave nelle attività infiammatorie e nell'autoimmunità [45].

2. SCOPO DELLA TESI

Il tirocinio di Laurea Magistrale in Biologia è stato svolto presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria di Alessandria (AOU AL), Dipartimento delle Attività Integrate Ricerca e Innovazione (DAIRI), sotto la supervisione della Dr.ssa Maria Cristina Sacchi della Prof.ssa Valentina Audrito (DISIT, UPO) come tutor didattico, su un progetto nato in collaborazione tra i due enti.

Le malattie autoimmuni rappresentano un gruppo di patologie che presentano una risposta immunitaria anomala diretta contro componenti dell'organismo stesso e caratterizzate da un'elevata eterogeneità clinica. La diagnosi di queste malattie, vista la loro natura eterogenea, risulta molto complessa e spesso tardiva in quanto si presenta una sovrapposizione dei sintomi tra diverse condizioni esiste una limitata specificità di alcuni marker sierologici comunemente utilizzati in ambito clinico. In clinica, il principale strumento di screening utilizzato sono gli anticorpi antinucleo (ANA), tuttavia la loro presenza non è sempre indicativa di una patologia conclamata. La positività agli ANA, infatti, spesso viene riscontrata anche in soggetti sani e, viceversa, la negatività a volte è riportata in soggetti malati. Indicatori di infiammazione come la proteina C-reattiva (PCR), utilizzata ampiamente come *marker* di infiammazione cronica, risultano spesso avere una limitata specificità diagnostica in ambito autoimmune; questo è dovuto al fatto che aumentano in molte condizioni infiammatorie.

Vista questa moltitudine di limitazioni, emerge la necessità di identificare nuovi marcatori più specifici per l'autoimmunità. Si propone, quindi, la valutazione del ruolo della nicotinamide fosforibosiltransferasi (NAMPT), in particolare della sua forma extracellulare eNAMPT (rilasciata in condizione di infiammazione), come possibile biomarcatore aggiuntivo nella diagnosi delle malattie autoimmuni. eNAMPT è infatti considerato e ampiamente studiato come una citochina pro-infiammatoria capace di modulare i meccanismi di attivazione immunitaria e nella modulazione della risposta infiammatoria.

L'obiettivo principale della presente tesi è quindi quello di analizzare i livelli di eNAMPT in una coorte di pazienti arruolati presso AOU AL, per in futuro valutarne l'utilità diagnostica come biomarcatore aggiuntivo, valutandone la capacità di fornire informazioni precoci rispetto ai marcatori tradizionali, quali gli ANA e la PCR. In ultima analisi, si propone di studiare se i livelli sierici di eNAMPT possano effettivamente aiutare nell'identificazione delle malattie autoimmuni, affiancati a marcatori già esistenti, favorendo una diagnosi più precoce e precisa.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Popolazione in studio

La popolazione in studio è stata arruolata presso il Laboratorio Clinico dell'AOU di Alessandria ed è costituita da un totale di 140 campioni di siero da soggetti con sospetto clinico di disturbi autoimmuni. La casistica è stata stratificata in due gruppi: 70 ANA-positivi con titolo $\geq 1:160$ e 70 ANA-negativi con titolo $\leq 1:80$. Inoltre, come controllo, sono stati utilizzati i campioni di siero di 30 donatori sani (HD) selezionati attraverso la banca del sangue locale dell'Ospedale di Alessandria (AOU-AL). Nelle due tabelle 5 e 6 sottostanti, sono riportati il genere, l'età, i valori di eNAMPT e PCR dei 70 campioni ANA-positivi e dei 70 campioni ANA-negativi.

CAMPIONE ANA+	eNAMPT (ng/mL)	PCR (mg/dL)	SESSO	ETÀ
#1	24,2227		F	47
#2	14,60075		F	47
#3	7,900361	0,57	F	60
#4	8,195201		F	53
#5	36,71072	0,23	F	51
#6	22,13765	0,15	F	81
#7	21,31966		F	57
#8	9,54434	0,28	F	64
#9	7,926875		M	49
#10	5,684981		F	44
#11	14,24683	13	F	54
#12	2,582226	7,68	F	89
#13	12,84352	0,31	F	64
#14	25,01574		M	63
#15	17,15337		F	80
#16	10,12366	0,1	F	22
#17	4,718361	0,27	F	36
#18	9,491206		F	61
#19	15,48385	0,05	F	66
#20	33,60154	0,23	F	51
#21	1,966505	0,35	F	82
#22	12,65624		F	83
#23	5,022708		F	87
#24	5,700621	0,05	F	69
#25	17,09255		M	70
#26	31,62329	0,31	M	55
#27	33,97045	0,46	F	41
#28	10,86032		M	62
#29	16,32165		F	52
#30	19,5471		F	46

#31	27,2996		F	65
#32	10,17541	0,46	M	57
#33	16,18643	0,64	F	63
#34	8,315481	0,03	F	59
#35	14,91012		F	87
#36	13,25757	0	F	60
#37	2,143871	0,06	F	55
#38	5,364549	0,07	F	58
#39	6,646139		M	85
#40	24,88188	1,2	F	54
#41	24,7788	0,65	M	58
#42	3,675328		F	60
#43	9,905901		F	84
#44	29,92916	0,04	F	60
#45	13,32886	0,03	F	25
#46	31,83619	4,17	M	63
#47	1,557666	0,15	F	65
#48	36,06131	1,31	F	46
#49	13,81519	0,06	F	56
#50	10,53464	0,15	F	77
#51	17,0342	0,1	F	22
#52	8,741654		F	59
#53	16,59597	0	F	61
#54	42,66738		M	58
#55	5,141538	0	F	57
#56	8,189151		F	41
#57	4,710562	0,02	M	44
#58	3,597768		F	51
#59	13,23911	0	F	56
#60	18,07093	1,18	M	86
#61	11,1541	0,03	F	45
#62	3,221849	0	F	57
#63	11,18238	0,02	F	50
#64	7,924562	0,36	F	72
#65	6,651995	0	M	35
#66	7,11559	0,66	F	74
#67	17,09806	0,64	F	57
#68	11,35192		F	56
#69	8,213735		F	60
#70	29,09423		F	81

Tabella 5: soggetti ANA positivi

CAMPIONE ANA-	eNAMPT (ng/mL)	PCR (mg/dL)	SESSO	ETÀ
#1	9,883715	0,12	M	59
#2	9,102725	2,99	M	81
#3	22,08646	0,23	M	66
#4	0,190945		F	3
#5	2,743378		F	35
#6	10,6982		F	58
#7	4,917998		M	46
#8	20,32256		F	54
#9	10,7885	0,14	F	54
#10	12,08959		F	61
#11	3,555897		F	76
#12	14,06232		F	30
#13	12,33771	0,01	M	60
#14	39,54277		M	26
#15	6,218721	0,07	F	44
#16	25,25895	0,44	M	72
#17	6,647558		M	51
#18	4,618479	1,56	M	52
#19	4,446527	0,49	M	69
#20	4,325921	0,71	F	64
#21	2,694849	0,19	F	44
#22	21,52423	7,08	F	25
#23	3,029288	0,02	F	33
#24	6,38944	0,31	F	38
#25	2,029919		M	82
#26	3,594193		M	24
#27	26,52084		F	43
#28	12,82342		M	54
#29	3,555525		F	50
#30	4,492583	0,06	F	47
#31	11,51577	0,44	M	66
#32	29,90848	1,36	F	49
#33	20,75284	7,5	F	58
#34	18,22583	0,05	M	79
#35	7,621452	6,16	M	85
#36	14,64481	0,25	F	84
#37	12,89009	0,12	M	79
#38	12,86437	2,19	M	54
#39	26,07524	0,05	M	27
#40	3,866251		F	69
#41	OVER		M	17
#42	35,87019	0,6	M	67
#43	11,09235	0,41	F	66

#44	12,03567	5,12	M	65
#45	24,09045		F	36
#46	24,75215		F	50
#47	8,40354		F	62
#48	22,20783		F	75
#49	18,90213		F	31
#50	12,83776	0,17	F	56
#51	9,278302	0,54	F	53
#52	4,870712	0,47	F	80
#53	10,21293		M	74
#54	8,397701		M	63
#55	16,46879		F	62
#56	21,43193	0,25	F	51
#57	0,156462	0,98	F	40
#58	42,98883	1,58	F	46
#59	6,873251	1,05	M	83
#60	2,326059		M	55
#61	3,941587		F	61
#62	14,48606	0	F	14
#63	16,86657	14,63	M	55
#64	35,53244	0,4	F	67
#65	20,02215	0,14	F	40
#66	34,47097	0,52	F	41
#67	31,96482		F	28
#68	4,400572		M	44
#69	35,83473	0,44	M	58
#70	30,40498		F	62

Tabella 6: soggetti ANA negativi

3.2. Saggio ELISA

L'immunochimica è la disciplina biochimica che studia l'interazione tra antigene (Ag) e anticorpo (Ab). L'antigene è rappresentato da una proteina o da un peptide, ed è il bersaglio che viene riconosciuto dall'anticorpo specifico. L'interazione avviene tra una piccola regione dell'antigene, definita epitopo, e i siti di riconoscimento situati sull'anticorpo. Questo legame è specifico e anche reversibile, in quanto si basa su legami deboli non covalenti come interazioni elettrostatiche, idrofobiche, legami a idrogeno e forze di Van der Waals. Le tecniche immunochimiche si basano sul sistema chiave-serratura, ovvero sull'interazione tra anticorpo e antigene che conduce alla formazione di un immunocomplesso [48]. ELISA, il cui acronimo Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, è una tecnica di immunochimica quantitativa che permette di determinare la concentrazione di un Ag

specifico all'interno di un campione. Le interazioni Ag-Ab in questa tecnica hanno luogo all'interno dei pozzetti di una piastra, in seguito attraverso l'utilizzo di uno spettrofotometro si ottiene il segnale di ogni pozzetto e da questo segnale tramite la costruzione di una retta di taratura, è possibile ricavare le concentrazioni ignote. In particolare, questo test si basa su una reazione colorimetrica, in cui l'intensità del colore è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'Ag; la colorazione, dunque, corrisponde al numero di complessi Ag-Ab che si sono formati nel pozzetto [48].

Il saggio ELISA si compone di diverse fasi sperimentali: la procedura inizia con il *coating*, in cui avviene la fissazione dell'Ab *sul* fondo del pozzetto. Successivamente, avviene il *blocking* che permette la saturazione di tutti i siti aspecifici attraverso l'utilizzo di detergenti o proteine come l'albumina sierica bovina (BSA). A questo punto viene aggiunto l'Ag spesso contenuto in miscele complesse e in seguito, viene aggiunto il secondo Ab marcato con enzima, che riconosce un sito diverso sull'Ag rispetto all'anticorpo primario. Un enzima molto utilizzato è la Horseradish Peroxidase (HRP) che in presenza di perossido di idrogeno (H_2O_2) ossida un substrato specifico per generare un cromogeno. In seguito, viene aggiunto il substrato dell'enzima in modo da ottenere una reazione colorimetrica all'interno del pozzetto; di solito, il substrato è composto da fenoli aromatici e ammine. Per evitare che la reazione colorimetrica proceda portando ad un'intensità di colore uguale in tutti i pozzetti a prescindere dalla loro concentrazione, si aggiunge un acido forte capace di bloccare la reazione. Come precedentemente accennato l'intensità della colorazione in ogni pozzetto è direttamente proporzionale alla concentrazione di Ag contenuto in ogni pozzetto. Infine, la misurazione avviene grazie allo spettrofotometro. Per calcolare le concentrazioni ignote, è necessario costruire una retta di taratura effettuando delle misure su diluizioni seriali a concentrazione nota dell'analita, e in seguito tramite l'equazione di questa retta è possibile calcolare le concentrazioni ignote [48].

NAMPT (Visfatin/PBFE) (human) ELISA kit dell'azienda AdipoGen Life Science

Questo kit viene utilizzato per determinare *in vitro* la concentrazione di NAMPT (umano) contenuta in siero e plasma. Questo saggio si basa su un ELISA *sandwich* in cui è presente un Ab monoclonale che riconosce in modo specifico il NAMPT fissato sul fondo dei pozzetti della multiwell da 96 pozzetti. All'interno dei pozzetti vengono inseriti prima gli standard per costruire la retta di taratura e in seguito i campioni da analizzare. Dopo una fase di lavaggio per eliminare tutto quello che non si è legato, viene inserito un secondo Ab policlonale capace di legare NAMPT in modo specifico e in un sito diverso rispetto all'Ab primario. Dopo un lavaggio, viene aggiunto un anticorpo anti-IgG di coniglio, coniugato con HRP; infine, viene aggiunto il substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) per far avvenire la reazione colorimetrica. Prima di effettuare la misurazione allo spettrofotometro si

aggiunge un acido forte per bloccare le reazioni nei pozzetti. L'analisi viene effettuata a 450 nm e l'intensità di colore risulta direttamente proporzionale alla concentrazione di NAMPT [49].



Figura 19: Logo AdipoGen Life Sciences

Materiali del kit ELISA:

- Piastra rivestita da anticorpo umano NAMPT (6 strips da 16 pozzetti)
- 2 flaconi di Wash Buffer 10X (2 x 30 ml)
- 2 flaconi di ELISA Buffer 10X (2 x 30 ml) (ELISA Buffer 10X)
- 1 fiala di anticorpo di rilevazione (60µl) (DET)
- 1 fiala di HRP 100X (HRP Conjugated anti-rabbit IgG) (150 µl) (HRP 100X)
- 1 fiala di Nampt umano Standard (lyophilized) (16 ng) (STD)
- 1 flacone di TMB Substrate Solution (12 ml) (TMB)
- 1 flacone di Stop Solution (12 ml) (STOP)
- 2 sigillanti per piastre (plastic film)
- 2 mini-sacchetti di gel di silice

Materiali richiesti ma non forniti:

- Pipette singole e multicanale e puntali monouso
- Lettore di micropiastre a 450 nm
- Acqua deionizzata
- Microtubi o equivalenti per preparare le diluizioni
- Contenitori in plastica e monouso per la preparazione dei buffer
- Lavatore di piastre: automatico o manuale
- Provette in vetro o plastica per la diluizione degli standard

In seguito, nel protocollo sono riportate la preparazione dei reagenti e quella dei campioni. Per quanto riguarda la preparazione dei reagenti, i passaggi che devono essere eseguiti sono i seguenti:

Come primo passaggio, il tampone di lavaggio 10X deve essere diluito 1:10 con acqua deionizzata prima dell'utilizzo, così da ottenere il tampone di lavaggio 1X. In parallelo, anche il tampone ELISA 10X deve essere diluito 1:10 con acqua deionizzata prima dell'utilizzo, in modo da ottenere il tampone ELISA 1X. Per quanto riguarda l'anticorpo di rilevazione, invece, deve essere diluito 1:200 nel tampone ELISA 1X precedentemente preparato (l'Ab diluito è instabile). Invece, l'HRP 100X (IgG anti-coniglio coniugata con HRP) deve essere diluito alla concentrazione richiesta aggiungendo 100 µl in 10 ml di tampone ELISA 1X (1:100). Infine, lo standard di NAMPT umano (STD) deve essere combinato con 1 mL di acqua deionizzata producendo una soluzione stock da 16 ng/ml.

Lo standard di NAMPT deve riposare almeno 15 minuti e poi bisogna miscelare bene prima di procedere con le diluizioni. In seguito, lo standard 16 ng/ml (STD) va diluito con ELISA 1X. A questo punto bisogna costruire una curva di calibrazione a sette punti effettuando diluizioni seriali 1:2 in tampone ELISA 1X. I punti consigliati per costruire la curva sono 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0 ng/ml.

Per ottenere:	Aggiungere:	All'interno di:
8 ng/ml	300 µl di Nampt (16 ng/ml)	300 µl of ELISA Buffer 1X
4 ng/ml	300 µl di Nampt (8 ng/ml)	300 µl of ELISA Buffer 1X
2 ng/ml	300 µl di Nampt (4 ng/ml)	300 µl of ELISA Buffer 1X
1 ng/ml	300 µl di Nampt (2 ng/ml)	300 µl of ELISA Buffer 1X
0.5 ng/ml	300 µl di Nampt (1 ng/ml)	300 µl of ELISA Buffer 1X
0.25 ng/ml	300 µl di Nampt (0.5 ng/ml)	300 µl of ELISA Buffer 1X
0.125 ng/ml	300 µl di Nampt (0.25 ng/ml)	300 µl of ELISA Buffer 1X
0 ng/ml	300 µl di ELISA Buffer 1X	niente

Tabella 7: Diluizioni seriali

La procedura si compone di alcuni passaggi:

Inizialmente vengono inserite nel telaio le strisce da 16 pozzetti necessarie per il saggio. Dopodiché, si aggiungono in duplicato 100 µl dei diversi standard in determinati pozzetti. In contemporanea, vengono aggiunti sempre in duplicato 100 µl di campioni di siero o plasma non diluiti nei pozzetti. Finiti questi due passaggi, si va a sigillare la piastra con il sigillante per piastre e si incuba tutta la notte a 4°C. In seguito all'incubazione, si aspira il contenuto dei pozzetti e si lava con 300 µl di Tampone di Lavaggio 1X (Wash Buffer) ripetendo il lavaggio per tre volte utilizzando una pipetta multicanale. Dopo l'ultimo lavaggio, è necessario rimuovere completamente il residuo liquido dai pozzetti. A questo punto, bisogna aggiungere 100 µl di Anticorpo di Rilevamento (DET) in ogni pozzetto, coprire la piastra e incubare per 1 ora a 37°C. Finita questa incubazione, bisogna aspirare il contenuto dei pozzetti e si lava con 300 µl di Tampone di Lavaggio 1X sempre per tre volte. Anche in questo passaggio è importante rimuovere il liquido residuo dal fondo dei pozzetti. A questo punto, vengono aggiunti 100 µl di anti-IgG di coniglio coniugato con HRP diluito (HRP) in ogni pozzetto, viene coperta la piastra e di nuovo si ha una incubazione di 1 ora a 37°C. Nuovamente viene aspirato il contenuto dei pozzetti rivestiti e viene effettuato un lavaggio con 300 µl di Tampone di Lavaggio 1X per cinque volte, rimuovendo sempre il liquido residuo dai pozzetti. Si aggiungono 100 µl di Soluzione Substrato TMB in ogni pozzetto e si incuba a temperatura ambiente e al buio per 10 minuti in modo da sviluppare la reazione cromatica, necessaria per la misurazione. Come ultimo passaggio si va a bloccare la reazione cromatica con l'aggiunta di 100 µl di Soluzione di Arresto (soluzione corrosiva), agitando delicatamente la piastra per garantire una buona miscelazione all'interno dei pozzetti. La reazione colorimetrica che avviene produce una soluzione blu che vira al giallo una volta aggiunta la Soluzione di Arresto. Infine, viene effettuata una misurazione a 450 nm in un lettore ELISA entro 30 minuti dalla fine della procedura [49].

Di seguito sono riportati i valori in ogni pozzetto del bianco e degli standard interni per costruire la retta di taratura (come esempio di una piastra).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BIANCO	BIANCO	ST1	ST1	ST2	ST2	ST3	ST3	ST4	ST4	ST5	ST5
B	ST6	ST6	ST7	ST7	ST8	ST8	1		2		3	ANA+
C	4		5		6		7		8		9	
D	10		11		12		13		14		15	
E	16		17		18		19		20		1	ANA-
F	2		3		4		5		6		7	
G	8		9		10		11		12		13	
H	14		15		16		17		18		19	

Tabella 8: valori bianco e standard interni

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,1742	0,174	0,1953	0,1686	0,1818	0,1634	0,2251	0,2462	0,27	0,2662	0,3465	0,3889
B	0,5826	0,6064	1,0192	0,907	1,5013	1,3791	1,1977	1,2463	0,8974	0,8645	0,5808	0,6015
C	0,5719	0,6381	1,6712	1,4679	1,2715	1,0373	1,0851	1,1689	0,7003	0,6337	0,617	0,5678
D	0,4935	0,4734	0,9217	0,812	0,3045	0,3374	0,7819	0,8375	1,268	1,2258	0,981	0,9772
E	0,7175	0,6684	0,4378	0,4309	0,666	0,6632	0,9257	0,9055	1,5245	1,4578	0,6707	0,6938
F	0,716	0,5779	1,2035	1,1019	0,1877	0,183	0,3139	0,3456	0,7375	0,6991	0,4263	0,4629
G	1,0797	1,1061	0,6685	0,776	0,7689	0,7874	0,3722	0,3748	0,8861	0,8328	0,7462	0,831
H	1,5857	1,6882	0,4902	0,5298	1,2856	1,2233	0,5358	0,5263	0,4317	0,4267	0,315	0,5256

Tabella 9: valori NAMPT

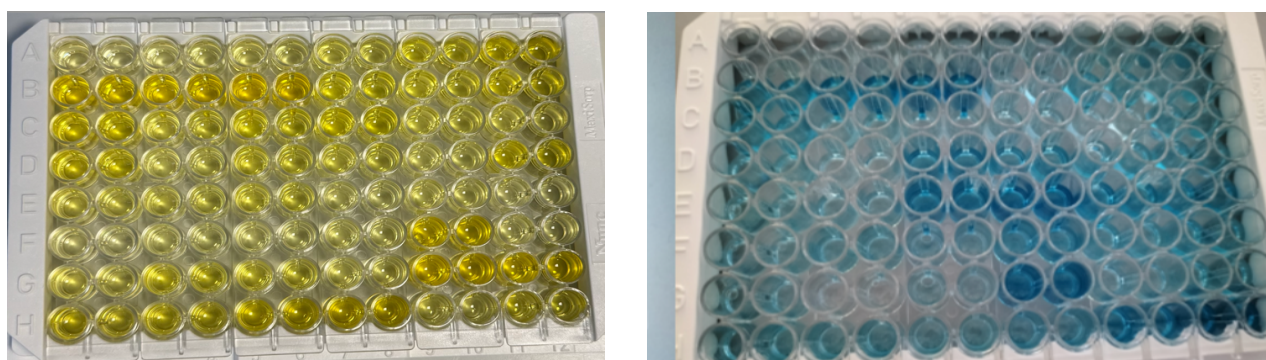


Figura 20: a destra si osserva la reazione colorimetrica dei campioni, mentre a sinistra si nota un viraggio del colore in seguito all'aggiunta della soluzione di *STOP*

3.3. Immunofluorescenza indiretta IFI (UNIQO)

L'immunofluorescenza indiretta si basa sul legame antigene e anticorpo. Durante la prima incubazione, gli anticorpi all'interno del campione del paziente (se presenti), in seguito a diluizione, legano specifici antigeni posti sui vetrini (supporto solido). Successivamente, viene aggiunto un coniugato contenente un anticorpo secondario con fluoresceina (FITC) che lega gli anticorpi del paziente che si sono precedentemente legati. A questo punto, tramite l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza, è possibile rilevare il complesso che si è formato.

UNIQO 160 è uno strumento automatizzato, definito *all-in-one* (in quanto effettua sette funzioni), di alta qualità per la diagnostica, capace di eseguire test di immunofluorescenza indiretta, IIFT su campioni di siero, plasma e liquor. In seguito alla preparazione della lista di lavoro e al caricamento dei campioni, UNIQO 160 elabora in modo automatico i test, a partire dalla preparazione del campione all'acquisizione delle immagini [50].



Figura 21: UNIQO 160 [50]

Il middleware EUROLabOffice 4.0 di EROIMMUN interfacciandosi con UNIQO 160, permette l'organizzazione dei campioni, l'archiviazione dei dati e la valutazione. Lo scambio dei dati con EUROLabOffice 4.0 avviene automaticamente una volta che lo strumento ha letto i vetrini.

Dunque, una volta finita l'analisi da parte di UNIQO 160, tutti i dati vengono automaticamente trasferiti in un'unica schermata con EUROLabOffice 4.0. In questa schermata è possibile visualizzare la scheda dal paziente con accesso diretto a risultati e ad immagini. Nella schermata, inoltre è possibile osservare i substrati, le eventuali diluizioni effettuate dallo strumento o aggiungere diluizioni se necessario, le informazioni del processo e le informazioni del lotto.

Quindi, l'interfaccia tra EUROLabOffice 4.0 e UNIQO 160 garantisce una migliore ottimizzazione delle liste di lavoro, memorizzazione dei dati e una migliore adattabilità nella routine di laboratorio evitando eventuali errori. Inoltre, all'inizio della seduta, i dati vengono inviati al LIS (sistema informativo di laboratorio utilizzato all'interno dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria SS di Alessandria che controlla le varie richieste dei campioni). Euroimmun ITALIA, invece, rappresenta una delle maggiori realtà nella produzione di prodotti per la diagnostica medica in vari campi quali autoimmunità, allergologia, malattie infettive, endocrinologia e malattie neurodegenerative [50].



Figura 22: Interfaccia UNIQO 160 e EUROLabOffice 4.0 [51]

Con questa procedura si ottengono dei risultati affidabili con solo due passaggi, il caricamento del campione e la valutazione dei dati [51].

Il test in immunofluorescenza indiretta che viene effettuato su substrato cellule HEp-20-10 è una analisi di tipo quantitativo e qualitativo che permette *in vitro* di riconoscere anticorpi IgG diretti contro il nucleo cellulare (ANA) presenti all'interno dei campioni da analizzare. Per effettuare questa analisi sono necessari: vetrini contenenti da 5 a 10 biochip composti da cellule HEp-20-10, anticorpi anti-IgG coniugati con FITC, il controllo positivo (contenente autoanticorpi ANA), il controllo negativo (senza autoanticorpi), il sale per il tampone fosfato salino PBS e il tween-20 per il lavaggio. Inoltre, oltre al rilevamento degli ANA su substrato di cellule HEp-20-10, vengono utilizzati anche altri vetrini composti da diversi substrati per la determinazione di altre tipologie autoanticorpi come, ad esempio, il vetrino Mosaic che è composto da tre tessuti diversi, il fegato di primate, il rene di ratto o topo e lo stomaco sempre di ratto o topo. In particolare, gli anticorpi che vengono determinati sono: gli anticorpi che si legano ai microsomi del fegato e del rene (LKM), gli anticorpi anti mitocondrio nel rene (AMA) e anticorpi contro la muscolatura liscia (ASMA). Per quanto riguarda gli anticorpi AMA di cui ne esistono nove tipologie (M1-M9) questi aiutano nella diagnosi di diverse malattie autoimmuni, tra cui la più significativa è colangite biliare primitiva e spesso sono correlati anche con la presenza di anticorpi ANA. Mentre, gli anticorpi ASMA sono presenti in varie patologie epatiche e soprattutto nella epatite autoimmune. Un ulteriore tipo di vetrino molto utilizzato è quello per anticorpi diretti contro il recettore per la fosfolipasi A2, (PLA2R); il recettore PLA2R è infatti riconosciuto come il bersaglio degli autoanticorpi nella nefropatia membranosa. Quindi in caso di positività vengono osservati diversi possibili *pattern* a seconda del vetrino, invece, in caso di negatività non si riscontra nessun tipo di *pattern* di fluorescenza [50], [52].

I sette passaggi effettuati dallo strumento sul campione (*all-in-one*):

Lo strumento ha una capacità di 160 campioni e 288 diluizioni e può effettuare test diversi simultaneamente e grazie a tre aghi in acciaio inox la procedura risulta automatizzata e precisa e permetterne una buona lettura in fluorescenza.

Il primo passaggio corrisponde al riconoscimento codice a barre; la lettura avviene automaticamente all'interno dello strumento in seguito al caricamento dei campioni grazie alla presenza di un letto automatico e si ha l'invio delle richieste di analisi, prima al LIS (sistema informativo di laboratorio), per verificare che ad ogni paziente coincide una richiesta e dopo le richieste vengono inviate all'EUROLabOffice 4.0.

In seguito, bisogna eseguire la preparazione dell'analisi che corrisponde al caricamento dei campioni su diversi rack, dei controlli positivi e negativi (20 al massimo), dei tamponi di diluizione (4 al massimo) e reagenti (9 flaconi al massimo), il mezzo di montaggio per i vetrini. A seconda della richiesta, sono necessari più campi nel blocco diluizioni, ed è quindi necessario aggiungere o sostituire blocchi di diluizione a seconda delle indicazioni. Lo strumento indica con dei colori la disponibilità dei pozzetti: grigio (campo di diluizione non utilizzato e non necessario), blu (campo di diluizione necessario e che viene utilizzato durante l'analisi) e giallo (campo di diluizione già utilizzato). Di seguito, avviene l'inserimento dei vetrini (fino a 18 per seduta) e dei portaoggetti. Il primo passaggio dell'analisi è la diluizione del siero nei blocchi di diluizione con PBS. Successivamente viene effettuata la deposizione di 30 µl di campione diluito in ogni pozzetto del vetrino e si ha un'incubazione di circa 30 minuti (a seconda della richiesta). Dopodiché avviene un lavaggio con PBS-Tween. Su ogni biochip del vetrino vengono posti 25 µl di coniugato (specifico in base alla richiesta) e dopo altri 30 minuti circa avviene un ulteriore lavaggio con PBS-Tween. Infine, avviene il montaggio del vetrino e la lettura in fluorescenza. Quindi tramite microscopia si ha l'acquisizione rapida delle immagini grazie all'integrazione di un microscopio di alta qualità con tre obiettivi a cambio automatico (4x,10x,20x). Infine, avviene l'acquisizione delle immagini in cui vengono rilevate delle immagini a fluorescenza e i dati vengono trasferiti automaticamente a EUROLabOffice 4.0 per la successiva valutazione [50].

3.4. Atellica Analyzer

Il metodo Atellica® CH Revised C-Reactive Protein (RCRP) viene utilizzato per quantificare la concentrazione di proteina C-reattiva nel siero e nel plasma attraverso l'uso di Atellica® CH Analyzer. Questo metodo, quindi, sfrutta una tecnica di immunodosaggio turbidimetrica con

particelle PETIA; per migliorare l'esito, questo metodo viene eseguito su due cuvette di reazione. In particolare, le particelle utilizzate sono rivestite con un anticorpo specifico per la PCR (AbPR), capace di legare la PCR se presente nel campione. La torbidità nella soluzione viene misurata a 340 nm in quanto risulta correlata con una maggiore concentrazione di PCR [53]. I livelli di PCR vengono rilevati solitamente nel siero o nel plasma (con litio eparina) e aumentano durante meccanismi di infiammazione, che possono essere infettivi ma anche non infettivi come nel caso dell'artrite reumatoide. In particolar modo si ha un incremento dei livelli di questa proteina, durante infezioni, lesioni tissutali o infiammazioni. La PCR è un marcatore aspecifico che viene usato per monitorare i livelli di infiammazione in alcune patologie o per ottenere informazione sullo stato infiammatorio generale. Essendo un marcatore aspecifico, i suoi valori devono essere accompagnati da uno storico completo del paziente [53].



Figura 23: Atellica® CH Analyzer

L'Atellica Analyzer può anche essere integrato nel sistema Atellica Solution, che combina la chimica clinica con analizzatori per immunodosaggi permettendo una elevata automaticità e un flusso di lavoro più funzionale. A seconda della molecola da dosare, esistono più di 300 configurazioni diverse che permettono diverse misure [53].



Figura 24: Sistema Atellica Solution [53]

Reagenti utilizzati nel metodo Atellica® CH Revised C-Reactive Protein (RCRP):

Descrizione del materiale	Conservazione	Stabilità ^a
Atellica CH RCRP	Non aperto a 2–8°C	Fino alla data di scadenza indicata sul prodotto
Pack 1 (P1)		
Pozzetto 1 (W1) e pozzetto 2 (W2)		
Reagente 1 (R1)	A bordo per pozzetto	45 giorni
22,9 mL		
Fosfato di potassio dibasico (245 mM); polietilenglicolo 8000 (1,88%); albumina sierica bovina (0,5%); inibitori microbici		
Pack 2 (P2)		
Pozzetto 1 (W1) e pozzetto 2 (W2)		
Reagente 2 (R2)		
11,8 mL		
Particelle di lattice rivestite con anti-CRP caprino (1,6 mg/mL, variabile per lotto); glicina (200 mM); sodio dodecil solfato (0,014%); inibitori microbici		

Figura 25: Reagenti

La procedura viene effettuata sempre su due cuvette:

Come primo passaggio sia per il siero che per plasma litio eparina, è necessario aggiungere 50 µL di campione primario e 200 µL di diluente Atellica CH Diluent all'interno di una cuvetta (da tenere da parte). In seguito, è necessario aggiungere 41,2 µL di reagente 1 e 19,8 µL di diluente Atellica CH Diluent nella prima cuvetta di reazione. Mentre, si aggiungono 41,2 µL di reagente 1 e 16,0 µL di diluente Atellica CH Diluent nella seconda cuvetta di reazione. Successivamente, aggiungere 2,5 µL

di campione prediluito (preparato nel primo passaggio) nella cuvetta di reazione 1 e aggiungere 10,0 µL di campione prediluito nella cuvetta di reazione 2 e miscelare bene. A questo punto, porre 19,6 µL di reagente 2 e 19,8 µL di diluente Atellica CH Diluent nella cuvetta di reazione 1 e, allo stesso tempo, porre 19,6 µL di reagente 2 e 16,1 µL di diluente Atellica CH Diluent nella cuvetta di reazione 2. Alla fine di questa serie di passaggi, è necessario mescolare bene e incubare le miscele delle cuvette a 37°C. Come ultimo procedimento bisogna aggiungere il reagente 2 in ogni cuvetta e misurare l'assorbanza per poi refertare i risultati ottenuti.

Il risultato viene ottenuto in mg/dL o mg/L a seconda dell'unità di misura impostata nel metodo.

Per quanto riguarda l'intervallo di riferimento utilizzato per la PCR questo valore è stato validato secondo il documento CLSI EP28-A3c 19 su Atellica CH Analyzer e questo valore per gli adulti sani deve essere $\leq 0,33$ mg/dL, ovvero 3,3 mg/L, sia per il siero che per il plasma [53].

3.5. Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando *GraphPad Prism versione 9.0* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). La normalità della distribuzione dei dati è stata verificata dal test Shapiro-Wilk (utilizzato per campioni di dimensioni ridotte). La significatività statistica per il confronto tra i due gruppi è stata valutata mediante il test t di Student per campioni appaiati o indipendenti. Il test t student è un test parametrico usato per confrontare le medie di due gruppi, in modo da determinare se le differenze osservate siano statisticamente significative o casuali. Nel caso in cui i dati non soddisfacessero i presupposti di normalità, è stato utilizzato il test non parametrico di Mann-Whitney, basato sul confronto tra i ranghi e non su una distribuzione normale. Inoltre, per confronti tra due o più gruppi, è stata utilizzata l'ANOVA a una via (*one-way ANOVA*). Se non diversamente specificato, i dati nelle figure sono presentati come media $\pm$ SEM (errore standard della media). Per tutti i test statistici, è stato adottato un livello di confidenza di 0,05. La significatività è stata indicata come: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ [54].

4. RISULTATI

4.1. Classificazione per fasce di età della coorte ANA+/-

La coorte di 140 individui è stata testata, come descritto nella sezione dei materiali e metodi per la positività o negatività agli ANA. Il grafico sotto riportato, riporta la distribuzione della coorte in studio per fasce di età dei due gruppi ANA positivi (+) e ANA negativi (-). I valori utilizzati sono quelli riportati nelle tabelle 5 e 6. È possibile osservare che la coorte in studio composta da 140 soggetti, presenta una distribuzione non omogenea nelle diverse fasce d'età. Si nota una prevalenza di soggetti nella classe 40-59 anni, che comprende sia i soggetti ANA positivi (n=33) che i soggetti ANA negativi (n=28). Per quanto riguarda le fasce di età più giovani 0-19 e 20-39, queste sono meno rappresentate; inoltre, in entrambe queste fasce, i soggetti ANA negativi sono maggiori rispetto a quelli ANA positivi. Nella fascia di età 60-79 si osserva una distribuzione più o meno equilibrata con ANA positivi (n=21) e ANA negativi (n=22). Differentemente, nella fascia di età 80-99 si osservano più soggetti ANA positivi (n= 11) rispetto agli ANA negativi (n=6). Complessivamente, i risultati mostrano una possibile associazione tra la positività agli ANA e l'aumento dell'età.

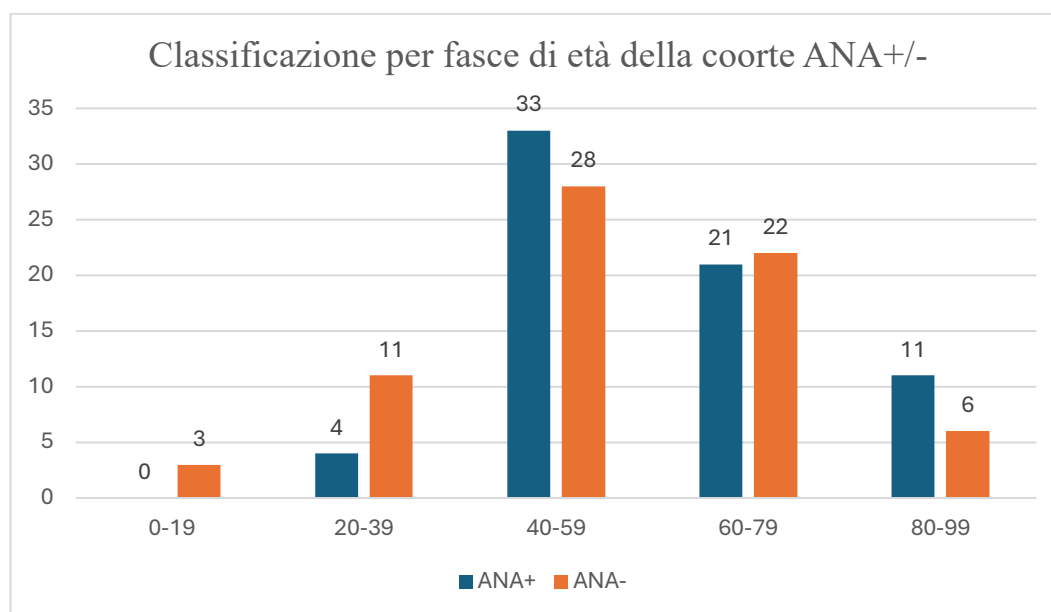


Figura 26: distribuzione dei soggetti della coorte per fasce di età, stratificata in base a positività agli ANA

La distribuzione percentuale della coorte ANA+/ANA- mostra una netta prevalenza nella fascia di età 40-59, che rappresenta il 44% della coorte totale. Di seguito sono riportate la fascia 60-79 con il 31% e la fascia 80-99 con il 12%. Per quanto riguarda le fasce di età più giovani queste sono più marginali; in particolare, la fascia 20-39 costituisce l'11%, mentre la fascia 0-19 il 2 %. Come nel

grafico precedente la distribuzione conferma un maggior numero di soggetti nelle fasce di età medio-avanzate rispetto a quelle giovanili.

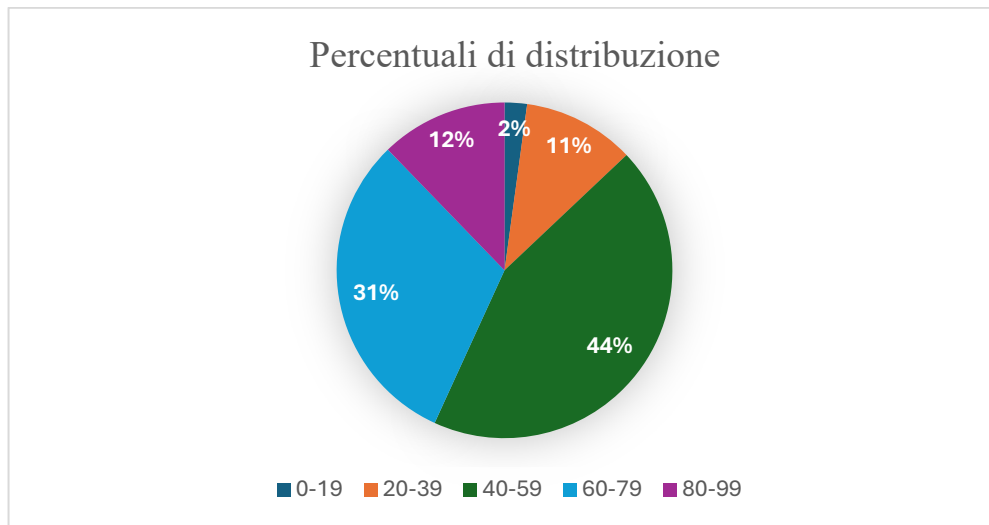


Figura 27: distribuzione percentuale della coorte ANA+/ANA- suddivisi per fasce di età

4.2. Classificazione per genere della coorte ANA+/-

La coorte analizzata mostra una distribuzione per genere (maschio e femmina) non omogenea tra i soggetti ANA positivi e ANA negativi. È possibile osservare una diversa stratificazione di soggetti ANA+ e ANA- nei due generi. Nel gruppo dei maschi, si osserva una maggiore frequenza di soggetti ANA- (n=29) rispetto ai soggetti ANA+ (n=13). Al contrario nel gruppo delle femmine, risulta più elevata la frequenza di soggetti ANA+ (n=57) rispetto ai soggetti ANA- (n=41). Complessivamente, i dati indicano una possibile correlazione tra il genere e la positività agli ANA, con un maggior numero di soggetti ANA+ nel genere femminile.

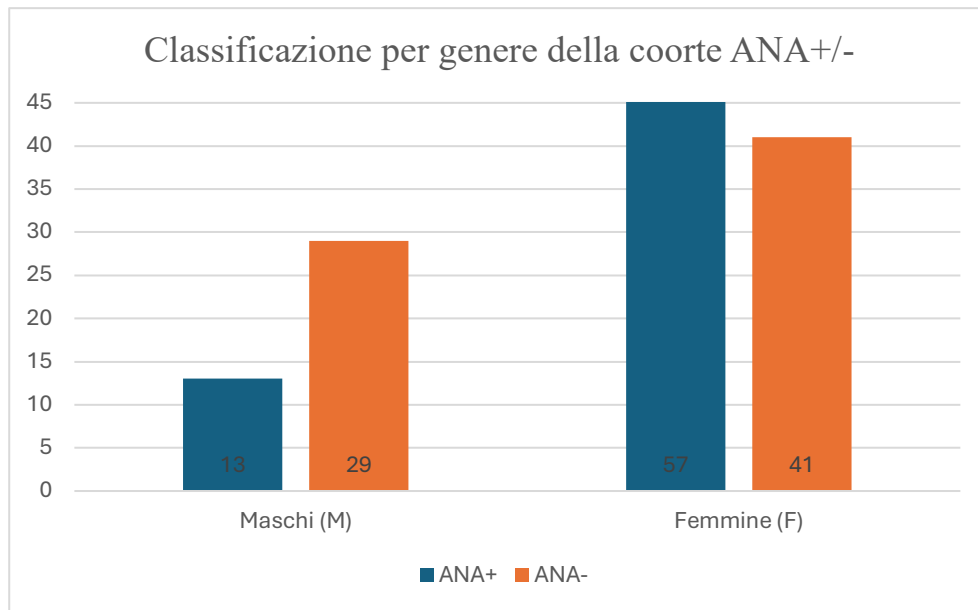


Figura 28: Distribuzione dei soggetti della coorte per genere, stratificata per positività agli ANA

La distribuzione percentuale della coorte ANA+ e ANA- nel genere, mostra che tra gli ANA+ il 70 % è rappresentato dal genere femminile, mentre il 30 % dal genere maschile. Confermando che probabilmente esiste una associazione tra il genere femminile e la positività agli ANA.

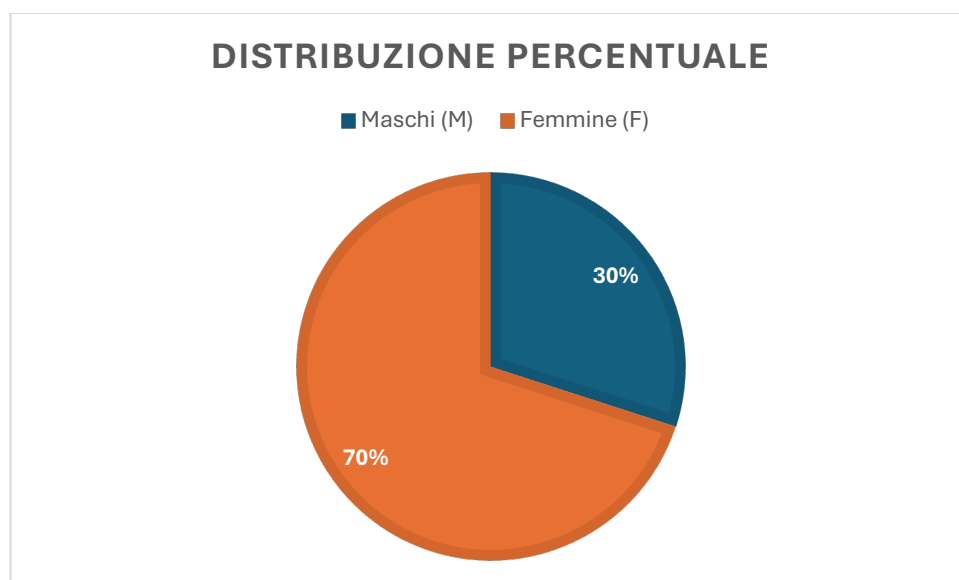


Figura 29: Distribuzione percentuale della coorte ANA+/ANA- suddivisi per genere

4.3. Analisi dei livelli di eNAMPT nella coorte ANA+/- rispetto a una coorte di controllo

La valutazione delle concentrazioni di eNAMPT è stata effettuata mediante saggio ELISA Adipogene, come descritto nella sezione dei metodi, nei sieri dei pazienti (140) e in una coorte di sieri derivati da donatori sani. I livelli di eNAMPT sono stati confrontati in tre gruppi: ANA+ (n=70), ANA- (n=70) e donatore sani HD (n=30). L'analisi statistica utilizzata è stata eseguita tramite ANOVA a una via e ha mostrato differenze statisticamente significative ($p < 0,0001$) tra i due gruppi ANA+ e ANA- vs il gruppo HD. Mentre non è emersa nessuna differenza statistica tra i gruppi di pazienti stratificati per ANA+ e ANA-. Tali risultati evidenziano che i livelli circolanti di eNAMPT sono aumentati in modo significativo tra individui malati vs sani, ma non emergono differenze tra pazienti con ANA+ rispetto a quelli con ANA-.

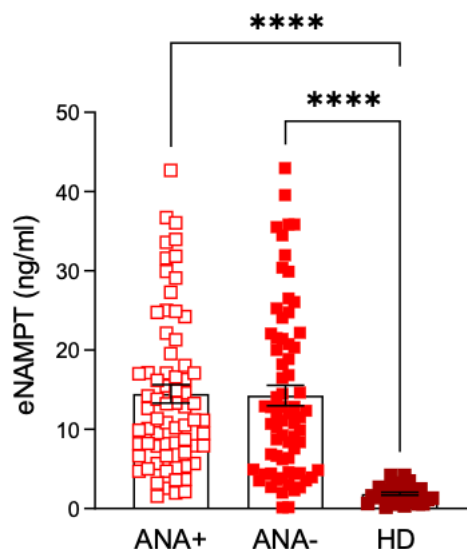


Figura 30: livelli di eNAMPT (ng/mL) rilevati utilizzando il test ELISA nel siero di una coorte di 140 pazienti (70 ANA+ e 70 ANA-) e in 30 donatori sani. L'analisi statistica utilizzata è il test ANOVA a una via. **** $p \leq 0.0001$.

4.4. Analisi dei livelli di PCR nella coorte ANA+/-

Nel grafico riportato sono stati confrontati i livelli sierici di proteina C-reattiva nei soggetti ANA+ e ANA-. L'analisi statistica utilizzata è il test di Mann-Whitney. I dati riportati presentano una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi ANA+ e ANA- ($p=0,0171$). In particolare, i soggetti del gruppo ANA- presentano livelli di PCR significativamente più elevati rispetto ai soggetti ANA+. In entrambi i gruppi si riscontra una forte variabilità interindividuale e la presenza di alcuni soggetti con valori elevati, fino a circa 13-15 mg/dL. In conclusione, la distribuzione complessiva dei valori di PCR risulta significativamente spostata verso l'alto nel gruppo ANA-.

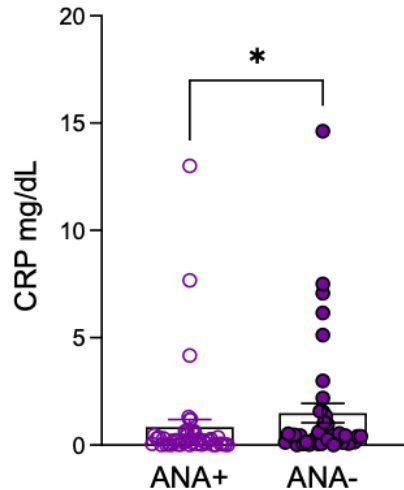


Figura 31: livelli sierici di PCR (mg/dL) nei gruppi ANA+ e ANA-. L'analisi statistica utilizzata è il test di Mann-Whitney. $p=0,0171$

4.5. Correlazioni PCR con eNAMPT

In figura è stata riportata la relazione tra i livelli sierici di eNAMPT (ng/ml) e PCR (mg/dL) nel gruppo ANA+. Vista la distribuzione non normale dei dati è stato applicato il test di correlazione non parametrico di Spearman. L'analisi ha mostrato che in 42 pazienti, dove era disponibile il dato di PCR, non emerge una correlazione significativa tra le due variabili ($r = 0,2954$; $p = 0,057$). Probabilmente aumentando la numerosità potrebbe emergere una correlazione positiva e significativa, indicando un possibile legame tra eNAMPT e l'attivazione dell'infiammazione nella coorte presa in esame.

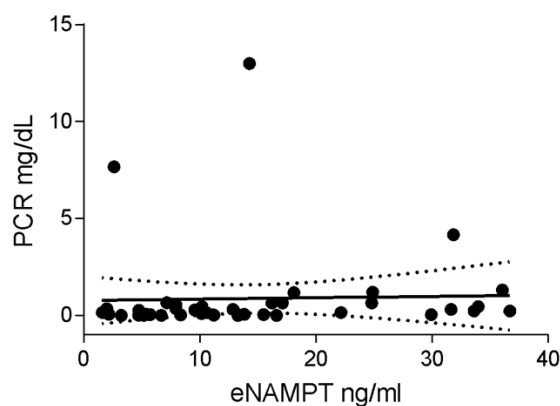


Figura 32: associazione tra i livelli di eNAMPT e PCR nella coorte ANA+. L'analisi statistica utilizzata è il test di correlazione non parametrico di Spearman. $p=0,057$

In seguito, è stata analizzata la relazione tra i livelli di eNAMPT (ng/ml) e PCR (mg/dL) nel gruppo ANA-. Anche in questo caso vista la distribuzione non normale dei dati è stato utilizzato il test di correlazione non parametrico di Spearman. L'analisi ha mostrato che non vi è correlazione eNAMPT e PCR ($r = 0,08052$; $p = 0,6214$).

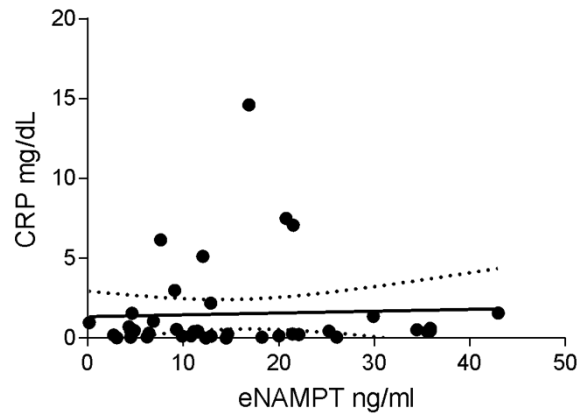


Figura 33: associazione tra i livelli di eNAMPT e PCR nella coorte ANA-. L'analisi statistica utilizzata è il test di correlazione non parametrico di Spearman. $p=0,6214$

5. DISCUSSIONE

Il presente lavoro di tesi si è proposto di valutare eNAMPT come possibile marcatore innovativo e aggiuntivo nella diagnostica delle malattie autoimmuni considerata la difficoltà nella loro diagnosi. Inoltre, i livelli di eNAMPT sono stati analizzati in relazione ad altri marcatori proinfiammatori, comunemente dosati in clinica, come la PCR.

Il risultato principale di questo studio è rappresentato dai livelli elevati e paragonabili di eNAMPT sia nei soggetti ANA positivi che in quelli ANA negativi (coorte di 140 individui), ma molto superiori rispetto a una coorte di controllo. Questi dati indicano, di conseguenza, che questo parametro potrebbe funzionare come indicatore di infiammazione sistemica o di attivazione immunitaria precedente allo sviluppo di autoanticorpi rilevabili e successivamente allo sviluppo di una malattia autoimmune piuttosto che come marcatore specifico di autoimmunità. Tuttavia, è necessario sottolineare che potrebbero anche riflettere processi patologici non autoimmuni ma di diversa natura.

Le malattie autoimmuni si sviluppano nel momento in cui il sistema immunitario perde la capacità di distinguere le molecole proprie da quelle estranee conducendo alla produzione di autoanticorpi che sono in grado di danneggiare l'organismo [55]. È interessante osservare che la produzione di questi autoanticorpi mostra una diversa distribuzione in soggetti di diverse età. È noto che durante l'invecchiamento si verifichi un aumento di autoanticorpi e questo è dovuto in parte al fatto che le difese, che prima eliminavano i patogeni, diventano uno stress cronico che modifica l'immunoregolazione determinando un incremento di autoanticorpi ANA. Questi ANA, che non indicano una risposta autoimmune, sono piuttosto collegati ad una reazione al danno tissutale. Questo spiega perché le patologie autoimmuni rimangono paradossalmente rare in questa fascia d'età, mentre la presenza degli autoanticorpi aumenta [56]. Nei risultati in figura 26 e figura 27 si nota una prevalenza di soggetti ANA+ nella classe 40-59 anni, mentre si vede un equilibrio nella fascia di età 60-79 e successivamente nella fascia di età 80-99 si osservano più soggetti ANA+ coerentemente con quanto riportato in letteratura. Tuttavia, nonostante le fasce d'età più giovani (0-19 e 20-39) siano meno rappresentate, come mostrato nei risultati, è noto che alcune malattie autoimmuni presentano un impatto molto severo sulla coorte dei giovani adulti tra i 15 e i 39 anni. Sarebbe quindi necessario promuovere nuovi studi epidemiologici mirati su questa popolazione che risulta essere più vulnerabile [57]. Come riportato in letteratura esistono delle nette differenze di genere nella risposta del sistema immunitario ed è noto che queste differenze derivano sia da fattori genetici che endocrini. Il genere femminile possiede una risposta immunitaria più robusta, che da un lato rappresenta un grande

vantaggio di sopravvivenza contro eventuali patogeni, mentre dall'altro lato questa iperattività aumenta di circa quattro volte il rischio di sviluppare malattie autoimmuni in questo genere rispetto a quello maschile [55]. Inoltre, come spiegato in letteratura la predisposizione femminile allo sviluppo di patologie autoimmuni non è associata solo al cromosoma X, ma anche all'effetto che gli ormoni sessuali esercitano sul sistema immunitario, in quanto in condizioni fisiologiche gli ormoni sessuali hanno la funzione di regolare le risposte immunitarie [58]. Coerentemente con quanto riportato in letteratura, nei risultati in figura 28 sulla stratificazione di soggetti ANA+ e ANA- nei due generi e sulla distribuzione percentuale della coorte ANA+ e ANA- nel genere, è stato riportato che nel gruppo dei maschi, si osserva una maggiore frequenza di soggetti ANA- mentre nel gruppo delle femmine, risulta più elevata la frequenza di soggetti ANA+. Inoltre, in figura 29 a livello percentuale è riportato che negli ANA+ il 70 % è rappresentato dal genere femminile, mentre il 30 % dal genere maschile. Come precedentemente discusso l'analisi degli autoanticorpi ANA tramite immunofluorescenza indiretta risulta essere il test più utilizzato per lo screening delle malattie autoimmuni. Tuttavia, una delle limitazioni di questo metodo risiede nel fatto che la presenza di autoanticorpi non è sempre un valore diagnostico; è noto, infatti, che questi autoanticorpi possono formarsi anche in seguito ad infezioni o traumi [27] [4]. Infatti, in diverse patologie autoimmuni, la diagnosi risulta possibile grazie alla combinazione tra quadro clinico e identificazione di autoanticorpi specifici [38]. Questo scenario evidenzia l'importanza di studiare e identificare nuovi marcatori più specifici in modo da velocizzare le diagnosi di malattie autoimmuni. Il NAD rappresenta un cofattore importante nelle reazioni redox ed è un substrato per numerosi enzimi che usano il NAD e che sono coinvolti nel metabolismo, nella regolazione del ritmo circadiano, nell'invecchiamento e nell'infiammazione. In questo contesto, NAMPT rappresenta l'enzima limitante nella via di recupero del NAD svolgendo un ruolo fondamentale nella conversione della nicotinamide in nicotinamide mononucleotide. Negli ultimi anni NAMPT è stato studiato molto in ambiti patologici infiammatori e non solo, viste le sue diverse proprietà profiammatorie e immunomodulatorie. Infatti, molti studi hanno dimostrato un aumento nei livelli di NAMPT in diverse condizioni patologiche quali tumori come il melanoma, tumore del colon e tiroide [59], [60]. Inoltre, livelli di eNAMPT sono stati analizzati anche in altre condizioni di disfunzione metabolica come il diabete di tipo 2 e l'obesità, in cui è stato proposto come marcatore di infiammazione cronica, in quanto è stato dimostrato che i suoi livelli aumentano rispetto a individui sani e indipendentemente dal sesso [60]. Ulteriori evidenze indicano un coinvolgimento di eNAMPT in patologie infiammatorie e immuno-mediate come artrite reumatoide, sepsi e malattie infiammatorie intestinali, nelle quali anche in questo caso l'espressione di eNAMPT aumenta e nel caso delle IBD pediatriche in cui i suoi valori non solo aumentano ma sono anche associati alla gravità della malattia [61], [62]. Inoltre, è

stata anche riportata un'amplificazione nell'espressione del gene NAMPT in vari tipi di tumore. In particolare, Audrito et al. hanno dimostrato che nel melanoma l'amplificazione di NAMPT svolge un ruolo nelle mutazioni del gene BRAF, suggerendo una sua potenziale attività oncogenica [61]. NAMPT è già noto come indicatore di infiammazione in alcune condizioni autoimmuni quali la psoriasi. È stato dimostrato infatti, che nella psoriasi eNAMPT, secreto da cheratinociti e fibroblasti, è in grado di indurre la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali e di aumentare il rilascio di chemochine e di molecole di adesione, contribuendo all'amplificazione dell'infiammazione [63]. Nel complesso, queste evidenze suggeriscono che eNAMPT agendo come citochina pro-infiammatoria in diverse condizioni e svolgendo un ruolo funzionale nell'infiammazione, non ancora completamente chiaro e contesto dipendente, potrebbe essere un potenziale marcatore sfruttabile nella diagnostica delle patologie autoimmuni. Tuttavia, la sua elevata espressione in varie malattie di diversa natura, non solo autoimmuni, ne limita la specificità. In linea con quanto riportato in letteratura i risultati ottenuti, riportati in figura 30, mostrano livelli di eNAMPT elevati sia nel gruppo ANA+ che in quello ANA- rispetto alla coorte di donatori sani in cui i valori rimangono bassi e concentrati. Tuttavia, è importante notare che i livelli di eNAMPT hanno discriminato i soggetti a cui è stata richiesta una valutazione autoimmune dai donatori sani che rappresentavano livelli decisamente inferiori. Tali risultati suggeriscono che l'aumento di eNAMPT sia in grado di riconoscere uno stato sottostante di attivazione immunitaria precedente alla comparsa degli autoanticorpi e che probabilmente sia associato ad uno stato infiammatorio piuttosto che a una condizione autoimmune specifica, tenendo conto del fatto che, come riportato in letteratura, la positività degli ANA non è sempre diagnostica di malattia autoimmune, visto che può essere riscontrata anche in soggetti sani o transitoriamente. Al contrario, i soggetti ANA- possono comunque presentare altre patologie, incluse alcune forme di malattie autoimmuni sieronegative oltre ad altre condizioni infiammatorie o metaboliche. Pertanto, una possibile spiegazione dell'aumento dei livelli di eNAMPT nei soggetti ANA- osservato nel presente studio, risiede nel fatto che gli individui inclusi nello studio sono pazienti per i quali è stata richiesta un'indagine clinica e che quindi potrebbero presentare altre condizioni patologiche, quali disordini metabolici, come il diabete o anche neoplasie, nelle quali è già stato descritto un aumento dei livelli di eNAMPT.

La proteina C-reattiva rappresenta uno dei marcatori sierici, più comunemente analizzati nella pratica clinica per valutare l'indice d'infiammazione. È una proteina infiammatoria acuta che ha la capacità di aumentare in risposta a lesioni, infezioni o processi d'infiammazione, agendo da marcatore acuto d'infiammazione [64], [65]. Dal punto di vista strutturale, la PCR viene sintetizzata dal fegato come proteina pentamerica, la quale in condizioni d'infiammazione è in grado di dissociarsi

irreversibilmente in cinque monomeri. Tuttavia, studi recenti indicano che potrebbe svolgere anche un ruolo nella modulazione della risposta infiammatoria oltre al suo ruolo di indicatore d'infiammazione e questo aspetto ne amplia la difficoltà nell'interpretazione clinica. Inoltre, è noto che la PCR aumenta anche in alcune patologie autoimmuni quali l'artrite reumatoide in quanto presenta una condizione infiammatoria acuta. Tuttavia, come precedentemente detto i suoi livelli incrementano anche in altre condizioni patologiche quali patologie cardiovascolari e infezioni [65]. Una delle limitazioni della PCR come marcatore corrisponde al fatto che in alcune condizioni autoimmuni, come nel caso dell'artrite psoriasica, la sua validità risulta ridotta in quanto i suoi livelli risultano elevati in meno del 50% dei pazienti che presentano la patologia. Queste evidenze indicano una bassa sensibilità del marcatore in questa specifica patologia, rispetto all'artrite reumatoide, sottolineando la sua aspecificità diagnostica [66].

Nel presente contesto, in figura 31 si osserva un dato apparentemente paradossale in quanto i livelli di PCR riportati sono più elevati nei pazienti ANA- rispetto agli ANA+. In generale, la distribuzione di PCR nei due gruppi presenta bassi livelli, tuttavia sono presenti dei valori estremi che mostrano valori elevati di PCR. Inoltre, nel gruppo ANA- è possibile osservare una maggiore dispersione rispetto al gruppo ANA+ dove i risultati sono più concentrati e queste differenze potrebbero essere spiegate da una diversa risposta all'infiammazione. Coerentemente con quello riportato in letteratura, questo risultato potrebbe essere spiegato dal fatto che la PCR non riflette solo il profilo immunologico ma che possa essere coinvolta in meccanismi infiammatori differenti, non necessariamente correlati alla presenza di autoanticorpi. Il fatto che i livelli di PCR possano aumentare sia in seguito a un'infezione che durante un'infiammazione acuta rende questo indicatore ancora più aspecifico in molte condizioni aumentando ulteriormente la difficoltà nell'interpretazione. Nel complesso, tali evidenze suggeriscono che quindi la PCR, pur essendo un marcatore d'infiammazione, non rappresenta un marcatore specifico per le sole malattie autoimmuni, ma in generale un indicatore aspecifico di infiammazione sistemica la cui espressione può variare significativamente in base ai diversi meccanismi d'infiammazione.

In letteratura NAMPT è stato ampiamente studiato come una molecola coinvolta sia nell'infiammazione acuta e cronica associata ad alcuni *marker* tradizionali. In particolare, in uno studio condotto su una coorte pediatrica di 102 bambini e adolescenti (tra 0-18 anni) da Gesing J et al. è stato dimostrato che esiste una correlazione positiva tra i livelli di NAMPT e PCR tenendo in considerazione come criteri di esclusione malattie oncologiche, sindromi metaboliche e malattie croniche non infiammatorie. Questa associazione sottolinea che la secrezione di eNAMPT può essere indotta anche da stimoli infiammatori [67]. Ulteriori evidenze suggeriscono un ruolo di NAMPT nello

sviluppo di alcune malattie infiammatorie come la parodontite e malattie autoimmuni quali l'artrite reumatoide, malattie infiammatorie intestinali e morbo di Graves in cui i suoi livelli risultano associati all'attività di malattia, insieme al titolo degli autoanticorpi [67]. È importante notare che sia PCR che NAMPT non sono specifici solo per la diagnosi di malattie autoimmuni in quanto possono essere attivati da vari stimoli, come segnali microbici e diverse citochine proinfiammatorie. Entrambi, infatti, spesso riflettono uno stato infiammatorio ed è necessaria una valutazione del quadro clinico complessivo, in quanto da soli non sono sufficienti per effettuare una diagnosi [67], [68]. Quindi, a livello molecolare, NAMPT è in grado di modulare l'infiammazione agendo su vari fattori di trascrizione e in molti casi è considerato un fattore patologico; inoltre, potrebbe essere una molecola in grado di indicare processi infiammatori più specifici rispetto alla PCR [69]. Tuttavia, è necessario sottolineare che in alcuni casi questi due indicatori possiedono un valore diagnostico più preciso, come nel caso dell'artrite reumatoide in cui entrambi questi marcatori aumentano. NAMPT, infatti, è stato proposto come biomarcatore di questa patologia in quanto svolge un ruolo attivo nella patogenesi. Interagendo con il fattore di trascrizione fattore nucleare kappa-B1 (NFkB1) è, infatti, in grado di attivare vari mediatori infiammatori come l'IL-6 a livello dei fibroblasti sinoviali dei soggetti con artrite reumatoide, contribuendo probabilmente al mantenimento dell'infiammazione articolare. Allo stesso modo, anche i valori della PCR risultano tendenzialmente maggiori nei soggetti che presentano l'artrite reumatoide [69], [70]. Nonostante queste evidenze, esistono studi retrospettivi che evidenziano eventuali limiti nell'uso della PCR, in quanto in molti pazienti affetti da artrite reumatoide i livelli di PCR risultano nella norma nonostante la malattia sia attiva. Tuttavia, dalla letteratura emerge che i livelli di PCR in alcune patologie non siano ancora completamente chiari ed elevati livelli di questa molecola potrebbero essere indice di un aumento del rischio di sviluppo di varie comorbidità [70]. Sulla base di queste premesse nella nostra coorte non emergono tuttavia correlazioni significative e positive tra eNAMPT e PCR come riportato nelle figure 32 e 33. Nella coorte ANA+ la correlazione tende in ogni caso a diventare significativa ($p=0.05$), probabilmente è solo una questione di numerosità del campione analizzato. Quindi saranno necessari ulteriori studi per definire la relazione tra eNAMPT e PCR.

Per quanto riguarda i limiti di questo studio, in primo luogo si ha l'utilizzo della tecnica IFI per determinare gli ANA che nonostante rappresenti la tecnica più utilizzata e precisa per rilevare gli ANA e la sua sensibilità sia elevata, in questo contesto presenta delle limitazioni. Si tratta, infatti, di un esame che dipende dall'esperienza dell'operatore per quanto riguarda la scelta del titolo di diluizione [71]. Un altro limite dell'IFI risiede nella sua specificità, in quanto come precedentemente detto questi autoanticorpi possono essere presenti anche in pazienti con altre malattie o

transitoriamente o anche in soggetti sani [72]. Per quanto riguarda la valutazione della PCR bisogna tenere conto che nonostante sia considerata un biomarcatore di infiammazione aspecifico possiede anche la capacità di agire come mediatore infiammatorio e di regolare processi infiammatori del sistema immunitario innato rendendone più difficile l'interpretazione [65], [73]. Infatti, è importante sottolineare che la PCR non è sempre indice dell'attività della malattia e quindi vanno considerati anche altri parametri clinici [68]. Dai risultati è emerso che i livelli di eNAMPT sono alti sia nei soggetti ANA+ sia in quelli ANA- e questo ne limita la specificità e ne complica l'interpretazione del suo significato clinico; tenendo sempre conto che i due gruppi non rappresentano necessariamente popolazioni sane o omogenee. Infatti, è noto un aumento nei livelli di eNAMPT in relazione con alcune patologie come tumori, carcinoma del colon e della tiroide e diabete e non solo in presenza di infiammazione [59], [60]. Questo aspetto rappresenta un altro grande limite del presente studio, in quanto la presenza di patologie concomitanti nei due gruppi, potrebbe aver influenzato i livelli di eNAMPT. Infatti, idealmente alcuni pazienti avrebbero dovuto essere esclusi o analizzati separatamente.

In futuro la ricerca dovrà concentrarsi sulla standardizzazione e sul miglioramento della tecnica IFI così come sullo sviluppo di nuove tecniche, tramite sistemi automatizzati, in modo da migliorare la riproducibilità dei risultati e attraverso l'armonizzazione dell'interpretazione dei risultati [72]. Per quanto riguarda la PCR sono necessari ulteriori studi per chiarire il ruolo specifico delle sue isoforme nelle risposte infiammatorie. Una comprensione maggiore dei meccanismi che regolano la PCR raffineranno il valore diagnostico di questa proteina definendone un utilizzo più mirato in alcune patologie [65], [73]. Parallelamente, anche il ruolo di eNAMPT nel sistema immunitario non è ancora completamente chiaro. Dunque, è necessario approfondire e comprendere i diversi meccanismi molecolari attraverso cui eNAMPT viene secreto e regola la risposta infiammatoria [67]. Una strategia per il futuro potrebbe essere quella di selezionare maggiormente la popolazione in studio e aumentare il numero di pazienti coinvolti nello studio. Da un punto di vista clinico, l'integrazione di marcatori tradizionali e innovativi rappresenta l'approccio migliore per ottenere una valutazione più significativa e specifica dello stato infiammatorio.

6. CONCLUSIONE

Il presente studio ha avuto come obiettivo la valutazione di eNAMPT come potenziale nuovo marcatore aggiuntivo nella diagnostica delle malattie autoimmuni, analizzandone i livelli in relazione agli autoanticorpi antinucleo ANA e confrontandoli con i valori di un marcatore infiammatorio tradizionale, la proteina C-reattiva. La diagnosi delle malattie autoimmuni si basa sul rilevamento degli autoanticorpi ANA, tuttavia, questi autoanticorpi possono essere presenti anche in soggetti sani o con diverse condizioni non autoimmuni, come infezioni e neoplasie, rendendone più difficile la diagnosi. È proprio per questa difficoltà nella diagnosi che risulta essenziale identificare marcatori aggiuntivi, come eNAMPT, che possano affiancare gli ANA e altri marcatori tradizionali in modo da fornire informazioni più complete sullo stato patologico del paziente e di conseguenza una diagnosi più rapida. I risultati mostrano che eNAMPT risulta molto elevato sia nei soggetti ANA+ che in quelli ANA- senza significative differenze tra i due gruppi rispetto a una coorte di donatori sani, indicando che questo parametro sia maggiormente correlato ad uno stato infiammatorio sistemico piuttosto che ad una condizione autoimmune specifica. Tutte queste evidenze sono coerenti con quanto presente in letteratura; infatti, è noto che eNAMPT svolge un ruolo attivo nei processi infiammatori e risulta aumentato in diverse patologie quali malattie autoimmuni, disordini metabolici e neoplasie. Di conseguenza, l'espressione aumentata di eNAMPT in varie condizioni cliniche ne diminuisce la specificità diagnostica, rendendo complessa la sua interpretazione come biomcatore specifico per le malattie autoimmuni. Inoltre, la presenza di livelli elevati di eNAMPT non solo nei soggetti ANA+ ma anche nei soggetti ANA- può essere interpretata considerando l'eterogeneità della popolazione studiata, che include soggetti con varie patologie. Allo stesso modo, anche la PCR si conferma un indicatore aspecifico di infiammazione. Per quanto riguarda la correlazione tra eNAMPT e PCR questa risulta debole e non statisticamente significativa. Questo risultato non permette di stabilire una associazione tra i due marcatori; tuttavia, potrebbe suggerire che entrambi i marcatori riflettano processi infiammatori condivisi fornendo informazioni diverse della stessa condizione. È interessante osservare come il valore si avvicini alla soglia di significatività statistica ($p = 0,05$) nella coorte ANA+, indicando che l'assenza di significatività potrebbe essere riconducibile alla limitata numerosità del campione analizzato.

Dunque, i risultati ottenuti supportano l'ipotesi che eNAMPT, pur non potendo essere considerato un indicatore specifico di autoimmunità, possa comunque rappresentare un potenziale marcatore innovativo e sensibile dello stato infiammatorio o di processi che potrebbero precedere lo sviluppo di patologie autoimmuni e la secrezione di autoanticorpi. Tuttavia, il suo coinvolgimento nelle fasi precoci delle malattie autoimmuni necessita di ulteriori approfondimenti. Queste evidenze

sottolineano che l'utilizzo di un unico marcatore non sia sufficiente per diagnosticare le diverse malattie autoimmuni. Quindi, l'integrazione di eNAMPT con marcatori tradizionali, già utilizzati, in associazione con il rilevamento degli autoanticorpi tramite l'IFI potrebbe rappresentare un approccio innovativo per migliorare l'accuratezza diagnostica e per comprendere meglio i meccanismi dei processi infiammatori nelle diverse patologie autoimmuni. Infine, una strategia per futuri studi potrebbe essere quella di ampliare le coorti di studio e considerare più criteri di esclusione relativi alle varie comorbidità presenti, in modo da chiarire e comprendere più a fondo il ruolo di eNAMPT definendo un suo potenziale utilizzo come biomarcatore nella pratica clinica.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] V. Audrito *et al.*, “Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) promotes M2 macrophage polarization in chronic lymphocytic leukemia,” 2015, doi: 10.1182/blood-2014-07.
- [2] M. Kumar, L. Yip, F. Wang, S. E. Marty, and C. G. Fathman, “Autoimmune disease: genetic susceptibility, environmental triggers, and immune dysregulation. Where can we develop therapies?,” 2025, *Frontiers Media SA*. doi: 10.3389/fimmu.2025.1626082.
- [3] Sacchi Maria Cristina, “Sacchi M. Corso- Il ruolo di un Laboratorio Ospedaliero nella diagnostica delle Malattie Autoimmuni.”
- [4] N. N. Kumar, S. Ahmad Dit Al Hakim, and B. Grygiel-Górniak, “Antinuclear Antibodies in Non-Rheumatic Diseases,” Jan. 01, 2025, *Sciendo*. doi: 10.2478/aite-2025-0004.
- [5] A. Agrawal and Y. Wu, “Editorial: Biology of C-reactive protein,” 2024, *Frontiers Media SA*. doi: 10.3389/fimmu.2024.1445001.
- [6] S. Lautrup, Y. Hou, E. F. Fang, and V. A. Bohr, “Roles of NAD⁺ in Health and Aging,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 14, no. 1, Jan. 2024, doi: 10.1101/cshperspect.a041193.
- [7] R. Zapata-Pérez, R. J. A. Wanders, C. D. M. van Karnebeek, and R. H. Houtkooper, “NAD⁺ + homeostasis in human health and disease ,” *EMBO Mol. Med.*, vol. 13, no. 7, Jul. 2021, doi: 10.15252/emmm.202113943.
- [8] M. E. Migaud, M. Ziegler, and J. A. Baur, “Regulation of and challenges in targeting NAD⁺ metabolism,” Oct. 01, 2024, *Nature Research*. doi: 10.1038/s41580-024-00752-w.
- [9] L. E. Navas and A. Carnero, “NAD⁺ metabolism, stemness, the immune response, and cancer,” Dec. 01, 2021, *Springer Nature*. doi: 10.1038/s41392-020-00354-w.
- [10] A. Peng, J. Li, J. Xing, Y. Yao, X. Niu, and K. Zhang, “The function of nicotinamide phosphoribosyl transferase (NAMPT) and its role in diseases,” 2024, *Frontiers Media SA*. doi: 10.3389/fmolb.2024.1480617.
- [11] F. J. Martínez-Morcillo *et al.*, “Non-canonical roles of NAMPT and PARP in inflammation,” Feb. 01, 2021, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.dci.2020.103881.
- [12] V. Audrito, “The Extracellular NADome Modulates Immune Responses,” Aug. 04, 2021, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fimmu.2021.704779.
- [13] C. C. S. Chini, J. D. Zeidler, S. Kashyap, G. Warner, and E. N. Chini, “Evolving concepts in NAD⁺ metabolism,” Jun. 01, 2021, *Cell Press*. doi: 10.1016/j.cmet.2021.04.003.
- [14] V. Audrito, V. G. Messana, and S. Deaglio, “NAMPT and NAPRT: Two Metabolic Enzymes With Key Roles in Inflammation,” Mar. 19, 2020, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fonc.2020.00358.
- [15] K. Tokizane and S. Imai, “NAD⁺ oscillation and hypothalamic neuronal functions,” *Fac. Rev.*, vol. 10, Apr. 2021, doi: 10.12703/r/10-42.
- [16] L. Q. Zhang, D. P. Heruth, and S. Q. Ye, “Nicotinamide phosphoribosyltransferase in human diseases,” 2011. doi: 10.4172/1948-593X.1000038.
- [17] F. Carbone *et al.*, “Regulation and function of extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin,” *Compr. Physiol.*, vol. 7, no. 2, pp. 603–621, Apr. 2017, doi: 10.1002/cphy.c160029.
- [18] R. Manickam, S. Santhana, W. Xuan, K. S. Bisht, and S. M. Tipparaju, “Nampt: a new therapeutic target for modulating NAD⁺ levels in metabolic, cardiovascular, and neurodegenerative diseases,” *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 103, no. 7, pp. 208–224, Jul. 2025, doi: 10.1139/cjpp-2024-0400.
- [19] A. Garten, S. Petzold, A. Körner, S. ichiro Imai, and W. Kiess, “Nampt: linking NAD biology, metabolism and cancer,” Apr. 2009. doi: 10.1016/j.tem.2008.10.004.

- [20] V. Audrito *et al.*, “NAD-Biosynthetic and Consuming Enzymes as Central Players of Metabolic Regulation of Innate and Adaptive Immune Responses in Cancer,” 2019, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fimmu.2019.01720.
- [21] C. Travelli, G. Colombo, S. Mola, A. A. Genazzani, and C. Porta, “NAMPT: A pleiotropic modulator of monocytes and macrophages,” Sep. 01, 2018, *Academic Press*. doi: 10.1016/j.phrs.2018.06.022.
- [22] M. Gasparrini and V. Audrito, “NAMPT: A critical driver and therapeutic target for cancer,” Apr. 01, 2022, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.biocel.2022.106189.
- [23] A. A. Grolla, C. Travelli, A. A. Genazzani, and J. K. Sethi, “Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase, a new cancer metabokine,” 2016, *John Wiley and Sons Inc.* doi: 10.1111/bph.13505.
- [24] E. Semerena, A. Nencioni, and K. Masternak, “Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase: role in disease pathophysiology and as a biomarker,” 2023, *Frontiers Media SA.* doi: 10.3389/fimmu.2023.1268756.
- [25] S. Torretta *et al.*, “The Cytokine Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (eNAMPT; PBEF; Visfatin) Acts as a Natural Antagonist of C-C Chemokine Receptor Type 5 (CCR5),” *Cells*, vol. 9, no. 2, Feb. 2020, doi: 10.3390/cells9020496.
- [26] M. Yoshida *et al.*, “Extracellular Vesicle-Contained eNAMPT Delays Aging and Extends Lifespan in Mice,” *Cell Metab.*, vol. 30, no. 2, pp. 329-342.e5, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.cmet.2019.05.015.
- [27] F. W. Miller, “The increasing prevalence of autoimmunity and autoimmune diseases: an urgent call to action for improved understanding, diagnosis, treatment, and prevention,” Feb. 01, 2023, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.coi.2022.102266.
- [28] H. Lou, G. S. Ling, and X. Cao, “Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: From immunopathology to therapeutic target,” Oct. 01, 2022, *Academic Press*. doi: 10.1016/j.jaut.2022.102861.
- [29] B. Nakken, G. Nagy, P. C. Huszthy, E. Fossum, Y. Kontinen, and P. Szodoray, “Inflammatory Mediators in Autoimmunity and Systemic Autoimmune Diseases,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/878712.
- [30] S. Mu *et al.*, “Autoimmune disease: a view of epigenetics and therapeutic targeting,” 2024, *Frontiers Media SA.* doi: 10.3389/fimmu.2024.1482728.
- [31] A. N. Theofilopoulos, D. H. Kono, and R. Baccala, “The multiple pathways to autoimmunity,” Jun. 20, 2017, *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/ni.3731.
- [32] Y. Xiang, M. Zhang, D. Jiang, Q. Su, and J. Shi, “The role of inflammation in autoimmune disease: a therapeutic target,” 2023, *Frontiers Media SA.* doi: 10.3389/fimmu.2023.1267091.
- [33] L. Wang, F. S. Wang, and M. E. Gershwin, “Human autoimmune diseases: A comprehensive update,” Oct. 01, 2015, *Blackwell Publishing Ltd.* doi: 10.1111/joim.12395.
- [34] Betterle Corrado, *Le malattie autoimmuni*, Prima Edizione., vol. 1. Padova: Piccin - Nuova Libreria, 2000.
- [35] N. B. D. V. E. T. R. Tozzoli, *Il laboratorio nelle malattie autoimmuni d'organo-Esculapio*.
- [36] N. B. D. V. E. T. R. Tozzoli, *Il laboratorio delle malattie reumatiche autoimmuni- Esculapio*.
- [37] G. Frazzei, R. F. van Vollenhoven, B. A. de Jong, S. E. Siegelaa, and D. van Schaardenburg, “Preclinical Autoimmune Disease: a Comparison of Rheumatoid Arthritis, Systemic Lupus Erythematosus, Multiple Sclerosis and Type 1 Diabetes,” Jun. 30, 2022, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fimmu.2022.899372.
- [38] H. Ma, C. Murphy, C. E. Loscher, and R. O’Kennedy, “Autoantibodies - enemies, and/or potential allies?,” Oct. 19, 2022, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fimmu.2022.953726.
- [39] L. Cinquanta, M. Infantino, and N. Bizzaro, “Detecting Autoantibodies by Multiparametric Assays: Impact on Prevention, Diagnosis, Monitoring, and Personalized Therapy in Autoimmune Diseases,” Jan. 01, 2022, *Oxford University Press*. doi: 10.1093/jalm/jfab132.

- [40] P. D. Burbelo, M. J. Iadarola, J. M. Keller, and B. M. Warner, “Autoantibodies Targeting Intracellular and Extracellular Proteins in Autoimmunity,” Mar. 08, 2021, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fimmu.2021.548469.
- [41] L. E. C. Andrade *et al.*, “Reflecting on a decade of the international consensus on ANA patterns (ICAP): Accomplishments and challenges from the perspective of the 7th ICAP workshop,” Sep. 01, 2024, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.autrev.2024.103608.
- [42] “<https://www.anapatterns.org/trees.php>.”
- [43] A. Ranjan *et al.*, “Navigating through antinuclear antibody (ANA) patterns on HEp-2 cell line: similar yet distinct! 1 AIIMS Patna International Consensus on ANA Patterns (ICAP) classification tree revisited: A single centre report on four nuclear patterns from a tertiary care centre in India.”
- [44] J. Damoiseaux *et al.*, “International consensus on ANA patterns (ICAP): the bumpy road towards a consensus on reporting ANA results,” *Autoimmunity Highlights*, vol. 7, no. 1, pp. 1–8, Dec. 2016, doi: 10.1007/s13317-016-0075-0.
- [45] M. Ahmed *et al.*, “From Homeostasis To Inflammation To Autoimmunity: The Potential Impact of CRP,” Dec. 01, 2025, *Springer*. doi: 10.1007/s10753-025-02303-7.
- [46] H. H. Zhou, Y. L. Tang, T. H. Xu, and B. Cheng, “C-reactive protein: structure, function, regulation, and role in clinical diseases,” 2024, *Frontiers Media SA*. doi: 10.3389/fimmu.2024.1425168.
- [47] T. Levinson and A. Wasserman, “C-Reactive Protein Velocity (CRPv) as a New Biomarker for the Early Detection of Acute Infection/Inflammation,” Aug. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/ijms23158100.
- [48] “Audrito V. Corso di biochimica applicata A.A. 2025/2026- metodologie biochimiche IV.”
- [49] “<https://adipogen.com/ag-45a-0006y-nampt-visfatin-pbef-human-elisa-kit.html>.”
- [50] “<https://www.euroimmun.it/about-us/company-profile-it/>.”
- [51] “https://www.biognost.be/diagnostics/wp-content/uploads/2023/12/YG_2900_I_UK_A04_web.pdf.”
- [52] “<https://laboratorioeuroimmun.it/it/test-laboratorio/anticorpi-anti-recettore-per-la-fosfolipasi-a2-pla2r/>.”
- [53] “<https://www.siemens-healthineers.com/laboratory-diagnostics/clinical-chemistry-and-immunoassay-systems/atellica-solution-analyzers>.”
- [54] “2024/2025 - STATISTICA MF0142 Agro-Ambientale - ALESSANDRIA.”
- [55] V. van Drongelen, J. Rew, and A. C. Billi, “Sex Bias in Autoimmunity: New Findings and New Opportunities,” Sep. 01, 2025, *Elsevier Inc.* doi: 10.1016/j.xjidi.2025.100391.
- [56] Z. Vadasz, T. Haj, A. Kessel, and E. Toubi, “Age-related autoimmunity,” Apr. 04, 2013. doi: 10.1186/1741-7015-11-94.
- [57] M. Zhao *et al.*, “Age-standardized incidence, prevalence, and mortality rates of autoimmune diseases in adolescents and young adults (15–39 years): an analysis based on the global burden of disease study 2021,” *BMC Public Health*, vol. 24, no. 1, Dec. 2024, doi: 10.1186/s12889-024-19290-3.
- [58] V. R. Moulton, “Sex hormones in acquired immunity and autoimmune disease,” Oct. 04, 2018, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fimmu.2018.02279.
- [59] K. Davis *et al.*, “Nicotinamide phosphoribosyltransferase expression and clinical outcome of resected stage I/II pancreatic ductal adenocarcinoma,” *PLoS One*, vol. 14, no. 3, Mar. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0213576.
- [60] I. V. Frielitz-Wagner *et al.*, “Diurnal rythm of Nampt is gender and weight dependent,” *Obes. Res. Clin. Pract.*, vol. 18, no. 3, pp. 181–188, May 2024, doi: 10.1016/j.orcp.2024.06.005.
- [61] V. Audrito *et al.*, “Tumors carrying BRAF-mutations over-express NAMPT that is genetically amplified and possesses oncogenic properties,” *J. Transl. Med.*, vol. 20, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/s12967-022-03315-9.

- [62] Z. A. Chen *et al.*, “Integrated multiple microarray studies by robust rank aggregation to identify immune-associated biomarkers in Crohn’s disease based on three machine learning methods,” *Sci. Rep.*, vol. 13, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1038/s41598-022-26345-1.
- [63] M. Matwiejuk, A. Kulczyńska-Przybik, H. Myśliwiec, A. Chabowski, B. Mroczko, and I. Flisiak, “The Role of Selected Proteins in the Pathogenesis of Psoriasis,” Jul. 01, 2025, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/ijms26136475.
- [64] “Methods Data”, doi: 10.1007/s15010.
- [65] Nicola R. Sproston and Jason J. Ashworth* 2018, “Role of C-Reactive Protein at Sites of inflammation and infection,” *Front. Immunol.*.
- [66] C. Houttekiet, K. De Vlam, B. Neerinckx, and R. Lories, “Systematic review of the use of CRP in clinical trials for psoriatic arthritis: A concern for clinical practice?,” Feb. 08, 2022, *BMJ Publishing Group*. doi: 10.1136/rmdopen-2021-001756.
- [67] J. Gesing *et al.*, “NAMPT serum levels are selectively elevated in acute infectious disease and in acute relapse of chronic inflammatory diseases in children,” *PLoS One*, vol. 12, no. 8, Aug. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0183027.
- [68] M. Paroli, C. Gioia, D. Accapezzato, and R. Caccavale, “Demographic Characteristics and Inflammatory Biomarker Profile in Psoriatic Arthritis Patients with Comorbid Fibromyalgia: A Cross-Sectional Study,” *Medicina (Lithuania)*, vol. 61, no. 6, Jun. 2025, doi: 10.3390/medicina61061050.
- [69] D. S. N. Sasikumar and V. Sundararajan, “Machine learning-based transcriptomic analysis identifies NAMPT and SAT1 as potential biomarkers and therapeutic targets in ferroptosis-associated rheumatoid arthritis,” *PLoS One*, vol. 20, no. 9 September, Sep. 2025, doi: 10.1371/journal.pone.0333556.
- [70] J. E. Pope and E. H. Choy, “C-reactive protein and implications in rheumatoid arthritis and associated comorbidities,” Feb. 01, 2021, *W.B. Saunders*. doi: 10.1016/j.semarthrit.2020.11.005.
- [71] O. S. Alsaed, L. I. Alamlah, O. Al-Radideh, P. Chandra, S. Alemadi, and A. W. Al-Allaf, “Clinical utility of ANA-ELISA vs ANA-immunofluorescence in connective tissue diseases,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-87366-w.
- [72] T. Hadjout *et al.*, “Is there an alternative to the indirect immunofluorescence ANA HEp-2 assay for the diagnosis of connective tissue diseases?,” *Front. Immunol.*, vol. 16, 2025, doi: 10.3389/fimmu.2025.1669124.
- [73] M. E. Olson *et al.*, “A biofunctional review of C-reactive protein (CRP) as a mediator of inflammatory and immune responses: differentiating pentameric and modified CRP isoform effects,” 2023, *Frontiers Media SA*. doi: 10.3389/fimmu.2023.1264383.