

Università del Piemonte Orientale “A. Avogadro”



Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Corso di Laurea Magistrale in Biologia

TESI DI LAUREA

**IL-6, TNF- α e NAMPT extracellulare: possibili biomarcatori per la
diagnosi precoce delle malattie autoimmuni**

Candidato:

Zattera Tommaso

Zattera Tommaso

Relatrice:

Prof.ssa Audrito Valentina

Correlatrice:

Dr.ssa Sacchi Maria Cristina

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1 Risposta infiammatoria	3
1.1.1 Citochine pro-infiammatorie	5
1.1.1.1 <i>Interleuchina-6 (IL-6)</i>	8
1.1.1.2 <i>Fattore di Necrosi Tumorale-α (TNF-α)</i>	10
1.1.1.3 <i>Nicotinamide Fosforibosiltransferasi (NAMPT)</i>	13
1.1.1.3.1 <i>NAMPT intracellulare: enzima chiave nel metabolismo del NAD</i>	14
1.1.1.3.2 <i>NAMPT extracellulare (eNAMPT): mediatore infiammatorio</i>	16
1.2 Autoimmunità	20
1.2.1 <i>Le malattie autoimmuni</i>	21
1.2.2 <i>Classificazione delle malattie autoimmuni</i>	22
1.2.3 <i>Patogenesi delle malattie autoimmuni</i>	25
1.2.4 <i>Diagnosi delle malattie autoimmuni</i>	29
1.2.4.1 <i>Anticorpi antinucleo (ANA)</i>	30
1.3 Autoimmunità e infiammazione	33
1.4 Scopo della Tesi	36
2. MATERIALI E METODI	38
2.1 <i>Popolazione in studio</i>	38
2.2 <i>MAGLUMI X3</i>	44
2.3 <i>ELISA Kit Nampt (Visfatin/PBEF) (human)</i>	48
2.4 <i>UNIQUO 160</i>	51
2.5 <i>Analisi statistica</i>	55
3. RISULTATI	56
3.1 <i>Determinazione dei livelli di IL-6, TNF-α ed eNAMPT nella coorte in studio</i>	56
3.2 <i>Confronto dei livelli di espressione delle citochine nella coorte ANA-positivi</i>	56
3.3 <i>Confronto dei livelli di espressione delle citochine nella coorte ANA-negativi</i>	57
3.4 <i>Correlazione IL-6-eNAMPT nella coorte in studio</i>	58
3.5 <i>Correlazione TNF-α-eNAMPT nella coorte in studio</i>	60
3.6 <i>Correlazione IL-6-TNF-α nella coorte in studio</i>	62
4. DISCUSSIONE DEI RISULTATI	63
5. CONCLUSIONI	69
6. BIBLIOGRAFIA	71

1. INTRODUZIONE

Le malattie autoimmuni sono condizioni patologiche complesse che si manifestano in conseguenza alla rottura della tolleranza immunologica verso le componenti dell'organismo e possono affliggere individui di ogni età e sesso. La loro eziopatogenesi è multifattoriale e la diagnosi è molto spesso complessa a causa dell'eterogeneità delle manifestazioni cliniche e della specificità limitata dei marker di laboratorio attualmente correlabili a tali condizioni (1). Inoltre, grazie a studi e scoperte recenti è stato dimostrato un importante coinvolgimento del processo infiammatorio sia nella patogenesi sia nell'evoluzione delle malattie autoimmuni (2), indicando la necessità di approfondire e incrementare le conoscenze riguardanti la relazione di causalità esistente tra l'infiammazione e le risposte autoimmunitarie, ed eventualmente la correlazione tra biomarcatori infiammatori già noti o di nuova introduzione per ottimizzare la diagnosi.

1.1 Risposta infiammatoria

L'infiammazione è un processo fisiologico attuato dall'organismo, nello specifico indotto dall'immunità innata e protratto dall'immunità adattativa, il cui scopo è quello di reclutare globuli bianchi, proteine plasmatiche e fluidi ematici nella sede di infezione o nella regione danneggiata, in modo da rispondere efficacemente agli stimoli lesivi e ripristinare l'omeostasi. La risposta infiammatoria si caratterizza da una fase iniziale in cui si verifica il riconoscimento di molecole di origine microbica (PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns) o derivanti dal danno cellulare e tissutale (DAMPs, Damage-Associated Molecular Patterns) da parte di cellule altamente specializzate nel riconoscimento antigenico, come macrofagi, cellule dendritiche e mastociti, definite cellule presentanti l'antigene (APC). Le APC rispondono a questo segnale mediante la secrezione di molecole pro-infiammatorie, distinte in citochine e chemochine, le quali permettono il reclutamento di altre cellule della difesa attraverso la migrazione di esse dal sangue ai tessuti infiammati, ma anche attraverso la produzione di molecole vasoattive che permettono la fuoriuscita dalla circolazione delle proteine di fase acuta e di liquidi a causare l'edema nella zona infiammata. A questo segue una complessa interazione tra fattori molecolari e cellule immunitarie, appartenenti inizialmente all'immunità innata e successivamente anche all'immunità adattativa, a livello del tessuto danneggiato ma che possono espandersi a livello sistemico allo scopo di eliminare l'infezione e riparare il danno, ripristinando l'integrità tissutale nella cosiddetta fase di risoluzione. Se ciò non avviene e la funzionalità del tessuto non riesce ad essere riottenuta, si instaura un equilibrio tra processi infiammatori e di riparazione che porta alla comparsa dell'infiammazione cronica, uno stato infiammatorio persistente che impedisce la risoluzione del processo e che spesso evolve nella deposizione di collagene e componenti della matrice extracellulare, i quali formano il tessuto fibrotico

inerte, con conseguente perdita dell'architettura tissutale e della funzionalità dell'organo e importanti ripercussioni sulla salute del soggetto (3,4). Gli effetti locali dell'infiammazione sono cinque: rossore come conseguenza dell'iperemia attiva (aumento del flusso sanguigno nella zona infiammata), calore associato all'aumento dell'afflusso di sangue arterioso, gonfiore o edema determinato dall'accumulo di trasudato infiammatorio, dolore derivante dall'attivazione delle fibre nervose algogene associate alla zona lesionata, e perdita di funzione dovuta al mancato utilizzo della regione infiammata (5). L'infiammazione locale può però estendersi anche a livello sistemico, in questo caso con segni clinici tipici, tra cui la febbre, la leucocitosi (aumento del numero di globuli bianchi nel sangue), e la risposta di fase acuta (sintesi epatica di particolari classi di proteine, dette per l'appunto proteine di fase acuta). Gli effetti sistemici dell'infiammazione sono una conseguenza diretta dell'azione delle citochine pro-infiammatorie (3).

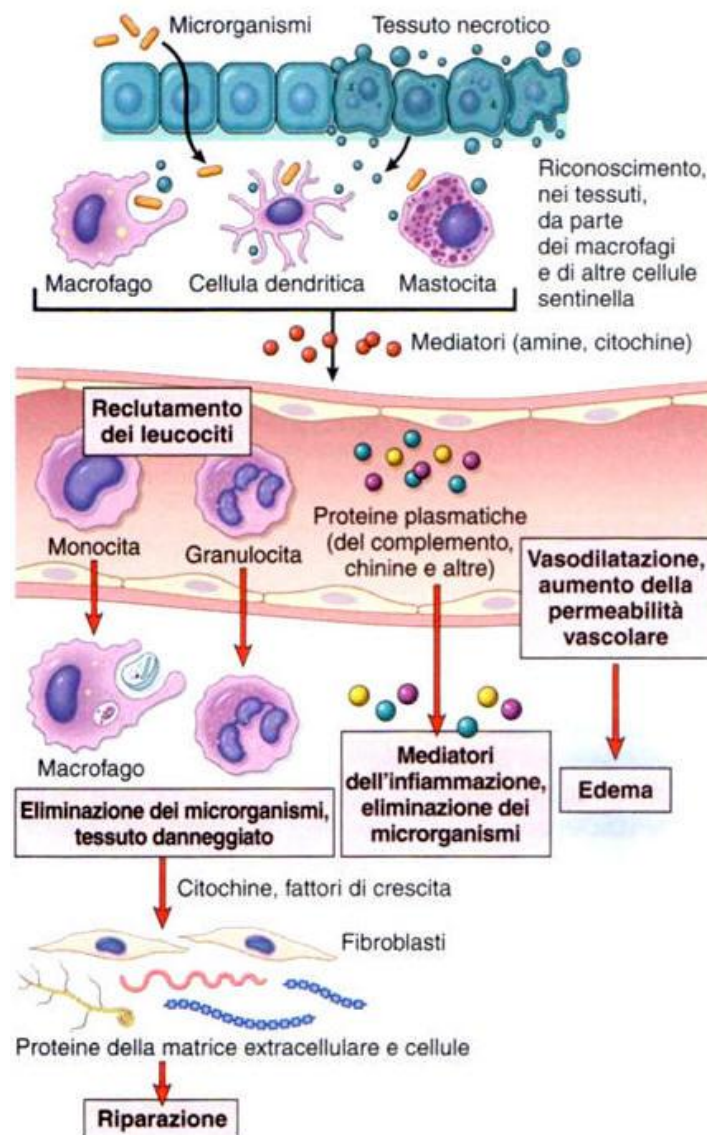


Figura 1: mediatori e fasi della risposta infiammatoria acuta; https://www.unmedicopertutti.it/amp-version-caratteristiche_inflammatione.html

Per definire la tipologia di infiammazione si utilizza una classificazione basata sulla causa del processo infiammatorio e sulle principali tipologie di molecole infiammatorie coinvolte: infiammazione di tipo I causata da una disfunzione neurologica, infiammazione di tipo II causata da danni fisici, infiammazione di tipo III causata da sostanze chimiche, infiammazione di tipo IV causata da infezioni di microrganismi patogeni, infiammazione di tipo V causata dal cancro, infiammazione di tipo VI causata da alterazioni del sistema immunitario, e infiammazione di tipo VII causata dalla riduzione del flusso ematico (6).

Per definire uno stato infiammatorio clinicamente rilevante vengono eseguiti dei dosaggi laboratoriali di diversi biomarcatori secreti durante la risposta infiammatoria, tra cui il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α), svariate interleuchine (le principali sono IL-1 e IL-6) e proteine di fase acuta come la proteina C reattiva (PCR), ma anche di enzimi come la ciclossigenasi-2 (COX-2), la 5-lipossigenasi (5-LOX) e le metalloproteasi della matrice (MMP). Queste molecole vengono dosate a livello sierico, salivare e urinario, e sono dei marcatori di importanza fondamentale per la categorizzazione dei processi infiammatori e per determinare il migliore approccio terapeutico attuabile (6).

1.1.1 Citochine pro-infiammatorie

La prima risposta dell'organismo ad un danno tissutale o ad un'infezione microbica è la secrezione di molecole pro-infiammatorie da parte delle cellule dell'immunità innata, le cosiddette citochine, che innescano la reazione infiammatoria acuta, permettono il reclutamento delle altre cellule dell'immunità adattativa e la risoluzione del processo (3). Le citochine sono molecole di natura glicoproteica a basso peso molecolare appartenenti a classi diverse, con alcune caratteristiche distintive, ma tutte accomunate dal loro ruolo fondamentale nell'infiammazione: sono molecole pleiotropiche, ossia caratterizzate da una pletora di effetti differenti in base al tessuto in cui agiscono e al suo stato di salute o patologia, tra cui induzione del processo infiammatorio, inibizione della replicazione virale, attivazione delle risposte dei linfociti T e riparazione delle ferite, ma anche in base alla fase della vita dell'organismo, intervenendo nello sviluppo embrionale, nella rigenerazione tissutale, in processi metabolici e loro alterazioni come l'obesità e nell'invecchiamento (7). Le citochine mediano la comunicazione tra le cellule del sistema immunitario, e tra esse e altre tipologie cellulari, come cellule nervose, cellule staminali ematopoietiche e cellule che intervengono nei processi riparativi (8). Esse hanno azione paracrina perché il loro compito viene svolto principalmente nei pressi del sito in cui sono prodotte, autocrina perché alcune citochine sono in grado di agire sulle cellule stesse che le producono, e in alcuni casi di infiammazione particolarmente estesa sono in grado di scatenare una risposta sistemica con effetto endocrino, come nel caso della loro abnorme produzione definita tempesta citochinica in alcune infezioni virali (8,9). Citochine diverse possono

svolgere la stessa azione o avere effetti simili (ridondanza), oppure l'azione di una citochina può inibire quella di un'altra (antagonismo); molte di quelle con un ruolo preponderante nell'infiammazione acuta vengono anche prodotte dalle cellule dell'immunità adattativa per sostenere una risposta cronica; una citochina può stimolare la produzione di altre citochine, entrambe le quali attivano cascate di segnalazione a valle con effetti biologici potenziati (sinergia) (3,8). Nonostante la maggior parte delle citochine abbia un ruolo pro-infiammatorio, alcune di esse hanno effetto antinfiammatorio, come IL-10 e TGF- β , compito svolto inibendo l'attività dell'immunità innata attraverso la stimolazione dell'effetto antinfiammatorio e immunosoppressivo dei linfociti T regolatori (Treg) (10). Le principali citochine coinvolte nella risposta infiammatoria acuta, e dunque prodotte dall'immunità innata, sono riportate nella tabella.

Citochina	Fonte cellulare	Bersagli ed effetti biologici
TNF	Macrofagi Linfociti T Cellule NK	Cellule endoteliali: attivazione (infiammazione, coagulazione) Neutrofili: attivazione Ipotalamo: febbre Fegato: sintesi delle proteine di fase acuta Muscolo, tessuto adiposo: metabolismo (cachessia) Altre cellule: apoptosi
IL-1	Macrofagi Cellule dendritiche Cellule endoteliali Cellule epiteliali	Cellule endoteliali: attivazione (infiammazione, coagulazione) Ipotalamo: febbre Fegato: sintesi delle proteine di fase acuta Linfociti: differenziamento in linfociti Th17
Chemochine	Macrofagi Cellule endoteliali Linfociti T Fibroblasti Piastrine	Leucociti: chemotassi, attivazione, migrazione nei tessuti
IFN tipo I (IFN- α e β)	INF- α : macrofagi, cellule dendritiche IFN- β : fibroblasti	Tutte le cellule: stato antivirale, aumento dell'espressione di molecole MHC di classe I Cellule NK: attivazione
IL-6	Macrofagi Cellule endoteliali Linfociti T	Fegato: sintesi delle proteine di fase acuta Linfociti B: proliferazione e differenziamento a plasmacellule Linfociti T: differenziamento in linfociti Th17

IL-10	Linfociti Treg Macrofagi	Macrofagi, DC: inibizione della produzione di IL-12, dell'espressione di molecole costimolatorie e di molecole MHC di classe I
-------	-----------------------------	--

Tabella 1: principali citochine dell'immunità innata, fonte cellulare di produzione, bersagli cellulari ed effetti biologici; Abbas et al., 2025

TNF = Fattore di Necrosi Tumorale (*Tumor Necrosis Factor*)

IL = Interleuchina

IFN = Interferone

MHC = Complesso Maggiore di Istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*)

NK = cellule *Natural Killer*

DC = Cellule Dendritiche (*Dendritic Cells*)

Le citochine svolgono la loro funzione biologica interagendo con specifici recettori che ne riconoscono domini precisi e che permettono l'attivazione di vie di segnalazione intracellulari allo scopo di indurre dei processi in risposta all'effetto delle citochine stesse. Tutti questi recettori, indipendentemente dal rispettivo ligando, sono formati da una o più subunità proteiche, e presentano una porzione extracellulare di legame per le citochine, una porzione transmembrana che ne garantisce il posizionamento stabile a livello della membrana cellulare, e una porzione intracellulare che attiva la trasduzione del segnale. I recettori per le citochine si dividono in quattro superfamiglie: recettori per le citochine di tipo II o famiglia dei recettori per l'interferone, famiglia del recettore per TNF (unica classe recettoriale costituita da trimeri preformati e non soggetti a polimerizzazione successiva al legame con il ligando), famiglia dei recettori per IL-1, e famiglia dei recettori per IL-17. Le vie di segnalazione associate ai recettori per le citochine rientrano generalmente in due pathway, ossia la trasduzione del segnale associata a JAK-STAT (recettori per le citochine di tipo I e II), e la via di attivazione di NF- κ B, distinguibile in via canonica e via non canonica (3).

Le citochine infiammatorie vengono normalmente prodotte durante le risposte infiammatorie acute e croniche, ma quando la loro produzione diventa eccessiva e deregolata compaiono delle condizioni patologiche definite come "malattie causate da citochine pro-infiammatorie". In queste morbidità i linfociti secernono tali citochine, le quali reclutano e attivano altre classi di linfociti che sostengono la risposta infiammatoria, e dunque si instaurano condizioni patologiche più complesse caratterizzate da un'infiammazione cronica. Le principali citochine prodotte durante le risposte infiammatorie croniche sono interferone- γ (INF- γ), interleuchina-17 (IL-17) e fattore di necrosi tumorale (TNF) che sostengono il processo, alle quali si aggiungono le chemochine che permettono l'efficace reclutamento delle altre cellule della difesa. Una volta che il processo cronicizza compare anche un importante danno tissutale, il principale problema delle infiammazioni croniche, che è sostenuto dalle

citochine mediante effetti dannosi diretti ai tessuti e di attivazione degli altri globuli bianchi attraverso l'induzione dell'espressione delle molecole MHC, ma anche dalle molecole prodotte dagli altri leucociti reclutati, come specie reattive dell'ossigeno (ROS) ed enzimi lisosomiali. Il processo appena descritto è considerato il principale meccanismo patogenetico delle malattie autoimmuni organo-specifiche (3).

DANNO TISSUTALE MEDIATO DALLE CITOCINE DEI LINFOCITI T

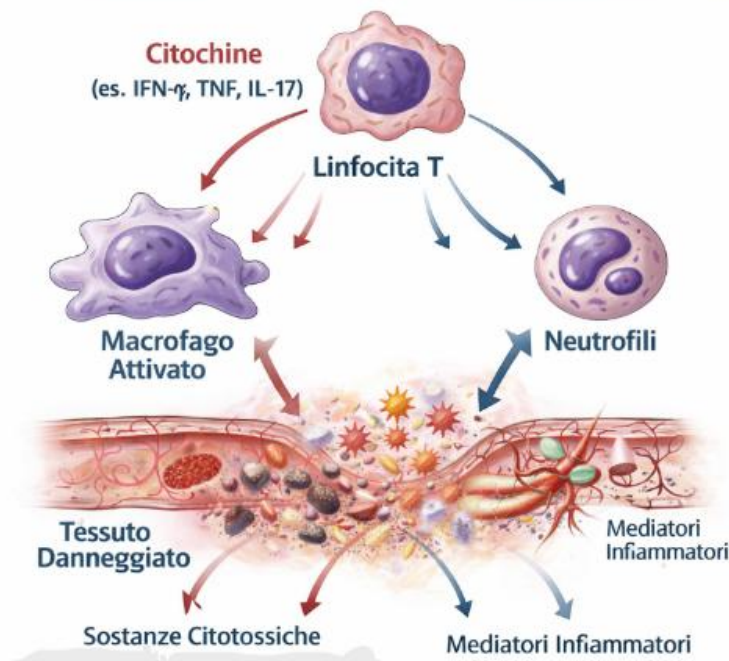


Figura 2: rappresentazione del danno tissutale mediato dalle citochine secrete dai linfociti T durante l'infiammazione cronica. Immagine generata con l'ausilio dell'intelligenza artificiale (*ChatGPT, OpenAI*), 2026

Per il trattamento delle patologie su base infiammatoria vengono utilizzati approcci di natura differente. Come farmaci di prima linea sono somministrati farmaci antinfiammatori ad ampio spettro, i quali inibiscono la secrezione di citochine e delle altre molecole pro-infiammatorie. In seconda linea vengono prescritti antagonisti e inibitori diretti delle citochine, dei loro recettori e dei checkpoint immunitari [CTLA-4, PD-1 e PD-L1; i checkpoint immunitari sono molecole che inibiscono l'attivazione dei linfociti T per regolare la risposta immunitaria (11)] a base di anticorpi monoclonali. Si utilizzano anche approcci di diversa natura, come la somministrazione endovenosa di immunoglobuline G (IgG) o la terapia di induzione della tolleranza verso i linfociti T (3).

1.1.1.1 Interleuchina-6 (IL-6)

L'interleuchina-6 è un omodimero proteico solubile con dimensione di 22-27kDa, composto da 184 residui amminioacidici e presentante due siti di N-glicosilazione e quattro residui di cisteina, codificato a partire da un gene posto sul cromosoma 7 e appartenente alla classe delle citochine di

tipo I. Questa citochina viene prodotta nelle cellule mieloidi, come macrofagi e cellule dendritiche, dalle cellule endoteliali e dai fibroblasti come conseguenza del riconoscimento di antigeni eterologhi, microbici (PAMPs) o di molecole di danno cellulare (DAMPs), ma anche in risposta a molecole pro-infiammatorie come TNF e IL-1 (3,8,12). L'aumento della concentrazione di IL-6 circolante è direttamente proporzionale all'entità del trauma e alla gravità della lesione che ne inducono la secrezione (13).

La segnalazione recettoriale associata a IL-6 inizia con il legame della citochina al suo recettore IL-6R, una proteina esistente in una forma transmembrana di 80kDa (mIL-6R) e in una forma solubile di 50-55kDa (sIL-6R), e successivamente ad una seconda proteina transmembrana, detta gp130, la cui funzione è fondamentale nella trasduzione del segnale. IL-6 può legarsi al suo recettore mIL-6R e a gp130 nella via di attivazione classica, ma può interagire anche con la forma solubile del recettore sIL-6R, generata in seguito a clivaggio proteico eseguito da parte delle metalloproteasi della matrice ADAM10 e ADAM17 (TACE) oppure come conseguenza di splicing alternativi del gene per IL-6R. Il complesso IL-6-sIL-6R è poi in grado di associarsi alla porzione extracellulare di gp130 espressa in numerose tipologie cellulari, attivando la trasduzione del segnale intracellulare in un processo definito "transattivazione". Il vantaggio di queste molteplici possibilità di interazione nella segnalazione è che l'effetto di IL-6 può essere esercitato a livello sistemico, dal momento che l'espressione di IL-6R è limitata ad alcuni sottotipi cellulari come gli epatociti, mentre l'espressione di gp130 è ubiquitaria. Una volta che si forma il complesso IL-6-IL-6R/gp130, possono essere attivate due principali vie di trasduzione del segnale intracellulare: la via di segnalazione JAK-STAT3, che si traduce nell'espressione genica di geni IL-6-inducibili, e il *pathway* JAK-SHP2-MAPK, che risulta invece nella fosforilazione e attivazione di bersagli intracellulari senza modificare l'espressione genica della cellula (3,12,14).

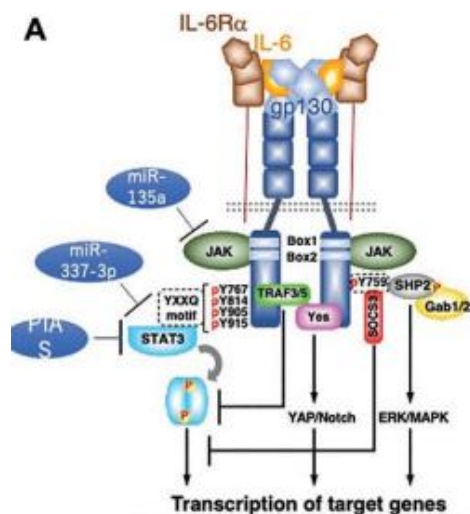


Figura 3: struttura di IL-6R e vie di segnalazione associate; Hirano, 2021

IL-6 fu identificata per la prima volta come un fattore solubile secreto dai linfociti T *helper* allo scopo di stimolare la produzione di anticorpi nei linfociti B. In realtà, IL-6 è una molecola pleiotropica che interviene nella regolazione di numerosi processi fisiologici a livello sistemico e locale: ha un effetto in varie fasi dell'infiammazione (stimola la mielopoiesi, induce il differenziamento di numerose cellule immunitarie come macrofagi, linfociti T e B, sulle quali induce la conversione in cellule secernenti IL-17 e in plasmacellule rispettivamente, favorisce il reclutamento dei neutrofili a livello dei siti infiammati), permette la rigenerazione tissutale a livello epatico, stimola la produzione di proteine di fase acuta come la proteina C reattiva, a livello ipotalamico induce la febbre in risposta a infezioni microbiche, ma regola anche l'appetito e il dispendio energetico basale, rende possibile l'angiogenesi mediata da VEGF (*Vascular-Endothelial Growth Factor*), regola il rimodellamento di osso e cartilagine, stimola la proliferazione e il differenziamento delle cellule nervose, interviene nei processi infiammatori associati all'invecchiamento, e regola il metabolismo del ferro e il metabolismo lipidico, in particolare agendo sulla lipolisi nel muscolo scheletrico e sull'ossidazione degli acidi grassi con effetti che contrastano l'obesità e l'accumulo sistemico di lipidi. Molti degli effetti biologici di IL-6 sono sovrapponibili a quelli di TNF- α e IL-1. A causa della vasta gamma di effetti sistemici, un'alterazione della produzione di IL-6 ha importanti ripercussioni su moltissimi processi fisiologici, portando ad un aumentato rischio di sviluppare patologie infiammatorie come conseguenza della perdita della tolleranza immunologica fino a sfociare nelle malattie autoimmuni e nella tempesta citochinica, di manifestare patologie tumorali per alterazione della regolazione della rigenerazione tissutale, e di andare incontro a malattie metaboliche, come l'obesità, e psichiatriche, come la schizofrenia e la depressione. In particolare, è stata dimostrata una correlazione tra il *pathway* di segnalazione IL-6-JAK-STAT3 e la manifestazione di patologie infiammatorie, autoimmuni e tumorali e anche tra i livelli di mediatori solubili e la gravità della patologia (3,7,8,12,14).

1.1.1.2 Fattore di Necrosi Tumorale- α (TNF- α)

Il Fattore di Necrosi Tumorale- α (TNF- α) è la prima citochina rilasciata in seguito a infezioni microbiche (PAMPs) e in caso di infiammazione acuta (DAMPs) (8). Il TNF- α appartiene, insieme al TNF- β o linfotossina, alla superfamiglia del TNF. Esso viene sintetizzato a partire da un gene presente in singola copia localizzato sul braccio corto del cromosoma 6, e una volta prodotto può trovarsi in due isoforme, una transmembrana e una solubile. Il TNF- α viene sintetizzato in forma di precursore di 157 amminoacidi come proteina transmembrana di tipo II preceduto da una sequenza altamente conservata di 76 amminoacidi che permette l'ancoraggio alla membrana (tmTNF- α), da parte di macrofagi, cellule dendritiche e mastociti prevalentemente, ma anche da neutrofili, cellule NK, cellule endoteliali, cheratinociti, astrociti e osteoblasti (15); quando clivato dalla metalloproteasi

della matrice ADAM17 (TACE) ancorata in membrana, dal precursore si genera una molecola solubile, la forma attiva del TNF- α , con peso molecolare di 17kDa (sTNF- α). La forma solubile non esiste mai in stato monomerico, ma immediatamente dopo il taglio proteolitico che ne determina l'attivazione si genera un composto omotrimerico con peso molecolare di 52kDa, il quale costituisce l'unica struttura in grado di legarsi ai rispettivi recettori. La forma solubile trimerica del TNF- α si organizza in una struttura piramidale orientata con i siti di legame per il recettore, uno per ogni subunità, alla base della piramide, rendendo così possibile il legame con tre strutture recettoriali contemporaneamente. Il TNF- α attivo non presenta un elevato grado di modifiche post-traduzionali, poiché è privo di siti di N-glicosilazione, ma si osservano alcuni siti di fosforilazione (3,16,17).

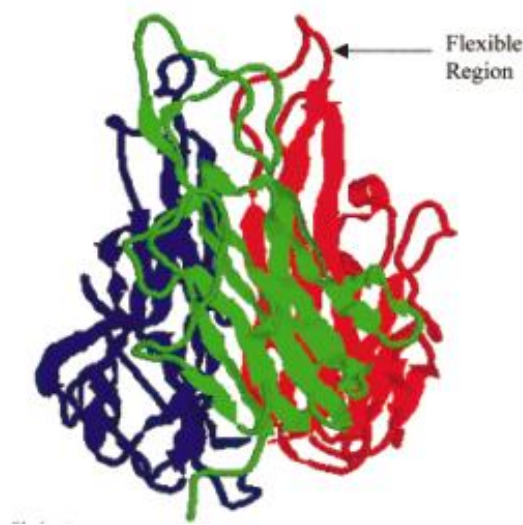


Figura 4: struttura tridimensionale del TNF- α ; Idriss & Naismith, 2000

Il TNF- α interagisce con due tipologie di recettori trimerici, distinti in tipo I (TNFRI) e tipo II (TNFRII), appartenenti alla superfamiglia dei recettori del TNF. Il recettore TNFRI ha un peso molecolare di 55kDa e una dimensione di 434 amminoacidi, mentre il TNFRII ha un peso molecolare di 75kDa ed è composto da 439 residui amminoacidici. TNFRI è caratterizzato da un'espressione ubiquitaria nell'organismo, mentre TNFRII viene quasi esclusivamente espresso dalle cellule ematopoietiche. La regione extracellulare dei due recettori presenta un'omologia molto ridotta, la quale è del tutto assente nella porzione intracellulare, suggerendo l'attivazione di vie di segnalazione distinte. TNFRII interagisce prevalentemente con le proteine TRAF (TNF *Receptor-Associated Factors*), le quali mediano l'attivazione delle vie di segnalazione di NF- κ B, MAPK e AKT per indurre una modificazione nell'espressione genica e la sopravvivenza della cellula. TNFRI interagisce con il fattore TRADD, il quale forma complessi di diversa natura con proteine distinte, i quali intervengono nell'attivazione delle caspasi per indurre l'apoptosi, nella necroptosi e nell'infiammazione. (3,16,17).

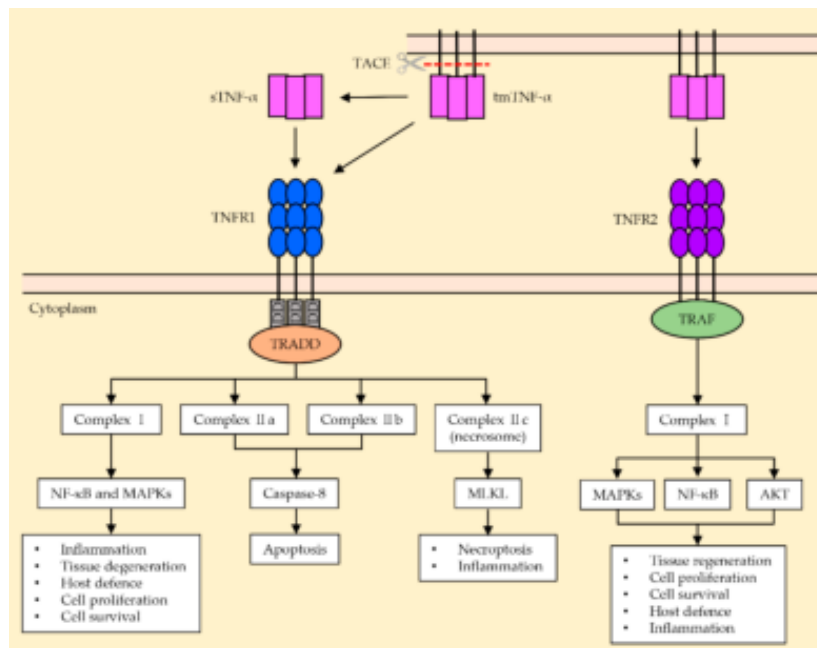


Figura 5: vie di segnalazione ed effetti biologici del TNF- α ; Jang et al., 2021

In relazione al tipo di recettore attivato, gli effetti di TNF- α possono essere protettivi o patologici. A livello locale il TNF- α ha un effetto prevalentemente pro-infiammatorio: favorisce il reclutamento di neutrofili e monociti nei siti infiammati mediante l'induzione dell'espressione delle molecole di adesione necessarie alla diapedesi, stimola le funzioni fagocitiche e microbicide di tali cellule, e induce la produzione di altre citochine pro-infiammatorie, come IL-1 e IL-6, e di chemochine. Il TNF- α ha anche un ruolo fondamentale nel promuovere la sopravvivenza e il differenziamento cellulare. A livello sistemico, per contro, i suoi effetti sono protettivi se hanno lo scopo di contrastare l'infiammazione in atto: induzione ipotalamica della febbre, stimolazione della sintesi epatica delle proteine di fase acuta, differenziamento leucocitario a livello midollare. Si parla invece di effetti sistemici patologici quando la secrezione di TNF- α perde la sua regolazione, portando a riduzione della contrattilità e della gittata cardiaca con rischio di shock cardiogeno, a formazione di coaguli vascolari con rischio di eventi trombotici per attivazione delle cellule endoteliali, e aumento della degradazione muscolare e del tessuto adiposo manifesta come cachessia e deperimento fisico. Dal momento che il TNF- α viene prodotto come principale citochina atta a contrastare le infezioni microbiche, una sua sintesi deregolata in stati infettivi può causare lo shock settico. Inoltre, il TNF- α è stato dimostrato essere uno dei principali responsabili di alcune condizioni infiammatorie croniche a patogenesi autoimmune come l'artrite reumatoide e la psoriasi, nelle quali l'infiammazione e l'effetto del TNF- α sono una conseguenza diretta dell'accumulo di cellule infiammatorie, prevalentemente di linfociti Th1, macrofagi, linfociti B, plasmacellule e cellule dendritiche a livello del sito colpito dalla patologia (3,8,17).

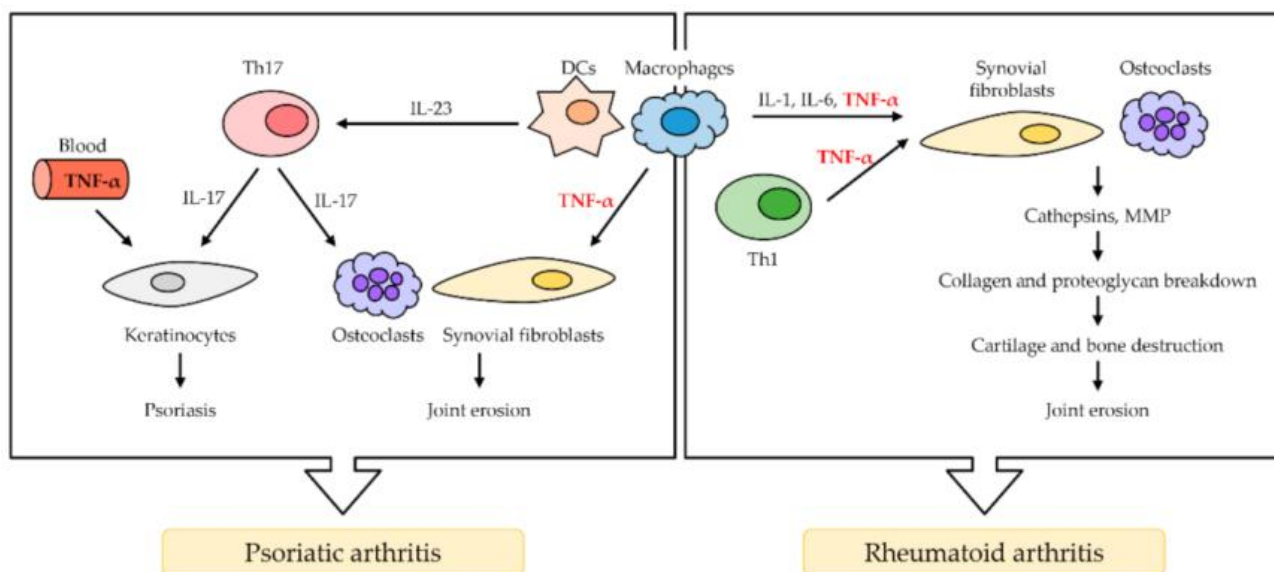


Figura 6: effetto del TNF- α nella patogenesi di artrite psoriasica e artrite reumatoide; Jang *et al.*, 2021

1.1.1.3 Nicotinamide Fosforibosiltransferasi (NAMPT)

La Nicotinamide Fosforibosiltransferasi (NAMPT) è una proteina ampiamente espressa in numerosi tessuti dell'organismo, tra cui midollo osseo, fegato e muscolo, ma anche dalle cellule del sistema immunitario e dalle cellule tumorali, che svolge un ruolo di primaria importanza nel metabolismo del Nicotinamide-Adenina-Dinucleotide (NAD). Il gene codificante *NAMPT* è ampiamente conservato negli animali superiori e in specie più semplici. *NAMPT* umano si trova localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7 e genera una proteina costituita da 491 residui amminioacidici con un peso molecolare di 52kDa. La struttura di NAMPT comprende 19 domini a β -foglietto e 13 domini a α -elica, organizzati in due domini funzionali distinti. Macroscopicamente, NAMPT è una proteina omodimerica appartenente alla famiglia delle fosforibosiltransferasi di tipo II, alla quale si associano due siti attivi analoghi necessari al legame delle molecole processate da tale enzima, ai quali possono legarsi anche gli inibitori di NAMPT (18). Grazie a studi sulla struttura e sull'attività biologica di NAMPT si è osservato che il residuo di Acido Aspartico in posizione 219 (Asp219) ha la funzione fondamentale di definire la specificità dell'enzima per il suo substrato, e allo stesso tempo si è dimostrata la presenza di siti di autofosforilazione e di idrolisi dell'ATP, che possono incrementarne l'attività catalitica (19).

NAMPT esiste in due forme distinte a seconda della sua localizzazione: NAMPT intracellulare (iNAMPT) è localizzato in maniera ubiquitaria all'interno delle cellule a livello di nucleo, citoplasma e mitocondri, ma in concentrazioni differenti a seconda della fase del ciclo cellulare considerata, e interviene nella via di sintesi del NAD, fondamentale a svariati processi necessari alla sopravvivenza

cellulare, come il metabolismo energetico, le difese antiossidanti, la proliferazione e l'apoptosi. NAMPT extracellulare (eNAMPT) fu inizialmente identificato come il fattore in grado di stimolare la formazione di colonie di linfociti pre-B (PBEF) e come adipochina secreta dal tessuto adiposo viscerale (visfatina). Studi successivi hanno poi dimostrato che eNAMPT viene invece secreto da tutte le cellule, con un ruolo predominante come fattore di crescita, enzima e citochina pro-infiammatoria, garantendo il mantenimento dell'omeostasi tissutale attraverso la regolazione dei livelli di NAD, e la corretta attivazione del sistema immunitario stimolando la secrezione di altre citochine infiammatorie (20). Inoltre, è stato anche osservato che NAMPT viene trasportato nella circolazione sistemica mediante vescicole extracellulari, per poi essere re-internalizzato nelle cellule dove è necessario a svolgere la sua funzione enzimatica (21).

Il fatto che NAMPT sia espresso da numerose tipologie cellulari e praticamente in tutti i tessuti e organi dell'organismo ha destato un elevato interesse, ipotizzandone un ruolo fondamentale nel mantenimento della condizione fisiologica e al contempo nella manifestazione di stati patologici. Diversi studi hanno dimostrato che NAMPT può essere con certezza considerato un marcatore per l'infiammazione cronica, grazie ai suoi effetti di fattore di crescita e di induzione dell'espressione genica nelle cellule della difesa, e si è visto avere un ruolo di primaria importanza anche in condizioni patologiche correlabili a processi infiammatori, come le malattie cardiovascolari e neurodegenerative, le malattie metaboliche, le malattie autoimmuni e il cancro (18).

1.1.1.3.1 NAMPT intracellulare: enzima chiave nel metabolismo del NAD

NAD è un cofattore enzimatico intracellulare di vitale importanza nei processi metabolici e di trasferimento elettronico, anche se può trovarsi all'esterno della cellula in concentrazioni variabili in base a diversi segnali, ma pur sempre molto minori rispetto a quelle intracellulari (100-500nM extracellulare contro 200-500µM intracellulare) (22). È stato osservato che le concentrazioni extracellulari di NAD (eNAD) aumentano drasticamente in condizioni stressorie, tra cui processi infiammatori, ipossia, acidosi, stress meccanico e in presenza di molecole citotossiche, suggerendo un suo ipotetico ruolo come allarmina (DAMP) in grado di attivare la risposta immunitaria innata. Ulteriori approfondimenti hanno dimostrato che i livelli di NAD subiscono un'importante riduzione in patologie associate all'anzianità, mentre un aumento dei livelli dello stesso è correlabile a patologie di natura infiammatoria, come il cancro. In condizioni fisiologiche, invece, i livelli di NAD extracellulare sono mantenuti ridotti per azione di una pletora di enzimi di membrana che lo metabolizzano rapidamente, permettendone la conversione in metaboliti facilmente internalizzabili nelle cellule e dunque garantendo il riciclo di molecole energetiche. La principale via catabolica di

eNAD è associata all'enzima immunomodulatore CD38, appartenente alla classe delle NADasi/ADPR ciclastasi (19,22).

La sintesi biologica di NAD avviene mediante tre processi fondamentali:

- la via *de novo* a partire dal triptofano, il quale viene convertito in diversi passaggi ad acido nicotinico-mononucleotide (NaMN) per azione dell'enzima limitante la reazione chinolato fosforibosiltransferasi (QPRT);
- il *pathway* di Preiss-Handler, nel quale il NaMN e, più in generale, l'acido nicotinico derivante dalla dieta per deammidazione ad opera della flora intestinale, viene convertito in NAD per azione dell'enzima limitante Nicotinato Fosforibosiltransferasi (NAPRT);
- la via di recupero (*salvage pathway*), in cui NAMPT converte la nicotinamide (NAM) e il fosforibosilpirofosfato (PRPP) in nicotinamide mononucleotide (NMN) nella reazione limitante, il quale viene poi convertito in NAD. In questa via di recupero il NAD può essere generato anche a partire da nicotinamide riboside (NR) (19).

L'esistenza di diverse vie metaboliche per la sintesi della stessa molecola probabilmente dipende dalla distribuzione tissutale preferenziale degli enzimi biosintetici, ma anche dalla diversa localizzazione intracellulare degli stessi. Nonostante ciò, il *pathway* più significativo per la sintesi di NAD nelle cellule di mammifero è quello di recupero, nel quale interviene NAMPT in forma omodimerica catalizzando la conversione di NAM e PRPP in NMN nel cosiddetto *rate-limiting step* della via biosintetica.

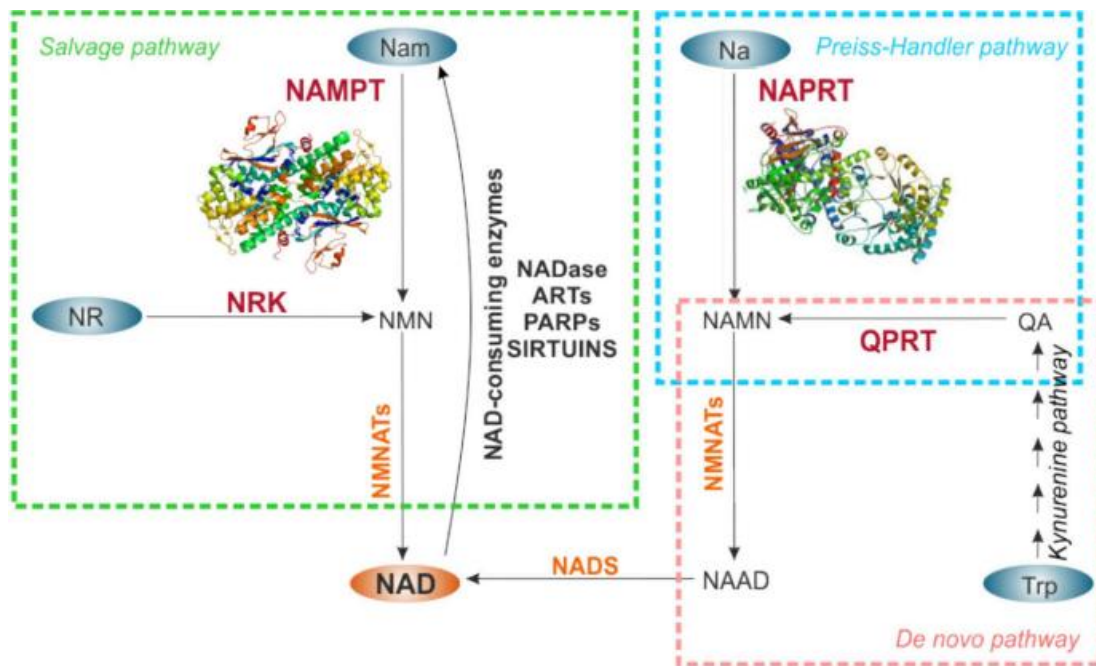


Figura 7: vie biosintetiche di NAD; Audrito et al., 2020

Le funzioni svolte da NAD all'interno della cellula sono svariate, tra cui la riparazione del DNA, il rimodellamento cromatinico, la divisione cellulare, la modulazione dell'infiammazione e della risposta immunitaria, la regolazione della funzione mitocondriale e la determinazione dei ritmi circadiani, tutti processi necessari a garantire l'omeostasi metabolica e organica. Inoltre, NAD permette il mantenimento dell'equilibrio energetico e lo stato di ossidoriduzione, e rende possibile l'esecuzione di numerose vie di segnalazione grazie al suo ruolo di cofattore enzimatico e accettore di elettroni (18).

1.1.1.3.2 NAMPT extracellulare (eNAMPT): mediatore infiammatorio

Negli ultimi anni è stato dimostrato che diversi tipi cellulari dell'organismo sono in grado di secernere NAMPT, il quale prende il nome di NAMPT extracellulare (eNAMPT) dopo la secrezione. Tra queste, le cellule che secernono tale molecola in maggior misura sono gli adipociti, gli epatociti, i cardiomiociti, le cellule nervose, le cellule del sistema immunitario e le cellule tumorali. È stato inoltre osservato che la sua secrezione segue un ritmo circadiano, con livelli massimali nel pomeriggio, ed è stato rilevato in liquido sinoviale, siero, fluido follicolare, lavaggi bronchiali, saliva, liquido cefalorachidiano e feci. Dal momento che questo processo non viene inibito dai classici inibitori della via di secrezione che prevede il coinvolgimento del reticolo endoplasmatico e dell'apparato di Golgi, come la brefeldina A, e per il fatto che NAMPT non possiede il classico peptide segnale per la secrezione, il meccanismo di rilascio nello spazio extracellulare non è ancora del tutto compreso, ma si ipotizza che venga rilasciato mediante un processo attivo non canonico e non come conseguenza diretta della lisi o della morte cellulare. Gli stimoli alla secrezione di eNAMPT sono svariati, tra cui *stressor* di diversa natura (ipossia, stress ossidativo e meccanico), stimoli ormonali associati al metabolismo energetico (insulina e glucagone), e stimoli infiammatori (TNF- α , IL-1 β e IFN- γ) e questi ultimi ne potenziano, a livello delle cellule dell'immunità innata, non solo la secrezione ma anche la sintesi (19,20). La secrezione di NAMPT, inoltre, sembra avere un ruolo protettivo nel ridurre la concentrazione intracellulare dello stesso (22).

Una volta rilasciato nell'ambiente extracellulare, eNAMPT acquista proprietà di citochina pro-infiammatoria e pro-angiogenica e di adipochina, a scapito della sua funzione da enzima (meno importante a livello extracellulare dove probabilmente non trova i substrati alla giusta concentrazione per essere attivo cataliticamente) (20). eNAMPT, però, presenta le stesse caratteristiche di sequenza e strutturali di iNAMPT.

Le funzioni di eNAMPT sono:

- Adipochina → conosciuto in questo caso con il nome di visfatina. Le adipochine sono molecole secrete dal tessuto adiposo che intervengono nell'omeostasi glicemica, nella regolazione del peso corporeo, in processi infiammatori, nel mantenimento della pressione sanguigna e nella cancerogenesi. eNAMPT viene rilasciato *in vivo* dal tessuto adiposo viscerale, sottocutaneo ed epicardico, motivo per cui le sue concentrazioni sono elevate in soggetti obesi e diabetici, e presenta effetti insulino-mimetici su svariate tipologie cellulari, come osteoblasti, cellule β -pancreatiche e cellule mesangiali renali mediante il legame con i recettori IRS-1 e IRS-2;
- Citochina pro-infiammatoria/allarmina → l'attività pro-infiammatoria di eNAMPT è ampiamente studiata e conosciuta. In seguito al legame con recettori come TLR4 e CCR5, e NAMPT induce l'attivazione di *pathway* infiammatori, come quelli associati a NF- κ B, MAPK e STAT3, i quali agiscono tutti come fattori di trascrizione e portano all'espressione genica di altre citochine pro-infiammatorie, tra cui TNF- α , IL-1 β e IL-6, e di chemochine, ad esempio CCL2, CCL3, CCL18 e CCL20. Oltre a ciò, eNAMPT può direttamente agire come molecola chemotattica, come fattore di proliferazione e differenziamento, e come molecola anti-apoptotica verso le cellule immunitarie. In questo modo, eNAMPT agisce come regolatore della risposta immunitaria, nello specifico di quella innata, con un effetto molto evidente sui monociti-macrofagi e sulle cellule pre-B. Inoltre, eNAMPT ha un ruolo di spicco anche nella stimolazione dell'espressione delle molecole di adesione a livello endoteliale, e nell'attivazione dell'inflammasoma;
- Fattore pro-angiogenico → eNAMPT induce la proliferazione, la migrazione e la formazione della struttura capillare dei vasi sanguigni, stimola la sintesi e la secrezione di VEGF e VEGFR-2, e interviene indirettamente nel rimodellamento della matrice extracellulare (18–20).

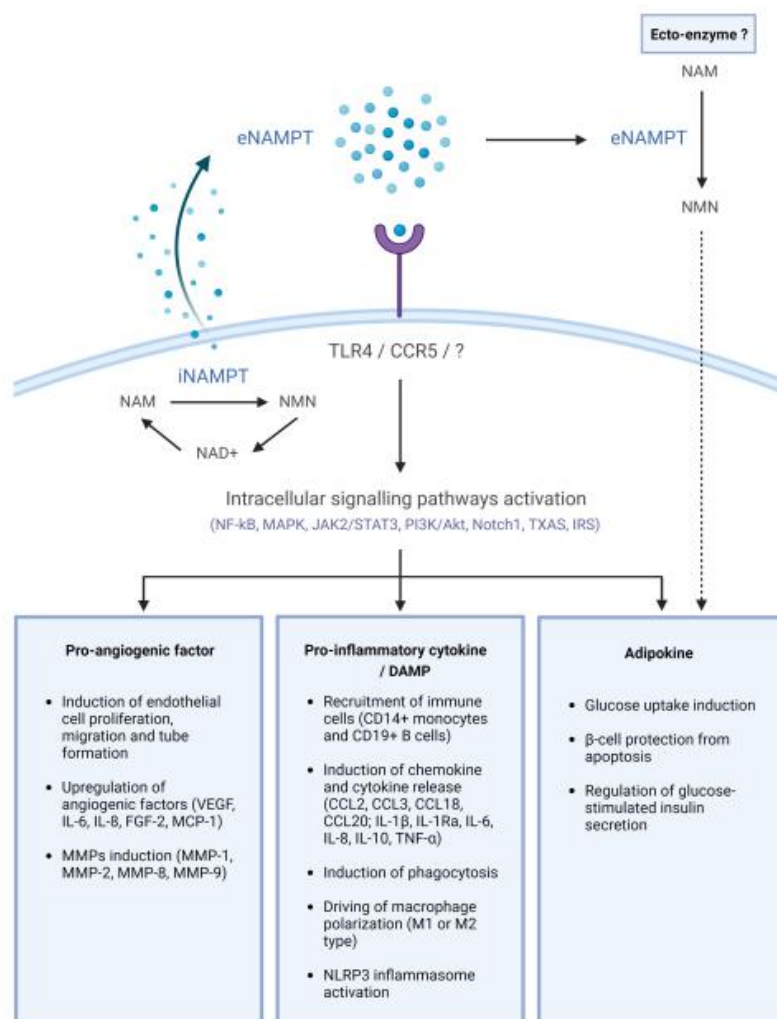


Figura 8: effetti biologici di eNAMPT e vie di segnalazione associate; *Semerena et al., 2023*

Dato il suo ruolo come molecola pro-infiammatoria, numerosi sono stati gli studi che hanno indagato i livelli di eNAMPT in patologie infiammatorie, i quali si sono conclusi con risultati positivi e hanno dimostrato l'aumento delle concentrazioni plasmatiche di eNAMPT in numerosi disordini di natura infiammatoria. In questo senso, eNAMPT può essere considerato sia come fattore causativo delle patologie, sia come marcatore di malattia. È ormai accertato che eNAMPT subisce un importante aumento di concentrazione in malattie metaboliche e cardiovascolari, come obesità, diabete di tipo I, diabete di tipo II e diabete gestazionale, sindrome metabolica e aterosclerosi, in patologie osteoarticolari, nella risposta infiammatoria associata a lesioni polmonari, in alcune forme di infezione come la sepsi, in patologie autoimmuni, come artrite reumatoide, psoriasi, malattia di Crohn e rettocolite ulcerosa e soprattutto nelle malattie oncologiche. In questo ultimo caso, eNAMPT non è correlabile ad una singola tipologia di tumore, ma i suoi livelli plasmatici aumentano esponenzialmente in diverse forme di neoplasie solide ed ematologiche, dal momento che viene secreto sia dalle cellule tumorali sia dalle cellule del microambiente. Si pensa inoltre che eNAMPT, dato il suo ruolo fisiologico nella regolazione del metabolismo energetico della cellula e di altri

processi fondamentali come la riparazione del DNA, abbia un ruolo di primaria importanza nella determinazione dei cosiddetti *hallmarks* del cancro, ossia le caratteristiche distintive delle cellule tumorali, le quali garantiscono la progressione della malattia, l'induzione e il sostentamento dell'infiammazione associata al cancro mediante l'immunosoppressione delle cellule della difesa, la migrazione delle cellule neoplastiche e la metastatizzazione (19,20).

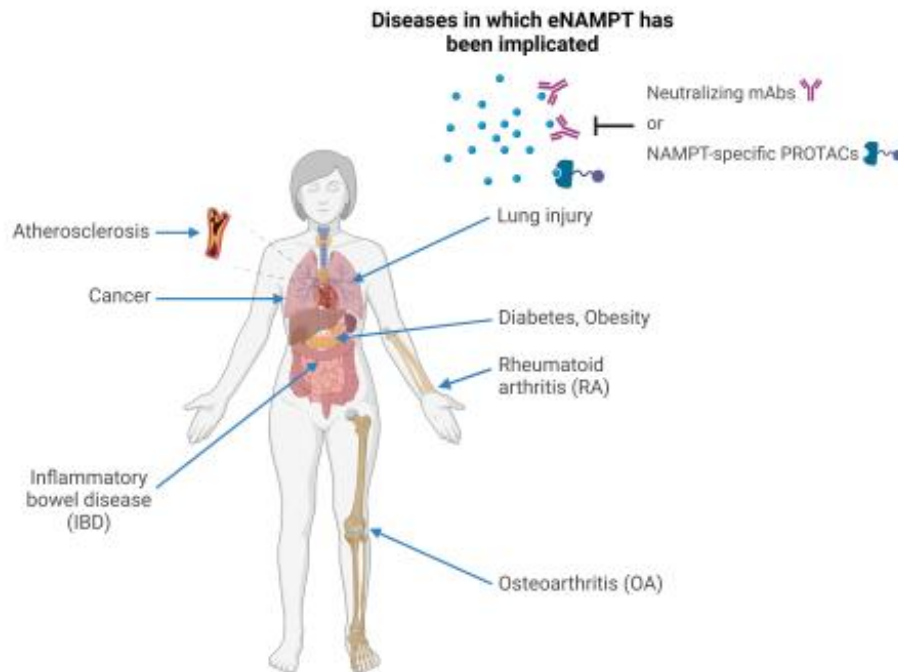


Figura 9: condizioni patologiche in cui è stato dimostrato un coinvolgimento di eNAMPT; *Semerena et al., 2023*

Dal punto di vista terapeutico, gli inibitori di NAMPT attualmente in commercio agiscono in maniera selettiva su iNAMPT, e sono stati sviluppati esclusivamente come terapie antineoplastiche allo scopo di ridurre drasticamente la quota di NAD intracellulare per causare alterazioni metaboliche che provocano la morte della cellula tumorale. Colpire eNAMPT risulta altrettanto interessante perché, mediante l'inibizione della sua azione, diventerebbe possibile ripristinare la competenza della risposta immunitaria verso le cellule neoplastiche. Le molecole in uso a questo scopo sono anticorpi monoclonali e PROTACs (*PROteolysis Targeting ChimeraS*). Lo stesso approccio potrebbe essere sfruttato per il trattamento di tutte le patologie che presentano elevati livelli di eNAMPT, nelle quali è dimostrato il ruolo eziopatogenetico di tale citochina, come le malattie autoimmuni (18–20,22–24).

1.2 Autoimmunità

L'autoimmunità è definita come una risposta immunitaria aberrante diretta contro antigeni propri dell'organismo detti antigeni *self* o autoantigeni (25). Si manifesta come conseguenza della perdita della tolleranza immunologica da parte del sistema immunitario nei confronti di componenti *self* determinando così la produzione di anticorpi autoreattivi (autoanticorpi), la causa principale del danno tissutale, dell'alterazione della funzionalità fisiologica di un tessuto e del sostentamento del processo infiammatorio che portano alla comparsa delle malattie autoimmuni (26).

La tolleranza immunologica viene definita come “la mancata responsività a un antigene causata da una precedente esposizione a quello stesso antigene” (3). In altre parole, la tolleranza immunologica corrisponde ad uno stato di non responsività del sistema immunitario nei confronti di autoantigeni o di antigeni eterologhi. Fisiologicamente, l'organismo evita lo sviluppo di risposte immunitarie contro i propri componenti e, più in generale, la comparsa di reazioni immunologiche eccessive attraverso fini meccanismi di regolazione della reattività delle cellule immunitarie sia in termini di riconoscimento antigenico che di controllo delle risposte immuni. Quando i linfociti entrano in contatto con un antigene possono attivarsi e scatenare una risposta immunitaria oppure possono inattivarsi e/o essere eliminati per generare la tolleranza. La tolleranza agli antigeni autologhi, definita anche tolleranza al *self*, è una delle proprietà fondamentali di un sistema immunitario correttamente funzionale e la perdita di tale caratteristica è la causa che sta alla base delle reazioni di attivazione della risposta immunitaria contro l'organismo, ovvero le reazioni autoimmuni alla base dell'insorgenza delle malattie autoimmuni (3,25). La tolleranza immunologica è dunque la diretta conseguenza dell'esecuzione corretta di meccanismi di regolazione che si verificano nel processo di maturazione dei linfociti:

- i linfociti esprimenti recettori ad alta affinità per gli autoantigeni tendono ad essere eliminati in una fase molto precoce della maturazione;
- la tolleranza può instaurarsi nei linfociti immaturi localizzati negli organi linfoidei primari (in questo caso si parla di tolleranza centrale, che avviene nel timo per i linfociti T e nel midollo osseo per i linfociti B) oppure nei linfociti maturi localizzati negli organi linfoidei secondari (in questo caso si parla di tolleranza periferica e si verifica principalmente a livello dei linfonodi), mediante l'esposizione ad antigeni autologhi contro i quali i linfociti non devono reagire. Se il legame con il recettore è stabile tali linfociti autoreattivi vengono eliminati o inattivati mediante l'induzione dell'anergia, ovvero “la condizione di un organismo che non reagisce di fronte a un'infezione o al contatto di una sostanza inoculata e dotata di potere antigenico” (Vocabolario Treccani) (27);

- la tolleranza periferica è sostenuta dalla presenza di linfociti T regolatori (Treg), i quali hanno la capacità di sopprimere l'attivazione dei linfociti autoreattivi.

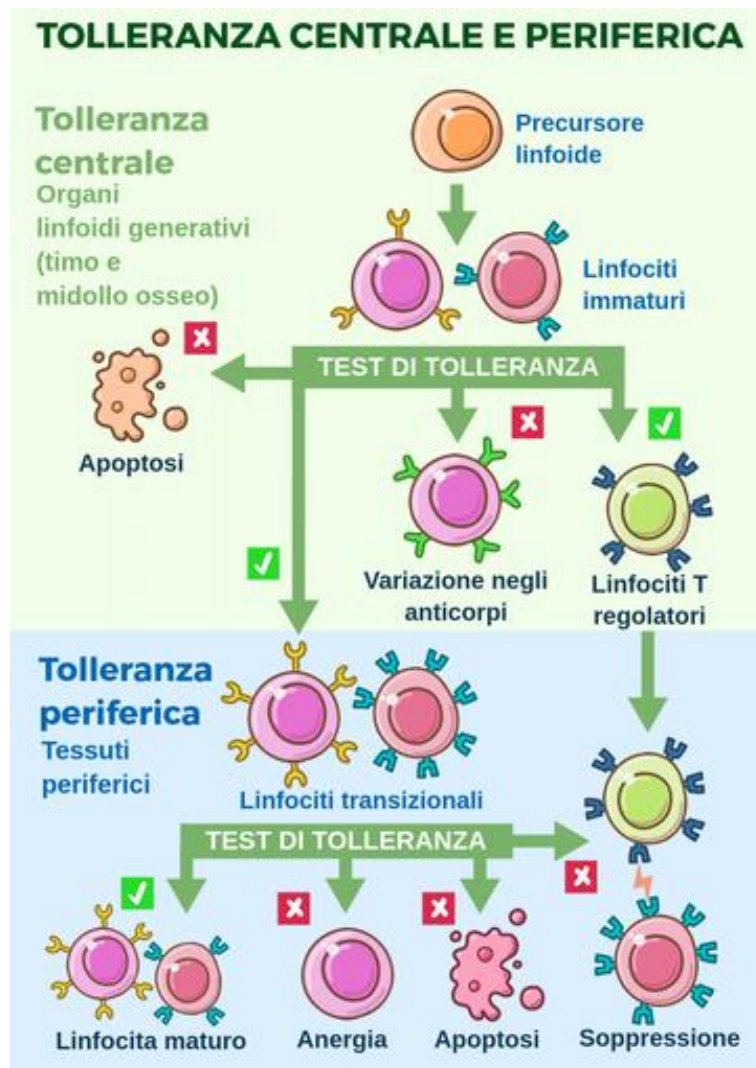


Figura 10: processo di sviluppo della tolleranza immunitaria; <https://theory.labster.com/it/tolerance-testing/>

La perdita della tolleranza immunologica è una conseguenza diretta della perdita dei meccanismi di regolazione della risposta immunitaria e di eliminazione delle cellule T e B autoreattive le quali, rispettivamente, perdono la capacità di discriminare gli autoantigeni dagli antigeni esogeni e producono eccessive quantità di anticorpi diretti contro tali antigeni, il cui effetto ultimo è la comparsa del danno tissutale e della malattia (3,25).

1.2.1 Le malattie autoimmuni

Le malattie autoimmuni sono condizioni patologiche complesse che si manifestano conseguentemente alla rottura della tolleranza immunologica verso uno o più autoantigeni; possono interessare limitatamente un organo o apparato dell'organismo oppure manifestarsi con un interessamento sistemico e possono affliggere individui di ogni età e sesso. Clinicamente i disordini

autoimmuni variano da condizioni acute molto gravi, con un elevato rischio per la sopravvivenza di chi ne viene colpito a causa di insufficienze multiorgano, a manifestazioni estremamente sfumate, caratterizzate da una minima variazione di parametri laboratoriali che possono essere facilmente confusi o trascurati; in alcuni casi il malfunzionamento del sistema immunitario può anche manifestarsi in assenza di segni e sintomi tipici di una malattia (1,25).

L'evoluzione di una patologia autoimmune avviene in tre fasi, due precedenti alla diagnosi e una post-diagnosi: nella fase iniziale si verifica la perdita della tolleranza immunologica nei confronti degli autoantigeni da parte dei linfociti T, i quali stimolano i linfociti B a produrre autoanticorpi che, generalmente, iniziano a danneggiare i tessuti colpiti. In una fase successiva, le cellule immunitarie autoreattive e quelle dei tessuti colpiti cominciano a produrre una grandissima quantità di molecole pro-infiammatorie che sostengono da un lato il danno tessutale e dall'altro l'errata attivazione delle cellule del sistema immunitario anche appartenenti a classi diverse rispetto ai linfociti T e B. Gli autoanticorpi prodotti dai linfociti B e le citochine infiammatorie secrete inducono un danno tessutale che si manifesta come conseguenza diretta di un danno o della morte delle cellule, processo attuato mediante la formazione di immunocomplessi, la citolisi o la fagocitosi delle cellule esprimenti gli autoantigeni. Nella fase successiva, unica post-diagnosi, il trattamento dei sintomi clinici della malattia conclamata e dello stato infiammatorio mira ad evitare ricadute e recidive, con lo scopo di indurre il soggetto in una fase di remissione la più duratura possibile (28).

Attualmente sono note oltre 100 malattie autoimmuni (28), le quali rappresentano una causa rilevante di morbidità e mortalità per la popolazione. Si tratta di disordini rari la cui frequenza diventa molto difficile da determinare precisamente. La principale difficoltà nella definizione è causata dall'assenza di marcatori specifici direttamente correlabili ad una precisa malattia. Malgrado le difficoltà degli studi epidemiologici, attualmente, si può affermare con forte evidenza che le malattie autoimmuni hanno una prevalenza intorno al 5-10% nella popolazione mondiale, del quale il 78% dei casi si verifica nel sesso femminile. Una quota importante di questi disordini colpiscono ghiandole del sistema endocrino e molto spesso si manifestano nello stesso individuo causando la cosiddetta sindrome plurighiandolare autoimmune (SPA), meglio detta sindrome autoimmune multipla (SAM). Sono patologie la cui diagnosi e trattamento richiedono la collaborazione di specialisti di ambiti diversi, come reumatologi, nefrologi, neurologi, dermatologi e immunologi soprattutto. (25,29,30).

1.2.2 Classificazione delle malattie autoimmuni

Le malattie autoimmuni vengono definite come tali sulla base di specifici criteri, elaborati per la prima volta da Witebsky e Rose nel 1957 e successivamente rivisitati e integrati da Rose nel 1993, a

loro volta distinguibili in criteri maggiori e criteri minori (Tabella 1). Per essere considerata autoimmune, una patologia deve rientrare in almeno due dei criteri maggiori (31).

Criteri maggiori	1. Presenza di infiltrato linfocitario localizzato nell'organo bersaglio o diffuso nell'organismo; 2. Presenza di autoanticorpi e/o linfociti autoreattivi localizzati nell'organo bersaglio e/o a livello sistemico; 3. Possibile identificazione e isolamento degli autoantigeni bersagliati dalla risposta autoimmune; 4. Possibile riproducibilità della malattia nell'animale previa inoculazione degli autoantigeni specifici; 5. Possibile trasferimento passivo della malattia nell'animale previa inoculazione di siero o linfociti autoreattivi; 6. Efficacia della terapia immunosoppressiva.
Criteri minori	1. Familiarità; 2. Associazione con il sistema HLA (<i>Human Leucocyte Antigen</i>); 3. Sesso femminile; 4. Associazione con altre malattie autoimmuni; 5. Processo patologico caratterizzato da esacerbazioni, recidive e remissioni; 6. Ipergammaglobulinemia.

Tabella 2: criteri maggiori e criteri minori di Witebsky e Rose per la definizione delle malattie autoimmuni

Sono considerati di primaria importanza per la diagnosi i criteri maggiori 1, 2, 3 e 5 e i criteri minori 1, 3 e 6, perché la presenza di infiltrati linfocitari negli organi bersaglio, corrispondente al criterio maggiore 1, e l'efficacia della risposta immunosoppressiva, il criterio maggiore 5, sono proprietà esclusive delle malattie autoimmuni. Per quanto riguarda l'identificazione degli antigeni specifici, questa ha un ruolo più legato alla ricerca clinica e di base legata a queste patologie, mentre la presenza di autoanticorpi specifici nel siero e in altri fluidi biologici rappresenta il punto fondante della diagnosi di laboratorio delle malattie autoimmuni (25).

Le malattie autoimmuni, oltre alla classificazione in base ai criteri, possono essere suddivise in tre gruppi sulla base della localizzazione della risposta immunitaria e degli autoanticorpi: malattie autoimmuni organo-specifiche (MAO o MAOS), malattie autoimmuni non organo-specifiche (o sistemiche; MAIS) e malattie autoimmuni intermedie. Le patologie organo-specifiche sono tra loro molto eterogenee in termini di epidemiologia (comprendono malattie rare, malattie ad alto impatto

epidemiologico e malattie con impatto in evoluzione), di presentazione clinica e di gravità. Si caratterizzano per una risposta immunitaria aberrante localizzata a livello di un singolo organo o apparato. L'infiltrato linfocitario è localizzato solamente all'interno dell'organo colpito e gli autoanticorpi riconoscono autoantigeni specifici di quel tessuto; inoltre, il danno tissutale è nella quasi totalità dei casi basato su un principio cellulo-mediato, con caratteristica classica la distruzione del tessuto e come risultato la disfunzione dell'organo. Tra le patologie autoimmuni organo-specifiche rientrano le tiroiditi autoimmuni, come il morbo di Basedow-Graves, la tiroidite di Hashimoto e il morbo di Addison. Le MAIS sono ancora considerate rare e non caratterizzate da biomarcatori sensibili e specifici. Si manifestano con lesioni diffuse in tutto l'organismo, con un'elevata quota di autoanticorpi circolanti che riconoscono autoantigeni espressi in maniera ubiquitaria, generalmente localizzati a livello nucleare e citoplasmatico e con un ruolo fondamentale nei processi di replicazione del DNA e di trascrizione e traduzione genica. Il danno associato alla malattia compare come conseguenza della precipitazione di immunocomplessi, oppure in conseguenza ad un meccanismo di citotossicità cellulare anticorpo-mediata (ADCC). La classe delle MAIS comprende il lupus eritematoso sistemico (LES) e le vasculiti. Le patologie autoimmuni intermedie, come dice lo stesso nome, presentano delle caratteristiche intermedie tra le due prima citate: colpiscono in prevalenza un organo o un apparato, ma gli autoanticorpi sono in grado di riconoscere antigeni non-organo specifici e di causare danni sistemici; i meccanismi patogenetici sono sia cellulo-mediati sia anticorpo-mediati. Le due malattie più note appartenenti a questo gruppo sono la Sindrome di Sjögren e la cirrosi biliare primitiva (25,31).

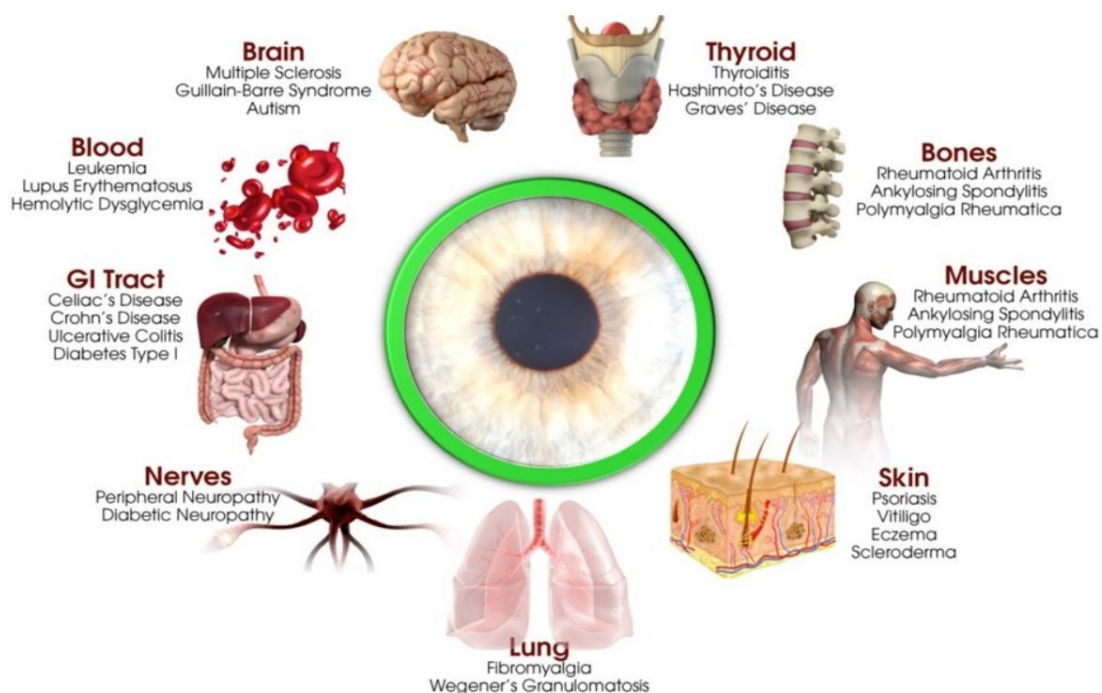


Figura 11: strutture potenzialmente colpite dai disordini autoimmuni e principali patologie ad esse associate; *Sacchi, 2024*

Malattie autoimmuni d'organo (MAOS)	
Adenoipofisite linfocitaria	Ipoparatiroidismo cronico
Alopecia areata	Miastenia gravis
Anemia emolitica autoimmune	Morbo di Addison
Anemia perniciosa	Morbo di Crohn
Celiachia	Morbo di Basedow-Graves
Colangite biliare primitiva	Pemfigo
Colangite sclerosante primitiva	Pemfigoide
Colite ulcerosa	Porpora trombocitopenica autoimmune
Diabete mellito di tipo I	Sclerosi multipla
Dermatite erpetiforme	Sindrome autoimmune multipla (tipi 1-4)
Epatite cronica autoimmune	Sindrome di Guillan-Barrè
Epidermolisi bollosa	Sindrome di Lambert-Eaton
Gastrite cronica atrofica	Sindrome di Stiff Person
Insufficienza midollare del surrene	Tiroidite di Hashimoto
Iperaldosteronismo autoimmune	Vitiligine

Tabella 3: principali malattie autoimmuni d'organo; *Betterle, 2000*

Malattie autoimmuni sistemiche (MAIS)	
Artrite reumatoide	Sclerosi sistemica/Sclerodermia
Dermatomiositi	Sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi
Miositi	Sindrome di Sjögren
Lupus eritematoso sistemico	Spondiloartriti
Polimiositi	Vasculiti sistemiche
Psoriasi	

Tabella 4: principali malattie autoimmuni sistemiche; <https://www.auxologico.it/temi/malattie-autoimmuni>

1.2.3 Patogenesi delle malattie autoimmuni

Le patologie autoimmuni sono malattie complesse, eterogenee e con una patogenesi multifattoriale che si basa sulla strettissima interazione tra fattori di predisposizione genetica e di regolazione epigenetica, stimoli ambientali e alterazione della funzionalità del sistema immunitario. In particolare, è stato dimostrato che il punto fondamentale della manifestazione delle malattie autoimmuni è la perdita della tolleranza immunologica nella quale è sempre coinvolta la disfunzione

della componente chiave del sistema immunitario adattativo, ossia i linfociti T CD4⁺ (25). Questi disordini presentano aspetti preponderanti di familiarità ed ereditarietà, mediati da polimorfismi genetici presenti principalmente nei loci del sistema HLA, uno dei principali determinanti della presentazione dell'antigene ai linfociti T e dell'attivazione della risposta immunitaria, aumentando il rischio di un'attivazione scorretta che risulta in una risposta autoreattiva. Oltre al sistema HLA, è stato osservato che anche loci che regolano la segnalazione di citochine, l'attivazione dei linfociti e la regolazione della risposta immunitaria (generalmente definiti loci "non-HLA") intervengono in questo processo. Un altro aspetto fondamentale da tenere in considerazione, quando si analizzano le caratteristiche delle malattie autoimmuni, è la differenza basata sul sesso, con una prevalenza molto maggiore nel sesso femminile rispetto a quello maschile (salvo alcune eccezioni): circa l'80% delle malattie autoimmuni compaiono in individui femminili, probabilmente a causa di un'interazione tra aspetti ormonali, genetici e immunologici. La differenza tra i due sessi è evidente non solo nella prevalenza (2.7% negli uomini contro 6.4% nelle donne), ma anche nella risposta clinica al trattamento. Anche l'età gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi delle malattie autoimmuni, in particolare perché, dal momento che la plasticità del sistema immunitario è molto elevata nel periodo iniziale della vita di un soggetto e tende a ridursi con il progredire dell'età, gli anziani sono maggiormente predisposti a sviluppare condizioni di autoreattività come conseguenza diretta dell'esaurimento e della perdita di regolazione del sistema immunitario. La disfunzionalità del sistema immunitario che porta alla comparsa delle malattie autoimmuni può anche essere dovuta ad aspetti propriamente immunologici, tra cui la modificazione di autoantigeni che porta alla formazione di neoantigeni riconosciuti come estranei dalle cellule della difesa, il rilascio di antigeni normalmente sequestrati in specifiche regioni dell'organismo come occhi e testicoli, l'espressione di molecole HLA su cellule non presentanti l'antigene, l'attivazione policlonale dei linfociti B e l'aumento dell'induzione dei linfociti Th1, alcuni difetti timici, e una riduzione del numero di linfociti T regolatori. I fattori ambientali hanno un ruolo di primaria importanza nella patogenesi dei disordini autoimmuni, agendo come *trigger* dell'alterazione della risposta immunitaria: a tutto ciò concorrono infezioni microbiche che alterano la risposta immunitaria mediante il meccanismo del mimetismo molecolare (riconoscimento di antigeni autologhi al posto di quelli microbici a causa di similarità strutturali e organizzazione di una risposta autoimmune anziché di difesa), aspetti alimentari e dietetici, come ad esempio l'assunzione di glutine, fattori ormonali, stili di vita, obesità, assunzione di farmaci, diagnosi di tumore e il suo trattamento, mancanza di sonno, inquinamento ambientale, cambiamento climatico, fumo e stress (1,8,26,28,31,32).



Nella quasi totalità dei casi, il danno tessutale che si associa ad una malattia autoimmune è una conseguenza diretta dell'effetto degli autoanticorpi prodotti in maniera aberrante dai linfociti B. Gli autoanticorpi possono però avere diverse significatività cliniche in base alla loro capacità di causare una lesione tessutale: gli autoanticorpi patogenetici correlano direttamente con la manifestazione, la gravità e l'andamento della malattia e possono dunque essere considerati la causa diretta della manifestazione clinica. Inoltre, sono in grado di causare la malattia sia *in vitro* sia *in vivo* e sono

totalmente assenti nei soggetti sani. Un esempio sono gli autoanticorpi anti-insulina nel diabete di tipo 1. Gli autoanticorpi non patogenetici sono correlabili alla malattia, ma il loro titolo e andamento è indipendente dalla progressione della condizione patologica. Sono presenti in soggetti sani, che in un futuro potranno andare incontro allo sviluppo della patologia autoimmune come non manifestarla mai, e per questo motivo possono essere rilevati sia molto tempo prima della comparsa della malattia sia anche diverso tempo dopo la sua guarigione sintomatologica. In più, a differenza degli autoanticorpi patogenetici, non sono in grado di causare la malattia in nessuna condizione sperimentale. Un esempio appartenente a questa classe è quello degli autoanticorpi anti-tiroide (TPOAb e TgAb) in soggetti asintomatici e gli anticorpi antinucleo (ANA) a basso titolo. Gli autoanticorpi come epifenomeni sono generalmente transitori e si manifestano in maniera transiente come conseguenza di altre patologie che non rientrano nei criteri classificativi delle malattie autoimmuni: un esempio sono gli anticorpi anti-muscolatura liscia (ASMA) nelle epatiti (25,31).

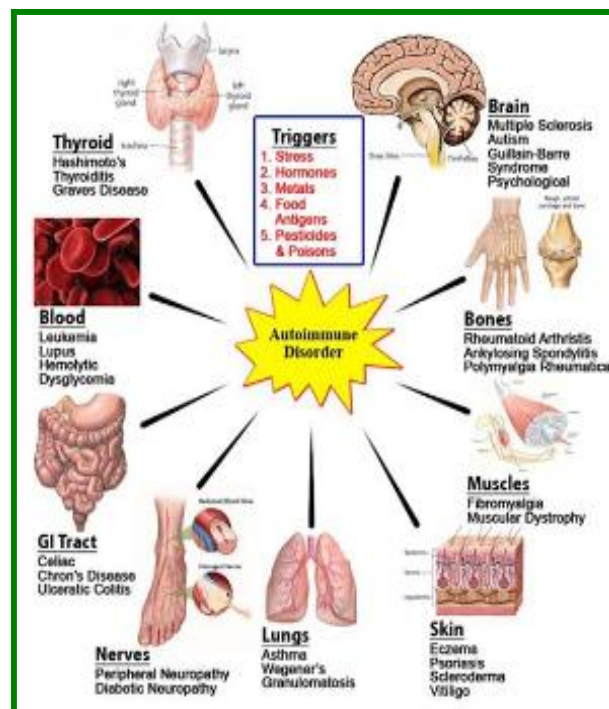


Figura 13: tessuti colpiti dall'attacco degli autoanticorpi patogenetici associati ai potenziali trigger che scatenano la risposta autoimmune; *Sacchi, 2024*

I meccanismi patogenetici con cui gli autoanticorpi producono il danno tissutale che poi sfocia nella malattia autoimmune sono principalmente sei: meccanismo citotossico dipendente da autoanticorpi come nel caso delle citopenie autoimmuni, meccanismo citotossico mediato da linfociti T citotossici (CD8+) autoreattivi come nei casi di tiroiditi autoimmuni, celiachia e diabete di tipo 1, meccanismo mediato dalla deposizione di immunocomplessi e proteine del complemento in tessuti e organi come nel caso delle miositi, meccanismo mediato da autoanticorpi che stimolano un recettore come nel morbo di Basedow-Graves, meccanismo mediato da autoanticorpi che inibiscono un recettore come

nei casi di miastenia *gravis* e diabete insulino-resistente, e meccanismo da autoanticorpi che sequestrano gli ormoni circolanti come nel caso del morbo di Addison a patogenesi autoimmune (25).

1.2.4 Diagnosi delle malattie autoimmuni

La diagnosi delle malattie autoimmuni si basa sull'attenta analisi e l'integrazione di sintomi clinici, esami obiettivi del medico, esami laboratoriali e radiologici. In particolare, la ricerca degli autoanticorpi è il punto chiave dell'analisi di laboratorio perché, salvo alcuni casi particolari, una positività al test autoanticorpale indica uno stress del sistema immunitario che si associa alla comparsa della patologia autoimmune (1,33). Generalmente gli autoanticorpi rilevati appartengono alla classe IgG, più raramente alle classi IgM e IgA, questi ultimi associati a prognosi peggiore (25). In base alle caratteristiche di diffusione e al *target* riconosciuto, gli autoanticorpi responsabili delle malattie autoimmuni che possono essere determinati a livello analitico vengono classificati in sei gruppi principali (30):

- anticorpi antinucleo (ANA; meglio detti anticorpi anti-antigeni intracellulari);
- anticorpi anti-antigeni nucleari estraibili (ENA);
- anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA);
- anticorpi anti-peptidi citrullinati (ACPA);
- anticorpi anti-immunoglobuline;
- anticorpi anti-fosfolipidi.

Gli autoanticorpi possono avere: un ruolo patogenetico nei casi in cui essi correlano direttamente con l'andamento delle patologie (ad esempio gli autoanticorpi anti-DNA a doppia elica, o anti-dsDNA, nel LES); un ruolo predittivo se possono essere utilizzati come indicatori di insorgenza della patologia perché precedono, in alcuni casi anche di molti anni, la manifestazione clinica della malattia autoimmune, (come gli autoanticorpi ACPA e il fattore reumatoide FR nell'artrite reumatoide); un ruolo diagnostico nei casi in cui essi abbiano una diretta correlazione e un'elevata specificità per una singola malattia autoimmune (è il caso, nuovamente, degli autoanticorpi anti-dsDNA nel LES); un ruolo prognostico se possono essere considerati come indicatori positivi dell'evoluzione della malattia perché correlano direttamente con la severità dei sintomi (gli ANCA nelle vasculiti, per esempio) (30). Nella maggior parte dei casi il test per la ricerca degli ANA è il test di screening utilizzato globalmente a scopo di ricerca, classificazione e soprattutto diagnosi per le malattie autoimmuni. La ricerca degli autoanticorpi è dunque fondamentale per la diagnosi delle patologie autoimmuni, ma anche per la definizione della terapia corretta dato il loro frequente coinvolgimento nella patogenesi e il loro significato predittivo, diagnostico e prognostico.

1.2.4.1 Anticorpi antinucleo (ANA)

La maggior parte delle malattie autoimmuni sistemiche è caratterizzata dalla produzione di autoanticorpi diretti contro diversi antigeni intracellulari, sia nucleari che citoplasmatici, i quali sono generalmente detti Anticorpi Antinucleo (ANA). Lo studio e la caratterizzazione di tali autoanticorpi ha evidenziato, in alcuni casi, una strettissima correlazione tra la sintomatologia clinica e il quadro sierologico dei pazienti rendendo possibile la considerazione degli ANA come marcatori di malattia veri e propri, mentre in altre situazioni costituiscono solamente un aspetto di supporto alla diagnosi. Nonostante queste evidenze, è importante ricordare che una positività al test di determinazione degli ANA non è sempre specifico per le malattie autoimmuni sistemiche, perché possono essere prodotti, e dunque rilevati, anche in condizioni patologiche diverse dalle malattie autoimmuni, oppure in pazienti sottoposti ad alcune terapie farmacologiche, con maggiore frequenza in individui anziani, di sesso femminile, o direttamente imparentati con soggetti affetti da tali morbidità (25).

Gli ANA sono rilevati mediante la tecnica di immunofluorescenza indiretta (IFI) su un substrato cellulare denominato HEp-2 (HEp-2 IIF), ossia cellule tumorali di noduli laringei fissate su vetrini portaoggetti. Questo test ha generalmente una sensibilità diagnostica molto elevata, che raggiunge anche valori prossimi alla perfezione in alcuni casi specifici (95% nel LES) (25). L'analisi di tali autoanticorpi, rilevati a partire dal siero dei pazienti, fornisce informazioni fondamentali relative al *target* intracellulare riconosciuto e in merito ai livelli sierici di autoanticorpi. Il risultato dell'analisi è un *pattern* di fluorescenza specifico in base all'antigene o agli antigeni che vengono riconosciuti, il quale riflette la distribuzione intracellulare dell'antigene stesso che può essere espresso o meno in diverse componenti della cellula e in diverse fasi del ciclo cellulare (32). L'immunofluorescenza indiretta su cellule HEp-2 permette la rilevazione di oltre 50 autoanticorpi diretti contro antigeni del nucleo, delle membrane nucleare e cellulare, dell'apparato mitotico, del citoplasma e degli organelli, i quali non sono inoltre localizzati rigidamente in specifici compartimenti cellulari ma possono essere diffusi in più porzioni della cellula (25). Gli ANA riconoscono dunque proteine e acidi nucleici contenuti all'interno della cellula, determinandone la perdita della funzione e la conseguente manifestazione della patologia (33).

Recentemente sono stati sviluppati diversi approcci volti a uniformare l'interpretazione dei *pattern* di fluorescenza e la metodica di refertazione dell'immunofluorescenza indiretta sul substrato HEp-2 allo scopo di standardizzare i risultati e rendere l'analisi sempre più riproducibile e uniforme. Quello oggi universalmente ricorrente è la classificazione ICAP [*International Consensus on Antinuclear Antibody (ANA) Patterns*], le cui linee guida sono state delineate da gruppo di studio mondiale con l'obiettivo di standardizzare quanto più possibile l'interpretazione dell'osservazione dei *pattern* ANA

in IFI su substrato HEp-2. Il comitato ICAP utilizza un codice standardizzato per tutti i laboratori di autoimmunità per distinguere i vari *pattern* di immunofluorescenza, composto dalla sigla AC (*Anti-Cell*) seguita da un numero da 1 a 30 per indentificare il *pattern* specifico. Per ottimizzare questa procedura di riconoscimento, l'ICAP ha creato un sito web (<https://www.anapatterns.org/>) dal quale possono essere consultate immagini standardizzate dei vari *pattern* di immunofluorescenza, e anche essere caricate dall'operatore delle immagini di tali *pattern*; a ciascuno, inoltre, è associata una breve descrizione, gli autoantigeni riconosciuti, la sua rilevanza clinica, e i riferimenti bibliografici (1,34).

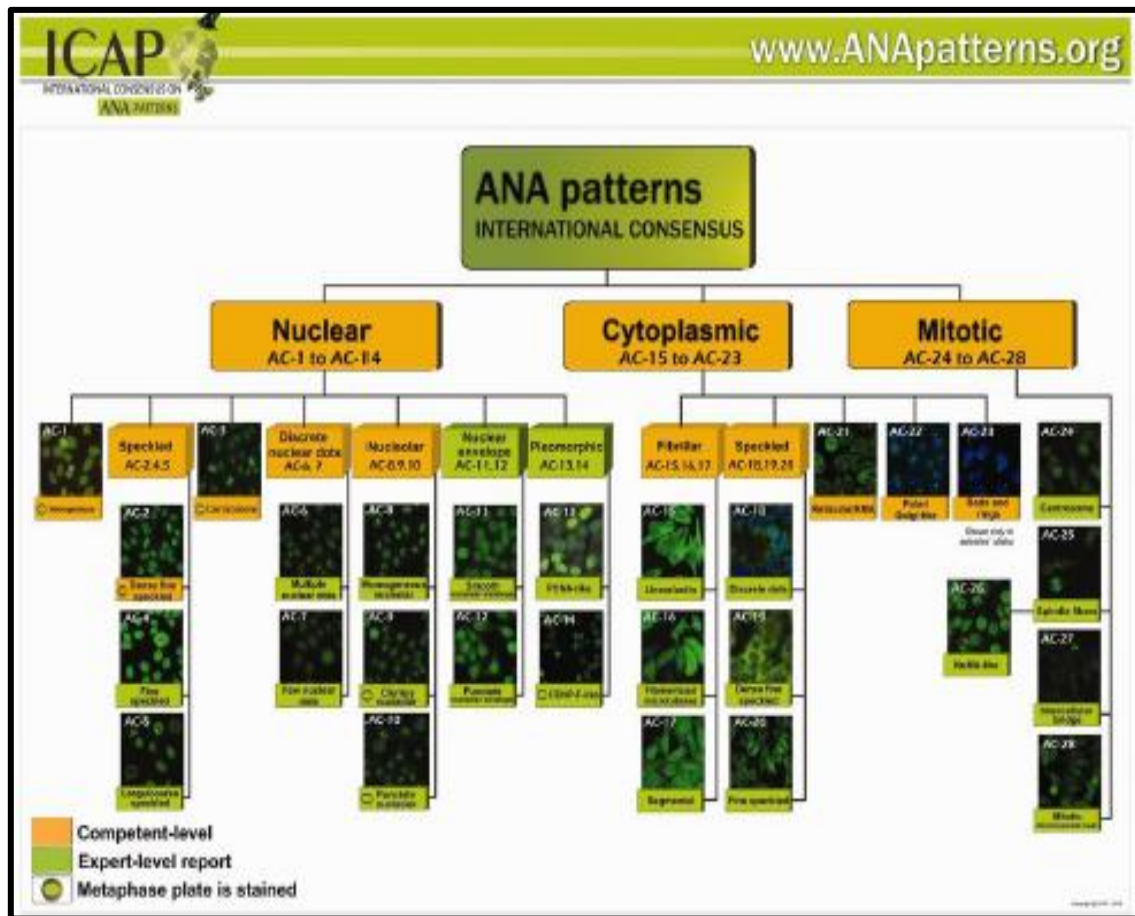


Figura 14: homepage del sito internet "anapatterns" istituito dall'ICAP rappresentante la nomenclatura e la classificazione dei 28 *pattern* di fluorescenza su substrato HEp-2 in base agli antigeni riconosciuti dagli ANA; Chan et al., 2016

Ad esempio, la sigla AC-1 indica il *pattern* "omogeneo" di positività autoanticorpale verso le componenti del nucleoplasma (Figura 15).

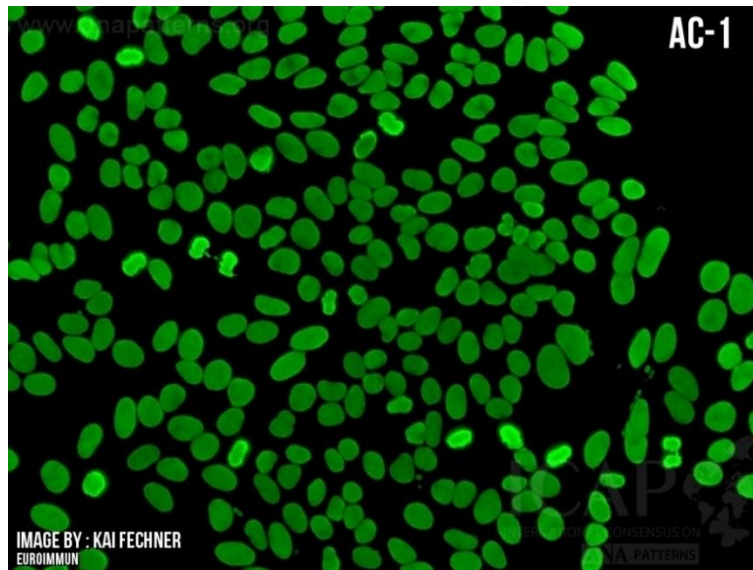


Figura 15: immagine scattata dal Dr. Kai Fechner (EUROIMMUN) raffigurante un *pattern* "omogeneo" (AC-1), ottenuta con la tecnica di immunofluorescenza indiretta su substrato HEp-2; https://www.anapatterns.org/view_pattern.php?pattern=1)

La positività o negatività al test di *screening* per gli ANA è confrontata con la diluizione alla quale il campione viene trattato, definendo così il titolo anticorpale come “l’ultima diluizione a cui il campione rimane positivo” (Tozzoli *et al.*, 2002). Il titolo di *screening*, ossia la diluizione a cui tutti i campioni vengono trattati in fase preliminare, è pari a 1:80 (l’unica eccezione è la ricerca degli anticorpi ANA nei bambini al di sotto dei due anni, per i quali il titolo di *screening* è pari a 1:40); pertanto, i titoli inferiori vengono considerati negativi, mentre quelli uguali o superiori (titolo da 1:160 e superiori) sono considerati come positivi. Nei casi di positività è necessario effettuare un ulteriore approfondimento diagnostico aumentando il titolo di diluizione e integrando altre analisi complementari (35). Una positività agli ANA con titolo pari a 1:80 compare nel 32% dei soggetti sani perché il test è caratterizzato da un’alta sensibilità ma da una specificità minore, mentre una positività a titoli superiori (generalmente oltre 1:160) si riscontra nella maggior parte dei soggetti malati ma solo nel 5% di quelli sani, perché una maggiore diluizione riduce la sensibilità dell’analisi ma ne aumenta la specificità (25). La positività al test ANA è aumentata nel corso degli anni, passando da 11.0% negli anni 1988-1991 a 16.1% nel biennio 2011-2012; la fascia di età che ha subito l’incremento più ripido è stata quella degli adolescenti, mentre non si sono osservate differenze significative nell’incremento tra i due sessi, negli anziani e nei soggetti bianchi non ispanici (32).

1.3 Autoimmunità e infiammazione

Un concetto fondamentale è la distinzione tra malattia autoimmune e malattia autoinfiammatoria perché, grazie alle scoperte più recenti, si è compreso il ruolo dell'infiammazione nelle malattie autoimmuni. Una malattia autoimmune deriva dalla perdita della tolleranza immunologica, dal riconoscimento di antigeni autologhi e dalla produzione errata e abnorme di autoanticorpi, per cui l'aspetto infiammatorio agisce da corollario a manifestazioni cliniche puramente conseguenti ad una deregolazione del sistema immunitario. Una malattia autoinfiammatoria, per contro, non è associata ad una risposta contro uno specifico antigene, per cui l'infiammazione cronica, che accompagna queste patologie, compare senza alterazioni autoreattive della funzionalità del sistema immunitario ma spesso è una conseguenza dell'interazione tra aspetti genetici di suscettibilità e stimoli ambientali di varia natura, come infezioni, variazioni di temperatura e stress meccanico. La difficoltà nel distinguere le due classi sta nella somiglianza del decorso clinico, della sintomatologia e delle cause scatenanti, motivo per cui sono considerate condizioni appartenenti allo stesso spettro di patologie ma localizzate agli estremi opposti (2).

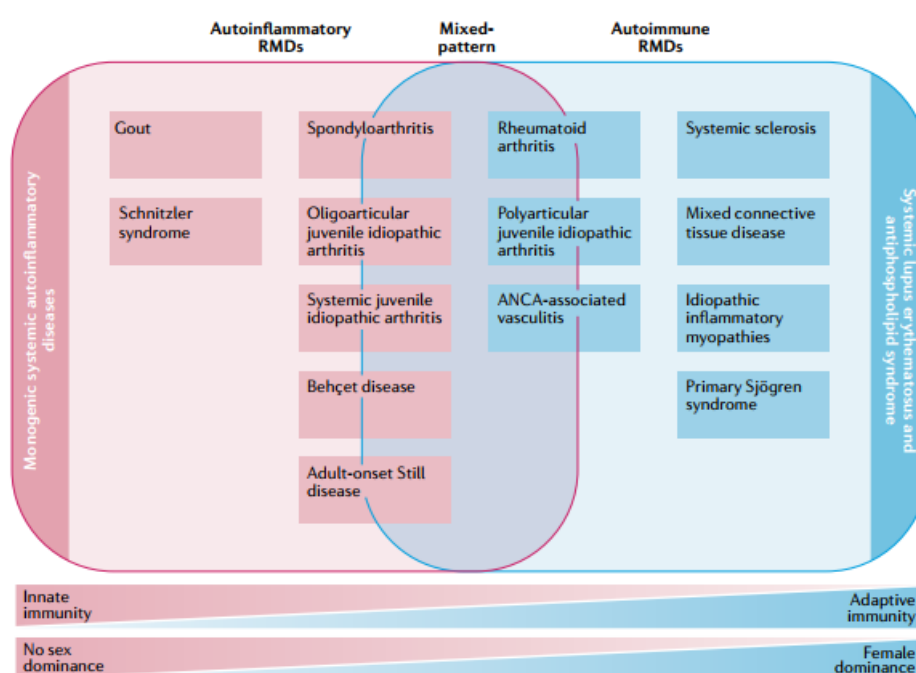


Figura 16: spettro delle malattie autoinfiammatorie e autoimmuni; *Szekanecz et al., 2021*

L'alterazione funzionale del sistema immunitario che sta alla base della patogenesi delle malattie autoimmuni e autoinfiammatorie può riguardare sia l'immunità innata che l'immunità adattativa. La componente innata è maggiormente associata a risposte di autoinfiammazione, le principali molecole che orchestrano il processo autoinfiammatorio appartengono alla superfamiglia delle citochine e sono IL-1, TNF- α , IL-6 e IFN di tipo 1. Di contro, l'immunità adattativa è una risposta specifica

organizzata allo scopo di eliminare un preciso stimolo lesivo, per cui prevede il coinvolgimento di tipologie cellulari attrezzate appositamente a questo fine. L'eccessiva risposta mediata da queste cellule, ovvero linfociti T e linfociti B, può causare difetti importanti nella regolazione della risposta immunitaria, che possono portare allo sviluppo dei segni tipici delle malattie autoimmuni (2).

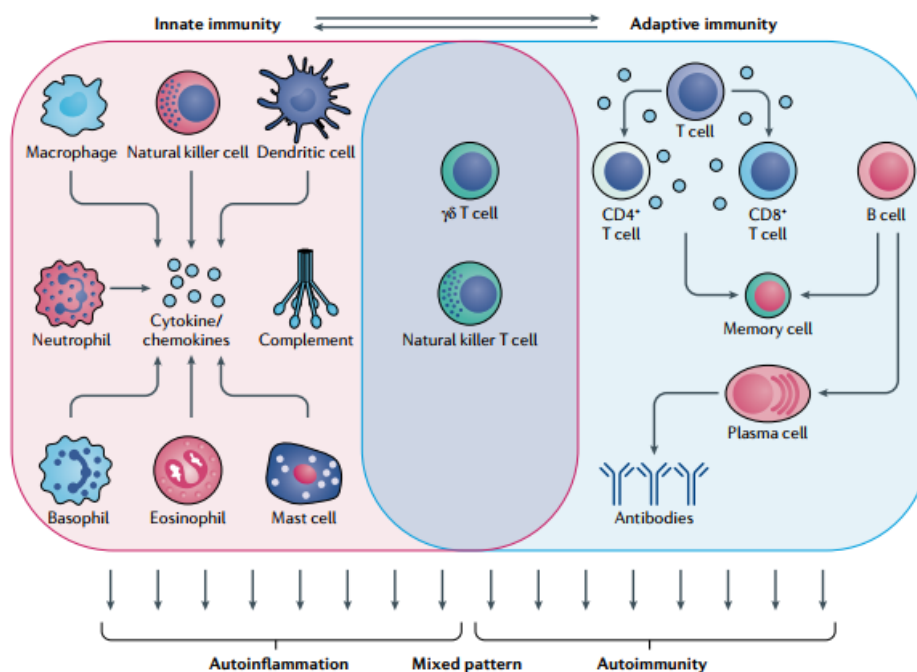


Figura 17: mediatori cellulari coinvolti nelle reazioni autoinfiammatorie e autoimmuni; Szekanecz et al., 2021

Recentemente è stato dimostrato il ruolo preponderante dell'infiammazione nella patogenesi e nell'evoluzione clinica delle malattie autoimmuni considerando la risposta infiammatoria eccessiva come una conseguenza diretta della deregolazione del sistema immunitario. La regolazione delle risposte immuni è mediata attraverso diversi meccanismi di controllo. Quelli principalmente coinvolti sono il ruolo dell'interleuchina 1 (IL-1), i corecettori espressi dai linfociti T che fungono da *checkpoints* immunitari, l'attività dei linfociti Treg e l'equilibrio nell'attività dei linfociti Th1 e Th2 (diversi spettri di polarizzazione dell'attività della medesima tipologia cellulare). I principali fattori infiammatori per i quali si è dimostrata un'attività deleteria nei confronti dei sopra citati meccanismi di regolazione e che, di conseguenza, portano alla comparsa di autoinfiammazione prima e autotimmunità successivamente sono l'alimentazione, le infezioni microbiche derivanti dall'ambiente e/o dal cibo, l'inquinamento ambientale, l'effetto di diverse sostanze chimiche con cui l'uomo entra quotidianamente in contatto, il cambiamento degli stili di vita e lo stress (36).

Dal punto di vista molecolare, studi più approfonditi hanno dimostrato il ruolo di IL-6, e più in particolare della sua interazione con il recettore gp130 nelle risposte infiammatorie aberranti e autoimmunitarie. L'attività di gp130 ha un ruolo protettivo nei confronti dell'organismo poiché

interviene nella maggior parte delle vie di segnalazione mediate da IL-6 e volte a eliminare lo stress esterno promuovendo il fenotipo Th1 dei linfociti con significato antinfiammatorio. Quando però questo meccanismo perde la sua regolazione, l'interazione tra IL-6 e gp130 assume un ruolo patologico e contribuisce all'innescio di svariati processi infiammatori che stanno alla base della comparsa dell'autoimmunità in diversi contesti, tra cui il sistema nervoso centrale, i polmoni e le articolazioni (37). Il ruolo di IL-6 nelle malattie autoimmuni è anche correlato alla sua capacità di indurre una risposta infiammatoria mediata dai linfociti T CD4⁺ inducendone il differenziamento a cellule Th17, il cui ruolo in funzione del loro repertorio secretorio nella patogenesi di svariate patologie autoimmuni è stato ampiamente studiato. Allo stesso tempo, IL-6 agisce anche attraverso la soppressione dell'induzione di linfociti Treg, i quali svolgono un ruolo di primaria importanza nell'inibizione dell'attività delle cellule autoreattive (38).

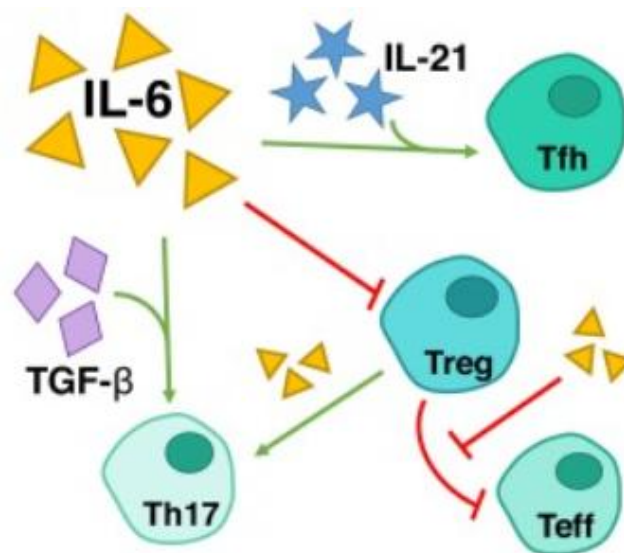


Figura 18: effetto di IL-6 sui linfociti T; Jones *et al.*, 2018

1.4 Scopo della Tesi

Le malattie autoimmuni sono caratterizzate dalla deregolazione del sistema immunitario, e recentemente è stata dimostrata la loro associazione a processi infiammatori cronici che ne facilitano lo sviluppo e che contribuiscono alla comparsa e alla progressione del danno tissutale (2). In questo contesto, sono numerosi i mediatori dell'infiammazione che svolgono un ruolo di fondamentale importanza nella disfunzione del sistema immunitario e nel mantenimento della condizione infiammatoria, principalmente citochine pro-infiammatorie e proteine di fase acuta (3). Nonostante i traguardi raggiunti riguardo alla definizione dei meccanismi patogenetici alla base di tali malattie, lo screening per gli Anticorpi Antinucleo non sempre ha valore diagnostico e/o non è sufficientemente sensibile o specifico se considerato singolarmente e per numerose malattie autoimmuni non esistono ancora dei marcatori precisi che consentono la diagnosi precoce e/o che garantiscono informazioni precise riguardo all'evoluzione della malattia o dello stato di remissione.

Tenendo conto di queste informazioni, lo scopo della ricerca che ha portato alla stesura di questa Tesi di Laurea, basata sull'attività di tirocinio svolta presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Alessandria (AOU-AL), nel Dipartimento delle Attività Integrate Ricerca e Innovazione (DAIRI), condotta sotto la supervisione della Dr.ssa Maria Cristina Sacchi e della Prof.ssa Valentina Audrito (DISIT, UPO), è stato quello di dosare i livelli plasmatici dei più comuni biomarcatori infiammatori in pazienti screenati per il test anticorpale per gli Anticorpi Antinucleo (ANA). Ci si è focalizzati su due tipologie di citochine pro-infiammatorie, Interleuchina-6 (IL-6) e Fattore di Necrosi Tumorale- α (TNF- α), il cui ruolo come marcatori diagnostici di infiammazione è già ampiamente validato. I valori sono stati poi ulteriormente confrontati con i livelli sierici dell'enzima Nicotinamide Fosforibosiltransferasi extracellulare (eNAMPT), dosato sui medesimi campioni.

L'obiettivo è quello di ricercare una possibile correlazione tra la modificazione delle concentrazioni di questi mediatori dell'infiammazione e la presenza di condizioni autoimmuni, con lo scopo di approfondire il loro potenziale ruolo nei processi infiammatori associati alle patologie a base autoimmunitaria. Nello specifico, l'indagine si presuppone di valutare come l'incremento dei livelli plasmatici di tali biomarcatori possa essere correlabile ad una condizione di infiammazione sistemica, nel tentativo di contribuire alla scoperta di biomarcatori per la determinazione precoce di patologie autoimmuni attualmente prive di tale possibilità.

A questo proposito, la valutazione contemporanea e integrata delle concentrazioni plasmatiche di IL-6, TNF- α ed eNAMPT potrebbe dare una svolta alla comprensione dei meccanismi eziopatogenetici coinvolti nelle malattie autoimmuni, e soprattutto alla determinazione del ruolo di tali molecole come potenziali biomarcatori di diagnosi precoce.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Popolazione in studio

Un totale di 140 campioni di siero è stato selezionato e prelevato dalla Struttura Complessa (SC) “Laboratorio Analisi” dell’Azienda Ospedaliero-Universitaria di Alessandria (AOU-AL) provenienti da pazienti con sospetto di malattia autoimmune. La selezione è stata eseguita in base alla richiesta di esami di secondo livello eseguiti dal Laboratorio di Autoimmunità dell’AOU-AL. I 140 campioni di partenza sono stati suddivisi in base all’esito del test di *screening* per gli Autoanticorpi Antinucleo (ANA) in 70 campioni positivi al test (ANA-positivi o ANA+) con titolo $\geq 1:80$ (Tabella 5) e 70 campioni negativi al test (ANA-negativi o ANA-) con titolo $< 1:80$ (Tabella 6). Su tutti i 140 campioni è stato eseguito il test di *screening* per gli ANA, il dosaggio di eNAMPT, di interleuchina 6 (IL-6) e del fattore di necrosi tumorale (TNF- α), dei quali sono riportati i valori nelle Tabelle 5 e 6.

CAMPIONE ANA+	eNAMPT+ (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
#1	24,2227	6,81	7,11
#2	14,60075	7,86	20
#3	7,900361	4,37	17,7
#4	8,195201	2,74	10,7
#5	36,71072	25,3	10,8
#6	22,13765	7,14	37,4
#7	21,31966	5,86	6,97
#8	9,54434	22,8	31,1
#9	7,926875	3,82	18,1
#10	5,684981	11,4	5,43
#11	14,24683	2,87	8,05
#12	2,582226	45,1	5,18
#13	12,84352	5,54	5,1
#14	25,01574	5,42	11,6

#15	17,15337	9,82	6,13
#16	10,12366	5,64	11,6
#17	4,718361	2,25	12,2
#18	9,491206	7,05	8,95
#19	15,48385	4,62	4,74
#20	33,60154	0,99	4,12
#21	1,966505	4,88	5,04
#22	12,65624	5,89	18,2
#23	5,022708	5,4	8,47
#24	5,700621	2,48	2,63
#25	17,09255	1,46	6,04
#26	31,62329	16,9	24,8
#27	33,97045	4,46	1,5
#28	10,86032	37,3	23,7
#29	16,32165	7,25	12,9
#30	19,5471	11	346
#31	27,2996	5,4	10,2
#32	10,17541	6,41	4,25
#33	16,18643	3,81	10
#34	8,315481	6,36	6,78
#35	14,91012	9,72	22,6
#36	13,25757	1,77	4,11
#37	2,143871	3,97	28
#38	5,364549	5,83	16,6

#39	6,646139	11,1	14,2
#40	24,88188	5,58	5,08
#41	24,7788	8,33	8,19
#42	3,675328	6,65	7,67
#43	9,905901	9,34	18,9
#44	29,92916	6,11	4,91
#45	13,32886	2,72	4,99
#46	31,83619	107	4,13
#47	1,557666	2,27	3,66
#48	36,06131	5,67	6,68
#49	13,81519	3,95	4,55
#50	10,53464	6,37	4,17
#51	17,0342	6,51	14,8
#52	8,741654	5,25	20,9
#53	16,59597	2,42	3,36
#54	42,66738	10,5	11,5
#55	5,141538	13,1	5,83
#56	8,189151	7,97	8,86
#57	4,710562	2,52	4,52
#58	3,597768	6,75	9,87
#59	13,23911	1,96	9,73
#60	18,07093	2,99	6,44
#61	11,1541	1,54	3,97
#62	3,221849	2,72	2,99

#63	11,18238	1,64	4,31
#64	7,924562	5,07	4,07
#65	6,651995	1,23	4,53
#66	7,11559	10,1	9,74
#67	17,09806	5,86	2,33
#68	11,35192	5,4	6,02
#69	8,213735	2,11	6,1
#70	29,09423	9,73	23

Tabella 5: campioni ANA-positivi e risultati dei relativi dosaggi

CAMPIONE ANA-	eNAMPT- (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)
#1	9,883715	0,981	2,97
#2	9,102725	84,9	25,3
#3	22,08646	1,82	3,37
#4	0,190945	2,31	14,4
#5	2,743378	-	-
#6	10,6982	2,27	6,28
#7	4,917998	-	-
#8	20,32256	1,47	3,43
#9	10,7885	0,753	2,26
#10	12,08959	3,45	4,04
#11	3,555897	17,4	8,81
#12	14,06232	5,15	2,91
#13	12,33771	3,28	18,3

#14	39,54277	4,17	11,1
#15	6,218721	2,28	4,05
#16	25,25895	8,19	8,54
#17	6,647558	8,42	19,8
#18	4,618479	8,89	42,8
#19	4,446527	5,73	31,3
#20	4,325921	5,67	9,22
#21	2,694849	3,2	7,48
#22	21,52423	23,5	12,8
#23	3,029288	4,13	3,23
#24	6,38944	4,47	2,7
#25	2,029919	-	-
#26	3,594193	-	-
#27	26,52084	4,08	6,43
#28	12,82342	1,52	4,89
#29	3,555525	-	-
#30	4,492583	2,85	8,97
#31	11,51577	4,32	7,96
#32	29,90848	2,43	4,35
#33	20,75284	64,9	17,9
#34	18,22583	2,89	10,1
#35	7,621452	988	10,9
#36	14,64481	3,88	7,4
#37	12,89009	5,62	2,96

#38	12,86437	50,8	30,5
#39	26,07524	2,76	11,2
#40	3,866251	-	-
#41	OVER fuori scala	-	-
#42	35,87019	9,16	12,4
#43	11,09235	4,06	6,71
#44	12,03567	7,04	5,65
#45	24,09045	6,76	8,87
#46	24,75215	7,62	13,6
#47	8,40354	3,27	3,76
#48	22,20783	10,3	25,8
#49	18,90213	3,22	6,39
#50	12,83776	5,23	3,42
#51	9,278302	4,28	6,1
#52	4,870712	6,55	11,7
#53	10,21293	80	9,9
#54	8,397701	5,44	6,63
#55	16,46879	49,4	14,6
#56	21,43193	5,31	13,6
#57	0,156462	18,5	19,8
#58	42,98883	9,98	8,87
#59	6,873251	5,13	6,24
#60	2,326059	-	-
#61	3,941587	-	-

#62	14,48606	26	15,1
#63	16,86657	40,2	6,34
#64	35,53244	4,64	4,7
#65	20,02215	7,42	6,56
#66	34,47097	1,54	26,5
#67	31,96482	1,25	4,29
#68	4,400572	15,9	6,61
#69	35,83473	3,22	3,71
#70	30,40498	7,24	6,84

Tabella 6: campioni ANA-negativi e risultati dei relativi dosaggi

2.2 MAGLUMI X3

Il dosaggio delle citochine pro-infiammatorie IL-6 e TNF- α è stato eseguito con l'ausilio dello strumento "MAGLUMI X3" della linea Maglumi X, commercializzato dalla ditta *Snibe Diagnostic (Shenzhen New Industries Biomedical Engineering CO., Ltd.; https://www.snibe.com/en/product/CLIA_analyzer/43.html)*. MAGLUMI X3 è un analizzatore immunologico a chemiluminescenza (CLIA) completamente automatizzato che sfrutta il principio dell'emissione di radiazione luminosa come conseguenza di una reazione chimica per rilevare la presenza di molecole in sospensione nel campione in esame anche se presenti in concentrazioni estremamente ridotte. Lo strumento permette di analizzare contemporaneamente 72 campioni con elevatissima processività, ed è possibile una vasta gamma di analisi attraverso l'uso di 180 *kit* analitici che permettono la determinazione di analiti ascrivibili alla funzionalità tiroidea e alla fertilità, di marcatori tumorali di primaria importanza, di marcatori di altre patologie come la fibrosi epatica, di molecole infiammatorie e di altre molecole libere rilevabili in circolo come testosterone, 17-idrossiprogesterone e fattori correlabili al metabolismo glucidico (39,40). Come tutti gli strumenti utilizzati in ambito ospedaliero è costituito dalla macchina principale che esegue l'analisi e dall'interfaccia digitale che permette di avviare e controllare il funzionamento dello strumento, la determinazione dei campioni da analizzare, il tipo di analisi che deve essere eseguito per ciascuno di essi e l'osservazione dei risultati al termine della seduta di lavoro.



Figura 19: MAGLUMI X3; Snibe Diagnostic (<http://www.medicalsystems.it/sistemi/maglumi-x3/>)

Lo strumento esegue l'analisi mediante l'uso di *kit* contenenti al loro interno tutti i reagenti necessari, dove i principali sono microsfere magnetiche (*Two Step Assay*; Figura 21) e/o la molecola ABEI [N-(4-amminobutil)-N-etilisoluminolo] (*One Step Assay*; Figura 21). La molecola ABEI viene utilizzata nella cosiddetta tecnologia di marcatura del MAGLUMI, processo che definisce la modalità di reazione: ABEI è una molecola organica non enzimatica di piccole dimensioni presentante miglioramenti nella struttura chimica allo scopo di aumentarne la stabilità nei tamponi acidi e alcalini, il cui ruolo è quello di reagire con idrossido di sodio e perossido per eseguire la marcatura chemiluminescente in circa tre secondi. La tecnologia di separazione si espleta mediante l'utilizzo delle microsfere magnetiche, altra tecnica ampiamente utilizzata in chemiluminescenza, la quale prevede il legame delle molecole di interesse a tali microsfere precedentemente sospese all'interno di una soluzione apposita in uno degli alloggiamenti del *kit*. I vantaggi dell'utilizzo delle sfere magnetiche comprendono una riduzione del tempo di analisi grazie ad una maggiore efficacia della reazione antigene-anticorpo, una sensibilità superiore grazie al migliore legame antigene-anticorpo che avviene sulle microsfere, una maggior precisione della reazione e una riduzione importante delle differenze analitiche nelle varie sedute di analisi e all'interno della stessa seduta grazie all'accurato mescolamento dei reagenti (41,42). Il principio di funzionamento del test è quello di un immunodosaggio a "*sandwich*" in chemiluminescenza: i vari reagenti vengono miscelati insieme al campione in esame in modo da permettere la reazione che porta alla formazione del *sandwich*; dopo un periodo di incubazione e un lavaggio, sono aggiunti dei reagenti appositi denominati *starter* che

permettono la reazione di chemiluminescenza, e il segnale luminoso emesso viene percepito da un fotomoltiplicatore ed espresso in termini di unità di luce relativa (RLU) proporzionale alla concentrazione dell'analita rilevato nel campione analizzato (43,44).



Figura 20: principi di funzionamento di MAGLUMI X3: tecnologia di marcatura con ABEI (sinistra) e tecnologia di separazione con microsfere magnetiche (destra); *Snibe Diagnostic*

Ciascun *kit* si compone di vaschette tra loro collegate e contenenti i diversi reagenti necessari all'analisi, nelle quali il campione viene iniettato sequenzialmente. I reagenti sono:

1. microsfere magnetiche rivestite con anticorpi monoclonali riconoscenti l'analita che vuole essere ricercato, in questo caso IL-6 e TNF- α , sospese in tampone fosfato (PBS) e NaN_3 (<0.1%);
2. un calibratore definito "basso" e uno definito "alto" necessari alla costruzione della curva di calibrazione per rendere l'analisi quantitativa o semiquantitativa, i quali definiscono rispettivamente il limite superiore e inferiore della suddetta curva e dunque la sensibilità del test agli estremi di concentrazione;
3. una soluzione tampone (PBS per IL-6 e Tris-HCl per TNF- α);

4. un anticorpo monoclonale diretto contro la molecola in esame e presentante la marcatura ABEI necessaria per la reazione di chemiluminescenza;
5. diluente 0.9% NaCl (esclusivo del kit per IL-6).

Sono inoltre forniti anche due controlli per ciascun analita, uno a bassa concentrazione e uno ad alta concentrazione, contenenti una concentrazione nota dell'analita in esame (43,44). Oltre ai reagenti contenuti nei *kit*, lo strumento necessita anche di soluzioni di avvio (*starter 1* e *starter 2*) caricate direttamente a bordo, di concentrati di lavaggio e di cuvette in materiale plastico anti-rottura dove viene alloggiato il campione per l'esecuzione dell'analisi.



Figura 21: kit e reagenti utilizzati per il funzionamento di MAGLUMI X3; <http://hoachatxetnghiem.com.vn/en/maglumi-cafp-prenatal-screening-clia-kits.htm>

La procedura analitica comincia con la rimozione delle pellicole protettive dai vari pozzetti dei *kit*, a cui segue un breve mescolamento manuale della vaschetta contenente le sferette magnetiche e un mescolamento automatico di circa 30 minuti eseguito dallo strumento previo caricamento a bordo. La prima procedura eseguita è la calibrazione del saggio, in modo da adattare la curva di calibrazione ai valori di RLU riscontrati; contemporaneamente viene eseguito il controllo di qualità del saggio, mediante l'analisi della concentrazione di analita nei controlli a bassa e ad alta concentrazione forniti dalla ditta produttrice. I valori ottenuti dalla valutazione del controllo di qualità devono rientrare in *range* specifici per ciascun *kit*, per cui ogni volta che un valore riportato è oltre i limiti la calibrazione e il controllo di qualità devono essere ripetuti. Concluse con successo le procedure di preparazione è possibile testare i campioni: l'analisi viene eseguita in totale automazione confrontando i valori ottenuti con la curva di calibrazione costruita su due punti (analisi quantitativa o semi-quantitativa), e i risultati vengono espressi in pg/mL. L'intervallo di riferimento per la normalità considerato per

ciascun test varia in base all'analita in esame: per IL-6 questo valore è stato definito ≤ 7.00 pg/mL, mentre per TNF- α lo stesso è stato determinato ≤ 8.00 pg/mL (43,44).

2.3 ELISA Kit Nampt (Visfatin/PBEF) (human)

Il dosaggio di NAMPT extracellulare (eNAMPT) è stato eseguito mediante *Nampt (Visfatin/ PBEF) (human) ELISA Kit* della ditta produttrice *AdipoGen Life Sciences*, versione 4, del 5 dicembre 2023 (*Adipogen, Epalinges, Switzerland; AG-45A-0006YEK-KI01*). Questo *kit* viene utilizzato per la quantificazione *in vitro* di eNAMPT umano a livello di siero e plasma. L'utilizzo è a solo scopo di ricerca, e non ha alcun valore diagnostico (45). Il principio di funzionamento della determinazione quantitativa di eNAMPT è un test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) a *sandwich*, test che permette la determinazione della presenza di una determinata sostanza in una soluzione e di quantificarla quando rapportata ad una curva di calibrazione sfruttando la specificità del legame antigene (sostanza in esame) – anticorpo (riconoscimento preciso dell'antigene), a cui segue una reazione colorimetrica conseguente all'aggiunta di un secondo anticorpo marcato con un tracciante e diretto verso un altro epitopo dello stesso antigene e di un substrato cromogeno che permette l'esecuzione del viraggio di colore. Il tutto viene poi letto in spettrofotometria alla lunghezza d'onda di 450 nm dopo acidificazione del campione, allo scopo di bloccare il proseguimento della reazione. L'intensità della reazione colorimetrica è direttamente proporzionale alla concentrazione di analita nel campione analizzato (45,46).

Il *kit* si compone di una singola piastra a 96 pozzetti ricoperti di anticorpi diretti contro eNAMPT umano, due flaconi da 30 mL ciascuno di *Wash Buffer* in concentrazione 10x, due flaconi da 30 mL ciascuno di *ELISA Buffer* in concentrazione 10x, una *vial* da 60 μ L di anticorpo di rilevamento, una *vial* da 150 μ L di IgG di coniglio coniugata con perossidasi di rafano (HRP) in concentrazione 100x, una *vial* da 16 ng di *Standard* costituito da eNAMPT umano, un flacone da 12 mL di 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB; substrato cromogeno) e due sigilli in plastica per coprire la piastra. Per l'esecuzione dell'analisi sono anche necessari uno spettrofotometro in grado di leggere la piastra ad una lunghezza d'onda di 450 nm, acqua deionizzata, e tutta la strumentazione di laboratorio del caso (micropipette, puntali sterili, *ependorf* e provette di varia natura) (45).



Figura 22: substrati e reagenti necessari all'esecuzione del dosaggio di eNAMPT mediante tecnica ELISA;
<https://adipogen.com/gold-standard-elisa-kits>

Il protocollo prevede l'iniziale preparazione dei reagenti, precisando come deve essere preparata solo la quantità di reagenti necessari all'analisi in corso. Il *Wash Buffer* 10x deve essere diluito 1:10 con acqua deionizzata per ottenere un *Buffer* 1x, e lo stesso vale per l'*ELISA Buffer*; l'anticorpo di rilevamento deve essere diluito 1:200 con *ELISA Buffer* 1x; HRP deve essere diluita 1:100 alle concentrazioni di lavoro mediante l'aggiunta di 100 μL di *ELISA Buffer* 1x; lo *Standard* deve essere rigenerato mediante l'aggiunta di 1 mL di acqua deionizzata, processo che genera una soluzione madre di 16 ng/mL che deve essere adeguatamente mescolata e lasciata riposare per 15 minuti in modo da garantire la totale rigenerazione, a cui segue la diluizione in *ELISA Buffer* 1x. Lo standard verrà utilizzato per la generazione di una curva di calibrazione a otto punti prodotta a partire da diluizioni seriali della soluzione madre (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 e 0 ng/mL). I campioni in esame devono essere analizzati puri (non diluiti) (45).

Per ottenere:	Aggiungere:	All'interno di:
8 ng/mL	300 μL NAMPT (16 ng/ml)	300 μL <i>ELISA Buffer</i> 1X
4 ng/mL	300 μL NAMPT (8 ng/ml)	300 μL <i>ELISA Buffer</i> 1X
2 ng/mL	300 μL NAMPT (4 ng/ml)	300 μL <i>ELISA Buffer</i> 1X
1 ng/mL	300 μL NAMPT (2 ng/ml)	300 μL <i>ELISA Buffer</i> 1X
0.5 ng/mL	300 μL NAMPT (1 ng/ml)	300 μL <i>ELISA Buffer</i> 1X
0.25 ng/mL	300 μL NAMPT (0.5 ng/ml)	300 μL <i>ELISA Buffer</i> 1X
0.125 ng/mL	300 μL NAMPT (0.25 ng/ml)	300 μL <i>ELISA Buffer</i> 1X
0 ng/mL	300 μL <i>ELISA Buffer</i> 1X	Pozzetto vuoto

Tabella 7: diluizioni seriali da eseguire per generare la curva di calibrazione; AG_45A_0006YEK_Nampt_human_ELISA_Kit_v4-1.pdf

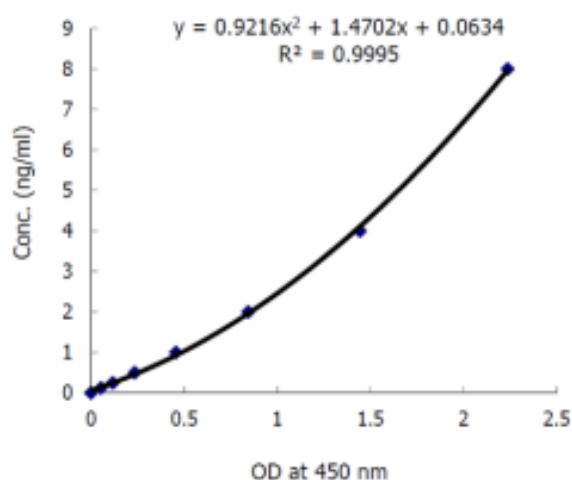


Figura 23: esempio di curva di calibrazione ottenuta mediante le diluizioni seriali dello Standard;
<https://adipogen.com/catalogsearch/result/?q=+Nampt+%28Visfatin%2FPBEF%29+%28human%29>

La procedura analitica prevede l'aggiunta di 100 μ L di ciascuna diluizione di *Standard* nel rispettivo pozzetto della piastra in duplicato; lo stesso è valido anche per i campioni. La piastra viene poi coperta con il sigillo e lasciata in incubazione *overnight* a 4°C. Il giorno successivo viene per prima cosa rimosso l'eccesso di soluzione, a cui segue l'aggiunta di 300 μ L di *Wash Buffer* 1x per eseguire il primo lavaggio; questo processo deve essere ripetuto tre volte, e per rimuovere il liquido residuo in eccesso (fondamentale alla corretta esecuzione della procedura) la piastra deve essere sbattuta energicamente su carta assorbente. A questo punto devono essere aggiunti a ciascun pozzetto 100 μ L di anticorpo di rilevamento, la piastra viene coperta dal sigillo e si attende l'incubazione per circa un'ora a 37°C. Segue un ulteriore lavaggio con *Wash Buffer* 1x con le stesse modalità prima descritte. Si aggiungono poi 100 μ L di IgG coniugate a perossidasi di rafano in ciascun pozzetto, si copre la piastra con il sigillo e si attende nuovamente l'incubazione per circa un'ora a 37°C. Viene eseguito un ultimo lavaggio con *Wash Buffer* 1x nello stesso modo già riportato, in questo caso ripetuto però per cinque volte. Giunti a questo punto vengono addizionati 100 μ L di substrato cromogeno (TMB), si attende l'esecuzione della reazione colorimetrica per circa 10 minuti, al buio e a temperatura ambiente (piastra di colore blu; Figura 24), e si termina la reazione con l'aggiunta di 100 μ L di soluzione di stop (piastra di colore giallo). Infine, viene eseguita, entro 30 minuti, la lettura spettrofotometrica a 450 nm di lunghezza d'onda della piastra per definire le concentrazioni di ciascun pozzetto. Dal momento che ogni *Standard*, controllo e campione è stato eseguito in doppio, il risultato finale della concentrazione si ottiene calcolando la media aritmetica dei risultati ottenuti dai due pozzetti per ciascuna soluzione, dalla quale viene sottratto poi il valore del cosiddetto bianco (il pozzetto contenente 0 ng/mL di concentrazione di *Standard*) (45).

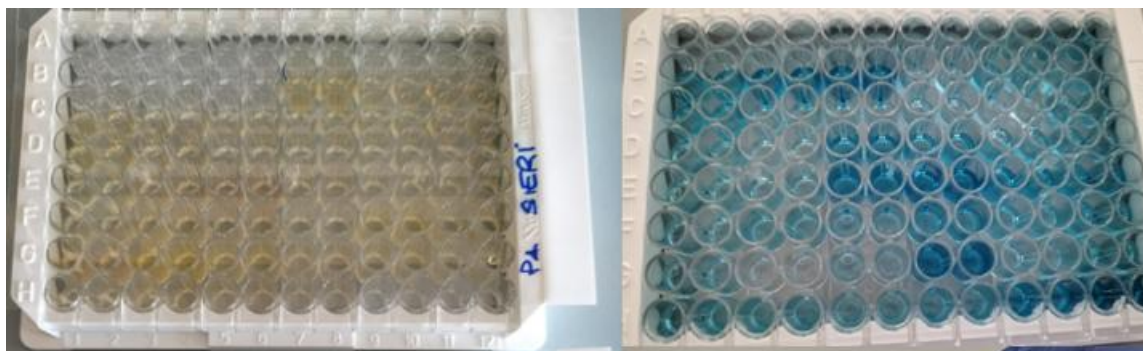


Figura 24: piastra utilizzata per il dosaggio di eNAMPT nei sieri di alcuni pazienti ANA+ e ANA-

<>	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 8: esempio di tabella riportante i valori ottenuti dal dosaggio di eNAMPT in alcuni pazienti dei gruppi ANA+ e ANA-

<>	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	
C	4		5		6		7		8		9	
D	10		11		12		13		14		15	
E	16		17		18		19		20		1	
F	2		3		4		5		6		7	
G	8		9		10		11		12		13	
H	14		15		16		17		18		19	

Tabella 9: didascalia della piastra utilizzata per il dosaggio di eNAMPT in alcuni pazienti ANA+ e ANA-, i cui risultati sono riportati in Tabella 8; la sigla "ST" indica i pozzetti contenenti gli standard, il colore azzurro i campioni del gruppo ANA+, il colore rosso i campioni del gruppo ANA-

Il valore minimo di concentrazione rilevato da *Nampt* (*Visfatin/PBEF*) (*human*) *ELISA Kit* è di 30 pg/mL, con un *range* normale di valori da 0.125 ng/mL a 8 ng/mL (45).

2.4 UNIQUO 160

Il dosaggio degli Anticorpi Antinucleo è stato eseguito attraverso lo strumento UNIQUO 160 (*EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG*, Germania; <https://www.euroimmun.it/prodotti/automazione/ifa/uniqo-160/>), il cui principio di funzionamento è la metodica di immunofluorescenza indiretta (IFA). UNIQUO 160 è uno strumento che permette l'esecuzione completamente automatizzata dei test di immunofluorescenza indiretta: ogni fase del processo analitico avviene a carico dello strumento, dal prelievo dei sieri e dei reagenti alla lettura dei vetrini, rendendo massima la processività e facilitando l'integrazione della diagnostica in IFI nella

quotidianità del laboratorio di autoimmunità. Lo strumento garantisce l'analisi di 160 campioni distribuiti in 18 vetrini nella stessa seduta di lavoro, il cui montaggio viene eseguito automaticamente dallo strumento con il vantaggio di preservare più a lungo la fluorescenza del campione. Inoltre, presenta un microscopio integrato che permette l'acquisizione di immagini estremamente nitide, che sono poi valutabili grazie al middleware digitale EUROLabOffice 4.0. Previa adeguata configurazione, UNIQO 160 rende possibile l'esecuzione della tecnica di immunofluorescenza indiretta per la ricerca della maggior parte degli autoanticorpi rilevabili con questa analisi applicandola anche a diversi substrati: ANA su substrato Hep-2, anticorpi anti-dsDNA su substrato *Crithidia luciliae*, anticorpi anti-endomisio su substrato di fegato o esofago di scimmia, anticorpi anti-mitocondrio (AMA), anti-muscolo liscio (ASMA) e anti-microsomi epatici e renali (LKM) su substrato triplo tessuto (fegato, rene e stomaco di topo o ratto), anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) su granulociti neutrofili, anticorpi anti-sistema nervoso centrale e anticorpi anti-recettore della fosfolipasi A2 (PLA2R) su substrato cellule umane transfettate (47).



Figura 25: UNIQO 160; <https://www.euroimmun.it/prodotti/automazione/ifa/uniqo-160/>

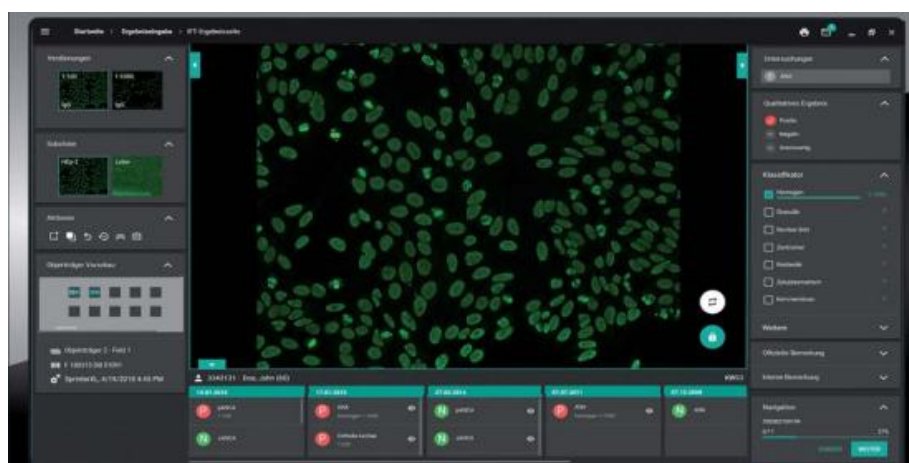


Figura 26: presentazione dei risultati mediante l'interfaccia EUROLabOffice 4.0;
https://www.euroimmun.com/documents/Indications/Autoimmunity/Rheumatology/ANA/FA_1510_I_UK_B.pdf

Il test di immunofluorescenza indiretta su cellule HEp-2 è il *gold standard* per la determinazione degli ANA, questo perché l'intensità del segnale luminoso generato è generalmente proporzionale alla quantità di autoanticorpi presenti nel campione e perché a seconda del tipo di antigene riconosciuto si organizzano *patterns* di positività differenti facilmente distinguibili. Inoltre, alcuni quadri di positività correlano direttamente con diverse manifestazioni autoimmuni, avendo dunque un ruolo diagnostico (ad esempio, il *pattern* "omogeneo" AC-1 e il LES) (48). L'IFA su cellule HEp-2 permette il dosaggio qualitativo/semi-quantitativo degli ANA *in vitro*, a scopo di supportare la diagnosi clinica e dunque ha valore diagnostico. La fluorescenza derivante viene valutata sia mediante il microscopio a fluorescenza sia attraverso l'interfaccia digitale EUROLabOffice 4.0 attraverso lo schermo del computer collegato al sistema informatico (LIS) (49).

L'esecuzione dell'analisi prevede l'incubazione dei controlli e dei campioni diluiti sui pozzetti del vetrino, e in presenza di autoanticorpi di classe IgG, IgA e/o IgM essi si legano agli antigeni intracellulari del substrato. Questi autoanticorpi vengono poi riconosciuti da anticorpi secondari anti-Ig umane marcate con un tracciante fluorescente (isotiocianato di fluoresceina, FITC), e la fluorescenza viene rilevata con l'ausilio di un microscopio a fluorescenza (49).

SYSTEMIC AUTOANTIBODIES AND ASSOCIATED AUTOIMMUNE DISEASES		Domains of immunofluorescence									
		Diagnostically									
		essential	relevant								
Dated July 2017											
Autoantibodies against	Cell nuclei (ANA)										
	CENP-F (cyclin II - mitosis)										
	dsDNA										
	Nucleosomes										
	Sm										
	U1-RNP										
	SS-A (Ro, 60 kDa)										
	SS-B (La)										
	Histones										
	PCNA (cyclin I)										
	RNA helicase A										
	MSA-1 (NuMA)										
	MSA-2 (HsEg5)										
	Topoisomerase I (Sci-70)										
	Fibrillarin (U3-RNP)										
	RNA polymerases I, II, III										
	NOR-90, PDGF-R										
	Centromeres (CENP-A, CENP-B)										
	PM-Scl (1, 75, 100)										
	Ku										
	Mt-2										
	SRP										
	cN-1A (Mup44)										
	Jo-1										
	TIF1-gamma										
	MDA5, NXP2, SAE1										
	PL-7, PL-12, OJ, EJ, SC, KS										
	Nuclear dots										
	Sp100, Sp140, SUMO, PML										
	Nuclear membrane, lamin B recept.										
GP210, NUP62											
Cardiolipin											
Beta-2 glycoprotein											
Phosphatidylserine											
Coagulation factor (lupus anticoag.)											
Prothrombin, annexin A5											
C1q											
Mitochondria (AMA)											
Mitochondria (AMA M2-3E/BPO)											
Ribosomal P proteins											
ASMA											
F-actin											
IgG (rheumatoid factors)											
Citrullinated peptides (CCP)											
Sa											
Filaggrin, RA keratin											
Citrullinated enolase peptide (CEP-1)											

Figura 27: Autoanticorpi Antinucleo rilevabili attraverso il test di immunofluorescenza indiretta;
https://www.euroimmun.com/documents/Indications/Autoimmunity/Rheumatology/ANA/FA_1510_1_UK_B.pdf

La confezione del prodotto necessario alla determinazione degli ANA su substrato HEp-2 contiene un determinato numero di vetrini (10, 20, 50 o 100) ciascuno contenente 5 o 10 pozzetti detti *biochip* rivestiti con le cellule HEp-2, un flacone da 1.5 mL di anticorpi anti-IgG umane prodotti in capra coniugati con FITC (detto gergalmente “coniugato”), un flacone da 0.25 mL di controllo positivo (autoanticorpi ANA ottenuti da siero di controllo umano titolato), un flacone da 0.1 mL di controllo negativo (siero di controllo umano titolato e privo di autoanticorpi ANA), due bustine di sale per PBS a pH 7.2 necessario per le fasi di lavaggio, due flaconi da 2.0 mL di *Tween* 20 per la preparazione del PBS, un flacone da 3.0 mL di mezzo di montaggio, un numero variabile di vetrini coprioggetto in funzione del numero di vetrini portaoggetto e la scheda tecnica. Tutti i reagenti contenuti nella confezione sono pronti all’uso. L’analisi viene eseguita mediante una tecnica di pipettaggio automatico sviluppata dalla ditta EUROIMMUN definita “*Titerplane*”, il cui fine ultimo è quello di standardizzare le analisi e garantire che le tempistiche di incubazione siano identiche per tutti i pozzetti di ogni vetrino. Lo strumento inizia la seduta di lavoro diluendo 1:10 i sieri dei campioni da analizzare con PBS-*Tween* in apposite cuvette. Per ciascun pozzetto di ogni vetrino viene depositata in maniera automatica una quantità di 30 μ L di controllo positivo, controllo negativo e siero diluito, occupando un solo pozzetto per ogni controllo e campione in esame; segue un’incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente. I vetrini vengono poi lavati con PBS-*Tween* per rimuovere tutti gli anticorpi in eccesso, e vengono aggiunti 25 μ L di coniugato a ciascun pozzetto; i vetrini vengono poi incubati per altri 30 minuti a temperatura ambiente, in questo caso però evitando l’esposizione alla luce diretta. Trascorso il tempo necessario i vetrini vengono nuovamente lavati con PBS-*Tween*, su ciascun pozzetto (anche quelli eventualmente non utilizzati) viene aggiunta una goccia di circa 10 μ L di mezzo di montaggio, e infine lo strumento posiziona delicatamente con l’ausilio di una ventosa il vetrino coprioggetto sul vetrino portaoggetto. L’ultima fase della procedura analitica è la scansione automatica dei vetrini, eseguita mediante il microscopio a fluorescenza interno allo strumento. Le fotografie ottenute, anche se è possibile un confronto con un *database* interno di immagini raffiguranti quadri di negatività e positività al test, devono sempre essere controllate e verificate dall’operatore per interpretare il *pattern* di fluorescenza ottenuto. Il medesimo protocollo viene applicato anche da strumenti semi-automatici, come ad esempio IF Sprinter o Sprinter XL, e deve essere seguita tal quale anche nel caso in cui la procedura sia eseguita manualmente (49).



Figura 28: *flowchart* di una seduta di lavoro su UNIQO 160 per il dosaggio degli ANA con tecnica IFA; Immagine generata con l'ausilio dell'intelligenza artificiale (*Gemini AI, Google*), 2026

2.5 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software *GraphPad Prism* in versione 9.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA; <https://www.graphpad.com/features>). La significatività statistica è stata determinata mediante il test *t*-Student per dati appaiati o non appaiati, seguito dal test di Shapiro-Wilk per valutare la normalità di distribuzione dei dati. Dove indicato sono stati applicati anche il test non parametrico di Mann-Whitney e il test ANOVA a una via (*One-way ANOVA*). Il test *t*-Student è un metodo statistico che permette di studiare i valori medi ascrivibili a una o due popolazioni, determinando il discostamento del valore ottenuto da quello conosciuto se presente un solo campione, confrontando i valori ottenuti da due popolazioni distinte e indipendenti, e l'eventuale esistenza di una differenza statisticamente significativa nei valori appaiati misurati (50). Il test non parametrico di Mann-Whitney è basato sull'attribuzione di ranghi alla popolazione, rendendo possibile l'analisi dei valori statistici ottenuti ogni qual volta non sia possibile un confronto diretto tra le medie della popolazione (51). Il test *One-way ANOVA* viene utilizzato per valutare le differenze tra le medie di più gruppi, analizzando nello specifico la varianza, nei casi in cui sia presente una singola variabile indipendente (52). A meno che non indicato diversamente, i dati nelle figure sono riportati utilizzando la dicitura "*mean ± SEM*" (media ± errore standard della media). Per tutte le analisi statistiche, è stato considerato come statisticamente significativo il livello di confidenza 0.05. La significatività è indicata con * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

3. RISULTATI

3.1 Determinazione dei livelli di IL-6, TNF- α ed eNAMPT nella coorte in studio

La prima analisi eseguita è stata la valutazione della distribuzione dei valori di concentrazione di tutte e tre le citochine pro-infiammatorie IL-6, TNF- α ed eNAMPT nella popolazione generale ($n = 140$), utilizzando la tecnica CLIA per IL-6 e TNF- α e la tecnica ELISA per eNAMPT. I livelli plasmatici di tutti e tre i parametri misurati sono stati riportati in un documento Excel diviso in base alla positività al test ANA in due categorie, denominate “ANA+” (pazienti positivi al test di *screening*; $n = 70$) e “ANA-“ (pazienti negativi al test di *screening*; $n = 70$), dal quale sono poi stati estrapolati i valori per la creazione dei diagrammi di dispersione (*scatter/strip plot*) necessari allo studio, mediante il test non parametrico di Mann-Whitney (Figura 29). Ogni grafico è stato costruito con le due coorti in esame riportate sull’asse delle ascisse e la concentrazione del biomarcatore sull’asse delle ordinate; le barre nelle figure indicano la media associata alla misura di dispersione ($mean \pm SEM$). IL-6 e TNF- α sono stati misurati con una curva di taratura in pg/mL, mentre eNAMPT in ng/mL. Le concentrazioni delle singole citochine nelle due coorti in esame non hanno dimostrato alcuna differenza statisticamente significativa, in figura “ns” (*not significant*), rendendo i parametri comparabili nei due gruppi nonostante la presenza di valori parecchio discostati dalla media. Questo evidenzia una tendenza comune nei livelli di ciascuna delle molecole infiammatorie prese in esame.

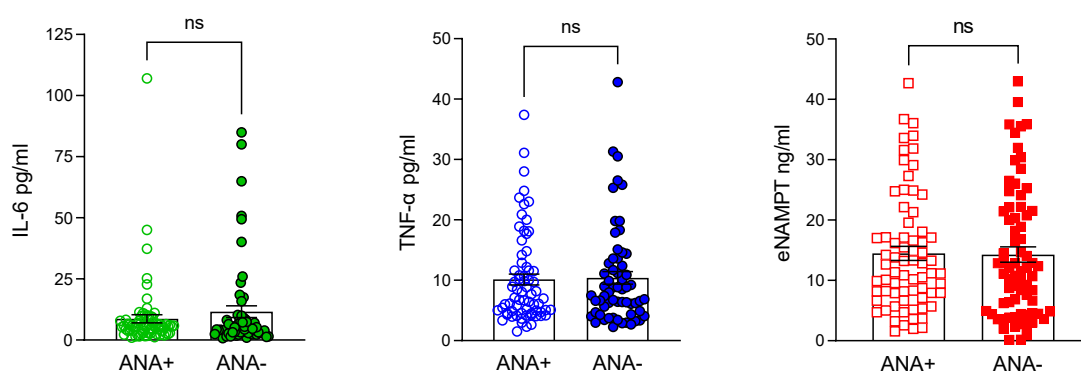


Figura 29: rappresentazione grafica dei livelli di IL-6 (grafico verde a sinistra), TNF- α (grafico blu al centro) ed eNAMPT (grafico rosso a destra) confrontati nella coorte complessiva. Le differenze osservate nei due gruppi non sono statisticamente significative.

3.2 Confronto dei livelli di espressione delle citochine nella coorte ANA-positivi

La valutazione dei livelli sierici delle citochine IL-6 e TNF- α (pg/mL) è stata eseguita inizialmente nella coorte ANA-positivi, con $n = 70$. L’analisi statistica ha previsto il confronto tra le due citochine nella singola coorte attraverso il test non parametrico di Mann-Whitney, il quale ha evidenziato un valore medio della concentrazione di TNF- α maggiore rispetto a quello di IL-6, caratterizzato anche da una maggiore deviazione standard (Figura 30). Entrambi i parametri, inoltre, si caratterizzano da

una distribuzione non normale a causa della presenza di valori molto discostati dalla media. Il test statistico ha restituito un valore di p -value pari a 0.0042. Questo risultato dimostra una differenza statisticamente significativa (** p -value < 0.01) nella distribuzione dei valori delle due citochine all'interno della stessa coorte ANA-positivi.

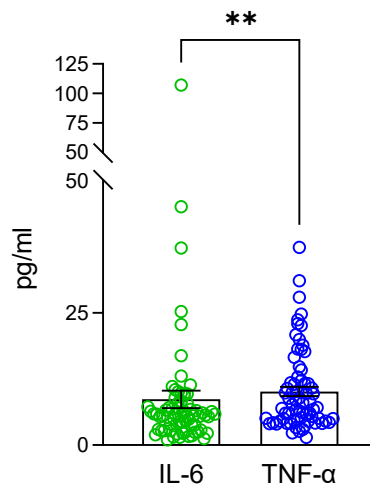


Figura 30: analisi della distribuzione di IL-6 e TNF- α nella coorte ANA+; ** p -value < 0.01 (p -value = 0.0042), test non parametrico di Mann-Whitney

3.3 Confronto dei livelli di espressione delle citochine nella coorte ANA-negativi

La medesima valutazione dei livelli sierici delle citochine IL-6 e TNF- α (pg/mL) è stata eseguita successivamente nella coorte ANA-negativi, con $n = 70$. Anche in questo caso è stato eseguito il confronto tra le due citochine nella singola coorte attraverso il test non parametrico di Mann-Whitney, evidenziando valori medi più bassi rispetto alla coorte ANA+ ma ugualmente significativi dal punto di vista statistico: il test ha fornito un valore di ** p -value < 0.01, dimostrando una differenza statisticamente significativa nella distribuzione dei valori delle due citochine all'interno della stessa coorte ANA-negativi.

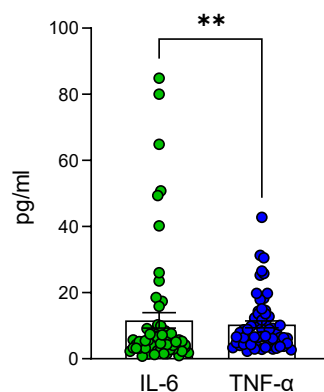


Figura 31: analisi della distribuzione di IL-6 e TNF- α nella coorte ANA-; ** p -value < 0.01, test non parametrico di Mann-Whitney

3.4 Correlazione IL-6-eNAMPT nella coorte in studio

La correlazione tra IL-6 (pg/mL, asse delle ordinate) ed eNAMPT (ng/mL, asse delle ascisse) nella coorte complessiva, eseguita mediante il test di correlazione per ranghi di Spearman e rappresentata con un grafico a dispersione (*scatter plot*), è risultata non statisticamente significativa (Figura 32).

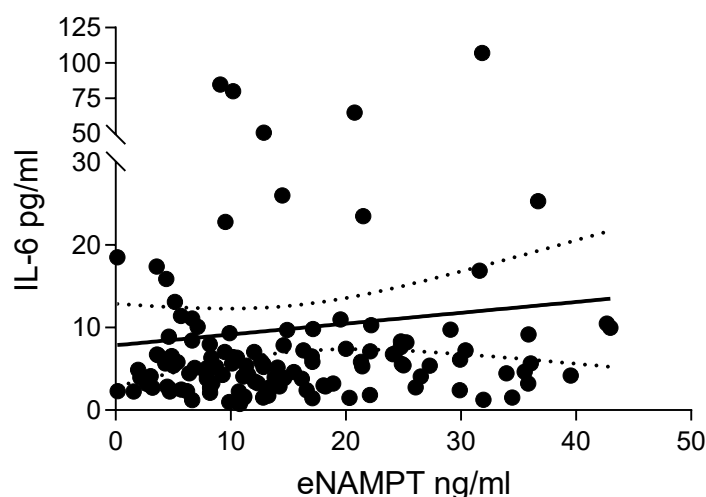


Figura 32: correlazione IL-6-eNAMPT, non statisticamente significativa; correlazione per ranghi di Spearman

Considerando singolarmente le coorti ANA+ e ANA-, la situazione si rivela differente. Nel caso della correlazione tra IL-6 ed eNAMPT nei pazienti ANA+ ($n = 68$), l'analisi è stata eseguita sempre mediante il test di correlazione per ranghi di Spearman e rappresentata graficamente attraverso uno *scatter plot*, dimostrando l'esistenza di una significatività statistica anche se non particolarmente forte ($r = 0.2575$, $p\text{-value} = 0.0340$) che si traduce nella condizione per cui aumentati livelli di eNAMPT sono associati positivamente ad un aumento dei livelli basali di IL-6 (Figura 33).

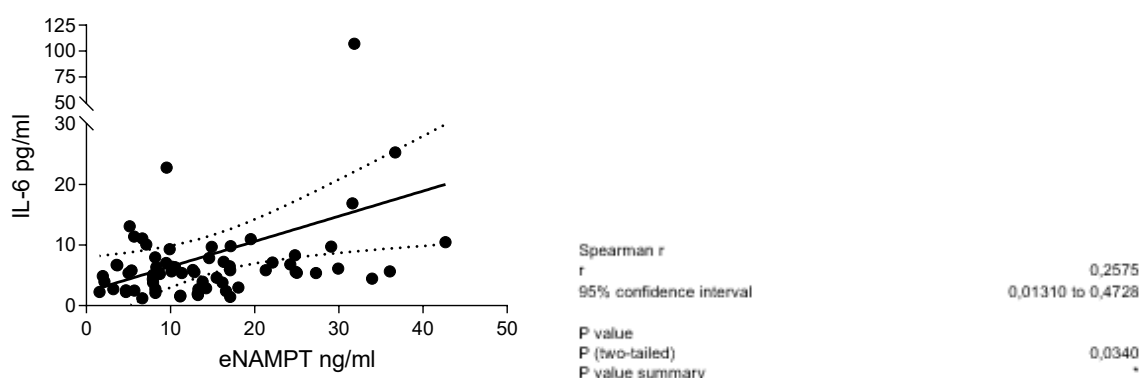


Figura 33: correlazione IL-6-eNAMPT nella coorte ANA+; $r = 0.2575$, $p\text{-value} = 0.034$ (* $p\text{-value} < 0.05$), test di correlazione per ranghi di Spearman

Per approfondire ulteriormente la valutazione, i pazienti del gruppo ANA+ sono stati categorizzati in due gruppi in base al dosaggio di IL-6 sierica utilizzando il valore di *cutoff* di 7 pg/mL fornito dalla

ditta (*Snibe Diagnostics*), per il quale un valore di concentrazione di tale citochina è da considerare clinicamente rilevante quando superiore a 7 pg/mL (Figura 34). I soggetti che presentavano valori di concentrazione di IL-6 superiore al valore di *cutoff* ($n = 22$) hanno anche riportato livelli di eNAMPT drasticamente maggiori rispetto agli individui caratterizzati da concentrazioni di IL-6 circolante pari o inferiore a 7 pg/mL ($n = 48$), rappresentato da un valore di $p\text{-value} = 0.0399$ e dunque statisticamente significativo ($*p\text{-value} < 0.05$). È stato utilizzato un test t per lo studio di variabili non appaiate. Complessivamente, questi dati suggeriscono un'associazione positiva tra i valori di concentrazione di eNAMPT e quelli di IL-6, soprattutto una volta superato il *cutoff*.

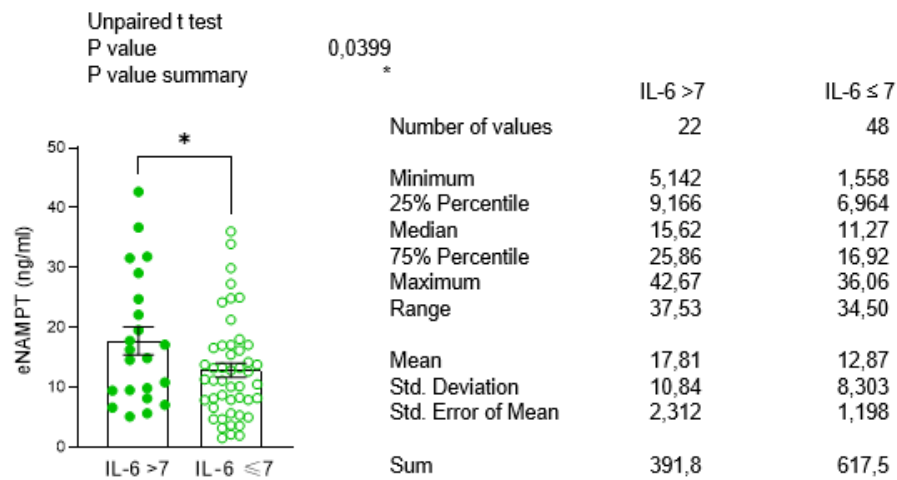


Figura 34: correlazione tra IL-6-eNAMPT nella popolazione ANA+ stratificata per il *cutoff* di 7 pg/mL; $p\text{-value} = 0.0399$ ($*p\text{-value} < 0.05$), test t per variabili non appaiate

Relativamente alla coorte ANA-, la rappresentazione grafica dei valori di concentrazione di IL-6 ed eNAMPT attraverso uno *scatter plot* ha dimostrato l'assenza di significatività statistica, suggerendo addirittura una tendenza negativa nella correlazione (Figura 35).

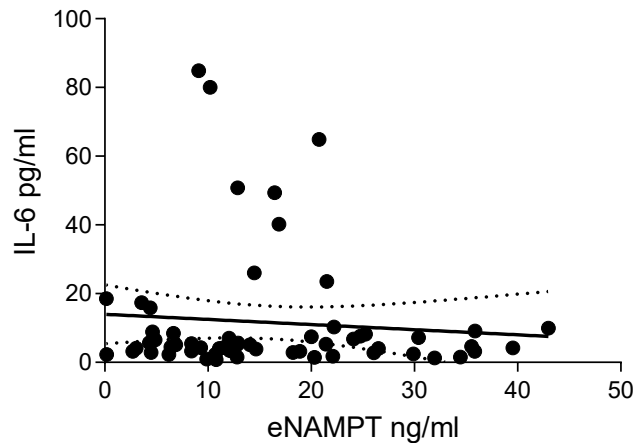


Figura 35: correlazione tra IL-6-eNAMPT nella popolazione ANA-; assenza di significatività statistica e ipotesi di *trend* negativo

3.5 Correlazione TNF- α -eNAMPT nella coorte in studio

La correlazione tra TNF- α (pg/mL, asse delle ordinate) ed eNAMPT (ng/mL, asse delle ascisse) nella coorte complessiva, eseguita mediante il test di correlazione per ranghi di Spearman e rappresentata con un grafico a dispersione, è risultata non statisticamente significativa (Figura 36).

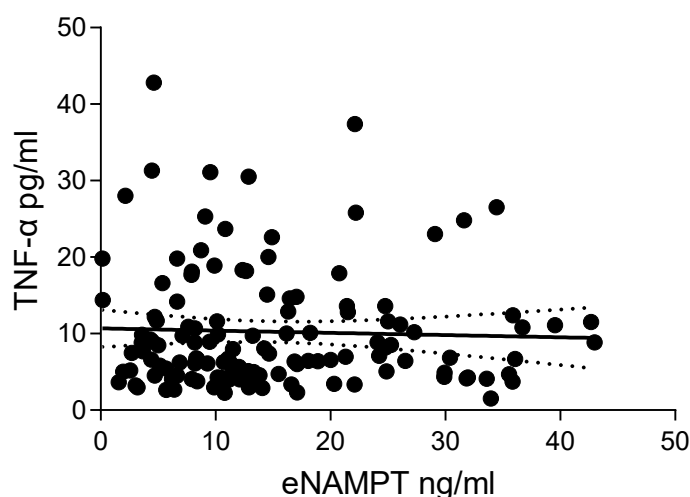


Figura 36: correlazione TNF- α -eNAMPT, non statisticamente significativa; correlazione per ranghi di Spearman

Valutando in maniera esclusiva le due popolazioni ANA+ e ANA-, la situazione riflette l'andamento osservato nella correlazione IL-6-eNAMPT. Per quanto riguarda la correlazione tra TNF- α ed eNAMPT nei pazienti ANA+ ($n = 66$), l'analisi è stata eseguita sempre con l'ausilio del test di correlazione per ranghi di Spearman e rappresentata graficamente in uno *scatter plot*. L'andamento della distribuzione dei valori sembrerebbe dimostrare l'esistenza di una correlazione tra le due citochine infiammatorie, ma l'analisi statistica ha rivelato l'assenza di significatività: $p\text{-value} = 0.1413$ per la distribuzione a una coda, $p\text{-value} = 0.2542$ per la distribuzione a due code, intervallo di confidenza al 95% da -0.1096 a 0.3752 (Figura 37).

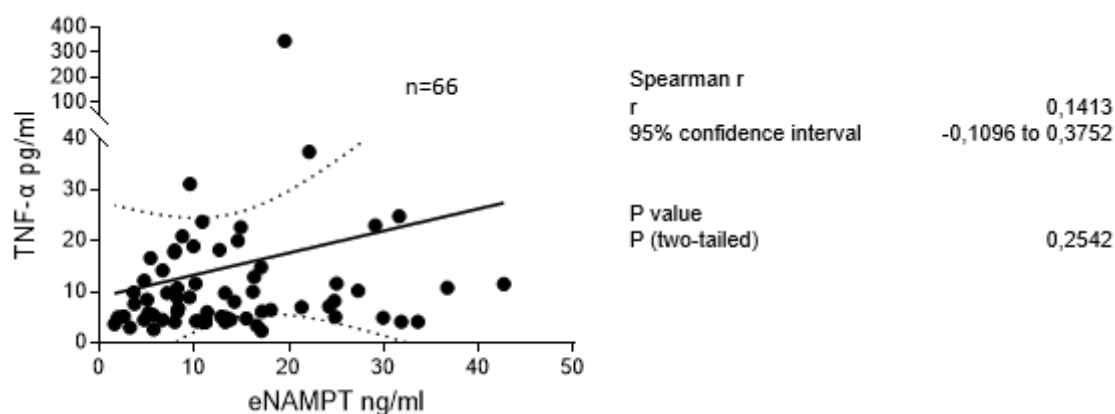


Figura 37: correlazione TNF- α -eNAMPT nella coorte ANA+, non statisticamente significativa; correlazione per ranghi di Spearman

Anche in questo caso è stata eseguita la stratificazione della popolazione ANA+ relativamente al dosaggio di TNF- α sierico utilizzando il valore di *cutoff* di 8 pg/mL fornito dalla ditta (*Snibe Diagnostics*), per il quale un valore di concentrazione di tale citochina è da considerare clinicamente rilevante quando superiore a 8 pg/mL (Figura 38). Anche in questo caso non si è osservata alcuna significatività dal punto di vista statistico dal confronto dei due gruppi, dal momento che i soggetti con concentrazione di TNF- α superiore a 8 pg/mL (n = 33) e soggetti con valori inferiori al *cutoff* (n = 33) mostrano livelli di eNAMPT molto simili. L'assenza di significatività statistica supporta l'assenza di correlazione tra i livelli sierici di TNF- α e di eNAMPT.

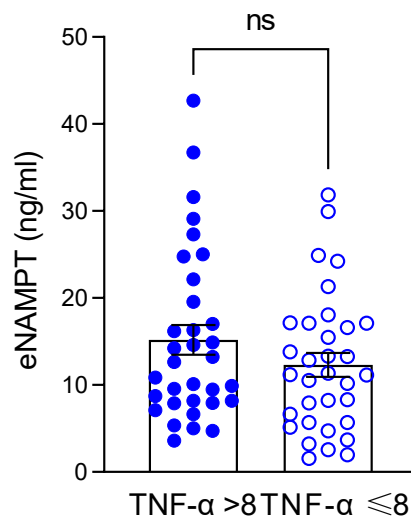


Figura 38: correlazione TNF- α -eNAMPT nella coorte ANA+ stratificata per il *cutoff* di 8 pg/mL, non statisticamente significativa

Nel caso della sola coorte di pazienti ANA-, la rappresentazione grafica dei valori di concentrazione di TNF- α ed eNAMPT attraverso uno *scatter plot* ha dimostrato l'assenza di significatività statistica, suggerendo un lieve trend negativo (Figura 39).

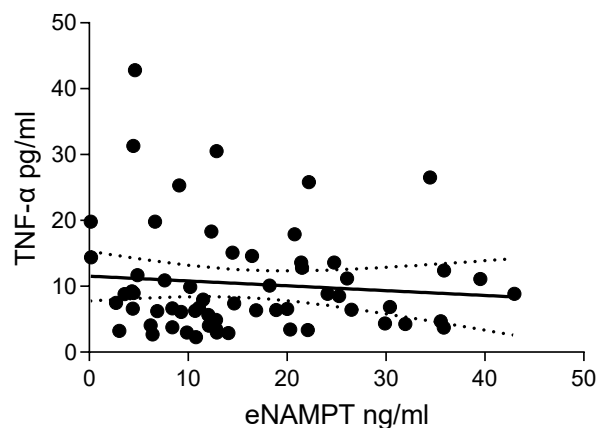


Figura 39: correlazione tra TNF- α -eNAMPT nella popolazione ANA-; assenza di significatività statistica e ipotesi di tendenza negativa

3.6 Correlazione IL-6-TNF- α nella coorte in studio

La correlazione tra le due citochine pro-infiammatorie IL-6 (pg/mL) e TNF- α (pg/mL) è stata studiata nella popolazione complessiva in esame ($n = 140$; numero di coppie = 129) mediante il test di correlazione per ranghi di Spearman e rappresentata graficamente da uno *scatter plot* (Figura 40). La correlazione si è dimostrata molto forte ($r = 0.4894$), con un livello di significatività statistica molto elevato ($****p\text{-value} < 0.0001$). Questa osservazione suggerisce che le due citochine influenzano in maniera vicendevole l'aumento delle proprie concentrazioni nel siero, e l'aumento di una è generalmente direttamente proporzionale all'aumento dell'altra.

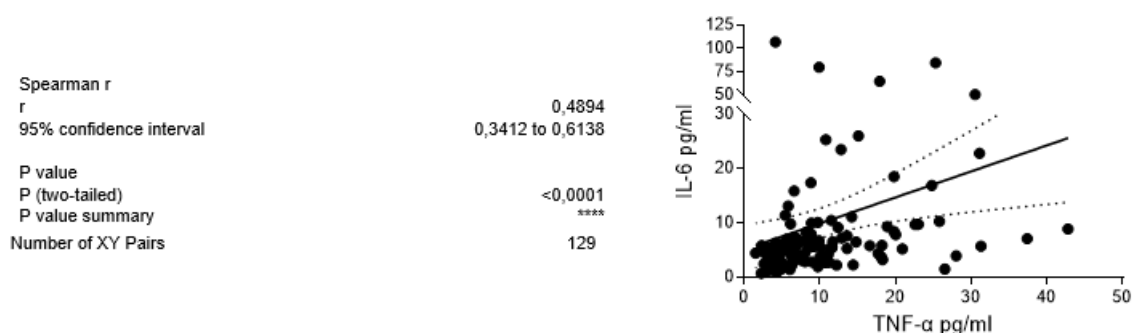


Figura 40: correlazione IL-6-TNF- α nella popolazione in studio; $****p\text{-value} < 0.0001$, test di correlazione per ranghi di Spearman

Questa tendenza si è riscontrata anche analizzando singolarmente la coorte ANA+ ($n = 69$, numero di coppie = 69), sempre mediante il test di correlazione per ranghi di Spearman e rappresentandola in uno *scatter plot* (Figura 41). In questo specifico caso la significatività statistica è leggermente inferiore ($r = 0.4421$, $***p\text{-value}$ approssimato a < 0.0001), ma comunque dimostra come aumentati livelli di una delle due citochine inducono il corrispondente aumento delle concentrazioni dell'altra. Il grafico di dispersione, allo stesso modo del precedente, evidenzia una tendenza consistente orientata all'aumento, anche se leggermente meno forte.

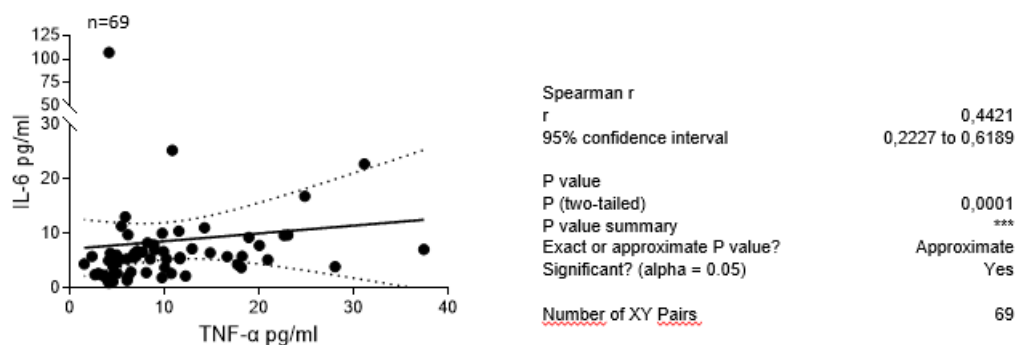


Figura 41: correlazione IL-6-TNF- α nella coorte ANA+; $***p\text{-value} < 0.0001$, test di correlazione per ranghi di Spearman

4. DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Lo studio si concentra sull'analisi dei livelli circolanti di eNAMPT, IL-6 e TNF- α in una coorte di individui con sospetto clinico di malattia autoimmune, motivo per cui è stato richiesto l'esame di *screening* ANA. Il dosaggio degli Anticorpi Antinucleo è considerato il *gold standard* per la diagnosi delle malattie autoimmuni sistemiche, ma viene anche ampiamente applicato in ambito di ricerca e di classificazione delle suddette patologie (33). Nonostante l'affermata rilevanza clinico-diagnostica, lo *screening* per gli ANA si rivela essere poco specifico e scarsamente significativo nei casi di più difficile classificazione, portando addirittura a incomprensioni e incongruenze interpretative tra gli specialisti medici e laboratoristi del settore (53). Per tale motivo, il solo dosaggio degli ANA potrebbe essere (in casi particolari) non sufficiente alla corretta stratificazione dei pazienti a rischio di sviluppare una patologia autoimmune, situazione analizzata ad esempio dagli studi di Koshorek *et al.* riguardanti il confronto degli ANA in soggetti sani e affetti da sclerosi multipla, in cui si è osservato che il solo dosaggio degli ANA non ha alcun significato diagnostico per la distinzione tra i due gruppi (54).

I pazienti sottoposti al dosaggio delle citochine fanno parte della popolazione generale e non sono soggetti già diagnosticati per un preciso disordine autoimmune. Forti di questa condizione sperimentale si è ipotizzato che altre molecole coinvolte nella patogenesi di malattie a carattere autoimmune e infiammatorio potessero svolgere un ruolo di primaria importanza come biomarcatori sensibili di malattia, rendendo possibile una più precisa caratterizzazione della storia clinica dei pazienti con sospetta patologia autoimmune e un'eventuale diagnosi precoce. Nella pletora di molecole coinvolte nella patogenesi di queste malattie, l'analisi si è concentrata su tre fattori principali: IL-6 e TNF- α , il cui ruolo nella patogenesi di diversi disordini autoimmuni come artrite reumatoide, LES, sclerosi sistemica, sindrome di Sjögren, spondilite anchilosante, epatopatie autoimmuni e malattie infiammatorie intestinali è già stato ampiamente dimostrato (28), e NAMPT extracellulare, i cui effetti di citochina infiammatoria sono già noti nelle patologie neoplastiche e metaboliche (20) e sono in corso di caratterizzazione nei casi di malattie autoimmuni e infiammatorie (55). Studi che hanno previsto l'analisi di questi altri marcatori in specifiche condizioni autoimmuni sono stati eseguiti da numerosi gruppi di ricerca, ottenendo però risultati contrastanti: per esempio studi sull'artrite reumatoide hanno dimostrato il ruolo patogenetico di eNAMPT e gli effetti negativi dell'infiammazione da esso indotta sulle cartilagini articolari (56), mentre studi sulle patologie della tiroide non hanno dimostrato alcun nesso causale tra la diagnosi di malattia di Graves e un aumento dei livelli di eNAMPT (57), rendendo necessaria una più precisa caratterizzazione del ruolo di tali molecole nelle patologie autoimmuni. La discordanza nei risultati ottenuti valutando il *setting* infiammatorio limitato a precise condizioni patologiche apre le porte per un'analisi più ampia

condotta in questo studio, fornendo le basi per valutare il potenziale ruolo di eNAMPT, IL-6 e TNF- α come potenziali biomarcatori diagnostici precoci se affiancati alla determinazione degli ANA.

I risultati osservati hanno evidenziato un'elevata concentrazione di tutte e tre le citochine infiammatorie analizzate in entrambi i gruppi in studio ANA-positivi e ANA-negativi. Tale dato si rivela particolarmente interessante perché in uno studio in corso di revisione svolto dal gruppo di lavoro della Professoressa Audrito e Dottoressa Sacchi è stata rivelata la medesima tendenza ma esclusivamente per NAMPT: le concentrazioni della molecola erano elevate sia in soggetti ANA-positivi che in soggetti ANA-negativi ma erano molto inferiori nel gruppo di controllo costituito da donatori sani, suggerendo il coinvolgimento di eNAMPT in processi infiammatori sistemici. La presente analisi riflette lo stesso andamento, suggerendo l'esistenza di una condizione infiammatoria non meglio specificata e comune alla maggior parte dei soggetti in studio. Il ruolo di IL-6, TNF- α ed eNAMPT nelle patologie infiammatorie è stato dimostrato da numerosi studi: analisi di patologie come la steatosi epatica non-alcolica (58), l'enterocolite necrotizzante (59) e l'ischemia cerebrale (60) hanno mostrato un importante aumento dei livelli di citochine circolanti e, di conseguenza, un miglioramento del quadro clinico nei casi di trattamento farmacologico con inibitori di eNAMPT. Allo stesso tempo, l'iperespressione di citochine infiammatorie di varia natura è stata caratterizzata anche in patologie autoimmuni come la gastrite atrofica autoimmune (61). I dati ottenuti dallo studio e le informazioni rinvenute dall'analisi della letteratura scientifica supportano l'ipotesi che l'aumento dei livelli sierici di eNAMPT, IL-6 e TNF- α si verifichi in una fase precoce della disregolazione immunitaria che accompagna la patogenesi e la progressione delle malattie autoimmuni, e che dunque queste citochine possano essere rilevabili nel siero dei pazienti ancora prima della produzione di autoanticorpi e della comparsa dei sintomi patognomici di alcune patologie autoimmuni. Per contro, considerando il fatto che IL-6, TNF- α ed eNAMPT sono molecole infiammatorie coinvolte nell'infiammazione acuta sistemica (7,19), la loro aumentata concentrazione sierica potrebbe non essere direttamente correlata alla presenza di una reazione autoimmunitaria ma da cause di altra natura, come infezioni microbiche. La similarità tra i risultati ottenuti nelle due coorti può essere anche giustificata dal fatto che il test ANA prevede l'analisi di biomarcatori immunologici (gli autoanticorpi) e non di *marker* infiammatori, con un significato incerto relativamente alla definizione di uno stato infiammatorio in atto nonostante le innovative scoperte riguardo il coinvolgimento dell'infiammazione nella patogenesi e nell'evoluzione delle condizioni autoimmuni (2).

Osservazioni sperimentali hanno già dimostrato ampiamente il ruolo di eNAMPT come citochina pro-infiammatoria nell'infiammazione cronica e acuta, con effetti sulle cellule dell'immunità innata (principalmente i macrofagi) nelle quali promuove la secrezione di altre citochine infiammatorie,

comprese IL-6 e TNF- α (62). I risultati ottenuti suggeriscono l'esistenza di una relazione tra il ruolo di queste tre molecole come mediatori infiammatori e un'attivazione patologica del sistema immunitario. Inoltre, l'incremento dei livelli sierici di eNAMPT, IL-6 e TNF- α può indicare uno stato di deregolazione immunitaria non rilevabile attraverso il test di *screening* per gli ANA perché alcuni *pathway* infiammatori potrebbero intervenire precocemente nello sviluppo delle malattie autoimmuni e in maniera dipendente o indipendente dallo sviluppo degli autoanticorpi. Il dosaggio delle citochine pro-infiammatorie coinvolte nella patogenesi dei disordini autoimmuni potrebbe risultare in uno strumento diagnostico di fondamentale importanza sia per la caratterizzazione più approfondita dello stato patologico del paziente, sia per l'esecuzione di una diagnosi precoce e/o più precisa nei casi di individui negativi al test ANA ma con sintomatologia clinica fortemente indicativa di una condizione autoimmune. In questa ottica, l'implementazione della valutazione della concentrazione sierica di eNAMPT, IL-6 e TNF- α nel percorso diagnostico potrebbe fornire una maggiore comprensione dei meccanismi infiammatori e immunitari caratteristici di queste patologie.

Confrontando i livelli sierici di IL-6 ed eNAMPT i risultati hanno riportato l'assenza di una correlazione sia nella popolazione generale e sia nella coorte ANA-negativi, mentre la medesima analisi eseguita esclusivamente nel gruppo ANA-positivi ha dimostrato l'esistenza di una correlazione tra i due parametri. La popolazione ANA-positivi è stata ulteriormente stratificata in due gruppi in base al valore di *cutoff* considerato per la rilevanza clinica dei valori di IL-6 (> 7 pg/mL): un gruppo comprendente gli individui con valori di concentrazione superiore rispetto al valore soglia e un gruppo costituito invece da coloro che presentavano valori inferiori al *cutoff*. Il confronto tra queste due sottopopolazioni rivela l'esistenza di una differenza statisticamente significativa. I risultati ottenuti dall'analisi della popolazione complessiva dimostrano come i livelli di eNAMPT e di IL-6 riscontrati nel siero dei pazienti non sono reciprocamente dipendenti, dal momento che concentrazioni elevate di eNAMPT non sempre sono associate a concentrazioni elevate di IL-6 e viceversa.

Numero campione	eNAMPT (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)
#1 ANA+	24.2227	6.81
#12 ANA+	2.5822	45.1
#3 ANA-	22.0864	1.82
#35 ANA-	7.6215	988.0

Tabella 10: esempi di valori discordanti di IL-6 ed eNAMPT nelle due coorti

L'esistenza di una correlazione positiva, seppur modesta, tra i livelli di eNAMPT e IL-6 nei pazienti del gruppo ANA-positivi è un dato di primaria importanza. I pazienti presentanti livelli di IL-6 superiori al valore soglia di 7 pg/mL, dunque considerati clinicamente rilevanti, si caratterizzano

anche da concentrazione di eNAMPT sieriche drasticamente maggiori rispetto ai soggetti con livelli di IL-6 inferiori al *cutoff*, nonostante la presenza di eccezioni. I dati ottenuti da questa analisi sono giustificabili dal punto di vista biologico dato il dimostrato coinvolgimento di entrambe le citochine in processi infiammatori acuti caratteristici di condizioni patologiche infiammatorie come ischemie (62) e malattie infiammatorie intestinali (IBD) (63). È stato anche dimostrato che la via di segnalazione di eNAMPT stimola direttamente la secrezione di IL-6 e che l'inibizione della sua attività biologica di citochina mediante farmaci di nuova generazione (anticorpi monoclonali come ALT-100 mAb) porta ad una importante riduzione del *milieu* infiammatorio tramite il blocco del *pathway* di segnalazione dedicato, con risultato il miglioramento dei sintomi tipici e della gravità di alcune condizioni infiammatorie e/o autoimmuni (64). Queste considerazioni, eseguite attraverso l'analisi dei dati sperimentali e in linea con la letteratura scientifica più recente, dimostrano come eNAMPT e IL-6 potrebbero essere coinvolti nei principali processi infiammatori acuti che portano alla deregolazione del sistema immunitario e alla perdita della tolleranza immunologica, eventi che stanno alla base della patogenesi delle malattie autoimmuni.

Analizzando invece il rapporto tra TNF- α ed eNAMPT, i risultati non hanno mostrato alcun tipo di correlazione statisticamente significativa nella popolazione generale, nella coorte ANA-positivi né in quella ANA-negativi nonostante la presenza di un *trend* positivo come si evince dalla Figura 37. Anche in questo caso la popolazione ANA-positivi è stata ulteriormente stratificata sulla base del valore soglia (8 pg/mL) in soggetti con concentrazioni di TNF- α superiori al *cutoff* e individui con concentrazioni inferiori alla soglia, che però ha ugualmente dimostrato l'assenza di correlazione tra i parametri. Allo stesso modo della correlazione tra IL-6 ed eNAMPT, anche quella tra TNF- α ed eNAMPT non mostra un andamento di codipendenza nei livelli sierici delle citochine, evidenziato anche in questo frangente dalla presenza di soggetti con concentrazioni molto elevate di eNAMPT a cui corrispondono concentrazioni ridotte di TNF- α e viceversa.

Numero campione	eNAMPT (ng/mL)	TNF- α (pg/mL)
#20 ANA+	33.6015	4.12
#30 ANA+	19.5471	346.0
#18 ANA-	4.6185	42.8
#69 ANA-	35.8347	3.71

Tabella 11: esempi di valori discordanti di TNF- α ed eNAMPT nelle due coorti

I risultati ottenuti dall'analisi di questi due parametri suggeriscono una relazione tra eNAMPT e TNF- α più complessa rispetto a quella osservata tra eNAMPT e IL-6. Come già precisato, TNF- α è coinvolto principalmente nelle fasi iniziali del processo infiammatorio (8) e la deregolazione della

sua secrezione è una delle cause scatenanti della patogenesi di diversi disordini autoimmuni (17). Nonostante il suo ruolo affermato di citochina pro-infiammatoria, in questo caso è possibile che la sua concentrazione nel siero dei pazienti possa non dipendere direttamente dalla secrezione di eNAMPT, ma potrebbe essere influenzata da altri fattori che nel presente studio non sono stati tenuti in considerazione come una differente regolazione biologica tra le due citochine, una diversa cinetica di secrezione durante i processi infiammatori e/o autoimmuni e un maggiore coinvolgimento dell'asse eNAMPT-IL-6 rispetto a quella eNAMPT-TNF- α nella patogenesi delle malattie autoimmuni. Inoltre, come riportato in letteratura, le interazioni tra eNAMPT e TNF- α sono estremamente variabili e fortemente dipendenti dall'assetto sperimentale e dalla malattia considerata: nel caso di una condizione patologica fortemente associata ad uno stato infiammatorio intenso e persistente come il danno da ischemia e riperfusione, nel contesto di un'ischemia cerebrale è stato dimostrato che la secrezione di eNAMPT da parte dei neuroni e la presenza di molecole di NAMPT ricombinante stimolano la produzione di TNF- α gliale in maniera tempo-dipendente e concentrazione-dipendente, dimostrando il ruolo di eNAMPT nell'ischemia cerebrale come stimolante alla secrezione di citochine infiammatorie, principalmente TNF- α (65). In netto contrasto, in condizioni di ischemia renale la secrezione di NAMPT indotta dal farmaco sperimentale SBI797812 (SBI) porta all'attivazione di una via di segnalazione NAMPT-dipendente che riduce la produzione di molecole infiammatorie come TNF- α e IL-6 (66). Nel caso di patologie come la gastrite atrofica autoimmune eNAMPT e TNF- α sembrano invece correlare positivamente data la presenza di elevate concentrazioni di entrambe le citochine a livello della mucosa gastrica (61); il ruolo patogenetico di TNF- α è stato confermato per altre malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide, la cui secrezione sembra essere anche in questo caso stimolata da eNAMPT (67). In contesti non infiammatori, per contro, una maggiore secrezione di eNAMPT sembrerebbe avere un ruolo protettivo verso la produzione di molecole infiammatorie, come analizzato da Oita *et al.*, che hanno dimostrato come una riduzione dell'espressione di eNAMPT si associa ad un'aumentata apoptosi TNF- α -dipendente delle cellule epiteliali polmonari mentre un aumento della produzione di tale citochina protegge le cellule dalla morte programmata indotta da TNF- α (68). La discordanza dei dati riportati in letteratura e i risultati ottenuti dallo studio corrente dimostrano che la correlazione tra eNAMPT e TNF- α dipende in maniera preponderante dal contesto sperimentale nel quale le due citochine vengono valutate. La relazione tra di esse non è lineare e diretta ma dipendente da altre influenze biologiche. Per questo motivo eNAMPT non può essere considerato come un esclusivo induttore di TNF- α : il suo ruolo è più quello di un modulatore, con effetti molto più variegati e dipendenti dal microambiente cellulare/tissutale e dal contesto fisiopatologico.

Una correlazione molto forte si è invece osservata confrontando le due citochine IL-6 e TNF- α in entrambe le popolazioni in studio, con una distribuzione caratterizzata da un valore medio di TNF- α maggiore rispetto a quello di IL-6 in entrambi i gruppi. Questo risultato è plausibile, per il fatto che entrambe le citochine sono marcatori infiammatori prodotti in elevata quantità dalle cellule dell'immunità innata, con la differenza che TNF- α inizia ad essere secreto nella fase più precoce di un'infezione microbica e di un'inflammatione acuta (17), avendo dunque la possibilità di raggiungere concentrazioni più elevate grazie al minor tempo impiegato per l'inizio del suo rilascio. Inoltre, gli elevati livelli di entrambe le citochine sia nella coorte ANA-positivi sia in quella ANA-negativi confermano la presenza di una risposta infiammatoria comune in tutta la popolazione in studio, come già osservato per eNAMPT. Il danno associato all'inflammatione indotta e protratta da IL-6 e TNF- α nelle malattie autoimmuni è stato ampiamente dimostrato in diversi studi, sia riguardanti condizioni patologiche maggiormente prevalenti come artrite reumatoide, LES, sclerosi sistemica, sindrome di Sjögren, spondilite anchilosante, epatiti autoimmuni e malattie infiammatorie intestinali (28,69), nelle quali le due molecole vengono massicciamente secrete dai macrofagi e partecipano al danno tissutale, sia in malattie autoimmuni più rare, come la vitiligine (70,71) e l'abortività ricorrente di tipo autoimmune (72), dove viene riportata anche l'esistenza di una correlazione tra i livelli delle due citochine. Inoltre, a supporto del coinvolgimento di IL-6 e TNF- α nella patogenesi delle malattie autoimmuni, è stato anche osservato che un aumento dei loro livelli sierici può influenzare negativamente l'attività dei linfociti Treg, i principali determinanti del mantenimento dell'omeostasi immunitaria, con risultato una maggiore probabilità di sviluppare un disordine autoimmune (73). La forza della correlazione osservata nello studio in esame permette di ipotizzare che la secrezione di IL-6 e TNF- α è influenzata da meccanismi biologici comuni che hanno effetto indipendentemente dalla condizione di positività al test ANA, supportando l'idea che i parametri di inflammatione sistemica possono essere presenti anche in soggetti non per forza produttori autoanticorpi e che possono essere utilizzati a fine di diagnosi precoce. Considerando inoltre l'effetto immunomodulatorio negativo delle due citochine sui linfociti Treg, alti livelli circolanti di IL-6 e TNF- α potrebbero essere utili non solo come biomarcatori di una malattia autoimmune conclamata in associazione allo *screening* per gli ANA, ma anche per indicare un aumentato rischio di sviluppare patologie autoimmuni in soggetti potenzialmente sani. In una fase più avanzata della malattia, invece, approcci basati sulla stimolazione e sulla riattivazione delle cellule Treg potrebbero rappresentare una strategia terapeutica utile per il trattamento delle patologie che, attualmente, non presentano ancora delle terapie risolutive, per le quali le opzioni terapeutiche sono estremamente limitate, nei casi in cui la terapia con farmaci biologici inibitori di IL-6 e TNF- α non si rivela efficace oppure se il paziente sviluppa resistenza al farmaco.

5. CONCLUSIONI

Lo scopo del lavoro svolto era valutare i livelli di citochine pro-infiammatorie come eNAMPT, IL-6 e TNF- α in pazienti sottoposti al test di *screening* ANA a causa di un sospetto clinico di malattia autoimmune. Il significato di questa analisi risiede nel fatto che il test ANA, nonostante sia il *gold standard* per la stratificazione dei pazienti possibilmente affetti da una patologia autoimmune, è in alcuni casi poco significativo e caratterizzato da soggettività interpretativa. L'integrazione della valutazione di altri parametri, come le citochine infiammatorie sopra citate, potrebbero definire in maniera più chiara la condizione immunologico-infiammatoria del paziente, rendendo più precisa la classificazione degli individui positivi e negativi.

L'osservazione di livelli infiammatori sovrapponibili tra le due popolazioni ANA-positivi e ANA-negativi è di particolare interesse perché suggerisce che l'attività deregolata del sistema immunitario, base dello sviluppo delle malattie autoimmuni, potrebbe essere indipendente dalla produzione di anticorpi e soprattutto che potrebbe verificarsi molto prima della rilevanza strumentale di tali marcatori. Alla luce di questo, i risultati ottenibili dall'implementazione di questi dosaggi aggiuntivi si rivelerebbero uno strumento fondamentale per una più profonda valutazione dei soggetti sottoposti ai test di *screening* per le patologie autoimmuni.

In particolar modo, eNAMPT si è dimostrato il parametro più indicativo tra quelli valutati, sia in merito alle sue elevate concentrazioni sieriche (molto maggiori rispetto a quelle delle altre due citochine) sia relativamente alla sua correlazione con IL-6 nei soggetti ANA-positivi. L'assenza di differenze significative nei livelli di eNAMPT nelle due coorti ANA-positivi e ANA-negativi impedisce il suo utilizzo come biomarcatore per la discriminazione delle due popolazioni. La relazione positiva evidenziata con IL-6, dimostrata anche in letteratura, potrebbe invece rappresentare un punto di partenza per l'implementazione del dosaggio di questi molteplici parametri come indicatore di attivazione precoce e alterata del sistema immunitario utile alla migliore differenziazione dei pazienti positivi e negativi.

La dimostrazione dell'esistenza di una forte correlazione tra IL-6 e TNF- α suggerisce l'esistenza di processi infiammatori sottostanti che stimolano la secrezione di entrambe le citochine in precise condizioni infiammatorie. In aggiunta, il rapporto evidenziato e l'elevata concentrazione media rilevata in entrambe le coorti avvalorano l'ipotesi dell'esistenza di uno stato infiammatorio a prescindere dalla positività autoanticorpale, rendendo IL-6 e TNF- α potenziali biomarcatori per la determinazione di una deregolazione del sistema immunitario, di una malattia autoimmune conclamata e di

un'aumentata suscettibilità allo sviluppo di questi disordini, il tutto associato al dosaggio di eNAMPT e al test di *screening* ANA.

Nell'insieme, queste osservazioni rendono plausibile l'esistenza di un'associazione positiva tra l'incremento di marcatori infiammatori sierici come eNAMPT, IL-6 e TNF- α e la manifestazione di segni e sintomi clinici di malattia autoimmune anche nell'eventualità di una negatività al test ANA. La presenza di elevate concentrazioni di citochine circolanti come marcatori diagnostici, di progressione e di suscettibilità allo sviluppo di alcune specifiche malattie autoimmuni è già stata ipotizzata in altri studi effettuati sul LES (74) e sulla sclerosi multipla (75). L'innovazione introdotta con il presente studio è che questi marcatori infiammatori potrebbero indicare precocemente un quadro fisiopatologico che aumenta il rischio di sviluppare una malattia autoimmune in generale, senza concentrarsi specificatamente su una singola condizione patologica, con un significato fondamentale nello *screening* per la diagnosi di questi disordini.

Nonostante i risultati promettenti, è necessario precisare l'esistenza di diverse limitazioni presenti in questo studio. In primo luogo, l'impossibilità di accesso a informazioni cliniche e di laboratorio complete per ciascun paziente rende più complesso trarre conclusioni relative all'eventuale presenza di patologie già conclamate, terapie in corso e i sospetti clinici che hanno portato alla richiesta dello *screening* per gli ANA da parte del medico curante. Secondariamente, la popolazione in studio si compone di 140 soggetti, un numero relativamente limitato, analizzati per la positività ANA invece di pazienti già diagnosticati per una precisa malattia autoimmune. La popolazione in esame può in realtà essere considerata anche un punto di forza perché, anche se piccola, può essere rappresentativa della popolazione generale dal momento che i soggetti sono stati selezionati a partire da un test di *screening* e non basandosi su una diagnosi preesistente di autoimmunità, permettendo di valutare i parametri analizzati in un gruppo di soggetti più simile alla situazione reale. In ultimo, non è stato possibile eseguire un *follow-up* dei pazienti per definire se i soggetti caratterizzati da un quadro patologico (positività agli ANA ed elevati livelli di eNAMPT, IL-6 e TNF- α) hanno sviluppato una patologia autoimmune.

Ulteriori analisi devono essere eseguite per confermare e validare i risultati ottenuti dal presente studio, valutando gli stessi parametri in popolazioni più numerose oppure in soggetti già affetti da malattie autoimmuni, in questo secondo caso allo scopo di valutare anche l'andamento dei *marker* infiammatori in relazione alla progressione della malattia e all'assunzione di un'eventuale terapia. Per chiarire i meccanismi molecolari alla base della relazione tra eNAMPT, IL-6 e TNF- α e tra le citochine e la condizione di autoimmunità potrebbero rivelarsi interessanti anche studi *in vitro* su modelli animali di malattie autoimmuni.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Pisetsky DS. Pathogenesis of autoimmune disease. *Nat Rev Nephrol.* agosto 2023;19(8):509–24. doi:10.1038/s41581-023-00720-1
2. Szekanecz Z, McInnes IB, Schett G, Szamosi S, Benkő S, Szűcs G. Autoinflammation and autoimmunity across rheumatic and musculoskeletal diseases. *Nat Rev Rheumatol.* ottobre 2021;17(10):585–95. doi:10.1038/s41584-021-00652-9
3. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Sozzani S, Annunziato F. *Immunologia cellulare e molecolare.* 10. ed. Milano: Edra; 2025.
4. Cifuentes M, Verdejo HE, Castro PF, Corvalan AH, Ferreccio C, Quest AFG, et al. Low-Grade Chronic Inflammation: a Shared Mechanism for Chronic Diseases. *Physiology.* 1 gennaio 2025;40(1):4–25. doi:10.1152/physiol.00021.2024
5. Infiammazione. Humanitas [Internet]. [citato 14 marzo 2026]. Disponibile su: <https://www.humanitas.it/enciclopedia/glossario-immunologia/infiammazione-sistema-immunitario/>
6. Roe K. An inflammation classification system using cytokine parameters. *Scand J Immunol.* febbraio 2021;93(2):e12970. doi:10.1111/sji.12970
7. Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *International Immunology.* 1 marzo 2021;33(3):127–48. doi:10.1093/intimm/dxaa078
8. Del Gobbo V. *Immunologia per le Lauree Sanitarie.* IV Edizione. Padova: Piccin - Nuova Libreria; 2013.
9. Sacchi MC, Tamiazzo S, Stobbione P, Agatea L, De Gaspari P, Stecca A, et al. SARS-CoV-2 infection as a trigger of autoimmune response. *Clinical Translational Sci.* maggio 2021;14(3):898–907. doi:10.1111/cts.12953
10. Zong Y, Deng K, Chong WP. Regulation of Treg cells by cytokine signaling and co-stimulatory molecules. *Front Immunol.* 13 maggio 2024;15:1387975. doi:10.3389/fimmu.2024.1387975
11. Manuale MSD, versione per i pazienti [Internet]. [citato 17 marzo 2026]. Immunoterapia per il cancro - Tumore. Disponibile su: <https://www.msmanuals.com/it/casa/tumore/prevenzione-e-trattamento-del-cancro/immunoterapia-per-il-cancro>
12. Kang S, Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. *Immunity.* aprile 2019;50(4):1007–23. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.026
13. Jawa RS, Anillo S, Huntoon K, Baumann H, Kulaylat M. Interleukin-6 in Surgery, Trauma, and Critical Care Part II: Clinical Implications. *J Intensive Care Med.* marzo 2011;26(2):73–87. doi:10.1177/0885066610384188
14. Alhendi A, Naser SA. The dual role of interleukin-6 in Crohn's disease pathophysiology. *Front Immunol.* 1 dicembre 2023;14:1295230. doi:10.3389/fimmu.2023.1295230
15. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery.* febbraio 2000;127(2):117–26. doi:10.1067/msy.2000.101584

16. Idriss HT, Naismith JH. TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 1 agosto 2000;50(3):184–95. doi:10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H
17. Jang D in, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *IJMS*. 8 marzo 2021;22(5):2719. doi:10.3390/ijms22052719
18. Peng A, Li J, Xing J, Yao Y, Niu X, Zhang K. The function of nicotinamide phosphoribosyl transferase (NAMPT) and its role in diseases. *Front Mol Biosci*. 24 ottobre 2024;11:1480617. doi:10.3389/fmolb.2024.1480617
19. Audrito V, Messana VG, Deaglio S. NAMPT and NAPRT: Two Metabolic Enzymes With Key Roles in Inflammation. *Front Oncol*. 19 marzo 2020;10:358. doi:10.3389/fonc.2020.00358
20. Semerena E, Nencioni A, Masternak K. Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase: role in disease pathophysiology and as a biomarker. *Front Immunol*. 17 ottobre 2023;14:1268756. doi:10.3389/fimmu.2023.1268756
21. Yoshida M, Satoh A, Lin JB, Mills KF, Sasaki Y, Rensing N, et al. Extracellular Vesicle-Contained eNAMPT Delays Aging and Extends Lifespan in Mice. *Cell Metabolism*. agosto 2019;30(2):329-342.e5. doi:10.1016/j.cmet.2019.05.015
22. Audrito V, Messana VG, Brandimarte L, Deaglio S. The Extracellular NADome Modulates Immune Responses. *Front Immunol*. 4 agosto 2021;12:704779. doi:10.3389/fimmu.2021.704779
23. Colombo G, Clemente N, Zito A, Bracci C, Colombo FS, Sangaletti S, et al. Neutralization of extracellular NAMPT (nicotinamide phosphoribosyltransferase) ameliorates experimental murine colitis. *J Mol Med*. aprile 2020;98(4):595–612. doi:10.1007/s00109-020-01892-0
24. Wu J, Han K, Sack MN. Targeting NAD⁺ Metabolism to Modulate Autoimmunity and Inflammation. *The Journal of Immunology*. 1 aprile 2024;212(7):1043–50. doi:10.4049/jimmunol.2300693
25. Sacchi MC. Il Ruolo di un Laboratorio Ospedaliero nella diagnostica delle Malattie Autoimmuni [Presentazione Power Point]. Presentazione Power Point presentato al. ottobre 2024; Università degli Studi del Piemonte Orientale (UniUPO).
26. Kumar M, Yip L, Wang F, Marty SE, Fathman CG. Autoimmune disease: genetic susceptibility, environmental triggers, and immune dysregulation. Where can we develop therapies? *Front Immunol*. 7 agosto 2025;16:1626082. doi:10.3389/fimmu.2025.1626082
27. Treccani [Internet]. [citato 14 marzo 2026]. Anergia - Significato ed etimologia - Vocabolario. Disponibile su: <https://www.treccani.it/vocabolario/anergia/>
28. Xiang Y, Zhang M, Jiang D, Su Q, Shi J. The role of inflammation in autoimmune disease: a therapeutic target. *Front Immunol*. 4 ottobre 2023;14:1267091. doi:10.3389/fimmu.2023.1267091
29. Bizzaro N, Tonutti E, Tozzoli R, Villalta D. Il laboratorio nelle malattie autoimmuni d'organo. Nuova ed. Bologna: Esculapio; 2019.
30. Tozzoli, Renato, Bizzaro, Nicola, Villalta, Danilo, Tonutti, Elio. Il laboratorio nelle malattie reumatiche autoimmuni. Società Editrice Esculapio; 2020.

31. Betterle C. Le Malattie Autoimmuni. Prima Edizione. Padova: Piccin - Nuova Libreria; 2000.
32. Miller FW. The increasing prevalence of autoimmunity and autoimmune diseases: an urgent call to action for improved understanding, diagnosis, treatment, and prevention. *Current Opinion in Immunology*. febbraio 2023;80:102266. doi:10.1016/j.coi.2022.102266
33. Andrade LEC, Klotz W, Herold M, Musset L, Damoiseaux J, Infantino M, 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. *Autoimmunity Reviews*. settembre 2024;23(9):103608. doi:10.1016/j.autrev.2024.103608
34. Chan EKL, Andrade LEC. <https://www.anapatterns.org/> [Sito Web]. 2015.
35. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, et al. Guidelines for the Laboratory Use of Autoantibody Tests in the Diagnosis and Monitoring of Autoimmune Rheumatic Diseases. *Am J Clin Pathol*. febbraio 2002;117(2):316–24. doi:10.1309/Y5VF-C3DM-L8XV-U053
36. Smurra R, Chiericato S. Malattie autoimmuni in versione integrata [Tesi di Master di I Livello in Psiconeuroendocrinoimmunologia]. Università degli Studi di Torino; 2017.
37. Silver JS, Hunter CA. gp130 at the nexus of inflammation, autoimmunity, and cancer. *Journal of Leukocyte Biology*. 7 luglio 2010;88(6):1145–56. doi:10.1189/jlb.0410217
38. Jones BE, Maerz MD, Buckner JH. IL-6: a cytokine at the crossroads of autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*. dicembre 2018;55:9–14. doi:10.1016/j.coi.2018.09.002
39. Medical System. <http://www.medicalsystems.it/sistemi/maglumi-x3/>. MAGLUMI X3.
40. Snibe Diagnostic. https://www.snibe.com/en/product/CLIA_analyzer/43.html. CLIA Analyzer Maglumi.
41. EFLM Preanalytical Conference. <https://www.eflmpreanalytical.org/wp-content/uploads/2025/12/MAGLUMI-X-serie.pdf>. Principio di funzionamento Maglumi.
42. Snibe Diagnostic; Shenzhen New Industries Biomedical Engineering CO., Ltd. Scheda tecnica MAGLUMI X3.
43. Snibe Diagnostic. MAGLUMI IL-6 (CLIA) [Scheda tecnica] [Internet]. 2022. Disponibile su: file:///C:/Users/user/Downloads/IFU_IL-6+80102513055.PDF
44. Snibe Diagnostic. MAGLUMI TNF- α (CLIA) [Scheda tecnica] [Internet]. 2023. Disponibile su: <https://it.scribd.com/document/782716390/178-TNF-%CE%B1-IFU-en-EU-IVDD-V2-3>
45. AdipoGen Life Sciences. Nampt (Visfatin/PBEF) (human) ELISA Kit [Scheda tecnica; AG-45A-0006YEK-KI01] [Internet]. 2023. Disponibile su: <https://adipogen.com/catalogsearch/result/?q=+Nampt+%28Visfatin%2FPBEF%29+%28human%29>
46. Audrito Valentina. Biochimica Applicata [Presentazione Power Point]. Presentazione Power Point presentato al. marzo 2025; Università degli Studi del Piemonte Orientale (UniUPO).

47. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG. UNIQO 160 [Internet]. Disponibile su: <https://www.euroimmun.it/prodotti/automazione/ifa/uniqo-160/>
48. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG. ANA diagnostics using indirect immunofluorescence [Internet]. Disponibile su: https://www.euroimmun.com/documents/Indications/Autoimmunity/Rheumatology/ANA/FA_1510_I_UK_B.pdf
49. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG. IFA: HEp-20-10 - Istruzioni per il Test in Immunofluorescenza Indiretta [Scheda tecnica] [Internet]. 2021. Disponibile su: <https://www.euroimmun.it/>
50. Il test t - Introduction to Statistics [Internet]. Disponibile su: <https://www.jmp.com/it/statistics-knowledge-portal/t-test>
51. Pozzolo Paola. Il Wilcoxon Mann Whitney test spiegato semplice [Internet]. Disponibile su: <https://paolapozzolo.it/wilcoxon-mann-whitney-test/>
52. ANOVA a una via - Introduction to Statistics [Internet]. Disponibile su: <https://www.jmp.com/it/statistics-knowledge-portal/one-way-anova>
53. Abel G, Ansari MQ, Snyder MR, Tebo AE, Wener MH, Naides SJ. Historical Perspective on Antinuclear Antibody Testing. *J Rheumatol.* maggio 2025;52(5):412–9. doi:10.3899/jrheum.2023-1121
54. Koshorek J, Hu C, Wang Y, Grkovski R, Lin D, Fitzgerald K, et al. Relevance of antinuclear antibody in diagnosis and characteristics of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders.* luglio 2024;87:105639. doi:10.1016/j.msard.2024.105639
55. Meier FMP, Frommer KW, Peters MA, Brentano F, Lefèvre S, Schröder D, et al. Visfatin/Pre-B-cell Colony-enhancing Factor (PBEF), a Proinflammatory and Cell Motility-changing Factor in Rheumatoid Arthritis. *Journal of Biological Chemistry.* agosto 2012;287(34):28378–85. doi:10.1074/jbc.M111.312884
56. Lei M, Tao MQ, Wu YJ, Xu L, Yang Z, Li Y, et al. Metabolic Enzyme Triosephosphate Isomerase 1 and Nicotinamide Phosphoribosyltransferase, Two Independent Inflammatory Indicators in Rheumatoid Arthritis: Evidences From Collagen-Induced Arthritis and Clinical Samples. *Front Immunol.* 17 gennaio 2022;12:795626. doi:10.3389/fimmu.2021.795626
57. Sawicka-Gutaj N, Andrusiewicz M, Czarnywojtek A, Waligórska-Stachura J, Biczysko M, Skrobisz J, et al. Changes of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Expressions in Thyroid Glands of Patients with Different Thyroid Pathologies. *BioMed Research International.* 2018;2018:1–6. doi:10.1155/2018/1316390
58. Sun BL, Sun X, Kempf CL, Song JH, Casanova NG, Camp SM, et al. Involvement of ENAMPT / TLR4 inflammatory signaling in progression of non-alcoholic fatty liver disease, steatohepatitis, and fibrosis. *The FASEB Journal.* marzo 2023;37(3):e22825. doi:10.1096/fj.202201972RR
59. Halpern MD, Gupta A, Zaghoul N, Thulasigam S, Calton CM, Camp SM, et al. Extracellular Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Is a Therapeutic Target in Experimental Necrotizing Enterocolitis. *Biomedicines.* 28 aprile 2024;12(5):970. doi:10.3390/biomedicines12050970

60. Chen CX, Huang J, Tu GQ, Lu JT, Xie X, Zhao B, et al. NAMPT inhibitor protects ischemic neuronal injury in rat brain via anti-neuroinflammation. *Neuroscience*. luglio 2017;356:193–206. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.05.022
61. Lenti MV, Facciotti F, Miceli E, Vanoli A, Fornasa G, Lahner E, et al. Mucosal Overexpression of Thymic Stromal Lymphopoietin and Proinflammatory Cytokines in Patients With Autoimmune Atrophic Gastritis. *Clin Transl Gastroenterol*. luglio 2022;13(7):e00510. doi:10.14309/ctg.0000000000000510
62. Suzuki Y, Otsuka T, Takahashi Y, Maruyama S, Annenkov A, Kanda Y, et al. CD38 ligation in sepsis promotes nicotinamide phosphoribosyltransferase-mediated IL-6 production in kidney stromal cells. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 30 giugno 2025;40(7):1310–21. doi:10.1093/ndt/gfae269
63. Colombo G, Caviglia GP, Ravera A, Tribocco E, Frara S, Rosso C, et al. NAMPT and NAPRT serum levels predict response to anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease. *Front Med*. 1 febbraio 2023;10:1116862. doi:10.3389/fmed.2023.1116862
64. Tumurkhuu G, Casanova NG, Kempf CL, Ercan Laguna D, Camp SM, Dagvadorj J, et al. eNAMPT/TLR4 inflammatory cascade activation is a key contributor to SLE Lung vasculitis and alveolar hemorrhage. *Journal of Translational Autoimmunity*. 2023;6:100181. doi:10.1016/j.jtauto.2022.100181
65. Zhao B, Zhang M, Han X, Zhang XY, Xing Q, Dong X, et al. Cerebral Ischemia Is Exacerbated by Extracellular Nicotinamide Phosphoribosyltransferase via a Non-Enzymatic Mechanism. *Mongin AA, curatore. PLoS ONE*. 31 dicembre 2013;8(12):e85403. doi:10.1371/journal.pone.0085403
66. Elmorsy EA, Khodeir MM, Kamal MM, El-Sayed M, Alharbi MS, Alsaykhan H, et al. Activation of nicotinamide phosphoribosyltransferase protects against unilateral renal ischemia-reperfusion injury via the NAD⁺/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway and modulation of NF κ B/TNF- α /IL-6. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. novembre 2025;214:107302. doi:10.1016/j.ejps.2025.107302
67. Polyakova YV, Zavodovsky BV, Sivordova LE, Akhverdyan YR, Zborovskaya IA. Visfatin and Rheumatoid Arthritis: Pathogenetic Implications and Clinical Utility. *CRR*. 22 settembre 2020;16(3):224–39. doi:10.2174/1573397115666190409112621
68. Oita RC, Camp SM, Ma W, Ceco E, Harbeck M, Singleton P, et al. Novel Mechanism for Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Inhibition of TNF- α -mediated Apoptosis in Human Lung Endothelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1 luglio 2018;59(1):36–44. doi:10.1165/rcmb.2017-0155OC
69. Mrđa J, Tadić-Latinović L, Božić Majstorović L, Mrđa V, Mirjanić-Azarić B, Ovčina I, et al. Association of TNF- α and IL-6 Concentrations with Depression in Patients with Rheumatoid Arthritis. *CIMB*. 5 giugno 2025;47(6):419. doi:10.3390/cimb47060419
70. De A, Choudhary N, Sil A, Sarda A, Hasanoor Raja AH. A Cross-Sectional Study of the Levels of Cytokines IL-6, TNF- α , and IFN- γ in Blood and Skin (Lesional and Uninvolved) of Vitiligo Patients and their Possible Role as Biomarkers. *Indian Journal of Dermatology*. gennaio 2023;68(1):67–72. doi:10.4103/ijd.ijd_27_22

71. Karagün E, Baysak S. Levels of TNF- α , IL-6, IL-17, IL-37 cytokines in patients with active vitiligo. *The Aging Male*. 4 dicembre 2020;23(5):1487–92. doi:10.1080/13685538.2020.1806814
72. Hua F, Li CH, Wang H, Xu HG. Relationship between expression of COX-2, TNF- α , IL-6 and autoimmune-type recurrent miscarriage. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. dicembre 2013;6(12):990–4. doi:10.1016/S1995-7645(13)60178-9
73. Zong Y, Deng K, Chong WP. Regulation of Treg cells by cytokine signaling and co-stimulatory molecules. *Front Immunol*. 13 maggio 2024;15:1387975. doi:10.3389/fimmu.2024.1387975
74. Moreno-Torres V, Castejón R, Martínez-Urbistondo M, Gutiérrez-Rojas Á, Vázquez-Comendador J, Tutor P, et al. Serum cytokines to predict systemic lupus erythematosus clinical and serological activity. *Clinical Translational Sci*. luglio 2022;15(7):1676–86. doi:10.1111/cts.13283
75. Emamgholipour S, Eshaghi SM, Hossein-nezhad A, Mirzaei K, Maghbooli Z, Sahraian MA. Correction: Adipocytokine Profile, Cytokine Levels and Foxp3 Expression in Multiple Sclerosis: a Possible Link to Susceptibility and Clinical Course of Disease. Nataf S, curatore. *PLoS ONE*. 6 gennaio 2014;9(1). doi:10.1371/annotation/8fc7e49e-2790-4cfa-900c-2a1e319d61b8