

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN  
MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE  
*CURRICULUM IN SCIENZE MEDICHE TRASLAZIONALI*

**XXXIII Ciclo**  
*(Anni 2018-2021)*

**Coordinatore: Prof. Francesco Beguinot**

**TESI DI DOTTORATO**

**MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEI RECETTORI PER  
L'ADIPONECTINA IN PAZIENTI CON IMMUNODEFICIENZA  
COMUNE VARIABILE E CORRELAZIONE CON LA TERAPIA  
SOSTITUTIVA CON IMMUNOGLOBULINE**

TUTOR/RELATORE

**Chiar.mo**  
**Prof. Giuseppe Spadaro**

CANDIDATO/A

**Dott. Antonio Pecoraro**

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>pag. 3</b>
- <i>Immunodeficienza comune variabile</i> .....	<i>pag. 3</i>
- <i>Il tessuto adiposo nella regolazione del sistema immunitario: il ruolo dell'adiponectina</i> .....	<i>pag. 10</i>
- <i>I livelli di adiponectina totale e degli oligomeri HMW sono ridotti nei pazienti con COVID</i> .....	<i>pag. 14</i>
- <i>Razionale ed obiettivi dello studio</i> .....	<i>pag. 16</i>
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>pag. 18</b>
- <i>Reclutamento dei soggetti</i> .....	<i>pag. 18</i>
- <i>Valutazioni biochimiche ed antropometriche</i> .....	<i>pag. 20</i>
- <i>Misurazione di adiponectina e leptina</i> .....	<i>pag. 20</i>
- <i>Valutazione dell'espressione dei recettori per l'Adiponectina sulla superficie di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) mediante citofluorimetria a flusso</i> .....	<i>pag. 21</i>
- <i>Misurazione della concentrazione di citochine</i> .....	<i>pag. 22</i>
- <i>Analisi statistica</i> .....	<i>pag. 22</i>

**RISULTATI**.....pag. 23

- *Caratteristiche biochimiche ed antropometriche*

*dei pazienti con CVID*.....pag. 23

- *Concentrazioni di leptina nei pazienti con CVID*.....pag. 23

- *Espressione di AdipoR1, AdipoR2 e T-caderina sulla superficie*

*dei PBMCs*.....pag. 24

- *Pattern di produzione di citochine in pazienti con CVID*

*in terapia di mantenimento*.....pag. 26

**DISCUSSIONE**..... .pag. 27

**BIBLIOGRAFIA**.....pag. 34

**TABELLE E FIGURE**.....pag. 44

## ***INTRODUZIONE***

### ***Immunodeficienza comune variabile***

Le immunodeficienze primitive sono un eterogeneo gruppo di patologie genetiche caratterizzate da una alterazione di uno o più componenti molecolari o cellulari del sistema immunitario, che determinano un'aumentata predisposizione allo sviluppo di infezioni di varia natura e manifestazioni infiammatorie, autoimmuni e neoplastiche [1]. L'immunodeficienza comune variabile (CVID), con una prevalenza tra 1:10000 e 1:50000 nelle varie casistiche, è la più frequente immunodeficienza primitiva clinicamente sintomatica dell'età adulta. Il deficit selettivo di IgA, infatti, presenta una prevalenza globale superiore (circa 1:700 individui) ma decorre nella maggioranza dei casi in maniera asintomatica. La CVID è caratterizzata dalla riduzione delle immunoglobuline sieriche (IgG, IgA e talvolta IgM) e da una ridotta o assente produzione anticorpale in risposta ai patogeni [2]. A differenza di altre immunodeficienze, solo nel 2-10% dei casi di CVID è possibile riscontrare una causa genetica sicuramente responsabile della patologia (forme monogeniche). Molte di queste forme sono recentemente emerse, grazie all'impiego di innovative tecniche di diagnostica molecolare (quali Next Generation Sequencing o Whole Exome Sequencing). I geni responsabili di forme monogeniche di CVID comprendono: LRBA, CTLA4, PRKCD, ICOS, NFKB1, NFKB2, PIK3CD, PIK3R1, TNFSF12 (TWEAK), CD19, CD81, CR2 (CD21), MS4A1 (CD20), TNFRSF7 (CD27), IL21,

IL21R, PLCG2, VAV1, RAC2, BLK, IKZF1 (IKAROS). Nei restanti casi (90-98%) l'ereditarietà è verosimilmente poligenica, sebbene differenti polimorfismi o mutazioni in vari geni siano stati ampiamente descritti. Tali geni sono attualmente considerati come geni predisponenti, ovvero geni i cui polimorfismi favoriscono l'insorgenza della patologia in presenza di non ben specificati background genetici e/o ambientali. Sono inclusi in questa categoria: TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF-R), MSH2, MSH5, MLH1, RAD50, HLA DQ/DR [3]. In accordo con questa eterogeneità genetica, anche le alterazioni immunologiche riscontrate nei pazienti con CVID sono estremamente variegata. La perdita parziale o totale delle funzioni svolte dal linfocita B è la caratteristica principale della CVID. Il deficit B-linfocitario può essere sia intrinseco, ovvero legato ad un difetto nella maturazione e differenziazione B-cellulare, sia secondario ad un'insufficiente cooperazione con altre cellule deputate al processo di risposta anticorpale (ad es. linfociti T). Sulla base della caratterizzazione delle sottopopolazioni B-linfocitarie mediante citofluorimetria a flusso, è possibile individuare alterazioni numeriche di alcune specifiche popolazioni B-linfocitarie, alcune delle quali tipiche della CVID. Quest'evenienza è di particolare interesse se si considera che alcune alterazioni di specifiche sottopopolazioni B-linfocitarie correlano con determinate manifestazioni cliniche della patologia. Nella fattispecie, una riduzione dei linfociti B "class-switched" (cellule CD27+IgG+ - linfociti B della memoria) è la più frequente alterazione cellulare in pazienti con CVID e correla con la presenza di splenomegalia. In maniera analoga un'espansione di linfociti B "transitional" (cellule CD38++IgM<sup>high</sup>) ed una riduzione dei plasmoblasti (cellule

CD38+++IgM-) sono associate con la presenza di linfadenopatia polidistrettuale e citopenie autoimmuni, rispettivamente [4]. Sebbene la CVID sia per definizione un'immunodeficienza dell'immunità umorale, sono state descritte anche numerose alterazioni dell'immunità cellulare quali una riduzione di linfociti T CD4+ naïve, un'alterata proliferazione, attivazione e secrezione di citochine T-linfocitarie (IL2, IFN- $\gamma$  e IL-10), ed una riduzione dei linfociti natural killer (NK). In particolare, è stato dimostrato che il grado di riduzione delle cellule NK correla con la presenza dei più severi fenotipi clinici (ad es. neoplasie, enteropatia, autoimmunità) e con una peggiore prognosi *quoad vitam* [5]. Altro aspetto caratteristico della CVID è uno stato di attivazione cronica del sistema immunitario, ed in particolare di cellule della linea monocito-macrofagica. Nella fattispecie, Barbosa *et al.* hanno dimostrato, in pazienti con CVID, un significativo incremento dei livelli sierici di CD14 solubile ed un'espansione di monociti attivati (CD14<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>) che correlavano con marcatori di attivazione B e T linfocitaria [6]. In maniera analoga, Hel *et al.* hanno dimostrato un'alterazione del profilo di secrezione citochinica dei pazienti con CVID, concorde con un'attivazione cellulare monocito-macrofagica. Nella fattispecie, venivano osservati un incremento dei livelli sierici di CXCL-10/IP-10, antagonista del recettore di IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12 (p40), CCL-2/MCP-1, G-CSF, e CCL-11/eotassina ed una riduzione della secrezione di citochine prodotte da cellule T helper CD4+ di tipo Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2), Th2 (IL-9, IL-13), e Th17 (IL-17) [7, 8]. In accordo con la notevole eterogeneità genetica ed immunologica, i pazienti con CVID possono presentare un'ampia gamma di manifestazioni cliniche che includono: infezioni batteriche

ricorrenti o severe prevalentemente del tratto respiratorio e gastrointestinale, manifestazioni autoimmuni (citopenie autoimmuni, vitiligine, tiroidite autoimmune, lupus eritematoso sistemico, artrite reumatoide, rettocolite ulcerosa, Morbo di Crohn), manifestazioni infiammatorie da “disregolazione” immunitaria (granulomatosi coinvolgente vari organi, polmonite interstiziale linfocitaria, linfadenopatia polidistrettuale, splenomegalia, epatomegalia) e neoplasie (prevalentemente malattie linfoproliferative ed adenocarcinomi del tratto gastrointestinale). L’estrema variabilità delle manifestazioni cliniche presentate dai pazienti con CVID ha condotto vari gruppi di ricerca a definire dei fenotipi clinici, non mutuamente esclusivi, in cui raggruppare pazienti con manifestazioni cliniche che presentassero analoghe patogenesi, al fine di facilitarne la stratificazione prognostica. La più autorevole classificazione in fenotipi clinici redatta da Chapel *et al.* nel 2008, e aggiornata nel 2012, prevede: 1- manifestazioni esclusivamente infettive; 2- citopenie autoimmuni (trombocitopenia autoimmune, anemia emolitica autoimmune e neutropenia autoimmune); 3- linfoproliferazione policlonale (granulomi, polmonite linfocitaria interstiziale, linfadenopatia persistente, splenomegalia); enteropatia [9, 10]. La pietra miliare del trattamento farmacologico della CVID, così come di tutte le immunodeficienze dell’immunità umorale, è la terapia sostitutiva con immunoglobuline umane polivalenti. Numerosi studi hanno infatti dimostrato una notevole riduzione degli episodi infettivi ed un miglioramento della prognosi a lungo termine nei pazienti con CVID in seguito all’inizio della terapia sostitutiva [11]. Tuttavia, a dispetto del notevole successo nel trattamento e nella prevenzione delle manifestazioni infettive, la

terapia con immunoglobuline non ha alcuna efficacia nel trattamento delle complicanze non infettive che sono progressivamente divenute la principale causa di mortalità nei pazienti con CVID [12]. Nonostante un grave episodio infettivo (ad es. una polmonite o una sepsi) può essere la manifestazione clinica di esordio della CVID, l'esordio della patologia è più frequentemente subdolo e poco eclatante, soprattutto nel caso in cui le manifestazioni di esordio siano di natura non infettiva. La presentazione clinica proteiforme della CVID e la concezione scorretta che le immunodeficienze siano una patologia tipica dell'età infantile concorrono all'instaurarsi di un notevole ritardo diagnostico (mediamente di 6-7 anni nelle varie casistiche europee). Il ritardo diagnostico, ed il conseguente ritardo nell'inizio della terapia e del management specialistico, determina un notevole peggioramento prognostico in alcuni sottogruppi di pazienti con CVID. Nella fattispecie, il nostro gruppo di ricerca ha recentemente dimostrato che tale evenienza è particolarmente rilevante per i pazienti con CVID e deficit assoluto di IgA [13]. In questo scenario, la maggior parte degli sforzi della comunità scientifica sono volti all'identificazione di marcatori biologici che consentano di ridurre il ritardo diagnostico e di effettuare stime della prognosi a lungo termine dei pazienti con CVID. In quest'ambito, una promettente strategia è la correlazione tra marcatori biologici di attivazione del sistema immunitario e specifici fenotipi clinici della patologia. In questa ottica, vari studi hanno valutato le relazioni biologiche tra il sistema immunitario ed il tessuto adiposo. Quest'ultimo, considerato erroneamente per lungo tempo come un tessuto di "deposito" biologicamente inerte, è



emerso negli ultimi anni come un vero e proprio organo endocrino capace di influenzare numerosi processi metabolici ed immunologici.

## ***Il tessuto adiposo nella regolazione del sistema immunitario: il ruolo dell'adiponectina***

Il tessuto adiposo svolge un ruolo cruciale nella regolazione dell'omeostasi metabolica [14]. Tuttavia, mentre il suo ruolo come fonte di energia era stato già evidenziato oltre 50 anni orsono, la dimostrazione dell'esistenza di regolatori circolanti derivati dal tessuto adiposo che esercitassero un'azione centrale sull'assunzione di cibo e sul dispendio energetico, è un'acquisizione molto più recente [15]. Questo tipo di attività biologica è stata per la prima volta descritta per il peptide di derivazione adipocitaria leptina. Successivamente un'ampia serie di molecole, definite come adipochine, è stata identificata, chiarendo in maggiore dettaglio le funzioni biologiche svolte dal tessuto adiposo [16]. Tra queste, l'adiponectina è una delle maggiormente studiate. L'adiponectina è un'adipochina del peso molecolare di 30 kDa, secreta esclusivamente dal tessuto adiposo, che esercita un'azione anti-diabetica agendo come insulino-sensibilizzante endogeno. L'espressione dell'adiponectina nell'uomo è down-regolata in corso di obesità [17]. E' riscontrabile negli adipociti e nel plasma in tre principali forme molecolari: trimerica, esamerica ed octadecamerica (LMW, MMW e HMW). L'adiponectina ad alto peso molecolare (HMW) esercita i principali effetti biologici, mentre gli altri oligomeri modulano in maniera differente i vari pathway di *signaling* intracellulare [18]. L'adiponectina esercita molteplici proprietà protettive anti-infiammatorie. Svolge, inoltre, un rilevante ruolo in alcune risposte immunitarie quali l'infiammazione, fungendo da mediatore patogenetico critico dello sviluppo dell'insulino-resistenza indotta dall'obesità [19]. Tuttavia, se essa agisca da fattore pro-

o anti-infiammatorio è ancora una questione particolarmente dibattuta. Vari studi hanno rilevato che l'adiponectina agisce come mediatore anti-infiammatorio nel corso della progressione di varie malattie metaboliche [20, 21]. In maniera analoga, la down-regolazione dell'adiponectina risulta associata all'incremento di vari marcatori infiammatori e a stati di disfunzione metabolica. Al contrario, altri studi evidenziano che l'adiponectina promuove le risposte infiammatorie mediante sia l'attivazione del pathway di NF- $\kappa$ B sia la secrezione di citochine pro-infiammatorie quali l'IL-1 e l'IL-6. Il meccanismo maggiormente descritto mediante il quale l'adiponectina determina effetti antinfiammatori, è la regolazione di proliferazione, plasticità e polarizzazione di macrofagi M1 ed M2. Nella fattispecie sopprime l'attivazione dei macrofagi M1 e promuove la proliferazione dei macrofagi M2 [22-24]. Ne deriva una riduzione dei livelli di TNF- $\alpha$ , MCP-1 ed IL-6 (marcatori tipici dell'attivazione dei macrofagi M1) ed un incremento di citochine antinfiammatorie quali IL-10 e MGL-1 (marcatori tipici dei macrofagi M2) [25]. Tali azioni vengono esercitate dall'adiponectina mediante il legame con specifici recettori, AdipoR1 ed AdipoR2, espressi sulla superficie dei macrofagi così come di numerose altre cellule immunitarie (ad es. linfociti B e cellule NK). AdipoR1 ed AdipoR2 svolgono ruoli rilevanti nella regolazione di infiammazione, metabolismo lipidico e glucidico e stress ossidativo [26]. Tali azioni sono state dimostrate sia *in vivo* che *in vitro*. Inoltre anche la T-caderina, una glicoproteina della superficie cellulare, è efficiente nel legare l'adiponectina e mediarne il *signaling*. In aggiunta alla preminente azione esercitata sulla proliferazione, plasticità e polarizzazione delle cellule monocito-macrofagiche,

l'adiponectina svolge importanti effetti antinfiammatori anche su numerose altre cellule del sistema immunitario [27]. Nella fattispecie, tali effetti possono essere così sintetizzati: inibisce la secrezione di IFN $\gamma$  da parte dei linfociti NK, inibisce il reclutamento dei granulociti eosinofili e l'attivazione dei granulociti neutrofilo, inibisce la secrezione di IL-5 ed IL13 da parte delle cellule linfoidi innate e blocca l'attivazione delle cellule T helper Th1 e Th17 ad opera delle cellule dendritiche [28-30]. In maniera concorde con questi riscontri di ordine biologico, i livelli di adiponectina sono diminuiti in un gran numero di malattie metaboliche, come l'obesità, il diabete mellito di tipo II e la OSAS (sindrome delle apnee ostruttive nel sonno). Negli individui affetti da queste patologie, l'espressione dell'adiponectina mostra frequentemente una regolazione inversa con marcatori infiammatori quali il TNF- $\alpha$ , l'IL-6 e la proteina C reattiva (PCR) [31-36]. Al contrario, ed in maniera sorprendente, superiori livelli di espressione di adiponectina sono stati riscontrati in patologie immuno-mediate quali l'artrite reumatoide, il lupus eritematoso sistemico e la broncopneumopatia cronica ostruttiva, a dispetto del loro stato infiammatorio. Le cause di questa up-regolazione in tali condizioni cliniche non sono state ancora chiarite [37-40]. Una plausibile ipotesi è che in tali patologie l'incremento dell'adiponectina rappresenti una sorta di tentativo compensatorio dello stato infiammatorio sistemico. Il ruolo del tessuto adiposo nella regolazione dell'infiammazione è stato recentemente valutato, tra le varie patologie, anche nell'immunodeficienza comune variabile [41, 42]. In particolare, uno studio ha valutato gli effetti dell'adipochina leptina su cellule mononucleate isolate dal sangue periferico di pazienti affetti da COVID [39]. Tale studio evidenziava un incremento della

risposta proliferativa dei linfociti ai mitogeni ed una riduzione dell'apoptosi mediata dall'attivazione di queste cellule, suggerendo, di conseguenza, un possibile ruolo patogenetico delle adipochine nei difetti cellulari osservati nella COVID.

## ***I livelli di adiponectina totale e degli oligomeri HMW sono ridotti nei pazienti con CVID***

Come discusso precedentemente, la CVID è una patologia caratterizzata da un'attivazione cronica del sistema immunitario e nella fattispecie della linea monocito-macrofagica, come dimostrato dalla disregolazione di una serie di citochine tipicamente coinvolte nell'attivazione monocito-macrofagica (TNF- $\alpha$ , IL-1 etc.) [6-8]. Alla luce di queste considerazioni, abbiamo deciso di analizzare, in un primo studio, i livelli di espressione e lo stato di oligomerizzazione dell'adiponectina in un'ampia coorte di pazienti affetti da CVID, confrontandoli con controlli sani, al fine di valutare l'eventuale ruolo di questa adipochina come marcatore di severità e/o prognosi della patologia [43]. I livelli di espressione di adiponectina sono stati quindi correlati alla presenza di determinati fenotipi clinici della CVID, al fine di valutare un eventuale coinvolgimento dell'adiponectina nella patogenesi di specifiche manifestazioni cliniche della patologia. Per valutare invece gli effetti immunomodulanti della terapia sostitutiva con immunoglobuline, si è deciso di analizzare l'espressione dell'adiponectina in una coorte di pazienti naïve (ovvero pazienti che hanno ricevuto la diagnosi di CVID ma non sono mai stati trattati) al momento della diagnosi e dopo la prima terapia sostitutiva con immunoglobuline. Per determinare infine se gli effetti esercitati dalle immunoglobuline sull'espressione di adiponectina si verificassero esclusivamente nella CVID o anche in altre condizioni cliniche, abbiamo deciso di valutare l'espressione dell'adiponectina prima e dopo la terapia con immunoglobuline in una ristretta coorte di pazienti affetti da polineuropatia demielinizzante

infiammatoria cronica (CIDP). Abbiamo riscontrato che i livelli di Adiponectina totale e degli oligomeri HMW erano ridotti nei pazienti affetti da CVID rispetto ai controlli sani, mentre non vi erano differenze nei pazienti affetti da CIDP. Ridotti livelli sierici di Adiponectina correlavano con la presenza di bassi livelli sierici di IgA alla diagnosi e con la presenza di due fenotipi clinici della CVID, la citopenia autoimmune e l'enteropatia. Condizioni caratterizzate da una peggiore prognosi a lungo termine e attivazione cronica del sistema immunitario. Inoltre, un'analisi mediante Receiver operating characteristic (ROC) curve dimostrava che tale modulazione dei livelli sierici di adiponectina era specifica per i pazienti con diagnosi di CVID. Infine, i livelli sierici di adiponectina totale e degli oligomeri HMW sono aumentati in maniera rapida e significativa dopo la prima infusione di immunoglobuline umane normali in 8 pazienti che non avevano mai ricevuto terapia sostitutiva (*treatment naïve*) ma non nei 5 pazienti affetti da CIDP, suggerendo, di conseguenza, che la somministrazione di immunoglobuline di per se non sarebbe sufficiente a determinare l'incremento dei livelli sierici di adiponectina, se non in presenza del background cellulare e molecolare proprio della CVID. Nel complesso, i dati derivanti da questo primo studio indicavano che i livelli sierici di adiponectina correlavano in maniera specifica con la disregolazione immunitaria tipica della CVID, suggerendo un possibile impiego di tale molecola come biomarcatore di attività di malattia nella CVID.

### ***Razionale ed obiettivi dello studio***

Dopo aver dimostrato la riduzione dei livelli sierici di Adiponectina totale e degli oligomeri HMW nei pazienti affetti da CVID, nonché gli effetti esercitati dalla terapia sostitutiva con immunoglobuline somministrate per via endovenosa sull'espressione di Adiponectina esclusivamente nel contesto clinico della CVID, abbiamo deciso di investigare le modalità mediante le quali i livelli sierici di adiponectina venivano modulati ed il possibile ruolo patogenetico o di biomarcatore nella CVID. L'espressione dei recettori di AdipoR1 ed AdipoR2 sulla superficie di linfociti B ed altre cellule mononucleate del sangue periferico è stata valutata da precedenti studi che avevano dimostrato una riduzione dell'espressione di entrambi i recettori sulla superficie cellulare dei linfociti B in pazienti con patologie autoimmuni quali l'artrite reumatoide ed il diabete di tipo 1 [25, 44]. Un altro studio ha inoltre descritto una correlazione inversa tra i livelli sierici di Adiponectina e l'espressione di AdipoR1 ed AdipoR2 su varie cellule mononucleate del sangue periferico[45] . Come accennato precedentemente, l'analisi dei pattern di espressione citochinica nella CVID e la loro modulazione in relazione alla presenza di specifici fenotipi clinici e/o complicanze della patologia è stata oggetto di numerosi studi [6-8]. Sebbene con risultati non univoci, tali studi hanno dimostrato che specifici pattern di secrezione di citochine sono associati alla disregolazione immunitaria tipica della CVID. In maniera analoga la secrezione di adiponectina, così come quella di altre rilevanti adipochine quale la leptina, modula l'espressione di numerose citochine in differenti condizioni cliniche. Nella fattispecie, l'adiponectina esercita, invece, un effetto inibente sull'attivazione



macrofagica bloccando i pathway NF-kB-dipendenti e la secrezione di citochine pro-infiammatorie quali IL1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Vari studi hanno dimostrato inoltre una correlazione inversa tra l'espressione di adiponectina e quella del TNF- $\alpha$  [21, 24]. Alla luce di tali considerazioni, per contribuire a chiarire i meccanismi mediante i quali le concentrazioni di adiponectina totale e dei suoi oligomeri sono modulate nel contesto patologico della CVID, abbiamo deciso di caratterizzare:

- il profilo di espressione dei recettori per l'adiponectina (AdipoR1, AdipoR2 e T-caderina) sulla superficie di varie popolazioni di cellule mononucleate del sangue periferico
- i livelli sierici di un'altra rilevante adipochina quale la leptina in pazienti con CVID, e la modulazione della sua espressione rispetto alla Adiponectina in relazione alla terapia sostitutiva con immunoglobuline
- il pattern di espressione di 5 citochine (IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) in 24 pazienti in terapia di mantenimento, 18 pazienti naive per terapia sostitutiva e 28 controlli sani in relazione alla somministrazione endovenosa di immunoglobuline umane normali (immediatamente prima e 24 ore dopo la prima infusione).

## ***MATERIALI E METODI***

### ***Reclutamento dei soggetti***

Ventiquattro pazienti (12 uomini, 12 donne) affetti da CVID in trattamento continuativo con immunoglobuline umane normali ed 8 pazienti *treatment naïve* (ovvero che non avevano mai ricevuto terapia sostitutiva con immunoglobuline) sono stati reclutati presso la UOSD di Allergia ed Immunodeficienze del Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università di Napoli Federico II. Tutti i pazienti soddisfacevano i criteri diagnostici stabiliti dalla European Society for Immunodeficiency (ESID) [46]: presenza di almeno una tra le seguenti caratteristiche cliniche: aumentata suscettibilità alle infezioni, manifestazioni autoimmuni, patologie granulomatose, linfoproliferazione policlonale e familiari affetti da deficit di produzione anticorpale; notevole riduzione delle IgG e delle IgA con o senza ridotti livelli sierici di IgM (valutata su almeno due determinazioni e maggiore di due deviazioni standard rispetto ai livelli normali per età); almeno una tra le seguenti alterazioni immunologiche: scarsa risposta vaccinale e riduzione dei linfociti B della memoria nel sangue periferico (inferiori al 70% rispetto alla norma); esclusione di cause secondarie di ipogammaglobulinemia; età superiore ai 4 anni; assenza di grave deficit T cellulare (definito come riduzione dei linfociti T CD4+ naive, riduzione dei linfociti T CD4+ o assente risposta ai test di proliferazione T-cellulare).

Come controlli abbiamo reclutato 28 volontari sani presso lo staff del CEINGE – Biotecnologie Avanzate di Napoli, appaiati per età, peso corporeo e body mass index

(BMI). Le informazioni retrospettive relative alle conte assolute e la distribuzione dei subset B- e T-linfocitari, la risposta vaccinale ai polisaccaridi pneumococcici e la storia clinica la storia clinica di infezioni ricorrenti, diarrea cronica, bronchiectasie, patologie autoimmuni (con particolare riferimento a trombocitopenia autoimmune, anemia emolitica autoimmune e neutropenia), linfoproliferazione policlonale (epatomegalia, splenomegalia, linfadenopatia, manifestazioni granulomatose non infettive) e neoplasie, sono stati recuperati dalla documentazione medica (cartelle cliniche e referti laboratoristici) dei pazienti con CVID, disponibile presso la UOSD di Allergologia e Immunodeficienze.

I pazienti in terapia di mantenimento ricevevano terapia sostitutiva continuativa con immunoglobuline umane polivalenti per via endovenosa alla dose di 400 mg/Kg peso corporeo/mese con intervalli tra le somministrazioni di 3 settimane, allo scopo di mantenere livelli sierici di IgG superiori a 600 mg/dl ( $768 \pm 87$  mg/dl). Non vi erano casi familiari di CVID. I pazienti *treatment naïve* hanno ricevuto la prima terapia sostitutiva con immunoglobuline umane polivalenti alla dose di 400 mg/kg peso corporeo. Il protocollo di ricerca è stato approvato dal Comitato Etico per le attività biomediche dell'Università di Napoli Federico II ed è stato condotto secondo la Dichiarazione di Helsinki II. Un consenso informato in forma scritta è stato espresso da tutti i partecipanti allo studio.

### ***Valutazioni biochimiche ed antropometriche***

Altezza e peso dei partecipanti sono state misurate utilizzando metodoche standard ed il body mass index è stato calcolato come peso corporeo (Kg)/quadrato dell'altezza (metri). I campioni ematici (5 ml) sono stati prelevati dopo 12 ore di digiuno per i pazienti in terapia di mantenimento, e sia immediatamente prima che 24 ore dopo la prima somministrazione di immunoglobuline per i pazienti *treatment naive*. I campioni ematici sono stati immediatamente centrifugati ed aliquote di siero sono state conservate alla temperatura di -20 °C. I livelli di IgG, IgA, IgM, colesterolo totale, LDL, HDL, trigliceridi, glucosio, proteine totali, ferro, fibrinogeno, proteina C reattiva e velocità di eritrosedimentazione sono stati determinati in tutti i partecipanti impiegando metodiche enzimatiche standard (Hitachi Modular, Roche, Mannheim, Germany).

### ***Misurazione di Adiponectina e Leptina***

Le concentrazioni sieriche di adiponectina e leptina sono state valutate in 18 pazienti con CVID *treatment naive* prima e 24 ore dopo la prima infusione di immunoglobuline umane normale, nei 24 pazienti con CVID in terapia di mantenimento e nei 28 controlli sani. La concentrazione di adiponectina totale è stata misurata mediante ELISA come precedentemente descritto [20]. I livelli di leptina sono stati misurati impiegando un kit commerciale ELISA (Elabscience, Houston, Texas, USA).

***Valutazione dell'espressione dei recettori per l'Adiponectina sulla superficie di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) mediante citofluorimetria a flusso.***

L'espressione dei recettori per l'adiponectina (AdipoR1, AdipoR2 e T-caderina) sulla  $\mu$ superficie leucocitaria è stata valutata in 18 pazienti con COVID *treatment naïve* prima e 24 ore dopo la prima somministrazione di immunoglobuline. I PBMCs sono stati incubati con specifici anticorpi per 30 minuti a 4 °C. Successivamente, i campioni sono stati marcati con gli specifici anticorpi secondari coniugati per 30 minuti a 4°C.

Anticorpi tipo rabbit anti-AdipoR1 (357-375) ed AdipoR2 (374-386) umani (Phoenix Pharmaceuticals, Karlsruhe, Germany) sono stati impiegati alla concentrazione di 5  $\mu$ g/ml e rilevati mediante anticorpo secondario tipo goat anti-Rabbit Alexa 488 (Life Technologies, Milano, Italia). Il *gating* per misurare l'espressione di AdipoR1 ed AdipoR2 sulla superficie dei PBMCs e dei linfociti B è stato basato sul controllo isotipo. Le frequenze relative al controllo isotipo sono state sottratte da quelle relative a AdipoR1 ed AdipoR2 in ogni campione. I seguenti anticorpi sono stati impiegati per marcare i PBMCs umani: CD4- FITC (1:50) (OKT-4), CD3-PerCp-Cy5.5 (1:50) (OKT3), CD19- PECy7 (1:50) (HIB19), CD8-Pacific Blue (1:50) (OKT8), CD56- PE (1:50) (MEM188) (all from E-bioscience, Hatfield, UK), CD4- Pacific orange (1:10) (clone S3.5) (Life Technologies, Milano, Italia) and CD45RO-APC (1:20) (UCHL1) (BD Bioscience, Oxford, UK),  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-PE (1:100) (P5D2),  $\alpha$ L $\beta$ 2-FITC (1:100) (212701), DP-2-FITC (1:10) (301108) (R&D Systems, Abingdon, UK.), CXCR3-PE (1:50) (2Ar1) (VWR International PBI S.r.l., Milano, Italy). Le sottopopolazioni B-

linfocitarie sono state marcate impiegando CD19-PerCpVio700 (1:30) (LT19), IgM-PE (1:30) (PJ2-22H3), IgD-APC (1:60) (IgD26), CD38-FTIC (1:150) (IB6), e CD27-APCVio-770 (1:10) (M-T271) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

### ***Misurazione delle concentrazioni di citochine***

Le concentrazioni di 8 citochine (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL10,  $INF\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , GM-CSF) sono state misurate nel siero di 18 pazienti con CVID *treatment naïve* prima e 24 ore dopo la prima infusione di immunoglobuline, in 24 paziente con CVID in mantenimento ed in 28 controlli sani, impiegando un kit disponibile in commercio (Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 8-plex Assay, Hercules, CA, USA). Il saggio è stato effettuato secondo le istruzioni del produttore e le concentrazioni delle citochine sono state calcolate comparando la lettura di una curva standard logistica pentaparametrica mediante uno strumento Bioplex 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### ***Analisi statistica***

La significatività statistica è stata stabilita per una  $p < 0.05$ . I test di Bonferroni e Student sono stati impiegati per comparare le medie dei parametri biochimici. L'analisi della varianza ed il test di Bonferroni sono stati impiegati per comparare le medie delle concentrazioni di citochine.

## RISULTATI

### *Caratteristiche biochimiche ed antropometriche dei pazienti con CVID*

Le caratteristiche antropometriche e biochimiche di 24 paziente con CVID in terapia di mantenimento e 28 controlli sani sono riportate in **Tabella 1**. I livelli sierici di colesterolo totale, proteine totali e sideremia erano inferiori nei pazienti rispetto ai controlli ( $p < 0.03$ ). I risultati del test ELISA hanno confermato le inferiori concentrazioni di adiponectina totale nei pazienti con CVID rispetto ai soggetti di controllo ( $p = 0.03$ ). Inoltre, i livelli di adiponectina totale sono incrementati nei pazienti *treatment naïve* 24 ore dopo la prima terapia sostitutiva con immunoglobuline ( $p = 0.007$ ). La **Tabella 2** mostra le caratteristiche biochimiche ed antropometriche di 18 pazienti con CVID *treatment naïve* prima e 24 ore dopo la prima somministrazione di immunoglobuline.

### *Concentrazioni di leptina nei pazienti con CVID*

Al fine di verificare la specificità della modulazione della produzione di adiponectina nel contesto clinico della CVID, abbiamo valutato il coinvolgimento della leptina, che è una delle più rilevanti adipochine prodotte dalle cellule del sistema adiposo. In prima istanza, per valutare se i livelli sierici di leptina fossero modulati dalla terapia sostitutiva con immunoglobuline, abbiamo misurato le sue concentrazioni in pazienti con CVID *treatment naïve* prima e 24 ore dopo la prima infusione di terapia sostitutiva

con immunoglobuline. In maniera interessante, diversamente dall'adiponectina, i livelli sierici di leptina non erano modificati dalla somministrazione di immunoglobuline (**Tabella 2**). Di conseguenza, le concentrazioni di leptina non differivano significativamente tra pazienti con CVID in terapia di mantenimento e controlli (Tabella 1). La **Figura 1** mostra i livelli di adiponectina e leptina, così come il rapporto adiponectina/leptina in pazienti con CVID *treatment naïve* prima e 24 ore dopo la prima terapia sostitutiva con immunoglobuline in confronto ai soggetti di controllo. Il rapporto adiponectina/leptina è risultato significativamente inferiore nei pazienti con CVID *treatment naïve* rispetto ai controlli. Al contrario, il rapporto adiponectina/leptina è aumentato 24 ore dopo la prima somministrazione di immunoglobuline negli stessi pazienti *treatment naïve*. Considerato che l'infusione di immunoglobuline non aveva modificato i livelli di leptina, possiamo concludere che la variazione osservata in tale rapporto è attribuibile alle variazioni nell'espressione di adiponectina.

### ***Espressione di AdipoR1, AdipoR2 e T-caderina sulla superficie dei PBMCs***

Come mostrato in **Figura 2**, gli esperimenti di citofluorimetria a flusso hanno dimostrato che l'espressione (in termini di percentuale di cellule positive) di AdipoR1 ed AdipoR2 a livello di superficie di linfociti B (cellule CD19+), linfociti B attivati (cellule CD19+CD27+), linfociti NK (cellule CD3-CD56+) e monociti (cellule CD14+) è superiore nei pazienti con CVID *treatment naïve* rispetto ai soggetti di



controllo (**Figura 2A**). In maniera interessante, l'espressione di AdipoR1 sulla superficie di linfociti B, linfociti NK e monociti è risultata significativamente superiore rispetto ai controlli. Al contrario, non sono state riscontrate differenze significative nell'espressione a livello delle cellule CD19+CD27+ (**Figura 2A**). L'espressione di AdipoR2 su linfociti B, linfociti NK, monociti e linfociti B CD27+ è risultata superiore nei pazienti con CVID *treatment naïve* rispetto ai controlli, non raggiungendo tuttavia una differenza statisticamente significativa.

In maniera interessante, 24 ore dopo la prima terapia sostitutiva con immunoglobuline, l'espressione sia di AdipoR1 sia di AdipoR2 è diminuita a livello della superficie dei linfociti B totali, dei linfociti B "attivati" CD27+, delle cellule NK e dei monociti. L'espressione di T-caderina a livello di superficie di linfociti B CD27+, linfociti NK o monociti non ha mostrato invece differenze tra controlli e pazienti *treatment naïve* sia prima che dopo la prima terapia sostitutiva con immunoglobuline (**Figura 2C**). Abbiamo inoltre raccolto campioni ematici da 5 pazienti con CVID *treatment naïve* per l'analisi dell'espressione dei recettori per adiponectina a livello della superficie di PBMCs a 7, 14 e 21 giorni dopo l'infusione ed abbiamo riscontrato che i livelli di espressione non differivano tra i vari tempi presi in esame (**Figura 3**). Infine, l'espressione di AdipoR1, AdipoR2 e T-caderina a livello della superficie cellulare dei linfociti T era appena al di sopra della soglia di rilevamento sperimentale (risultati non mostrati).

### ***Pattern di produzione di citochine in pazienti con COVID in terapia di mantenimento***

Come mostrato in **Figura 4**, i livelli sierici di IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  sono risultati significativamente superiori nei 2 gruppi di trattamento rispetto ai controlli. I livelli di IL-10 sono risultati inferiori nei pazienti rispetto ai controlli, mentre l'espressione di IL-2, IL-4 ed IFN- $\gamma$  non ha mostrato significative differenze sia tra i due gruppi di pazienti (mantenimento e *treatment naïve*) sia rispetto ai controlli. I livelli di IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  considerando i soli pazienti *treatment naïve* sono risultati sovrapponibili a quelli dei controlli sani. Infine, la prima infusione di immunoglobuline umane polivalenti non ha significativamente modificato i livelli sierici delle suddette citochine dopo 24 ore, 7, 14 o 21 giorni dalla prima infusione (**Figura 5**). I livelli sierici di IL-10, considerando i soli pazienti *treatment naïve*, sono risultati inferiori rispetto ai controlli.

## DISCUSSIONE

Come precedentemente descritto, non è stato dimostrato un univoco meccanismo molecolare responsabile delle manifestazioni cliniche tipiche della CVID. Tuttavia, numerosi studi hanno evidenziato un'attivazione cronica del sistema immunitario nei pazienti con CVID associato alla up-regolazione di una serie di citochine ad attività pro-infiammatoria [6, 44, 45]. D'altro canto, le nuove rilevanti acquisizioni sulle funzioni svolte dal tessuto adiposo hanno chiarito l'esistenza di un intricato network che mette in correlazione omeostasi metabolica e sistema immunitario. Tali azioni si svolgono prevalentemente mediante gli effetti esercitati da differenti citochine ed adipochine [41]. In un precedente studio, propedeutico agli esperimenti oggetto di questa tesi, avevamo dimostrato che l'espressione dell'adiponectina totale e degli oligomeri HMW, ovvero quelli dotati di maggiore attività biologica, è ridotta in pazienti con CVID, è associata alla presenza di specifici fenotipi clinici della patologia ed indirettamente alla prognosi a lungo termine, ed è influenzata dall'inizio della terapia sostitutiva con immunoglobuline in pazienti *treatment naïve* [43]. In particolare, avevamo riscontrato una significativa associazione tra i livelli sierici di adiponectina ed alcuni fenotipi clinici dei pazienti con CVID quali le citopenie autoimmuni e l'enteropatia. I pazienti con citopenia autoimmuni e quelli con enteropatia presentavano livelli significativamente più bassi di adiponectina rispetto a quelli senza tali fenotipi clinici. Queste osservazioni sono di rilievo se si considera che circa il 10-20% dei pazienti con CVID presenta citopenie autoimmuni [9, 46] e circa il 10% enteropatia [9]. Inoltre, i pazienti con CVID che presentano nel corso della storia

naturale della patologia manifestazioni non infettive hanno una prognosi a lungo termine decisamente peggiore (rischio di morte 11 volte superiore) rispetto a quelli che presentano esclusivamente manifestazioni infettive [46]. In maniera analoga, i livelli di adiponectina erano significativamente più bassi nel sottogruppo di pazienti che presentavano livelli sierici di IgA alla diagnosi inferiori a 7 mg/dl rispetto a quelli con IgA alla diagnosi superiori a 7 mg/dl. Quinti et al. hanno precedentemente dimostrato che livelli di IgA alla diagnosi inferiori a 7 mg/dl definiscono un sottogruppo di pazienti con un maggiore rischio di sviluppare polmoniti batteriche e, conseguentemente, una peggiore prognosi [47]. Nel loro complesso, questi riscontri suggerivano uno specifico ruolo dell'adiponectina nella patogenesi delle manifestazioni cliniche della COVID. Negli esperimenti descritti in questa trattazione, abbiamo invece dimostrato che l'espressione dei recettori AdipoR1 ed AdipoR2 sulla superficie di membrana di cellule mononucleate dal sangue periferico di pazienti affetti da COVID differisce da quella da controlli sani appaiati per età, genere e BMI, e si modifica dopo la prima infusione di immunoglobuline in pazienti con COVID *treatment naïve*. L'ipotesi della specificità del coinvolgimento dell'adiponectina nella patogenesi e/o nelle modifiche infiammatorie della COVID è supportata dall'assenza di modifiche nell'espressione di leptina e dei livelli sierici di numerose citochine testate. Considerati nel loro complesso, questi risultati suggeriscono che il sistema di regolazione della produzione e sintesi di adiponectina giochi un ruolo critico nella COVID, ed in particolar modo in alcune caratteristiche manifestazioni cliniche. L'espressione dei recettori AdipoR1 ed AdipoR2 è stata precedentemente esaminata nei linfociti B, monociti e

linfociti NK, ma non a livello dei linfociti T [25]. In particolare, è stata riscontrata una riduzione dell'espressione di AdipoR1 ed AdipoR2 a livello della superficie cellulare dei linfociti B di pazienti con patologie autoimmuni, in particolare, artrite reumatoide e diabete mellito di tipo 1 [48]. Chimen et al. hanno descritto una correlazione inversa tra i livelli sierici di adiponectina e l'espressione dei suoi recettori a livello di varie popolazioni di cellule del sistema immunitario [49, 50]. Concordemente, in un precedente studio, abbiamo riscontrato che bassi livelli sierici di adiponectina era associati al riscontro di una up-regulation di AdipoR1 ed AdipoR2 e, viceversa, che elevati livelli sierici di adiponectina riscontrati in vari modelli di patologia autoimmune risultavano in una down-regolazione di AdipoR1 ed AdipoR2 [51]. Inoltre, i nostri risultati suggeriscono che le funzioni di regolazione del sistema immunitario operate dall'adiponectina nella COVID sono specificamente correlate ai pathway di signaling di AdipoR1 ed AdipoR2, ma non di T-caderina.

Mentre vari studi hanno associato l'espressione di T-caderina al riscontro di danno endoteliali e progressione neoplastica [52, 53], non vi sono, al meglio delle nostre conoscenze, dati sperimentali riguardanti l'espressione di T-caderina e le sue variazioni, nelle differenti linee cellulari del sistema immunitario. L'assenza di variazioni nell'espressione di T-caderina sulla superficie dei PBMCs dei pazienti valutati in questo studio, indica che, nel contesto patologico della COVID, questo recettore non è coinvolto nell'espletamento della regolazione immunitaria operata dall'adiponectina.

Un altro interessante risultato del nostro studio riguarda le modifiche nell'espressione di AdipoR1 ed AdipoR2, che in maniera simile alle variazioni dei livelli sierici di adiponectina, sono parzialmente revertite verso i livelli riferibili alla popolazione generale, o quanto meno ai controlli sani, dopo la prima somministrazione sostitutiva di immunoglobuline umane polivalenti. Questo risultato rafforza l'ipotesi che il sistema metabolico della produzione di adiponectina svolga un ruolo preminente nella patogenesi della disregolazione immunitaria e delle manifestazioni cliniche della COVID. Per quanto concerne le risposte infiammatorie, l'acquisizione preminente è che l'adiponectina agisca prevalentemente come regolatore dell'infiammazione esercitando effetti sulla secrezione di citochine pro- ed anti-infiammatorie. Di contro, alcuni studi in vitro hanno dimostrato che l'adiponectina possa esercitare proprietà pro-infiammatorie in determinate circostanze, attraverso l'incremento dell'espressione e dell'attività di mediatori e citochine pro-infiammatorie [54-56]. Per stabilire la specificità del coinvolgimento dell'adiponectina nella COVID abbiamo studiato il trend delle concentrazioni di leptina nelle stesse condizioni sperimentali. Quest'ultima citochina è prodotta dagli adipociti e riveste un ruolo nella regolazione del sistema immunitario ampiamente descritto [57, 58]. Abbiamo riscontrato che l'espressione di leptina non differiva in maniera significativa tra i pazienti in terapia di mantenimento ed i controlli sani, né prima o dopo la prima somministrazione di immunoglobuline nei pazienti con COVID *treatment naïve*. Nell'unico studio disponibile in letteratura che abbia valutato il ruolo della leptina nella COVID, l'espressione di questa adipochina non era associato con la patologia o con specifiche manifestazioni cliniche della stessa [39].

Numerosi studi hanno poi valutato la produzione di differenti citochine nella CVID, sebbene con risultati contrastanti [7, 59, 60]. In questo studio abbiamo riscontrato che i livelli sierici di IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  erano superiori nei pazienti con CVID, considerati complessivamente i due sottogruppi di trattamento, rispetto ai controlli. Al contrario, i livelli di IL-10 erano inferiori nei pazienti affetti da CVID rispetto ai controlli sani. Infine non vi erano differenze significative nei livelli di IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ . Inoltre, abbiamo riscontrato che considerando i soli pazienti *treatment naïve*, i livelli della maggioranza della citochine era comparabile a quelli dei controlli sani ad eccezione della IL-10, i cui livelli erano significativamente inferiori nei pazienti con CVID *treatment naïve* rispetto ai controlli sani [61, 62].

Il differente andamento dei livelli sierici di citochine nel gruppo dei pazienti in terapia di mantenimento rispetto ai pazienti *treatment naïve* è verosimilmente correlato alle condizioni cliniche del paziente (ad esempio infezioni ricorrenti, neoplasie, manifestazioni infiammatorie e/o autoimmuni, etc.). Difatti, le variazioni dell'espressione citochinica si rendono evidenti solo dopo numerose e continuate somministrazioni di immunoglobuline, condizione che si verifica nei pazienti in terapia di mantenimento. L'IL-6 e l'IL-8 sono in massima parte prodotte e secrete da cellule monocito/macrofagiche, che stimolano, di conseguenza, la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B in linfociti B di memoria o plasmacellule [63, 64]. Al contrario, IL-2 ed IL-4 sono prodotte prevalentemente da linfociti T [65].

La up-regulation dell'espressione di IL-6 ed IL-8 nei pazienti con CVID in terapia di mantenimento potrebbe indicare un preminente coinvolgimento dei macrofagi, rispetto

ai linfociti T, nella patogenesi delle manifestazioni fisiopatologiche proprie della COVID. In questo senso, riteniamo verosimile che gli effetti immunologici dell'infusione continuativa di immunoglobuline possano concretizzarsi nell'attivazione di linfociti Th2 e dei macrofagi, determinando di conseguenza un incremento delle concentrazioni di IL-6 ed IL-8. L'incremento delle concentrazioni sieriche di IL-6 ed IL-8 è stata precedentemente descritta da Varzaneh et al. e da Ibanez et al. [59, 66]. Inoltre, la persistente attivazione dei macrofagi, che sono la principale fonte cellulare di IL-6 ed IL-8 è stata parimenti descritta in una coorte di pazienti con COVID già in terapia cronica e continuativa con immunoglobuline [67].

L'andamento dei livelli sierici di IL-10 è strettamente correlato a quello dell'IL-2 e dell'IL-4, che presentano una scarsa secrezione nei pazienti *treatment naïve*, verosimilmente in relazione alla disregolazione immunitaria della COVID ma sottoposta a trattamento [68]. Difatti, la riduzione della produzione di IL-10 ad opera dei linfociti T di pazienti affetti da COVID è stata ampiamente descritta in precedenti studi sperimentali [62, 69, 70].

In conclusione, possiamo asserire che i dati sperimentali sopra descritti e discussi, dimostrano per la prima volta che i recettori per l'adiponectina sono espressi in maniera differenziale, rispetto ai controlli sani, e che la loro espressione tende a ritornare parzialmente verso condizioni fisiologiche dopo la prima terapia sostitutiva con immunoglobuline umane polivalenti. La peculiarità e la rilevanza fisiopatologica del ruolo svolto dall'adiponectina nella COVID trova riscontro nell'osservazione che le concentrazioni sieriche di leptina ed altre citochine indagate negli esperimenti effettuati



non si modifica dopo l'inizio della terapia sostitutiva in pazienti con CVID *treatment naïve*. Ulteriori studi saranno necessari per chiarire ulteriormente i meccanismi molecolari che sottendono gli effetti biologici mediati dall'adiponectina nella patogenesi della disregolazione immunitaria e delle manifestazioni cliniche della CVID.

## ***BIBLIOGRAFIA***

- [1] Ameratunga R, Allan C, Woon ST. Defining Common Variable Immunodeficiency Disorders in 2020. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2020; 40(3):403-420.
- [2] Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, Costa-Carvalho BT, Cunningham-Rundles C, de la Morena MT, Espinosa-Rosales FJ, Hammarström L, Nonoyama S, Quinti I, Routes JM, Tang ML, Warnatz K. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2016; 4(1):38-59.
- [3] Bogaert DJ, Dullaers M, Lambrecht BN, Vermaelen KY, De Baere E, Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J Med Genet.* 2016; 53(9):575-90.
- [4] Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, Vlkova M, Hernandez M, Detkova D, Bos PR, Poerksen G, von Bernuth H, Baumann U, Goldacker S, Gutenberger S, Schlesier M, Bergeron-van der Cruyssen F, Le Garff M, Debré P, Jacobs R, Jones J, Bateman E, Litzman J, van Hagen PM, Plebani A, Schmidt RE, Thon V, Quinti I, Espanol T, Webster AD, Chapel H, Vihinen M, Oksenhendler E, Peter HH, Warnatz K. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood.* 2008; 111(1):77-85.
- [5] Ebbo M, Gérard L, Carpentier S, Vély F, Cypowyj S, Farnarier C, Vince N, Malphettes M, Fieschi C, Oksenhendler E, Schleinitz N, Vivier E; DEFI Study Group. Low Circulating Natural Killer Cell Counts are Associated With Severe Disease in Patients With Common Variable Immunodeficiency. *EBioMedicine.* 2016; 6:222-30.

- [6] Barbosa RR, Silva SP, Silva SL, Tendeiro R, Melo AC, Pedro E, Barbosa MP, Santos MC, Victorino RM, Sousa AE. Monocyte activation is a feature of common variable immunodeficiency irrespective of plasma lipopolysaccharide levels. *Clin Exp Immunol*. 2012; 169(3):263-72.
- [7] Hel Z, Huijbregts RP, Xu J, Nechvatalova J, Vlkova M, Litzman J. Altered serum cytokine signature in common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2014; 34(8):971-8.
- [8] Vlkova M, Ticha O, Nechvatalova J, Kalina T, Litzman J, Mauri C., Blair P.A. Regulatory B cells in CVID patients fail to suppress multifunctional IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$ + CD4+ T cells differentiation. *Clin Immunol*. 2015; 160:292-300.
- [9] Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood*. 2008; 112 (2):277-86.
- [10] Chapel H, Lucas M, Patel S, Lee M, Cunningham-Rundles C, Resnick E, et al. Confirmation and improvement of criteria for clinical phenotyping in common variable immunodeficiency disorders in replicate cohorts. *J Allergy Clin Immunol* . 2012; 130 (5): 1197-1198.e9.
- [11] Quinti I, Soresina A, Spadaro G, Martino S, Donnanno S, Agostini C, Claudio P, Franco D, Maria Pesce A, Borghese F, Guerra A, Rondelli R, Plebani A; Italian Primary Immunodeficiency Network. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2007; 27(3):308-16.
- [12] Quinti I, Agostini C, Tabolli S, Brunetti G, Cinetto F, Pecoraro A, et al. Malignancies are the major cause of death in patients with adult onset common variable immunodeficiency. *Blood*. 2012; 120 (9):1953-54.

- [13] Graziano V, Pecoraro A, Mormile I, Quaremba G, Genovese A, Buccelli C, Paternoster M, Spadaro G. Delay in diagnosis affects the clinical outcome in a cohort of covid patients with marked reduction of iga serum levels. *Clin Immunol.* 2017; 180:1-4.
- [14] Galic S, Oakhill JS, Steinberg G.R. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010; 316: 129-139.
- [15] Procaccini C, De Rosa V, Galgani M, Carbone F, La Rocca C, Formisano L., Matarese G. Role of adipokines signaling in the modulation of T cells function. *Front Immunol.* 2013; 4:332.
- [16] Wensveen, FM., Valentić, S., Šestan, M., Wensveen, T.T., Polić, B.. Interactions between adipose tissue and the immune system in health and malnutrition. *Semin Immunol.* 2015; 27(5): 322-333.
- [17] Exley MA, Hand L, O'Shea D, Lynch L. Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity. *J Endocrinol.* 2014; 223(2): R41-48.
- [18] Nigro E, Scudiero O, Monaco ML, Palmieri A, Mazzarella G, Costagliola C, Bianco A. et al. New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. *Biomed Res Int.* 2014:658913.
- [19] Kern PA, Di Gregorio G.B, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes.* 2003; 52:1779-85.
- [20] Lacedonia D, Nigro E, Matera MG, Scudiero O, Monaco ML, Polito R, Carpagnano GE, et al. Evaluation of adiponectin profile in Italian patients affected by obstructive sleep apnea syndrome. *Pulm Pharmacol Ther.* 2016; 40:104-8.

- [21] Nigro E, Piombino P, Scudiero O., Monaco ML, Schettino P, Chambery A, Daniele A. Evaluation of salivary adiponectin profile in obese patients. *Peptides*. 2015; 63:150-5.
- [22] Nigro E, Daniele A, Scudiero O, Monaco ML, Roviezzo F, D'Agostino B, Mazzarella G, et al. Adiponectin in asthma: implications for phenotyping. *Curr. Protein Pept. Sci*. 2015; 16:182-7.
- [23] Costagliola C, Daniele A, Dell'Omo R, Romano MR, Aceto F, Agnifili L, Semeraro F, et al. Aqueous humor levels of vascular endothelial growth factor and adiponectin in patients with type 2 diabetes before and after intravitreal bevacizumab injection. *Exp. Eye Res*. 2013; 110:50-4.
- [24] Daniele A, De Rosa A, Nigro E, Scudiero O, Capasso M, Masullo M, de Laurentiis G. Adiponectin oligomerization state and adiponectin receptors airway expression in chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*. 2012; 44:563-9.
- [25] Pang TT, Narendran P. The distribution of adiponectin receptors on human peripheral blood mononuclear cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2008; 1150:143-5.
- [26] Gackowska L, Litwin M, Trojanek J, Eljaszewicz A, Kubiszewska I, Niemirska A, Wierzbicka A, et al. Expression of Adiponectin Receptors on Peripheral Blood Leukocytes of Hypertensive Children Is Associated with the Severity of Hypertension. *Biomed. Res. Int*. 2015:742646.
- [27] Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart JC, Staels B. Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004; 314:151-8.

- [28] Yamaguchi N, Argueta JG, Masuhiro Y, Kagishita M, Nonaka K, Saito T, Hanazawa S, et al. Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling. *FEBS Lett.* 2005; 579:6821-6.
- [29] Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood.* 2000; 96:1723-32.
- [30] Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 316:924-9.
- [31] Kim KY, Kim JK, Han SH, Lim JS, Kim KI, Cho DH, Lee MS, et al. Adiponectin is a negative regulator of NK cell cytotoxicity. *J Immunol.* 2006; 176:5958-64.
- [32] Tsao, T.S., Murrey, H.E., Hug, C., Lee, D.H. and Lodish, HF, Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 29359-62.
- [33] Tomizawa A, Hattori Y, Kasai K. Induction of gene expression in response to globular adiponectin in vascular endothelial cells. *Life Sci.* 2009; 85:457-61.
- [34] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, et al. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation.* 2000; 102:1296-301.
- [35] Ajuwon KM, Spurlock ME. Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 288:R1220-5.

- [36] Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 285:527-33.
- [37] Robinson K, Prins J, Venkatesh B. Clinical review: adiponectin biology and its role in inflammation and critical illness. *Crit Care.* 2011; 15:221.
- [38] Tsatsanis, C., Zacharioudaki, V., Androulidaki, A., Dermitzaki, E., Charalampopoulos, I., Minas, V., Gravanis, A. et al., Adiponectin induces TNF-alpha and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 335:1254-63.
- [39] Goldberg, A.C., Eliaschewitz, F.G., Montor, W.R., Baracho, G.V., Errante, P.R., Callero, M.A., Cardoso, M.R. et al., Exogenous leptin restores in vitro T cell proliferation and cytokine synthesis in patients with common variable immunodeficiency syndrome. *Clin. Immunol.* 2005; 114: 147-53.
- [40] Matarese, G., Moschos, S. and Mantzoros, CS., Leptin in immunology. *J. Immunol.* 2005; 174: 3137-42.
- [41] Abella, V., Scotece, M., Conde, J., Pino, J., Gonzalez-Gay, MA., Gómez-Reino, JJ., et al., Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nat Rev Rheumatol.* 2017; 13(2): 100-109.
- [42] Fernández-Riejos, P., Najib, S., Santos-Alvarez, J., Martín-Romero, C., Pérez-Pérez, A., González-Yanes, C., Sánchez-Margalet, V.. Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010: 568343.
- [43] Pecoraro A, Nigro E, Polito R, Monaco ML, Scudiero O, Mormile I, Cesoni Marcelli A, Capasso M, Habetswallner F, Genovese A, Daniele A and Spadaro G. Total

and High Molecular Weight Adiponectin Expression Is Decreased in Patients with Common Variable Immunodeficiency: Correlation with Ig Replacement Therapy. *Front Immunol.* 2017; 8:895.

[44] Vlková, M., Fronková, E., Kanderová, V., Janda, A., Ruzicková, S., Litzman, J., Sedivá A. et al., Characterization of lymphocyte subsets in patients with common variable immunodeficiency reveals subsets of naive human B cells marked by CD24 expression. *J. Immunol.* 2010. 185: 6431-8.

[45] Kalina, T., Stuchlý, J., Janda, A., Hrusák, O., Růzicková, S., Sedivá, A., Litzman, J. et al., Profiling of polychromatic flow cytometry data on B-cells reveals patients' clusters in common variable immunodeficiency. *Cytometry.* 2009; 75: 902-9.

[46] Resnick, E.S., Moshier, E.L., Godbold, J.H. and Cunningham-Rundles, C., Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood.* 2012; 119(7): 1650-7.

[47] Quinti, I., Soresina, A., Guerra, A., Rondelli, R., Spadaro, G., Agostini, C., Milito, C. et al., Effectiveness of immunoglobulin replacement therapy on clinical outcome in patients with primary antibody deficiencies: results from a multicenter prospective cohort study. *J. Clin. Immunol.* 2011; 31: 315-22.

[48] Mandal P, Pratt BT, Barnes M, McMullen MR, Nagy LE. Molecular mechanism for adiponectin-dependent M2 macrophage polarization: link between the metabolic and innate immune activity of full-length adiponectin. *J Biol Chem.* 2011; 15:13460–9.

[49] Chimen M, McGettrick HM, Apta B, Kuravi SJ, Yates CM, Kennedy A, et al. Homeostatic regulation of T cell trafficking by a B cell-derived peptide is impaired in autoimmune and chronic inflammatory disease. *Nat Med.* 2015; 5:467–75.



- [50] Yazdani R, Habibi S, Sharifi L, Azizi G, Abolhassani H, Olbrich P, Aghamohammadi A. Common Variable Immunodeficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, Classification, and Management. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2020; 30(1):14-34.
- [51] Francisco V, Ruiz-Fernández C, Pino J, Mera A, González-Gay MA, Gómez R, et al. Adipokines: linking metabolic syndrome, the immune system, and arthritic diseases. *Biochem Pharmacol*. 2019; 165:196–206.
- [52] Ren JZ, Huo JR. Correlation between T-cadherin gene expression and aberrant methylation of T-cadherin promoter in human colon carcinoma cells. *Med Oncol*. 2012; 29:915–18.
- [53] Ye M, Huang T, Li J, Zhou C, Yang P, Ni C, et al. Role of CDH13 promoter methylation in the carcinogenesis, progression and prognosis of colorectal cancer: a systematic meta-analysis under PRISMA guidelines. *Medicine*. 2017; 96:e5956.
- [54] Lappas, M., Permezel, M. and Rice, G.E., Leptin and adiponectin stimulate the release of proinflammatory cytokines and prostaglandins from human placenta and maternal adipose tissue via nuclear factor-kappaB, peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma and extracellularly regulated kinase 1/2. *Endocrinology*. 2005; 146: 3334-42.
- [55] Xu, A., Wang, Y., Keshaw, H., Xu, L.Y., Lam, K.S. and Cooper, G.J., The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest*. 2003; 112: 91-100.
- [56] Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N. et al., Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*. 2002. 8: 731–737.

- [57] Procaccini C, Jirillo E, Matarese G. Leptin as an immunomodulator. *Mol Aspects Med.* 2012; 1:35–45.
- [58] Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol.* 2000; 68:437–46.
- [59] Varzaneh FN, Keller B, Unger S, Aghamohammadi A, Warnatz K, Rezaei N. Cytokines in common variable immunodeficiency as signs of immune dysregulation and potential therapeutic targets - a review of the current knowledge. *J Clin Immunol.* 2014; 5:524–43.
- [60] Zhang JM, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007; 2:27–37.
- [61] Barsotti NS, Almeida RR, Costa PR, Barros MT, Kalil J, Kokron CM. IL-10-producing regulatory B cells are decreased in patients with common variable immunodeficiency. *PLoS ONE.* 2016; 3:e0151761.
- [62] Holm AM, Aukrust P, Aandahl EM, Müller F, Taskén K, Frøland SS. Impaired secretion of IL-10 by T cells from patients with common variable immunodeficiency— involvement of protein kinase A type I. *J Immunol.* 2003; 11:5772–7.
- [63] Jego G, Bataille R, Pellat-Deceunynck C. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood.* 2001; 6:1817–22.
- [64] Pandolfi F, Paganelli R, Oliva A, Quinti I, Polidori V, Fanales-Belasio E, et al. Increased IL-6 gene expression and production in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol.* 1993; 2:239–44.

- [65] Taraldsrud E, Fevang B, Jørgensen SF, Moltu K, Hilden V, Taskén K, et al. Defective IL-4 signaling in T cells defines severe common variable immunodeficiency. *J Autoimmun.* 2017; 81:110–19.
- [66] Ibáñez C, Suñé P, Fierro A, Rodríguez S, López M, Álvarez A, et al. Effects of Intravenous Immunoglobulins on serum cytokine levels in patients with primary hypogammaglobulinemia. *BioDrugs.* 2005; 19:59–65.
- [67] Paquin-Proulx D, Sandberg JK. Persistent immune activation in CVID and the role of IVIg in its suppression. *Front Immunol.* 2014; 5:637.
- [68] Mitchell RE, Hassan M, Burton BR, Britton G, Hill EV, Verhagen J, et al. IL-4 enhances IL-10 production in Th1 cells: implications for Th1 and Th2 regulation. *Sci Rep.* 2017; 12:11315.
- [69] Zhou Z, Huang R, Danon M, Mayer L, Cunningham-Rundles C. IL10 production in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol.* 1998; 86:298–304.
- [70] Azizi G, Bagheri Y, Yazdani R, Zaki-Dizaji M, Jamee M, Jadidi-Niaragh F, et al. The profile of IL-4, IL-5, IL-10 and GATA3 in patients with LRBA deficiency and CVID with no known monogenic disease: association with disease severity. *Allergol Immunopathol.* 2019; 47:172–8.

## Tabella 1

Caratteristiche biochimiche ed antropometriche di pazienti con CVID in terapia di manteniment e *treatment naïve* rispetto a controlli sani. [I risultati sono espressi come medie (deviazione standard). I risultati statisticamente significativi sono in grassetto].

	Controlli	Pazienti CVID in terapia di mantenimento	p-value	Pazienti CVID <i>treatment naïve</i>	p-value
Genere M/F	14/14	12/12		10/8	
Età (anni)	42.67 (15)	45.29 (14.86)	0.53	41.44 (16.18)	0.42
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	24.36 (2.74)	25.19 (4.45)	0.45	24.51 (4.47)	0.65
Colesterolo totale (mg/dl)	199.88 (43.17)	161.41 (41.21)	<b>0.002</b>	158.37 (28.33)	0.87
Trigliceridi (mg/dl)	95.56 (45.25)	95.16 (35.80)	0.97	94.66 (56.52)	0.97
Glucosio (mg/dl)	87.29 (13.86)	80.29 (15.31)	0.09	82.06 (10.79)	0.69
IgG (mg/dl)	-	224.79 (97.56)	-	2.36 (1.85)	<b>&lt;0.0001</b>
IgA (mg/dl)	-	12.41 (13.99)	-	0.11 (0.13)	<b>0.0006</b>
IgM (mg/dl)	-	23.75 (47.88)	-	0.31 (0.38)	0.07
Proteine totali (g/dl)	7.3 (0.62)	6.48 (0.59)	<b>0.001</b>	6.01 (0.54)	
Sideremia (µg/dl)	95.59 (34)	68.79 (34.12)	<b>0.01</b>	55.75 (26.04)	0.20
Fibrinogeno (mg/dl)	-	331.54 (99.66)	-	301.81 (66.44)	0.30
Proteina C reattiva	-	0.678 (0.78)	-	2.21 (2.87)	<b>0.02</b>
VES (mm/h)	-	10.16 (9.75)	-	8.40 (4.83)	0.59
Adiponectina (µg/ml)	20.17 (8.74)	15.96 (3.63)	<b>0.03</b>	6.53 (6.19)	<b>&lt;0.0001</b>
Leptina (ng/ml)	9.49 (3.59)	8.38 (3.75)	0.28	8.32 (3.29)	0.95

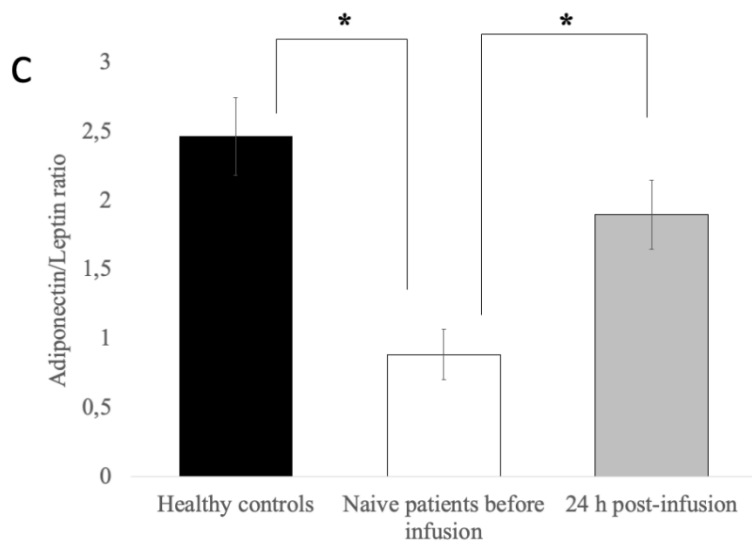
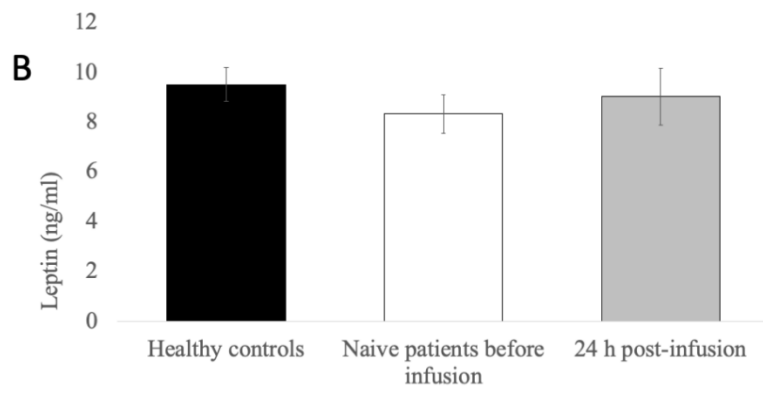
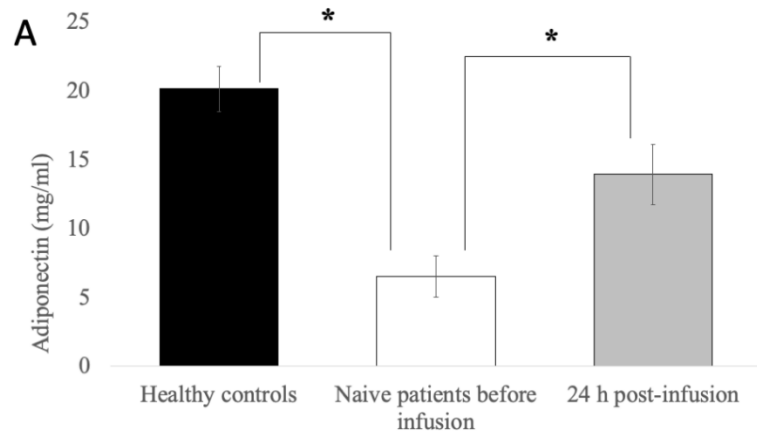
## Tabella 2

Caratteristiche antropometriche e biochimiche di pazienti con CVID *treatment naïve* prima e 24 ore dopo la prima infusione di immunoglobuline per via endovenosa. [I risultati sono espressi come medie (deviazione standard). I risultati statisticamente significativi sono in grassetto].

	<b>Pazienti CVID <i>treatment naïve</i></b>	<b>Pazienti CVID <i>treatment naïve</i> – 24 ore dopo la prima infusione di Ig</b>	<b>p-value</b>
Genere M/F	10/8	-	-
Età (anni)	41.44 (16.18)	-	-
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	24.51 (4.47)	-	-
Colesterolo totale (mg/dl)	158.37 (28.33)	-	-
Trigliceridi (mg/dl)	94.66 (56.52)	-	-
Glucosio (mg/dl)	82.06 (10.79)	-	-
IgG (mg/dl)	2.36 (1.85)	7.99 (2.83)	<b>&lt;0.0001</b>
IgA (mg/dl)	0.11 (0.13)	0.12 (0.15)	0.78
IgM (mg/dl)	0.31 (0.38)	0.33 (0.35)	0.87
Proteine totali (g/dl)	6.01 (0.54)	-	-
Sideremia (µg/dl)	55.75 (26.04)	-	-
Fibrinogeno (mg/dl)	301.81 (66.44)	-	-
Proteina C reattiva	2.21 (2.87)	-	-
VES (mm/h)	8.40 (4.83)	-	-
Adiponectina (µg/ml)	6.53 (6.19)	13.93 (9.22)	<b>0.007</b>
Leptina (ng/ml)	8.32 (3.29)	9.01 (4.88)	0.62

## **Figura 1**

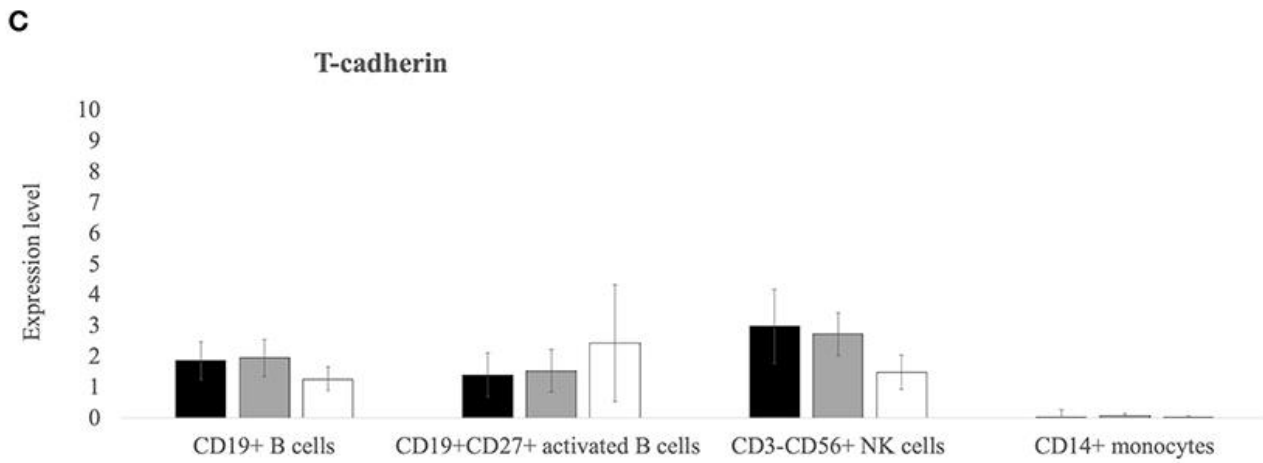
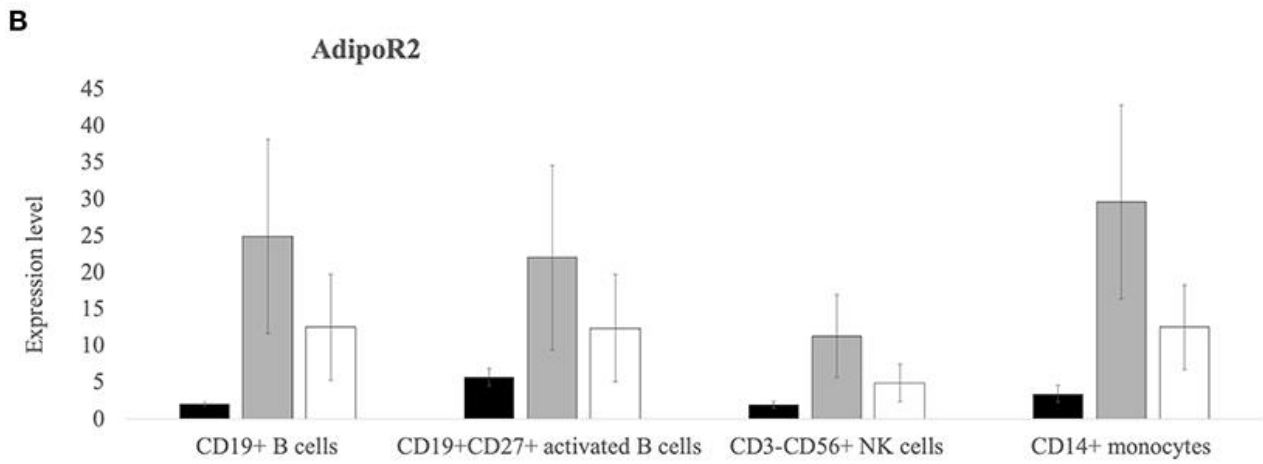
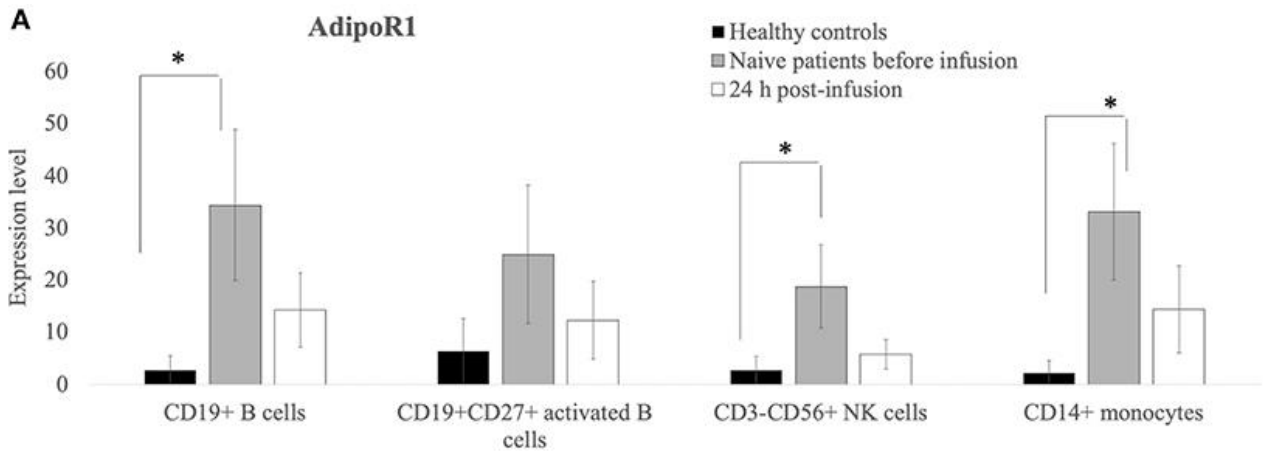
Concentrazioni sieriche di leptina (1A), adiponectina (1B) e rapporto adiponectina/leptina (1C) in pazienti con COVID *treatment naïve* in condizioni basali e 24 ore dopo la prima somministrazione di immunoglobuline, ed in controlli sani. I risultati rappresentano la media ( $\pm$  la deviazione standard) derivata per ogni paziente da 3 esperimenti indipendenti, realizzati in triplicato. \* $p < 0.05$



## Figura 2

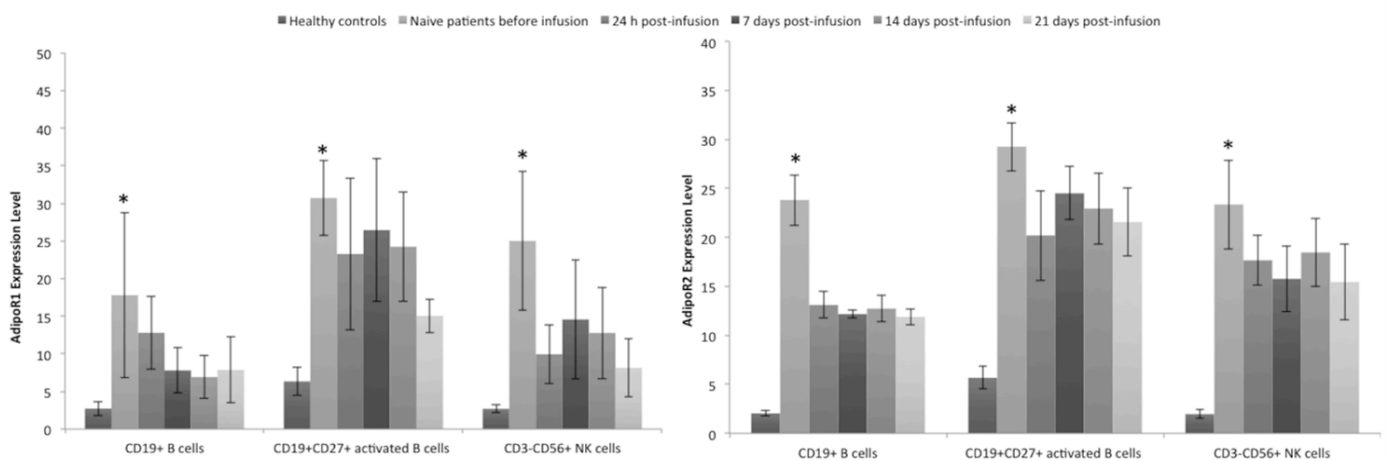
L'espressione di AdipoR1 ed AdipoR2 è maggiore nelle sottopopolazioni linfocitarie di pazienti con CVID *treatment naïve* rispetto a controlli sani. Tale espressione di reduce 24 ore dopo la prima somministrazione di immunoglobulin. (A-C) Percentuale di cellule positive a AdipoR1, AdipoR2 e T-caderina sulla superficie cellulare di sottopopolazioni linfocitarie (linfociti B CD19+, linfociti B CD19+CD27+, linfociti NK CD3-CD56+ e monociti CD14+) da controlli sani e da pazienti con CVID *treatment naïve* prima e 24 ore dopo la prima somministrazione di immunoglobuline. Risultati ottenuti da 2 esperimenti indipendenti realizzati mediante citofluorimetria a flusso, realizzati in triplicato. \* $p < 0.05$ .





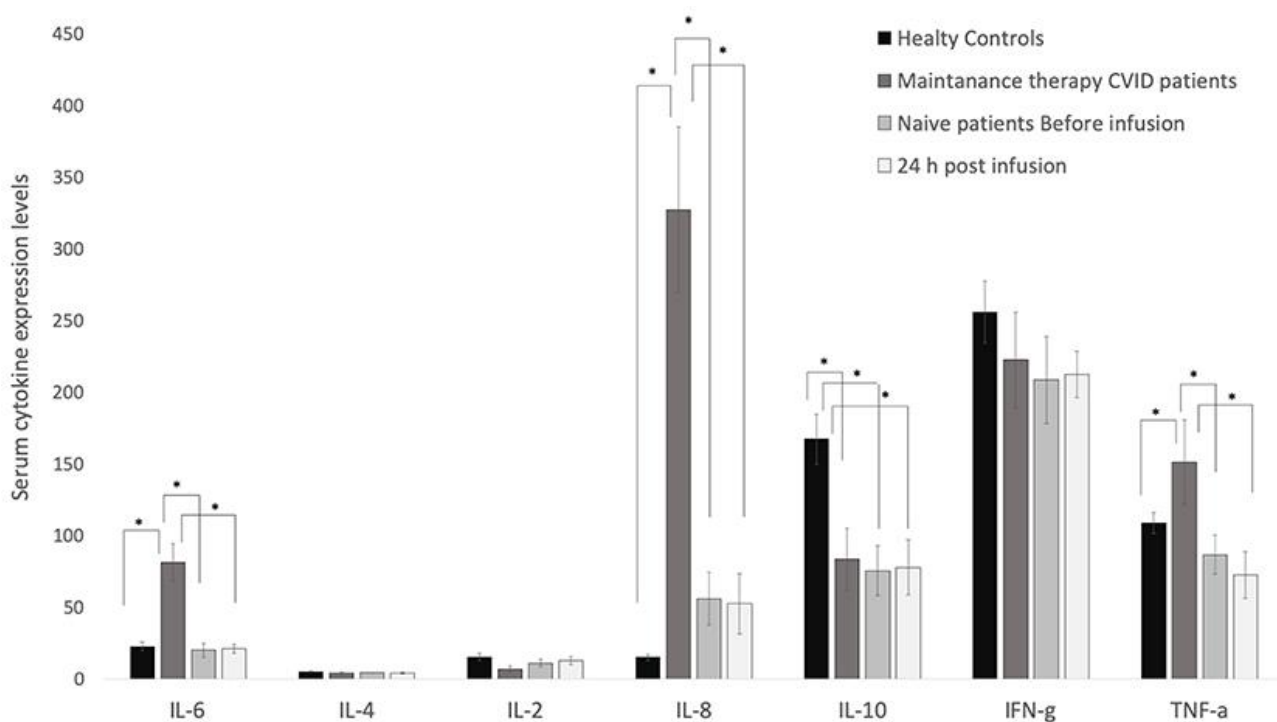
### Figura 3

Percentuale di cellule positive per AdipoR1 ed AdipoR2 nelle varie popolazioni linfocitarie (linfociti B CD19+, linfociti B CD19+CD27+, linfociti NK CD3-CD56+ e monociti CD14+), in controlli sani ed in pazienti con *CVID treatment naïve* a varie tempistiche (prima della prima infusione di immunoglobuline e 24 ore, 7, 14 e 21 giorni dopo). Risultati ottenuti da 2 esperimenti indipendenti realizzati mediante citofluorimetria a flusso, realizzati in triplicato. \* $p < 0.05$ .



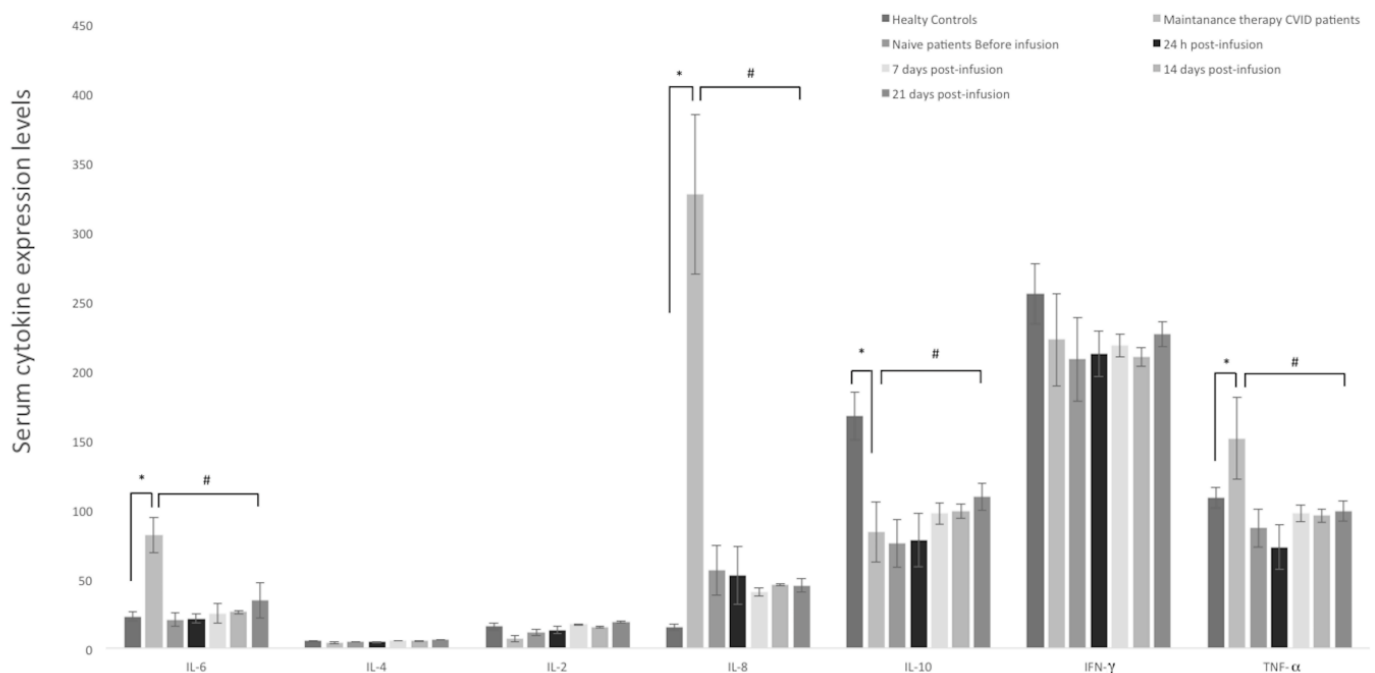
## Figura 4

I livelli sierici di IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  sono superiori nei pazienti con CVID rispetto ai controlli. Tali concentrazioni non sono modificate significativamente dopo terapia con immunoglobuline. Un test ELISA è stato effettuato per quantificare i livelli sierici di varie citochine in pazienti con CVID in terapia di mantenimento, in pazienti con CVID *treatment naïve* prima e 24 ore dopo la prima somministrazione di immunoglobuline, ed in controlli sani. Risultati ottenuti da 2 esperimenti indipendenti realizzati mediante citofluorimetria a flusso, realizzati in triplicato. \* $p < 0.05$ .



## Figura 5

Livelli sierici di IL-6, IL-4, IL-2, IL-8, IL-10, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  in pazienti con CVID e controlli sani. Il test ELISA è stato effettuato per valutare le concentrazioni di sieriche delle suddette citochine in controlli sani, pazienti con CVID in terapia di mantenimento ed in pazienti *treatment naïve* a varie tempistiche rispetto alla prima infusione di immunoglobuline (prima, 24 ore, 7, 14 e 21 giorni dopo). Risultati ottenuti da 2 esperimenti indipendenti realizzati mediante citofluorimetria a flusso, realizzati in triplicato. \* $p < 0.05$ .





UNIONE EUROPEA  
Fondo Sociale Europeo



Dottorando	<b>Dr. Pecoraro Antonio</b>
Tutor	<b>Prof. Giuseppe Spadaro</b>
Coordinatore	<b>Prof. Francesco Beguinot</b>
Corso di Dottorato	<b>Dottorato di Ricerca in Medicina Clinica e Sperimentale</b>
Ciclo	<b>33°</b>
Codice borsa	<b>DOT1318210 - Borsa 2</b>
CUP	<b>E62G17000000006</b>
Titolo Progetto	<b>Identificazione di biomarcatori nell'immunodeficienza comune variabile (CVID) e correlazione con la terapia sostitutiva con immunoglobuline</b>

La borsa di dottorato è stata cofinanziata con risorse del  
Programma Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-2020 (CCI 2014IT16M2OP005),  
Fondo Sociale Europeo, Azione I.1 "Dottorati Innovativi con caratterizzazione Industriale"



UNIONE EUROPEA  
Fondo Sociale Europeo

