

1222·2022  
**800**  
ANNI



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

**Studio dei microRNA circolanti in vescicole  
extracellulari nelle miopatie infiammatorie  
idiopatiche ed effetto della terapia con glucocorticoidi  
e immunosoppressori**

Relatore: Chiar.mo Prof. Giulio Ceolotto

Correlatore: Dr.ssa Alessandra Giannella

Laureando: Gioele Bevilacqua

Anno Accademico 2022/2023



# INDICE

<b>ABSTRACT:</b> .....	5
<b>INTRODUZIONE</b> .....	9
<b>1. MIOPATIE INFIAMMATORIE IDIOPATICHE (MII)</b> .....	9
1.1 Classificazione delle MII.....	9
1.2 Epidemiologia.....	10
1.3 Eziologia .....	10
1.4 Sottogruppi delle MII.....	11
1.5 Meccanismi patogenetici.....	14
1.6 Diagnosi.....	16
1.7 Prognosi.....	17
<b>2. TERAPIA</b> .....	18
2.1 Terapia farmacologica .....	19
2.2 Glucocorticoidi: definizione .....	19
2.3 Glucocorticoidi nelle MII.....	22
2.4 Prednisone .....	23
2.5 Immunosoppressori: definizione .....	24
2.6 Immunosoppressori nelle miopatie infiammatorie idiopatiche .....	24
<b>3. VESICOLE EXTRACELLULARI (EVs)</b> .....	27
3.1 Definizione e classificazione delle EVs .....	27
3.2 Indirizzamento alle cellule riceventi e assorbimento delle EVs .....	28
3.3 Il cargo delle EVs.....	30
3.4 Le funzioni biologiche .....	30
3.5 EVs nelle miopatie infiammatorie idiopatiche .....	31
<b>4. microRNA (miRNA)</b> .....	32
4.1 Definizione, biogenesi e funzione .....	32
4.2 miRNA nelle EVs .....	34
4.3 Il significato dei miRNA nelle MII .....	35
<b>SCOPO DELLO STUDIO</b> .....	37
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	39
<b>1. Selezione dei pazienti e dei donatori</b> .....	39
<b>2. Raccolta dei campioni</b> .....	39
<b>3. Isolamento e quantificazione delle EVs</b> .....	40
3.1 Analisi del tracciamento delle nanoparticelle (NTA) .....	40

3.2 Microscopia elettronica a trasmissione .....	41
<b>4. Estrazione e quantificazione dell'RNA .....</b>	<b>41</b>
<b>5. Preparazione e purificazione delle librerie .....</b>	<b>42</b>
5.1 Ligazione degli adattatori in 3' e 5' .....	42
5.2 Retrotrascrizione e clean-up del cDNA .....	42
5.3 Pre-amplificazione delle librerie e clean-up .....	43
5.4 Struttura completa delle sequenze di una libreria di small non-coding RNA .....	43
5.5 Quantificazione delle librerie .....	44
5.6 Controlli di qualità .....	44
<b>6. Diluizione e denaturazione delle librerie e Phi X .....</b>	<b>45</b>
<b>7. Caricamento sul sequenziatore NextSeq 550.....</b>	<b>45</b>
<b>8. Analisi bioinformatica .....</b>	<b>46</b>
8.1 Rimozione della sequenza degli adattatori .....	47
8.2 Allineamento delle sequenze.....	48
8.3 Normalizzazione delle conte (reads).....	48
8.4 Filtraggio dati.....	48
8.5 Analisi differenziale dell'espressione dei miRNA.....	49
<b>9. Analisi Statistica.....</b>	<b>49</b>
<b>RISULTATI .....</b>	<b>51</b>
<b>1. Caratteristiche della corte dei pazienti .....</b>	<b>51</b>
<b>2. Caratterizzazione delle EVs mediante IFC .....</b>	<b>53</b>
<b>3. Analisi dell'espressione dei miRNA nelle EVs di pazienti con MII .....</b>	<b>54</b>
3.1 Analisi dell'espressione dei miRNA .....	56
3.2 Analisi dell'espressione differenziale dei miRNA.....	56
<b>4. Analisi della rete dei bersagli genici dei miRNA.....</b>	<b>59</b>
<b>5. Analisi delle EVs e dell'espressione dei miRNA nei pazienti con CAM .....</b>	<b>59</b>
<b>6. Analisi differenziale degli effetti della terapia farmacologica sulla     concentrazione delle EVs e sull'espressione dei miRNA.....</b>	<b>61</b>
<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....</b>	<b>63</b>
<b>BIBLIOGRAFIA:.....</b>	<b>69</b>
<b>RINGRAZIAMENTI .....</b>	<b>77</b>

## **ABSTRACT:**

**Introduzione:** Le miopatie infiammatorie idiopatiche (MII) sono un gruppo eterogeneo di malattie rare immuno-mediate i cui meccanismi non sono ancora stati chiariti e per le quali sono ancora carenti biomarcatori per la diagnosi precoce. Le vescicole extracellulari (EVs) sono nanoparticelle implicate nel signaling intercellulare in grado di trasportare microRNA (miRNA), RNA e proteine. I miRNA sono brevi sequenze di RNA non codificante che regolano l'espressione genica post-trascrizionale. Recenti evidenze mettono in luce il loro ruolo nella fisiopatologia delle malattie autoimmuni. Comunque, il ruolo dei miRNA contenute nelle EVs-miRNA nei pazienti affetti da MII non è stato esaustivamente esplorato.

**Scopo dello studio:** Lo scopo dello studio è di caratterizzare nei pazienti affetti da MII le EVs plasmatiche, e di determinare, mediante tecnologia NGS, il profilo di espressione dei miRNA nelle EVs. Ci proponiamo inoltre di indagare l'effetto del trattamento farmacologico con glucocorticoidi o glucocorticoidi e immunosoppressori sulla concentrazione delle EVs circolanti e sulla espressione dei miRNA nei pazienti affetti da MII.

**Pazienti e Metodi:** In questo studio sono stati reclutati 47 pazienti adulti ( $\geq 18$  anni) affetti da MII in follow-up presso l'U.O.C. di Reumatologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova e 45 donatori sani (HD) appaiati per età e sesso. Si è ottenuto l'isolamento delle EVs tramite cromatografia ad esclusione dimensionale seguita da ultrafiltrazione. Concentrazione e dimensioni delle EVs sono state valutate tramite Nanoparticle tracking analysis ("Analisi del Tracciamento delle Nanoparticelle", NTA). La caratterizzazione del cargo dei miRNA delle EVs è stata realizzata mediante QIAseq miRNA Library Kit, le librerie sono state in seguito sequenziate mediante piattaforma Illumina NextSeq 550. L'analisi bioinformatica dell'espressione dei miRNA è stata eseguita mediante il software CLC Genomics Workbench.

**Risultati:** Tra il gruppo di pazienti affetti da MII e il gruppo di controllo, non sono state riscontrate differenze significative nella concentrazione delle EVs. L'analisi dei miRNA presenti nelle EVs ha evidenziato un profilo di espressione significativamente diverso tra i due gruppi. Quattro miRNA (miR-122-5p, miR-486-5p, miR-192-5p e miR-32-5p) sono risultati essere significativamente aumentati nelle EVs ottenuti dai pazienti con MII rispetto al gruppo di controllo, mentre quattro miRNA (miR-142-3p, miR-141-3p, Let-7a-5p e miR-3613-5p) sono risultati essere significativamente ridotti. I migliori valori di performance della curva ROC sono stati ottenuti per miR-486-5p (AUC =0.74)

e per miR-142-3p (AUC=0.79). La concentrazione delle EVs circolanti è risultata significativamente aumentata nel gruppo di pazienti affetti da MII associato alle neoplasie (cancer-associated myocytes, CAM) rispetto a quello senza neoplasie. Inoltre, l'analisi differenziale dei miRNA ha mostrato che il let-7f-5p è significativamente aumentato nei pazienti con CAM ( $p=0.001$ ), mentre il miR-143-3p è significativamente ridotto rispetto ai pazienti MII senza CAM ( $p=0.002$ ). Nei pazienti affetti da MII, la somministrazione farmacologica con glucocorticoidi e immunosoppressori ha ridotto la concentrazione delle EVs circolanti rispetto alla sola somministrazione con glucocorticoidi. Inoltre, l'associazione glucocorticoidi e immunosoppressori ha ridotto l'espressione di let-7f-5p ( $p=0.03$ ), di miR-4433b-5p ( $p=0.04$ ) e di miR-92a-3p ( $p=0.01$ ) e ha aumentato l'espressione di miR-27a-3p ( $p=0.03$ ) rispetto al trattamento con solo glucocorticoidi.

**Conclusioni:** Questo studio ha dimostrato il ruolo delle EVs circolanti come potenziali marcatori di MII e ha evidenziato come i miRNA presenti nelle EVs possono svolgere un ruolo importante come mediatori cellulari tra il sistema immunitario e il tessuto muscolare. Inoltre, la modulazione dell'espressione dei miRNA nelle EVs indotta dal trattamento farmacologico può fornire utili informazioni per lo sviluppo di efficaci terapie nelle MII.





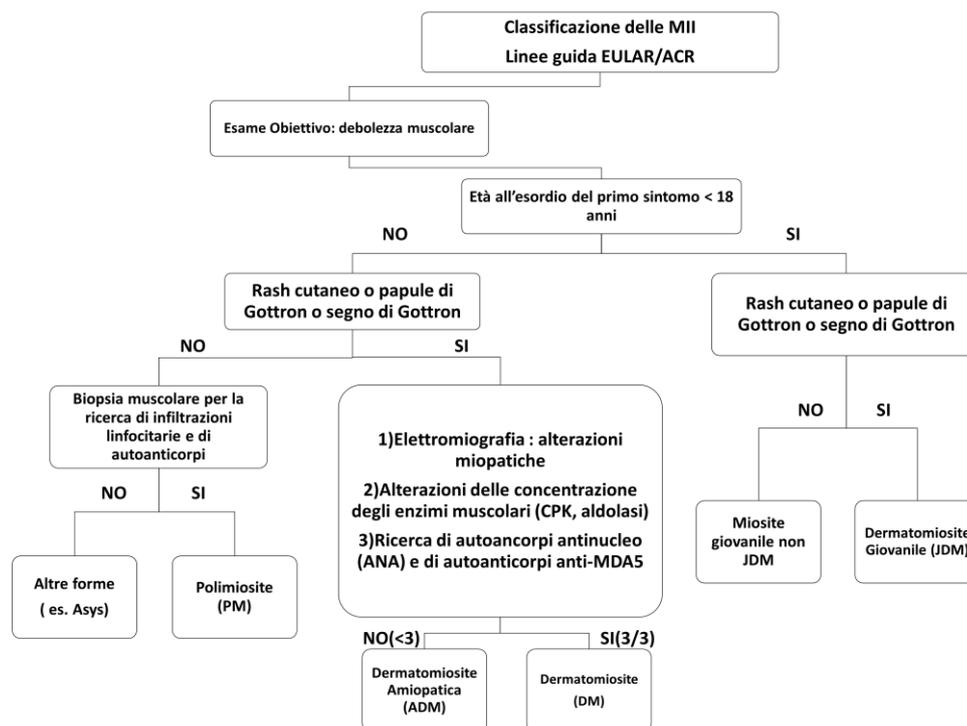
# INTRODUZIONE

## 1. MIOPATIE INFIAMMATORIE IDIOPATICHE (MII)

Le miopatie infiammatorie idiopatiche (MII), dette comunemente miositi, sono un gruppo eterogeneo di patologie di natura autoimmunitaria che colpiscono la muscolatura scheletrica. Le MII si presentano clinicamente con debolezza muscolare cronica e progressiva che interessa prevalentemente la muscolatura prossimale (cingoli scapolare e pelvico) in modo simmetrico; ne deriva un affaticamento muscolare che compromette numerose attività della vita quotidiana. Sono comunque frequenti anche manifestazioni extra-muscolari che coinvolgono la cute, le articolazioni, l'interstizio polmonare e il cuore. La diagnosi delle MII all'esordio è spesso complessa e non sempre riconosciuta in quanto i sintomi sono generalmente lievi e poco specifici (1) (2).

### 1.1 Classificazione delle MII

Il gruppo delle MII, secondo le recenti guide di classificazione dell'EULAR/ACR vengono suddivisi nei seguenti sottotipi: 1) dermatomiosite (DM), 2) polimiosite (PM), 3) miosite da corpi inclusi (IBM), 4) dermatomiosite amiopatica (ADM), 5) dermatomiosite giovanile (JDM), 6) miosite giovanile diversa da JDM (3).



**Figura 1.** Criteri di classificazione EULAR/ACR per le miopatie infiammatorie idiopatiche adulte e giovanili e i loro principali sottogruppi. (3)

## 1.2 Epidemiologia

Sono malattie rare, con incidenza che varia da 1 a 12 nuovi casi all'anno per milione di abitanti. In realtà, proprio per il fatto che si tratta di malattie rare, e quindi ancora poco conosciute, è probabile che tali dati siano sottostimati, dal momento che un significativo numero di pazienti verosimilmente sfugge alla diagnosi e alla ospedalizzazione. L'incidenza delle MII negli Stati Uniti è stimata tra 0.1 e 1 caso ogni 100.000 persone all'anno. Inoltre, è stato osservato che ci sono differenze geografiche significative, con una maggiore incidenza di queste malattie nelle regioni settentrionali rispetto a quelle meridionali, almeno in Europa e Nord America. Tutto ciò suggerisce che fattori ambientali come la mancanza di esposizione al sole nelle regioni settentrionali, che può causare una carenza di vitamina D, potrebbero influire nello sviluppo di queste malattie autoimmuni. Inoltre, l'incidenza delle MII aumenta con l'età. Il picco massimo di incidenza si verifica di solito tra i 40 e i 50 anni (4). In generale, il rapporto tra donne e uomini è di circa 2:1, tranne per due eccezioni importanti: la miosite da corpi inclusi (IBM) e la miopatia associata al cancro (CAM), dove il rapporto tra uomini e donne è rispettivamente di 3:1 e 2:1. È interessante notare che questa differenza di genere sembra essere meno marcata nelle forme giovanili (5). Per quanto riguarda la mortalità, i tassi variano notevolmente tra i diversi studi, oscillando tra il 20% e il 90%. La principale causa di morte legata alla malattia è rappresentata dalla rapida progressione della malattia polmonare interstiziale (ILD), particolarmente rilevante nelle fasi iniziali della malattia. Inoltre, possono contribuire all'aumento della mortalità anche gli eventi cardiovascolari e lo sviluppo di tumori maligni (6).

## 1.3 Eziologia

L'origine delle miopatie infiammatorie idiopatiche, ancora non completamente compresa, è multifattoriale e complessa, poiché coinvolge una serie di fattori di rischio di natura ambientale e genetica. Tra i fattori esterni che possono influenzare l'insorgenza delle MII, si possono annoverare le infezioni virali (come HBV, HCV, HIV, HTLV1), l'esposizione al sole, il fumo e l'uso delle statine; anche se il fattore genetico più significativo è rappresentato senza dubbio dall'aplotipo HLA (Antigene Leucocitario Umano) (7). Per quanto riguarda il ruolo dei virus, particolarmente rilevante per l'HIV (Virus dell'Immunodeficienza Umana) e l'HTLV1 (Virus Linfotropico delle Cellule T Umane Tipo 1), sembra che possa essere attribuito ad un processo di mimetismo molecolare basato su una reattività incrociata (8).

## **1.4 Sottogruppi delle MII**

### **Dermatomiosite**

La dermatomiosite (DM) è una patologia caratterizzata principalmente da infiammazione muscolare e da manifestazioni cutanee come il rash cutaneo e il segno di Gottron. Altri segni caratteristici includono le "mani da meccanico", la distrofia cuticolare e il rash cutaneo sulla parte laterale dell'anca. Alcuni pazienti possono sviluppare ulcere cutanee o calcinosi, che sono manifestazioni cutanee più rare ma difficili da trattare. L'infiammazione muscolare coinvolge diversi tipi di cellule immunitarie, tra cui linfociti B, macrofagi e linfociti T CD4+, con un ruolo significativo anche del sistema del complemento (5). Gli autoanticorpi associati alla dermatomiosite si dividono in due categorie principali: quelli specifici per la malattia (MSA), che sono fortemente indicativi per la diagnosi e correlati a specifici sintomi clinici, e quelli associati alla miosite (MAA), che possono essere presenti anche in altre malattie del tessuto connettivo. La positività agli autoanticorpi specifici può fornire indizi importanti sulla gravità e sulle manifestazioni cliniche della malattia (5).

### **Polimiosite**

La polimiosite (PM) è una malattia caratterizzata da debolezza muscolare progressiva, che solitamente coinvolge principalmente i muscoli della zona pelvica. In alcuni casi, possono essere interessati anche i muscoli del collo (9). Questa malattia è causata da un'infiammazione che coinvolge gli strati interni dei muscoli scheletrici. L'infiammazione è provocata da una reazione anomala del sistema immunitario, in particolare da linfociti T CD8+ e macrofagi, che attaccano erroneamente i muscoli stessi. La polimiosite è molto rara durante l'infanzia, ma l'incidenza aumenta dopo i vent'anni, e con una frequenza maggiore nelle donne (9). La diagnosi della polimiosite può essere complicata, specialmente se i sintomi coinvolgono solo i muscoli e non ci sono segni evidenti sulla pelle. Tuttavia, quando la malattia si diffonde in altre parti del corpo, il paziente può manifestare sintomi come febbre, stanchezza, perdita di peso, problemi polmonari, difficoltà nella deglutizione o miocardite (9). Non ci sono marcatori specifici che confermano la diagnosi della polimiosite, rendendo la diagnosi più complessa rispetto ad altre malattie simili (2).

## Miosite da corpi inclusi

La miosite da corpi inclusi (IBM) rappresenta la miopatia più frequente tra gli individui di età superiore ai 50 anni (10). E' caratterizzata principalmente da una debolezza lieve e progressiva, non dolorosa, del quadricipite femorale e dei flessori delle dita. Possono essere colpiti anche il bicipite, il tricipite, i muscoli del viso e quelli coinvolti nella deglutizione, provocando disfagia in metà dei pazienti (11) (10). L' IBM può essere associata ad altre condizioni, come la sindrome di Sjogren e la leucemia linfocitica granulosa grande (12). Alcuni pazienti possono anche avere comorbidità, come il diabete e le malattie cardiovascolari (11).

## Sindrome da anticorpi antisintetasi

La sindrome da anticorpi antisintetasi (ASyS) è una infiammazione muscolare caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi, che sono diretti contro un'aminoacil-tRNA sintetasi, una particolare proteina coinvolta nel processo di traduzione delle informazioni genetiche nelle proteine (13) (14).

## Miopatie necrotizzanti immuno-mediate

Le miopatie necrotizzanti immuno-mediate (IMNM) sono caratterizzate dalla presenza di una grave necrosi delle cellule muscolari, che porta a livelli molto elevati di creatin-fosfo-chinasi nel sangue e ad una forte debolezza muscolare, soprattutto a livello dei muscoli prossimali (15).

## Miosite associata al cancro

Inoltre, esiste una associazione tra i sottogruppi delle MII, in particolare la dermatomiosite, e il cancro. La presenza di neoplasia è segnalata nel 7-30 % dei pazienti e il rischio di neoplasia inoltre è maggiore in pazienti con un'età maggiore di 50 anni al momento della diagnosi di dermatomiosite. Dal punto di vista patologico, il sistema immunitario, sotto la guida delle cellule T, reagisce contro un neoantigene espresso dalle cellule tumorali, ma per errore attacca anche un autoantigene non mutato presente in altre cellule non tumorali. In modo analogo, la perdita di tolleranza immunitaria verso i propri tessuti può verificarsi anche quando il sistema immunitario produce anticorpi contro proteine normali del corpo che vengono esposte in modo atipico a causa della presenza del cancro. Tale meccanismo è stato ipotizzato anche per

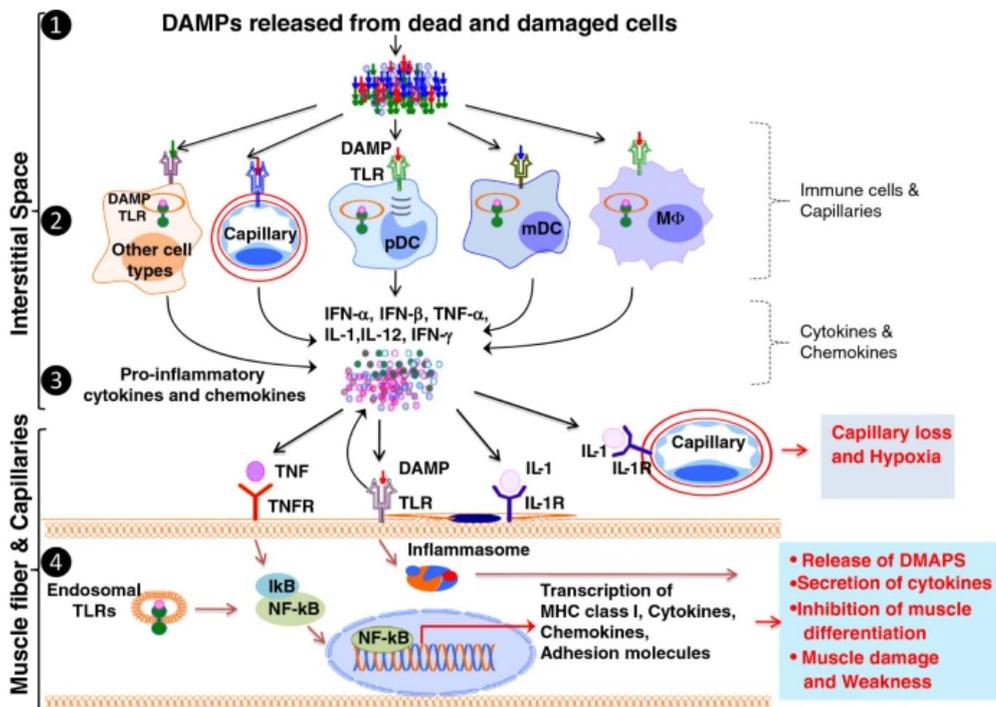
la miopatia causata dalle statine, dove l'uso di questi farmaci può alterare il normale funzionamento del sistema immunitario, determinando patologie muscolari (8).

### Miosite “overlap”

L'OM (miosite overlap) è una condizione in cui si verifica una sovrapposizione tra diverse categorie di malattie. In altre parole, è una situazione in cui si manifesta un'inflammazione muscolare in concomitanza con altre malattie del tessuto connettivo (CTD) come il Lupus Eritematoso Sistemico (LES), la Sindrome di Sjogren (SS), l'Artrite Reumatoide (RA) e la Sclerosi Sistemica (SSc). È importante notare che, rispetto ai pazienti con DM o PM, i pazienti affetti da OM mostrano un maggiore coinvolgimento extra-muscolare (16).

## 1.5 Meccanismi patogenetici

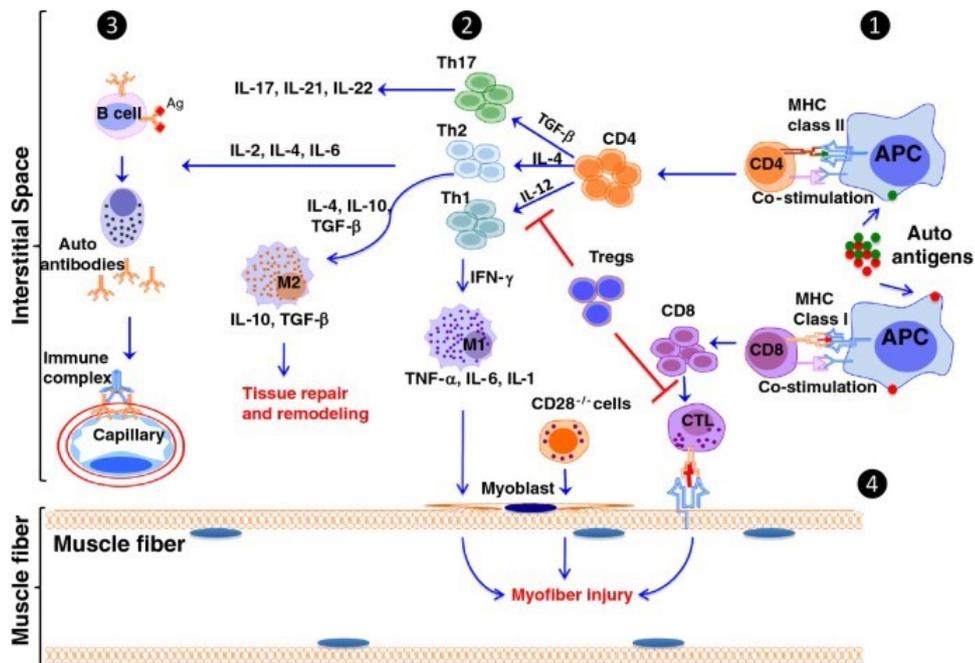
I meccanismi fisiopatologici coinvolti nella MII non sono ancora completamente noti. Il sistema immunitario innato gioca un ruolo fondamentale nel danneggiamento del tessuto muscolare. Il tessuto muscolare, in risposta a stimoli sia fisiologici che patologici (come le infezioni), rilascia segnali molecolari associati al danno (DAMPs) da cellule danneggiate. I DAMPs attivano una risposta immunitaria innata legandosi a recettori come i Toll-like receptor (TLR) presenti su diverse cellule, tra cui le fibre muscolari, i macrofagi infiltranti, le cellule dendritiche e altre. Questa attivazione innata porta alla produzione di citochine pro-infiammatorie come TNF- $\alpha$ , IL-1 e IFN- $\gamma$ , le quali causano danni ai capillari e ipossia nel tessuto muscolare. Inoltre, alcune citochine, come il TNF- $\alpha$ , possono anche causare direttamente la morte delle cellule muscolari e inibire la formazione di nuove fibre muscolari, determinando così la perdita di massa muscolare e la debolezza. Questi meccanismi contribuiscono alla complessità del danneggiamento muscolare nelle miopatie.



**Figura 2.** Rappresentazione dei meccanismi dell'immunità innata nel danneggiamento muscolare nelle miopatie. (17)

Tuttavia, anche il sistema immunitario adattativo svolge un ruolo cruciale nel danneggiamento dei muscoli. Quando il tessuto muscolare subisce danni, si attiva una risposta immunitaria complessa che coinvolge diverse cellule e citochine:

1. Le cellule presentanti l'antigene (APC) nel muscolo vengono attivate da segnali molecolari associati al danno (DAMPs) tramite i recettori Toll-like (TLR).
2. Le APC attivate stimolano i linfociti T CD4 e CD8, i quali attuano delle risposte specifiche contro autoantigeni.
3. I linfociti T CD4 attivati si differenziano in diverse categorie, come Th1, Th2 e Th17, ognuna delle quali produce citochine specifiche che influenzano diversi tipi cellulari.
4. Th1 produce citochine pro-infiammatorie e attiva macrofagi M1 che danneggiano le cellule muscolari.
5. Th2 promuove la riparazione dei tessuti e stimola la produzione di autoanticorpi.
6. I linfociti T CD8 attivati diventano cellule T citotossiche che danneggiano il muscolo attraverso enzimi citotossici (17).



**Figura 3.** Rappresentazione dei meccanismi dell'immunità adattativa nel danneggiamento muscolare nelle miopatie. (17)

## 1.6 Diagnosi

### Esami di laboratorio

I test di laboratorio utilizzati per la diagnosi ed il monitoraggio delle miositi possono essere divisi in 3 categorie:

1. test per il controllo dello stato generale del paziente e delle sue condizioni cliniche (VES, PCR, emocromo, ecc.);
2. misurazione della concentrazione degli enzimi e di sostanze derivate dal muscolo (creatin-fosfo-chinasi (CKP), la concentrazione della mioglobina (MB)). Il CPK in particolare è aumentato in circa l'80-90 % dei pazienti con malattia attiva, con valori di circa 10 volte il valore massimo normale, anche se, nei casi più severi, può arrivare fino a 100 volte il valore normale. Altri esami richiesti per la diagnosi sono la concentrazione dell'aldolasi, del lattato deidrogenasi (LDH), e delle transaminasi (aspartato aminotransferasi (GOT) e l'alanina aminotransferasi (ALT));
3. test immunologici: gli ANA sono positivi nel 50-80 % dei pazienti e il pattern nucleare "punteggiato" è il più frequente. Oltre a questi, che si ritrovano comunemente anche nelle altre connettiviti, vi sono anticorpi specifici per la miosite come gli anticorpi antisintetasi (Anti SRP) (18).

Inoltre, è fondamentale considerare anche le seguenti valutazioni strumentali: la risonanza magnetica muscolare, l'elettromiografia (EMG) e i test di funzionalità polmonare. La risonanza magnetica muscolare è in grado di discriminare tra condizioni di alterazione muscolare di tipo acuto e cronico, che possono avere una natura infiammatoria o degenerativa (19). L'EMG, invece, è utile per differenziare le cause di debolezza muscolare, sia di origine muscolare che neuropatica. Infine, i test di funzionalità polmonare sono fondamentali nel monitorare l'attività dell'ILD, la sua gravità e la risposta alla terapia (20).

*Tabella 1. Autoanticorpi specifici e associati alla miosite.*

Autoanticorpi specifici della miosite	Autoanticorpi associati alla miosite
Anti-Mi2 (20-30%)	Anti-Ro/SSA
Anti-MDA5	Anti-U1RNP
Anti- SAE	Anti-PM-Scl75
Anti-NXP2	Anti-PM-Scl100
Anti-MDA5	Anti-Ku
Anti-TIF1g	Anti-C1NA
Anti-t-RNA-sintetasi	
Anti-SRP	
Anti-HMGCR	

## 1.7 Prognosi

Una diagnosi tempestiva, seguita da un trattamento adeguato, è fondamentale per prevenire o ritardare l'atrofia muscolare e la perdita funzionale. Nelle MII, i principali fattori prognostici includono il tipo di malattia, i marcatori sierologici, la tempistica della diagnosi, l'età, la gravità della malattia all'esordio, l'estensione del coinvolgimento extra-muscolare e la possibile presenza di una neoplasia. Circa il 60% dei pazienti affetti da MII sperimenta un ciclo di recidiva e remissione della malattia nel tempo. I sintomi delle MII possono variare di intensità nel corso della malattia. Durante le fasi di recidiva, i sintomi possono peggiorare, mentre durante le fasi di remissione, possono migliorare o scomparire completamente. Nel rimanente 40% dei casi, i sintomi delle MII possono scomparire a causa dell'effetto degli immunosoppressori. Questi farmaci riducono l'attività del sistema immunitario, che è iperattivo nelle MII, e ciò può portare ad una riduzione dei sintomi. Tuttavia, è importante notare che l'uso prolungato di immunosoppressori può comportare rischi ed effetti collaterali significativi. Entro il primo anno dalla diagnosi delle MII, si raggiunge il picco massimo di mortalità. Ciò significa che il periodo subito dopo la diagnosi è particolarmente critico per i pazienti affetti da queste malattie, e il rischio di decesso è più elevato in questo periodo (2). Nelle MII, le principali cause di morte sono spesso legate a condizioni correlate alla malattia e possono essere le seguenti:

- malattie cardiovascolari: problemi cardiaci e vascolari possono essere una causa significativa di mortalità. L'infiammazione cronica associata alle MII può influenzare il sistema cardiovascolare;
- tumori maligni: i pazienti con MII hanno un rischio leggermente aumentato di sviluppare tumori maligni. Questo può essere dovuto all'attività autoimmune del sistema immunitario che può comportare alterazioni nelle cellule del corpo;
- ILD (Malattia Polmonare Interstiziale): si tratta di un'importante complicazione delle MII. Coinvolge il tessuto polmonare e può portare a difficoltà respiratorie. La progressione dell'ILD può influire sulla mortalità.

## **2. TERAPIA**

La terapia per le MII ha due obiettivi principali. Prima di tutto, deve aiutare il paziente a recuperare le capacità fisiche che potrebbero essere state compromesse a causa della malattia. In secondo luogo, la terapia deve prevenire il peggioramento dei muscoli e degli altri organi del corpo, evitando un'ulteriore progressione della malattia e di danni aggiuntivi.

Tipi di trattamenti:

- terapia non farmacologica come la fisioterapia e l'esercizio fisico per recuperare la forza e il tono muscolare.
- terapia farmacologica con glucocorticoidi e/o immunosoppressori.

## 2.1 Terapia farmacologica

**Tabella 2.** Elenco dei farmaci indicati per il trattamento delle miopatie infiammatorie idiopatiche (MII) e la loro efficacia. Le caselle nere indicano la possibile indicazione dei farmaci (21).

		GCs	MTX	AZA	CYATAC	MMF	CYC	HCQ	IVIG	RTX	Physical therapy
Disease involvement	Muscular	■	■	■	■	■	■	A	■	■	■
	Skin	■	■			■	■	■	■	■	
	ILD	■	B	■	■	■	■		■	■	
	Arthritis	■	■								■
	Dysphagia	■							■	■	
Auto-Ab positivity	Anti-synthetase				■						■
	Mi-2										■
	SRP										■

**A:** I pazienti dovrebbero essere monitorati per un'eventuale peggioramento della mialgia e delle malattie della pelle.

**B:** I pazienti dovrebbero essere monitorati per possibili tossicità polmonari correlate ai farmaci.

**GCs:** Glucocorticoidi, **MTX:** Metotrexato, **AZA:** Azatioprina, **CYA:** Ciclosporina, **TAC:** Tacrolimus, **MMF:** Micofenolato mofetile, **CYC:** Ciclofosfamide, **HCQ:** Idrossiclorochina, **IVIG:** Immunoglobuline intravenose, **RTX:** Rituximab, **ILD:** Malattia polmonare interstiziale.

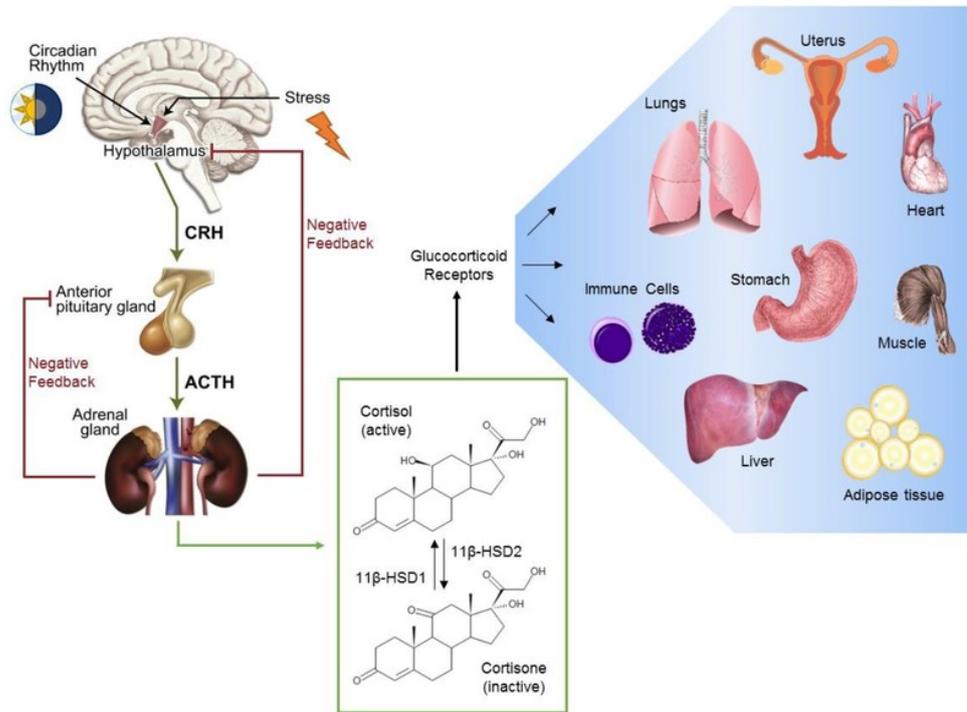
## 2.2 Glucocorticoidi: definizione

I glucocorticoidi vengono definiti “farmaci antinfiammatori steroidei”. Sono così definiti, poiché si tratta di farmaci derivati sinteticamente da ormoni steroidei, prodotti naturalmente dall'organismo. I glucocorticoidi possono essere utilizzati in diverse forme, inclusa la somministrazione sistemica, come compresse o iniezioni, e possono essere prescritti anche in casi di infezione. In alcune situazioni, sono più efficaci dei farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) nel gestire l'infiammazione, soprattutto nelle condizioni autoimmuni gravi (22).

### La sintesi dei glucocorticoidi

La sintesi dei glucocorticoidi, tra cui il cortisolo, è regolata da un sistema denominato asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA). Questo asse è fondamentale nel gestire la risposta del corpo allo stress, sia esso di tipo fisico che fisiologico, ed è parte di una rete di segnalazione altamente regolata. L'HPA è composto da una serie di segnali che

stimolano la produzione di cortisolo e da meccanismi a feedback negativo che aiutano a mantenere l'equilibrio nell'organismo (22).

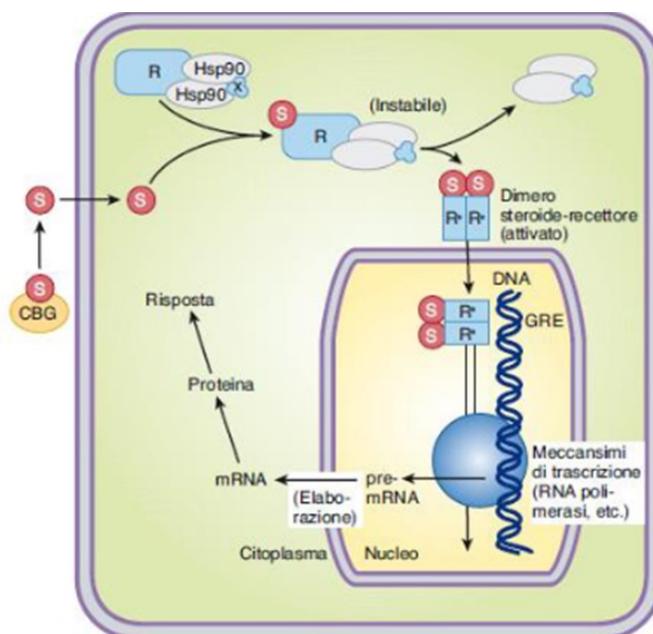


**Figura 4. Regolazione sistemica e a livello tissutale dei glucocorticoidi.** La sintesi dei glucocorticoidi è regolata dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), composto da segnali di stimolazione e a feedback negativo che controllano la secrezione dell'ormone rilasciante corticotropina (CRH) dall'ipotalamo, dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) dalla ghiandola pituitaria e infine del cortisolo dalle ghiandole surrenali. Il sistema enzimatico 11β-idrossisteroide deidrogenasi (11β-HSD) è responsabile dell'attivazione e della disattivazione del cortisolo, che in parte è responsabile della regolazione locale del cortisolo. Il cortisolo induce le sue influenze pleiotropiche sui tessuti periferici attraverso azioni mediate dal recettore dei glucocorticoidi, supportando la normale fisiologia e il funzionamento di questi sistemi organici. Figura adattata da (23) (24) (25).

## L'interazione di uno steroide con il recettore

I glucocorticoidi, sono considerati degli ormoni di natura lipofila, in grado di attraversare facilmente le membrane cellulari. All'interno della cellula, il glucocorticoide si lega ad un particolare recettore situato nel citoplasma della cellula stessa. Questo legame determina la formazione di un dimero che si trasferisce nel nucleo della cellula. Una volta nel nucleo, il dimero ha la capacità di modulare la trascrizione genica, attivando o disattivando i geni e alterando il processo di sintesi

proteica della cellula. Questo processo può avere un notevole impatto sul comportamento e sulle funzioni della cellula.



**Figura 5.** Modello di interazione di uno steroide, S (ad esempio il cortisolo), ed il suo recettore, R, e gli eventi successivi in una cellula bersaglio. Lo steroide è presente nel sangue in forma legata alla globulina che lega i corticosteroidi (CBG), ma entra nella cellula in forma libera. Il recettore intracellulare è ancorato a proteine stabilizzanti, tra cui due molecole della proteina dello shock termico 90 (Hsp90) ed altre indicate con X nella figura. Questo complesso recettoriale non ha la capacità di attivare la trascrizione genica. Tuttavia, quando una molecola di cortisolo interagisce con il recettore, si forma un complesso instabile che porta alla separazione della Hsp90 e delle altre proteine. Il complesso steroide-recettore può quindi formare dimeri, penetrare nel nucleo cellulare e legarsi alle sequenze regolatrici dei geni che rispondono ai corticosteroidi, chiamati elementi di risposta ai glucocorticoidi (GRE). Questo processo regola l'attività della RNA polimerasi II e dei fattori di trascrizione associati ad essa. È importante notare che molti fattori regolatori (non mostrati nella figura) possono essere coinvolti nell'attivazione (coattivatori) o nell'inibizione (corepressori) della risposta agli steroidi. L'mRNA risultante viene poi trascritto e trasportato nel citoplasma per la sintesi di nuove proteine, che costituiscono i mediatori finali della risposta ormonale. Inoltre, oltre a interagire con le sequenze GRE, il complesso steroide-recettore può interagire con altri fattori di trascrizione, come il NFκB (Fattore di Necrosi Tumorale Nucleare KB, non mostrato nella figura), all'interno del nucleo cellulare, influenzando così la loro funzione. (26)

## Assorbimento e metabolismo dei glucocorticoidi sintetici

I glucocorticoidi sintetici sono farmaci liposolubili assorbiti rapidamente quando assunti per via orale, raggiungendo la concentrazione massima nel sangue in 1-3 ore, specialmente nelle formulazioni a rilascio immediato. Questi farmaci presentano varie caratteristiche; ad esempio, l'idrocortisone è di classe II con una velocità di dissoluzione più lenta, mentre il prednisolone è di classe I con elevata permeabilità e solubilità. Il

legame con le proteine plasmatiche, incluso il rischio di saturazione della globulina legante i corticosteroidi, influisce sulla disponibilità del farmaco attivo nel sangue. Inoltre, sono soggetti a processi di conversione enzimatica guidati dall'11 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi. Il loro metabolismo avviene principalmente nel fegato e vengono eliminati principalmente attraverso i reni, sia come metaboliti inattivi che come farmaco non metabolizzato. La durata d'azione varia: l'idrocortisone e il prednisolone hanno un'azione breve, il metilprednisolone è simile, mentre il desametasone ha un'azione molto più prolungata (22).

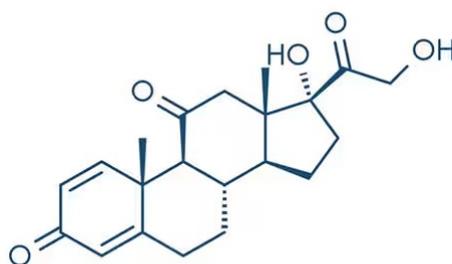
### **2.3 Glucocorticoidi nelle MII**

L'utilizzo di glucocorticoidi, anche se non ci sono dati definitivi da studi controllati e randomizzati che ne confermino l'efficacia, rappresenta il trattamento di prima linea per i pazienti affetti da MII. Questi farmaci sono utilizzati in quanto aiutano a ridurre l'infiammazione muscolare. Infatti in più del 60% dei pazienti trattati, si è notato un miglioramento dei sintomi muscolari. Questo effetto è già particolarmente evidente all'inizio del trattamento, soprattutto nei primi 6 mesi (21). Inizialmente, soprattutto nei pazienti con coinvolgimento muscolare e polmonare, si somministrano glucocorticoidi per via orale con una dose pari a 1mg/kg/die per quattro o sei settimane (27). Per i pazienti con coinvolgimento polmonare più grave, talvolta si utilizzano con successo, dosi più elevate di glucocorticoidi. Tuttavia, in caso di malattia più lieve o in presenza di altre condizioni mediche come l'ipertensione, il diabete o il glaucoma, la dose può essere inferiore. In situazioni selezionate, può essere prescritta una dose ancora più alta, fino a 2 mg/kg/die. Per i pazienti con malattie più gravi e coinvolgimento di altri organi (oltre ai muscoli), può essere necessario un trattamento con glucocorticoidi per via endovenosa (27). Questo è spesso raccomandato per pazienti con grave compromissione muscolare, ulcere cutanee, difficoltà nella deglutizione o malattia polmonare interstiziale (ILD). In questo caso, si utilizza solitamente il metilprednisolone per via endovenosa a dosi elevate (da 500 a 1000 mg al giorno per tre giorni consecutivi). La dose più alta viene mantenuta per 2-4 settimane e poi gradualmente ridotta del 20-25% ogni mese fino a raggiungere una dose più bassa di prednisone (21). È importante notare che, specialmente nei casi di trattamento cronico con glucocorticoidi, può essere necessaria un'associazione con farmaci immunosoppressivi per gestire gli effetti collaterali e prevenire il peggioramento della malattia (27). I glucocorticoidi possono causare una serie di effetti collaterali, tra cui diabete mellito, dislipidemia, aumento di peso, problemi gastrointestinali, maggiore

suscettibilità alle infezioni, crescita eccessiva dei peli sul corpo (irsutismo), cambiamenti dell'umore, aspetto "cushingoide" (sindrome di Cushing), ipertensione, cataratta e glaucoma. Alcuni studi suggeriscono che il desametasone, somministrato per via orale può essere altrettanto efficace quanto il metilprednisolone, ma con minori effetti collaterali. Tuttavia, l'associazione con un farmaco immunosoppressivo dovrebbe essere presa in considerazione fin dalle prime fasi del trattamento, poiché un trattamento precoce può portare a risultati migliori per i pazienti affetti da MII (21).

## 2.4 Prednisone

Il prednisone è un farmaco appartenente alla categoria dei corticosteroidi sistemici, noti anche come glucocorticoidi. Viene utilizzato per diverse finalità, sia come terapia sostitutiva (in condizioni in cui il corpo non produce abbastanza cortisolo), sia per trattare patologie infiammatorie gravi di tipo reumatico, come malattie delle articolazioni e dei muscoli, sia per condizioni bronchiali e polmonari come l'asma. Il prednisone rappresenta uno dei glucocorticoidi maggiormente utilizzati nel trattamento delle MII. Somministrato per via orale, viene convertito nel suo composto attivo, il prednisolone, responsabile degli effetti terapeutici desiderati. Il dosaggio è molto importante e spesso segue cicli di trattamento, con un'alta biodisponibilità e una rapida metabolizzazione nel fegato. Tuttavia, va notato che può sopprimere l'asse HPA coinvolto nella produzione naturale di cortisolo, quindi la sospensione del trattamento richiede una graduale riduzione della dose per consentire al corpo di riprendere la produzione endogena di cortisolo e prevenire la sindrome da astinenza. Questo processo graduale è cruciale per evitare complicazioni e permette la valutazione di terapie alternative in base alle esigenze e alla condizione clinica del paziente (28).



*Figura 6. Struttura chimica del prednisone.*

## 2.5 Immunosoppressori: definizione

Gli immunosoppressori sono farmaci che rallentano o limitano la risposta naturale del nostro sistema immunitario. Il loro meccanismo farmacologico può variare a seconda del tipo di farmaco, ma in generale, mirano a ridurre l'attività delle cellule del sistema immunitario che possono essere iperattive o che stanno contribuendo a reazioni autoimmuni o infiammatorie. I loro principali meccanismi di azione sono i seguenti:

- inibizione della proliferazione cellulare;
- inibizione della sintesi di DNA e RNA;
- blocco di specifici recettori;
- inibizione delle citochine infiammatorie;
- eliminazione selettiva delle cellule immunitarie.

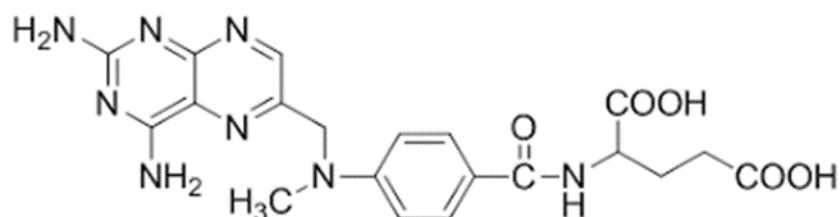
Tuttavia, è importante sottolineare che possono anche aumentare il rischio di infezioni e causare altri effetti collaterali, poiché indeboliscono le difese naturali del nostro organismo. Pertanto, il loro uso è attentamente valutato e monitorato da un medico per bilanciare i benefici terapeutici con i potenziali rischi.

## 2.6 Immunosoppressori nelle miopatie infiammatorie idiopatiche

Nel trattamento delle malattie muscolari con sintomi cutanei, come la dermatomiosite (DM) e la polimiosite (PM), vengono utilizzati diversi farmaci immunosoppressori per controllare l'infiammazione e migliorare i sintomi. Di seguito, vengono discussi alcuni di questi farmaci e le loro caratteristiche principali:

- **Metotressato (MTX):** è uno dei farmaci più comunemente usati per queste malattie e può essere somministrato attraverso diverse vie, come quella orale, sottocutanea o intramuscolare fino ad una dose di 20-25 mg a settimana. Recentemente, è stato dimostrato che il suo utilizzo non causa danni polmonari e può addirittura rallentare la progressione delle malattie polmonari interstiziali (ILD). Spesso, il MTX viene usato in associazione ai glucocorticoidi per ottenere migliori risultati. Inoltre, durante l'assunzione del MTX è importante assumere integratori di acido folico, per ridurre gli effetti collaterali e viene evitato in gravidanza a causa del rischio teratogeno. Gli effetti collaterali più comuni del MTX comprendono un aumento del rischio di infezioni, danni al fegato (epatotossicità) e alterazioni dell'emocromo. Inoltre,

l'uso di MTX richiede una particolare attenzione nei pazienti che hanno problemi renali preesistenti o che stanno assumendo farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS), poiché questi farmaci possono interagire o aumentare il rischio di effetti collaterali. Va sottolineato che, nonostante la sua efficacia, a causa del possibile rischio di tossicità polmonare, in alcuni casi si preferiscono altri immunosoppressori per trattare le malattie muscolari. Ad esempio, nei pazienti con malattie muscolari e cardiopatie congenite, la terapia iniziale spesso comprende l'uso combinato di immunosoppressori e glucocorticoidi per gestire le varie complicazioni legate alla malattia.



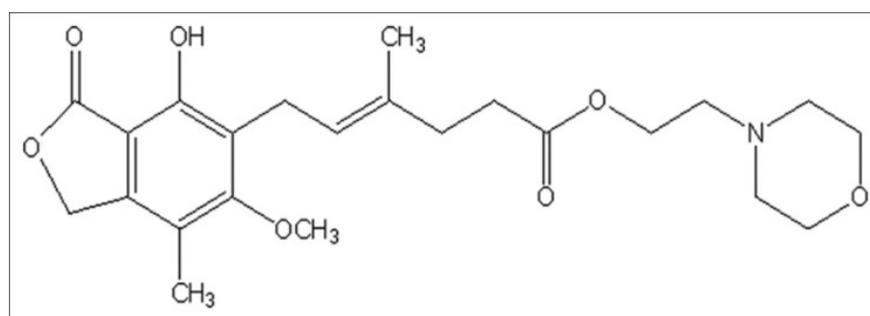
*Figura 7. Struttura chimica del metotressato.*

- **Azatioprina (AZA):** è un farmaco antimetabolita utilizzato per trattare la polimiosite. Agisce interferendo con il metabolismo delle purine e la sintesi di RNA e DNA nelle cellule. Un aspetto interessante è che ha effetti simili ai glucocorticoidi, come il prednisone, riducendo la necessità di dosi elevate di prednisone nei pazienti. Sebbene le prove siano ancora in corso, sembra essere un trattamento efficace per la polimiosite associata a malattie polmonari interstiziali (MII-ILD), con risultati simili al metotrexato in termini di efficacia e sopravvivenza. La somministrazione è orale, inizialmente con una dose di 50 mg/die, con dosi crescenti fino a un massimo di 2 mg/kg/die. Gli effetti collaterali comuni possono essere l'emesi, l'epatotossicità e la mielosoppressione.



*Figura 8. Struttura chimica dell'azatioprina.*

- **Micofenolato mofetile (MMF):** è un farmaco che inibisce la proliferazione delle cellule T e B del sistema immunitario ed è stato studiato nel contesto delle miopatie infiammatorie idiopatiche (MII). Il MMF ha dimostrato effetti benefici, specialmente nelle manifestazioni cutanee della dermatomiosite (DM) e nelle MII con malattie polmonari interstiziali (ILD), incluso nei casi rapidamente progressivi. La somministrazione è orale, con una dose iniziale di solitamente 500 mg due volte/die, aumentata gradualmente fino a 2-3 g/die, suddivisi in due dosi. Solitamente è ben tollerato, ma potrebbero verificarsi effetti gastrointestinali e variazioni ematiche, come la neutropenia. Si richiede il monitoraggio regolare dell'emocromo, degli enzimi epatici e della funzionalità renale. C'è un rischio aumentato di infezioni, alcune gravi, quindi il MMF non è raccomandato durante la gravidanza.



*Figura 9. Struttura chimica del micofenolato mofetile.*

- **Ciclosporina-A (CYA) e Tacrolimus (TAC):** sono inibitori della calcineurina (CNIs) utilizzati per trattare le MII. Questi farmaci inibiscono l'attivazione delle cellule T e la produzione di citochine come l'IL-2. Sono efficaci per migliorare i sintomi muscolari e respiratori, soprattutto nei pazienti con autoanticorpi anti-aminoacil-tRNA sintetasi (anti-ARS). La CYA viene assunta per via orale (2-4 mg/kg/die), mentre con il TAC si parte con una dose di 1-2 mg/die, con adattamento graduale (5-20 ng/ml). Richiedono monitoraggio costante per evitare effetti collaterali come problemi renali, epatici, ipertensione, e ipertricosi.
- **Ciclofosfamide (CYC):** è un farmaco originariamente sviluppato per il trattamento dei tumori, ma viene utilizzato anche nelle forme gravi di malattie reumatiche. La CYC è stata impiegata nei pazienti con miopatie infiammatorie idiopatiche dimostrandosi efficace nel migliorare sia i sintomi respiratori che

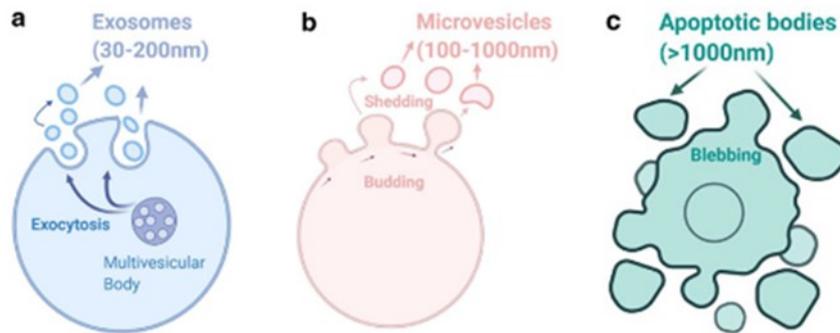
quelli muscolari, incrementando la forza muscolare e riducendo gli enzimi muscolari (21).

### **3. VESCICOLE EXTRACELLULARI (EVs)**

#### **3.1 Definizione e classificazione delle EVs**

Le vescicole extracellulari (EVs) sono piccole vescicole rivestite da un doppio strato fosfolipidico, prodotte da molte tipologie cellulari con lo scopo di veicolare il proprio contenuto (*cargo*) alle cellule bersaglio. Le EVs infatti vengono rilasciate nei fluidi biologici (plasma, siero, liquido sinoviale) (29) (30), e contengono una varietà di componenti cellulari, tra cui proteine, lipidi, acidi nucleici, mRNA e miRNA, e influenzano diversi processi fisiopatologici (31) (32). Sulla base delle dimensioni e del meccanismo di biogenesi le EVs possono essere distinte in esosomi, microvescicole (MV) e corpi apoptotici. Gli esosomi sono un gruppo eterogeneo di vescicole con dimensioni che variano da 40 a 160 nm la cui formazione deriva principalmente dalla invaginazione della membrana plasmatica a formare l'endosoma. Le MV hanno dimensioni comprese fra 50 nm e 1 µm e si originano direttamente dalla membrana plasmatica mediante gemmazione verso l'esterno. I corpi apoptotici si formano in seguito alla frammentazione della cellula secondaria al processo di apoptosi e hanno una dimensione compresa fra 0,5 e 4 µm.

Nel 2018, al fine di uniformare la nomenclatura, la Società Internazionale delle Vescicole Extracellulari ha proposto le linee guida ("Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles"), suggerendo di utilizzare il termine generico "vescicole extracellulari" (EVs) e di distinguere tra "EVs piccole" (< 200 nm) e "EVs medie/grandi" (> 200 nm) in base alla loro caratterizzazione fisica o in base alla loro composizione biochimica, e alla loro marcatura con le tetraspanine (CD63+/CD81+) (33).



**Figura 10.** Tipi di vescicole extracellulari. Classificazione di diversi tipi di EVs. Differiscono principalmente per la biogenesi e le dimensioni. Adattato da Gurung S et al. *Cell Commun Signal.* 2021 (34)

### 3.2 Indirizzamento alle cellule riceventi e assorbimento delle EVs

Le EVs sono, quindi, importanti mediatori inter-cellulari e sono coinvolti in una moltitudine di processi, sia fisiologici (coagulazione, sorveglianza immunitaria) che patologici (tumorigenesi, formazione di metastasi). Una volta rilasciate nel fluido extracellulare, le vescicole extracellulari (EVs) possono indurre una risposta nelle cellule bersaglio in due modi: attivando recettori di membrana oppure rilasciando nel citoplasma il proprio *cargo* che può contenere: proteine (es. fattori di trascrizione), acidi nucleici (es. mRNA e microRNA) e lipidi.

. Questo processo può avvenire in due modi:

1. Contatto diretto: le EVs possono contenere molecole di superficie che interagiscono direttamente con recettori sulla membrana delle cellule bersaglio. Queste interazioni possono attivare segnali all'interno delle cellule bersaglio senza che le EVs stesse entrino nella cellula. Questo meccanismo è simile ad una sorta di "comunicazione a distanza" tra le cellule (35).
2. Assorbimento: le EVs possono anche essere assorbite dalle cellule bersaglio. Questo può avvenire in due modi principali:
  - fusione delle membrane: in questo caso, le EVs si fondono direttamente con la membrana delle cellule riceventi. Questa fusione permette al contenuto delle EVs di essere rilasciato direttamente all'interno della cellula ricevente.

- internalizzazione tramite endocitosi: le EVs possono anche essere "assorbite" dalle cellule riceventi attraverso un processo chiamato endocitosi. In questo processo è come se la cellula ricevente le "inghiottisse" in piccole sacche chiamate vescicole.

Una volta che le EVs sono all'interno delle cellule riceventi, possono trasferire diversi tipi di molecole, come i miRNA che possono influenzare l'espressione dei geni, o gli mRNA che possono essere tradotti per produrre proteine funzionali. Inoltre, altre molecole importanti come il DNA genomico (gDNA), il DNA mitocondriale (mtDNA), lunghe catene di RNA non codificante (lncRNA) e proteine possono essere consegnate alle cellule riceventi (36). Le EVs possono essere assorbite attraverso diversi processi di endocitosi, come l'endocitosi mediata dai recettori o altri tipi di endocitosi (36) (35).

**Tabella 3.** Panoramica delle principali caratteristiche dei differenti tipi di vescicole derivate dalle cellule eucariotiche.

	Diametro	Densità	Morfologia (TEM)	Cellula di origine	Origine	Composizione
	Nm	g/ml				
<b>Esosomi</b>	50-100	1.13-1.19	A forma di coppa	La maggior parte dei tipi di cellule	Membrana plasmatica; endosoma	Composizione biochimica nota, ma molti lipidi e proteine non sono specifici degli esosomi
<b>Microvescicole</b>	20-1000	Sconosciuta	A forma di coppa	La maggior parte dei tipi di cellule	Membrana plasmatica	Poco conosciuta
<b>Corpi apoptotici</b>	1000-5000	1.16-1.28	Eterogenea	Tutti i tipi di cellule	Membrana plasmatica, reticolo endoplasmatico	Istoni, DNA

### 3.3 Il cargo delle EVs

Le EVs, contengono diverse molecole come proteine, lipidi e acidi nucleici, che possono essere trasferite nelle cellule e svolgere un ruolo fisiopatologico (35). Le proteine all'interno delle EVs sono varie e possono avere un ruolo nella formazione delle VE, nel trasporto delle vescicole e nella trasmissione dei segnali tra le cellule. In particolare un gruppo di proteine di membrana dette tetraspanine svolgono un ruolo importante nella caratterizzazione delle EVs (37) (38) (39) (40). Le EVs contengono anche diversi lipidi come, colesterolo, sfingolipidi (inclusa sfingomieline e ceramide), fosfolipidi, glicerofosfolipidi come la fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamide (PE), fosfatidilinositolo (PI) (37). Le EVs trasportano una varietà di materiale genetico come mRNA e miRNA, funzionalmente attivo. I miRNA extracellulari "incapsulati" all'interno delle EVs possono essere trasferiti alle cellule riceventi, sono in grado di regolare l'espressione genica a livello post trascrizionale. Inoltre le EVs derivate da cellule tumorali possono contenere DNA che porta le mutazioni presenti nelle cellule tumorali di partenza e possono essere utilizzati come biomarkers di malattia (41) (42) (43).

### 3.4 Le funzioni biologiche

Le EVs sono coinvolte in una serie di processi sia fisiologici che patologici (44). Un numero crescente di evidenze scientifiche supporta il ruolo delle EVs nella comunicazione tra cellule, sia agendo localmente su cellule vicine, che a distanza, attraverso la circolazione sanguigna. Le EVs svolgono un ruolo cruciale nel trasporto di acidi nucleici, lipidi e proteine da una cellula all'altra. Queste molecole vengono protette all'interno delle EVs, evitando la loro degradazione da parte degli enzimi presenti nell'ambiente extracellulare. Le EVs influenzano le vie di trasduzione del segnale delle cellule riceventi rilasciando molecole segnale, trasferendo molecole di RNA regolatorie o messaggeri e proteine. Inoltre, possono rimuovere recettori di membrana dalle cellule riceventi, un processo che avviene durante la maturazione dei reticolociti (45). Le EVs possono anche aiutare le cellule a eliminare molecole indesiderate, come gli aggregati di  $\beta$ -amiloide e  $\alpha$ -sinucleina, quando l'attività dei lisosomi (le strutture cellulari deputate a questa funzione), è compromessa (42). È stato dimostrato che le EVs hanno proprietà pro-coagulanti, anti-coagulanti e fibrinolitiche. Promuovono la maturazione dei reticolociti in eritrociti, stimolano la formazione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi), regolano lo sviluppo embrionale e la rigenerazione dei tessuti, e influenzano la plasticità delle sinapsi e l'interconnessione delle microglie

nel sistema nervoso (46). Inoltre, le EVs svolgono un ruolo chiave sia nell'immunità innata che in quella adattativa. Regolano il processo infiammatorio, trasportano citochine pro-infiammatorie, promuovono la presentazione degli antigeni e influenzano il funzionamento del sistema immunitario. In particolare, le EVs possono veicolare il MAC (complesso d'attacco alla membrana), una proteina coinvolta nel sistema del complemento, che può essere rilasciata per proteggere le cellule dalla sua attivazione. Tuttavia, in alcune malattie, le EVs possono anche attivare il sistema del complemento in modo eccessivo, contribuendo allo sviluppo di patologie come trombosi e infiammazioni. Le EVs rilasciate dalle cellule dendritiche presentano sulla loro superficie molecole tipiche della cellula donatrice, come il MHC-I (complesso maggiore di istocompatibilità di classe I), il MHC-II (complesso maggiore di istocompatibilità di classe II) e molecole di adesione. Ciò stimola la presentazione degli antigeni alle cellule T CD8+ e T CD4+, svolgendo un ruolo cruciale nell'immunità adattativa. Inoltre, le EVs rilasciate dai linfociti T regolatori (Treg) contengono specifici miRNA che possono inibire la proliferazione dei linfociti T CD4+, svolgendo un ruolo immunosoppressivo (47).

### **3.5 EVs nelle miopatie infiammatorie idiopatiche**

Le vescicole extracellulari stanno emergendo con estremo interesse nella ricerca medica, soprattutto quando si tratta di malattie autoimmuni (48). Ciò che le rende così interessanti è la loro capacità di riflettere lo stato di salute delle cellule che le hanno rilasciate e il loro ambiente circostante. Un aspetto intrigante delle EVs è la loro presenza nei fluidi corporei, come il sangue. Questo li rende potenzialmente accessibili tramite una procedura diagnostica chiamata "biopsia liquida", che è molto meno invasiva rispetto alle biopsie tradizionali che richiedono il prelievo di campioni di tessuto. Le EVs potrebbero quindi essere utilizzate come strumenti per diagnosticare precocemente una serie di condizioni mediche. L'analisi del contenuto delle EVs può fornire importanti indizi sulla patogenesi della malattia. Ad esempio, le proteine e gli acidi nucleici contenuti nelle EVs possono essere usati come indicatori per valutare l'attività della malattia. Inoltre, possono essere utilizzati per stratificare il rischio di un paziente o per determinare la risposta alla terapia (49).

Le EVs inoltre possono contenere molecole, come miRNA e proteine, coinvolte nell'infiammazione e nella regolazione delle risposte immunitarie (50) (51). Inoltre, alcuni studi hanno riportato la presenza in pazienti affetti da MII di EVs contenenti anticorpi associati alle miositi, suggerendo che potrebbero essere coinvolte nella risposta immunitaria della miosite (52) (53).

Una caratteristica unica delle EVs è la loro capacità di proteggere il loro "carico utile" durante il trasporto. Di conseguenza, le informazioni contenute nelle EVs possono essere conservate per lungo tempo prima dell'analisi, il che è particolarmente utile per il monitoraggio a lungo termine delle malattie. L'uso delle EVs come biomarcatori non si limita alle malattie autoimmuni, ma si estende anche al cancro. Possono essere utilizzate per il monitoraggio longitudinale delle malattie oncologiche e per la diagnosi precoce di recidive. Inoltre, il contenuto delle EVs potrebbe fornire preziose informazioni sulla risposta dei pazienti ai trattamenti (54). In conclusione, le EVs rappresentano una promettente area di ricerca nella medicina diagnostica. La loro presenza nei fluidi corporei offre un modo non invasivo per ottenere informazioni cruciali sulla salute delle cellule e sullo stato di una malattia. L'analisi delle EVs potrebbe aprire la strada a diagnosi più precoci, monitoraggio a lungo termine delle malattie e personalizzazione dei trattamenti, migliorando così la gestione delle condizioni mediche (55).

## **4. microRNA (miRNA)**

### **4.1 Definizione, biogenesi e funzione**

I microRNA, o miRNA, sono piccole molecole di RNA che svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione genica nei nostri organismi. Sono stati scoperti per la prima volta durante gli studi condotti su *Caenorhabditis* nel 1993 (56) e da allora sono stati oggetto di intensa ricerca. Si stima che costituiscano circa l'1-5% dell'intero genoma umano e che contribuiscano a regolare più del 30% dei geni che codificano proteine (57). I miRNA sono classificati come "small non-coding RNA" (piccoli sequenze di RNA non codificanti). Sono composti da sequenze di RNA a singolo filamento con una lunghezza media di circa 22 nucleotidi, anche se questa lunghezza può variare leggermente. La loro funzione principale è quella di regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale. Si legano a specifici mRNA (RNA messaggeri) di geni bersaglio e impediscono che questi vengano tradotti in proteine dai ribosomi.

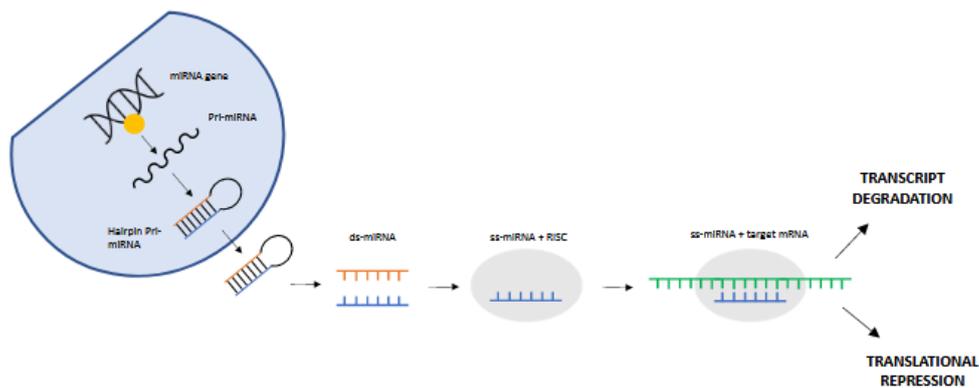
La biogenesi dei miRNA può avvenire attraverso due processi principali:

- Trascrizione del pri-miRNA: se la sequenza per il miRNA è situata in una regione intergenica del DNA, viene trascritta in una molecola detta pri-miRNA.

Successivamente, questa molecola subisce una serie di processi di maturazione nucleare, tra cui il clivaggio da parte di un complesso noto come "microprocessor," che è composto da due proteine chiamate DGCR8 ("Regione Critica "8" della Sindrome di DiGeorge") e Drosha. Questo processo genera il pre-miRNA.

- Rimozione intronica: se la sequenza del miRNA fa parte di una regione intronica di un gene che codifica proteine, il pri-miRNA verrà trascritto come parte di un mRNA non maturo. Durante il processo di splicing, il miRNA verrà rimosso dall'mRNA.

Il pre-miRNA, una volta formato, viene trasportato dal nucleo al citoplasma da proteine trasportatrici come l'Esportina-5 e il RanGTP, che ne proteggono l'integrità. Nel citoplasma, il pre-miRNA subisce ulteriori tagli grazie all'azione dell'endonucleasi "Dicer," generando così il miRNA maturo. Il miRNA maturo entra quindi a far parte di un complesso proteico chiamato RISC (RNA-induced silencing complex, un complesso effettore proteico), che agisce come mediatore per la degradazione o l'inibizione della traduzione dell'mRNA del gene bersaglio. Questo meccanismo di regolazione avviene nel citoplasma, all'interno di strutture chiamate P-body, che sono compartimenti cellulari coinvolti nella regolazione dell'espressione genica. Quando un miRNA si lega ad un mRNA, può influenzare la sua attività. L'aspetto interessante è che la complementarità tra un miRNA e un mRNA non è sempre perfetta, ma può essere parziale. Questo significa che un singolo miRNA può avere un effetto su molti diversi mRNA. Di conseguenza, un miRNA può influenzare contemporaneamente la trascrizione di centinaia di geni diversi. Questo ha un impatto significativo sull'espressione genica e sulla produzione di proteine nel corpo. Siccome le proteine svolgono molte funzioni diverse all'interno delle cellule e dell'organismo, l'azione dei miRNA può avere conseguenze notevoli sulla salute e sul funzionamento delle cellule e dei tessuti (58). I miRNA sono coinvolti in una vasta gamma di processi biologici e hanno un impatto significativo sulla regolazione del sistema immunitario. Pertanto, anomalie nei miRNA, come mutazioni o polimorfismi, possono contribuire allo sviluppo di disturbi autoimmuni. Cambiamenti nell'espressione dei miRNA possono essere causati da diverse condizioni, tra cui anomalie cromosomiche, polimorfismi a singolo nucleotide, infezioni virali, modifiche epigenetiche o alterazioni nel processo di biogenesi dei miRNA (59).



*Figura 11. Biogenesi e funzione dei miRNA.*

## 4.2 miRNA nelle EVs

Recentemente, è emerso che le EVs sono efficaci trasportatori di informazioni genetiche, compresi i miRNA, che possono essere trasferiti tra le cellule per regolare l'espressione genica e la funzione delle cellule riceventi (60). Gli RNA associati alle EVs (EVs-RNA) stanno attirando molta attenzione nella ricerca medica per il loro potenziale ruolo nella salute e nelle malattie. Al momento mancano protocolli standardizzati per estrarre gli EV-RNA e non c'è un accordo generale su come valutare i livelli di espressione di diversi tipi di RNA. Tuttavia, il processo di isolamento dei miRNA dalle EVs (vescicole extracellulari) e la loro successiva analisi attraverso diverse tecniche, come la qRT-PCR, gli array di miRNA o il sequenziamento di nuova generazione (NGS), è ben consolidato e ampiamente documentato. Inoltre, è importante notare che la maggior parte delle EVs presenti nel sangue circolante proviene dai globuli rossi e dai globuli bianchi. Queste EVs possono contenere diversi tipi di RNA, tra cui i miRNA. Ciò significa che le informazioni genetiche trasportate dalle VE possono essere condivise tra le EVs che provengono da diverse parti del corpo. Va notato che le cellule possono scegliere quali RNA e miRNA includere nelle EVs prima di rilasciarle nel corpo, e questa selezione è molto diversa rispetto a quanto si trova all'interno delle cellule madri. Finora, sono stati identificati diversi meccanismi che sembrano guidare questa selezione, ma i dettagli specifici non sono ancora del tutto chiari (61). È stato dimostrato che il contenuto di RNA nelle EVs ha un impatto significativo sulle malattie, come il cancro e le malattie autoimmuni, influenzando la loro progressione e le risposte ai trattamenti. Ad esempio, alcuni miRNA presenti nelle EVs possono promuovere la

crescita tumorale o influenzare la risposta ai farmaci. Altri miRNA possono svolgere un ruolo protettivo o contribuire alla regolazione di processi cellulari specifici (35). È importante notare che, poiché le EVs possono essere facilmente rilevate nei fluidi corporei come il sangue, stanno emergendo come potenziali strumenti per diagnosticare precocemente diverse malattie, comprese quelle autoimmuni. Il loro contenuto di RNA può essere analizzato per ottenere importanti informazioni sulla malattia, la sua gravità e la risposta al trattamento. Questo approccio offre numerosi vantaggi rispetto ai biomarcatori tradizionali, compresa la capacità di rilevare la presenza di malattie in modo non invasivo e la possibilità di monitorare l'andamento della malattia nel tempo.

### **4.3 Il significato dei miRNA nelle MII**

Negli ultimi anni, si è scoperto che alcuni cambiamenti nel modo in cui i geni vengono attivati o disattivati (alterazioni epigenetiche), svolgono un ruolo importante nella polimiosite (PM) e nella dermatomiosite (DM). Tuttavia, la ricerca sul ruolo dei miRNA, in particolare quelli presenti nelle vescicole extracellulari (EV-miRNA), è ancora in fase iniziale. Nel tessuto muscolare dei pazienti affetti da PM, è stato scoperto che il miR-146a è presente in quantità inferiori rispetto al tessuto muscolare di persone sane. Questo miRNA svolge un ruolo nella regolazione dell'infiltrazione dei macrofagi e in alcune vie di segnalazione coinvolte nelle risposte immunitarie (62). In modo simile, i pazienti con PM presentano una riduzione dei livelli di miR-409-3p e miR-381 nel sangue, il che contribuisce all'infiltrazione dei macrofagi nei tessuti muscolari, aggravando la malattia (63) (64). Altri miRNA come miR-146a, miR-221 e miR-222 sono invece troppo attivi nei tessuti muscolari dei pazienti con PM e DM, e sembrano inibire il differenziamento delle cellule muscolari. Al contrario, alcuni miRNA come miR-1, miR-133a e miR-133b, che regolano la differenziazione dei miociti, sono meno attivi nelle MII, soprattutto nella DM, mentre il miR-206 è meno attivo nella DM (65). Nel sangue dei pazienti con MII, ci sono anche cambiamenti nei livelli di miRNA coinvolti nella risposta immunitaria e nella difesa contro i virus, soprattutto quelli associati alla via dell'IFN. Ad esempio, negli MII positivi per l'anticorpo anti-Jo1, DM e PM, è stato osservato un aumento del miR-96-5p, che provoca problemi nei mitocondri e stress ossidativo che potrebbero contribuire ai danni muscolari (66). Inoltre, sono stati rilevati livelli più bassi di altri miRNA, ossia let-7 e miR-21 nel sangue dei pazienti con PM e DM, e questi miRNA potrebbero essere utilizzati per distinguere le due malattie (67) (68). Altri miRNA, come miR-4442, sembrano essere deregolati nel sangue dei pazienti con

DM/PM, ma il loro livello si abbassa dopo il trattamento con farmaci. Questi miRNA potrebbero essere utili per monitorare la malattia e valutare l'efficacia del trattamento (69). Infine, in pazienti con ASyS-ILD, una forma di MII con coinvolgimento polmonare, si sono osservati livelli più alti di miRNA chiamati EV-miR-30a-5p ed EV-miR-29c-3p, che sembrano essere coinvolti nella risposta infiammatoria e nella formazione di tessuto cicatriziale nei polmoni. Questi miRNA potrebbero quindi aiutare a comprendere meglio la malattia e a sviluppare nuovi approcci terapeutici (70).

## SCOPO DELLO STUDIO

Questo studio ha lo scopo di caratterizzare le vescicole extracellulari (EVs) circolanti e di analizzare il ruolo come potenziali biomarcatori e di indagare il loro contenuto in miRNA nella miopatia infiammatoria idiopatica (MII).

Nello specifico, gli obiettivi dello studio sono:

- 1) Determinare la concentrazione delle EVs e di misurare mediante tecnologia NGS il profilo di espressione dei miRNA presenti nelle EVs in un gruppo di pazienti affetti da MII e in un gruppo di controllo;
- 2) Quantificare le EVs circolanti e misurare il profilo di espressione dei miRNA nelle EVs in un gruppo di pazienti affetti da MII associata a neoplasia e in un gruppo MII non affetti da neoplasia;
- 3) Confrontare l'effetto del trattamento farmacologico, tra la terapia con soli glucocorticoidi e quella combinata di glucocorticoidi e immunosoppressori, sulla concentrazione delle EVs circolanti e sull'espressione di miRNA nei pazienti affetti da MII.



# MATERIALI E METODI

## 1. Selezione dei pazienti e dei donatori

Sono stati reclutati 47 pazienti adulti (età >18 anni) affetti da miopatie infiammatorie idiopatiche (MII) presso la degenza o l'ambulatorio dell'Unità di Reumatologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova, tra marzo 2020 e settembre 2022. I pazienti MII sono stati poi suddivisi secondo le linee guida internazionali in (71): dermatomiositi (DM) (n=14), polimiositi (PM) (n=5), miosite da corpi inclusi (IBM) (n=1) e sindrome da anticorpi antisintetasi (ASyS) (n=15). Tra i pazienti affetti da MII, 12 di essi hanno sviluppato dei tumori (gruppo dei pazienti affetti da miosite associato al tumore, abbreviato come CAM). Nella coorte di pazienti, il trattamento farmacologico è stato suddiviso in due gruppi: un gruppo trattato solamente con glucocorticoidi (GC) (n=16) e un gruppo costituito da pazienti che hanno ricevuto una terapia combinata di glucocorticoidi e immunosoppressori (GC+IS) (n=20), entrambi per un periodo di almeno due anni. Nel primo gruppo, il glucocorticoide utilizzato è stato il prednisone (5-37.5 mg/die). Nel secondo gruppo, gli immunosoppressori principalmente utilizzati in associazione ai glucocorticoidi, sono stati il metotressato (20-25 mg a settimana) e il micofenolato mofetile (50 mg/die, con dosi crescenti fino ad un massimo di 2 mg/kg/die). Infine, 45 volontari sani sono stati reclutati come gruppo di controllo. Lo studio è stato condotto in conformità con i principi della Dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal comitato etico locale (protocollo 5349/AO/22), seguendo le linee guida delle buone pratiche cliniche. Tutti i partecipanti hanno fornito il loro consenso informato per essere inclusi nello studio e per l'analisi dei dati. Un prelievo di sangue è stato raccolto per la determinazione della concentrazione di creatin-fosfo-chinasi (CPK), lattato deidrogenasi (LH), aldolasi (ALD), mioglobina (MB), aspartato (AST) e alanina aminotransferasi (ALT)), e per la ricerca degli anticorpi MAA (anticorpi anti-aminoacil-tRNA sintetasi) e MSA (autoanticorpi specifici della miosite) al fine di classificare i sottogruppi delle MII.

## 2. Raccolta dei campioni

I campioni di sangue venoso prelevati dai pazienti e dai volontari sani, raccolti in provette contenenti citrato di sodio, sono stati centrifugati per la separazione del plasma a 1500g per 20 minuti. Successivamente, il plasma è stato nuovamente

centrifugato a 3000g per 15 minuti a temperatura ambiente, in modo da ottenere una frazione di plasma priva di piastrine (PPF). Infine, il PPF è stato conservato ad una temperatura di -80°C, fino a quando è stato utilizzato per la preparazione delle vescicole extracellulari.

### **3. Isolamento e quantificazione delle EVs**

Le vescicole extracellulari (EVs) sono state isolate dal plasma dei pazienti affetti da MI e dai donatori sani (DS) mediante la cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) e mediante l'ultrafiltrazione (UF) presso il Laboratorio di Reumatologia del Dipartimento di Medicina. La cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) consente di recuperare particelle con dimensioni comprese tra i 70 e i 1000 nm. Successivamente, l'ultrafiltrazione permette attraverso una membrana semipermeabile di separare le particelle o le molecole in base alle loro dimensioni e alla loro massa molecolare. In breve, sono state utilizzate colonne qEV original®/70 nm (Izon Science) che dopo essere state equilibrate con una soluzione salina fosfato (PBS) sono state caricate con un aliquota di plasma (0.5 ml). Il metodo consente di ottenere delle frazioni plasmatiche contenenti le vescicole extracellulari, come precedentemente descritto (72). Le frazioni delle EVs ottenute tramite SEC sono state arricchite attraverso l'ultrafiltrazione a 4000x g per 10 minuti, usando un filtro Amicon® Ultra-4 mL di dimensioni di 100 KDa (Merck Millipore). Le particelle di dimensioni maggiori di 100 KDa, sono state trattenute dal filtro e sono state eluite con una soluzione di PBS (frazione contenenti le EVs), mentre quelle con un peso molecolare inferiore sono state eliminate. I campioni così raccolti contenenti le EVs sono stati congelati a -80 °C per gli scopi successivi.

#### **3.1 Analisi del tracciamento delle nanoparticelle (NTA)**

L'analisi delle vescicole extracellulari è stata condotta utilizzando uno strumento chiamato NanoSight NS300, prodotto da Malvern Panalytical. Questo strumento consente di quantificare le vescicole extracellulari misurando le loro dimensioni e la loro concentrazione, espresse in particelle per millilitro (particle/mL). La concentrazione e le dimensioni delle EVs sono state calcolate dal software NTA (versione 3.4) in base al fattore di diluizione e al diametro idrodinamico, utilizzando l'equazione di Einstein-Smoluchowski (72).

### **3.2 Microscopia elettronica a trasmissione**

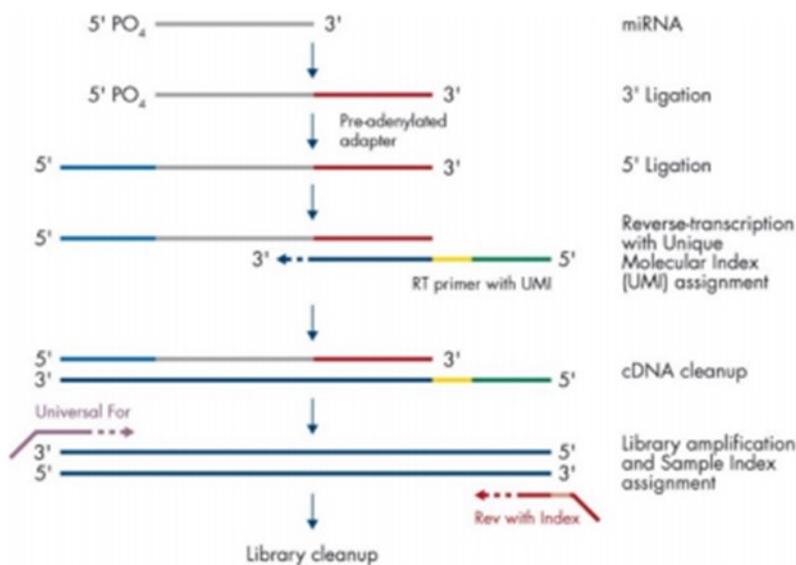
La microscopia elettronica a trasmissione (TEM) è una tecnica analitica utilizzata per visualizzare le strutture più piccole nella materia (73). Una goccia di campioni EVs (circa 25  $\mu\text{L}$ ) è stata depositata su una griglia a fori da 400 mesh con film forato. Dopo la colorazione con acetato di uranile al 2% (per 2 minuti), il campione è stato osservato utilizzando un microscopio elettronico a trasmissione Tecnai G2 (FEI) operante a 100 kV. Le immagini sono state catturate mediante una telecamera digitale Veleta (Sistema di Imaging Soft Olympus) (72).

## **4. Estrazione e quantificazione dell'RNA**

L'estrazione e la purificazione degli small non-coding RNA (sncRNA) sono state eseguite mediante l'utilizzo del kit miRNeasy Serum/Plasma Advanced (Qiagen, Germania). Il kit miRNeasy Serum/Plasma Advanced è stato scelto per questa operazione, in quanto è appositamente progettato per l'estrazione di acidi nucleici, inclusi i miRNA, da campioni biologici come il siero, il plasma e le vescicole extracellulari. Questo metodo ha permesso di estrarre e purificare l'RNA di dimensione inferiore ai 200 nucleotidi (nt) utilizzando colonnine cromatografiche contenenti una specifica resina come matrice di separazione (74). In sintesi, si inizia aggiungendo 5 volte il volume di soluzione QIAzol a 200  $\mu\text{L}$  di siero per lisare completamente i diversi componenti del siero. Il lisato così ottenuto viene successivamente trattato con 200  $\mu\text{L}$  di cloroformio e quindi centrifugato a 12.000 g per 15 minuti a 4°C. Questa centrifugazione permette di separare il lisato in tre fasi: una fase inferiore che contiene i residui organici, una fase intermedia e una fase superiore, acquosa e trasparente che contiene l'acido nucleico. La fase superiore viene raccolta per la successiva purificazione utilizzando le colonnine cromatografiche. Dopo una serie di lavaggi con soluzioni contenenti etanolo, gli small non-coding RNA che si legano alla membrana della colonnina, vengono estratti utilizzando una soluzione di acqua priva di RNasi (RNasi-free), cioè priva di enzimi che degradano l'RNA. La concentrazione dell'RNA estratto (misurata in  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) è stata determinata utilizzando il fluorimetro Qubit 4.0, (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Il fluorimetro Qubit è in grado di rilevare coloranti fluorescenti che si legano in modo specifico all'acido nucleico (75).

## 5. Preparazione e purificazione delle librerie

La preparazione delle librerie dei miRNA estratti dal plasma dei soggetti dello studio, è stata condotta utilizzando il kit QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen, Germania). Questo processo implica diversi passaggi, come illustrato nella **Figura 12**, al fine di preparare le librerie necessarie per l'analisi dei miRNA.



**Figura 12.** Schema della preparazione delle librerie per il sequenziamento degli sncRNAs con tecnologia Illumina.

### 5.1 Ligazione degli adattatori in 3' e 5'

Nella prima fase della preparazione delle librerie, viene legato un adattatore in 3', che è una sequenza nucleotidica pre-adenilata di circa 20 basi, a tutti gli RNA presenti nel campione utilizzando un enzima chiamato ligasi. Questa reazione segue un profilo termico specifico, che consiste in un'incubazione di 1 ora a 28°C, seguita da un'incubazione di 20 minuti a 65°C e infine il raffreddamento a 4°C per almeno 5 minuti. Successivamente, in una seconda reazione, viene aggiunto un secondo adattatore in posizione 5', al prodotto ottenuto dalla reazione precedente.

### 5.2 Retrotrascrizione e clean-up del cDNA

Dopo le reazioni di ligazione degli adattatori, viene eseguita la reazione di retrotrascrizione (RT) per convertire l'RNA estratto a singolo filamento, in DNA a doppio filamento. Il profilo termico di questa reazione include un ciclo di incubazione di 1 ora a 50°C per l'attivazione della trascrittasi inversa, seguito da un'incubazione di 15 minuti

a 70°C per inattivarla. Durante la reazione di retrotrascrizione, vengono utilizzati dei primer che contengono una parte complementare all'adattatore in posizione 3' e una breve sequenza nucleotidica casuale chiamata UMI ("Indice molecolare Unico"). In questo processo, viene assegnata una sequenza UMI unica a ciascuna molecola retrotrascritta che viene generata. Di conseguenza, ogni molecola di RNA che viene convertita in DNA durante la retrotrascrizione, ha la sua propria sequenza UMI specifica, che funge da "etichetta" univoca per quella molecola. Questo approccio è utile perché si ritiene che la quantificazione delle letture ottenute durante il sequenziamento possa essere sovrastimata a causa di errori intrinseci durante il processo di pre-amplificazione (che è lo step successivo alla retrotrascrizione nella preparazione delle librerie). La presenza delle sequenze UMI consente di evitare questi possibili errori, in quanto è possibile filtrare i risultati delle letture basandosi sulla presenza della sequenza UMI, garantendo così una maggiore accuratezza nei dati di sequenziamento.

### **5.3 Pre-amplificazione delle librerie e clean-up**

La reazione di pre-amplificazione della libreria avviene attraverso una reazione di PCR utilizzando la DNA polimerasi HotStartTaq. Il profilo termico per questa fase consiste in un'attivazione della polimerasi a 95°C per 15 minuti, seguita da 22 cicli di denaturazione a 95°C per 15 secondi, appaiamento con i primer a 60°C per 30 secondi e un'estensione a 72°C per 15 secondi, durante la quale vengono aggiunti i nucleotidi. Vengono utilizzati primer universali forward e primer reverse, ciascuno contenente una breve sequenza nucleotidica chiamata "Index" che funge da barcode specifico per ciascun campione. Questi barcode consentono di associare in modo univoco le sequenze ai campioni durante il processo di sequenziamento, consentendo così la separazione delle informazioni provenienti dai diversi campioni. Il prodotto di amplificazione, che costituisce la libreria, viene poi purificato mediante l'uso di biglie magnetiche, come descritto in precedenza, e infine eluito in acqua priva di RNasi (RNasi-free), quindi conservato ad una temperatura di -20°C per ulteriori analisi e archiviazione.

### **5.4 Struttura completa delle sequenze di una libreria di small non-coding RNA**

Alla fine del processo di preparazione delle librerie dei miRNA, queste librerie sono composte da sequenze lunghe 76 nucleotidi ciascuna, con la seguente struttura:

-Sequenza del miRNA.

-Adattatore 3' con una lunghezza di 19 nucleotidi.

-Sequenza UMI di 12 nucleotidi.

-Adattatore universale Illumina di 12 nucleotidi.

-Sequenza X, che insieme all'adattatore universale Illumina costituisce il primer utilizzato per la retrotrascrizione, e contiene anche l'Index 22 (**Figura 13**).

Questa struttura consente di identificare in modo univoco ciascuna molecola di miRNA all'interno della libreria e di prepararle per il sequenziamento con la piattaforma Illumina.



**Figura 13.** Rappresentazione della composizione di una libreria per miRNA alla fine del processo di preparazione.

## 5.5 Quantificazione delle librerie

La quantificazione delle librerie viene effettuata misurando la concentrazione in ng/ $\mu$ L utilizzando il Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific nel Massachusetts, USA). La lettura è altamente sensibile grazie all'uso di un colorante fluorescente chiamato Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit, che viene aggiunto a ciascun campione (76). La concentrazione ottenuta dal Qubit è espressa in ng/ $\mu$ L e viene convertita in nanomoli (nM) utilizzando la seguente formula:

$$(X \text{ ng}/\mu\text{L}) (10^6) / (112450) = Y \text{ Nm}$$

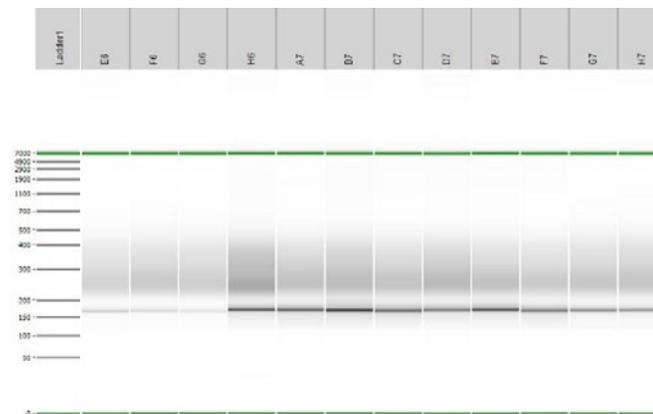
-X rappresenta la concentrazione in ng/ $\mu$ L misurata dal Qubit

-Y rappresenta la concentrazione convertita in nM.

## 5.6 Controlli di qualità

I controlli di qualità vengono effettuati per valutare l'efficienza della preparazione della libreria e la distribuzione delle lunghezze delle sequenze all'interno della libreria. Questa valutazione avviene tramite elettroforesi capillare utilizzando il sistema LabChip GX di Perkin Elmer con il kit DNA High Sensitivity Assay Chip 3K. Come mostrato nella **figura 14**, si osserva un picco di concentrazione delle sequenze ad una lunghezza di 180

basi, che coincide con la lunghezza media delle librerie degli small non-coding RNA (sncRNA). Questo picco indica che la maggior parte delle sequenze nella libreria ha una lunghezza di circa 180 bp ed è un risultato desiderabile, poiché suggerisce che la preparazione della libreria è stata efficiente e che le sequenze sono state preparate in modo uniforme.



**Figura 14.** Visualizzazione di una corsa elettroforetica di alcuni campioni dello studio. Si osserva il ladder (a sinistra) che permette di identificare la lunghezza delle librerie di ogni campione.

## 6. Diluizione e denaturazione delle librerie e Phi X

Le librerie generate da ciascun campione vengono combinate in un'unica miscela (pool) in modo che abbiano una concentrazione equimolare di 1 nM. Successivamente, questa miscela viene denaturata con una soluzione di NaOH (0.2) e poi ulteriormente diluita ad una concentrazione finale di 1.7 pM. Inoltre, alla libreria viene aggiunta una quantità di 1.5 pM di Phi X, che è una libreria di genoma di un batteriofago. Questo batteriofago è utilizzato come controllo positivo nelle reazioni di sequenziamento poiché ha una sequenza ben conosciuta e una composizione bilanciata di basi: il 45% delle basi sono GC e il 55% sono AT (77) (78).

## 7. Caricamento sul sequenziatore NextSeq 550

Il sistema NextSeq™ 550 di Illumina® è in grado di eseguire il sequenziamento ad alta efficienza di esomi, interi genomi e trascrittomi. Per eseguire una corsa di

sequenziamento su NextSeq 550, è necessario preparare una cartuccia di reagenti e una cella a flusso. La cartuccia di reagenti contiene tutti i componenti necessari per la reazione di sequenziamento, tra cui la DNA polimerasi, i nucleotidi marcati con fluorofori, i primer per il sequenziamento, il buffer e la soluzione per il lavaggio. Il pool delle librerie denaturate viene caricato nell'apposito alloggiamento della cartuccia.

La cella a flusso è una piattaforma solida su cui vengono generati i cluster e dove avviene la reazione di sequenziamento effettiva. Durante questa fase, il software "Real-Time Analysis" di Illumina identifica le basi, filtra i dati e calcola i punteggi di qualità. Questo software svolge un ruolo fondamentale nel processo di sequenziamento, garantendo l'accuratezza e la qualità dei dati prodotti.

## 8. Analisi bioinformatica

I risultati del sequenziamento vengono presentati nel formato FASTQ. Un file FASTQ è composto da quattro linee, ciascuna con un ruolo specifico:

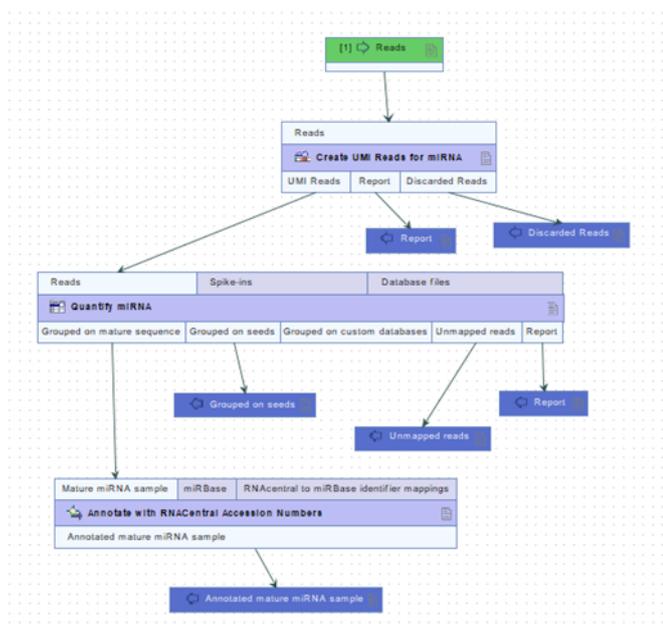
1. La prima riga fornisce informazioni sulla read, come il nome dello strumento utilizzato, il modello di flow cell, le coordinate del cluster, e il tipo di corsa (ad esempio, single-read o paired-end).
2. La seconda riga contiene la sequenza nucleotidica effettiva, cioè la serie di lettere che rappresenta le basi (A, T, C, G).
3. La terza riga è un semplice separatore indicato da un "+".
4. La quarta riga contiene una serie di caratteri che forniscono informazioni sulla qualità della sequenza (nota come Q-score). Questi caratteri rappresentano la precisione della lettura delle basi e possono variare in base alla qualità dei dati. Un punteggio Q più alto indica una maggiore precisione nella lettura delle basi.

Questo formato FASTQ è ampiamente utilizzato per rappresentare i dati del sequenziamento e contiene tutte le informazioni essenziali per l'analisi successiva delle sequenze ottenute. (79) **(Figura 15)**

```
@ML-P2-14:9:000H03HG:1:11102:17290:1073 1:N:0:TCCTGAGC+CGCATCTA  
TTTGGTAACAGCATGAATTATTTCTAGCCACTAAAACCTCTATGAACATCTTTGTGAAGGTTTCAGATAGAGCCTGAAGTACACAGAGAACAATTTAAAAAA  
+  
AAAAAEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE<AEEEEEE
```

*Figura 15. Esempio di un file in formato FASTQ.*

I file FASTQ ottenuti dal sequenziamento vengono successivamente elaborati utilizzando il software bioinformatico CLC Genomics Workbench 21.0.3 (Qiagen in Hilden, Germania). Questo software fornisce pipeline specifiche per l'analisi dei miRNA, consentendo di analizzare in modo efficiente e accurato i dati ottenuti. Le fasi dell'analisi bioinformatica sono descritte nel flusso di lavoro o workflow, come mostrato nella **figura 16**. Questo workflow guida attraverso le diverse fasi dell'analisi, tra cui la qualità dei dati, il controllo della qualità, l'allineamento delle sequenze, l'identificazione dei miRNA e altre analisi specifiche per il proprio studio. Il CLC Genomics Workbench è uno strumento essenziale per l'interpretazione e l'analisi dei dati di sequenziamento dei miRNA.



**Figura 16.** Diagramma di flusso utilizzato dal software CLC Genomics Workbench per la quantificazione dei miRNA.

## 8.1 Rimozione della sequenza degli adattatori

Le sequenze degli adattatori sono importanti per l'ibridizzazione delle librerie con le sequenze complementari presenti nella cella a flusso durante il processo di sequenziamento. Tuttavia, è necessario rimuovere queste sequenze degli adattatori dai dati grezzi, poiché possono interferire con l'analisi successiva. Questo processo di rimozione delle sequenze degli adattatori è noto come "trimming". Per eseguire il trimming, viene utilizzato un algoritmo bioinformatico che ha l'abilità di rimuovere tutte le sequenze che corrispondono esattamente alla serie di nucleotidi

dell'adattatore (nel tuo caso, AACTGTAGGCACCATCAAT). Questo processo di trimming garantisce che le sequenze degli adattatori non influenzino l'analisi dei dati e che le letture siano pulite e pronte per ulteriori analisi bioinformatiche.

## **8.2 Allineamento delle sequenze**

Dopo la rimozione degli adattatori, le sequenze ottenute durante il sequenziamento vengono allineate alle sequenze contenute nei database dei miRNA (miRBase v.22.1) utilizzando il genoma di riferimento umano Hg38. Questo processo bioinformatico permette di identificare e quantificare la popolazione di small non-coding RNA (sncRNA), esprimendola in termini di conte o di reads (sequenze) associate a ciascun miRNA presente nel database.

## **8.3 Normalizzazione delle conte (reads)**

La normalizzazione delle conte è una fase importante dell'analisi dei dati di sequenziamento, poiché consente di confrontare in modo accurato l'espressione dei target tra diversi campioni. Questo è particolarmente importante perché gli esperimenti di sequenziamento possono essere influenzati da variazioni sistematiche ed errori sperimentali dovuti da diversi fattori, come le dimensioni delle librerie, la lunghezza del trascritto e il contenuto in G-C delle sequenze, oltre ad errori di campionamento o bias operatori dovuti alle quantità iniziali di campione utilizzato per preparare le librerie.

In questo studio, la normalizzazione è eseguita utilizzando il metodo chiamato "Trimmed Mean of M-values" (TMM). Questo metodo si basa sull'assunzione che la maggior parte dei target abbia un'espressione relativamente costante. Il fattore TMM viene calcolato per ciascun campione, utilizzando un campione come riferimento e gli altri come campioni di test. Si calcola la media ponderata dei rapporti logaritmici di espressione tra il campione di test e quello di riferimento. Questo calcolo consente di confrontare l'espressione differenziale delle sequenze in esame in modo accurato.

Le conte normalizzate utilizzando il metodo TMM vengono quindi espresse come CPM (conte per milione), il che facilita il confronto tra campioni (80).

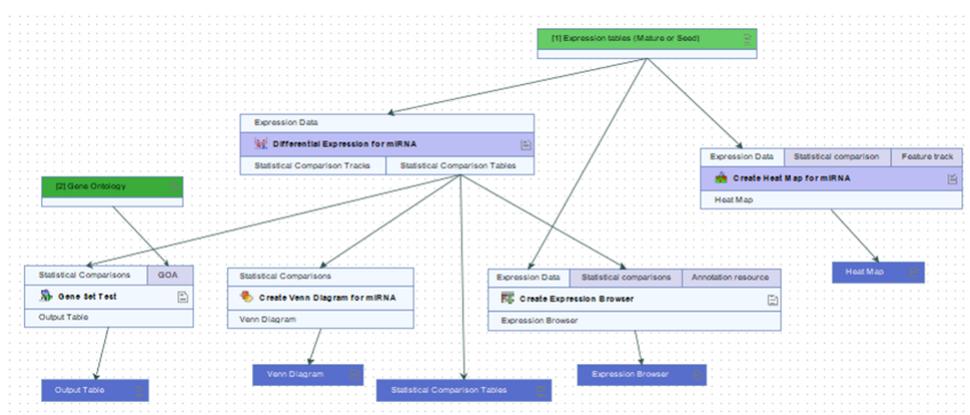
## **8.4 Filtraggio dati**

In questa fase, vengono selezionati solo i miRNA che hanno un numero sufficiente di conte (reads) per condurre un'analisi di espressione differenziale tra i diversi gruppi di campioni. Per questo motivo, è stato utilizzato un valore di soglia medio di conte  $> 2.5$

per ciascun gruppo. I miRNA che presentano un valore di conte medio inferiore a 2.5 non sono stati inclusi nell'analisi successiva. Questo criterio di selezione aiuta a garantire che solo i miRNA con un livello di espressione significativo vengano considerati nelle analisi di espressione differenziale, eliminando quelli con espressione troppo bassa che potrebbero non essere rilevanti per l'obiettivo dello studio.

## 8.5 Analisi differenziale dell'espressione dei miRNA

L'analisi differenziale dell'espressione dei miRNA tra i diversi gruppi è stata condotta utilizzando l'algoritmo bioinformatico basato su EdgeR. Questo algoritmo è stato impiegato per identificare e confrontare le differenze nell'espressione dei miRNA tra i gruppi di campioni in base ai criteri di interesse specifici del proprio studio. La **figura 17** mostra il processo e i risultati di questa analisi, consentendo di identificare i miRNA che sono significativamente diversi in termini di espressione tra i gruppi considerati.



**Figura 17.** Diagramma di flusso utilizzato dal software CLC Genomics Workbench per l'analisi dell'espressione differenziale dei miRNA.

I dati finali della analisi differenziale vengono espressi come valori di significatività p-value e False Discovery Rate (FDR)  $\leq 0.05$  e come valori di fold change (aumento o riduzione di espressione). Il fold change rappresenta la differenza nell'espressione dei miRNA tra i gruppi.

## 9. Analisi Statistica

Per l'analisi statistica, sono stati utilizzati i software SPSS versione 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) e GraphPad Prism® versione 9 (GraphPad Software, CA, USA). L'analisi delle

caratteristiche operative del ricevitore (ROC) è stata eseguita utilizzando il software MedCalc versione 19.1.5 (MedCalc Software Ltd, Belgio).

Il test t di Student per dati non appaiati è stato applicato per confrontare le differenze tra le variabili parametriche; mentre nei casi in cui la normalità non è stata confermata, l'analisi statistica è stata effettuata mediante il test U di Mann-Whitney, per due o più gruppi indipendenti. Un valore di p value  $\leq 0.05$  a due code è stato considerato statisticamente significativo.

# RISULTATI

## 1. Caratteristiche della corte dei pazienti

In questo studio sono stati reclutati 35 pazienti affetti da MII caratterizzati da alterazioni dei valori di CPK (creatin-fosfo-chinasi), di aldolasi, di GOT (Aspartato Amino-Tranferasi), di LDH (Lattato deidrogenasi). I pazienti affetti da MII sono stati inoltre suddivisi in base alle linee guida internazionali (71) in 4 gruppi: dermatomiositi, polimiositi, miositi da corpi inclusi, sindrome da anticorpi antisintetasi. Inoltre è stato considerato un ulteriore gruppo, quello dei pazienti affetti da miopatie associate a cancro (CAM)(n=12), per un totale di 47 pazienti nella corte. Le principali caratteristiche cliniche dei pazienti dello studio sono riportate nella **Tabella 4**.

*Tabella 4. Caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti affetti da MII.*

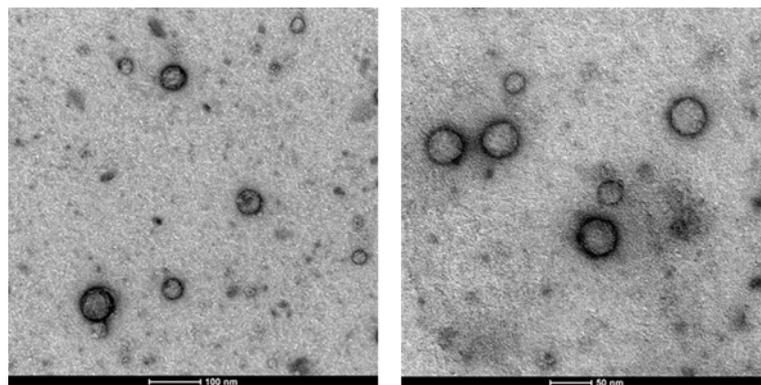
Caratteristiche cliniche e demografiche	Numero di pazienti, valori clinici, di laboratorio e farmacologici
Pazienti (n)	47
Sesso (Femmine)	30
Durata della malattia (anni)	4.70 ± 4.98
<b>1. Test di laboratorio (U/L)</b>	
CPK	869.52 ± 2186.46
Aldolasi	12.93 ± 25.38
GOT	59.26 ± 90.36
LDH	267.13 ± 98.66
<b>2. Sierologia (n)</b>	
<u>Autoanticorpi specifici per la miosite (MSAs)</u>	
Anti-Mi2	6
Anti-t-RNA sintetasi	15
Anti-SRP	3
Anti-MDA-5	4
Anti-TIF1-γ	4
Anti-HMGCoAR	1
<u>Autoanticorpi associati alla miosite (MAAs)</u>	

Anti-SSA	10
Anti-SSB	2
Anti-Ku	1
Anti-PM/Scl-100	3
Altri	4
<b>3.MMT-8 (test muscolare manuale)</b>	144 (100 – 150)
<b>4.Manifestazioni cliniche al momento del campionamento (n)</b>	
Cutanee	22
Il segno di Gottron e le papule	10
Rash cutaneo	6
Artriti	5
Miositi	15
ILD	7
<b>5. Sottotipi di MII</b>	
Dermatomiositi	14
Polimiositi	5
Miositi da corpi inclusi	1
Sindrome da anticorpi antisintetasi	15
Miositi associate al cancro	12
<b>Trattamento farmacologico (da almeno 6 mesi)</b>	
Glucocorticoidi orali (prednisone) (n)	36
Farmaci immunosoppressori (n)	20

I valori sono espressi come media +SD o come interquartile.

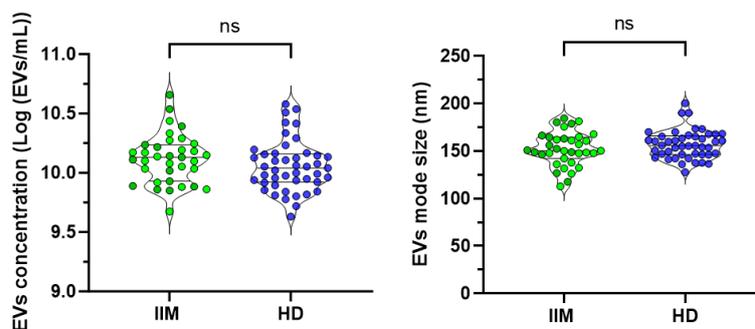
## 2. Caratterizzazione delle EVs mediante IFC

Le vescicole extracellulari circolanti sono state isolate dal plasma dei pazienti e caratterizzate mediante la citofluorimetria a flusso per immagini (IFC), con l'uso di marcatori di superficie specifici per le EVs, rappresentate dalle tetraspanine (CD9, CD63, CD81). Le tetraspanine infatti sono marcatori di superficie specifici per le EVs di piccole dimensioni (< 200 nm) di origine endosomica. A conferma di questi risultati, la **figura 18** riporta una rappresentativa immagine delle EVs ottenuta tramite il microscopio elettronico a trasmissione (TEM).



**Figura 18.** Immagini delle EVs isolate ottenute al microscopio elettronico a trasmissione (TEM).

Dopo la caratterizzazione delle EVs plasmatiche, è stata determinata mediante citofluorimetria a flusso la loro concentrazione nel plasma dei pazienti affetti da MII e di controlli (HD). Come mostrato nella **figura 19**, non vi erano differenze significative di concentrazione di EVs e delle loro dimensioni tra il gruppo di pazienti MII e quello di controllo.

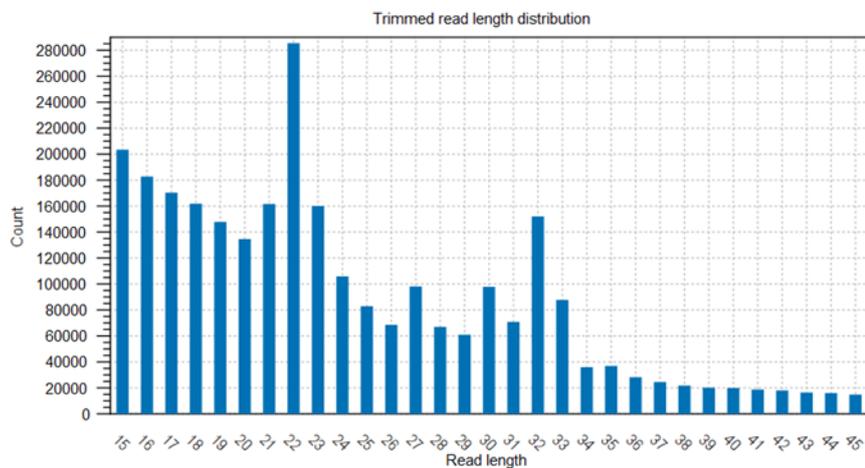


**Figura 19.** Valori di concentrazione e di dimensione delle EVs nei pazienti MII e nel gruppo di controllo (HD). La concentrazione è indicata come logaritmo in base 10 del numero di EVs presenti in un millilitro di campione biologico; la dimensione è riportata in nanometri.

### 3. Analisi dell'espressione dei miRNA nelle EVs di pazienti con MII

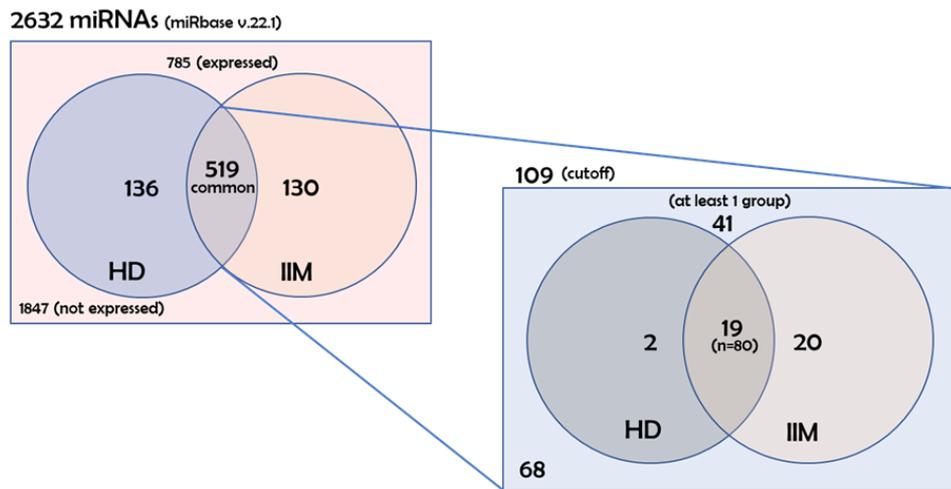
I miRNA contenuti nelle EVs sono stati determinati mediante la tecnologia Next Generation Sequencing (NGS). Come riportato nella **Figura 20**, la distribuzione della lunghezza delle reads in relazione al numero delle conte mostra un picco tra i 20-25 nucleotidi, corrispondente alla lunghezza media dei miRNA, e un secondo picco con una lunghezza media tra i 30-35 nucleotidi tipica dei piRNA, un'altra classe di small non coding RNA.

#### 3.2 Trimmed read length distribution

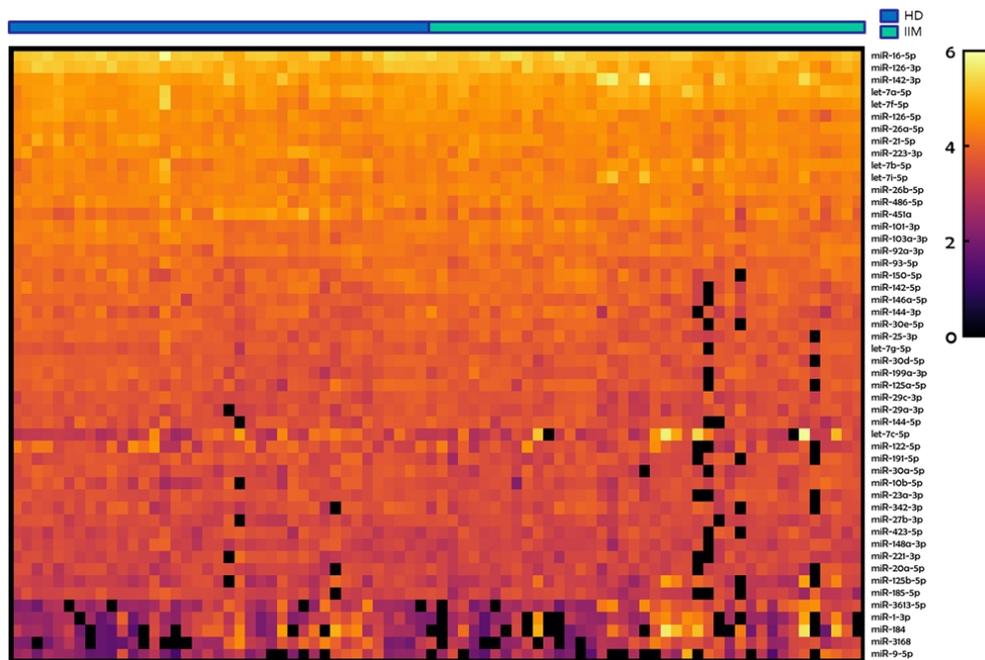


**Figura 20.** Grafico della distribuzione della lunghezza delle reads in rapporto al numero delle conte.

L'analisi bioinformatica ha evidenziato che su un totale di 2.632 miRNA allineati, ben 519 sono risultati espressi in almeno un campione di entrambi i gruppi. Dopo aver applicato una correzione dei dati mediante filtraggio, l'analisi bioinformatica ha considerato complessivamente 109 miRNA rilevanti (come indicato nella **Figura 21**). I 50 miRNA circolanti più espressi nelle EVs circolanti nel gruppo di studio, sono rappresentati nel grafico heat map (**Figura 22**).



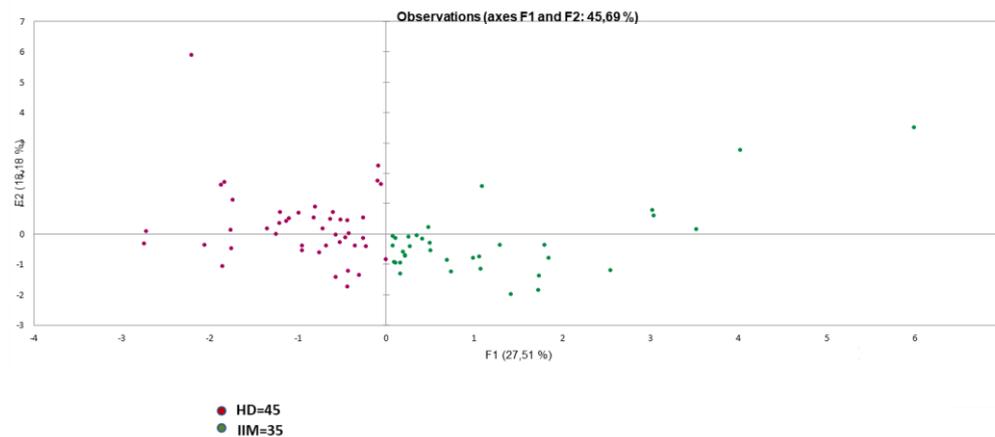
**Figura 21.** Il diagramma di Venn mostra la distribuzione dei miRNA allineati attraverso l'analisi bioinformatica (2.632) tra campioni di vescicole extracellulari nelle condizioni (HD e IIM). Tra i 785 miRNA espressi nella corte (519 sono espressi in almeno 1 un campione per gruppo), i miRNA con conteggio medio di letture di almeno 2.5 per gruppo ed espressi in almeno 30 soggetti per gruppo sono stati mantenuti per l'analisi differenziale di espressione tra i due gruppi (109 miRNA): 41 miRNA erano espressi in tutti i campioni di almeno un gruppo, mentre 19 miRNA erano costantemente espressi in tutti i campioni della coorte.



**Figura 22.** Heat map dei 50 miRNA maggiormente espressi nel gruppo di studio: il colore giallo corrisponde ad una più alta espressione, mentre il colore viola scuro corrisponde ad una espressione inferiore in scala logaritmica; i miRNA sono mostrati sull'asse verticale. Il gruppo di pazienti IIM (quadrato verde) e il gruppo di controllo (quadrato blu) sono rappresentati sull'asse orizzontale.

### 3.1 Analisi dell'espressione dei miRNA

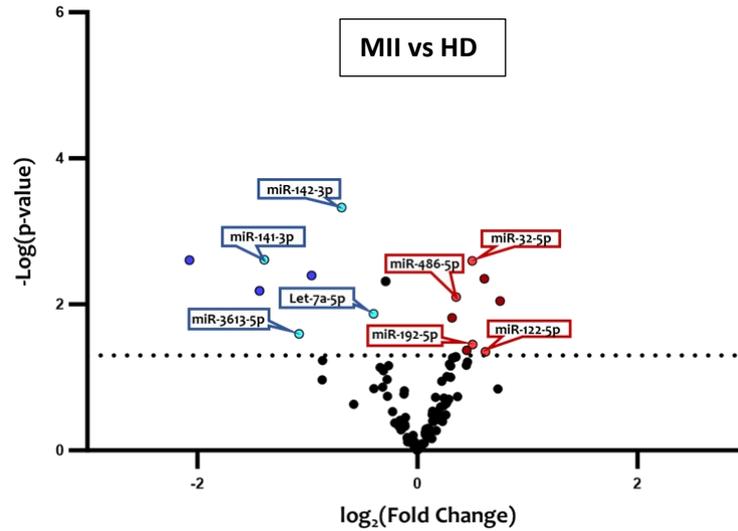
Successivamente, abbiamo determinato la differenza di espressione tra i 109 miRNA presenti nelle EVs circolanti plasmatiche ottenute dai soggetti affetti da MII e dai soggetti sani. La prima analisi consiste nell'analisi bioinformatica dei componenti principali (PCA), che rappresenta un metodo statistico per semplificare i dati contenenti un elevato numero di informazioni. Questa analisi bioinformatica ha lo scopo di ridurre la complessità delle variabili casuali al fine di individuare alcuni sottoinsiemi, i clusters, che possono essere significativi tra i gruppi esaminati e permette di visualizzare differenze macroscopiche nel totale profilo trascrizionale dei miRNA tra le popolazioni di individui. La **Figura 23** mostra che l'analisi PCA dei livelli di espressione nei miRNA, riporta una buona clusterizzazione tra il gruppo dei pazienti affetti da MII e il gruppo di controllo.



**Figura 23.** Analisi bioinformatica "PCA" (Analisi dei Principali Componenti): in verde il gruppo dei pazienti MII e in rosso quello di controllo.

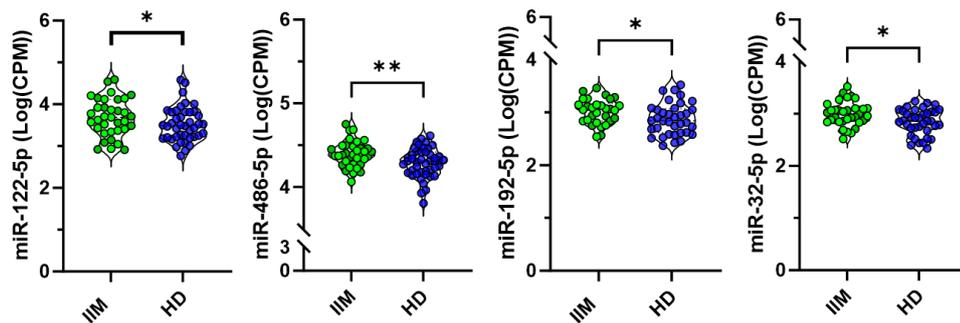
### 3.2 Analisi dell'espressione differenziale dei miRNA

L'analisi differenziale dell'espressione dei miRNA è stata condotta mediante il software CLC Genomics. Questa analisi consente di ottenere la differenza di espressione dei miRNA tra il gruppo MII e quello di controllo rappresentato dal valore Fold Change (FC) e dalla significatività indicata come False Discovery Rate (FDR), che corrisponde all'adjusted p-value ( $p < 0.05$ ). L'analisi differenziale dell'espressione dei miRNA viene riportata mediante il grafico Volcano Plot che evidenzia i miRNA up-regolati (rosso) e i miRNA down-regolati (azzurro) rispetto al gruppo di controllo. (**Figura 24**)



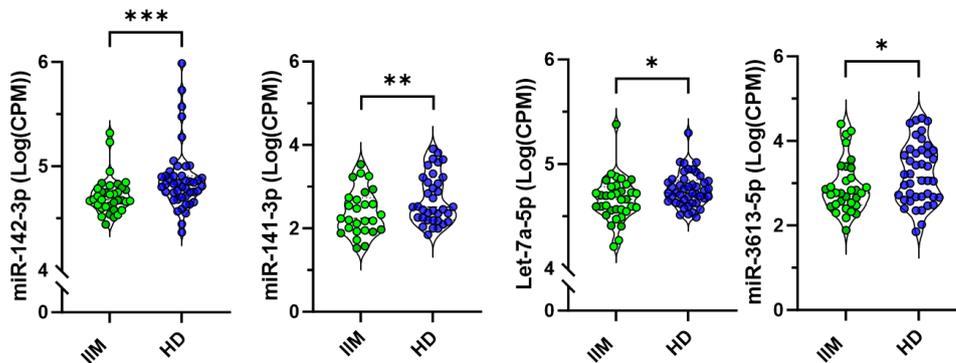
**Figura 24.** Volcano plot di 109 miRNA derivanti dalle EVs. L'analisi differenziale mostra i miRNA up-regolati (colore rosso) e quelli down-regolati (colore azzurro) nel gruppo dei pazienti MII rispetto al gruppo di controllo (MII vs HD). La linea orizzontale delimita i miRNA significativi ( $p$ -values  $< 0.05$ ).

La **Figura 25** riporta l'espressione dei quattro miRNA che sono risultati essere significativamente aumentati nelle EVs ottenute dai pazienti affetti da MII rispetto al gruppo di controllo: miR-122-5p ( $p=0.04$ ), miR-486-5p ( $p=0.001$ ), miR-192-5p ( $p=0.017$ ) e miR-32-5p ( $p=0.016$ ).



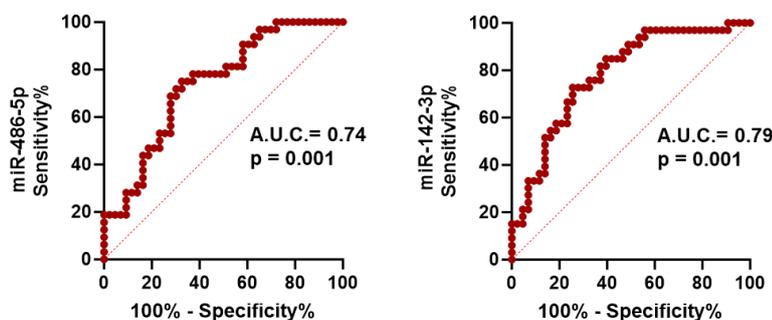
**Figura 25.** Grafici a violino dell'espressione differenziale dei miRNA significativamente up-regolati nei pazienti MII (verde) rispetto ai controlli (HD) (blu). L'espressione dei miRNA è riportata come logaritmo in base 10 delle conte normalizzate (CPM) ottenute dal sequenziamento NGS.

La **Figura 26** mostra l'espressione dei miRNA che sono risultati essere significativamente ridotti nelle EVs dei pazienti affetti da MII rispetto al gruppo di controllo: miR-142-3p ( $p=0.001$ ), miR-141-3p ( $p=0.041$ ), let-7a-5p ( $p=0.016$ ) e miR-3613-5p ( $p=0.043$ ).



**Figura 26.** Grafici a violino dell'espressione differenziale dei miRNA significativamente down-regolati nei pazienti MII (verde) rispetto ai controlli (HD) (blu). L'espressione dei miRNA è riportata come logaritmo in base 10 delle conte normalizzate (CPM) ottenute dal sequenziamento NGS.

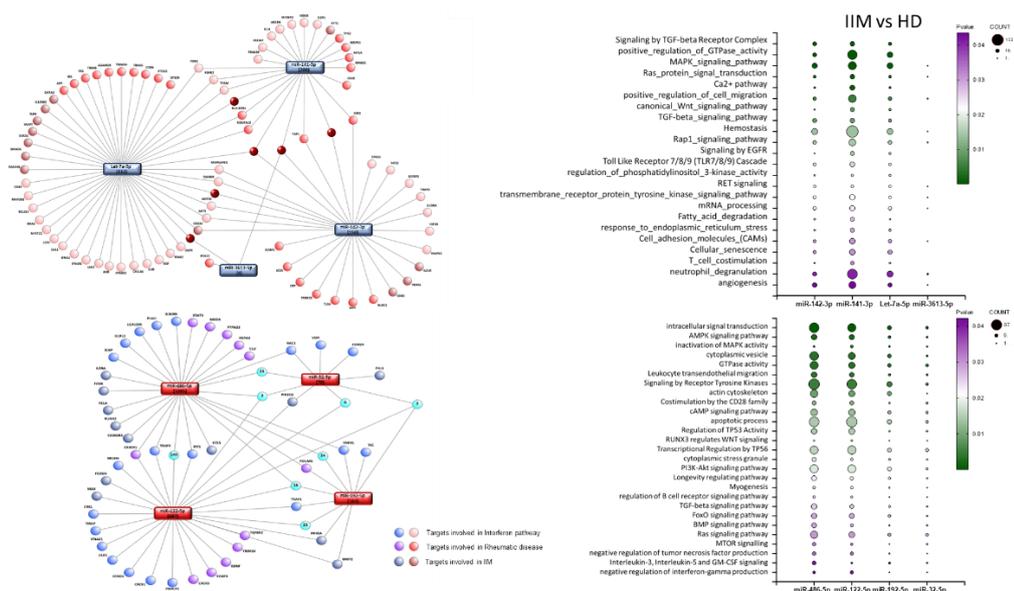
Infine, abbiamo valutato la specificità e la sensibilità dei miRNA significativamente differenti nei due gruppi di studio mediante l'analisi della curva ROC. Le ROC ci hanno permesso di valutare l'accuratezza degli otto miRNA selezionati, nel discriminare i pazienti affetti da MII dal gruppo di controllo. La migliore performance è stata ottenuta per il miR-486-5p e miR-142-3p (**Figura 27**). I valori di specificità e la sensibilità di miR-486-5p sono stati rispettivamente di 0.68 e di 0.75, con un'area sotto la curva (AUC) pari a 0.74, mentre la specificità e la sensibilità di miR-142-3p sono stati rispettivamente di 0.74 e 0.73, con un'area sotto la curva (AUC) pari a 0.79.



**Figura 27.** Analisi della curva ROC dei due miRNA. AUC = Area sotto la curva.

## 4. Analisi della rete dei bersagli genici dei miRNA

Al fine di ottenere una comprensione più approfondita del ruolo funzionale dei miRNA selezionati nei pazienti affetti da MII, abbiamo condotto un'analisi dei potenziali geni bersaglio arricchiti nelle MII e nelle vie dell'interferone. Utilizzando Cytoscape, abbiamo creato una rete biologica che evidenzia i più significativi geni bersaglio dei miRNA up-regolati e quelli down-regolati nei pazienti con MII in relazione al principale processo in cui sono coinvolti (**Figura 28**). È emerso che numerosi geni bersaglio dei miRNA up-regolati e down-regolati nei soggetti con MII sono coinvolti in fenomeni quali apoptosi, differenziamento e attivazione cellulare, necroptosi e infiammazione.

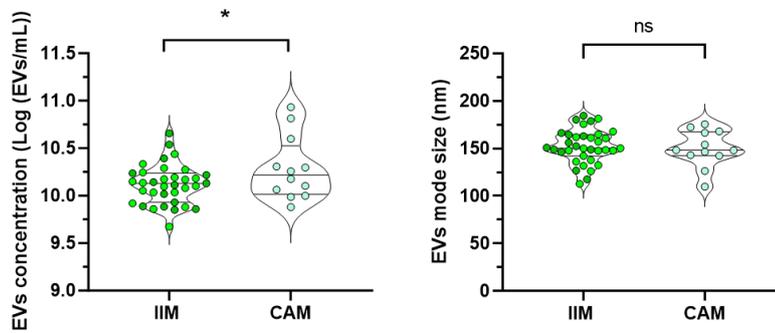


**Figura 28.** Nel pannello a sinistra: le tonalità di colore rosso rappresentano un'up-regolazione; tonalità blu una down-regolazione di miRNA (rettangoli) e probabili geni bersaglio (sfere) e relativi pathway nei quali sono coinvolti. Nel pannello a destra: grafico a bolle con evidenziati i più significativi geni bersaglio in cui i target sono coinvolti in funzione del numero per target arricchiti nel pathway (dimensione sfere) delle sfere e la significatività (colore viola → verde)

## 5. Analisi delle EVs e dell'espressione dei miRNA nei pazienti con CAM

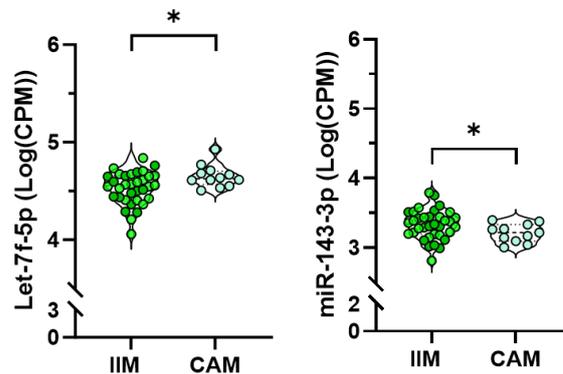
La miopatia associata a cancro (CAM) rappresenta la comorbidità più grave e la principale causa di mortalità nei pazienti con MII. Per comprendere meglio questa condizione, abbiamo esaminato la quantità di EVs ed effettuato l'analisi differenziale di

espressione dei miRNA derivanti dalle EVs dei pazienti affetti da MII associata a cancro (CAM) (n=12) e dei 35 pazienti MII non affetti da CAM. I nostri dati dimostrano che la quantità di EVs circolanti è risultata essere significativamente aumentata nei pazienti MII con CAM rispetto ai pazienti non affetti da CAM, mentre non sono state riscontrate differenze nelle dimensioni medie delle EVs (**Figura 29**)



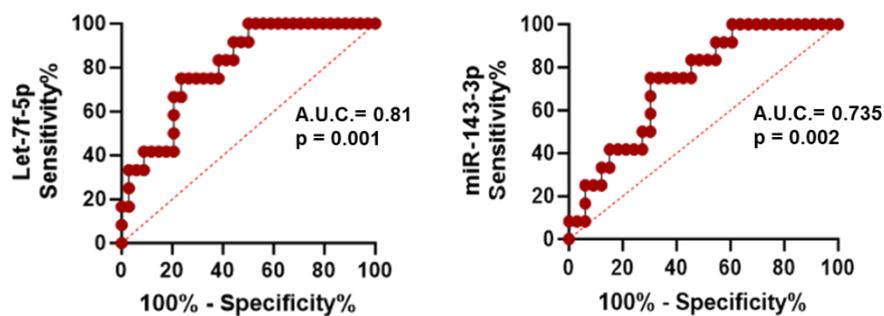
**Figura 29.** Valori di concentrazione e dimensione delle EVs nei pazienti MII rispetto a MII associata a cancro (CAM). La concentrazione è indicata come logaritmo in base 10 del numero di EVs presenti per millilitro di campione biologico; la dimensione è riportata in nanometri.

Successivamente, l'analisi differenziale dei miRNA derivati dalle EVs, ha mostrato che il let-7f-5p è risultato essere significativamente aumentato nei pazienti CAM ( $p=0.001$ ), mentre il miR-143-3p è significativamente ridotto rispetto ai pazienti con MII non associata a cancro ( $p=0.002$ ) (**Figura 30**).



**Figura 30.** Grafici a violino dell'espressione differenziale dei miRNA più significativi nel confronto MII vs CAM. L'espressione dei miRNA è riportata come logaritmo in base 10 delle conte normalizzate (CPM) ottenute dal sequenziamento NGS.

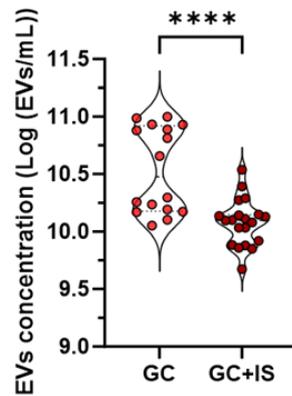
Per valutare ulteriormente il ruolo potenziale di Let-7f-5p e miR-143-3p come biomarcatori per la miosite associata a cancro (CAM), abbiamo valutato le loro capacità discriminatorie tra i due gruppi mediante l'analisi della curva ROC (**Figura 31**). I valori di specificità e sensibilità di Let-7f-5p sono stati rispettivamente di 0.77 e di 0.75, con un'area sotto la curva (AUC) pari a 0.81, mentre la specificità e la sensibilità di miR-143-3p sono stati rispettivamente di 0.70 e 0.75, con un'area sotto la curva (AUC) pari a 0.735.



*Figura 31. Analisi della curva ROC dei due miRNA. AUC = Area sotto la curva*

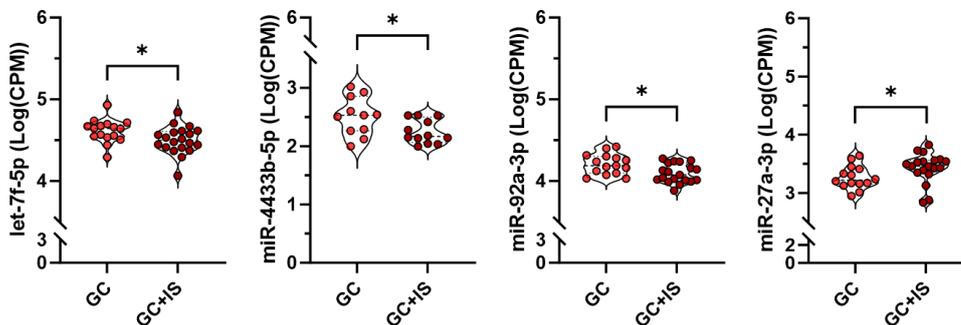
## 6. Analisi differenziale degli effetti della terapia farmacologica sulla concentrazione delle EVs e sull'espressione dei miRNA

Abbiamo infine condotto un'ulteriore analisi per esaminare l'effetto del trattamento farmacologico sulla quantità delle EVs e sull'espressione dei miRNA derivati dalle EVs plasmatiche nei pazienti affetti da MII. Il confronto è stato fatto tra due gruppi di pazienti: il primo gruppo costituito da pazienti che sono stati trattati esclusivamente con glucocorticoidi (n=16), mentre il secondo da quelli che hanno ricevuto una terapia combinata di glucocorticoidi e immunosoppressori (n=20). La **Figura 32** mostra che il trattamento farmacologico con glucocorticoidi in associazione agli immunosoppressori ha ridotto significativamente la quantità plasmatica di EVs rispetto al solo trattamento farmacologico con glucocorticoidi.



**Figura 32.** Valori di concentrazione delle EVs nei pazienti in terapia con soli GC e nei pazienti in terapia con GC in associazione agli IS. La concentrazione è indicata come logaritmo in base 10 del numero di EVs presenti in un millilitro di campione biologico.

Successivamente, abbiamo analizzato l'effetto del trattamento farmacologico sul contenuto dei miRNA nelle EVs circolanti. L'analisi differenziale dei miRNA derivati dalle EVs ha mostrato una riduzione significativa di Let-7f-5p ( $p=0.03$ ), di miR-4433b-5p ( $p=0.04$ ) e di miR-92a-3p ( $p=0.01$ ), rispetto al gruppo di pazienti trattati esclusivamente con glucocorticoidi (**Figura 33**) e un aumento di espressione di miR-27a-3p ( $p=0.03$ ) nel gruppo di pazienti trattati con glucocorticoidi e immunosoppressori rispetto al solo trattamento con glucocorticoidi.



**Figura 33.** Grafici a violino dell'espressione differenziale dei miRNA più significativi in relazione al trattamento farmacologico dei pazienti MII. L'espressione dei miRNA è riportata come logaritmo in base 10 delle conte normalizzate (CPM) ottenute dal sequenziamento NGS.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo studio abbiamo investigato il potenziale ruolo come biomarcatori delle vescicole extracellulari circolanti e del loro contenuto in miRNA in pazienti affetti da miopatia infiammatoria idiopatica (MII). E' stato anche investigato l'effetto della terapia farmacologica con glucocorticoidi e quella con glucocorticoidi associati agli immunosoppressori, sul rilascio delle vescicole extracellulari (EVs) e sul profilo di espressione dei miRNA. I nostri risultati dimostrano che le EVs circolanti provenienti dai pazienti MII presentano un diverso profilo di espressione dei miRNA, in particolare quattro miRNA (miR-122-5p, miR-486-5p, miR-192-5p e miR-32-5p) sono risultati upregolati e 4 miRNA down-regolati (miR-142-3p, miR-141-3p, let-7a-5p e miR-3613-5p) rispetto al gruppo di controllo. In un gruppo di pazienti con MII associata a neoplasie, il numero di EVs circolanti è significativamente aumentato e presentano un diverso contenuto di miRNA con un aumento di espressione di let-7f-5p e riduzione di miR-143-3p, rispetto ai pazienti MII non associata a cancro. Infine, abbiamo dimostrato che la quantità di EVs circolanti rilasciate dai pazienti MII e il loro contenuto di Let-7f-5p, di miR-4433b-5p e di miR-92a-3p vengono ridotti dal trattamento farmacologico con glucocorticoidi e immunosoppressori rispetto al solo trattamento con glucocorticoidi. Tutti questi risultati pertanto hanno evidenziato la presenza di un diverso contenuto di miRNA nelle EVs circolanti nei pazienti affetti da MII e che la loro caratterizzazione e identificazione potrebbe aprire la strada al riconoscimento di nuovi meccanismi molecolari implicati in questa patologia e, da qui, indirizzare al meglio i trattamenti terapeutici.

Le miopatie infiammatorie idiopatiche (MII) sono un gruppo eterogeneo di malattie rare autoimmuni caratterizzate principalmente da debolezza muscolare invalidante tale da limitare le comuni attività di vita quotidiana e incidere sull'equilibrio psico-emotivo del soggetto. Inoltre, le MII possono essere potenzialmente letali a causa della possibile presenza di complicanze extramuscolari come quelle polmonari, cardiovascolari o associati a neoplasie. Purtroppo i meccanismi molecolari coinvolti in questa patologia non sono ancora chiariti, soprattutto per via dell'eterogeneità dei sottotipi della malattia. Alla luce di queste osservazioni, è urgente la determinazione di nuovi biomarcatori per la diagnosi precoce di MII e per indirizzare il paziente ad una corretta terapia farmacologica.

Le vescicole extracellulari (EVs) giocano un ruolo importante nella fisiopatologia delle malattie autoimmuni a causa del loro ruolo immunomodulatorio e nella risposta cellulo-mediata, in quanto capaci di trasferire proteine, lipidi e acidi nucleici, influenzando così le funzioni fisiologiche e patologiche sia delle cellule recipienti che progenitrici. Inoltre, le EVs possono essere utilizzate come possibili biomarcatori per diagnosticare e monitorare la progressione delle malattie autoimmunitarie in quanto possono essere isolate dai fluidi biologici come il plasma, siero o liquido cerebrospinale (CSF). Inoltre, è importante analizzare il cargo delle EVs, in quanto a seconda degli stimoli provenienti dal microambiente dove circolano, le vescicole extracellulari rilasciando particolari molecole, come i miRNA, promuovono o sopprimono l'attività delle cellule immunitarie. I miRNA sono sequenze di RNA non codificante che regolano l'espressione genica post-trascrizionale e le cui alterazioni sono state associate allo sviluppo e progressione di diverse malattie autoimmuni.

Nel nostro studio condotto su 35 pazienti affetti da MII e 45 donatori sani, è emerso un profilo di espressione diverso dei miRNA contenuti nelle EVs come dimostrato dall'analisi delle componenti principali (PCA) che ha indicato una buona discriminazione tra i due gruppi. I nostri dati dimostrano che quattro miRNA sono risultati essere upregolati (miR-122-5p, miR-486-5p, miR-192-5p e miR-32-5p) e quattro miRNA downregolati (miR-142-3p, miR-141-3p, let-7a - 5p e miR-3613-5p) nel gruppo di MII. Inoltre, l'analisi bioinformatica ottenuta mediante Cytoscape ha consentito la visualizzazione delle interazioni molecolari tra i miRNA identificati in questo studio e i geni targets, in particolare, ha evidenziato il coinvolgimento di questi miRNA nei meccanismi molecolari dell'infiammazione e nel pathway dell'interferone associati alle miopatie.

L'analisi della curve ROC ha permesso di verificare che le migliori performance di sensibilità e di specificità sono riscontrabili nel miR-486-5p che risulta up-regolato e di miR-142-3p che risulta down regolato rispetto ai controlli sani. miR-486-5p appartiene alla famiglia conosciuta come "MyomirRs" perché questi miRNA sono presenti specificatamente nel tessuto cardiaco e nel tessuto muscolare scheletrico e regolano i meccanismi molecolari della miogenesi favorendo la differenziazione del mioblasto (81) tramite l'attivazione del gene ANK-1 (82) miR-486-5p è presente ad elevate concentrazioni nel plasma e nelle vescicole extracellulari (83). Recenti studi hanno dimostrato un aumento di espressione di mir486 nelle malattie infiammatorie e in particolare nelle miopatie. miR-486-5p infatti è coinvolto nelle vie di signaling di MAPK,

PI3K/Akt, mTOR e che sono cruciali per le cellule immunitarie. miR-142-3p è espresso soprattutto nelle cellule immunitarie e soprattutto nei linfociti T suggerendo un ruolo funzionale importante nei processi emopoietici e nell'immunità. Non è ancora chiaro il ruolo di miR-142-3p nelle miopatie ma sembra che la riduzione della sua espressione possa contribuire ad una overespressione di geni targets (vedi **Figura 28**) del pathway dell'interferone (IFN- $\beta$ ) favorendo la sua up-regolazione e quindi l'inflammazone tipica della miopatia.

La seconda parte del nostro studio è stata indirizzata nel verificare se vi sono differenze di concentrazione di EVs e di miRNA derivate da EVs tra il gruppo di pazienti affetti da MII con neoplasie (CAM) e i pazienti MII senza neoplasie. I nostri dati dimostrano un significativo aumento di EVs nel gruppo MII con neoplasie rispetto a quello senza neoplasie e di un diverso profilo di espressione di miRNA. Infatti, let-7f-5p è risultato essere significativamente aumentato mentre miR-143-3p significativamente ridotto nelle EVs dei pazienti con CAM. Pur non essendo ancora chiaro il meccanismo fisiopatologico di questi eventi, abbiamo ipotizzato che l'aumento di EVs e il diverso profilo di miRNA possa essere correlato a un traffico di antigeni, veicolato dalle EVs, disregolato nelle forme paraneoplastiche. In effetti, è probabile che le EVs svolgano un ruolo patogenetico in questo gruppo di pazienti, facilitando la diffusione di auto-antigeni dal microambiente neoplastico arricchendosi da un lato di let-7f-5p e dall'altro riducendo il contenuto di miR-143-3p, attraverso una prolungata ed estesa presentazione dell'antigene che, a sua volta, innesca potenti risposte immunitarie con conseguente sviluppo delle manifestazioni paraneoplastiche muscolari. Bisogna considerare inoltre che nelle neoplasie le EVs e il loro cargo rappresentato da questi miRNA svolgono diverse funzioni sia di controllo sul microambiente immunitario neoplastico, ad esempio inducendo l'apoptosi delle cellule T citotossiche attivate o sopprimendo vie di segnale dell'attivazione linfocitaria, sia di promozione della crescita neoplastica ad esempio, attraverso la promozione del "switch angiogenico" e il trasferimento di fattori di crescita. Quindi, l'aumento dei livelli di EVs nelle CAM potrebbe essere spiegato sia come un fattore coinvolto nell'induzione della miopatia come sindrome paraneoplastica, sia come un meccanismo per favorire la crescita della stessa neoplasia. Infine, abbiamo valutato l'effetto del trattamento farmacologico dei pazienti MII sul contenuto di EVs e del profilo di espressione di miRNA. Il contenuto di EVs circolanti è risultato ridotto nei pazienti MII che assumevano la terapia in associazione GC + IS rispetto a quella con solo GC. I livelli di EVs significativamente più

bassi in pazienti trattati con immunosoppressione sistemica suggerisce un impatto dell'intensità dell'immunosoppressione sulla produzione o sul traffico delle EVs. Inoltre, il trattamento farmacologico combinato ha ridotto l'espressione di Let-7f-5p che era significativamente incrementata nel gruppo di pazienti MII affetti da neoplasie. Recenti studi riportano che Let-7f-5p gioca un ruolo fondamentale nella differenziazione cellulare e la sua regolazione ed espressione anomala è associata all'inizio e alla progressione del cancro. Infatti, un aumento di espressione di let-7f-5p è riportato in diverse patologie infiammatorie associate allo sviluppo di neoplasie come nella tiroide, nel rene e nei surreni. Ulteriori studi hanno suggerito che i livelli plasmatici e quelli presenti nelle EVs di let-7f-5p possono essere utilizzati per monitorare la terapia con lo scopo di fornire opzioni di trattamento personalizzate per i pazienti con MII associati alle neoplasie.

In conclusione, questo studio ha mostrato come le vescicole extracellulari e il loro contenuto in miRNA siano coinvolte nelle miopatie infiammatorie idiopatiche e che le loro modificazioni riflettono diversi fenotipi di malattia, soprattutto quella associata al cancro. Inoltre, i nostri dati suggeriscono che l'identificazione e la caratterizzazione delle EVs e del loro cargo, in particolare dei miRNA, hanno un ruolo fondamentale non solo come potenziali biomarcatori per la diagnosi precoce di MII ma anche per la risposta al trattamento farmacologico aprendo a una visione clinica di medicina di precisione.





## BIBLIOGRAFIA:

1. Alenzi FM. Myositis Specific Autoantibodies: A Clinical Perspective. *Open Access Rheumatol Res Rev.* 2020;12:9–14. 2021;7(1):86
2. Lundberg IE, Fujimoto M, Vencovsky J, Aggarwal R, Holmqvist M, Christopher-Stine L, et al. Idiopathic inflammatory myopathies. *Nat Rev Dis Primer.* 2021;7(1):86.
3. Lundberg IE, Tjärnlund A, Bottai M, Werth VP, Pilkington C, Visser M de, et al. 2017 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies and their major subgroups. *Ann Rheum Dis.* dicembre 2017;76(12):1955–64.
4. Furst DE, Amato AA, Iorga ŞR, Gajria K, Fernandes AW. Epidemiology of adult idiopathic inflammatory myopathies in a U.S. managed care plan. *Muscle Nerve.* 2012;45(5):676–83.
5. Iaccarino L, Ghirardello A, Bettio S, Zen M, Gatto M, Punzi L, et al. The clinical features, diagnosis and classification of dermatomyositis. *Diagn Criteria Autoimmune Dis.* 2014;48–49:122–7
6. Dobloug GC, Svensson J, Lundberg IE, Holmqvist M. Mortality in idiopathic inflammatory myopathy: results from a Swedish nationwide population-based cohort study. *Ann Rheum Dis.* 2018;77(1):40.
7. Rothwell S, Cooper RG, Lundberg IE, Miller FW, Gregersen PK, Bowes J, et al. Dense genotyping of immune-related loci in idiopathic inflammatory myopathies confirms HLA alleles as the strongest genetic risk factor and suggests different genetic background for major clinical subgroups. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(8):1558–66.
8. Adler BL, Christopher-Stine L. Triggers of inflammatory myopathy: insights into pathogenesis. *Discov Med.* 2018;25(136):75–83.
9. Sarwar A, Dydyk AM, Jatwani S. Polymyositis. In: *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022*
10. Naddaf E, Barohn RJ, Dimachkie MM. Inclusion Body Myositis: Update on Pathogenesis and Treatment. *Neurother J Am Soc Exp Neurother.* 2018;15(4):995–1005.

11. Greenberg SA. Inclusion body myositis: clinical features and pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol*. 2019;15(5):257–72.
12. Greenberg SA, Pinkus JL, Amato AA, Kristensen T, Dorfman DM. Association of inclusion body myositis with T cell large granular lymphocytic leukaemia. *Brain J Neurol*. 2016;139(Pt 5):1348–60.
13. Connors GR, Christopher-Stine L, Oddis CV, Danoff SK. Interstitial lung disease associated with the idiopathic inflammatory myopathies: what progress has been made in the past 35 years? *Chest*. 138(6):1464–74.
14. Solomon J, Swigris JJ, Brown KK. Myositis-related interstitial lung disease and antisynthetase syndrome. *J Bras Pneumol Publicacao Of Soc Bras Pneumol E Tisiologia*. 2011;37(1):100–9.
15. Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Mammen AL. Immune-Mediated Necrotizing Myopathy. *Curr Rheumatol Rep*. 2018;20(4):21.
16. Nuño-Nuño L, Joven BE, Carreira PE, Maldonado-Romero V, Larena-Grijalba C, Llorente Cubas I, et al. Overlap myositis, a distinct entity beyond primary inflammatory myositis: A retrospective analysis of a large cohort from the REMICAM registry. *Int J Rheum Dis*. 2019;22(8):1393–401.
17. Rayavarapu, S., Coley, W., Kinder, T.B. et al. Idiopathic inflammatory myopathies: pathogenic mechanisms of muscle weakness. *Skeletal Muscle* 3, 13 (2013). <https://doi.org/10.1186/2044-5040-3-13>.
18. Gono T, Kawaguchi Y, Hara M, Masuda I, Katsumata Y, Shinozaki M, et al. Increased ferritin predicts development and severity of acute interstitial lung disease as a complication of dermatomyositis. *Rheumatol Oxf Engl*. 2010;49(7):1354–60.
19. Ukichi T, Yoshida K, Matsushima S, Kawakami G, Noda K, Furuya K, et al. MRI of skeletal muscles in patients with idiopathic inflammatory myopathies: characteristic findings and diagnostic performance in dermatomyositis. *RMD Open*. 2019;5(1):e000850.
20. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TEJ, Lynch DA, Nicholson AG, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(6):733–48.
21. Barsotti S, Lundberg IE. Current Treatment for Myositis. *Curr Treatm Opt Rheumatol*. 2018;4(4):299-315. doi: 10.1007/s40674-018-0106-2. Epub 2018 Sep 15. PMID: 30613465; PMCID: PMC6299051.
22. Scherholz ML, Schlesinger N, Androulakis IP. Chronopharmacology of glucocorticoids. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019 Nov-Dec;151-152:245-261. doi: 10.1016/j.addr.2019.02.004. Epub 2019 Feb 21. PMID: 30797955; PMCID: PMC6703983.

23. Cruz-Topete D, Cidlowski JA. One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*. 2015;22(1-2):20-32. doi: 10.1159/000362724. Epub 2014 Sep 12. PMID: 25227506; PMCID: PMC4243162.
24. Cruz-Topete D, Cidlowski JA, Glucocorticoids: Molecular Mechanisms of Action, in: Riccardi C, Levi-Schaffer F, Tiligada E (Eds.) *Immunopharmacology and Inflammation*, Springer International Publishing, Switzerland, 2018.
25. Oakley RH, Cidlowski JA. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Nov;132(5):1033-44. doi: 10.1016/j.jaci.2013.09.007. Epub 2013 Sep 29. PMID: 24084075; PMCID: PMC4084612.
26. <https://hdl.handle.net/2318/1722973>.
27. Ashton C, Paramalingam S, Stevenson B, Bruschi A, Needham M. Idiopathic inflammatory myopathies: a review. *Intern Med J*. 2021;51(6):845–52.
28. «AGENZIA ITALIANA DEL FARMACO: RIASSUNTO DELLE CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO PREDNISONA»
29. Allelein, S. et al. Potential and challenges of specifically isolating extracellular vesicles from heterogeneous populations. *Sci Rep* 11, 1–12 (2021).
30. Tian, J., Casella, G., Zhang, Y., Rostami, A. & Li, X. Potential roles of extracellular vesicles in the pathophysiology, diagnosis, and treatment of autoimmune diseases. *Int J Biol Sci* 16,620–632 (2020).
31. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30, 255–289 (2014).
32. Yáñez-Mó, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4, 27066 (2015).
33. Théry, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 7, 1535750 (2018).
34. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal*. 2021;19(1):47.
35. van Niel, G., D'Angelo, G. & Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 213–228 (2018).
36. Teng, F. & Fussenegger, M. Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering. *Advanced Science* 8, 1–17 (2021).

37. Liu, M.-L., Williams, K. J. & Werth, V. P. Microvesicles in Autoimmune Diseases. in *Advances in Clinical Chemistry* vol. 77 125–175 (Elsevier Inc., 2016).
38. Andreu, Z. & Yáñez-Mó, M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol* 5, 1–12 (2014).
39. 118. Stahl, P. D. & Raposo, G. Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of.
40. Nicolas, R. H. & Goodwin, G. H. Isolation and Analysis. in *The Chromosomal Proteins* 41–68 (Elsevier, 1982). doi:10.1016/B978-0-12-386050-7.50008-3.
41. Massaro, C. et al. Extracellular Vesicle-Based Nucleic Acid Delivery: Current Advances and Future Perspectives in Cancer Therapeutic Strategies. *Pharmaceutics* 12, 980 (2020).
42. van Niel, G., D'Angelo, G. & Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 213–228 (2018).
43. Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses. *Traffic* 12, 1659–1668 (2011).
44. Sun, H., Burrola, S., Wu, J. & Ding, W. Q. Extracellular vesicles in the development of cancer therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21 1–22 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms21176097> (2020).
45. Buzas, E. I., György, B., Nagy, G., Falus, A. & Gay, S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* 10, 356–364 (2014).
46. Zhao, Y. et al. Trends in the biological functions and medical applications of extracellular vesicles and analogues. *Acta Pharm Sin B* 11, 2114–2135 (2021).
47. Robbins, P. D., Dorronsoro, A. & Booker, C. N. Regulation of chronic inflammatory and immune processes by extracellular vesicles. *Journal of Clinical Investigation* vol. 126 1173–1180 Preprint at <https://doi.org/10.1172/JCI81131> (2016).
48. Xu, K. et al. Extracellular vesicles as potential biomarkers and therapeutic approaches in autoimmune diseases. *Journal of Translational Medicine* vol. 18 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02609-0> (2020).
49. Zhao, Z., Wijerathne, H., Godwin, A. K. & Soper, S. A. Isolation and analysis methods of extracellular vesicles (EVs). *Extracell Vesicles Circ Nucl Acids* (2021)doi:10.20517/evcna.2021.07.
50. Loredó Martínez, M. et al. Nonimmune mechanisms in idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 32, 515–522 (2020).
51. Kim, S. et al. Roles of Exosome-Like Vesicles Released from Inflammatory C2C12 Myotubes: Regulation of Myocyte Differentiation and Myokine Expression. *Cellular Physiology and Biochemistry* 48, 1829–1842 (2018).

52. Zhu, T., Wang, Y., Jin, H. & Li, L. The role of exosome in autoimmune connective tissue disease. *Ann Med* 51, 101–108 (2019).
53. Baka, Z. et al. Increased serum concentration of immune cell derived microparticles in polymyositis/dermatomyositis. *Immunol Lett* 128, 124–130 (2010).
54. Xu, K. et al. Extracellular vesicles as potential biomarkers and therapeutic approaches in autoimmune diseases. *J Transl Med* 18, 432 (2020).
55. Lane, R. E., Korbie, D., Hill, M. M. & Trau, M. Extracellular vesicles as circulating cancer biomarkers: opportunities and challenges. *Clin Transl Med* 7, (2018).
56. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y. PMID: 8252621.
57. Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. 2010 Nov;11(7):537-61. doi: 10.2174/138920210793175895. PMID: 21532838; PMCID: PMC3048316.
58. Alevizos I, Illei GG. MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(7):391–8
59. Visone R, Croce CM. MiRNAs and cancer. *Am J Pathol*. 2009;174(4):1131–8.
60. Fernández-Messina, L., Gutiérrez-Vázquez, C., Rivas-García, E., Sánchez-Madrid, F. & de la Fuente, H. Immunomodulatory role of microRNAs transferred by extracellular vesicles. *Biol Cell* 107, 61–77 (2015).
61. Groot, M. & Lee, H. Sorting Mechanisms for MicroRNAs into Extracellular Vesicles and Their Associated Diseases. *Cells* 9, 1–16 (2020).
62. Yin, Y. et al. MIR-146a Regulates Inflammatory Infiltration by Macrophages in Polymyositis/Dermatomyositis by Targeting TRAF6 and Affecting IL-17/ICAM-1 Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry* 40, 486–498 (2016).
63. Ye, Q. & Chen, Z. MicroRNA-409-3p regulates macrophage migration in polymyositis through targeting CXCR4. *Autoimmunity* 54, 353–361 (2021).
64. Yutao, L. et al. MicroRNA-381 reduces inflammation and infiltration of macrophages in polymyositis via downregulating HMGB1. *Int J Oncol* 53, 1332–1342 (2018).
65. Georgantas, R. W. et al. Inhibition of myogenic microRNAs 1, 133, and 206 by inflammatory cytokines links inflammation and muscle degeneration in adult inflammatory myopathies. *Arthritis and Rheumatology* 66, 1022–1033 (2014).
66. Parkes, J. E. et al. MicroRNA and mRNA profiling in the idiopathic inflammatory myopathies. *BMC Rheumatol* 4, 25 (2020).

67. Oshikawa, Y. et al. Decreased miR-7 expression in the skin and sera of patients with dermatomyositis. *Acta Derm Venereol* 93, 273–276 (2013).
68. Yu, L. et al. hsa-miR-7 Is a Potential Biomarker for Idiopathic Inflammatory Myopathies with Interstitial Lung Disease in Humans. *Ann Clin Lab Sci* 48, 764–769 (2018).
69. Hirai, T. et al. Circulating plasma microRNA profiling in patients with polymyositis/dermatomyositis before and after treatment: miRNA may be associated with polymyositis/dermatomyositis. *Inflamm Regen* 38, 1 (2018).
70. Bozzini, S. et al. A Proof-of-Concept Analysis of Plasma-Derived Exosomal microRNAs in Interstitial Pulmonary Fibrosis Secondary to Antisynthetase Syndrome. *Int J Mol Sci* 23, 14579(2022).
71. - Lundberg IE, Tjärnlund A, Bottai M, Werth VP, Pilkington C, Visser M, Alfredsson L, Amato AA, Barohn RJ, Liang MH, Singh JA, Aggarwal R, Arnardottir S, Chinoy H, Cooper RG, Dankó K, Dimachkie MM, Feldman BM, Torre IG, Gordon P, Hayashi T, Katz JD, Kohsa.
72. - Franco C, Ghirardello A, Bertazza L, Gasparotto M, Zanatta E, Iaccarino L, Valadi H, Doria A, Gatto M. Size-Exclusion Chromatography Combined with Ultrafiltration Efficiently Isolates Extracellular Vesicles from Human Blood Samples in Health and Disease.
73. <https://www.nanoscience.com/techniques/transmission-electron-microscopy/>.
74. <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/cell-free-rna/mirneasy-serum-plasma-advanced-kit>.
75. <https://www.thermofisher.com/it/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit.html>.
76. <https://www.thermofisher.com/it/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit.html>.
77. [https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system\\_documentation/nextseq/nextseq-denature-dilute-libraries-guide-15048776-09.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/nextseq/nextseq-denature-dilute-libraries-guide-15048776-09.pdf).
78. <https://emea.support.illumina.com/bulletins/2017/02/what-is-the-phix-control-v3-library-and-what-is-its-function-in-.html>.
79. <https://emea.support.illumina.com/bulletins/2016/04/fastq-files-explained.html>.
80. Abbas-Aghababazadeh F, Li Q, Fridley BL. Comparison of normalization approaches for gene expression studies completed with high-throughput

sequencing. *PLoS One*. 2018 Oct 31;13(10):e0206312. doi: 10.1371/journal.pone.0206312. PMID: 30379879; PMCID: PMC6209231.

81. Kamiya M, Kimura N, Umezawa N, Hasegawa H, Yasuda S. Muscle fiber necroptosis in pathophysiology of idiopathic inflammatory myopathies and its potential as target of novel treatment strategy. *Front Immunol*. 2023 Jul 7;14:1191815. doi: 10.3389/fimmu.2023.1191815. PMID: 37483632; PMCID: PMC10361824.

82. Zilahi E, Adamecz Z, Bodoki L, Griger Z, Póliska S, Nagy-Vincze M, Dankó K. Dysregulated expression profile of myomiRs in the skeletal muscle of patients with polymyositis. *EJIFCC*. 2019 Jun 24;30(2):237-245. PMID: 31372109; PMCID: PMC6599196.

83. Argyriou A, Horuluoglu B, Galindo-Feria AS, Diaz-Boada JS, Sijbranda M, Notarnicola A, Dani L, van Vollenhoven A, Ramsköld D, Nennesmo I, Dastmalchi M, Lundberg IE, Diaz-Gallo LM, Chemin K. Single-cell profiling of muscle-infiltrating T cells in idiopathic inflammatory myopathies. *EMBO Mol Med*. 2023 Jul 31:e17240. doi: 10.15252/emmm.202217240. Epub ahead of print. PMID: 37522383.



## RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Prof. Giulio Ceolotto per la sua disponibilità e per avermi concesso di svolgere la tesi sperimentale presso il Campus Biomedico. Voglio ringraziare la Dottoressa Alessandra Giannella per la sua pazienza e suoi insegnamenti che hanno arricchito il mio percorso di apprendimento, aprendomi a nuove prospettive e conoscenze. Inoltre, ringrazio anche la dottoressa Andrea Benetti che si è sempre dimostrata disponibile e pronta ad aiutarmi.

Ringrazio di cuore tutti i miei amici lentellesi, che nonostante la grande distanza, sono stati sempre presenti nella mia vita, con gesti semplici e divertenti, che hanno reso i momenti trascorsi insieme ancora più preziosi. In particolare voglio ringraziare personalmente Simone, Alex, Camillo, Francesco, Alice, Lorenza, Edoardo e Filippo, amici di una vita con cui condivido ricordi meravigliosi. Con loro, voglio estendere il mio ringraziamento anche ai miei cari amici Adriano, Rocco, e Pasquale, con i quali ho sviluppato un legame unico, soprattutto negli ultimi anni. Anche se trascorriamo pochi momenti fisicamente insieme, manteniamo un contatto quotidiano, creando così la sensazione di essere sempre insieme. Tanto voi quanto gli amici di Lentella siete per me come una famiglia, persone su cui posso contare in qualsiasi momento.

Ringrazio anche i miei compagni di corso per le belle esperienze vissute qui a Padova, soprattutto nei primi anni. Un ringraziamento particolare va al mio caro coinquilino Francesco con il quale ho condiviso la stessa casa per tre anni; una splendida persona e che mi ha supportato anche nei momenti più difficili. Inoltre, voglio ringraziare i miei carissimi vicini di casa, Iuliano e Violanda, per la loro gentilezza e bontà d'animo.

Grazie di cuore a tutti i parenti: un ringraziamento speciale va ai miei affettuosi zii Giordano, Loris, Tiziana e Eridania, che sono stati un costante sostegno nella mia vita; in particolare, desidero ringraziare di cuore le mie nonne, Emma e Lella, per il loro grande affetto. Mia nonna Lella la ringrazio anche per i suoi messaggi di buonanotte che ricevo ogni sera, e che sono diventati dei momenti speciali delle mie giornate. Un pensiero e una dedica speciale va anche ai miei nonni Camillo e Carmine, che avrei tanto desiderato fossero qui con me in questo momento. Spero di avervi reso orgogliosi di me.

Infine dedico questa tesi alla mia splendida famiglia: ai miei amati genitori, dico grazie per loro il sostegno economico e per i grandi sacrifici. Senza di voi, non avrei mai potuto raggiungere questo importante traguardo. Siete dei genitori straordinari che, nonostante le difficoltà, vi siete sempre contraddistinti per la vostra grande e non scontata disponibilità. Grazie a mia sorella Veronica, una ragazza solare che illumina le mie giornate. Grazie a mio fratello Ismaele, il mio punto di riferimento. Oltre che fratello maggiore, ti considero anche un grande amico, che mi ha sempre guidato e supportato, anche durante i primi passi del mio percorso universitario. Papà, Mamma, Veronica e Ismaele, siete il dono più prezioso che ho e voglio che sappiate che vi vorrò sempre un mondo di bene.

E a me stesso ribadisco con forza: “Credi sempre fermamente in ciò che fai e, soprattutto, non smettere mai di lottare e perseverare.”

