

**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA**

Dipartimento di Medicina – DIMED

Direttore: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

U.O.C. di Reumatologia

Direttore: Ch.mo Prof. Andrea Doria

TESI DI LAUREA

**ASSOCIAZIONI CLINICHE, ORIGINE CELLULARE E  
CARATTERIZZAZIONE DEL CARGO DELLE VESICOLE  
EXTRACELLULARI IN PAZIENTI AFFETTI DA MIOPATIE  
INFIAMMATORIE IDIOPATICHE: STUDIO TRASVERSALE  
MONOCENTRICO**

Relatrice: Dott.ssa Mariele Gatto

Correlatrice: Dott.ssa Chiara Franco

Laureando: Davide Ragno

Anno Accademico 2021/2022



# INDICE

RIASSUNTO .....	V
ABSTRACT .....	VII
1. INTRODUZIONE .....	1
1.1 MIOPATIE INFIAMMATORIE IDIOPATICHE .....	1
1.1.1 DEFINIZIONE .....	1
1.1.2 CLASSIFICAZIONE .....	1
1.1.3 EPIDEMIOLOGIA .....	8
1.1.4 EZIOLOGIA .....	9
1.1.5 MECCANISMI PATOGENETICI .....	12
1.1.6 MANIFESTAZIONI CLINICHE .....	16
1.1.7 DIAGNOSI .....	23
1.1.8 CLINIMETRIA .....	31
1.1.9 PROGNOSI .....	32
1.1.10 TERAPIA .....	33
1.2 VESCICOLE EXTRACELLULARI .....	38
1.2.1 DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE .....	38
1.2.2 BIOGENESI E RILASCIO .....	39
1.2.3 TARGETING E UPTAKE DELLE EVs NELLE CELLULE RICEVENTI .....	44
1.2.4 CARGO .....	45
1.2.5 FUNZIONI BIOLOGICHE .....	46
1.2.6 EVs NELLA CANCEROGENESI .....	48
1.2.7 EVs NELLE MALATTIE REUMATICHE AUTOIMMUNI .....	50
1.2.8 EVs NELLE MIOPATIE INFIAMMATORIE IDIOPATICHE .....	53
1.3 MICRO-RNA .....	55
1.3.1 BIOGENESI .....	56

1.3.2	MECCANISMI DI FUNZIONAMENTO.....	59
1.3.3	FUNZIONI BIOLOGICHE.....	62
1.3.4	microRNA NELLE PATOLOGIE UMANE .....	64
1.3.5	microRNA NELLE MALATTIE AUTOIMMUNI .....	68
1.3.6	microRNA NELLE MIOPATIE INFIAMMATORIE IDIOPATICHE.....	79
2.	SCOPO DELLO STUDIO .....	85
3.	PAZIENTI E METODI .....	86
3.1	PAZIENTI .....	86
3.2	METODI .....	89
3.2.1	RACCOLTA E PROCESSAMENTO DEI CAMPIONI.....	89
3.2.2	CROMATOGRAFIA AD ESCLUSIONE DIMENSIONALE .....	89
3.2.3	ULTRAFILTRAZIONE .....	90
3.2.4	NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS (NTA).....	90
3.2.5	CITOFLUORIMETRIA PER IMMAGINI (IFC) .....	91
3.2.6	ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE DALLE VESCICOLE EXTRACELLULARI.....	91
3.2.7	PREPARAZIONE DELLE <i>LIBRARIES</i> .....	92
3.2.8	NEXT GENERATION SEQUENCING.....	94
3.2.9	ANALISI STATISTICA.....	94
4.	RISULTATI.....	95
4.1	QUANTIFICAZIONE DELLE EVs MEDIANTE NTA .....	97
4.2	CARATTERIZZAZIONE DELLE EVs MEDIANTE IFC.....	99
4.3	ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI microRNA CONTENUTI NELLE VESCICOLE EXTRACELLULARI.....	101
5.	DISCUSSIONE.....	112
6.	CONCLUSIONI.....	122

## RIASSUNTO

**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) e altri mediatori. I miRNA sono sequenze di RNA non codificante (19-25 nucleotidi) che regolano l'espressione genica post-trascrizionale e le cui alterazioni sono state associate allo sviluppo e progressione di diverse malattie autoimmuni. Attualmente, il ruolo degli EVs-miRNA nelle MII non è stato esaustivamente esplorato.

**Scopo dello studio.** Lo scopo dello studio è di caratterizzare le EVs plasmatiche, esplorarne l'origine e determinarne il cargo di miRNA in pazienti con MII. Ci proponiamo inoltre di indagare le associazioni tra le caratteristiche delle EVs e diversi fenotipi di MII.

**Pazienti e metodi.** In questo studio trasversale monocentrico sono stati reclutati pazienti adulti ( $\geq 18$  anni) affetti da MII in follow-up presso l'U.O.C. di Reumatologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova e 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* (NTA). La caratterizzazione del cargo di miRNA delle EVs è stata realizzata mediante *QIAseq miRNA Library Kit* seguita da *Next Generation Sequencing* (NGS).

I dati clinici e di laboratorio sono stati ottenuti dalla rete intraospedaliera e sono stati analizzati in modo trasversale; per i confronti sono stati utilizzati i test parametrici t di Student e one-way ANOVA con correzione di Bonferroni.

**Risultati.** Sono state isolate EVs plasmatiche da una coorte di 59 pazienti con MII (F:M 1,7:1; età media $\pm$ DS 55,9 $\pm$ 12,9 anni) e confrontate con 60 HD appaiati per età e sesso. 18 pazienti (30,5%) erano affetti da dermatomiosite; 8 da polimiosite (13,6%); 2 da miosite a corpi inclusi (3,4%); 14 da miosite associata a cancro (CAM; 23,7%); 14 da sindrome anti-tRNA sintetasi (23,7%); 3 da miosite non specificata (5,1%). L'analisi degli EVs-miRNA è stata condotta su 21 pazienti e 21 HD. I valori di concentrazione delle EVs isolate hanno raggiunto  $\sim 10^{10}$  EV/mL all'NTA. La IFC ha

confermato il corretto isolamento di EVs grazie all'identificazione di marcatori di superficie specifici (tetraspanine) e ha evidenziato una prevalenza di EVs CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> rispetto a CD3<sup>+</sup> ( $p < 0,0001$ ), suggerendo una potenziale derivazione dai linfociti B. I pazienti con MII hanno mostrato concentrazioni di EVs maggiori rispetto ai HD ( $p = 0,0461$ ). La presenza di CAM è stata associata a concentrazioni di EVs più elevate rispetto ai HD ( $p = 0,003$ ) e ai pazienti non-CAM ( $p = 0,025$ ). La concentrazione delle EVs è risultata ridotta in pazienti sottoposti a terapia immunosoppressiva.

L'analisi sugli EVs-miRNA ha evidenziato un profilo di espressione differenziale (DE) tra pazienti e HD per 10 miRNA. Alcuni miRNA presentano funzioni immunomodulatorie (miR-451a, miR-222-3p, miR-15a-5p), altri (miR-486-5p, miR-185-5p, miR-23b-3p) svolgono ruoli chiave nell'oncogenesi e si presentano specificamente alterati nelle CAM. miR-223-3p è significativamente down-regolato nelle DM. I miRNA della famiglia *let7* con funzione anti-flogistica e anti-neoplastica erano sempre down-regolati rispetto ai HD.

**Conclusioni.** Le EVs sono alterate nei pazienti con MII rispetto ai HD in termini di concentrazione e cargo di miRNA. La stratificazione per subset di malattia suggerisce che diversi fenotipi di MII siano associati a diversi profili miRNA, con implicazioni funzionali e potenzialmente terapeutiche. I nostri dati suggeriscono quindi un possibile ruolo delle EVs come potenziali biomarcatori per la diagnosi precoce di specifici fenotipi di MII e per la risposta al trattamento, sottolineando al contempo l'importanza della caratterizzazione del profilo epigenetico dei pazienti con MII in una visione di medicina di precisione basata sull'inquadramento endotipico di condizioni eterogenee dal punto di vista clinico e patogenetico.

## ABSTRACT

**Background.** Idiopathic inflammatory myopathies (IIMs) are a heterogeneous group of rare immune-mediated diseases whose processes have not yet been elucidated and for which biomarkers for early diagnosis are still lacking. Extracellular vesicles (EVs) are nanoparticles involved in intercellular signaling able to carry microRNAs (miRNAs) and other mediators. miRNA are short non-coding RNA sequences (19-25 nucleotides) that regulate post-transcriptional gene expression and whose alterations have been associated with the development and progression of several autoimmune diseases.

**Aim of the study.** This study aims to characterize plasma EVs, to explore their cellular origin and to analyze their miRNA cargo in patients with IIM. Moreover, we aim at investigating the associations between EVs features and their miRNA cargo with different IIM phenotypes.

**Patients and Methods.** Adults ( $\geq 18$  years old) affected by IIM treated at the U.O.C. of Rheumatology of Padua University Hospital and age- and sex-matched healthy donors (HD) were included in this single center cross-sectional study. Isolation of EVs was obtained by size exclusion chromatography followed by ultrafiltration. Concentration and size of EVs were assessed by nanoparticle tracking analysis (NTA). Characterization of miRNA cargo inside EVs was performed by QIAseq miRNA Library Kit followed by Next Generation Sequencing (NGS).

Clinical and laboratory data were retrieved from the intrahospital network and they were analyzed in a cross-sectional way; parametric Student-t test and one-way ANOVA with Bonferroni correction tests were used for comparisons.

**Results.** Plasma EVs were isolated from a cohort of 59 patients with IIM (F:M 1.7:1; mean $\pm$ DS age 55.9 $\pm$ 12.9 years) and compared with 60 age- and sex-matched HD. 18 patients suffered from dermatomyositis (30.5%); 8 from polymyositis (13.6%); 2 from inclusion body myositis (3.4%); 14 from cancer-associated myositis (CAM; 23.7%); 14 from anti-tRNA synthetase syndrome (23.7%); and 3 from unspecified myositis (5.1%). EVs-miRNA analysis was conducted on 21 patients and 21 HD.

The concentration values of the isolated EVs reached  $\sim 10^{10}$  EVs/mL at NTA. Flow cytometry confirmed the correct isolation of EVs by the identification of typical surface markers of EVs (tetraspanins) and showed a significant prevalence of EVs

with CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> compared with CD3<sup>+</sup> ( $p < 0.0001$ ), suggesting that EVs might derive from B lymphocytes.

IIM patients displayed significantly increased EVs concentrations compared to HD ( $p = 0.0461$ ). In addition, the presence of CAM was associated with higher EVs concentrations compared to healthy donors ( $p = 0.003$ ) and non-CAM patients ( $p = 0.025$ ). EVs concentration was found to be reduced in patients treated with immunosuppressive drugs.

Analysis on EVs-miRNA revealed a different expression (DE) profile between IIM patients and HD involving 10 miRNAs. Some of the detected miRNAs exhibit immune-modulatory functions (miR-451a, miR-222-3p, miR-15a-5p), while others (miR-486-5p, miR-185-5p, miR-23b-3p) play key roles in oncogenesis and are specifically altered in CAM. miR-223-3p was significantly down-regulated in DM. Let7 family miRNAs with anti-flogistic and anti-neoplastic functions were found to be consistently down-regulated compared to HD.

**Conclusions.** EVs are altered in patients with IIM compared with HD in terms of EVs concentration and miRNA cargo. Stratification by disease subsets suggests that different phenotypes of IIM are associated with different miRNA profiles, with functional and potentially therapeutic implications. Thus, our data suggest a possible role of EVs as potential biomarkers for early detection of specific IIM phenotypes and treatment response, while underscoring the importance of characterizing the epigenetic profile of patients with IIM in a precision medicine vision based on the endotypic framing of clinically and pathogenetically heterogeneous conditions.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 MIOPATIE INFIAMMATORIE IDIOPATICHE

### 1.1.1 DEFINIZIONE

Le miopatie infiammatorie idiopatiche (MII) sono un gruppo eterogeneo di patologie immuno-mediate ad eziologia multifattoriale e coinvolgimento d'organo multisistemico, con un particolare interessamento della muscolatura scheletrica<sup>1</sup>.

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 una affaticabilità 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.

Il termine di MII comprende quindi un insieme eterogeneo di condizioni che presentano una vasta gamma di manifestazioni cliniche, reperti istopatologici, nonché profili sierologici e diversa suscettibilità al trattamento<sup>2</sup>.

### 1.1.2 CLASSIFICAZIONE

La prima classificazione che fornisce un approccio all'inquadramento delle MII è stata fornita da Bohan e Peter (1975) e individua 5 gruppi: polimiosite (PM); dermatomiosite (DM); dermatomiosite (o polimiosite) associata a cancro (CAM); dermatomiosite (o polimiosite) associata a vasculite dell'infanzia; dermatomiosite (o polimiosite) associata a connettiviti, oggi nota anche come miosite overlap (OM). Ciascuno di questi gruppi può essere una diagnosi "definita", "probabile" o "possibile" in base alla presenza o all'assenza dei cinque criteri diagnostici.<sup>3,4</sup>

I cinque criteri diagnostici forniti da Bohan e Peter, visibili nella *Tabella 1*, sono: 1) debolezza muscolare prossimale simmetrica all'esame obiettivo; 2) aumento degli enzimi muscolari; 3) alterazioni miopatiche all'elettromiografia (EMG); 4) anomalie istopatologiche rilevate con la biopsia muscolare e assenza di segni di

altre miopatie; 5) rash cutaneo caratteristico di DM. Si possono quindi formulare le diagnosi di: 1) DM definita se sono soddisfatti almeno quattro criteri, compreso quello dermatologico; 2) PM definita in presenza di tutti e quattro i criteri, tranne quello dermatologico; 3) DM o PM possibile o probabile quando non sono soddisfatti i criteri di esclusione e non tutti i criteri necessari sono presenti.

La sensibilità raggiunge il 94% a scapito di una specificità del 29%.

Criteria	Description
A	Proximal and symmetrical muscle weakness of the pelvic and scapular girdle, anterior flexors of the neck, progressing for weeks to months, with or without dysphagia or involvement of respiratory muscles
B	Elevation of the serum levels of skeletal muscle enzymes: creatine kinase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase and aldolase
C	Electromyography characteristic of myopathy (short and small motor units, fibrillation, positive pointy waves, insertional irritability and repetitive high-frequency firing)
D	Muscle biopsy showing necrosis, phagocytosis, regeneration, perifascicular atrophy, perivascular inflammatory exudate
E	Typical cutaneous changes: (1) Heliotrope rash with periorbital oedema and violaceous erythema (2) Gottron's sign: vasculitis in the elbow, metacarpophalangeal and proximal interphalangeal joints
Polymyositis	(1) Definite – all of A–D (2) Probable – any three of A–D (3) Possible – any two of A–D
Dermatomyositis	(1) Definite – E plus and three of A–D (2) Probable – E plus and two of A–D (3) Possible – E plus and one of A–D

Exclusion criteria: congenital muscular dystrophies, central or peripheral neurological disease, infectious myositis, metabolic/endocrine myopathies and myasthenia gravis.

Tabella 1. Criteri classificativi di Bohan e Peter per polimiosite e dermatomiosite. Oldroyd et al, *Curr Opin Rheumatol* (2018)

La classificazione di Bohan e Peter presenta diverse limitazioni: i criteri sono ottenuti su dati provenienti da un singolo istituto; non comprendono le miositi a corpi inclusi (IBM); non considerano le interstiziopatie polmonari (ILD: *Interstitial Lung Disease*) tra le manifestazioni polmonari<sup>5</sup>.

Nel 1995, *Tanimoto et al.*<sup>6</sup> ampliano la classificazione di Bohan e Peter introducendo criteri aggiuntivi: mialgia, artrite non erosiva o artralgia, segni infiammatori sistemici (febbre e aumento dei livelli sierici di PCR) e, per la prima volta, positività per gli autoanticorpi anti-Jo1 (istidil-tRNA sintetasi), uno degli autoanticorpi miosite-specifici (MSAs). *Targoff et al.*<sup>7</sup> (1997) modificano i criteri di Bohan e Peter aggiungendo altri MSAs (anticorpi che riconoscono autoantigeni come amminoacil-tRNA trasferasi, signal recognition particle – SRP, Mi-2) e stabiliscono che l'infiammazione muscolare rilevata alla RMN possa sostituire la debolezza muscolare o l'aumento sierico degli indici di miocitolisi<sup>5</sup>.

Dalakas e Hohlfeld (2003) sulla base di criteri clinici, caratteristiche istologiche e immunopatologiche ben definite, distinguono le MII in tre gruppi principali: PM, DM e miosite sporadica a corpi inclusi (sIBM) <sup>8</sup>.

*Troyanov et al.*<sup>9</sup> (2005) propongono una nuova classificazione sulla base delle caratteristiche clinico-sierologiche indicando un nuovo sottotipo di MII definito miosite *overlap* (OM). Essa si caratterizza per la presenza di miosite associata ad almeno una manifestazione clinica *overlap* e/o alla positività per anticorpi *overlap*: anticorpi anti-tRNA sintetasi, anticorpi anti-SRP, anticorpi associati a sclerosi sistemica e anticorpi anti-nucleoporine. Secondo questa nuova classificazione la OM diviene la più frequente tra le MII, diversamente da quanto affermato dalla classificazione di Bohan e Peter secondo cui fosse la PM quella più frequente. Inoltre è stato osservato che la sclerosi sistemica (SSc) è la connettivite che più spesso si associa a OM <sup>5</sup>.

Amato e Hoogendijk (2003) forniscono nuovi criteri classificativi (criteri ENMC) per le MII che si riferiscono a DM, PM, IBM e a due nuove entità, la miosite non specifica (NSM) e la miopatia necrotizzante immuno-mediata (IMNM). La prima corrisponde alla presenza di infiltrati non specifici in sede perivascolare/perimisiale ma senza altre caratteristiche diagnostiche per DM o PM; si associa ad altre connettiviti (CTDs) e rappresenta di fatto un'entità clinica simile alla OM secondo Troyanov. La seconda, conosciuta anche come miopatia necrotizzante autoimmune (NAM) corrisponde ad una condizione di miopatia idiopatica con presenza di fibre muscolari necrotiche ma senza infiltrato infiammatorio; è a sua volta classificabile in IMNM anti-HMGCR positiva (associata o meno all'assunzione di statine), IMNM anti-SRP positiva, INMN sieronegativa. Il titolo autoanticorpale anti-HMGCR si è dimostrato essere correlato ai livelli di creatinfosfochinasi (CPK) e alla forza muscolare, suggerendo il ruolo patogeno degli autoanticorpi anti-idrossimetilglutaril-CoA reductasi <sup>5,10,11</sup>.

La necessità di avere a disposizione criteri armonizzati, validati e quanto più inclusivi dell'eterogeneità clinica delle MII ha portato alla stesura, nel 2017, dei *criteri di classificazione EULAR/ACR per le miopatie infiammatorie idiopatiche adulte e giovanili e i loro principali sottogruppi*, visibili nella *Tabella II*.

Sulla base delle caratteristiche cliniche, laboratoristiche e istopatologiche, si possono individuare i seguenti sottogruppi di MII: polimiosite (PM); miosite a corpi inclusi (IBM); dermatomiosite (DM); dermatomiosite amiotopatica (ADM); dermatomiosite giovanile (JDM); miosite giovanile non JDM. Tre sottogruppi non possono essere classificati come entità a sé stanti a causa dell'insufficiente numerosità dei campioni oggetto di studio: miopatia necrotizzante immuno-mediata (IMNM), che viene inserita nella spettro della PM; dermatomiosite ipomiopatica; polimiosite giovanile (JPM)<sup>12</sup>.

Secondo quanto stabilito dai criteri EULAR/ACR, è possibile classificare un soggetto come affetto da MII definita quando si raggiunge uno score pari o superiore a 7,5 in assenza di biopsia muscolare o di 8,7 in presenza della stessa. Ciò corrisponde ad una probabilità superiore al 90% di avere una miopatia infiammatoria idiopatica.

I criteri EULAR/ACR hanno mostrato una sensibilità (93%) e una specificità (88%) in presenza del dato bioptico, ridotte rispettivamente al 87% e al 82% in sua assenza. Confrontando questi risultati con i criteri più comunemente applicati è emerso che la classificazione secondo Targoff mostra un'elevata sensibilità (93%) e specificità (89%) ma non tiene conto dei diversi sottogruppi di MII, le classificazioni secondo Bohan e Peter e secondo Tanimoto hanno un'elevata sensibilità (98% e 96% rispettivamente) ma una bassa specificità (55% e 31% rispettivamente) mentre le classificazioni secondo Dalakas e Hohlfeld e secondo l'ENMC hanno un'elevata specificità (98% e 97% rispettivamente) ma una bassa sensibilità (6% e 52% rispettivamente)<sup>12</sup>.

I criteri EULAR/ACR costituiscono dunque l'attuale caposaldo nella classificazione delle MII. Tuttavia, l'uso di questi criteri è comunque limitato a scopi di ricerca con l'intento di dare uniformità negli studi clinici.

**Table 2** The European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology (EULAR/ACR) classification criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies (IIMs)

When no better explanation for the symptoms and signs exists, these classification criteria can be used			
Variable	Score points		Definition
	Without muscle biopsy	With muscle biopsy	
<b>Age of onset</b>			
Age of onset of first symptom assumed to be related to the disease $\geq 18$ years and $< 40$ years	1.3	1.5	18 $\leq$ Age (years) at onset of first symptom assumed to be related to the disease $< 40$
Age of onset of first symptom assumed to be related to the disease $\geq 40$ years	2.1	2.2	Age (years) at onset of first symptom assumed to be related to the disease $\geq 40$
<b>Muscle weakness</b>			
Objective symmetric weakness, usually progressive, of the proximal upper extremities	0.7	0.7	Weakness of proximal upper extremities as defined by manual muscle testing or other objective strength testing, which is present on both sides and is usually progressive over time
Objective symmetric weakness, usually progressive, of the proximal lower extremities	0.8	0.5	Weakness of proximal lower extremities as defined by manual muscle testing or other objective strength testing, which is present on both sides and is usually progressive over time
Neck flexors are relatively weaker than neck extensors	1.9	1.6	Muscle grades for neck flexors are relatively lower than neck extensors as defined by manual muscle testing or other objective strength testing
In the legs, proximal muscles are relatively weaker than distal muscles	0.9	1.2	Muscle grades for proximal muscles in the legs are relatively lower than distal muscles in the legs as defined by manual muscle testing or other objective strength testing
<b>Skin manifestations</b>			
Heliotrope rash	3.1	3.2	Purple, lilac-coloured or erythematous patches over the eyelids or in a periorbital distribution, often associated with periorbital oedema
Gottron's papules	2.1	2.7	Erythematous to violaceous papules over the extensor surfaces of joints, which are sometimes scaly. May occur over the finger joints, elbows, knees, malleoli and toes
Gottron's sign	3.3	3.7	Erythematous to violaceous macules over the extensor surfaces of joints, which are not palpable
<b>Other clinical manifestations</b>			
Dysphagia or oesophageal dysmotility	0.7	0.6	Difficulty in swallowing or objective evidence of abnormal motility of the oesophagus
<b>Laboratory measurements</b>			
Anti-Jo-1 (anti-histidyl-tRNA synthetase) autoantibody present	3.9	3.8	Autoantibody testing in serum performed with standardised and validated test, showing positive result
Elevated serum levels of creatine kinase (CK)* or lactate dehydrogenase (LD)* or aspartate aminotransferase (ASAT/AST/SGOT)* or alanine aminotransferase (ALAT/ALT/SGPT)*	1.3	1.4	The most abnormal test values during the disease course (highest absolute level of enzyme) above the relevant upper limit of normal
<b>Muscle biopsy features—presence of:</b>			
Endomysial infiltration of mononuclear cells surrounding, but not invading, myofibres		1.7	Muscle biopsy reveals endomysial mononuclear cells abutting the sarcolemma of otherwise healthy, non-necrotic muscle fibres, but there is no clear invasion of the muscle fibres
Perimysial and/or perivascular infiltration of mononuclear cells		1.2	Mononuclear cells are located in the perimysium and/or located around blood vessels (in either perimysial or endomysial vessels)
Perifascicular atrophy		1.9	Muscle biopsy reveals several rows of muscle fibres, which are smaller in the perifascicular region than fibres more centrally located
Rimmed vacuoles		3.1	Rimmed vacuoles are bluish by H&E staining and reddish by modified Gomori trichrome stains

\*Serum levels above the upper limit of normal.

Tabella II. Criteri di classificazione EULAR/ACR per le miopatie infiammatorie idiopatiche adulte e giovanili e i loro principali sottogruppi. Lundberg I et al., *Arthritis & Rheumatology* (2017)

La *Figura 1* mostra l'algoritmo diagnostico suggerito dai criteri EULAR/ACR per i identificare i principali fenotipi di malattia.

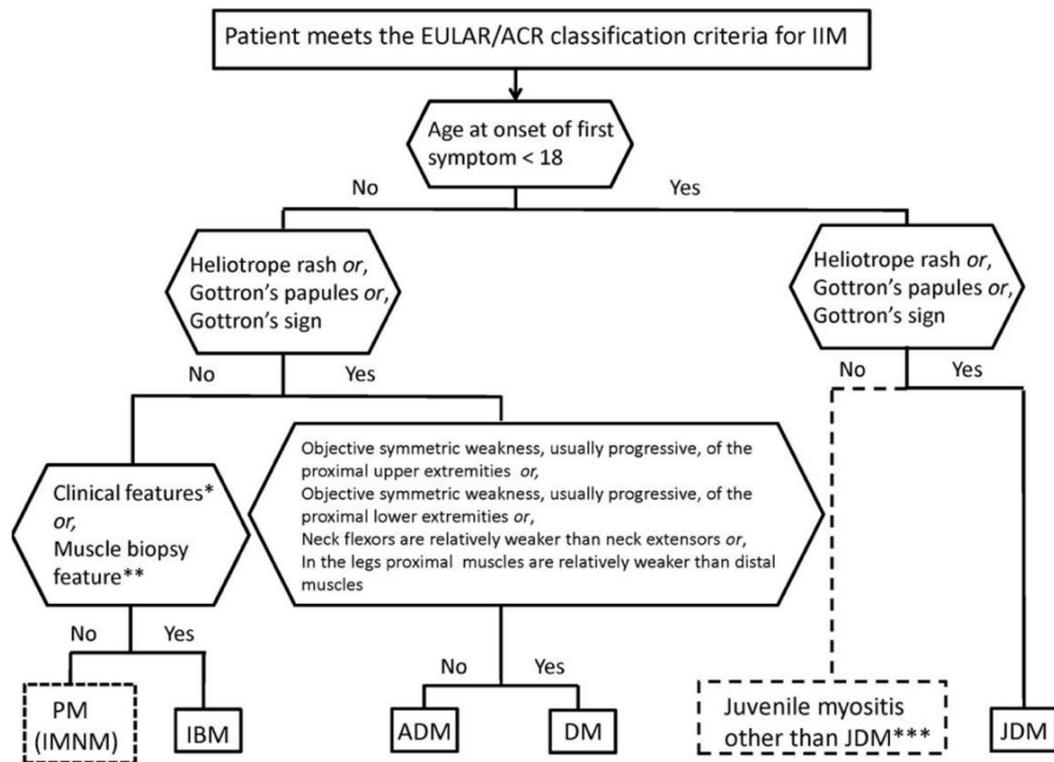


Figura 1. Criteri di classificazione EULAR/ACR per le miopatie infiammatorie idiopatiche adulte e giovanili e i loro principali sottogruppi. Lundberg I et al., *Arthritis & Rheumatology* (2017)

Tali criteri presentano dei limiti, il più rilevante dei quali è la mancata comprensione nella classificazione di alcuni sottotipi di MII abbastanza frequenti: la miosite associata a cancro (CAM) e la sindrome antisintetasi (ASyS).

L'ASyS, peculiare forma di MII recentemente riconosciuta, è caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi diretti contro le amminoacil transfer RNA sintetasi (ARS), enzimi citoplasmatici che catalizzano in modo ATP-dipendente il legame di un amminoacido al corrispondente tRNA. Sono stati riconosciuti 8 autoanticorpi reagenti contro differenti ARSs: anti-Jo-1, anti-PL-7, anti-PL-12, anti-EJ, anti-OJ, anti-KS, anti-Zo. Questi anticorpi, presenti in maniera mutualmente esclusiva nel siero dei pazienti, definiscono l'entità clinica della ASyS che possiede poi sfumature diverse in relazione al tipo di anti-ARS che la contraddistingue.

La sindrome antisintetasi è caratterizzata dalla presenza di miosite, interstiziopatia polmonare (ILD), artriti non erosive, rash cutaneo, mani da meccanico, fenomeno di Raynaud e sintomi costituzionali<sup>13</sup>.

Tra gli MSAs, gli anticorpi anti-ARS sono rilevati nel 25-35% dei pazienti affetti da MII. Tra gli anti-ARS, gli anticorpi anti-Jo-1 sono di più frequente riscontro, identificati precisamente nel 15-30% delle PM e nel 60-70% delle ILD.

La diagnosi e la gestione della ASyS sono ancora difficili a causa di sintomi spesso mascherati e/o aspecifici all'esordio della malattia. Infatti solo il 19% dei casi presenta la triade clinica completa (ILD, miosite e artrite non erosiva) all'esordio della malattia, mentre la presentazione più comune è una manifestazione isolata seguita da una seconda o terza componente della triade entro un anno<sup>14</sup>.

Alla luce di ciò, sono stati proposti due criteri classificativi specifici per la ASS, i criteri di Connors (2010)<sup>15</sup> e i criteri di Solomon (2011)<sup>16</sup>. Entrambi i criteri richiedono una sierologia positiva per autoanticorpi anti-ARS a cui si affiancano caratteristiche cliniche, come riportato nella *Tabella III* sottostante che li pone a confronto.

<b>Connors et al.</b>	<b>Solomon et al.</b>
<b>Serum positivity for an anti-aminoacyl tRNA synthetase antibody</b>	
<b>Plus</b>	<b>Plus</b>
1 or more of the following	2 major criteria or 1 major and 2 minor criteria
Raynaud's phenomenon	Major
Arthritis	Interstitial lung disease
Interstitial lung disease	Polymyositis or dermatomyositis (Bohan and Peter's criteria)
Fever not attributable to other causes	Minor
Mechanic's hands	Arthritis
	Raynaud's phenomenon
	Mechanic's hands

*Tabella III. Criteri diagnostici proposti per la sindrome anti-sintetasi (ASyS). Gasparotto et al. Curr Opin Rheumatol (2019)*

Considerazioni analoghe possono essere fatte per la dermatomiosite clinicamente amiotopatica (*Clinically Amyopathic Dermatomyositis, CADM*) che comprende la DM amiotopatica, definita dalla presenza per 6 mesi o più di manifestazioni cutanee tipiche, confermate dalla biopsia, senza evidenza clinica di debolezza muscolare prossimale e senza anomalie nei livelli sierici degli enzimi muscolari, e la DM ipomiopatica, nella quale si riscontrano invece lievi alterazioni degli indici di miocitolisi ma un quadro clinico muscolare silente<sup>5</sup>.

Una parte dei pazienti affetti da CADM presenta una positività per l'anticorpo anti-proteina 5 associata alla differenziazione del melanoma, MDA-5 (*anti-melanoma differentiation associated protein 5*), identificando un quadro clinico preciso,

inizialmente riscontrato nella popolazione dell'Asia Orientale, caratterizzato da una interstiziopatia polmonare rapidamente progressiva (RP-ILD) ed un alto tasso di mortalità. Connotati cutanei della "sindrome anti-MDA-5" sono l'ulcerazione delle papule di Gottron, papule palmari ed eritema periungueale. Questi pazienti non sono efficacemente rilevati dai criteri EULAR/ACR, come dimostrato in un recente studio<sup>17</sup> svolto dall'università di Hong Kong. Gli autori suggeriscono che la sensibilità dei criteri EULAR/ACR potrebbe essere migliorata al 98,3% se l'anticorpo anti-MDA-5 fosse considerato uno dei criteri.

### **1.1.3 EPIDEMIOLOGIA**

Le MII sono patologie rare con una prevalenza compresa tra 3 e 34 casi su 100.000 abitanti e un'incidenza che varia da 11 a 660 nuovi casi per milione di abitanti l'anno. Una revisione sistematica dei dati presenti in letteratura<sup>2</sup> ha evidenziato un aumento di incidenza e prevalenza delle MII nel tempo, che potrebbe tuttavia dipendere da un miglioramento della capacità diagnostica nonché da una maggiore chiarezza dei sistemi classificativi impiegati negli studi.

Similmente alle altre malattie autoimmunitarie, le MII sono più frequenti nelle femmine con un rapporto complessivo F:M di 2:1; al contrario la miosite a corpi inclusi (IBM) e la miosite associata a cancro (CAM) sono più frequenti nel sesso maschile con un rapporto M:F, rispettivamente, di 3:1 e 2:1<sup>1</sup>.

L'età d'insorgenza media di DM e PM nell'adulto è compresa tra 52 e 56 anni; quella della IBM, patologia legata all'invecchiamento che raramente esordisce prima della quinta decade, è di 67 anni<sup>18</sup>.

In linea generale, escludendo le IBM, tutte le MII possono manifestarsi in tutte le fasce d'età; in modo particolare la DM presenta un picco d'incidenza negli adolescenti (5 – 15 anni), oltre quello dell'età adulta.

È stato inoltre osservato un aumento della frequenza della DM in funzione della latitudine geografica<sup>19</sup>, seguendo un gradiente da Nord a Sud, verosimilmente in relazione alla maggiore esposizione ai raggi UV<sup>20</sup>, coinvolti nella patogenesi della DM associata alla presenza di anticorpi anti-Mi-2.

#### 1.1.4 EZIOLOGIA

I fattori eziologici alla base delle MII sono numerosi e variano tra i diversi sottotipi; tuttavia non sono ancora stati caratterizzati completamente. È verosimile che l'eziologia delle MII, similmente alle altre patologie autoimmuni, sia il prodotto dell'interazione tra fattori genetici e ambientali, come infezioni, esposizione a raggi UV e farmaci (per esempio statine, D-penicillamina, cloroquina).

#### FATTORI GENETICI

Il *Myositis Genetics Consortium* (MYOGEN), comprendendo 2.566 pazienti provenienti da 14 Paesi, è stato il più importante studio genetico in ambito di MII ed ha evidenziato che l'associazione più robusta riguarda i geni dell'*Human Leucocyte Antigen* (HLA), siti sul cromosoma 6.

Specifici alleli dell'aplotipo ancestrale 8.1 (8.1AH) sono stati correlati a sottotipi differenti di miosite, in particolare gli alleli HLA-DB1\*03:01 nella PM e HLA-B\*08:01 per la DM. Sono stati associati alla IBM gli alleli HLA-DRB1\*03:01, HLA-DRB1\*01:01 e HLA-DRB1\*13:01, questi ultimi due specifici per la malattia<sup>21</sup>.

A rendere il quadro ancora più complesso, differenti HLA sono stati associati a sottogruppi di MII definiti dagli MSA. A titolo d'esempio, la presenza degli anticorpi anti-Jo-1 è stata fortemente associata a diversi alleli dell'8.1 AH come HLA-B\*08:01, HLA-DQB1\*02:01 e HLA-DRB1\*03:01<sup>22</sup>. Recentemente si è osservato che è una arginina in posizione 74 dell'aplotipo HLA-DRB1 a conferire il rischio più alto per il riscontro degli anti-Jo-1<sup>23</sup>. Considerazioni analoghe possono essere fatte per altri autoanticorpi (anti-Mi-2, anti-MDA-5, anti-TIF1-γ).

Anche alcuni geni non-HLA conferiscono un aumentato rischio di malattia.

La PM è stata associata in maniera specifica a PTPN22 (tirosin fosfatasi coinvolta nella trasduzione del segnale del TCR), ma anche a IL-18R1 (appartenente alla famiglia IL-1R) e RGS1 (un regolatore del signaling delle proteine G); la DM è associata a GSDMB (Gasdermin-B, la cui famiglia di geni è implicata nel cancro e nella regolazione dell'apoptosi nelle cellule epiteliali), mentre altri studi la correlano a PLCL1 (fosfolipasi C-like 1) e BLK (tirosin-chinasi non recettoriale della famiglia *src* coinvolta nel signaling del BCR e nello sviluppo delle cellule B). La IBM è associata a CCR5 (recettore tipo 5 per la chemochine C-C); inoltre la presenza di

rare varianti dei geni VCP, SQSTM1 e FYCO1 supporta l'ipotesi che una disregolazione dell'autofagia sia coinvolta nella patogenesi della malattia. Altri geni significativamente mutati da menzionare sono STAT4 (per la trasduzione del segnale del TCR), TRAF6 e UBE2L3 (entrambi coinvolti nella via NF- $\kappa$ B nelle cellule B)<sup>21,22</sup>.

### **FATTORI AMBIENTALI**

Attualmente si ritiene che i fattori ambientali per lo sviluppo di MII agiscano come fattori scatenanti alla base di una predisposizione genetica. Diversi studi hanno indagato come possibili fattori ambientali alla base dei fenotipi di MII: infezioni (virali, batteriche, parassitarie), farmaci, esposizione ai raggi ultravioletti, impianti in silicone e in collagene, esposizione lavorativa a polveri<sup>22</sup>.

Nel tessuto muscolare dei pazienti affetti da MII non è mai stata dimostrata la presenza di sequenze virali, come Coxsackie, virus influenzali, Paramyxovirus, CMV e EBV; tuttavia è verosimile che tali agenti virali, pur non infettando direttamente il muscolo, agiscano da *trigger* di un processo auto-immune a carico dello stesso<sup>24</sup>. È peculiare, seppur sporadica, la relazione tra IBM e infezioni retrovirali: soggetti infettati da HIV o HTLV-1 hanno sviluppato un quadro clinico e istopatologico compatibile con IBM sporadica. Si è osservata la presenza di un clone virus specifico di linfociti T CD8<sup>+</sup> invadenti le fibrocellule; tale clone può contribuire alla patogenesi della IBM attraverso una cross-reazione con gli antigeni espressi dai miociti<sup>25</sup>.

L'esposizione alle radiazioni ultraviolette è implicata nella patogenesi della DM, in modo particolare nelle forme con positività anticorpale anti-Mi-2, dimostrata dalla capacità delle radiazioni UV di aumentare l'espressione di Mi-2 (componente del complesso *Nucleosome Remodeling Deacetylase* – NuRD) nei cheratinociti<sup>26</sup>.

Diversi farmaci possono agire come fattori di rischio per l'insorgenza di MII. Le statine, potenti agenti ipocolesterolemizzanti, si possono associare a mialgie e innalzamento degli enzimi muscolari, ma non a debolezza muscolare. Questi effetti indesiderati sono molto spesso transitori e reversibili alla sospensione del farmaco. Questi vanno distinti dal quadro di miopatia necrotizzante autoimmune (NAM/IMNM) che persiste anche dopo la sospensione della statina e richiede

terapia immunosoppressiva. Si è dimostrato che gli anticorpi anti-HMGCR, caratteristici della IMNM, hanno lo stesso bersaglio delle statine; da qui è emersa l'ipotesi che le statine potessero agire da trigger. Le statine sono capaci di aumentare l'espressione ectopica di HMGCR sulle membrane delle fibrocellule, diventando così possibile bersaglio di un processo autoimmune. Inoltre l'espressione aumentata di HMGCR è stata evidenziata anche nelle cellule muscolari in rigenerazione. È stato suggerito quindi che il danno muscolare immuno-mediato iniziato in presenza di statine può essere sostenuto anche dopo la sospensione della statina, attraverso un aumento persistente dell'espressione di HMGCR associato alla riparazione muscolare. Fino al 65% dei pazienti IMNM HMGCR-positivi ha una storia di esposizione alle statine<sup>24,27,28</sup>.

Gli inibitori del check-point immunitario (ICPIs), utilizzati nel trattamento di alcune neoplasie, possono agire da trigger per l'insorgenza di MII: sono stati riportati casi in cui pembrolizumab, ipilimumab e nivolumab sono stati associati allo sviluppo di DM e IMNM, quest'ultima talvolta assieme alla miastenia gravis<sup>24</sup>.

Si ipotizza che altri farmaci, come interferoni e inibitori del TNF- $\alpha$ <sup>29</sup> e la D-penicillamina<sup>30</sup>, utilizzata nel trattamento del morbo di Wilson, possano contribuire allo sviluppo delle MII. Nella maggior parte dei casi, la sospensione dei farmaci ha determinato un miglioramento della miosite.

Un altro fattore di rischio ambientale per lo sviluppo di MII è il fumo di sigaretta, che è stato associato nello specifico alla comparsa di ASS con anticorpi anti-Jo-1. In particolare si è visto che l'associazione tra fumo e anticorpi anti-Jo-1 è ancora più forte nei pazienti portatori dell'allele HLA-DRB1\*03:01<sup>31</sup>. Ciò potrebbe spiegare la bassa incidenza di ASS nei bambini rispetto alle forme di JDM.

È stata riportata un' aumentata incidenza di MII (e di altre patologie autoimmuni) tra i soccorritori e i sopravvissuti del World Trade Center, verosimilmente per l'aumentata esposizione ambientali a polveri.

Infine, una percentuale di MII (25%), soprattutto DM, è strettamente preceduta o seguita dalla diagnosi di una neoplasia (solitamente entro due anni).

### **1.1.5 MECCANISMI PATOGENETICI**

Le MII condividono la presenza di lesioni muscolari immuno-mediate anche se i meccanismi precisi alla base del danno rimangono ancora non chiarificati e, in aggiunta, sono notevolmente variabili tra i diversi sottotipi di malattia.

#### **PATOGENESI DELLA DERMATOMIOSITE**

Nella DM, gli elementi patogenetici cruciali sono l'atrofia delle fibrocellule perifascicolari e le alterazioni capillari e perimisiali<sup>32</sup>. L'evento patogenetico iniziale è la microangiopatia mediata dal complemento, indotta probabilmente da anticorpi, con deposizione precoce di complessi di attacco alla membrana (MAC) C5b-C9 sulle cellule endoteliali che determina necrosi capillare, ischemia e distruzione delle fibre muscolari più importante alla periferia dei fascicoli. L'attivazione del MAC promuove il rilascio di citochine pro-infiammatorie, l'aumento dell'espressione di molecole di adesione sulle cellule endoteliali (VCAM e ICAM-1) e la conseguente migrazione di cellule immunitarie attivate, come linfociti B, linfociti T CD4<sup>+</sup> e cellule dendritiche plasmacitoidi, nell'endomysio e nel perimisio. Le aree perifascicolari contengono fibre che sono in uno stato di rimodellamento e rigenerazione (esprimono TGF- $\beta$ , NCAM e Mi-2), di stress cellulare (esprimono le proteine dello shock termico 70 [HSP70] e HSP90) e di attivazione immunitaria (esprimono MHC-I, chemochine e STAT1), oltre a molecole associate all'immunità innata (come MxA, ISG15 e il gene 1 [RIG-1] induttore dell'acido retinoico)<sup>33</sup>.

Anche l'immunità innata gioca un ruolo cruciale: è stato dimostrato che l'interferone di tipo 1 (IFN-I), in particolare IFN- $\beta$ , è fondamentale nella patogenesi della DM. Infatti l'abbondante produzione di IFN-I amplifica la risposta infiammatoria e immunitaria dando origine alla lesione dell'endotelio, della fibrocellula perimisiale e alle alterazioni vacuolari dei cheratinociti basali, elementi tipici della DM<sup>34</sup>.

Oltre ai suddetti effetti dell'IFN-I, vi sono altri meccanismi non immuno-mediati come la risposta da sovraccarico del reticolo endoplasmatico (EOR) e la risposta da stress delle proteine mal-ripiegate (UPR). Lo stress del RE può portare al danno ossidativo attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) a seguito

della disfunzione mitocondriale conseguente ad un aumento della concentrazione citoplasmatica di  $\text{Ca}^{++}$ .

Il danno cellulare basato su meccanismi diversi amplifica la risposta immunitaria mediante il rilascio di citochine pro-infiammatorie creando un circolo vizioso<sup>35</sup>.

### **PATOGENESI DELLA POLIMIOSITE**

Nella PM, l'infiammazione, che si sviluppa in multipli focolai all'interno dell'endomysio, è caratterizzata prevalentemente da cellule T  $\text{CD8}^+$  che invadono fibre muscolari sane e non necrotiche che esprimono l'antigene del MHC di classe I (le fibre muscolari normali non esprimono questo antigene). I linfociti T citotossici danneggiano la fibra muscolare mediante il rilascio di granuli di perforine che conduce alla necrosi<sup>2</sup>.

### **PATOGENESI DELLA MIOSITE A CORPI INCLUSI**

Attualmente la IBM viene considerata come una patologia con connotati sia autoimmunitari che degenerativi.

Alcuni aspetti degenerativi includono vacuoli ben delimitati (*rimmed vacuoles*), alterazioni mitocondriali e aggregati proteici sarcoplasmatici. Tra i marker degenerativi, gli aggregati proteici di p62 e TDP43 sono abbastanza caratteristici di questo sottotipo di miosite<sup>36</sup>.

Il ruolo dell'autoimmunità nella IBM è ormai appurato grazie a diversi elementi: 1) alcuni aplotipi (HLA DRB1\*03:01 e HLA-B\*08:01) conferiscono un aumentato rischio di malattia; 2) riscontro di specifici anticorpi circolanti come quelli anti-cN1A (diretti contro la 5' nucleotidasi citosolica IA), presenti nel 90-95% dei pazienti con IBM; 3) presenza, all'istopatologia, di cellule T citotossiche altamente differenziate, cellule dendritiche mieloidi e macrofagi che circondano e invadono le miofibrille<sup>36</sup>.

Questi linfociti T  $\text{CD8}^+$  presentano un peculiare fenotipo ( $\text{CD28}^-$  e  $\text{CD5}^-$ ;  $\text{CD16}^+$ ,  $\text{CD94}^+$  e  $\text{CD57}^+$ ) coerente con una differenziazione terminale in reazione ad antigeni specifici non identificati<sup>37</sup>. Sono cellule dotate di spiccata citotossicità mediata dal rilascio di granzimi e perforine, responsabili del danno cellulare; secernono livelli elevati di  $\text{IFN-}\gamma$  che determina la over-espressione di MHC-I nei miociti, risposta da stress del reticolo endoplasmatico e aggregazione proteica.

È curioso osservare che alterazioni fenotipiche analoghe sono presenti anche nella leucemia a grandi linfociti granulari T (T-LGLL), neoplasia che non risponde alla terapia corticosteroidica, suggerendo che anche la refrattarietà della IBM agli steroidi sia legata ad aspetti della sua genesi immuno-mediata piuttosto che alla componente degenerativa<sup>36</sup>.

### **PATOGENESI DELLA MIOPATIA NECROTIZZANTE IMMUNO-MEDIATA**

Esistono tre sottotipi di miopatia necrotizzante immuno-mediata: IMNM sieronegativa, i cui aspetti patogenetici sono meno noti; IMNM anti-HMGCR (3-idrossi-3-metil-glutaril-coenzima A reduttasi) e anti-SRP (signal recognition particle), forme sieropositive, in cui le specificità anticorpali sono verosimilmente patogenetiche.

Nelle forme sieropositive, gli anticorpi anti-SRP o anti-HMGCR si legano agli autoantigeni target espressi ectopicamente sulla superficie cellulare dei miociti. Il legame innesca la via classica del complemento, con conseguente formazione del complesso di attacco (MAC) al sarcolemma che conduce alla necrosi. Il reclutamento dei macrofagi porta alla miofagocitosi e al rilascio di citochine proinfiammatorie come IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$ . In aggiunta, la rigenerazione muscolare è compromessa da un'alterazione della differenziazione dei mioblasti anticorpo-mediata e da bassi livelli di IL-4 e IL-13<sup>28</sup>.

A riprova di ciò, i titoli di autoanticorpi anti-SRP e anti-HMGCR sono in stretta correlazione con la debolezza muscolare e l'aumento della CPK. Inoltre, il loro trasferimento passivo in topi è una condizione sufficiente per indurre una miopatia complemento-mediata<sup>38</sup>.

L'IMNM anti-HMGCR si verifica potenzialmente quando un individuo geneticamente suscettibile (in associazione ad HLA DRB1\*11:01) up-regola l'HMGCR, soprattutto dopo essere stato esposto alle statine<sup>39</sup>.

### **PATOGENESI DELLA SINDROME ANTISINTETASICA**

I meccanismi alla base della ASyS devono ancora essere del tutto chiariti.

Tuttavia, la presenza di anticorpi diretti contro le amminoacil-tRNA sintetasi (ARS) è una caratteristica distintiva di questa sindrome e della stessa patogenesi. Infatti, tali autoanticorpi, di cui l'anti-Jo-1 è il principale, hanno come bersaglio epitopi *self* i cui titoli appaiono concordi con l'attività della malattia e possono precedere

di mesi la diagnosi. È stato dimostrato che nei pazienti affetti da ASyS con ILD, la proteina Jo-1 espressa a livello polmonare assume una conformazione atipica<sup>40</sup>.

L'innescò della ASyS sembra avvenire a livello polmonare a seguito dell'esposizione a fattori trigger come fumo o infezioni virali. Ciò può portare, in soggetti con background genetico favorevole, all'esposizione aberrante dell'antigene *self* e alla perdita della tolleranza. Di conseguenza, si attiva in maniera incontrollata l'immunità sia innata che adattativa<sup>41</sup>.

Le ARS svolgono altre peculiari funzioni nel processo immunitario. L'istidil-t-RNA sintetasi sembra agire da chemochina regolando la migrazione linfocitaria e l'attivazione monocitaria. Oltre che nel siero, livelli di anticorpi anti-Jo-1 sono stati evidenziati nel lavaggio bronco-alveolare a testimoniare l'importante ruolo svolto dal polmone nella patogenesi<sup>42</sup>.

Un ruolo chiave è stato attribuito alle cellule NK (Natural Killer) che nelle forme attive di ASyS assumono un fenotipo caratterizzato dall'aumento di CD57 e Ig-like transcript 2 e dalla diminuzione di NKp30. Ne consegue una ridotta capacità di rilasciare IFN- $\gamma$ , mentre la capacità di rilasciare enzimi proteolitici e degranulare è implementata. Questo fenotipo di cellule NK infiltra il perimio e circonda le miofibrille. Anche nel tessuto polmonare si è riscontrato un numero elevato di cellule NK rispetto ai controlli sani<sup>42</sup>.

### **PATOGENESI DELLA MIOSITE ASSOCIATA A CANCRO**

L'associazione tra cancro e MII è complessa da studiare dal punto di vista patogenetico; sono state formulate almeno due ipotesi principali non mutuamente esclusive.

Da un lato, l'esposizione sulla membrana cellulare di neo-antigeni da parte delle cellule neoplastiche o delle miofibrille in rigenerazione può avviare la risposta immunitaria per mimetismo molecolare. Inoltre, la perdita di tolleranza verso il *self* può essere indotta dalla prolungata presentazione antigenica o dalla modificazione post-traduzionale di proteine *self* nel contesto di un alterato microambiente tumorale<sup>43</sup>. In questo senso, va considerato che mutazioni di antigeni ubiquitari e coinvolti nella carcinogenesi come, ad esempio TIF1- $\gamma$ , possono causare l'espressione o lo smascheramento di onco-antigeni in grado di

stimolare la produzione di autoanticorpi, i quali potrebbero cross-reagire con antigeni muscolari e cutanei<sup>44,45</sup>.

La CAM potrebbe quindi essere considerata alla stregua di una manifestazione paraneoplastica, come confermato dalla almeno parziale regressione della miopatia dopo la remissione del tumore<sup>46</sup>.

#### **1.1.6 MANIFESTAZIONI CLINICHE**

Le MII presentano un quadro assai eterogeneo di presentazione clinica. Ogni paziente presenta un grado variabile di coinvolgimento a livello muscolare ed extra-muscolare, delineando così tre profili clinici: esclusivamente muscolare, esclusivamente extra-muscolare e coinvolgimento misto.

#### **MANIFESTAZIONI MUSCOLARI**

Un segno distintivo della maggior parte delle MII è la debolezza muscolare, raramente associata a mialgie, che riguarda i cingoli scapolare e pelvico e i muscoli prossimali degli arti a distribuzione simmetrica ed esordio acuto (entro pochi giorni) oppure, più frequentemente, sub-acuto o insidioso (nell'arco di diversi mesi)<sup>2</sup>.

I pazienti affetti da MII presentano progressiva difficoltà a svolgere azioni della vita quotidiana come salire le scale, alzarsi dalle sedie, successivamente diviene faticoso anche alzare le braccia per prendere oggetti posti in alto fino a sollevare il capo dal cuscino<sup>1</sup>.

I deltoidi, i flessori dell'anca, gli adduttori e gli estensori sono maggiormente interessati insieme ai flessori del collo; al contrario gli estensori del collo tendono ad essere relativamente risparmiati. Il coinvolgimento della muscolatura distale può essere precoce nella IBM<sup>36</sup> mentre si riscontra tipicamente solo nei casi più avanzati di PM, IMNM e DM. L'asimmetria del coinvolgimento muscolare è insolita e non caratterizza le MII<sup>1,2</sup>.

L'interessamento della muscolatura estrinseca oculare non è comunemente presente la muscolatura facciale non è compromessa, ad eccezione che per la IBM<sup>47</sup>.

L'atrofia muscolare e le contratture sono rare e limitate ad una malattia grave e di lunga durata, per lo più dovute a impotenza funzionale. Invece, nella IBM, l'atrofia muscolare può comparire precocemente e interessa in modo selettivo i quadricipiti e i muscoli dell'avambraccio<sup>33</sup>.

Fino a un terzo dei pazienti (soprattutto nella IBM) può soffrire di disfagia prossimale dovuta alla debolezza dello sfintere esofageo superiore che espone il paziente al rischio di polmoniti ab ingestis, ad elevato tasso di mortalità, e di malnutrizione severa<sup>48</sup>. Pertanto una disfagia grave o refrattaria richiede sempre indagini appropriate e una gestione tempestiva. La sovrapposizione con la sindrome di Sjögren può aggravare ulteriormente la disfagia.

Anche il diaframma e i muscoli toracici possono essere colpiti nella MII determinando una patologia polmonare restrittiva. L'entità della debolezza muscolare nei test di funzionalità polmonare può essere misurata attraverso gli indicatori: MIF (flusso inspiratorio medio) e MEF (flusso espiratorio medio). Nei casi severi, può essere necessaria la ventilazione meccanica<sup>1,2</sup>.

Il coinvolgimento muscolare può anche essere subclinico e mostrarsi solo come un rialzo degli enzimi muscolari<sup>4</sup>.

### **MANIFESTAZIONI EXTRAMUSCOLARI**

Dal punto di vista clinico, la dermatomiosite amiotopica (CADM), la DM post-miosite, la DM ipomiopatica e, occasionalmente, la ASyS possono presentare un fenotipo clinico esclusivamente extramuscolare.

Le manifestazioni extramuscolari comprendono un'ampia gamma di manifestazioni che vanno dall'artrite infiammatoria, all'interstiziopatia polmonare (ILD) e ai segni vasculitici fino a caratteristiche cutanee distintive.

Inoltre possono essere presenti anche segni sistemici aspecifici, come febbre, artralgia e perdita di peso.

## MANIFESTAZIONI CUTANEE

Le lesioni cutanee sono il segno cardine della DM ma possono anche caratterizzare al ASyS. Le manifestazioni cutanee possono essere concomitanti ma più spesso precedere l'impegno muscolare anche di mesi o anni. Possono talvolta causare prurito<sup>32</sup>.

Le manifestazioni cutanee della DM sono di diverso tipo e sono classificabili secondo la classificazione di Euwer e Sontheimer in: patognomoniche, caratteristiche o compatibili.

### LESIONI CUTANEE PATOGNOMONICHE DI DM

**Papule di Gottron:** visibili fino al 30% dei pazienti con DM; sono papule eritematose o violacee, spesse circa 1 mm, localizzate simmetricamente sulla superficie estensoria delle articolazioni, più frequentemente metacarpofalangee (MCP), interfalangee prossimali (IP) e distali (IF).

**Segno di Gottron:** macule eritematose piane, simmetriche, di colore violaceo che ricoprono le superfici estensorie di MCP, IP, gomiti, ginocchia o caviglie. Possono essere presenti sia edema che ulcerazione. Quando queste lesioni desquamano possono mimare la psoriasi o il lichen planus.

### LESIONI CUTANEE CARATTERISTICHE DI DM

**Rash eliotropo:** presente in circa il 25% dei pazienti con DM; è un eritema violaceo localizzato simmetricamente nell'area periorbitale, che può essere accompagnato da edema. La palpebra superiore tende a essere più coinvolta di quella inferiore. Può presentarsi, seppur più raramente, in altre condizioni come sindromi allergiche, sarcoidosi e infezioni da *Trichinella canis*.

**Eritema maculare fotosensibile e simmetrico:** è di colorito violaceo o rosso e si estende al viso (eritema medio-facciale senza risparmio delle pieghe nasolabiali), al tronco (segno del collo a V sulla parte superiore del torace) e alle superfici estensorie degli arti (segno dello scialle sulla parte posteriore del collo e sulle spalle). Quando si verifica desquamazione, può somigliare al lupus eritematoso cutaneo o alla dermatite seborroica, con le quali va in diagnosi differenziale.

**Teleangectasie periungueali con o senza distrofia delle cuticole:** è interessante notare che il coinvolgimento delle cuticole correla con l'attività di malattia a livello cutaneo, come se fosse una rappresentazione diretta di attiva vasculopatia. La videocapillaroscopia mostra anse anomale a livello del letto capillare, con zone alternate di dilatazione e di restringimenti. Inoltre, le cuticole ipertrofiche possono dare origine a infarti emorragici.

#### LESIONI CUTANEE COMPATIBILI CON DM

**Poichilodermatomiosite:** è una manifestazione cutanea che consiste nell'alternanza di aree di ipopigmentazione e iperpigmentazione con teleangectasie associate. Questa condizione è per lo più rilevata a livello dell'area a V della parte anteriore del collo e del torace, delle spalle posteriormente e della parte bassa della schiena. Il poichiloderma nelle regioni laterali delle cosce è noto come segno della fondina.

**Calcinosi cutanee:** è un segno a cavallo tra segni cutanei e vasculitici, più frequenti nei gruppi giovanili (ad esempio, calcinosi sottocutanea, infarti periungueali e ulcerazioni digitali). Il deposito di sali di calcio insolubili si verifica a livello delle fasce muscolari, dando origine a noduli sottocutanei palpabili che occasionalmente erompono in ulcere per rilasciare il loro contenuto calcareo. La miosite overlap, insieme ai pazienti positivi agli autoanticorpi anti-PM-Scl, anti MJ e anti-NXP2, sono più inclini a sviluppare questa grave e impegnativa manifestazione cutanea. A questo scopo vengono impiegati colchicina, diltiazem e bisfosfonati con risultati variabili.

#### ALTRE MANIFESTAZIONI CUTANEE

**Mani da meccanico:** non sono considerate manifestazioni cutanee in senso stretto tuttavia sono un segno abbastanza caratteristico della ASyS. Il termine fa riferimento alla presenza di ipercheratosi, desquamazione e fissurazione distribuite in modo caratteristico sulla superficie laterale delle dita e sui polpastrelli.

**Fenomeno di Raynaud:** segno vasculitico aspecifico presente in circa il 35% dei casi, quasi esclusivamente nelle DM idiopatica e nelle forme overlap.



Figura 2. Manifestazioni cutanee della DM. A. Papule di Gottron; B. Teleangectasie periungueali con distrofia ed emorragia delle cuticole; C. Mechanic's hand; D. Segno di Gottron; E. Rash eliotropo; F. Poichilodermatomiosite. Iaccarino et al. *Journal of Autoimmunity* (2014)

#### MANIFESTAZIONI ARTICOLARI

Complessivamente un coinvolgimento articolare di intensità variabile è documentato fino al 20% dei pazienti. L'artrite è relativamente poco frequente, ma può accompagnare riacutizzazioni della malattia o condizioni *overlap*. In modo particolare, l'ASyS, specialmente i soggetti anti-Jo-1-positivi, e un sottogruppo di DM anti-MDA5-positiva presentano il tasso più considerevole di artrite, che colpisce principalmente le piccole articolazioni di mani e piedi in modo simmetrico ma non erosivo, mimando perciò solo parzialmente l'artrite reumatoide<sup>49,50</sup>.

#### MANIFESTAZIONI POLMONARI

I pazienti affetti da miosite sviluppano spesso un coinvolgimento polmonare, che è la manifestazione extramuscolare più comune riscontrata nella MII rappresentando una causa significativa di morbilità e mortalità tra questi pazienti. Ciò giustifica gli approfonditi esami polmonari (radiografia del torace, HRCT, test di funzionalità respiratoria con DLCO) a cui vengono sottoposti al momento della diagnosi<sup>16,51</sup>.

L'ILD colpisce ben l'80% dei pazienti con DM e PM, con una forte associazione con il profilo sierologico<sup>52</sup>. A tal proposito nella ASyS, l'impegno polmonare è assai rilevante ed è stato osservato che i soggetti con profilo anticorpale positivo per anti-PL-7 e anti-PL-12 presentano forme di ILD più severa e spesso come unica manifestazione clinica rispetto ai soggetti con positività anti-Jo-1<sup>53</sup>.

Il coinvolgimento polmonare può essere la conseguenza di diversi meccanismi: 1) la già citata insufficienza respiratoria determinata dalla compromissione muscolare del diaframma e dei muscoli toracici; 2) le infezioni ricorrenti che questi pazienti contraggono a causa dei farmaci immunosoppressori o della disfagia; 3) il danno infiammatorio diretto all'interstizio polmonare nel contesto della ILD<sup>54</sup>. In questi pazienti può verificarsi anche pneumomediastino.

Il quadro clinico è variabile e comprende sia pazienti asintomatici che sintomatici. Questi ultimi presentano tosse secca e dispnea progressivamente ingravescente (accompagnata o meno da astenia) o ILD rapidamente progressiva e fatale. La tosse, l'ippocratismo digitale (*clubbing* ungueale) e i crepitii all'auscultazione sono una triade classica della malattia<sup>15</sup>.

Un pattern restrittivo anomalo registrato alle curve spirometriche e una ridotta capacità di diffusione dei gas al test DLCO sono considerati abbastanza tipici.

La relazione temporale tra la diagnosi di MII e l'insorgenza dell'ILD varia ampiamente tra i diversi pazienti, anticipando talvolta di anni la diagnosi ufficiale.

L'ILD può essere classificata in varie sottocategorie sulla base di caratteristiche istopatologiche e radiologiche visibili con la TC ad elevata risoluzione (HRCT): 1) polmonite interstiziale non specifica (NSIP); 2) polmonite da organizzazione (OP); 3) polmonite interstiziale usuale (UIP). Ciò non toglie che possano essere presenti anche quadri sovrapposti.

La NSIP è solitamente caratterizzata all'imaging da opacità a vetro smerigliato (*ground-glass*) bilaterali e abbastanza simmetriche con una predominanza ai campi polmonari basali. Si possono osservare inoltre sottili bronchiectasie da trazione. Il coinvolgimento tende a essere principalmente subpleurico. Tuttavia, l'iniziale risparmio subpleurico è altamente specifico per la NSIP.

La NSIP ha una prognosi relativamente favorevole rispetto all'UIP, con un'aspettativa di vita a 5 anni del 90% per il sottotipo cellulare e di oltre il 60% per il sottotipo fibrotico, grazie alla migliore risposta del primo ai corticosteroidi. Il micofenolato mofetile (MMF) può fornire un beneficio in questa circostanza<sup>55,56</sup>.

L'OP si presenta radiologicamente con opacità multifocali a vetro smerigliato (GGO) e/o consolidamenti a predominante distribuzione subpleurica o peribronchiale. Si possono osservare anche noduli di dimensioni eterogenee. La prognosi è per lo più benigna, grazie alla risposta soddisfacente ai corticosteroidi.

L'ILD rapidamente progressiva (RP-ILD) è un fenotipo molto grave che caratterizza il sottogruppo di DM anti-MDA-5<sup>+</sup>. Questa ILD si manifesta radiologicamente come una combinazione di pattern NSIP e OP con un'espansione rapidamente progressiva dell'alveolite e delle consolidazioni settali che iniziano con una distribuzione subpleurica e basale con una rapida invasione del parenchima polmonare<sup>57</sup>.

La caratteristica più distintiva dell'UIP alla HRCT è l'*honeycombing*, soprattutto se il parenchima coinvolto è superiore al 5%. L'aspetto del polmone a favo d'ape e le opacità reticolari subpleuriche sono caratteristiche utili nella diagnosi differenziale rispetto alla NSIP e all'enfisema. L'UIP è gravata da una prognosi infausta ed è fortunatamente una condizione rara<sup>58</sup>.

#### MANIFESTAZIONI CARDIACHE

Un coinvolgimento cardiaco è presente nel 13-72% dei casi ma si tratta prevalentemente di forme subcliniche che non correlano con la gravità della malattia; meno del 10% dei pazienti affetti da PM/DM presenta manifestazioni cliniche evidenti con mortalità complessiva stimata tra il 5 e il 48%<sup>59</sup>.

L'infiltrazione flogistica nel cuore può portare a una miocardite subclinica. Inoltre, possono verificarsi fenomeni di sostituzione fibrotica a carico del sistema di conduzione, soprattutto ventricolare, che porta ad aritmie asintomatiche nel 30-80% dei pazienti<sup>60</sup>.

Il rischio di infarto miocardico acuto risulta essere aumentato di 4 e 3 volte in soggetti affetti rispettivamente da PM e DM. Ciò sembrerebbe essere giustificato dal fatto che l'infiammazione cronica rappresenta un noto fattore di rischio per aterosclerosi e tende a favorire stati di ipercoagulabilità<sup>61</sup>.

Il coinvolgimento cardiaco può anche includere insufficienza cardiaca congestizia (CHF, nel 10-15% dei casi), disfunzione diastolica ventricolare sinistra e contrazione ventricolare sinistra ipercinetica<sup>32</sup>.

### **1.1.7 DIAGNOSI**

Il primo passo per una diagnosi di MI è il forte sospetto clinico basato sulle tipiche manifestazioni muscolari ed extramuscolari della malattia che devono essere indagate da un'attenta valutazione anamnestica e dall'obiettività clinica.

Il sospetto clinico deve tuttavia essere confermato da una vasta serie di accertamenti di tipo laboratoristico, di imaging e istopatologici. Infine, è necessario escludere altre possibili cause di miopatia compatibili con il quadro clinico<sup>32,50,62,63</sup>.

### **INDAGINI DI LABORATORIO**

Le indagini laboratoristiche presentano diverse alterazioni biochimiche, alcune delle quali sono aspecifiche (ad esempio, PCR, VES e  $\alpha_2$ -globuline) mentre altre sono abbastanza specifiche come enzimi muscolari e sierologia.

#### **ENZIMI MUSCOLARI**

La maggior parte dei pazienti affetti da MI presenta un aumento di almeno un enzima di derivazione muscolare, classicamente la CPK (cioè la creatina fosfochinasi), che si distingue come l'enzima principale nel monitoraggio routinario dell'attività muscolare essendo altamente sensibile, anche se non è necessariamente correlato alla gravità della malattia<sup>2</sup>. Nel 30% dei pazienti, tuttavia, può rientrare nel range di normalità, soprattutto all'esordio della malattia o in caso di atrofia muscolare avanzata. L'IMNM e l'IBM producono rispettivamente i livelli di CPK più alti e più bassi tra i fenotipi di MI.

La mioglobina (MB) risulta elevata in oltre il 70% dei pazienti con miosite attiva e difficilmente determina lesioni tubulari acute in quanto i valori raggiunti non superano la soglia di tossicità tubulare. La sua sensibilità per le infiammazioni muscolari è pari a quella della CPK, ma in corso di miosite la mioglobina si innalza più precocemente della CPK e tende a normalizzarsi prima rispetto ad altri enzimi<sup>64</sup>.

Anche l'aspartato aminotransferasi (AST) e l'alanina aminotransferasi (ALT) sono impiegate nel monitoraggio dell'attività muscolare. Tuttavia, potrebbe essere necessaria anche la rilevazione della  $\gamma$ -glutamyl-transferasi ( $\gamma$ GT) nel caso in cui si debba escludere una alterazione epatica.

Infine, la lattato deidrogenasi (LAD) e l'aldolasi sono occasionalmente presenti nel pannello degli indici di citomiolisi; quest'ultima ha una bassa sensibilità controbilanciata da una grande specificità per il coinvolgimento perimisiale<sup>33</sup>.

#### MARCATORI SIEROLOGICI

La determinazione del profilo anticorpale nelle MII ha un elevato valore prognostico e contribuisce all'identificazione del fenotipo clinico più adatto al paziente, pur avendo un significato diagnostico limitato. Questi auto-anticorpi hanno come bersaglio antigeni *self* intra-cellulari ad espressione ubiquitaria coinvolti in numerosi processi cellulari come la trascrizione e la regolazione genica.

Gli anticorpi riscontrati nella MII possono essere suddivisi in anticorpi specifici per la miosite (**MSAs**) e anticorpi associati alla miosite (**MAAs**). Gli MSAs si riscontrano pressoché esclusivamente nei pazienti con MII, gli MAAs, invece, non sono specifici per le MII, in quanto vengono rilevati anche in altre connettiviti (CTD), e tra le MII sono generalmente presenti nelle forme overlap, come nelle MII associate a sclerosi sistemica (SSc).

Gli MSAs e gli MAAs sono normalmente misurati tramite saggi immunoenzimatici ELISA, ma purtroppo non sono disponibili in tutti i centri. Inoltre, molti pannelli per le MII disponibili in commercio presentano livelli di accuratezza non uniformati.

Si stima che l'80% dei pazienti affetti da MII risulta positivo a qualche autoanticorpo e circa il 45% di essi è positivo ad un MSAs<sup>65,66</sup>.

MSAs

Gli **anti-Mi-2** sono autoanticorpi diretti contro Mi-2, conosciuto anche come complesso NuRD (Nucleosome Remodeling and Deacetylase) che partecipa alla regolazione dell'espressione genica e al rimodellamento della cromatina. Sono anticorpi standard per la DM che compaiono in quasi il 30% dei pazienti; questi non hanno un rischio aumentato di cancro, ILD e poliartrite. Gli anti-Mi-2 sono legati ad un'insorgenza relativamente acuta della DM con importanti manifestazioni cutanee come il segno dello scialle o del collo a V. Sono noti per essere associati ad una buona risposta al trattamento<sup>67</sup>.

Per la ASyS, sono stati identificati al momento anticorpi diretti contro 8 delle 21 amminoacil-tRNA sintasi (ARS) che sono tra loro mutualmente esclusivi: **anti-Jo-1** (presente nel 20% delle ASyS), anti-EJ, anti-PL-7 e anti-PL-12 sono i più frequenti mentre anti-OJ, anti-KS, anti-Zo e anti-Ha sono di meno comune riscontro.

La miosite è comune nei casi positivi ad anticorpi anti-Jo1, anti-PL-7, anti-EJ; l'artrite è anch'essa comune nei casi positivi ad anticorpi anti-Jo-1. La ILD, nei casi positivi ad anticorpi anti-PL-7, anti-KS, anti-OJ e anti-PL-12, è più prevalente e clinicamente severa. Manifestazioni cutanee tipiche di DM sono comuni: dal momento che le caratteristiche istopatologiche della ASyS possono rientrare nei criteri della DM, la valutazione del dato sierologico risulta estremamente utile nell'inquadramento del paziente<sup>53,68</sup>.

Gli anticorpi **anti-MDA-5** (noti anche come CADM-140) hanno come bersaglio l'RNA elicasi codificata dal gene 5 associato alla differenziazione del melanoma. Di solito determina un fenotipo peculiare che consiste in una interstiziopatia polmonare rapidamente progressiva, artrite, CADM e, occasionalmente, ulcerazioni di papule e segno di Gottron oltre che alopecia non cicatriziale. Le manifestazioni muscolari sono lievi o assenti per tutta la durata della malattia. La prognosi è infausta<sup>69</sup>.

Gli anticorpi **anti-SAE** sono diretti contro il piccolo enzima attivatore del modificatore ubiquitina-simile che media la regolazione della trascrizione genica. Le neoplasie sono più frequenti in questi pazienti che nella popolazione generale.

La disfagia e le manifestazioni cutanee sono comuni e anticipano di gran lunga lo sviluppo della miopatia<sup>70</sup>.

Gli anticorpi **anti-TIF1-γ** colpiscono il fattore trascrizionale intermedio 1 gamma e comportano un rischio maggiore di malignità, oltre a risultati cutanei caratteristici che comprendono papule ipercheratosiche sui palmi delle mani e sulla pianta dei piedi, lesioni simili alla psoriasi e chiazze "*red-on-white*"<sup>71</sup>.

Gli anticorpi **anti-NXP-2** riconoscono la proteina 2 della matrice nucleare, che agisce da regolatore trascrizionale. Si trova comunemente tra i pazienti affetti da forme giovanili di DM (JDM) caratterizzate da interessamento severo già all'esordio e presenza di calcinosi cutanea. È associato a malignità nei maschi e negli adulti<sup>71</sup>.

I pazienti **anti-SRP**-positivi caratterizzano frequentemente, ma non esclusivamente, la IMNM. L'antigene coinvolto è la particella di riconoscimento del segnale (SRP) impegnata nella traslocazione delle proteine appena sintetizzate nel reticolo endoplasmico. Il coinvolgimento cardiaco è spesso presente in questa popolazione, che presenta un esordio severo con alti livelli di CPK e prognosi grave anche a causa della scarsa risposta al trattamento<sup>72</sup>.

Una sierologia positiva agli **anti-HMGCR** suggerisce una IMNM associata all'esposizione a statine che riconoscono anche la 3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A reduttasi. La presentazione può essere simile a quella dei casi di anti-SRP<sup>39</sup>.

Gli anticorpi **anti-cN1A**, che hanno come bersaglio la 5'nucleosidasi citosolica IA, sono presenti in oltre il 90% dei casi di IBM e hanno importante significato come biomarcatore diagnostico. Tuttavia non sono così tanto sensibili quanto sono specifici, perciò un test negativo non dovrebbe portare all'esclusione della IBM<sup>73</sup>.

#### MAAs

Gli **anti-Ro/SSA** sono presenti in oltre il 30% dei casi di miosite, spesso associati agli anti-ARS. È stato dimostrato che, nei pazienti con DM/PM anti-Jo1 positiva, hanno un significato prognostico negativo, correlando con forme più severe di ILD, miosite, artrite e CAM<sup>65</sup>.

Gli **anti-PM-Scl** sono di frequente riscontro in individui adulti con miosite accompagnata da manifestazioni cutanee e polmonari di tipo sclerodermico. Sono riportati casi di JDM in cui i rash cutanei presenti all'esordio tendono a scomparire lasciando il posto ad un quadro di sclerodermia; tipicamente questi soggetti sono positivi per anticorpi anti-PM-Scl ed è stato perciò coniato il termine "scleromiosite" per definirne la loro condizione.

Gli anticorpi **anti-U1RNP** sono solitamente presenti in soggetti con miosite sovrapposta ad altre connettiviti (MTCD), più spesso SSc e LES<sup>68</sup>.

### **ELETTROMIOGRAFIA E STUDI DI CONDUZIONE NERVOSA**

L'EMG si rivela estremamente utile nella valutazione degli aspetti funzionali del coinvolgimento muscolare costituendo un supporto alla diagnosi di MII. Le anomalie elettromiografiche possono essere osservate in circa l'80% dei pazienti. La letteratura riporta l'esistenza di una triade elettromiografica composta da: 1) complessi polifasici durante la contrazione volontaria e riduzione dell'ampiezza dei potenziali d'azione delle unità motorie, manifestazione di una perdita dei tratti di fibre muscolari; 2) potenziali di fibrillazione, onde acute positive per aumento dell'attività giunzionale; 3) scariche ripetute e ad alta frequenza di potenziali irregolari. Queste alterazioni non sono specifiche della malattia.

Inoltre, l'EMG può essere utilizzata per identificare il gruppo muscolare più adatto per la biopsia, ma la biopsia muscolare non dovrebbe essere eseguita sullo stesso muscolo che è stato recentemente sottoposto allo studio miografico.

L'EMG insieme alla NCS è utile per la diagnosi differenziale tra cause miopatiche e neuropatiche di debolezza motoria. Tuttavia, l'IBM può mostrare un pattern di denervazione all'esame<sup>64</sup>.

### **IMAGING**

L'ecografia muscoloscheletrica con power Doppler è una tecnica rapida e accessibile per la valutazione delle MII. Non è invasiva, ma è notevolmente dipendente dall'operatore. All'ecografia in fase acuta di miosite, si evidenzia solitamente un volume muscolare normale o aumentato, ipoecogenicità per l'edema tissutale, ed iperemia coerente con la flogosi acuta, visibile al power

Doppler. Quando la malattia cronicizza, l'ecografia mostra contrazione volumetrica del muscolo e l'iperecogenicità<sup>2</sup>.

La RMN rappresenta il *gold standard* per l'imaging muscolare nell'ambito delle MII, in quanto consente una visione dettagliata dell'estensione del coinvolgimento muscolare. Infatti, le sequenze pesate in T2 e le sequenze STIR rivelano l'edema muscolare durante le fasi attive della miosite e correlano con l'attività di malattia. D'altra parte, le sequenze pesate in T1 sono più adatte per la visualizzazione delle aree di sostituzione fibro-adiposa e dell'atrofia muscolare nella malattia grave e avanzata. In base a quanto detto, le sequenze T2 e STIR sono più utili nella valutazione della DM mentre nella PM sono necessarie sia quelle in T2 che in T1 in quanto coesistono aspetti flogistici e di atrofia e sostituzione fibrosa. Nella IBM sono invece per lo più le sequenze T1 in quanto prevale l'ipo-atrofia muscolare. Occasionalmente, possono essere visibili calcificazioni. La sensibilità della RMN è superiore a quella della biopsia, in quanto evita gli errori di campionamento che possono verificarsi con quest'ultima. Purtroppo, non è molto specifica, poiché diverse patologie possono presentarsi con un aspetto radiologico indistinguibile (ad esempio, rabdomiolisi, distrofia muscolare e miopatia metabolica). La RMN può essere utilizzata per identificare le regioni candidate a essere sottoposte a biopsia<sup>64,74</sup>.

Non bisogna dimenticare il coinvolgimento polmonare presente in diversi fenotipi di MII. Infatti quando si rileva una sospetta obiettività polmonare con crepitii basali e una sierologia con anti-ARS o anti-MDA-5 è opportuno eseguire una HRCT, metodica non invasiva e altamente sensibile, per rilevare e poi monitorare una interstiziopatia polmonare (ILD). Assieme a questa, nel monitoraggio, è opportuno effettuare prove spirometriche e il test DLCO per valutare l'entità della patologia restrittiva.

### **BIOPSIA MUSCOLARE**

Una biopsia muscolare (ed eventualmente una cutanea) deve essere eseguita ogni volta che i dati clinici e di laboratorio non riescono a fornire una diagnosi chiara, possibilmente prima di intraprendere un trattamento. Va sottolineato che il

reperto biotico deve comunque interpretato alla luce del quadro clinico e sierologico del paziente.

Nonostante una specificità elevatissima, la sensibilità non è soddisfacente (tra l'80-90%) specialmente per le CAM.

Infatti, per evitare errori di campionamento, l'area deve essere scelta accuratamente sulla base di un MMT-8 ridotto, di un aspetto EMG e/o RM che indichi attività infiammatoria in quel sito.

Si scelgono preferibilmente quadricipiti, deltoidi e bicipiti.

A fini diagnostici, la biopsia è lo strumento diagnostico più importante a disposizione dato che il tessuto muscolare interessato da ciascun sottotipo di MII presenta caratteristiche distintive, visibili in *Tabella IV*.

Myositis subtype	Muscle fibres and tissue	Inflammatory cell infiltrates	MHC I expression	MAC depositions	Other specific findings
Dermatomyositis	Perifascicular atrophy, reduced number of capillaries	Perivascular, perimysial, T cells, B cells, macrophages, plasmacytoid dendritic cells	Perifascicular fibres	Small blood vessels	Sarcoplasmic MxA expression
Polymyositis	Degeneration, necrosis, regeneration	Endomysial inflammatory infiltrate with T cells often surrounding and/or invading non-necrotic muscle fibres	Diffuse distribution	No specific findings	Absence of rimmed vacuoles
Immune-mediated necrotizing myopathy	Necrotic fibres with scattered distribution, different stages of necrosis and myophagocytosis and regeneration, endomysial fibrosis and proliferation	Macrophage predominant, paucilymphocytic infiltrates	Diffuse distribution, sometimes only faint	Sarcolemmal and/or on small blood vessels	No specific findings
Antisynthetase syndrome	Oedematous and/or fragmented perimysium that stains with alkaline phosphatase, sometimes perifascicular myofibre necrosis	Scattered perimysial CD68 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> cells	Perifascicular predominance	Fibres adjacent to the perimysium, sarcolemmal on non-necrotic fibres	Myonuclear actin filament inclusions in electron microscopy, absence of MxA expression
Inclusion body myositis	Rimmed vacuoles, ragged red fibres, cytochrome oxidase-negative fibres, groups of atrophic fibres	Endomysial inflammatory infiltrate with mainly CD8 <sup>+</sup> cells surrounding and/or invading non-necrotic muscle fibres	Diffuse distribution	No specific findings	TDP43, p62 aggregates, 15–18 nm filaments in electron microscopy

IIM, idiopathic inflammatory myopathy; MAC, membrane attack complex.

*Tabella IV. Caratteristiche istopatologiche dei differenti sottotipi di MII. Lundberg et al. Nature Reviews Disease Primers, 2021*

Le caratteristiche istologiche condivise tra le MII includono necrosi, degenerazione e rigenerazione della miofibrille, oltre infiltrati flogistici.

Alla biopsia muscolare della DM, sono reperti tipici l'atrofia perifascicolare e la fibrosi. Le alterazioni perimisiali rappresentano la caratteristica distintiva della DM, mostrando un cospicuo infiltrato infiammatorio perivascolare, la deposizione di MAC sulla parete delle cellule endoteliali dei capillari endomisiali che porta alla distruzione dei vasi e all'ischemia, con conseguente vasculite istologicamente visibile. Perciò la presenza di atrofia associata a infiltrato infiammatorio perivascolare e inter-fascicolare è diagnostica di DM<sup>24,33</sup>.

A differenza di PM e IBM, l'invasione delle fibre non necrotiche è una componente molto meno caratteristica.

L'immunoistochimica rivela l'espressione di proteine associate alla rigenerazione (MYH8, vimentina, NCAM) insieme alla proteina A di resistenza al myxovirus (MxA), la proteina di tipo 1 inducibile dall'interferone, con un verosimile significato patogenetico. I MAC sono rilevabili sulle pareti dei vasi prima che si noti un infiltrato infiammatorio<sup>75,76</sup>.

Alla biopsia muscolare di PM si evidenzia solitamente un coinvolgimento endomisiale in cui le cellule infiammatorie (principalmente CTL: cellule T citotossiche CD8<sup>+</sup>) infiltrano le singole miofibrille, in *foci* multipli, con una predilezione per quelle centrali. Non è stata segnalata la deposizione di immunocomplessi. È inoltre visibile una diffusa necrosi e tentativi di rigenerazione delle fibrocellule<sup>76</sup>.

Il dato caratteristico della IMNM è un'abbondante necrosi muscolare nonostante gli infiltrati infiammatori siano scarsi. Le fibre necrotiche e rigeneranti sono sparse in tutto il tessuto<sup>75</sup>.

Le caratteristiche patognomoniche della IBM consistono in *rimmed vacuoles*, depositi di amiloide positiva alla colorazione Rosso-Congo e/o inclusioni sarcoplasmatiche p62-positive. CTL, cellule dendritiche mieloidi e macrofagi costituiscono l'infiltrato infiammatorio che invade le miofibrille; questo abbondante infiltrato si ammassa nello spazio perimisiale<sup>76,77</sup>.

Le biopsie di ASyS mostrano necrosi perifascicolare con una frequenza maggiore rispetto a quelli del DM (79% e 35% rispettivamente). Una popolazione di linfociti T CD4<sup>+</sup> specifiche per l'istidil-tRNA sintetasi infiltrano l'endomisio. Queste cellule inoltre si possono trovare nei polmoni e nel sangue dei pazienti con ASyS<sup>76,77</sup>.

## DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLE MII

Molte condizioni possono mimare la IIM, in particolare: distrofie muscolari; miopatie metaboliche; miopatie mitocondriali; miopatie endocrine; miopatie indotte da farmaci; miopatie infettive; malattie del motoneurone; miastenia gravis<sup>47</sup>.

Nessuna di queste condizioni è associata alle manifestazioni cutanee della DM, ma la diagnosi differenziale dei fenotipi di MII con presentazione esclusivamente muscolare può risultare molto più impegnativa.

Nella *Tabella V*, riportata in basso, si evidenziano le principali patologie muscolari che entrano in diagnosi differenziale con le MII.

Inflammatory myopathies	Noninflammatory myopathies
<b>Infectious myopathies</b> Bacterial (egs. Staph, Strep, M. tuberculosis) Viral (egs. Influenza, EBV, HBV, HCV, HIV, HTLV-1) Fungal (egs. Candida, Coccidiomycosis) Protozoal (egs. Toxoplasma, malaria) Cestode (egs. Cysticercosis) Nematode (egs. Trichinosis) <b>Toxic myopathies</b> (egs. Cocaine/heroin, cimetidine, D-penicillamine, adulterated rapeseed oil, amiodarone, L-tryptophan, colchicine) <b>Lipid-lowering agents</b> <b>Myositis associated with graft versus host disease</b> <b>Myositis ossificans</b> <b>Myositis associated with the vasculitides</b> <b>Macrophagic myofasciitis</b> <b>Inflammatory dystrophies</b> (fascioscapulohumeral dystrophy (FSHD), dysferlin deficiencies) <b>Idiopathic inflammatory myopathies</b> (egs. PM, DM) <b>Malignant hyperthermia</b> <b>Myotonia</b> <b>Neuromuscular junction disorders</b> (egs. Eaton-Lambert Syndrome, myasthenia gravis) <b>Periodic paralyses</b> <b>Rhabdomyolysis</b> <b>Tendonitis-fasciitis syndromes</b>	<b>Congenital</b> (nemaline rod, central core) <b>Mitochondrial</b> (acid maltase, McArdle's, phosphofructokinase (PFK), carnitine and carnitine palmityltransferase deficiency) <b>Endocrine</b> (hypo- & hyperthyroidism, acromegaly, diabetes, hypo- & hyperparathyroidism) <b>Toxic</b> (drugs – egs. Ethanol, AZT, corticosteroids) <b>Nutritional</b> (vitamin E deficiency, malabsorption syndromes) <b>Muscular dystrophies</b> (egs. Duchenne's, Becker's, FSHD, LGMD (limb-girdle muscular dystrophy), Distal, Oculopharyngeal) <b>Neuropathies</b> Denervating conditions (spinal muscular atrophy, amyotrophic lateral sclerosis) Proximal neuropathies (Guillan-Barre syndrome, autoimmune polyneuropathy, diabetic plexopathy, acute intermittent porphyria) <b>Overuse syndromes</b> <b>Paraneoplastic syndromes</b> (egs. carcinomatous neuropathy, cachexia, myonecrosis) <b>Rheumatic syndromes</b> (egs. Giant cell arteritis/polymyalgia rheumatica (GCA/PMR), granulomatous with polyangiitis, polyarteritis nodosa (PAN), fibromyalgia syndromes) <b>Trauma</b>

Tabella V. Diagnosi differenziale di patologie muscolari. Castro et al., *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* (2012)

### 1.1.8 CLINIMETRIA

Un cardine della gestione del paziente con MII è la quantificazione dell'attività di malattia e del danno da malattia. La prima valuta tipo, estensione e severità delle manifestazioni patologiche reversibili; la seconda include alterazioni anatomiche (cicatrizzazione, fibrosi, atrofia), fisiologiche e funzionali persistenti o permanenti indotte dalla pregressa attività di malattia, nonché complicanze a lungo termine

della terapia e comorbidità. Due gruppi internazionali che includono l'*International Myositis Assessment and Clinical Studies Group* (IMACS) e la *Paediatric Rheumatology International Trials Organisation* (PRINTO) hanno validato delle metodiche che consentono di standardizzare queste valutazioni<sup>78</sup>.

Per quanto riguarda l'attività di malattia, il test di forza muscolare manuale (MMT-8) è il più diffuso e pratico sebbene sia operatore-dipendente. L'MMT-8 è un test manuale che quantifica la forza muscolare di otto gruppi muscolari standardizzati (flessori del collo, deltoide, bicipiti, estensore del polso, grande gluteo, medio gluteo, quadricipite, flessore dorsale della caviglia) attribuendo a ciascuno un punteggio da 0 a 10 secondo la *Kendall 10-point Strength Scale*; dalla somma dei punteggi si ottiene lo score complessivo che può raggiungere il punteggio massimo di 150/150.

Il MDAAT è uno strumento combinato che include il *Myositis Disease Activity Assessment VAS* (MYOACT) e il *Myositis Intention to Treat Activities Index* (MITAX) per determinare in maniera più accurata l'attività di malattia globale, inclusa l'attività extra-muscolare<sup>79</sup>.

Per quanto riguarda la qualità della vita, viene comunemente utilizzato il *Medical Outcomes Study Short Form* (MOS SF-36).

### **1.1.9 PROGNOSI**

La diagnosi e il trattamento precoci sono essenziali per evitare o ritardare il più possibile l'atrofia muscolare e la perdita funzionale.

I principali indicatori prognostici nella MII includono il fenotipo di malattia, i marcatori sierologici, il ritardo diagnostico, l'età di insorgenza della malattia, la gravità della malattia all'esordio, l'estensione del carico di malattia extramuscolare e l'eventualità di una neoplasia alla base.

Quasi il 40% dei pazienti raggiunge la remissione clinica grazie alla terapia immunosoppressiva, mentre il resto dei pazienti è destinato a un decorso remittente-ricidivante della malattia<sup>64</sup>.

Le stime di mortalità mostrano ampie variazioni così come i tassi di sopravvivenza a 10 anni che oscillano tra il 20 e 90% in relazione allo studio condotto e al tipo di pazienti considerati, con il picco di mortalità più alto entro il primo anno dalla diagnosi. Le principali cause di morte dei pazienti con MII sono i tumori maligni, le patologie cardiovascolari e soprattutto polmonari che possono essere rapidamente progressive<sup>2</sup>.

### **1.1.10 TERAPIA**

#### **TRATTAMENTO NON FARMACOLOGICO**

L'esercizio fisico è una aggiunta fondamentale al trattamento farmacologico e dovrebbe essere intrapresa non appena lo stato clinico del paziente lo consenta.

Durante le fasi attive della malattia non si devono eseguire esercizi sotto-carico, al contrario si preferiscono le mobilizzazioni passive per evitare le contratture. L'esercizio fisico attivo, possibilmente sotto la supervisione di un fisioterapista, è caldamente consigliato durante la fase di remissione. In questi pazienti, si osserva una forte associazione tra l'esercizio fisico e la qualità di vita auto-riferita<sup>2</sup>.

È interessante notare che l'esercizio fisico sembra attivare una vasta gamma di pathway molecolari che, in ultima analisi, promuovono la crescita dei capillari e il rimodellamento muscolare, attenuando al contempo la risposta immunitaria<sup>2,80</sup>.

Inoltre, i pazienti dovrebbero essere istruiti sui benefici della fotoprotezione fin dall'inizio, poiché essa può influenzare il decorso della malattia a qualsiasi livello.

Valutazioni e precauzioni fisiatriche svolgono un ruolo fondamentale nella gestione dei pazienti con disfagia grave col fine di ridurre il rischio di polmoniti *ab ingestis*<sup>81</sup>.

## TRATTAMENTO FARMACOLOGICO

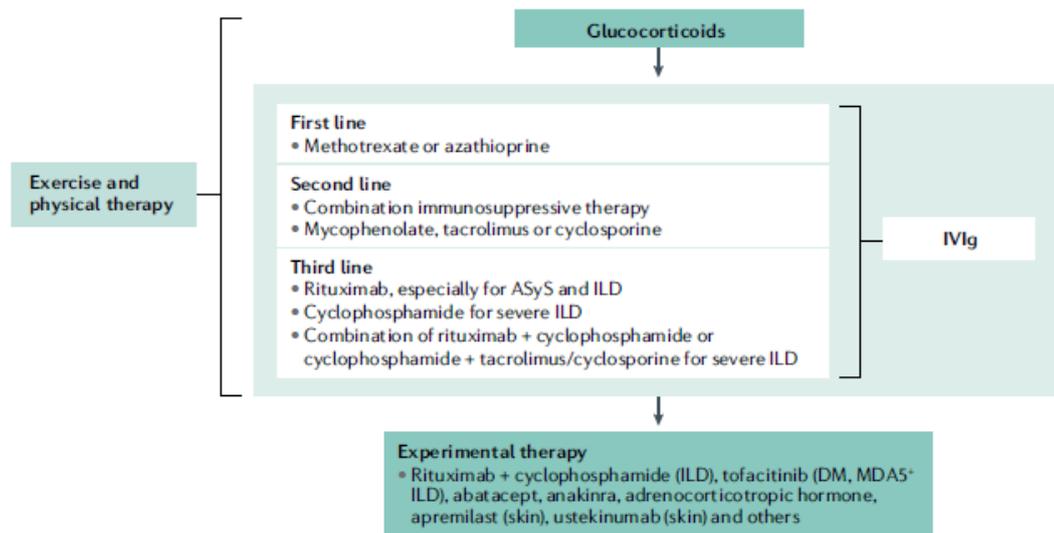


Figura 3. Linee guida per il trattamento delle miopatie infiammatorie idiopatiche. Lundberg I et al., *Nature Reviews, Disease Primers* (2021)

## CORTICOSTEROIDI

L'eterogeneità e la rarità delle MII le rende inadatte a *trial* clinici adeguatamente potenziati; di conseguenza non vi è un consenso generale basato su evidenze di elevata qualità per il trattamento delle miositi.

Tuttavia, i corticosteroidi (CS) sono riconosciuti in modo unanime come farmaci di prima linea, soprattutto in caso di ILD grave o di debolezza muscolare. Infatti studi ne hanno dimostrato il beneficio sull'infiammazione muscolare. Soggetti trattati con CS per 3-6 mesi hanno avuto una riduzione dell'espressione di molecole infiammatorie come IL-1 $\alpha/\beta$ , ICAM-1, MHC-I nonché, dal punto di vista clinico, un recupero della forza muscolare<sup>82</sup>.

Un'elevata dose di carico di prednisone (1 mg/kg/die) deve essere somministrata per un periodo di 4-6 settimane, con una successiva riduzione in base al monitoraggio della malattia.

Se il quadro clinico è favorevole, il prednisone deve essere gradualmente ridotto del 20% ogni mese fino a raggiungere la dose minima efficace (circa 5-10 mg/die) per un totale di 9-12 mesi.

Un miglioramento significativo della forza muscolare è atteso soprattutto nel corso del secondo semestre dall'inizio del trattamento. Se il controllo della malattia non è soddisfacente, si devono aggiungere gli immunosoppressori. Nei casi gravi di miosite o ILD può essere necessario un bolo di metilprednisolone per via endovenosa alla dose di 500-1000 mg/die per tre giorni consecutivi<sup>83</sup>.

Anche se i glucocorticoidi possono conseguire un miglioramento biochimico e clinico delle manifestazioni delle MII, sono purtroppo legati a numerosi effetti indesiderati a lungo termine, oltre che a tassi di *flare* di malattia più elevati. Pertanto, questi pazienti possono trarre beneficio dall'associazione con un immunosoppressore<sup>84</sup>.

### **IMMUNOSOPPRESSORI**

Con l'obiettivo di ridurre il dosaggio di CS per limitare effetti avversi e riacutizzazioni, si è soliti associare una terapia con farmaci immunosoppressori (IS). Bisogna sottolineare che, tuttavia, si tratta di farmaci *slow-acting* che impiegano circa 3 mesi per raggiungere la piena efficacia<sup>85</sup>.

Il **metotrexato** (MTX) è spesso usato in associazione al cortisonico come terapia iniziale della miosite e nel trattamento dei pazienti che sviluppano *flare* di malattia conseguenti alla riduzione di dose del cortisonico. In prima linea, è raccomandata una dose di 10-20 mg/settimana. Un ampio studio clinico ha dimostrato in soggetti affetti da JDM *naïve* alla terapia una risposta migliore con la combinazione prednisone e metotrexato rispetto al solo prednisone<sup>83,86</sup>. Il metotrexato è gravato da epatotossicità e mielosoppressione, per questo motivo si consiglia sempre l'associazione con acido folico; è inoltre noto teratogeno.

L'**azatioprina** (ATZ) è relativamente sicura per l'uso in gravidanza ed è l'immunosoppressore di scelta nei pazienti con una patologia epatica o polmonare sottostante, ma anche nella dipendenza da alcol<sup>83</sup>. La dose orale è di 2-3 mg/kg/die e consente di ottenere risultati funzionali migliori a lungo termine rispetto ai soli glucocorticoidi<sup>87</sup>. A causa del rischio di mielosoppressione è richiesto un monitoraggio dell'emocromo entro le prime due settimane di somministrazione; per il resto è ben tollerato, ad eccezione di lievi disturbi gastrointestinali.

Il **micofenolato mofetile** (MMF) è un agente di seconda linea, tranne nei casi di miosite moderata o grave associata a ILD, in cui può essere utilizzato come farmaco di prima linea. Il dosaggio del MMF deve essere aumentato progressivamente fino a raggiungere una dose target di 500-1000 mg<sup>85</sup>.

La **ciclofosfamide** (CYC) è un potente agente immunosoppressivo utile nel trattamento di forme di MII refrattarie o gravi, come in caso di ILD rapidamente progressiva, miosite grave o vasculite sistemica. È disponibile sia in formulazione endovenosa (500 mg in bolo ogni 15 giorni per 6 mesi o mensilmente 0,75g/m<sup>2</sup> fino alla dose target) che orale (1,5-2 mg/kg/die). Purtroppo, il suo uso è limitato da una notevole tossicità multisistemica che ne limita l'utilizzo a gravi situazioni cliniche<sup>83</sup>.

Gli inibitori della calcineurina, **ciclosporina** (CsA) e **tacrolimus**, sono impiegati come seconda linea e agiscono sopprimendo l'attivazione delle cellule T. La dose raccomandata per la CsA orale è di 3-5 mg/kg/die, mentre il tacrolimus dovrebbe mantenere livelli plasmatici di 8-10 ng/ml. Il loro utilizzo sta prendendo piede nelle miositi refrattarie o gravi con o senza ILD associata, che richiedono uno stretto monitoraggio<sup>85</sup>.

### **IMMUNOGLOBULINE**

Le immunoglobuline endovenose (IVIg) sono agenti di seconda o terza linea con proprietà antinfiammatorie e immunomodulanti. Vengono utilizzate in concomitanza con altre terapie o in seguito al loro fallimento. Sono note per accelerare la risposta al trattamento e sono sicure in pazienti in gravidanza, oncologici o infetti.

In caso di resistenza al trattamento, l'IVIg può essere somministrata alla dose elevata di 2 g/kg per 2-5 giorni al mese in base alla risposta del paziente, di solito non superando i 3-4 cicli. La loro farmacodinamica comprende diversi meccanismi immunomodulatori, il loro uso è ben tollerato e comporta un miglioramento della qualità di vita auto-riferita<sup>88</sup>.

## FARMACI BIOLOGICI

Il **rituximab** (RTX) è un farmaco biologico che agisce attraverso la deplezione dei linfociti B CD20<sup>+</sup>, coinvolti probabilmente nella patogenesi di diversi fenotipi di MII. È relativamente sicuro e ben tollerato e consente una significativa riduzione degli steroidi nonché un miglioramento muscolo-cutaneo nei pazienti con MII altrimenti refrattaria. I miglioramenti clinici più evidenti si osservano nei pazienti anti-Jo-1 o anti-Mi-2 e JDM. Il RTX deve essere somministrato in due occasioni separate, a distanza di due settimane, alla dose di 1000 mg<sup>89,90</sup>.

Le terapie **anti-TNF- $\alpha$**  (ad esempio, Etanercept e Infliximab) hanno portato risultati contrastanti, forse a causa della funzione ambigua che il TNF- $\alpha$  esercita nel *milieu* muscolare, compromettendo la contrazione muscolare e la miogenesi da un lato e promuovendo lo sviluppo delle miofibrille dall'altro<sup>91</sup>.

**Abatacept** è una proteina di fusione derivante dalla combinazione di CTLA4 e della porzione Fc delle IgG1, che determina l'inibizione della co-stimolazione delle cellule T. È interessante come sia associato a importanti segni di miglioramento sia dal punto di vista clinico che istologico. Viene somministrato per via endovenosa per 30 minuti a una dose compresa tra 500 e 1000 mg, in relazione del peso del paziente<sup>92</sup>.

Recentemente si è cominciato a vagliare il ruolo dei **JAK inibitori**, come il Tofacitinib, nel trattamento delle manifestazioni cutanee refrattarie della DM<sup>93</sup>, nonché dell'impegno polmonare progressivo (RT-ILD) in forme severe di DM MDA-5<sup>+</sup> o di ASyS non-Jo-1<sup>+</sup>, con risultati incoraggianti<sup>94</sup>.

## 1.2 VESICOLE EXTRACELLULARI

### 1.2.1 DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE

Il termine “vescicole extracellulari” (EVs) fa riferimento a particelle rivestite da un doppio strato fosfolipidico e incapaci di replicarsi, non contenenti un nucleo funzionante. Queste particelle sono rilasciate nello spazio extracellulare da tutte le cellule soprattutto in circostanze particolari come, ad esempio, l’apoptosi o l’attivazione cellulare<sup>95</sup>.

Negli anni, l’interesse per le EVs è cresciuto notevolmente in quanto sono stati identificati come attori principali nella comunicazione inter-cellulare, grazie alla loro capacità di trasportare in maniera efficace biomolecole attive come proteine, lipidi, acidi nucleici proteggendole dalla degradazione, altrimenti inevitabile nell’ambiente extracellulare.

Le EVs si trovano in quasi tutte le matrici biologiche e sono quindi promettenti candidati come biomarcatori di patologie; inoltre, presentano anche il potenziale per un uso terapeutico alla luce della loro funzione di veicoli intercellulari di alta precisione, in grado di attraversare le barriere biologiche<sup>96</sup>.

Le EVs presentano un’importante eterogeneità in termini di biogenesi, dimensioni, densità e composizione biochimica, oltre che di origine cellulare e condizioni di rilascio. Tale diversità ha comportato importanti problemi di nomenclatura fino alla pubblicazione delle linee guida MISEV 2018, che si sono poste l’obiettivo di fornire una classificazione organizzata e standardizzata delle EV.

Sulla base della biogenesi, le EVs erano distinte in esosomi e microvescicole. Gli **esosomi** hanno origine da vescicole intra-luminali (ILVs) formate per gemmazione interna della membrana esosomiale durante la maturazione degli endosomi. I corpi multivescicolari (MVBs), che trasportano le ILVs, si fondono con il plasmalemma permettendo così il rilascio delle particelle nel compartimento extra-cellulare. Le **microvescicole** (MVs) sono particelle formate per gemmazione esterna della membrana plasmatica e rilasciate nello spazio extracellulare<sup>97</sup>.

Gli esosomi presentano dimensioni limitate dal diametro delle vescicole presenti nei MVBs (< 150 nm), mentre il diametro delle MVs può variare in modo

significativo (da 100 nm a 1 µm). Poiché vi è una significativa sovrapposizione tra i due sottotipi (soprattutto nell'intervallo 100-150 nm) e la biogenesi esatta non può essere solitamente individuata, EVs è il termine generico approvato dall'International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)<sup>98</sup>.

Sulla base delle caratteristiche fisiche si distinguono le **small EVs** (sEVs) con dimensioni inferiori a 100 o 200 nm e le **medium/large EVs** (m/l EVs) con dimensioni superiori a 200 nm; vengono inoltre suddivise in EVs a bassa, media e alta densità<sup>95</sup>.

È possibile distinguere le EVs anche sulla base della composizione biochimica: EVs CD63<sup>+</sup>/CD81<sup>+</sup>, EVs marcate con Annexina A5 e così via. Infine, è possibile stratificare le EVs in relazione al tipo cellulare da cui originano o alla loro composizione: oncosomi, corpi apoptotici, EVs derivate da cellule immunitarie, cellule endoteliali ecc. caratterizzandole mediante specifici marcatori cellulari<sup>95</sup>.

Caratterizzare le EVs in base alla biogenesi richiede di individuare marcatori di superficie mediante analisi di citofluorimetria o marcatori contenuti nelle EVs tramite *western blot* (es. TSG101, Alix).

Sebbene la formazione di esosomi e MVs avviene in sedi cellulari differenti, alcuni meccanismi intracellulari e *sorting machineries* sono condivisi da entrambe. Dopo aver veicolato i cargo nei siti di produzione specifici delle EVs, la loro formazione avviene tramite le seguenti fasi: *clustering*, gemmazione, fissione e rilascio<sup>97</sup>.

### 1.2.2 BIOGENESI E RILASCIO

La biogenesi delle EVs è un processo complesso e fortemente regolato; i meccanismi variano in relazione al cargo o al tipo cellulare.

Come già accennato, nonostante questa varietà, la biogenesi delle EVs rimane abbastanza simile per le diverse tipologie di EVs: 1) il futuro cargo, che agisce come regolatore principale in questa fase, è indirizzato verso specifici microdomini presenti lungo la membrana endosomiale per la formazione degli esosomi o la membrana plasmatica per le MVs; 2) i microdomini sono “zolle” di membrana plasmatica arricchite con sfingolipidi e proteine transmembrana che partecipano

al reclutamento graduale di ulteriori componenti del cargo grazie all'ausilio di *sorting machineries*; 3) il *sorting* induce una curvatura della membrana endosomiale o plasmatica che la fa gemmare rispettivamente verso l'interno o verso l'esterno; 4) gli esosomi subiscono una fissione all'interno del lume dei MVBs (che circondano molte ILVs), mentre i MV subiscono un rilascio diretto dalla membrana plasmatica; 5) entrambi i meccanismi di rilascio sono calcio-dipendenti e necessitano di un notevole coinvolgimento citoscheletrico<sup>99</sup>.

### **BIOGENESI DEGLI ESOSOMI**

Il plasmalemma degli esosomi può derivare o dal network trans dell'apparato di Golgi (TGN) o dagli endosomi precoci formati dall'invaginazione della membrana plasmatica.

Nella biogenesi degli esosomi, la membrana dell'endosoma tardivo viene riorganizzata per formare microdomini arricchiti di tetraspanine (TEM) che svolgono un ruolo chiave nella produzione di esosomi: le principali tetraspanine coinvolte sono CD9 e CD63<sup>100</sup>.

Inoltre, al sito di produzione vengono reclutati *sorting machineries* come l'*Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT)* o *machineries* alternativi come il *pathway syndecan-syntenin-ALIX* per il reclutamento del cargo e la gemmazione della membrana. La fissione, invece, sarà eseguita esclusivamente dagli elementi del complesso ESCRT. È fondamentale sottolineare il ruolo cruciale di questi complessi molecolari nel determinare la composizione, le proprietà funzionali e il destino finale delle vescicole.

Gli acidi nucleici sono una componente rilevante del cargo degli esosomi e anche se alcune molecole sembrano essere inglobate passivamente nella vescicola, come nel caso di numerosi frammenti di DNA o RNA, vi sono sempre più prove inequivocabili che le molecole di RNA sono caricate selettivamente negli esosomi e nelle EVs in generale. È stato riscontrato che brevi sequenze al 3'-UTR degli mRNA agiscono come un codice di identificazione per l'associazione con il miR-1289, portando all'arricchimento di tali miRNA nelle EVs<sup>97</sup>.

Le proteine citoplasmatiche solubili possono essere veicolate negli esosomi dalle chaperonine HSP70 e HSC70. Inoltre, le proteine ancorate (ad esempio le proteine ancorate a GPI) mostrano una notevole affinità per le zattere lipidiche e i microdomini arricchiti di sfingolipidi sugli endosomi. Alcune modifiche post-traduzionali come la farnesilazione o l'ubiquitinazione sono associate a un maggiore arricchimento di tali proteine negli esosomi. In effetti, il macchinario ESCRT è costituito da 30 proteine assemblate in quattro complessi, il primo dei quali, ESCRT-0, sequestra sulla membrana endosomiale le proteine ubiquitinate. Ciò consente a ESCRT-I di legare il cargo ubiquitinato all'esosoma in formazione e di attivare ESCRT-II, promuovendo così la deformazione della membrana in gemme che racchiudono il cargo. ESCRT-II recluta a sua volta l'ultimo complesso, ESCRT-III, che completa la gemmazione inducendo la fissione. L'interazione tra ESCRT-I e ESCRT-III è mediata da ALIX, che funge da intermediario tra i componenti TSG101 e CHMP4A di ESCRT-I e III, rispettivamente<sup>97</sup>.

Accanto al complesso ESCRT, esistono *machineries* alternativi come la *pathway* sindecano-sintenina-ALIX. Questa via è strettamente dipendente dalla presenza del sindecano, un proteoglicano a singolo dominio transmembrana con una catena di eparan solfato che può legare specifici cargo (ad esempio, FGFR1), che determina un raggruppamento di queste proteine transmembrana. Questi agglomerati reclutano la sintenina1 che promuove l'internalizzazione del sindecano nel sito di produzione dell'esosoma, dove l'eparinasi endosomiale digerisce la catena di eparan solfato. L'elaborazione della catena di eparan solfato facilita l'ulteriore raggruppamento e il legame di ALIX, sostenendo successivamente la gemmazione della membrana e la successiva fissione tramite ESCRT-III<sup>101,102</sup>.

La *Figura 4* illustra i meccanismi di biogenesi degli esosomi sopra descritti.

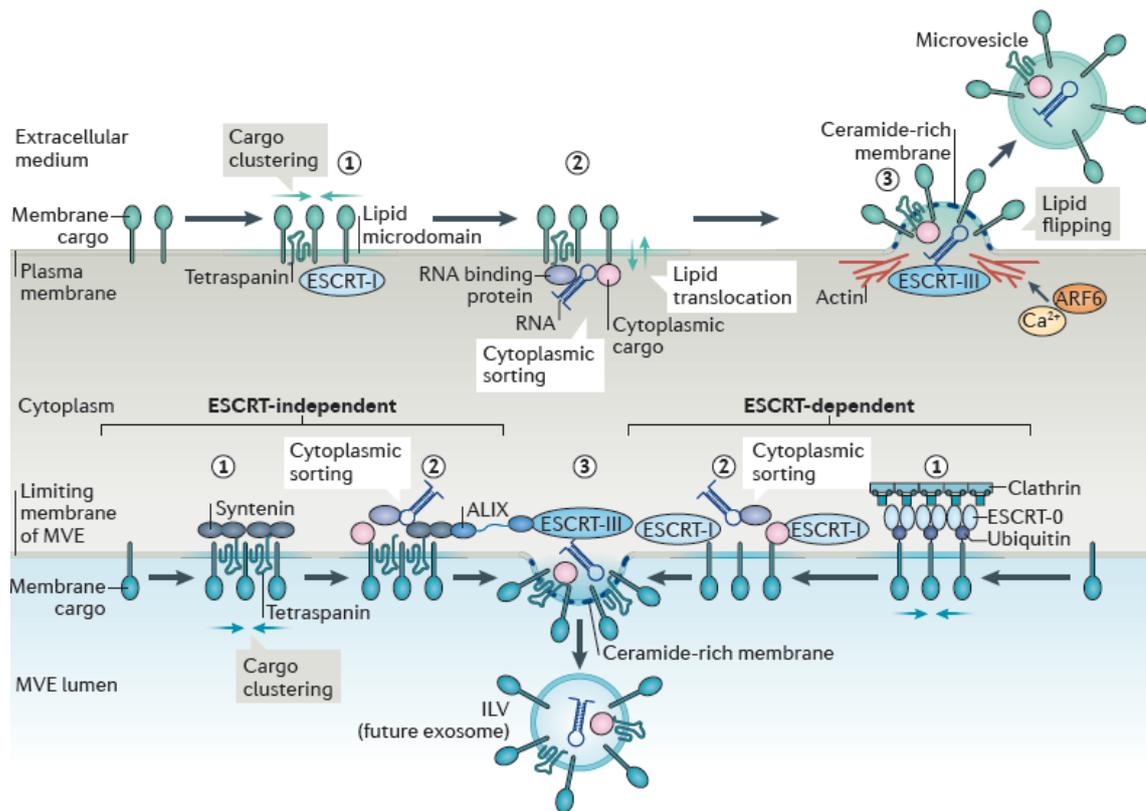


Figura 4. Panoramica sulle vie di biogenesi degli esosomi. Van Niel G et alii, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2018)

## RILASCIO DEGLI ESOSOMI

I MVBs possono seguire due percorsi alternativi: la via degradativa che comporta la fusione con i lisosomi (più frequente) oppure la via secretoria, in cui la membrana limitante del MVB si fonde con la membrana plasmatica.

Questo equilibrio può essere alterato in molte circostanze, ad esempio nei difetti di degradazione lisosomiale o nell'espressione della tetraspanina 6 che innesca la via sindecano-sintenina-ALIX, viene favorita la secrezione di esosomi piuttosto che la loro degradazione; al contrario, l'espressione di molecole MHC II ubiquitinate promuove la via degradativa. Entrambe le opzioni richiedono che le MVB siano trasportate lungo il citoscheletro e successivamente fuse con la membrana plasmatica o con i lisosomi.

La via degradativa prevede il trasporto retrogrado sui microtubuli attraverso motori proteici come le dineine con l'ausilio di RAB GTPasi, mentre per la secrezione è necessario un trasporto anterogrado con proteine motrici convenzionali. Il *docking* e la fusione sono le ultime fasi del rilascio dell'esosoma e

richiedono l'azione congiunta di RAB GTPasi, actina e complessi proteici SNARE calcio-sensibili<sup>97</sup>.

### **BIOGENESI DELLE MICROVESCICOLE**

I meccanismi alla base della biogenesi delle MVs non sono ancora del tutto chiari. Sebbene alcuni meccanismi e caratteristiche possano essere condivisi con gli esosomi, le modificazioni della distribuzione dei fosfolipidi di membrana è un processo peculiare della biogenesi delle MVs.

Infatti, l'aumento del  $Ca^{++}$  intracellulare determina una progressiva perdita dell'interazione tra sarcolemma e citoscheletro (grazie all'azione di calpaine calcio-dipendenti) ma soprattutto attiva una serie di traslocasi calcio-dipendenti, come le flippasi, che insieme alle scramblasi sono responsabili dello spostamento delle molecole lipidiche attraverso la membrana plasmatica, che porta all'esposizione della fosfatidilserina sul foglietto esterno. Questa asimmetria nella composizione della membrana ne provoca meccanicamente la gemmazione verso l'esterno<sup>103</sup>.

### **RILASCIO DELLE MICROVESCICOLE**

Il rilascio delle MVs necessita di un notevole rimodellamento del citoscheletro: un'alterata polimerizzazione dell'actina seguita dalla contrazione dell'actomiosina del citoscheletro determina la formazione di un anello di actina la cui contrazione consente il distacco delle MVs. Quest'ultimo processo, passaggio chiave per il rilascio di MVs, è orchestrato e strettamente regolato dalla piccola proteina GTPasi RhoA e dalla RHO-associated protein kinase (ROCK)<sup>104</sup>.

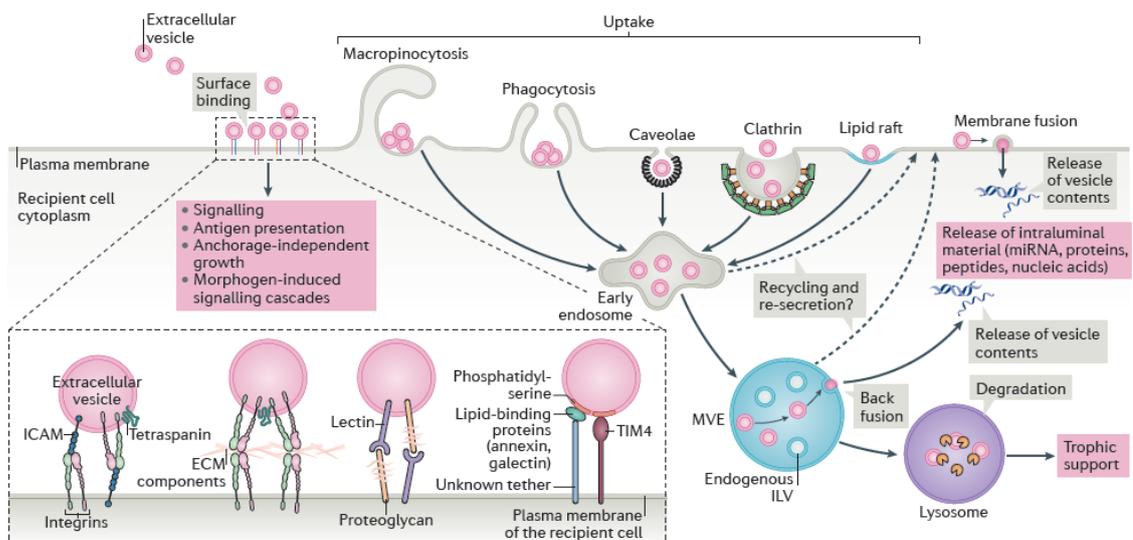
### 1.2.3 TARGETING E UPTAKE DELLE EVs NELLE CELLULE RICEVENTI

Il targeting delle EVs, visibile in *Figura 5*, è un processo altamente specifico che dipende da diverse variabili, come il tipo di cellula ricevente e il suo stato fisiologico, le condizioni di pH, i marcatori di superficie esposti e, infine, la funzione delle EVs.

Le specifiche interazioni tra i ligandi sulla superficie delle EVs e i corrispondenti recettori sul plasmalemma della cellula ricevente sono responsabili di certo tropismo. Tetraspanine, integrine, ICAM, lectine, proteoglicani eparan-solfato e componenti della MEC sono solo alcuni dei numerosi mediatori di tali interazioni<sup>96</sup>.

È curioso che il bersaglio del rilascio di EVs e quindi la cellula ricevente può essere la stessa cellula donatrice, in quanto le EVs possono anche svolgere funzioni autocrine.

Una volta che la EV è agganciata alla membrana della cellula ricevente, si aprono diversi scenari: 1) la EV potrebbe rimanere legata alla superficie e questo contatto potrebbe avviare una cascata di trasduzione del segnale; 2) il carico della EV potrebbe essere rilasciato direttamente nel citoplasma in seguito alla fusione con la membrana plasmatica (ad esempio, trasferimento di miRNA); 3) la EV potrebbe essere fagocitata attraverso vari meccanismi, come la macropinocitosi, la fagocitosi, l'endocitosi mediata da clatrina o caveolina<sup>97</sup>.



*Figura 5. Destino delle vescicole extracellulari con la cellula bersaglio. Van Niel G et alii, Nature Reviews Molecular Cell Biology (2018)*

#### 1.2.4 CARGO

##### PROTEINE

Il cargo proteico presente nelle EVs è estremamente variegato, poiché comprende numerose proteine citosoliche e della membrana plasmatica, mentre sono molto meno rappresentate le proteine espresse negli organelli intracellulari o nel nucleo. Sono presenti nelle EVs: proteine coinvolte nella loro biogenesi (ad esempio, ALIX, TSG101 e altri componenti dell'ESCRT) e nel loro rilascio, proteine coinvolte nella risposta allo shock termico, proteine del citoscheletro, citosoliche e del *trafficking* vescicolare. Anche i fattori di trascrizione, gli enzimi e le proteine della matrice extracellulare contribuiscono alla composizione del cargo<sup>105</sup>.

In particolare, alcune molecole transmembrana appartenenti alla superfamiglia delle tetraspanine (CD9, CD63, CD81 e CD82) fungono da marcatori ad alta specificità per le EVs. Inizialmente ritenute esclusive degli esosomi, le tetraspanine sono state trovate anche nelle MVs e nei corpi apoptotici<sup>100</sup>.

È peculiare che la composizione proteica varia tra i vari sottotipi di EVs: da un lato, gli esosomi tendono ad avere un contenuto glicoproteico significativamente più elevato rispetto alla cellula donatrice, mentre, dall'altro, le MVs tendono ad arricchirsi maggiormente di cargo proteici modificati post-traduzionalmente (glicosilazione e fosforilazione)<sup>106</sup>.

##### LIPIDI

I lipidi sono attori fondamentali nella biogenesi delle EVs; si osserva una significativa differenza tra la composizione lipidica della cellula donatrice e della EV. In particolare, le molecole di colesterolo e gli acidi grassi saturi degli sfingolipidi consentono un impacchettamento più serrato dei lipidi sulla superficie delle EVs rispetto alle catene insature dei fosfolipidi presenti nel plasmalemma; ciò garantisce maggiore rigidità strutturale e quindi una elevata resistenza nell'ambiente cellulare<sup>105</sup>.

Tuttavia, i lipidi non hanno solo una funzione strutturale ma svolgono un ruolo fondamentale nelle funzioni biologiche delle EVs. Ad esempio, gli esosomi con lisofosfatidilcolina (LPC o lisolecitina) sulla superficie sono capaci di interagire più efficacemente con le cellule dendritiche (DC): gli esosomi internalizzati dalle DC

immature ne inducono la maturazione e ne potenziano la capacità di presentazione dell'antigene<sup>107</sup>.

### **ACIDI NUCLEICI**

È ormai condiviso che le molecole di acido nucleico più importanti di cui sono ricche le EVs sono **small non coding-RNA**, piccoli RNA che non superano i 200 bp. Esiste una chiara relazione tra il carico di RNA e la condizione fisiologica o patologica della cellula di origine. Tuttavia, ciò non implica che il carico di EV debba rispecchiare la composizione di RNA della cellula donatrice per quanto riguarda i tipi di RNA e la loro concentrazione relativa.

Molti degli RNA che vi si trovano partecipano alla sintesi proteica, come i transfer RNA (tRNA), le subunità di 18S o 28S di rRNA e gli mRNA. Tuttavia, la parte più considerevole del carico di RNA è costituita da RNA regolatori come microRNA (miRNA), piwi-interacting RNA (piRNA) e small nucleolar RNA (snoRNA)<sup>97</sup>.

A titolo d'esempio, in molte condizioni fisiologiche e patologiche, il trasferimento di miRNA attraverso vescicole extracellulari induce effetti significativi nelle cellule bersaglio. È stato dimostrato che le DC rilasciano esosomi contenenti miR-155 e miR-146a i quali, all'interno delle DC che li internalizzano esercitano un'azione rispettivamente attivatoria ed inibitoria sull'espressione di geni legati all'infiammazione<sup>108</sup>.

### **1.2.5 FUNZIONI BIOLOGICHE**

Evidenze sempre crescenti sostengono che le EVs hanno un ruolo chiave nella comunicazione inter-cellulare alla stregua di altri mediatori più noti come citochine, ormoni o neurotrasmettitori. Inoltre le EVs trasportano un cargo variabile e plurifunzionale proteggendolo dalla degradazione dell'ambiente extracellulare. Per di più, le EVs regolano il *signaling* cellulare rimuovendo recettori di membrana (come avviene nella maturazione dei reticolociti), rilasciando molecole di segnale, trasferendo miRNA e rimuovendo componenti citosoliche come il MAC<sup>109</sup>.

Le EVs possono anche contribuire a smaltire molecole indesiderate come gli aggregati di beta-amiloide e alfa-sinucleina in caso di attività lisosomiale compromessa<sup>97</sup>.

Interessante ruolo delle EVs è quello nello sviluppo embrionale dove, ad esempio, sulla base di studi su *Drosophila* si è visto che le EVs possono facilitare la formazione di gradienti Wnt e Hedgehog, permettendo così il corretto sviluppo degli arti e degli assi anatomici<sup>110</sup>.

Le EVs sono anche implicate nell'immunità sia innata, regolando in diverse fasi il processo infiammatorio, sia adattativa, promuovendo la presentazione dell'antigene e regolando il funzionamento del sistema immunitario.

Le EVs presentano interazioni importanti col sistema del complemento; rappresentano infatti un sistema di *escape* dal complemento: si è dimostrato il rilascio di vescicole caricate con MAC così da rimuoverlo dalla superficie cellulare garantendo la sopravvivenza della cellula stessa. D'altro canto, le EVs costituiscono una sorta di piattaforma che promuove l'attivazione del complemento. Diversi studi evidenziano un'elevata concentrazione di EVs in condizioni in cui si ha attivazione del complemento, come malattia trombotiche e infiammatorie. Infatti, nel liquido sinoviale di pazienti con AR sono presenti livelli significativamente più alti di EVs che legano in superficie proteine del complemento come C1q, C3 e C4<sup>111</sup>.

Le DC rilasciano EVs che mantengono le molecole di membrana della cellula da cui originano; dal momento che le DC esprimono sia MHC-I che MHC-II, è plausibile che le EVs rilasciate possano stimolare sia i linfociti T CD8<sup>+</sup> che i CD4<sup>+</sup> rispettivamente. La capacità delle EVs di stimolare le cellule T è promossa dall'interazione delle vescicole con le DC. Gli esosomi rilasciati da DC mature presentano in superficie una maggiore quantità di MHC-II, CD86 e ICAM1; quest'ultimo può fungere da piattaforma di ancoraggio per promuovere maggiormente l'interazione tra vescicole, APC e linfociti T. Nel complesso quindi l'interazione tra APC ed EVs avviene secondo due modalità: (1) le EVs che vengono internalizzate trasferiscono i peptidi caricati sui loro MHC agli MHC della cellula ospite che li espone in superficie per l'interazione coi linfociti T; (2) le EVs che

vengono catturate dalla DC e mantenute sulla sua superficie presentano l'antigene direttamente ai linfociti T, mentre la DC fornisce le molecole co-stimolatorie, che sono assenti sulle vescicole (meccanismo noto come *cross-dressing*)<sup>112</sup>.

I linfociti T regolatori ( $T_{reg}$ ) svolgono un ruolo fondamentale per garantire la tolleranza al self e modulare la risposta immunitaria; queste funzioni sono ottenute anche dalle EVs da essi rilasciate. EVs contenenti miR-150-5p e miR-142 inducono nelle cellule dendritiche un fenotipo toleragenico, con riduzione dell'espressione dell'IL-6, citochina pro-infiammatoria, e un aumento della sintesi di IL-10, ad azione immunosoppressiva<sup>113</sup>. Inoltre, le EVs derivate dai  $T_{reg}$  possono anche inibire la proliferazione dei linfociti T  $CD4^+$  mediante EVs contenenti miR-146a-5p che sopprime STAT1 e IRAK2; oppure il miRNA let-7d inibisce l'espressione della COX-2 nelle cellule riceventi abbattendo così la produzione di IFN- $\gamma$ . Un altro meccanismo attraverso il quale le EVs rilasciate dai  $T_{reg}$  esercitano una funzione immunosoppressiva è legato all'IL-35. Le EVs grazie a specifici domini delle tetraspanine (CD81) possono legare l'IL-35, diventando concentratori di questa citochina. Successivamente l'IL-35 lega l'IL-35R delle altre cellule immunitarie (linfociti T  $CD4^+$  e  $CD8^+$ ) inducendo anergia tramite l'espressione di PD-1<sup>114</sup>.

### **1.2.6 EVs NELLA CANCEROGENESI**

Visto l'importante ruolo nella comunicazione inter-cellulare, è indubbio che le EVs siano capaci di mediare diversi *hallmarks of cancer* tra cui la proliferazione e la migrazione cellulare, l'angiogenesi, l'invasione tissutale e la metastatizzazione e soprattutto l'evasione del sistema immunitario. Appare chiaro come questo sia un campo di ricerca estremamente florido e in espansione.

Le EVs rappresentano perciò mediatori chiave nella complessa interazione tra cellule tumorali, cellule stromali e microambiente tumorale, influenzando la crescita del tumore primitivo e aprendo la strada alla progressione metastatica.

Nel contesto della neoplasia, le EVs prendono parte ad una comunicazione multidirezionale che coinvolge cellule tumorali e stromali ma anche altre sottopopolazioni che fanno parte del microambiente tumorale come i macrofagi associati al tumore (TAM). A titolo d'esempio, KRAS e EGFR III costituiscono il carico proteico delle EVs nel microambiente tumorale; in questo modo molecole oncogeniche vengono condivise tra le sottopopolazioni tumorali mediante lo scambio di EVs, con conseguente attivazione di MAPK e AKT<sup>115</sup>.

Come già detto, le EVs secrete dai tumori interagiscono con i fibroblasti stromali, che vengono indirizzati verso la differenziazione in miofibroblasti, e con le cellule endoteliali, inducendo di conseguenza l'angiogenesi.

È stato dimostrato che le cellule stromali hanno un duplice ruolo nell'interazione EVs-mediata con le cellule neoplastiche: da un lato, conferiscono alle cellule tumorali la resistenza all'apoptosi e chemioresistenza, oltre a proprietà invasive, attraverso diverse vie (ad esempio, mediante l'up-regolazione di Wnt e la down-regolazione di PTEN grazie a specifici miRNA); dall'altro, presentano attività antitumorali, imponendo uno stato di quiescenza alle cellule metastatiche<sup>116</sup>.

Per quanto riguarda l'evasione del sistema immunitario, le EVs di derivazione tumorale possono esercitare un'azione immunosoppressiva in diversi modi. Particolare attenzione è stata posta sul circuito PD-1 e PD-L1 che agisce sulle cellule T rendendole anergiche. È stato osservato che nel melanoma e nel glioblastoma si instaura un microambiente immunosoppressivo mediante EVs tumorali PD-L1<sup>+</sup> che attivano il checkpoint immunitario PD-1/PD-L1 sui linfociti T CD8<sup>+</sup> impedendone la proliferazione<sup>114</sup>.

La transizione epitelio-mesenchimale (EMT) è un'altra fase chiave della tumorigenesi che viene in parte regolata dalle EVs. In particolare, è stato dimostrato che le vescicole caricate con vimentina e MMP promuovono l'acquisizione del fenotipo mesenchimale con proprietà migratorie e invasive<sup>117</sup>. Tuttavia, per garantire l'efficacia del processo di metastatizzazione, le cellule tumorali circolanti (CTC) devono aderire a una nicchia pre-metastatica favorevole (PMN), la cui formazione è sostenuta dalle EVs attraverso una serie di meccanismi<sup>118</sup>. Nello specifico, le EVs tumorali che agiscono sull'endotelio

promuovono la perdita di integrità della barriera endoteliale causando discontinuità nell'endotelio che diviene un punto d'ingresso delle CTC. Questo processo è mediato da specifici miRNA (miR-105) che down-regolano negli endotelioцитi le proteine implicate nella formazione delle giunzioni serrate<sup>119</sup>.

### **1.2.7 EVs NELLE MALATTIE REUMATICHE AUTOIMMUNI**

#### **EVs NEL LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO**

Il LES è una patologia cronica autoimmune caratterizzata dalla formazione di immunocomplessi (IC) costituiti da anticorpi diretti contro numerosissimi antigeni *self*. Le EVs si possono considerare una fonte importante di autoantigeni. È stato osservato che il dsDNA delle cellule apoptotiche è contenuto nelle EVs e che quest'ultime espongono cromatina sulla loro superficie promuovendo l'interazione con linfociti B attivati DNA-specifici<sup>120</sup>.

Una ridotta *clearance* dei corpi apoptotici è un tratto distintivo del LES. Infatti le EVs CD46<sup>+</sup>, CD55<sup>+</sup> e CD59<sup>+</sup> sono protette dall'assemblaggio del MAC; ciò determina un'alterata *clearance* dei corpi apoptotici con conseguente accumulo<sup>121</sup>. Inoltre è stato dimostrato che alcune sottopopolazioni di EVs derivate da corpi apoptotici sono in grado di innescare la NETosi nelle cellule dendritiche (DC) di pazienti con LES, favorendo ulteriormente la formazione di anticorpi anti-dsDNA<sup>122</sup>. In aggiunta, è stato visto che i corpi apoptotici provenienti dal siero di pazienti affetti da LES attivano la cGMP-AMP sintasi (cGAS), che a sua volta attiva i geni stimolatori dell'interferone (*STING*), aumentando la secrezione di IFN di tipo I. Analogamente, il miR-574 esosomiale è responsabile dell'aumento dell'espressione di IFN I nelle DC plasmacitoidi di questi pazienti<sup>123</sup>.

È interessante notare che in diversi studi è stata rilevata una concentrazione significativamente più elevata di EVs dal plasma dei pazienti con LES rispetto ai controlli sani<sup>124</sup>. Più specificamente, le EVs derivate da monociti CD14<sup>+</sup> sembrano essere significativamente più concentrate tra i pazienti con LES in fase attiva rispetto a quelli con malattia inattiva<sup>125</sup>.

La concentrazione di MVs derivate dall'endotelio sembra essere in stretta correlazione con il grado di coinvolgimento vascolare nei pazienti con LES. Le EVs derivate dai podociti (in particolare le EVs HMGB1<sup>+</sup>) raccolte da campioni di urina di pazienti affetti da nefrite lupica (NL) mostrano una forte associazione con il danno glomerulare e il grado di attività della NL, correlano inoltre con parametri clinici quali SLEDAI (SLE Disease Activity Index), VES e proteinuria. Le EVs urinarie potrebbero quindi essere un utile marcatore per monitorare il danno glomerulare. Allo stesso modo, il miR-146 esosomiale è un promettente marcatore urinario per la sclerosi renale<sup>126</sup>.

Le EVs isolate dai pazienti affetti da LES hanno una composizione proteica peculiare in quanto sembrano essere arricchite in immunoglobuline e complemento rispetto a quelle dei controlli sani e sono relativamente povere di proteine microtubulari e citoscheletriche<sup>127</sup>.

#### **EVs NELL'ARTRITE REUMATOIDE**

Similmente a quanto visto per il LES, alcuni studi evidenziano che la concentrazione complessiva di EVs nel sangue periferico è notevolmente aumentata nei pazienti con AR rispetto a quella dei controlli sani; inoltre i livelli di EVs sembra correlino con l'attività e la progressione della malattia. Tuttavia, altri studi sembrano smentire la presenza di una differenza significativa.

Sono state poi analizzate le specifiche sottopopolazioni di EVs riscontrate ed è emerso che nel liquido sinoviale la concentrazione delle EVs di derivazione piastrinica (*platelet derived microparticles*, PDMP) è invece marcatamente più elevata rispetto ai livelli circolanti suggerendo una produzione locale di EVs e/o una loro localizzazione preferenziale. Nella sinovia, queste PDMP promuovono l'angiogenesi con lo scopo di sostenere l'infiammazione cronica facilitando l'ulteriore reclutamento di cellule infiammatorie nell'articolazione interessata<sup>99,128</sup>.

Sembrano anche essere innalzare le EVs derivate dai FLS (sinoviociti simili ai fibroblasti); queste EVs partecipano alla stimolazione dei linfociti B nel microambiente intra-articolare e contengono sulla loro superficie esosaminidasi

D, una glicosidasi con effetti dannosi per l'articolazione. Questa tipologia di FLS-EVs risulta essere particolarmente elevata nel sottotipo distruttivo dell'AR<sup>129</sup>.

Inoltre le EVs contenenti peptidi citrullinati secrete dalle FLS sono probabilmente implicate nello sviluppo di anticorpi anti-proteine citrullinate (ACPA) con un ruolo primario nella patogenesi dell'AR<sup>130</sup>.

Sono anche state isolate EVs rilasciate da FLS che trasportano TNF- $\alpha$  con effetti stimolanti sulle pathway di AKT e NF- $\kappa$ B che portano alla resistenza all'apoptosi e all'attivazione delle cellule T promuovendo la flogosi sinoviale<sup>131</sup>.

Le microvescicole derivate dai macrofagi che racchiudono DAMP (ad esempio, S100A9, HMGB1 e fosfolipidi di membrana ossidati) legano e attivano direttamente il TLR2/4 e possono analogamente trasportare citochine come RANK-L, IL-15 IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , generando potenti effetti pro-infiammatori<sup>99</sup>.

#### **EVs NELLA SINDROME DI SJÖGREN**

I pazienti affetti da SS presentano una concentrazione di EVs che ha una relazione controintuitiva con l'attività della malattia: in media, le concentrazioni di EVs sono aumentate nei pazienti con SS rispetto ai controlli sani, tuttavia, i pazienti più gravi sperimentano un calo della concentrazione di EVs. Possibili spiegazioni di questo fenomeno sono il consumo o il sequestro delle vescicole nei tessuti bersaglio della SS oppure la stessa distruzione nella fase attiva di malattia dovuta all'attività della fosfolipasi (soprattutto PLA<sub>2</sub>).

È interessante notare che gli esosomi rilasciati dalle cellule epiteliali delle ghiandole salivari dei pazienti con SS sono capaci di trasportare proteine cargo come Ro/SSA e La/SSB, antigeni chiave nella patogenesi di questa sindrome<sup>132</sup>.

### 1.2.8 EVs NELLE MIOPATIE INFIAMMATORIE IDIOPATICHE

Esiste una relazione piuttosto complessa e bidirezionale tra EVs e MII: da un lato, le EVs vengono rilasciate nel contesto di diverse patologie muscolari che condividono una disregolazione della concentrazione del calcio intracellulare, dall'altro, la patogenesi delle MII è profondamente influenzata dal contributo delle EVs, visti i numerosi ruoli che queste vescicole giocano nella regolazione dell'immunità. Infatti le EVs derivate da cellule muscolari, oltre ad essere una possibile fonte di auto-antigeni e citochine ad attività pro-infiammatoria, contengono miochine, una combinazione di peptidi e sequenze di miRNA<sup>35</sup>.

Studi *in vitro* rivelano che le miofibrille infiammate rilasciano miochine che esercitano un'azione inibitoria dei segnali miogenici<sup>133</sup>.

*Baka et al.*<sup>134</sup> hanno dimostrato che la concentrazione delle EVs rilasciate dalle cellule immunitarie è significativamente più alta nei pazienti affetti da MII rispetto ai controlli sani; altri autori evidenziano che le EVs derivate dalle piastrine sono più alte nei pazienti con MII rispetto ai soggetti sani e che correlano con l'infiammazione sistemica e i cui valori si riducono a seguito della somministrazione di glucocorticoidi<sup>135</sup>.

Gli MSA (ad esempio, anticorpi anti-Jo-1 e anti-Mi-2) e gli MAA (ad esempio, anticorpi anti-PM/Scl, ecc.) sono solitamente inclusi nelle EVs isolate da pazienti con polimiosite<sup>124</sup>.

Uno studio ha dimostrato che esosomi isolati dal plasma di pazienti con JDM non trattata trasportano cargo di RNA differenti rispetto agli esosomi isolati da soggetti sani; inoltre, l'internalizzazione di questi esosomi da parte di cellule endoteliali aortiche umane si associa ad un'alterata espressione di geni essenziali per il corretto funzionamento delle cellule endoteliali tra cui geni coinvolti nell'assemblaggio delle giunzioni inter-cellulari, nell'adesione tra cellule e nell'organizzazione del citoplasma; di particolare rilevanza è il fatto che analisi computazionali supportino l'idea che questi effetti trascrizionali siano imputabili agli RNA contenuti dalle EVs<sup>136</sup>.

## **EVs COME BIOMARCATORE NELLE MII**

Il potenziale ruolo delle EVs come biomarcatori nell'ambito della MII rappresenta ad oggi un territorio inesplorato.

Uno studio condotto su pazienti affetti da PM e DM, volto a caratterizzare la PDMP plasmatica mediante ELISA e a correlarla con i dati clinici, ha dato risultati interessanti<sup>135</sup>: la concentrazione di PDMP è apparsa più elevata nei pazienti con malattia attiva o in trattamento rispetto a quella dei controlli sani, mentre è risultata più bassa dopo il trattamento con glucocorticoidi; un aumento del rapporto PDMP/piastrine è stato associato alla malattia attiva (e all'andamento della PCR) rispetto al gruppo di trattamento, ma non ha mostrato alcuna relazione con i livelli di CK; non sono state rilevate differenze significative nei livelli di PDMP tra i sottotipi di DM e PM; non è stata rilevata alcuna correlazione significativa con il grado di gravità della malattia o con i reperti istopatologici.

Un altro studio su pazienti affetti da PM e DM mediante IFC ha rivelato che le EV CD3<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup>, cioè quelle derivate dalle cellule T, dai monociti e dalle cellule B, erano significativamente più elevate nei pazienti affetti da PM/DM rispetto ai controlli sani. Si è anche osservato che l'aumento della concentrazione complessiva di EVs e l'aumento specifico di EVs derivate da monociti e cellule B sono correlati alla debolezza muscolare valutata con MMT-8. Non sono state identificate altre correlazioni cliniche o di laboratorio, tranne una sierologia anti-Jo-1 positiva e un coinvolgimento polmonare che sono stati associati a livelli significativamente più elevati di EVs derivate da monociti, cellule T e B<sup>134</sup>.

### 1.3 MICRO-RNA

I microRNA (miRNA) sono un insieme di piccoli RNA non codificanti, a singolo filamento, della lunghezza di 19-25 nucleotidi, che regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale, inducendo la degradazione di specifici RNA messaggeri (mRNA) oppure impedendone la traduzione in proteina.

I microRNA presentano un suffisso "miR" seguito da un numero di identificazione univoco. I geni che codificano i miRNA hanno lo stesso prefisso del miRNA corrispondente ma scritto con lettere maiuscole. I numeri identificativi sono assegnati sequenzialmente. Alle sequenze paraloghe, in cui il miRNA maturo differisce di solo una o due posizioni, sono assegnati dei suffissi con le lettere, ad esempio miR-10a e miR-10b. Distinti loci presenti nella forcina possono dar luogo a miRNA maturi identici, distinti da suffissi numerici, ad esempio miR-281-1 e miR-281-2. Il suffisso -3p o -5p, che a volte segue il nome del miR, indica il braccio maturo da cui deriva<sup>137</sup>.

La scoperta dei miRNA risale all'identificazione di un piccolo RNA non codificante di 22 nucleotidi, chiamato lin-4, nel nematode *C. elegans*. Questo piccolo RNA legandosi alla regione 3' non tradotta (3'-UTR) dell'mRNA di LIN-14, ne bloccava l'espressione durante i primi stadi dello sviluppo larvale<sup>138</sup>.

Ad oggi, sono stati identificati nell'uomo più di 1500 miRNA (<https://www.mirbase.org/>). Studi recenti suggeriscono che il numero totale possa superare le mille unità e che siano capaci di regolare dal 30% al 60% dei geni di tutto il genoma.

I miRNA agiscono in numerosi processi cellulari, quali differenziamento, proliferazione e apoptosi, e in molti processi fisiologici come il metabolismo, la cardiogenesi, sviluppo e funzione del sistema nervoso e la regolazione del sistema immunitario.

Nella maggior parte degli organismi, il numero di miRNA è inferiore rispetto a quello degli mRNA e delle proteine. Questo perché un unico miRNA è in grado di regolare centinaia di mRNAs. Di conseguenza, un pool di miRNA tessuto-specifico può essere particolarmente ricco di informazioni biologiche, poiché la variazione

nell'espressione di centinaia di RNA messaggeri viene, in certa misura, riflessa dall'espressione di uno o pochi miRNA che li regolano<sup>139</sup>.

### 1.3.1 BIOGENESI

I geni MIRNA possono essere intergenici o intragenici. I geni MIRNA intergenici hanno una propria unità trascrizionale indipendente, costituita da promotore, sequenza di trascrizione e regione di terminazione che non si sovrappongono ad altri geni. Al contrario, i geni MIRNA intragenici possono essere localizzati entro sequenze introniche o esoniche di RNA non codificanti oppure essere situati all'interno di regioni introniche di geni codificanti-proteine. Questi ultimi sono denominati mirtroni, miRNA ottenuti a partire da introni di pre-mRNA, e prevedono un processo di biogenesi non canonico<sup>140</sup>.

La maggior parte dei miRNA origina da esoni o da introni di RNA non codificanti mentre solo un terzo si trova negli introni di geni ospiti che codificano per mRNA<sup>141</sup>.

La trascrizione dei geni MIRNA avviene quasi sempre ad opera della RNA polimerasi II e dà origine a lunghi trascritti primari, i "pri-miRNA" che presentano almeno una o più strutture a forcina formatesi grazie all'appaiamento delle sequenze complementari imperfette del pri-miRNA stesso. Questi lunghi trascritti presentano sempre il capping di 7-metil-guanosia all'estremità 5'; mentre il segnale di poliadenilazione in 3' può non essere sempre presente. I pri-miRNA nel nucleo vengono clivati in una struttura a stem-loop di circa 70 (60-100) nucleotidi denominata pre-miRNA. Questa tappa è guidata dal Microprocessor complex costituito da due enzimi: Drosha, RNasi III con attività endoribonucleasica specifica per RNA a doppio filamento (dsRNA), e DGCR8 (DiGeorge syndrome Critical Region gene 8) o Pasha, proteina di legame del dsRNA che costituisce la subunità non catalitica del Microprocessor complex<sup>142</sup>. Inoltre, sebbene Drosha e Pasha costituiscano il core del microprocessore, anche altre proteine ne fanno parte. Di queste le proteine ad azione elicastica DEAD-box o p68 (nota anche come DDX5) e la p72 (o DDX17) sono fondamentali, infatti se delete portano alla morte dell'embrione<sup>143</sup>.

I pre-miRNA vengono successivamente esportati nel citoplasma mediante l'azione combinata delle proteine esportina-5 e RAN, Ras-related nuclear protein.

Nel citosol, i pre-miRNA subiscono un ulteriore processo di maturazione a carico di un'altra RNasi III denominata DICER. Questo enzima, che agisce in sinergia con una proteina legante il dsRNA, TRBP (TAR RNA binding protein), cliva, in modo ATP-dipendente, il pre-miRNA nella regione a forcina per ottenere un piccolo RNA a doppio filamento imperfetto (duplex miRNA:miRNA\*), di 19-22 nucleotidi, contenente sia il miRNA maturo che il suo complementare, miRNA\*. Uno solo dei due filamenti del duplex viene selezionato e incorporato nel complesso multiproteico RISC (RNA induced-silencing complex): la selezione avviene in base alle proprietà termodinamiche del duplex e il filamento meno stabile all'estremità 5' viene mantenuto mentre l'altro è immediatamente degradato. Il miRNA maturo legato al complesso RISC si associa ad una proteina Argonata (la più frequente è Ago2) e quest'ultima guida il complesso RISC verso l'estremità 3'-UTR dell'mRNA target<sup>144</sup>.

Tra i miRNA intragenici presentano alcune peculiarità i miRNA intronici.

Lo splicing è un processo che rimuove le sequenze introniche dal trascritto di pre-mRNA dando origine ad una molecola di RNA circolare con una coda corta, denominata *lariat intronico*.

I miRNA che originano da sequenze introniche vengono processati mediante una pathway canonica, sovrapponibile a quella sopra descritta, o con una pathway non canonica. Nella prima via, l'azione degli enzimi Drosha e Pasha avviene in maniera contestuale all'azione dello spliceosoma; quindi il microprocessor complex si lega e taglia la forcina del pri-miRNA direttamente dall'ansa dell'introne, mentre gli esoni laterali e l'introne intermedio sono legati allo spliceosoma. Invece, circa 500 miRNA intronici umani, definiti mirtroni, sono processati mediante una pathway non canonica che è indipendente dagli enzimi Drosha e Pasha. In questo caso i pre-miRNA derivano direttamente dallo splicing intronico e dal debranching dei lariats intronici mediato dall'enzima DBR1 (Debranching RNA Lariats 1). I mirtroni sottoposti all'azione dell'enzima DBR1 sono analoghi ai pre-miRNA canonici e possono poi continuare la maturazione venendo trasportati nel citosol dal sistema esportina-5/RAN<sup>145</sup>.

Alcuni mirtroni contengono code estese all'estremità 5' o 3', che richiedono quindi una rifinitura esonucleolitica per diventare un substrato per l'esportazione nucleare<sup>146</sup>.

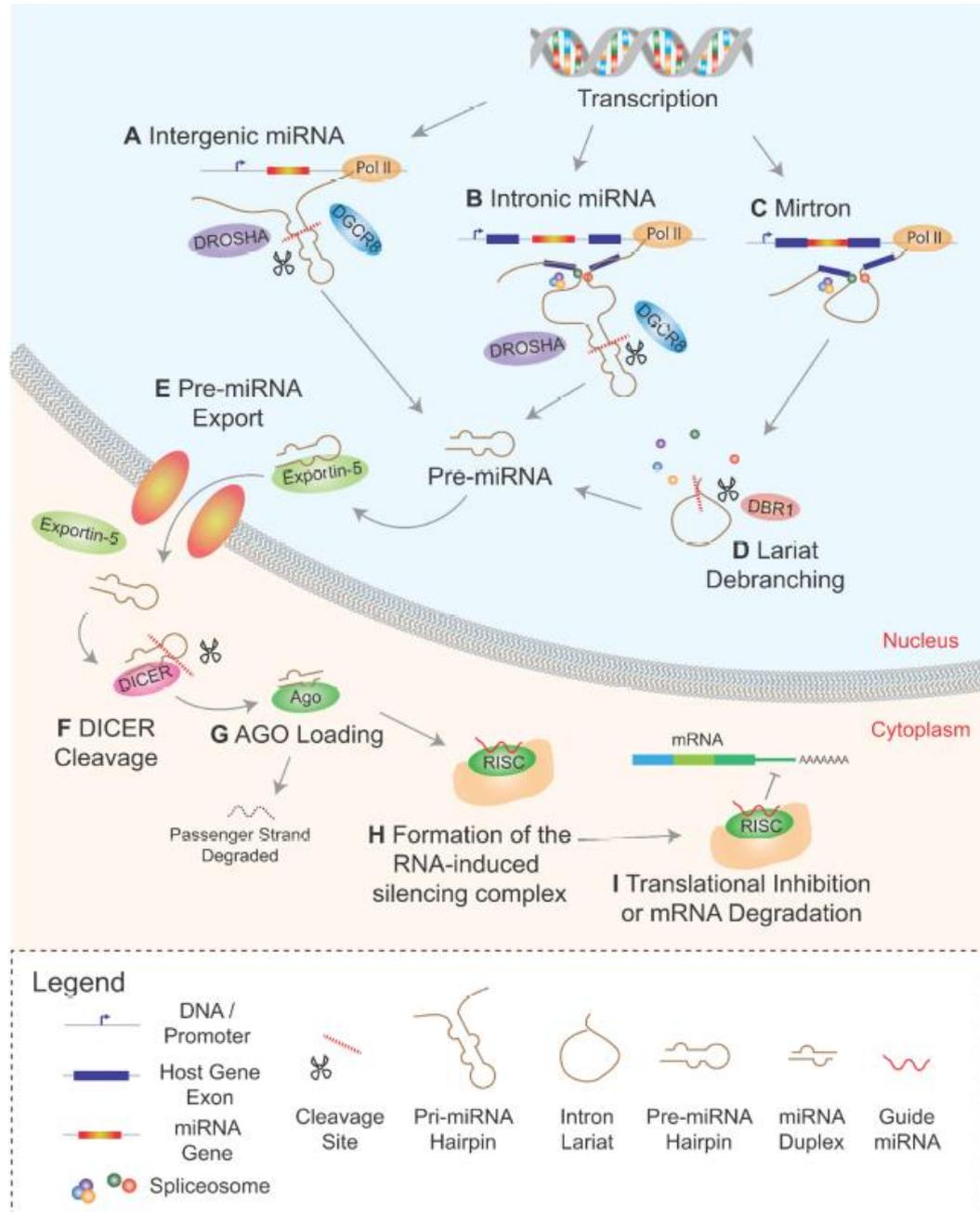


Figura 6. Panoramica sulla biogenesi dei microRNA. Wong et al., Biomedicines (2021)

### 1.3.2 MECCANISMI DI FUNZIONAMENTO

La specificità di riconoscimento tra miRNA e mRNA avviene tramite l'appaiamento tra la sequenza di nucleotidi 2-8 dell'estremità 5' del miRNA, denominata "*seed sequence*", e la regione 3'UTR del mRNA. Recenti studi, tuttavia, hanno dimostrato che questo appaiamento non è strettamente necessario e la repressione dell'mRNA può avvenire anche tramite un duplex mRNA-miRNA senza seed, noti come "*seedless*"<sup>144</sup>.

Il silenziamento post-trascrizionale dell'mRNA target è dovuto ai componenti del complesso RISC attivato dall'appaiamento mRNA/miRNA. Componenti proteici chiave di questo complesso sono i membri della famiglia Argonata (Ago) che presentano domini proteici altamente conservati: 1) il dominio PAZ (Piwi Argonate Zwiller) all'estremità N-terminale che lega l'estremità 3' del miRNA maturo; 2) il dominio centrale MID che ancora l'estremità 5' del miRNA; 3) il dominio PIWI ritenuto responsabile della degradazione dell'mRNA bersaglio poiché presenta una conformazione simile ad una RNasi H (endoribonucleasi che taglia il filamento di RNA di un ibrido RNA/DNA). Invece il dominio PIWI di alcune proteine Ago taglia un filamento di RNA legato ad un piccolo RNA, ciò è chiamata *slicer activity*. Delle proteine Ago umane (Ago 1-4) solo una, Ago2, presenta questa specifica attività. Al di là dell'attività endonucleasica mediata dal dominio PIWI, le proteine Ago sono responsabili anche dei processi di repressione traduzionale e distruzione esonucleasica dell'mRNA target attraverso l'interazione con altre proteine<sup>146</sup>.

Il meccanismo di interferenza dei miRNA dipende dall'entità dell'appaiamento tra mRNA e miRNA stesso. Se è presente una complementarità perfetta tra miRNA e mRNA target, si ottiene un clivaggio endonucleolitico dell'mRNA, mediato da Ago2 con attività di slicer. Questo processo è stato osservato anche nei mammiferi ma avviene raramente in quanto quasi tutte le interazioni miRNA-mRNA presentano numerosi mismatch ed hanno quindi un appaiamento non perfetto. In questo caso viene promossa la repressione traduzionale piuttosto che il clivaggio e la degradazione dell'mRNA<sup>144,147</sup>.

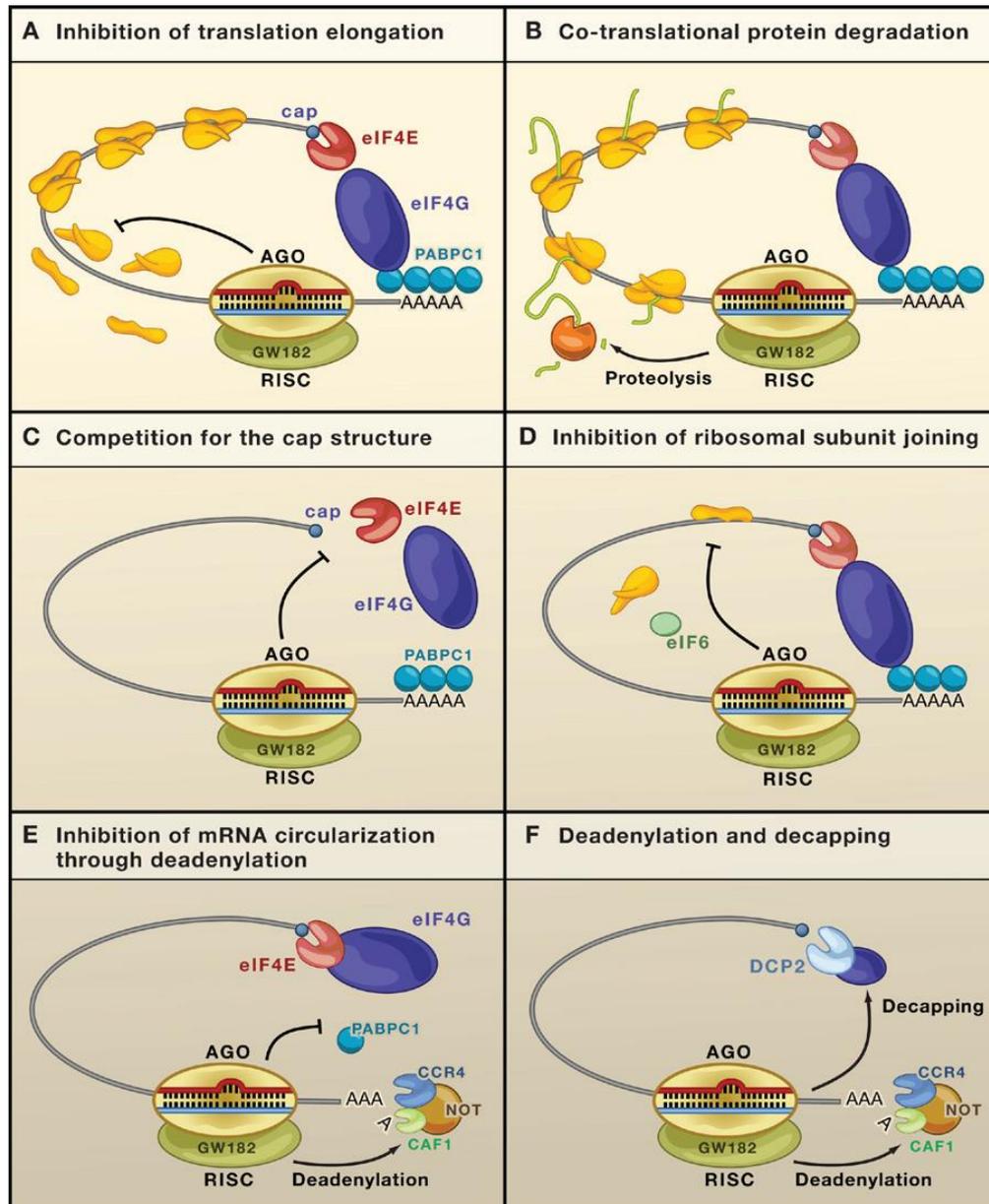


Figura 7. Modelli proposti per l'interferenza dei miRNA sul trascritto di mRNA. Eulalio et al. Cell 132 (2008)

I miRNA sono in grado di promuovere attraverso diversi meccanismi, schematizzati nelle sovrastante Figura 7, la repressione traduzionale <sup>148</sup>:

- A) repressione della traduzione durante la fase di allungamento: il complesso RISC, costituito principalmente dalle proteine Ago e da GW182, inibisce la traduzione dell'mRNA target bloccando la tappa di elongazione o promuovendo il distacco prematuro dei ribosomi (*ribosome drop-off*);
- B) degradazione co-traduzionale delle proteine: in questo caso il processo di traduzione non è inibito ma la catena polipeptidica nascente viene

degradata co-traduzionalmente. La proteasi coinvolta non è stata identificata;

- C) competizione per il riconoscimento del capping (inibizione dell'inizio della traduzione): il dominio centrale di Ago-2 ha elevata analogia con il fattore di inizio della traduzione eIF4E, e quindi compete con esso nel legame al cap di 7-metilguanosina;
- D) inibizione del legame tra le subunità ribosomiali (inibizione dell'inizio della traduzione): le proteine Argonata reclutano il fattore di inizio eucariotico umano 6, eIF6, e in questo modo la subunità ribosomiale 60S non è in grado di legarsi correttamente alla subunità ribosomiale 40S;
- E) inibizione della forma ad anello dell'mRNA: il complesso RISC è in grado di reclutare fattori per la deadenilazione della coda di poli-A in 3' come CCR4-NOT e CAF1 impedendo quindi la formazione di un loop chiuso del mRNA che determinerebbe l'insuccesso della traduzione e una sua maggiore efficienza;
- F) *Decapping* e deadenilazione: oltre ai fattori della deadenilazione, il complesso RISC può reclutare l'enzima di *decapping* DCP2 e suoi coattivatori che rimuovono il cappuccio di 7-metilguanosina in 5'. In questo modo l'mRNA è totalmente destabilizzato e non può essere tradotto. Questo peculiare processo è denominato decadimento dell'mRNA miRNA-mediato.

È stato visto che il tipo di meccanismo utilizzato dipende dall'mRNA target e non dal miRNA, perché uno stesso miRNA può indurre sia una repressione traduzionale che un decadimento dell'mRNA miRNA-mediato. Studi successivi hanno scoperto che l'adozione di un meccanismo o dell'altro dipende dalla struttura del duplex mRNA-miRNA, nello specifico dal numero, tipo e posizione dei mismatch<sup>148</sup>.

I microRNA possono anche spegnere i loro bersagli sequestrando l'mRNA in piccoli complessi citoplasmatici separati, i corpi di "rielaborazione" del mRNA o i *P-bodies* (conosciuti anche come *GW-bodies*). I *P-bodies*, piccoli domini citoplasmatici sferoidi proteici e dinamici, contengono ribonucleoproteine (RNP) e miRNA che sono entrambi coinvolti nei processi di repressione traduzionale e decadimento del mRNA. Le proteine Argonata, GW182 (glycine-tryptophan repeat-containing

protein di 182 kDa che è il maggiore componente proteico dei *P-bodies*), il complesso di deadenilazione CAF1-CCR4-NOT, l'enzima di decapping DCP2 e i suoi attivatori, sono presenti nei *P-bodies* con lo scopo di coadiuvare la funzione dei miRNA e la regolazione della sopravvivenza dell'mRNA. Tuttavia, sebbene i *P-bodies* contengano diverse proteine cruciali per il silenziamento miRNA-mediato, questi corpi citoplasmatici non sono richiesti per il funzionamento dei miRNA, rappresentando un effetto dell'attività dei miRNA in una cellula piuttosto che la causa della loro azione<sup>148,149</sup>.

In ultima analisi, i *P-bodies* sono considerati sia come dei siti di degradazione di mRNA (in maniera miRNA-mediata) sia come centri di stoccaggio dello stesso mRNA, soprattutto in condizioni di stress<sup>150</sup>.

### **1.3.3 FUNZIONI BIOLOGICHE**

Il ruolo fisiologico dei miRNA è stato messo in evidenza nei modelli di topi knock-out per due enzimi fondamentali nella biogenesi dei miRNA: Dicer e DGCR8. L'assenza di entrambe queste due proteine porta a letalità embrionale.

Studiare la funzione di un singolo miRNA è più complesso in quanto non sono richiesti singoli miRNA per garantire lo sviluppo di un tessuto. A titolo d'esempio un topo knockout per un determinato miRNA cardiaco, miR-208, sviluppa ancora il cuore. Tuttavia la deficienza del miR-208 porta a difetti nella risposta allo stress emodinamico e successivamente a ipertrofia cardiaca. Quindi, i miRNA sono fondamentali per mantenere lo stato di differenziazione dei tessuti nonché la loro stessa omeostasi; infatti molti miRNA tessuto specifici sono ridotti in diverse malattie incluso il cancro.

Attraverso studi di iperespressione in topi transgenici, si è scoperto che i miRNA sono coinvolti in diversi aspetti della funzione neuronale come il rimodellamento nello sviluppo neurologico, lo sviluppo della memoria dipendente dall'amigdala, la maturazione delle fibre dendritiche e la sopravvivenza delle cellule neuronali post-mitotiche. Inoltre, i miRNA regolano la funzione di molte cellule ematopoietiche come gli eritrociti, i megacariociti, i neutrofili e i linfociti<sup>151</sup>.

I miRNA svolgono un ruolo importante nella fisiologia del sistema immunitario, agendo sia sulla via innata che sulla via adattativa.

miR-21 e miR-196 possono bloccare *in vitro* la granulopoiesi, mentre il miR-155 può incrementare *in vivo* il numero dei granulociti immaturi. Oltre a regolare lo sviluppo dei granulociti, i miRNA possono modularne la funzione. miR-223 regola negativamente sia la proliferazione che l'attivazione dei neutrofili. Anche il sistema monocitico-macrofagico viene influenzato dai miRNA; infatti i livelli di miR-17-92 e miR-106-92 decrescono in maniera significativa nel processo di differenziazione della cellula staminale emopoietica (HSC) in monocita. Ciò porta ad un aumento del fattore di trascrizione RUNX1, noto come AML1, che a sua volta reprime i promotori dei suddetti miRNA per garantire la corretta differenziazione monocitaria<sup>152</sup>.

I macrofagi vengono guidati da miRNA anche nella fase effettrice che viene classicamente suddivisa in M<sub>φ</sub>1, macrofagi attivati classicamente che mediano potenti risposte antimicrobiche, e M<sub>φ</sub>2, macrofagi attivati alternativamente che sono implicati nei processi di riparazione tissutale. Un determinato insieme di fattori trascrizionali guida la polarizzazione verso l'una piuttosto che verso l'altra forma; questi fattori di trascrizione sono regolati da specifici miRNA. Tra questi, miR-21 gioca un ruolo chiave nella polarizzazione macrofagica: l'inibizione del miR-21 dirige il macrofago verso il profilo pro-infiammatorio M1, mentre livelli elevati di miR-21 nel macrofago, ad esempio indotti dall'efferocitosi (processo di fagocitosi di cellule apoptotiche e detriti cellulari), lo spingono verso il profilo pro-risolutore M2<sup>153</sup>.

L'ontogenesi dei linfociti T nel timo e la loro attivazione periferica sono controllate da un complesso network di proteine che sono soggette a regolazione da parte di miRNA. Il cluster miR-17-92 ostacola l'espressione degli mRNA che codificano per proteine pro-apoptotiche come BID e PTEN. Quindi questo cluster di miRNA si pensa che aumenti la sopravvivenza delle cellule T durante lo sviluppo e che sia espresso durante la fase di selezione doppio-negativa dei linfociti T nel timo. È stato dimostrato anche il coinvolgimento di alcuni miRNA nella differenziazione dei linfociti T: studi su topi *knockout* per miR-155 presentavano risposte

immunitarie T-mediate sempre sotto profilo T<sub>H</sub>2. Di contro il miR-155 è coinvolto nella differenziazione del linfocita T sotto profilo T<sub>H</sub>1. miR-326 promuove lo sviluppo dei linfociti T<sub>H</sub>17, identificati come importanti mediatori di patologie infiammatorie, sia in vitro che in vivo agendo su ETS1<sup>152</sup>.

Per quanto riguarda le cellule B, la loro differenziazione è sotto il controllo di miR-150, un miRNA espresso nei linfociti maturi, che regola l'espressione di c-Myc, un fattore di trascrizione coinvolto in molteplici fasi dello sviluppo dei linfociti<sup>154</sup>.

#### **1.3.4 microRNA NELLE PATOLOGIE UMANE**

È stato dimostrato che i microRNA controllano diversi processi fisiologici quali il metabolismo, l'apoptosi, la proliferazione cellulare, la divisione delle cellule staminali, la differenziazione muscolare e la morfogenesi del cervello, quindi non sorprende che le aberrazioni nella loro espressione sono correlate ad una varietà di patologie che vanno dai tumori alle malattie autoimmuni<sup>155</sup>.

I miRNA sono regolatori cruciali sia dello sviluppo cardiovascolare che dell'angiogenesi e spesso sono espressi in maniera aberrante in patologie a carico di cuore e vasi sanguigni. Cambiamenti del profilo di espressione di specifici miRNA sono associati, infatti, a rimodellamento cardiaco, ad aritmie, ai processi di aterosclerosi ed angiogenesi, oltre che ad ischemia da danno da riperfusione. Diversi miRNA sono implicati nella fibrosi cardiaca, compresi miR-21, miR-29, miR-30, miR-133 e miR-590. miR-21 è poco espresso nel cuore sano ma è fortemente overespresso nelle aree infatuate infarcite di fibroblasti; miR-21 regola sprouty-1, un inibitore endogeno della via delle MAP-chinasi. L'azione di miR-21, inibendo sprouty-1, si riflette in una maggiore sopravvivenza dei fibroblasti che esita nella fibrosi cardiaca<sup>156</sup>.

Diversi miRNA quali miR-29, miR-192 e miR-200a/b/c sono implicati nella nefropatia diabetica (DN), la principale complicanza microvascolare del diabete che conduce a insufficienza renale cronica (IRC). I livelli di miR-29 sono ridotti nella DN e questo causa la perdita diretta dell'inibizione dell'espressione del collagene, mentre i livelli degli altri due miRNA, miR-192 e miR-200 b/c, sono aumentati. Il

loro incremento porta a un aumento dell'inibizione dei repressori trascrizionali ZEB1/2, che inibiscono la produzione di collagene nelle cellule mesangiali del rene. L'inibizione di miR-192 aumenta *in vivo* l'espressione di ZEB1/2, che riducono l'espressione dei marcatori di fibrosi (TGF- $\beta$ , collagene, fibronectina) e diminuiscono l'ispessimento della membrana basale glomerulare<sup>157</sup>.

### **miRNA E CANCRO**

Un numero sostanziale di geni microRNA si trova in regioni del genoma che vengono spesso amplificate, delete o riarrangiate nel cancro, stabilendo così un ruolo dei microRNA nella patogenesi del cancro. L'espressione di microRNA deregolati è stata documentata in diversi tipi di cancro, tra cui il linfoma, il cancro del colon-retto, il cancro del polmone, il cancro al seno e il glioblastoma, ed è stato dimostrato che specifici microRNA hanno come bersaglio geni che sono regolatori critici per lo sviluppo del cancro, tra cui E2F e RAS<sup>158</sup>.

I miRNA possono comportarsi da oncosoppressori o da oncogeni, in dipendenza del mRNA bersaglio a cui si legano: possono ridurre l'espressione di geni oncosoppressori, comportandosi come oncogeni (onco-miRNA) o agire su trascritti mRNA oncogenici, comportandosi come oncosoppressori.

La prima evidenza del coinvolgimento dei miRNA nelle neoplasie risale alla scoperta di delezioni o traslocazioni riguardanti due miRNA, miR-15a e miR-16-1, la cui down-regolazione è stata individuata in circa il 65% dei pazienti affetti da leucemia linfocitica cronica (LLC). Questi miRNA regolano negativamente l'espressione di Bcl-2, proteina anti-apoptotica, che permette la sopravvivenza dei linfociti B. Quando questi miRNA sono deleti, la proteina Bcl-2 viene overespressa, guidando la trasformazione neoplastica<sup>159</sup>.

miR-200, che bersaglia ZEB1 e CNNB1, inibisce la crescita cellulare, la migrazione e l'invasione nel carcinoma nasofaringeo. Nel carcinoma pancreatico così come in quello mammario, miR-200, agendo su BM1, inibisce il processo di metastatizzazione<sup>160</sup>.

La famiglia di miRNA let-7 regola negativamente RAS, uno dei più importanti oncogeni mutato nel 15-30% dei tumori umani. La regione 3'UTR del gene RAS

contiene diverse regioni che permettono a let-7 di legarsi, regolandone la traduzione. L'espressione di let-7 è più bassa nei tumori polmonari rispetto al tessuto polmonare sano, e parallelamente la proteina Ras è significativamente più espressa nei tumori polmonari<sup>161</sup>. Quindi i miRNA codificati dalla famiglia let-7, implicati come geni oncosoppressori (TSG), mappano in siti fragili del genoma e sono associati al cancro polmonare, mammario, uroteliale e cervicale<sup>162</sup>.

La famiglia di miR-34, composta da miR-34a e miR-34b/c, viene attivata trascrizionalmente da p53, tra i più importanti oncosoppressori e mutato assai spesso in differenti neoplasie. È stato riscontrato che il miR-34 up-regolato inibisce la crescita del cancro inattivando i geni *NOTCH*, *c-MET* e *BCL2* coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e nell'apoptosi, mentre la sua perdita determina resistenza ai chemioterapici da parte delle cellule tumorali<sup>163</sup>.

Diminuiti livelli di espressione di miR-143 e miR-145 sono stati fortemente associati al cancro del colon-retto (CCR). miR-143 ha come target K-Ras e la DNA metiltransferasi 3A. Nel cancro della mammella, la perdita di miR-145 si traduce in un aumento della proteina Rhotekin (RTKN), proteina scaffold che interagisce col sistema Rho-GTP, che esita nella proliferazione cellulare<sup>144</sup>.

Il cluster miR-17/92 è il più attivo cluster di miRNA oncogeni che gioca un ruolo chiave nella progressione neoplastica. Nel cancro mammario, bersaglia HBP1 e regola l'invasione neoplastica attivando il pathway WNT/ $\beta$ -catenina<sup>160</sup>. miR-17-5p, membro del cluster miR-17/92, è fortemente up-regolato nell'adenocarcinoma pancreatico e bersaglia la proteina RBL2 (retinoblastoma-like protein 2), importante oncosoppressore<sup>142</sup>.

Altri miRNA oncogeni sono miR-222 e miR-221 che regolano p27, proteina che lega le cicline e le CDK bloccando l'ingresso in fase S del ciclo cellulare, stimolando la proliferazione cellulare nel glioblastoma<sup>160</sup>.

miR-155 è over-espresso nel cancro al polmone, nel cancro mammario, nella leucemia mieloide acuta, nella LLC, nel linfoma di Burkitt e di Hodgkin. Esso agisce su *HGAL*, *FOXO3A*, *SOCS1*, *JMJD1A* in diverse neoplasie contribuendo alla progressione tumorale e alla resistenza ai chemioterapici<sup>160</sup>. A titolo d'esempio,

miR-155 agisce nel cancro mammario come oncogene agendo sulla proteina VHL (Von-Hippel Lindau), oncosoppressore; in tal modo viene up-regolato il fattore di trascrizione HIF (Hypoxia Inducing Factors) rendendo possibile la neoangiogenesi<sup>163</sup>.

Anche le proteine Argonauta sono state associate al cancro; tre geni umani Argonauta – AGO3, AGO1, AGO4 situati sul cromosoma 1 – sono frequentemente deleti nel tumore di Wilms del rene e sono anche associati a tumori neuroectodermici<sup>162</sup>.

Gli studi sempre più recenti puntano ad identificare lo specifico gruppo di microRNA che sono up- e down-regolati anche nei vari sottotipi di una neoplasia. Ne costituisce un esempio il carcinoma mammario con i suoi sottotipi molecolari che presentano anch'essi uno specifico profilo di espressione di miRNA. Più precisamente, let-7c, miR-10a, and let-7f sono associati al cancro mammario di tipo luminale A; miR-18a, miR-135b, miR-93 e miR-155 sono associati al tipo basale; per i miR-142-3p e miR-150 è stata dimostrata un'associazione con il tipo HER2-positivo<sup>160</sup>.

Questa recente frontiera della ricerca si pone come obiettivo, oltre all'identificazione di nuovi meccanismi fisiopatologici della biologia del cancro, di utilizzare tali microRNA come marker precoci di neoplasia. Già dal 2008 sono stati identificati miRNA circolanti nel plasma sanguigno; per giunta questi miRNA plasmatici sono risultati stabili anche in condizioni avverse (pH alto o basso, cicli di congelamento e scongelamento e conservazione a lungo termine a temperatura ambiente). Recentemente, è stato osservato che i miRNA plasmatici possono essere impacchettati e veicolati negli esosomi, nelle microvescicole e nei corpi apoptotici, ma anche associati alle proteine Argonauta (Ago2) o al complesso delle lipoproteine HDL dove vengono protette dalla loro degradazione mediata dalle RNasi. I microRNA circolanti presentano quindi delle caratteristiche interessanti per essere biomarcatori ideali. miRNA stabili sono stati riscontrati in vari fluidi biologici come plasma, siero, saliva, liquido cefalorachidiano<sup>155</sup>.

Si riportano alcuni esempi di miRNA la cui espressione è significativamente alterata in diverse neoplasie, spesso precocemente. Alti livelli sierici di miR-21 sono associati con la diagnosi e la prognosi di pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL), mentre nella leucemia mieloide acuta (AML) miR-150 e miR-342 sono iper-espressi e potrebbero essere dei buoni marcatori per questo tipo di tumore. Il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) potrebbe essere diagnosticato precocemente usando i miRNA, miR-25 e miR-223, che aumentano significativamente nel siero. Diversi miRNA risultano alterati nel cancro coloretale (CRC); per una diagnosi precoce si può usare una combinazione di sette miRNA esosomiali (let-7a, miR-23a, miR-21, miR-150, miR223 e miR-1229), poiché questi miRNA sono molto aumentati rispetto agli individui sani. Nella saliva di pazienti con carcinoma a cellule squamose orale, sono stati trovati bassi livelli di due miRNA, miR-125a e miR-200a. Inoltre due miRNA, miR-125b e miR-126, presenti nelle urine sono indicati come biomarcatori altamente sensibili (80%), specifici (100%), e non invasivi per la diagnosi e la prognosi del cancro della vescica<sup>155</sup>.

### **1.3.5 microRNA NELLE MALATTIE AUTOIMMUNI**

Una delle proprietà fondamentali del sistema immunitario è la capacità di discriminare gli antigeni autologhi (self) e di non montare una risposta immunitaria nei loro confronti; questa proprietà è definita tolleranza immunologica.

La tolleranza può essere centrale quando si sviluppa nel corso dell'ontogenesi linfocitaria a livello degli organi linfoidi centrali (midollo osseo e timo), oppure periferica, meccanismo di tolleranza verso antigeni self tessuto-specifici non presenti a livello timico o midollare che avviene attraverso l'anergia clonale o la soppressione dei linfociti autoreattivi<sup>164</sup>.

Le malattie autoimmunitarie, come il lupus eritematoso sistemico (LES), l'artrite reumatoide (AR), il diabete mellito tipo 1 (DM1) e la sclerosi multipla (SM), colpiscono circa il 5% della popolazione mondiale, hanno una eziologia multifattoriale data dalla combinazione di fattori genetici, epigenetici e ambientali, e sono caratterizzate da una perdita della tolleranza immunologica<sup>165</sup>.

Diverse popolazioni di cellule immunitarie e relative pathways molecolari sono alla base dei meccanismi di tolleranza. Tutti questi meccanismi dipendono da risposte regolabili, sensibili a piccole variazioni nell'espressione di proteine chiave. In particolare, le vie di segnale a valle dei recettori per l'antigene, come le vie di PI3K (fosfatidil-inositolo-3-chinasi) e NF- $\kappa$ B, possono essere regolate da parte dei microRNA<sup>166</sup>.

La regolazione della tolleranza centrale da parte dei microRNA riguarda sia i linfociti T che i linfociti B. Per il comparto B, il ruolo maggiore è svolto dal cluster miR-17~92, composto da 6 miRNA appartenenti a quattro famiglie: miR-17, miR-18, miR-19 e miR-92. Questo cluster promuove la sopravvivenza dei linfociti B in via di sviluppo grazie alla regolazione della via di segnale di PI3K. BIM, proteina pro-apoptica e indotta dal signaling di PI3K, è un target diretto del suddetto cluster così come PTEN, importante regolatore negativo della via di PI3K.

Quando - nel corso dell'ontogenesi dei linfociti B - miR-17~92 è deletato, l'espressione di BIM e PTEN è aumentata e le cellule B vanno incontro ad apoptosi, risultando in una deficienza del comparto B. Al contrario, l'over-espressione di miR-17~92, incrementa la sopravvivenza e promuove fenomeni di autoimmunità<sup>166</sup>.

La tolleranza centrale dei linfociti T è affidata alla fase di selezione negativa delle cellule T in maturazione nel timo. Il miR-181 stabilisce una soglia per la forza del segnale del TCR durante lo sviluppo delle cellule T. L'espressione del miR-181 diminuisce progressivamente quando i timociti si differenziano da doppio negativi (DN) a doppio positivi (DP) a singoli positivi (SP). Nello specifico, l'azione del miR-181 conferisce una maggiore sensibilità alla stimolazione del TCR modulando diverse fosfatasi bersaglio come PTPN22 o SHP2. Quindi la presenza del miR-181 timico è cruciale per l'eliminazione dei timociti autoreattivi che rispondono a un ligando *self*<sup>166</sup>.

Diversi microRNA sono stati riconosciuti come regolatori cruciali della reazione del centro germinativo (CG), tappa fondamentale dell'attivazione dei linfociti B. L'espressione intrinseca di miR-155 nelle cellule B è richiesta per una ottimale reazione del CG e per la produzione di anticorpi; questo microRNA agisce

promuovendo la sopravvivenza dei linfociti B. Inoltre la delezione di questo miRNA si traduce, oltre che in una inefficace reazione del CG, anche in una riduzione delle cellule T helper follicolari ( $T_{Hf}$ ). Al contrario, i miR-146a e miR-146b stati identificati come regolatori negativi della reazione del CG<sup>167</sup>.

Tra i meccanismi di tolleranza periferica, un ruolo è svolto anche dalle cellule T regolatorie ( $T_{reg}$ ) che prendono parte alla soppressione delle risposte immunitarie durante condizioni patologiche come i disturbi autoimmuni e rigetto del trapianto. Le  $T_{reg}$  sono cellule T  $CD4^+$ ,  $CD25^+$  (recettore per l'interleuchina-2 che lega in modo competitivo l'IL-2, fondamentale per l'attivazione del linfocita  $T_H$ ) e caratterizzate dall'espressione del fattore di trascrizione Foxp3. Ne esistono di due tipi,  $T_{reg}$  naturali, che originano direttamente dal timo e presentano funzione stabile in periferia, e  $T_{reg}$  inducibili, sviluppate in periferia da cellule T naïve a seguito di specifici stimoli antigenici. Diversi microRNA prendono parte alla biogenesi e al funzionamento della cellula  $T_{reg}$ , come miR-155 che regola lo sviluppo dei suddetti linfociti. Questo microRNA agisce direttamente sull'mRNA di SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1) che regola negativamente il segnale del recettore di IL-2 e la via di signaling a valle mediata da STAT5 che culmina con Foxp3.  $T_{reg}$  inoltre over-esprimono miR-126 che modula la pathway PI3K/Akt, di importanza vitale per l'espressione di Foxp3. Un altro microRNA importante è miR-142-3p; Foxp3, infatti, down-regola l'espressione di questo miRNA e ciò risulta nell'attivazione dell'adenilato ciclasi e nell'aumento di AMP ciclico, i cui livelli elevati sono importanti per l'attività soppressoria del  $T_{reg}$ <sup>168</sup>.

### **microRNA E SCLEROSI MULTIPLA**

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune caratterizzata da una demielinizzazione flogistica immuno-mediata del sistema nervoso centrale; è la principale causa di disabilità neurologica non traumatica nei giovani.

È stato osservato che l'espressione di miR-15a e miR-16-1 è ridotta nelle cellule mononucleate dal sangue periferico (PBMC), soprattutto nei linfociti T  $CD4^+$ , nei pazienti con sclerosi multipla remittente-ricidivante (RR-SM). Vista l'azione che questi esercitano su Bcl-2, la riduzione dei miR-15a e miR-16-1 concorre alla patogenesi della SM in quanto è inibita l'apoptosi delle cellule immunitarie<sup>169</sup>.

Al contrario è stato dimostrato che l'espressione di miR-340 nelle cellule T CD4<sup>+</sup> della memoria è aumentata nei pazienti con SM. La disfunzione di miR-340 ha inibito la via cellulare T<sub>H</sub>2, promuovendo invece lo sviluppo delle risposte immunitarie cellulo-mediate sotto profilo T<sub>H</sub>1, principale responsabile del danno alla mielina<sup>170</sup>.

Anche miR-155, indotto trascrizionalmente da NF-κB, è up-regolato in diversi stati immunopatologici, come la SM agendo sia sui linfociti T che sulle cellule della barriera emato-encefalica (BEE). miR-155 agisce sulla proteina regolatoria CD47 che viene down-regolata, innescando così il processo di fagocitosi della mielina mediata dai macrofagi. Inoltre, questo miRNA promuove la differenziazione dei linfociti T in senso T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>17, determinanti nel mantenimento del circuito flogistico. Anche nella microglia e negli astrociti, l'espressione di miR-155 è aumentata e questo si traduce, rispettivamente, in una maggiore secrezione di fattori infiammatori e in una più intensa fagocitosi della mielina<sup>171</sup>.

Altre evidenze, hanno dimostrato che il miR-146a nelle cellule endoteliali cerebrali inibisce l'attivazione del fattore NF-κB regolando negativamente l'adesione dei linfociti T alle pareti vasali cerebrali<sup>172</sup>. Infatti, l'espressione di questo miRNA è fortemente down-regolata nella SM. Pertanto, sovra-regolare l'espressione endogena di miR-146a può essere una strategia terapeutica promettente per la SM<sup>171</sup>.

Nella SM, le cellule T<sub>reg</sub> sono ridotte e disfunzionali. È stata proposta una spiegazione di questo fenomeno che potrebbe risiedere nell'azione di esosomi circolanti nei pazienti affetti da SM che inibiscono lo sviluppo e l'azione dei linfociti T<sub>reg</sub>. Tra i miRNA esosomiali spicca *let-7i*, notevolmente aumentato nei pazienti con SM, che sembra sopprimere l'induzione delle cellule T<sub>reg</sub> agendo sul recettore per il fattore di crescita insulino-simile (IGF1R) e su quello per TGFβ (TGFB1)<sup>173</sup>.

Per quanto riguarda l'utilizzo dei microRNA come biomarcatore nella SM, uno studio che includeva 4 coorti osservazionali ha dimostrato che 5 miRNA (hsa-miR-484, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-320a, hsa-miR-486-5p e hsa-miR-320c) presentano una differenza significativa tra pazienti con SM e individui sani<sup>174</sup>. È ancora più

interessante notare che ogni fenotipo di SM descrivibile con immagini di risonanza magnetica (MRI) è caratterizzato da una firma molecolare di miRNA; in particolare, miR-22-3p, miR-361-5p e miR-345-5p erano i differenziatori più validi dei fenotipi MRI<sup>175</sup>.

La SM è una malattia il cui decorso è ancora altamente imprevedibile. I microRNA esosomiali potrebbero fornire un valido supporto per questo scopo. *Ebrahimkhani et al.*<sup>176</sup> hanno identificato nove miRNA esosomiali (miR-15b-5p, miR-23a-3p, miR-30b-5p, miR-223-3p, miR-374a-5p, miR-342-3p, miR-432-5p, miR-433-3p e miR-485-3p) che potrebbero distinguere la SM recidivante-remittente dalla SM progressiva prevedendo il sottotipo di malattia con un alto grado di accuratezza<sup>176</sup>.

### **microRNA E ARTRITE REUMATOIDE**

L'artrite reumatoide (AR) è una malattia infiammatoria cronica di origine autoimmunitaria che colpisce le articolazioni diartroidali, in associazione a diverse manifestazioni extra-articolari; se non trattata porta a deformità muscolo-scheletriche fino all'anchilosi articolare e si associa ad elevata morbilità.

L'alterata espressione dei microRNA è stata associata a numerosi pathways infiammatori attraverso un aumentato rilascio di citochine pro-infiammatorie e altri processi responsabili del mantenimento del circolo vizioso autoimmunitario<sup>177</sup>.

Nei PBMC dei pazienti con AR si è stata riportata un'importante disregolazione di numerosi miRNA: miR-16, miR-103a, miR-132, miR-145, miR-146a, miR-155, miR-221, miR-222 e miR-301a sono stati trovati up-regolati, mentre miR-21, miR-125b e miR-548a sono down-regolati. Queste alterazioni si traducono nell'aumento della secrezione di citochine pro-infiammatorie e nella disregolazione della funzione di linfociti T<sub>H</sub>17 e T<sub>reg</sub>, a titolo d'esempio miR-146a è aumentato nelle cellule T<sub>H</sub>17 mentre è diminuito nelle cellule T<sub>reg</sub><sup>177</sup>.

miR-18, microRNA del cluster miR-17~92, regolatore di NF-κB cruciale nell'AR, è up-regolato nei pazienti con AR. miR-18a esacerba l'infiammazione e la distruzione delle articolazioni agendo su TNFAIP-3, regolatore negativo del signaling di NF-κB.

Inoltre miR-18a aumenta l'espressione di diversi mediatori come IL-6, IL-8 e MMP-1 (Matrix MetalloProteinases)<sup>178</sup>.

Tra le citochine centrali nel processo di infiammazione della sinovia c'è TNF- $\alpha$ , verso la quale sono diretti i farmaci biologici che hanno modificato la storia di malattia dei pazienti con AR. È stato osservato che molti miRNA regolano significativamente il livello di espressione di TNF- $\alpha$  durante RA. L'espressione di miR-146a è notevolmente aumentata nel tessuto sinoviale dell'AR e lo stesso vale per miR-155 che agisce sopprimendo SOCS1 e aumentando i livelli di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ <sup>179,180</sup>.

Anche l'IL-17, citochina pro-infiammatoria, è importante nella patogenesi dell'AR. Hanno scoperto che sei miRNA (cioè let-7a, miR-26, miR-146a/b, miR-150 e miR-155) erano significativamente sovraespressi nelle cellule T che producono IL-17. Tra i sei miRNA, il miR-146a è anche altamente espresso nella sinovia iperplastica (pannus)<sup>179</sup>.

Una disregolazione dell'espressione dei microRNA è stata osservata anche nelle cellule della membrana sinoviale che concorrono attivamente al danno articolare. Si sono osservati cambiamenti nell'espressione dei miRNA nei sinoviociti simil-fibroblasti (FLS) dell'AR: l'ipermetilazione dei geni miR-124a e miR-34a nei FLS provoca una ridotta apoptosi degli stessi e una maggiore produzione di TNF- $\alpha$ . Nella sinovia infiammata, bassi livelli di miR-27a determinano una maggiore produzione di MMP che degradano la matrice cartilaginea e consentono ai FLS di invadere la cartilagine. Inoltre bassi livelli di miR-30a nei tessuti sinoviali infiammati sono correlati ad una ridotta apoptosi e maggiore autofagia dei FLS e dei macrofagi sinoviali<sup>177</sup>.

Sono stati condotti anche studi sulle EVs dei pazienti affetti da AR. Le EVs provenienti da PBMC e da cellule nucleate del liquido sinoviale veicolano il recettore di PD-1 e miRNA con funzione inibitoria verso le cellule T. Questo potrebbe essere un meccanismo protettivo contro l'infiammazione nell'AR o potrebbe essere correlato all'esaurimento dei linfociti T<sup>181</sup>.

Per quanto riguarda la diagnosi di AR, è ormai noto che gli anticorpi anti-peptidi citrullinati (ACPA) caratterizzano lo stadio pre-clinico dell'AR e possono precedere di diversi anni i primi sintomi di malattia. Confrontando l'espressione di miRNA nel siero dei pazienti già in fase pre-clinica con i pazienti sani, si osserva una "firma" diversa: in particolare i livelli di miR-22 e miR-103a sono significativamente più alti sia nei pazienti con AR che in quelli in fase pre-clinica. Perciò questi microRNA potrebbero essere utilizzati per predire lo sviluppo di AR in individui con ACPA positivi<sup>177</sup>.

L'uso dei miRNA come biomarcatori ha evidenziato che miR-24, miR-125a, miR-155 e miR-146a<sup>182</sup>, con una maggiore significatività statistica, sono aumenti nel sangue periferico; ciò potrebbe essere utilizzato per diagnosticare l'AR. Gli studi futuri devono concentrarsi su come i livelli sierici di miRNA potrebbero aiutare nella diagnosi differenziale tra RA e altre artriti<sup>177</sup>.

I microRNA, nell'AR, sono stati anche studiati come potenziali predittori della risposta al trattamento. Elevati livelli sierici pre-terapia di miR-16, miR-125b e miR-223 nei pazienti con AR sono stati associati a una migliore risposta alla terapia con DMARD (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs) non biologici, principalmente metotrexato (MTX)<sup>177</sup>. Diversi studi hanno esaminato la relazione tra i livelli sierici di miRNA e la risposta ai DMARD biologici, sia agli inibitori del TNF (anti-TNF) che ad altri. L'aumento pre-terapia dei livelli sierici di miR-886 combinato con bassi livelli di miR-22 era altamente predittivo della risposta al trattamento con adalimumab (ADA) dopo dodici mesi<sup>183</sup>.

Infine, è giusto porre l'attenzione su una possibile implicazione dei miRNA nel trattamento dell'AR. Visto il ruolo cruciale di miR-146a e miR-155 nel regolare la cascata di segnale pro-infiammatoria nell'AR, principalmente attraverso TNF- $\alpha$ , potrebbero diventare degli eccellenti bersagli terapeutici nell'AR<sup>179</sup>.

## **microRNA E LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO**

Il lupus eritematoso sistemico (LES) è una malattia infiammatoria, cronica, ad eziologia multifattoriale e patogenesi autoimmune caratterizzata dalla produzione di una vasta gamma di autoanticorpi; può interessare molteplici tessuti e organi con una grande variabilità clinica.

L'immunità innata, soprattutto attraverso le cellule dendritiche (DC), è la responsabile dell'avvio e della promozione dell'autoimmunità del LES e del danno d'organo. La presentazione inappropriata o disfunzionale dell'antigene da parte delle DC potrebbe promuovere la perdita della tolleranza dei linfociti T e B nel LES. Le DC nei pazienti con LES sono anomale e presentano una diminuzione del numero di DC mieloidi normali circolanti (mDC) ma un aumento del numero di DC plasmacitoidi (pDC) che è specializzato nella produzione di interferone di tipo I (IFN-I), riconosciuto come l'attore centrale nella patogenesi del LES, in risposta a RNA a filamento singolo e DNA CpG ipometilato, tramite TLR-7 e TLR-9. Queste caratteristiche uniche consentono ai pDC di svolgere un ruolo cruciale nella patogenesi del LES e hanno dimostrato di essere correlati alle manifestazioni della malattia, inclusi gli autoanticorpi anti-dsDNA caratteristici del LES. Studi recenti hanno descritto il coinvolgimento di let-7c, miR-155, miR-150 nella regolazione delle funzioni di pDC in risposta alla stimolazione dei TLR. Infatti, un aumento di let-7c, inibito trascrizionalmente da Blimp-1 (B-lymphocyte-induced maturation protein 1), si traduce in un fenotipo altamente pro-infiammatorio delle pDC<sup>184</sup>. miR-155 agisce su SOCS1 nei macrofagi e promuove una risposta infiammatoria mediata da IFN-I<sup>185</sup>.

Un recente studio<sup>185</sup> ha dimostrato il ruolo di miR-4512 nei pazienti affetti da LES. Questo miRNA ha come target diversi geni, principalmente *CXCL2* e *TLR4*, la cui espressione viene inibita in monociti e macrofagi. Nei PBMC dei pazienti con LES, l'espressione di miR-4512 è fortemente down-regolata e ciò risulta in una aumentata secrezione di citochine pro-infiammatorie ed espressione di CXCL2, i cui livelli elevati possono innescare il processo di NETosi neutrofilica, coinvolta in maniera aberrante nella patogenesi del LES. In definitiva, la soppressione di miR-4512 promuove la sovra-espressione di CXCL2 e TLR4 e l'asse molecolare CXCL2-

TLR4 attiva ulteriormente l'espressione di chemochine e citochine infiammatorie mediata da NF- $\kappa$ B, incluso CXCL2, che a sua volta promuove il reclutamento dei neutrofili nei siti infiammatori e formazione di NET (*Neutrophil extracellular traps*).

La disregolazione dell'immunità adattativa è altrettanto importante nel LES e riguarda sia i linfociti B che i linfociti T.

Studi sull'espressione aberrante di diversi miRNA nelle cellule B dei pazienti con LES hanno riportato che miR-7, miR-155 (il cui ruolo nella patogenesi del LES è controverso<sup>186</sup>), miR-30a e miR-15a erano up-regolati, mentre miR-1246 è down-regolato. miR-7, modulando negativamente PTEN, innesca la pathway PI3K/AKT promuovendo l'attivazione delle cellule B e la differenziazione in plasmacellule; miR-30a reprime LYN, che agisce negativamente sulla trasduzione del segnale di CD19 e CD180, ciò esita in una iperattivazione del linfocita B. Al contrario l'espressione di miR-1246 è stata correlata negativamente con l'attivazione dei linfociti B nei pazienti con LES, grazie all'azione negativa su EBF1 (Early B-cell Factor-1): la ridotta espressione di questo miRNA determina una up-regolazione di EBF1 che aumenta la produzione delle molecole co-stimolanti CD40, CD80 e CD86 migliorando la funzione delle cellule B<sup>184</sup>.

A proposito delle cellule T del LES, miR-126 e miR-148a sono stati trovati up-regolati ed entrambi agiscono sulla DNA metiltransferasi 1 (DNMT1). I pazienti con LES sembrerebbero infatti avere una ridotta espressione di DNMT1 con conseguente ipometilazione del DNA anormale nei linfociti T, importante tratto epigenetico nel LES. Oltre a questi, anche miR-21 e miR-29b agiscono sulla metilazione del DNA via DNMT1<sup>184,187</sup>. Tuttavia miR-21, tipicamente up-regolato nel LES, presenta importanti altre funzioni in quanto sopprime direttamente l'espressione di PDCD4 (Programmed Cell Death 4) portando ad un'aumentata produzione di IL-10 ed espressione di CD156 (CD40L) nelle cellule T CD4<sup>+</sup>. Ciò si traduce in una aumentata differenziazione plasmacellulare delle cellule B con produzione anticorpale in quanto sono potenziali i segnali di co-stimolazione B-T: CD40:CD154 e CD28:CD80/86<sup>187,188</sup>. L'up-regolazione di miR-21 svolge un ruolo nella polarizzazione delle cellule T sotto profilo T<sub>H</sub>17 a scapito della differenziazione in T<sub>reg</sub><sup>188</sup>. Studi recenti hanno evidenziato che l'espressione di

miR-142 è ridotta nei linfociti T CD4<sup>+</sup>; la ridotta espressione di miR-142 determina una up-regolazione di CD84 e IL-10/SAP, con conseguente aumento della funzione dei linfociti T e della produzione di IgG in cellule B, fortemente stimulate dalle cellule T.

Livelli elevati di IFN di tipo I, citochine prodotte da cellule dell'immunità innata, sono caratteristici della patogenesi del LES. È stato dimostrato che miR-146a riduce l'espressione di più diversi componenti della via di signaling dell'IFN-I (TRAF6, IRAK1, IFN-5, STAT1), attenuando così i numerosi effetti che tale citochina ha su tutte le cellule del sistema immunitario. Infatti, nel LES vi è una drastica riduzione del miR-146a e ciò contribuisce all'attivazione anomala della via dell'IFN-I. In aggiunta, l'attivazione della via IFN-I è stata notevolmente ridotta dopo l'introduzione di miR-146a nelle PBMC dei pazienti con LES. Questi risultati hanno suggerito che la regolazione esogena di miR-146a potrebbe essere una strategia terapeutica promettente per il LES<sup>184</sup>.

Analizzando il profilo di espressione sierico di miRNA tra pazienti affetti da LES e donatori sani, l'espressione di miR-371b-5p e miR-5100 è significativamente aumentata nel siero dei pazienti con LES rispetto ai controlli sani, e si è dimostrata essere più alta nei pazienti con malattia attiva rispetto a coloro con malattia inattiva<sup>189</sup>. Un altro studio ha valutato l'uso dei microRNA come biomarcatore della nefrite lupica (NL), una delle manifestazioni più devastanti nel LES che colpisce fino al 70% dei pazienti con LES. I livelli sierici di miR-130-3p sono aumentati nella fase iniziale della LN indipendentemente dai punteggi SLEDAI e sono associati a danno renale, proteinuria delle 24 ore e dell'indice di cronicità (CI) valutato su biopsia renale. miR-423 è associato alla transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) e alla fibrosi renale e livelli elevati di miR-423-5p sono stati dimostrati nei PBMC di pazienti con LN di diverse etnie. Allo stesso modo, miR-182-5p era particolarmente up-regolato nei pazienti con LN. È stata svolta inoltre una analisi sui microRNA presenti nelle urine. Durante la riacutizzazione attiva di LN, let-7a e miR-21 sono risultati down-regolati negli esosomi urinari. Il livello di miR-146a esosomiale urinario è risultato inversamente correlato ai livelli circolanti di complemento C3 e C4, alla proteinuria e anche all'CI della biopsia renale. Infine,

miR-221 e miR-222 nel sedimento urinario erano correlati negativamente con i livelli di anti-dsDNA nei pazienti con LN. Questi primi risultati indicano che i microRNA urinari sono biomarcatori promettenti per la diagnosi e la prognosi non invasiva di NL. Tuttavia è improbabile che un singolo miRNA urinario abbia un valore diagnostico sufficiente per essere di uso clinico. Quindi è necessario progettare e convalidare pannelli con più marker per una futura applicazione clinica<sup>188</sup>.

### **microRNA E SINDROME DI SJÖGREN**

La sindrome di Sjögren (SS) è una malattia autoimmune sistemica caratterizzata da una flogosi cronica a carico delle ghiandole a secrezione esocrina, prevalentemente salivari e lacrimali, con conseguente cheratocongiuntivite secca e xerostomia. Sono presenti anche manifestazioni cliniche extra-ghiandolari a carico di numerosi organi e apparati.

Ad oggi, gli studi che analizzano l'associazione tra microRNA e SS sia come biomarcatore che come attori nella fisiopatologia della SS sono limitati.

Diversi microRNA sono risultati alterati nelle ghiandole salivari colpite dal processo flogistico autoimmune, nelle cellule epiteliali derivate dalle ghiandole salivari stesse in coltura e nei PBMC dei pazienti affetti da SS. Le prime evidenze riguardano il cluster miR-17~92 che è risultato down-regolato nelle ghiandole salivari minori. miR-146a e miR-155 sono up-regolati in diversi tipi cellulari coinvolti nella risposta immunitaria aberrante sita nelle ghiandole salivari. miR-300, miR-609, miR-3162-3p e miR-4701-5p appaiono deregolati nei pazienti affetti da SS rispetto ai controlli sani: questi microRNA sono regolatori di diverse vie di segnale coinvolgenti JAK-STAT, importanti per la regolazione di citochine. Inoltre questi miRNA sembrano alterare le risposte di TGF- $\beta$  con funzione regolatoria nei monociti<sup>190</sup>.

miR-181a e miR-16, associati alla positività agli anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB, sono stati trovati nelle ghiandole salivari minori e sono risultati down-regolati nei pazienti con SS rispetto ai controlli sani. Una riduzione del miR-181a è

associata ad una aumentata sensibilità delle cellule T agli antigeni per una maggiore reattività per il *self* del TCR<sup>190</sup>.

Evidenze recenti hanno messo in luce che miR-200-5p potrebbe essere implicato nella linfomagenesi associata a SS primaria. Sono stati osservati bassi livelli di questo miRNA nei pazienti che stavano per sviluppare o avevano un linfoma non-Hodgkin; tale diminuzione era evidente molto prima dell'insorgenza clinica del linfoma. Si ipotizza quindi che miR-200-5p possa essere coinvolto nella patogenesi del linfoma infatti questo microRNA è un regolatore dell'oncogenesi e della metastatizzazione in quanto modula la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) attraverso la down-regolazione di ZEB-1<sup>191</sup>.

### **1.3.6 microRNA NELLE MIOPATIE INFIAMMATORIE IDIOPATICHE**

Negli ultimi anni, è stato dato un ruolo sempre più importante alle alterazioni epigenetiche nel contesto dell'eziopatogenesi di PM/DM.

Ad oggi, lo studio del ruolo dei miRNA - soprattutto degli EVs-miRNA - nelle MII è ancora limitato.

In questo studio<sup>192</sup>, i livelli di espressione e la funzione dei miRNA è stata studiata nel siero, nei PBMC, nel muscolo e nella cute dei pazienti affetti da PM/DM. Molti miRNA come miR-21, miR-206, miR-3907, miR-1, miR-133a/b, miR-146a, miR-221, miR-222 e miR-7 hanno mostrato un'espressione alterata nei pazienti con PM/DM, contribuendo potenzialmente alla patogenesi delle stesse. Sono stati inoltre identificati nuovi miRNA nel tessuto muscolare dei pazienti come miR-196a-5p, specificatamente down-regolato nella PM, e miR-193b-3p, miR-30d-5p, miR-30a-5p e miR-101-3p, down-regolati sia nella DM che nella PM. È stato osservato - analizzando i bersagli di questi microRNA - che miR-196a-5p agisce su CPM (proteina carbossipeptidasi M), che gioca un ruolo nel controllo del signaling di ormoni peptidici e fattori di crescita, nella migrazione e invasione delle cellule neoplastiche mentre miR-193b-3p agisce su NECAP2 che contribuisce al ricircolo rapido AP1-mediato degli endosomi precoci.

Il ruolo di miR-146a è stato analizzato nel contesto della patogenesi di PM/DM. Lo studio<sup>193</sup> ha valutato la funzione del miR-146a nel regolare l'infiltrato macrofagico e le vie di signaling coinvolte attraverso biopsie di tessuto muscolare di pazienti confrontate con controlli sani. miR-146a modula sia l'immunità innata che quella adattativa attraverso la regolazione negativa di TRAF6 (TNF- receptor-associated factor 6) e IRAK1 (IL-1 receptor-associated kinase 1), proteine importanti nel signaling pro-infiammatorio. L'interleuchina 17 è una potente citochina pro-infiammatoria che induce l'espressione di TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23, G-CSF; il suo ruolo è stato ormai confermato in diverse malattie autoimmuni come AR, SM, LES, asma. ICAM-1, conosciuta anche come CD54, è una molecola di adesione espressa su diversi tipi cellulari, fondamentale per la migrazione delle cellule immunitarie. Nella PM, è verosimile che la down-regolazione miR-146a, mediante l'aumento di TRAF6 e quindi del signaling di NF-kB, può up-regolare la via di IL-17/ICAM-1 aumentando l'infiltrato macrofagico nel tessuto muscolare, evento patogenetico importante nella polimiosite<sup>193</sup>.

Un altro lavoro<sup>194</sup> è stato condotto su miR-146a nel contesto della patogenesi di PM/DM. Si è visto che nei PBMC dei pazienti, l'espressione di miR-146a è marcatamente down-regolata mentre vi sono alti livelli di citochine pro-infiammatorie come IL-17 e IFN- $\gamma$  e di REG3A (Regenerating islet-derived protein 3-alpha), proteina con funzione antimicrobica e con effetto sulla riparazione dei tessuti, il cui livello di espressione si è dimostrato aumentato nel tessuto muscolare dei pazienti mediante immunocistochimica. miR-146a e REG3A, che viene regolato negativamente da tale microRNA, agiscono sulla migrazione dei macrofagi; l'IL-17 può aumentare l'espressione della proteina REG3A mediante il suo recettore (IL-17RA) presente sui macrofagi, e ciò si traduce in un'aumentata migrazione macrofagica. In definitiva, la down-regolazione del miR-146a determina, mediante REG3A, una maggiore infiltrazione dei macrofagi nel tessuto muscolare. Bisogna sottolineare che gli infiltrati infiammatori mediati dai macrofagi giocano un ruolo critico in diverse patologie muscolari in quanto i macrofagi sono cellule chiave nell'orchestrare e modulare i processi riparativi; inoltre quando questi infiltrati sono cronici portano ad una persistente distruzione

del tessuto muscolare da parte di cellule immunitarie o per deposizione di collagene.

Un recente studio eseguito da *Ye et al.*<sup>195</sup> ha valutato la funzione di miR-409-3p nella migrazione dei macrofagi nella PM. Questo microRNA sembra agire sul recettore delle chemochine CXCR4, altamente espresso in linfociti, monociti-macrofagi e neutrofili. Già nella DM è stato dimostrato che la pathway SDF-1 (CXCL12)/CXCR4 gioca un ruolo cruciale nella migrazione dei macrofagi. In questo studio, è stata osservata una down-regolazione di miR-409-3p nel siero dei pazienti affetti da PM. Poiché questo miRNA, riducendo l'espressione di CXCR4, comporta una ridotta migrazione dei macrofagi, la sua down-regolazione si traduce in maggiore infiltrazione dei macrofagi nel tessuto muscolare concorrendo alla patogenesi della malattia.

Ancora un altro studio sulla migrazione dei macrofagi nella patogenesi della PM è stato condotto da *Liu et al.*<sup>196</sup> in relazione al miR-381 e ai suoi effetti sulla proteina HMGB1 che quando rilasciata nello spazio extracellulare induce la produzione di numerose citochine ed è perciò coinvolta in diverse patologie come il cancro, il LES ed anche la PM. La down-regolazione del miR-381, osservata nella PM, si traduce in un'augmentata espressione di HMGB1, target del miRNA, e quest'ultima determina una attivazione pro-infiammatoria, mediata dall'asse IL-17/ICAM-1 che comporta anche un'augmentata migrazione macrofagica.

Altri studi hanno confrontato l'espressione di miRNA e il corrispondente profilo di mRNA nelle MII. *Parkes et al.*<sup>197</sup> hanno osservato una espressione differenziale dei miRNA su siero nei vari gruppi di MII (DM, PM, IBM, ASyS con anti-Jo-1) rispetto ai controlli. Dall'indagine sono emersi diversi miRNA come miR-96-5p, risultato ampiamente up-regolato nelle MII in modo significativo nella sindrome anti-Jo-1, e miR-10a-5p, significativamente down-regolato nella IBM. Si sono poi analizzati i possibili target di miR-96-5p e tra questi il più interessante è stato ADK (Adenosina chinasi), enzima che converte l'adenosina monofosfato in adenosina difosfato. L'up-regolazione di miR-96-5p e la conseguente down-regolazione di ADK sono associati ad una disfunzione mitocondriale. L'accumulo di specie reattive

dell'ossigeno (ROS) che ne deriva può essere alla base di un altro peculiare meccanismo, non immuno-mediato, delle MII<sup>197</sup>.

Un gruppo di ricercatori ha analizzato il profilo circolante di miRNA plasmatici in pazienti con PM/DM prima e dopo il trattamento<sup>198</sup>. È stato dimostrato che dopo il trattamento l'espressione di miR-3187-3p è significativamente up-regolata, al contrario quella di miR-4442 è down-regolata. L'espressione di miR-4442 nella fase attiva di malattia, prima del trattamento, è fortemente up-regolata e la sua espressione è notevolmente più alta rispetto ai pazienti con AR e LES in fase attiva o ai controlli sani. Ne deriva quindi che i livelli circolanti di miR-4442 plasmatici sono associati a PM/DM. Inoltre i livelli di questo miRNA correlano positivamente con l'attività di malattia valutata con lo score MITAX (Myositis intention to treat index). Non è stata riportata alcuna funzione biologica del miR-4442 tuttavia, visto la sua significatività, potrebbe rivelarsi un ottimo biomarcatore per la diagnosi di PM/DM e per la risposta al trattamento<sup>198</sup>.

Confrontando la differente espressione di miRNA sierici tra DM e PM, tre miRNA (hsa-miR-3676, hsa-miR-3907 e hsa-miR-877) correlano significativamente con l'attività di malattia. Quindi è verosimile pensare, non essendoci più miR-4442, che lo spettro di miRNA sierici e plasmatici dei pazienti affetti da MII sia differente.

Sono stati svolti anche studi sull'espressione dei miRNA dalle lesioni cutanee tipiche di DM e CADM e diversi miRNA sono risultati up-regolati o soppressi. Tra tutti, miR-223 è risultato down-regolato nelle papule di Gottron dei pazienti con CADM, addirittura assente nei pazienti con DM rispetto ai livelli nei donatori sani. La soppressione di miR-223 conduce all'over-espressione di PCK $\epsilon$  (Protein chinasi epsilon) nei cheratinociti basali dello strato proliferativo dell'epidermide; questo fenomeno molecolare è responsabile dell'acantosi e dell'iperproliferazione osservata all'istopatologia delle papule di Gottron. miR-223 è dunque specifico delle manifestazioni cutanee di DM e CADM. Tuttavia, analizzando i livelli sierici di miR-223 tra i vari gruppi di MII (PM, DM, CADM) rispetto ai controlli sani, si è visto che solo nella CADM l'espressione sierica di miR-223 rimane significativamente down-regolata<sup>199</sup>.

Un'altra considerazione interessante riguarda l'espressione di microRNA implicati nel controllo della differenziazione del tessuto muscolare e del suo corretto funzionamento, denominati myo-miRNA (*Myogenic microRNA*). miR-1, miR-133a e miR-133b sono drasticamente diminuiti nei campioni di tessuto muscolare di pazienti affetti da MII, specialmente IBM. A questi, si aggiunge miR-206 che è fortemente ridotto nel muscolo dei pazienti con DM. Diverse citochine infiammatorie come TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\alpha/\beta$ , altamente espresse nel muscolo con MII, possono sopprimere l'espressione dei myo-miRNA e compromettere così la differenziazione mioblasti/miociti che è fondamentale nei processi rigenerativi e riparativi del muscolo. In aggiunta ai suddetti myo-miRNA, altri miRNA sono alterati nelle biopsie di tessuto muscolare, come miR-146a, miR-221 e miR-222, che sono stati trovati over-espressi nella PM e IBM. Questi miRNA sembrano inibire la differenziazione in miociti. Inoltre, miR-378 è down-regolato in tutti i campioni di tessuto muscolare analizzati nello studio descritto<sup>200</sup>.

Nella DM, l'espressione di miR-206 è ridotta in modo significativo nei PBMC e nel siero dei pazienti rispetto ai controlli sani. È stata osservata una correlazione tra miR-206 e l'espressione di KLF4 (Krüppel-like factor 4), fattore di trascrizione importante per lo sviluppo e la differenziazione dei linfociti T sotto profilo T<sub>H</sub>17. L'aumentata espressione di KLF4, dovuta alla riduzione di miR-206, incrementa la porzione di linfociti T<sub>H</sub>17 e la produzione di IL-17, importante citochina pro-infiammatoria fondamentale nella patogenesi della DM<sup>201</sup>.

Un altro studio condotto da *Ye et al.*<sup>202</sup> ha valutato l'espressione sierica di cinque miRNA immuno-relati (miR-23a-3p, miR-23b-3p, miR-146a-5p, miR-146b-5p e miR-150-5p) in relazione alle specificità anticorpali e ai fenotipi clinici della DM. Dall'analisi è emerso che: 1) la diminuzione dell'espressione sierica di miR-23b è correlata negativamente con i livelli di CPK; 2) la down-regolazione sierica di miR-150-5p è specificamente correlata ai pazienti DM con autoanticorpi anti-MDA5 e anti-NXP2; 3) l'espressione sierica di miR-146b-5p è significativamente più elevata nei pazienti con CAM rispetto a quelli in assenza di neoplasia.

Il meccanismo con cui miR-150-5p concorre alla formazione degli autoanticorpi non è ancora chiaro, tuttavia questo miRNA è implicato nello sviluppo e nella differenziazione delle cellule B e quindi nella produzione anticorpale.

Altre evidenze mostrano che l'up-regolazione sierica di miR-21-5p è correlata con i livelli sierici di immunoglobuline G, mentre una diminuzione dei livelli sierici di miR-7 si associa con l'entità del coinvolgimento cutaneo dei pazienti con DM. miR-23b è un regolatore del signaling di numerose citochine infiammatorie come TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17 ed anche del fattore NF-kB. La sua down-regolazione potrebbe partecipare al danno muscolare aumentando le citochine e di conseguenza le cellule immunitarie responsabili del danno<sup>202</sup>.

Uno studio recente eseguito da *Zhong et al.*<sup>203</sup> ha esaminato il profilo circolante dei microRNA derivati dagli esosomi (exRNA) in pazienti affetti da DM, in particolare quelli complicati con ILD e con positività anticorpale anti-MDA5, confrontanti con pazienti affetti da DM senza coinvolgimento polmonare e sieronegativi e con i controlli sani. Dall'analisi dell'espressione differenziale dei miRNA esosomiali in questi tre gruppi è emerso che hsa-miR-4488 e hsa-miR-1228-5p sono significativamente up-regolati nel gruppo DM-ILD-MDA5 Ab (+). Si è poi passati ad identificare possibili target di questi miRNA mediante il multiMiR database.

miR-4488 ha come target plausibile DDX39B che in ultima analisi inibisce il signaling di NF-kB. Essendo miR-4488 up-regolato, è verosimile che questo miRNA promuova il processo flogistico mediante il signaling NF-kB grazie alla repressione di DDX39B. Al di là delle possibili implicazioni fisiopatologiche, la rilevazione dei miRNA esosomiali può costituire un nuovo caposaldo come biomarcatore<sup>203</sup>.

Un altro studio recente sui miRNA esosomiali è stato condotto nei pazienti con sindrome antisintetetica (ASyS)<sup>204</sup> con l'obiettivo di identificare biomarcatori periferici di interstiziopatia polmonare (ILD). È emerso che nei pazienti con ASyS-ILD appare esserci un'aumentata espressione periferica di specifici miRNA esosomiali (miR-15b-5p, miR-23a-3p, miR-25-3p, miR-30a-5p e miR29c-3p). I miRNA identificati modulano la risposta immune e infiammatoria, i processi di fibrogenesi polmonare ed interferiscono principalmente sul pathway PI3K-Akt, che regola la proliferazione cellulare e l'apoptosi ed è attivata in maniera aberrante nei fibroblasti polmonari dei pazienti fibrotici (ILD)<sup>204</sup>.

## 2. SCOPO DELLO STUDIO

Questo studio ha lo scopo di caratterizzare le vescicole extracellulari (EVs) plasmatiche ed analizzarne il ruolo come potenziali biomarcatori nel contesto delle MII e di indagare, in maniera preliminare, il loro cargo di miRNA che caratterizza le MII ipotizzandone un ruolo fisiopatogenetico. Nello specifico, gli scopi dello studio sono:

- 1) Quantificare le EVs mediante misurazioni NTA al fine di stabilire eventuali differenze tra il gruppo dei pazienti con MII e il gruppo dei controlli sani e individuare correlazioni tra i dati clinici e laboratoristici nel gruppo dei pazienti;
- 2) Caratterizzare le EVs mediante citofluorimetria per immagini (IFC) l'espressione di marker linfocitari di superficie (CD3 e CD19) per ipotizzare una possibile origine cellulare;
- 3) Analizzare il cargo di microRNA delle EVs tramite *Next Generation Sequencing* (NGS) e valutare l'espressione differenziale di questi sncRNA tra il gruppo di pazienti e sani e tra i diversi sottotipi di MII.

### 3. PAZIENTI E METODI

#### 3.1 PAZIENTI

I pazienti adulti affetti da MII ( $\geq 18$  anni) e i controlli sani appaiati per età e sesso sono stati arruolati presso la degenza o l'ambulatorio dell'Unità di Reumatologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova tra marzo 2020 e settembre 2022.

I criteri di eleggibilità per i pazienti prevedono un'età superiore ai 18 anni e una diagnosi documentata di qualsiasi sottotipo di MII effettuata da un reumatologo esperto sulla base di dati clinici, di laboratorio e istologici, se disponibili.

Sono stati esclusi i pazienti affetti da ulteriori patologie invalidanti che richiedevano immunosoppressione e/o trattamento fisico riabilitativo.

Lo studio ha ricevuto l'approvazione del Comitato di Bioetica dell'ospedale (protocollo numero 0042610) ed è stato condotto in conformità alle norme di Helsinki.

È stato ottenuto il consenso informato scritto sia per i pazienti che per il gruppo dei donatori sani, consentendo la raccolta di un campione di sangue intero e l'accesso completo ai dati clinici e laboratoristici dalle cartelle cliniche della rete intraospedaliera.

I dati recuperati sono stati esportati in Microsoft Excel V.2019 per l'archiviazione e l'analisi.

Sulla base della letteratura, sono state scelte ed esaminate 55 variabili cliniche chiave per ciascun paziente in modo trasversale, ricorrendo a dati retrospettivi paralleli solo a scopo di riferimento.

Vengono qui riportate le variabili cliniche (*Tabella VI*), di laboratorio (*Tabella VII*) e sierologiche (*Tabella VIII*) analizzate al momento del prelievo. Le variabili sono espresse in modo dicotomico se non diversamente specificato.

	<b>VARIABILI CLINICHE</b>
<b>1.</b>	Sottogruppo di MII (n.)
<b>2.</b>	Durata della malattia (aa)
<b>3.</b>	Fenomeno di Raynaud
<b>4.</b>	Segno di Gottron su gomiti/ginocchia
<b>5.</b>	Segno di Gottron sulle mani
<b>6.</b>	Rash eliotropo
<b>7.</b>	Segno dello scialle
<b>8.</b>	Segno della fondine
<b>9.</b>	Poichilodermatomiosite
<b>10.</b>	Alterazioni ungueali
<b>11.</b>	Papule di Gottron
<b>12.</b>	Eritema del volto
<b>13.</b>	Segno del collo a V
<b>14.</b>	Disfagia
<b>15.</b>	Dispnea
<b>16.</b>	Tosse
<b>17.</b>	Calcinosi
<b>18.</b>	Mani da meccanico
<b>19.</b>	Miosite
<b>20.</b>	Interstiziopatia polmonare (ILD)
<b>21.</b>	Artrite
<b>22.</b>	Pattern TC ad alta risoluzione (HRCT)
<b>23.</b>	Diagnosi di neoplasia
<b>24.</b>	Miosite acuta
<b>25.</b>	Attività cutanea
<b>26.</b>	Attività articolare
<b>27.</b>	Attività muscolare
<b>28.</b>	Attività polmonare
<b>29.</b>	MMT-8, (/150)
<b>30.</b>	Tipo di immunosoppressore, (n.)
<b>31.</b>	Prednisone Dose equivalente (mg/d)

Tabella VI. Variabili cliniche esaminate

	PARAMETRI DI LABORATORIO (U/L)
1.	CPK
2.	Aldolasi
3.	Mioglobina
4.	LAD
5.	AST
6.	ALT

Tabella VII. Parametri di laboratorio esaminati

	PANNELLO SIEROLOGICO
<i>MSAs:</i>	
1.	Anticorpi anti-Mi-2
2.	Anticorpi anti-SRP
3.	Anticorpi anti-HMGCR
4.	Anticorpi anti-MDA-5
5.	Anticorpi anti-TIF1- $\gamma$
Anti-tRNA sintetasi (ARS)	
6.	Anticorpi anti-Jo-1
7.	Anticorpi anti-PL-12
8.	Anticorpi anti-PL-7
9.	Anticorpi anti-EJ
10.	Anticorpi anti-OJ
<i>MAAs:</i>	
11.	Anticorpi anti-SSA
12.	Anticorpi anti-SSB
13.	Anticorpi anti-Ku
14.	Anticorpi anti-PM/Scl-100
15.	Anticorpi anti-PM
16.	Anticorpi anti-U1RNP
17.	Anticorpi anti-PM/Scl75
18.	Anticorpi anti-Scl70

Tabella VIII. Pannello sierologico esaminato

## 3.2 METODI

### 3.2.1 RACCOLTA E PROCESSAMENTO DEI CAMPIONI

I campioni di sangue venoso (6 mL) prelevati dai pazienti e dai controlli sani sono stati raccolti in provette di sodio-citrato (tappo azzurro) e conservati a +4°C prima di essere processati entro un'ora.

I campioni di sangue sono stati poi centrifugati a *1500g* per 20 minuti al fine di separare il plasma dalla componente corpuscolata del sangue. I surnatanti sono stati trasferiti in provette da 15 mL e sottoposti a doppia centrifugazione a *3000g* per 15 minuti a temperatura ambiente.

Il plasma privo di piastrine (*Platelet-free plasma*, PFP) ottenuto è stato infine raccolto in provette eppendorf da 1,5 mL e conservato a -80°C fino alla fase successiva.

### 3.2.2 CROMATOGRAFIA AD ESCLUSIONE DIMENSIONALE

I campioni di PFP, dopo essere stati scongelati, sono stati sottoposti a cromatografia ad esclusione dimensionale (*Size exclusion chromatography*, SEC) utilizzando le colonnine "*qEV Original®/70 nm smart columns*" (Izon Science) rivestite internamente da una matrice di sefarosio che consentono di isolare particelle di dimensione compresa tra 70 nm e 1000 nm (*recupero ottimale per particelle di dimensione > 110 nm*).

Brevemente, la preparazione delle colonnine prevede di eseguire dei lavaggi con tampone fosfato salino (PBS) (pH 7,4; ThermoFisher Scientific) filtrato con filtri da 0,22 µm (*Millex-GP*; Merck Millipore) ottenendo *filtered* PBS (fPBS). Si prosegue con l'aggiunta di 500 µL di campione PFP.

L'eluato che attraversa le colonnine viene suddiviso in 25 frazioni (Fr) di 500 µL ciascuna. Le Fr. 1-6 rappresentano il volume morto, che è stato eliminato; Fr. 7-10 (2 mL) corrispondono alle frazioni vescicolari di interesse per lo studio, da recuperare; Fr. 11-25 corrispondono alle frazioni proteiche, da eliminare.

### 3.2.3 ULTRAFILTRAZIONE

La frazione vescicolare è stata sottoposta a ultra-filtrazione utilizzando i seguenti filtri "Amicon® Ultra-4 mL 100 kDa centrifugal filter unit" (Merck Millipore). Ogni filtro è stato sterilizzato con 1 mL di etanolo 70% mediante centrifugazione a 2800g per un minuto. I residui di etanolo sono stati rimossi con 2 mL di fPBS mediante centrifugazione a 2800g per 2 minuti.

Le frazioni di EVs (2 mL + 1 mL di fPBS) sono state poste sul filtro e centrifugate a 4000g per 10 minuti secondo le istruzioni del produttore per raccogliere i campioni trattenuti sul filtro. I campioni raccolti sono stati portati a un volume di 500 µL, aliquotati in eppendorf da 1,5 mL e congelati a -80°C.

### 3.2.4 NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS (NTA)

La concentrazione e le dimensioni delle EVs sono state misurate in campioni diluiti in fPBS per ottenere un intervallo di concentrazione compreso tra  $10^6$  e  $10^8$  particelle/mL, come specificato dal produttore. La soglia di rilevamento ideale è stata determinata per includere particelle con concentrazioni limitate di 20-120 particelle per fotogramma, mentre le particelle indistinte sono state limitate a 5 per fotogramma. In accordo con le istruzioni del produttore, il livello della telecamera è stato aumentato fino a quando tutte le particelle erano distintamente visibili, senza superare una saturazione del segnale delle particelle superiore al 20% (livello 11-12). La messa a fuoco automatica è stata regolata in modo da evitare particelle indistinte.

Per ogni campione, le particelle poste in movimento browniano sono state registrate in 3 video di 60 secondi ciascuno con un ingrandimento 20X acquisito a 25°C, con velocità della siringa di 40 µL/s; laser 45 mW a 488 nm.

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. Per minimizzare la distorsione dei dati basata su singole particelle di grandi dimensioni, il rapporto tra il totale delle tracce valide e il totale delle tracce complete è stato sempre  $\leq 1:5$ .

### 3.2.5 CITOFLUORIMETRIA PER IMMAGINI (IFC)

I campioni di EVs sono stati diluiti 1:100 in fPBS (filtri da 0,1 µm; Merck Millipore) e quindi incubati per 30 minuti al buio a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi coniugati con fluorofori, precedentemente centrifugati a 20.000g per 10 minuti a 10 °C per evitare la formazione di aggregati anticorpo-anticorpo: anti-CD3 umano (Brilliant Violet 711; BioLegend), anti-CD19 umano (Brilliant Violet 421; BioLegend).

I controlli comprendevano: EV marcate con Triton X-100 0,1% (Merck), EV non marcate, EV marcate con un singolo anticorpo e campioni misti di EV marcate con un singolo anticorpo, fPBS, fPBS con l'aggiunta di anticorpi coniugati con fluorofori.

Le acquisizioni IFC dei campioni EVs sono state eseguite con lo strumento Amnis ImageStreamX MkII (ISx; EMD Millipore, Seattle, WA, USA) per un tempo fisso di 2 minuti impostando la fluidica a bassa velocità, l'ingrandimento a 60X, la massima potenza del laser, la dimensione del nucleo di 7 µm, l'apertura numerica di 0,9 e l'opzione "Remove Beads" non selezionata. La strategia di gating EV è stata limitata all'area sotto le *Speed Beads*. A ogni avvio, è stato eseguito lo strumento di calibrazione ASSIST® per ottimizzare le prestazioni. Le analisi dei dati e le matrici di compensazione spettrale sono state eseguite con il software IDEAS® (versione 6.3). Il controllo fluidico avanzato ISx e le Speed Beads in continuo movimento consentono di enumerare le particelle utilizzando la funzione "oggetti per mL" del software IDEAS®.

### 3.2.6 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE DALLE VESCICOLE EXTRACELLULARI

L'RNA totale è stato estratto dai campioni di vescicole extracellulari isolate (350-400 µL) mediante il kit "miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit" seguendo le indicazioni del produttore.

Alla fine del procedimento, l'eluato dalle colonnine "RNeasy® UCP MinElute" fornite dal kit contenente la frazione totale di RNA presenti nelle vescicole extracellulari viene conservato a -80°C.

È stata misurata la concentrazione di microRNA estratto mediante un'aliquota (5  $\mu$ L) del volume dell'RNA totale estratto dalle EVs utilizzando il kit "Qubit microRNA assay kit" (ThermoFisher) seguendo le indicazioni fornite dal produttore allo strumento Qubit (ThermoFisher).

### 3.2.7 PREPARAZIONE DELLE LIBRARIES

Una *library* consiste in una collezione di vari frammenti di un acido nucleico in esame ottenuti per frammentazione, a cui vengono legati specifici oligonucleotidi sia al 3' che al 5' detti adattatori o *adapters*. Sequenze complementari agli adattatori si trovano sul supporto dove avverrà il sequenziamento, denominato *Flowcell*, permettendo così la fissazione dei frammenti sulla superficie di quest'ultimo.

La preparazione delle *libraries* degli RNA estratti dalle EVs di 25 pazienti e 25 donatori sani è stata effettuata mediante l'utilizzo del kit "QIAseq miRNA Library Kit" (Qiagen, Germania) e prevede dei passaggi consecutivi, schematizzati in *Figura 8*, finalizzati all'aggiunta degli adattatori alle sequenze nucleotidiche, alla retro-trascrizione a cDNA e all'amplificazione dei frammenti per poi procedere al sequenziamento.

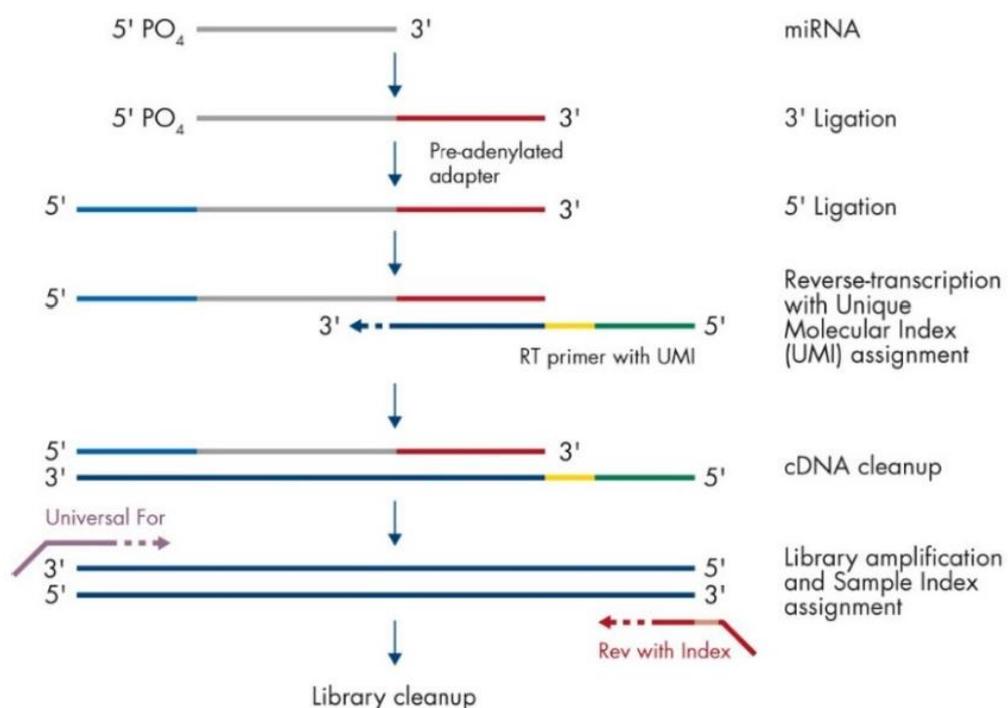


Figura 8. Preparazione della libraries di miRNA mediante QIAseq miRNA Library Kit

### **LIGAZIONE DEGLI ADAPTERS**

La prima fase di preparazione delle *libraries* prevede la ligazione di un *adapter* pre-adenilato al 3' terminale di tutti gli RNA presenti nel campione. Il mix di reazione contenente uno specifico buffer ed un adattatore da aggiungere a 5 µL di RNA estratto, viene incubato in questo modo: 1 h a 28°C, 20 minuti a 68°C, 4°C per almeno 5 minuti. Terminata questa fase, si procede alla ligazione dell'*adapter* al terminale 5' aggiungendo l'RNA adapter al primo prodotto di reazione e incubando 30 minuti a 28°C, 20 minuti a 65°C e infine a 4°C.

### **RETRO-TRASCRIZIONE E AMPLIFICAZIONE DEL cDNA**

La reazione di retro-trascrizione viene effettuata per ottenere un amplificato di DNA a doppio filamento a partire da RNA estratto a singolo filamento. La reazione prevede un primo step nel quale la sequenza già legata agli adapter viene incubata con un "iniziatore". Il primer della reazione è stato disegnato sulla sequenza dell'adapter in 3' ma è integrato ad una ulteriore sequenza chiamata "UMI" (*Unique Molecular Index*). In questo modo il primer legherà la regione del 3' adapter rendendo possibile la sintesi di cDNA (DNA complementare), mentre verrà assegnato un UMI ad ogni singola molecola generata.

Questa caratteristica è utile poiché la quantificazione delle *reads* ottenute durante il sequenziamento può risultare sovrastimata a causa di errori intrinseci alla tecnica, legati al processo di amplificazione. Questi *bias* possono essere eliminati filtrando i risultati per le *reads* contenenti la sequenza UMI.

Generate le molecole di cDNA, si può procedere alla fase di amplificazione delle *libraries*. La reazione utilizza la *Taq* DNA polimerasi e le fasi di denaturazione, *annealing* ed estensione vengono ripetute per 22 cicli secondo il seguente profilo termico: 15 secondi a 95°C, 30 secondi a 60°C, 15 secondi a 72°C rispettivamente.

### **CLEAN-UP E PURIFICAZIONE DELLE LIBRARIES**

Nella fase di pre- e post- amplificazione della *library* si rende necessaria la purificazione del campione per eliminare qualsiasi residuo di reagente precedentemente utilizzato, ma soprattutto per il filtraggio delle molecole, salvaguardando le sequenze a basso peso molecolare, oggetto di interesse dello

studio (sncRNA). Ciò si ottiene mediante una tecnica di *clean-up* con biglie magnetiche in grado di legare le molecole di interesse.

Infine, la concentrazione di ciascuna libreria è stata quantificata allo strumento Qubit (ThermoFisher) utilizzando il kit “*Qubit 1X dsDNA HS kit*” (ThermoFisher) secondo il protocollo del produttore.

### 3.2.8 NEXT GENERATION SEQUENCING

Per il sequenziamento delle librerie di sncRNA è stata utilizzata la piattaforma Illumina NextSeq550. Dopo aver calcolato per ogni libreria la stessa concentrazione, è stato preparato un pool di *libraries* con una concentrazione finale di 1,2 pM.

Dopo aver eseguito i lavaggi e aver impostato lo strumento con comandi di input per fissare il numero di cicli richiesti per la lettura di 75 nucleotidi e gli index appartenenti ad ogni singola *library* per il riconoscimento, è possibile caricare il pool di *libraries*. Dopo circa 24 ore lo strumento ha terminato la corsa di sequenziamento e digitalizzato i dati in formato FASTQ.

L'analisi informatica dei dati NGS è stata eseguita mediante il software “*CLC Genomics Workbench*” attraverso il quale i dati sono stati normalizzati, filtrati ed è stato valutato il Fold Change per determinare l'espressione differenziale dei diversi miRNA.

### 3.2.9 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata eseguita applicando il *t test di Student* per campioni indipendenti e l'*ANOVA a una via* con la correzione di Bonferroni per confrontare i dati relativi a 3 o più gruppi. Le variabili continue sono state espresse come media  $\pm$  SD; la mediana è utilizzata per distribuzioni continue non normali. Per eseguire le analisi sono stati utilizzati i software GraphPad Prism® versione 9 e SPSS 23 (Chicago, IL). Un valore  $p \leq 0,05$  è stato considerato significativo.

## 4. RISULTATI

### CARATTERISTICHE DELLA COORTE DI PAZIENTI

Durante il periodo di studio, sono stati esaminati 59 pazienti adulti affetti da MII, di questi un paziente non è stato incluso nelle analisi successive.

I pazienti affetti da MII sono suddivisi in diversi sottotipi di malattia e le loro principali caratteristiche cliniche e demografiche sono riportate di seguito nella *Tabella IX*.

<b>Genere</b>	
Femmine	37 (62.7%)
Maschi	22 (37.3%)
<b>Età alla diagnosi, media <math>\pm</math> SD (anni)</b>	55,9 $\pm$ 12,9
<b>Durata della malattia al momento del prelievo, media <math>\pm</math> SD (anni)</b>	3,9 $\pm$ 5,5
<b>MMT-8 score mediana (IQR)</b>	144 (134 - 150)
<b>Diagnosi di MII (n, %)</b>	
DM - Dermatomiosite	18 (30,5 %)
PM - Polimiosite	8 (13,6 %)
IBM – Miosite a corpi inclusi	2 (3,4 %)
CAM* - Miosite associata al cancro	14 (23,7 %)
ASS – Sindrome anti-sintetasi	14 (23,7 %)
Altre**	3 (5,1 %)
<b>Sierologia ever (n, %)</b>	
<u>Autoanticorpi Miosite-specifici (MSA)</u>	
Anti-Mi2	8 (13,6 %)
Anti-t-RNA sintetasi***	16 (27,1 %)
Anti-SRP	3 (5,1 %)
Anti-MDA-5	5 (8,5 %)
Anti-TIF1- $\gamma$	5 (8,5 %)
Anti-HMGCoAR	1 (1,7 %)
<u>Autoanticorpi Miosite-associati (MAA)</u>	
Anti-SSA	10 (16,9 %)
Anti-SSB	3 (5,1 %)
Anti-Ku	3 (5,1 %)
Anti-PM/Scl-100	4 (6,8 %)
Altri <sup>†</sup>	7 (11,6 %)

<b>Manifestazioni cliniche ever (n, %)</b>	
Cutanee	38 (64,4 %)
Papule e segno di Gottron	21 (35,6 %)
Rash eliotropo	15 (25,4 %)
Mani da meccanico	15 (25,4 %)
Fenomeno di Raynaud	12 (22,0 %)
Altre ‡	31 (52,5 %)
Artriti	19 (32,2 %)
Muscolo-scheletriche	47 (79,7 %)
ILD	33 (55,9 %)
Dispnea	22 (37,3 %)
Tosse	14 (23,7 %)
Disfagia	16 (27,1 %)
<b>Manifestazioni cliniche al momento del campionamento (n, %)</b>	
Attività cutanea	23 (39,0 %)
Papule e segno di Gottron	11 (18,6 %)
Rash eliotropo	6 (10,2 %)
Mani da meccanico	9 (15,3 %)
Altro §	16 (27,12 %)
Attività articolare	6 (10,2 %)
Attività muscolare	21 (35,6 %)
Attività polmonare	7 (11,7 %)
<b>Assenza di attività clinica</b>	25 (42,4 %)
<b>Trattamento in atto</b>	
Corticosteroidi orali (n, %)	44 (74,6 %)
Dose di prednisone, media ± SD, (mg/die)	13,65 ± 16,39
Farmaci immunosoppressori	37 (62,7 %)
Micofenolato mofetile	12 (20,3 %)
Metotrexato	17 (28,8 %)
Azatioprina	1 (1,7 %)
Ciclosporina A/ Tacrolimus	2 (3,4 %)
Rituximab	4 (6,8 %)
Abatacept	1 (1,7 %)
<b>Assenza di trattamento</b>	5 (8,5 %)

Tabella IX. Principali caratteristiche cliniche e demografiche della coorte oggetto di studio.

MMT, manual muscle test; IQR, intervallo interquartile; ILD, interstiziopatia polmonare;

CAM\*: 1 caso di carcinoma ovarico sieroso di alto grado (1,7%), 1 caso di colangiocarcinoma (1,7%), 3 casi di adenocarcinoma colon-rettale (5,1%), 2 casi di IPMN (3,4%), 1 caso di adenoma colico di basso grado (1,7%), 1 caso di carcinoma polmonare a piccole cellule (1,7%), 1 caso di adenocarcinoma polmonare (1,7%), 1 caso di carcinoma squamocellulare cutaneo (1,7%), 1 caso di adenocarcinoma di tipo intestinale della fossa nasale (1,7%), 1 caso di linfomi non Hodgkin extra-nodale (1,7%) e 1 caso di carcinoma uroteliale (1,7%)

Altre \*\*: 3 pazienti con una diagnosi di MII ma senza l'identificazione di uno specifico sottotipo per la mancanza di un dato istologico al momento del campionamento

Anti-t-RNA sintetasi\*\*\*: 11 casi di anti-Jo-1 (18,6%), 4 casi di anti-PL-12 (6,8%), 1 caso di anti-PL-7 (1,7%)

Altro<sup>†</sup>: 1 caso di anti-PM-1 (1,7%); 1 caso di anti-U1RNP (1,7%), 3 casi di anti PM/Scl75 (5,1%), 1 caso di anti-Scl70 (1,7%) e 1 caso di anti-SMA (1,7%)

Altre <sup>‡</sup>: 9 casi con distrofia delle cuticole (15,3%), 5 casi con segno della fondina (8,5%), 1 caso con poichilodermatomiosite (1,7%), 5 casi con eritema del volto (8,5%), 5 casi con eritema al décolleté (8,5%), 2 casi con livedo reticularis (3,4%), 15 casi con eritema dello scialle (25,4%)

Altre <sup>§</sup>: 9 casi con eritema dello scialle (15,3%), 4 casi con segno della fondina (6,8%), 4 casi con distrofia delle cuticole (6,8%), 8 casi con eritema del volto (13,6%), 5 casi con eritema al décolleté (8,5%), 1 caso di livedo reticularis (1,7%)

## 4.1 QUANTIFICAZIONE DELLE EVs MEDIANTE NTA

L'analisi effettuata mediante NTA, eseguita su 58 pazienti affetti da MII e 60 donatori sani, ci ha permesso di ottenere informazioni precise sulla concentrazione e sulle dimensioni delle EVs isolate dai nostri campioni.

L'analisi NTA ha mostrato quindi che i pazienti affetti da MII presentano una concentrazione di vescicole extracellulari significativamente maggiore rispetto ai controlli sani (Healthy donors, HD): rispettivamente,  $1,75 \times 10^{10} \pm 1,35 \times 10^{10}$  contro  $1,34 \times 10^{10} \pm 7,35 \times 10^9$  (media  $\pm$  SD) [EVs/ml];  $p = 0,0461$ , come riportato in *Figura 9*.

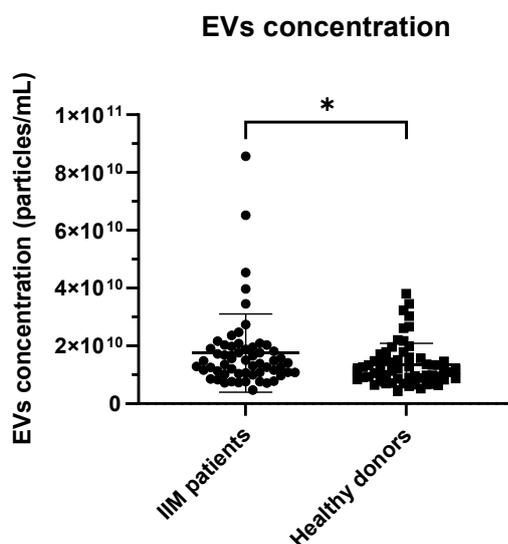
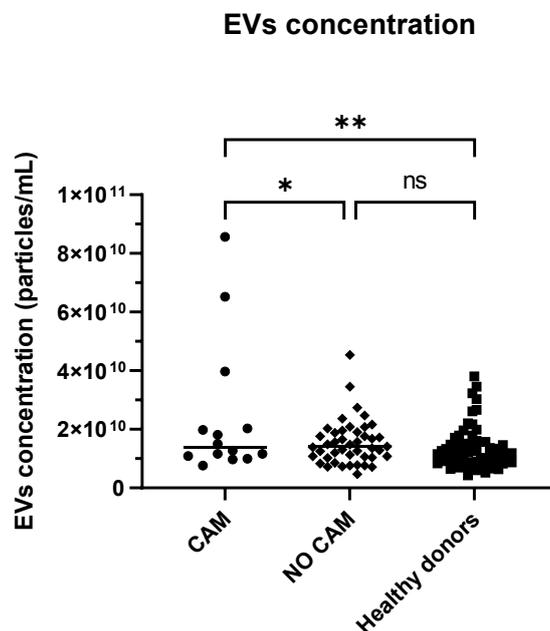


Figura 9. Confronto della concentrazione di EVs tra pazienti affetti da MII e donatori sani misurate all'NTA

Non è emersa alcuna differenza significativa tra pazienti e controlli sani nella moda delle dimensioni delle EVs (rispettivamente  $152,1 \text{ nm} \pm 19,16$  contro  $154,6 \text{ nm} \pm 15,07$ ;  $p =$  non significativa) né nella loro dimensione media (rispettivamente  $199,3 \text{ nm} \pm 18,71$  contro  $204,5 \text{ nm} \pm 18,06$ ;  $p = \text{ns}$ ).

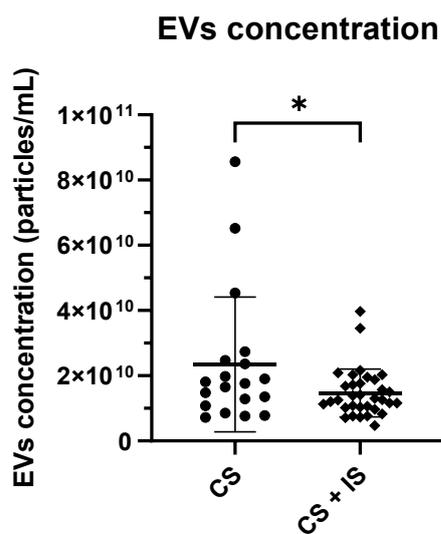
Sono stati eseguiti successivamente confronti delle concentrazioni di EVs tra HD e i differenti sottotipi di MII (DM, PM, IBM, ASyS, CAM), dai quali non sono emerse differenze significative ad eccezione del confronto tra CAM e HD.

In particolare, il confronto tra il gruppo di HD ( $n = 60$ ), pazienti MII con CAM ( $n = 14$ ) e pazienti MII non classificati come CAM ( $n = 44$ ) ha mostrato una differenza significativa della concentrazione di EVs tra i pazienti con CAM e HD (rispettivamente  $2,41 \times 10^{10} \pm 2,35 \times 10^{10}$  contro  $1,34 \times 10^{10} \pm 7,35 \times 10^9$  EVs/mL;  $p = 0,0029$ ) oltre che una differenza significativa tra i gruppi CAM e non-CAM (rispettivamente  $2,41 \times 10^{10} \pm 2,35 \times 10^{10}$  contro  $1,54 \times 10^{10} \pm 7,65 \times 10^9$ ;  $p = 0,0249$ ), come mostrato in *Figura 10*.



*Figura 10. Confronto della concentrazione di EVs tra donatori sani e pazienti suddivisi in CAM e miopatia esente da CAM.*

È stato eseguito anche un confronto delle concentrazioni di EVs in relazione all'intensità del trattamento farmacologico suddividendo i pazienti in trattati con corticosteroidi (CS, n = 19) e trattati con la combinazione di corticosteroidi e immunosoppressori (CS + IS, n = 33). È emersa una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi (rispettivamente  $2,35 \times 10^{10} \pm 2,06 \times 10^{10}$  contro  $1,47 \times 10^{10} \pm 7,34 \times 10^9$ ;  $p = 0,0308$ ), come visibili in *Figura 11*.



*Figura 11. Confronto della concentrazione di EVs tra il gruppo trattato con CS e il gruppo trattato con l'associazione CS + IS.*

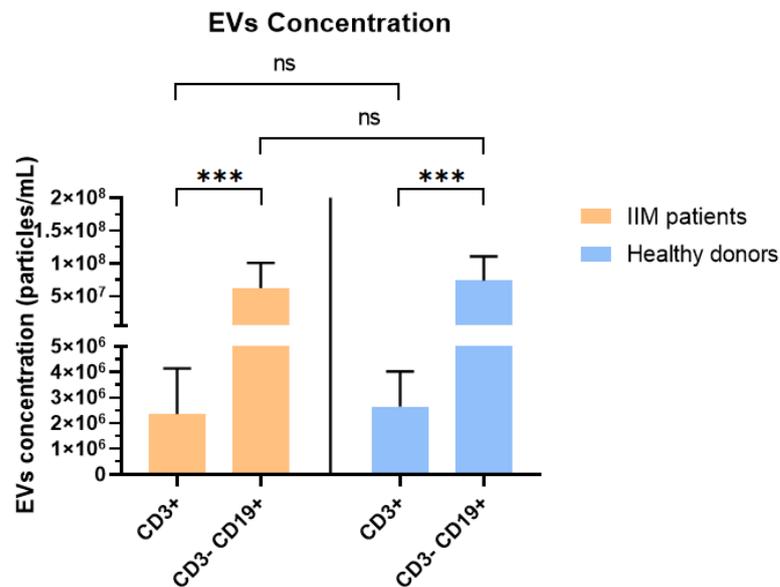
## 4.2 CARATTERIZZAZIONE DELLE EVs MEDIANTE IFC

La caratterizzazione IFC precedentemente eseguita dimostra che le nanoparticelle isolate hanno un profilo di espressione dei marcatori di superficie coerente con le EVs, soprattutto di piccole dimensioni, come evidenziato dalla presenza predominante di tetraspanine.

Infatti, lo strumento acquisisce un segnale fluorescente emesso dalle particelle in risposta al legame dell'anticorpo, marcato con uno specifico fluoroforo, per i marcatori di superficie costitutivi: le tetraspanine (CD9, CD63 e CD81), specifiche per piccole EVs di origine endosomiale, e l'integrina CD11c, marcatore più generico.

Successivamente abbiamo indagato la presenza di marcatori linfocitari, CD3 (marcatore tipico della famiglia di linfociti T) e CD19 (marcatore tipico dei linfociti B) sulla superficie delle EVs per caratterizzarle ulteriormente.

Sia i pazienti (n = 26) che i sani (n = 25) hanno mostrato una netta prevalenza di vescicole extracellulari con immuno-fenotipo CD3-negativo e CD19-positivo, come visibile in *Figura 12*. Il confronto della concentrazione di EVs con immuno-fenotipi differenti, CD3<sup>+</sup> contro CD3<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup>, è risultato significativo con p < 0,0001 considerando le categorie di sani e pazienti in maniera indipendente. Quando sono state confrontate le concentrazione di EVs relative all'immuno-fenotipo CD3<sup>+</sup> e CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> tra donatori sani e pazienti affetti da MII non si sono evidenziate differenze significative (rispettivamente CD3<sup>+</sup>:  $2,64 \times 10^6 \pm 1,38 \times 10^6$  contro  $2,35 \times 10^6 \pm 1,78 \times 10^6$ ; CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>:  $7,38 \times 10^7 \pm 3,67 \times 10^7$  contro  $6,20 \times 10^7 \pm 3,85 \times 10^7$ ).

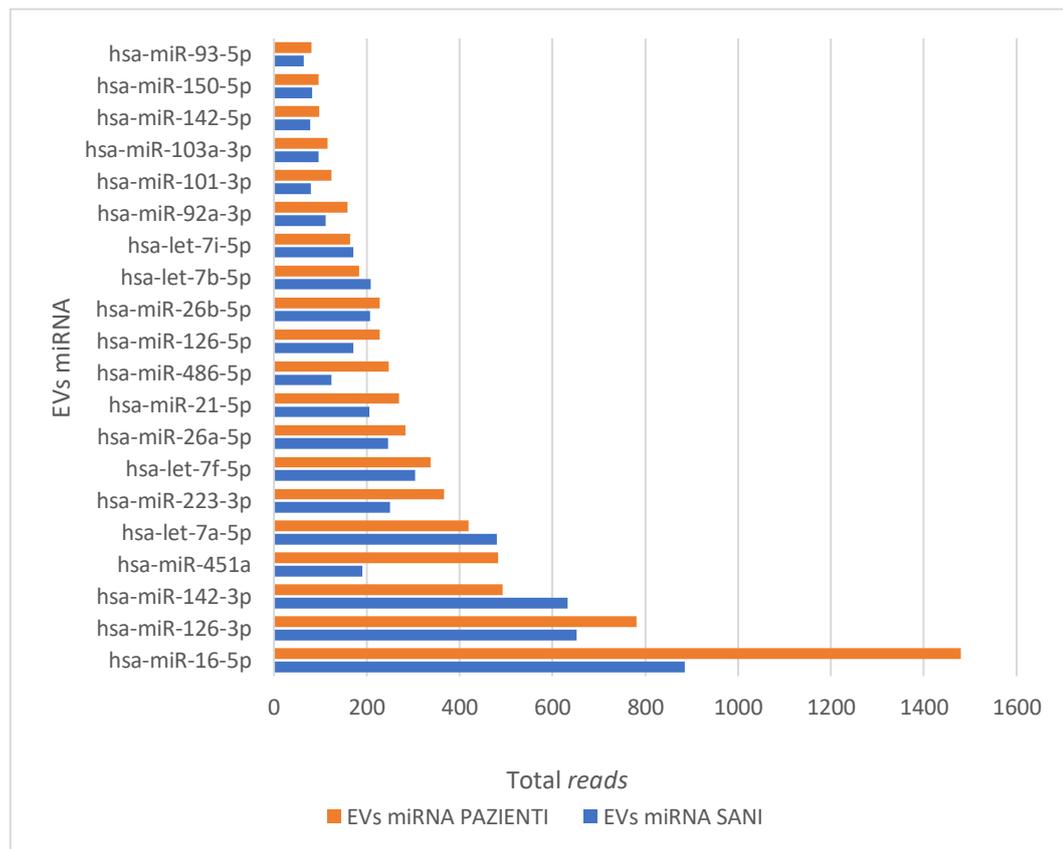


*Figura 12. Caratterizzazione delle EVs alla citofluorimetria (IFC). Confronto delle EVs con immunofenotipo CD3<sup>+</sup> e CD3<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup>.*

### 4.3 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI microRNA CONTENUTI NELLE VESICOLE EXTRACELLULARI

L'analisi dei dati ottenuti all'NGS è stata effettuata con il software "CLC Genomics". Sono stati ottenuti i dati relativi all'espressione dei microRNA estratti da EVs di 21 pazienti affetti da MII e 21 donatori sani.

Nella *Tabella X* sopra riportata, viene mostrato il livello di espressione (indicato come *reads*) dei 20 miRNA vescicolari più rappresentativi dei donatori sani (in blu) e dei pazienti affetti da MII (in arancione): il miR-16-5p risulta il più espresso in tutti i campioni con una media di reads di  $1480 \pm 1287$  nei pazienti e  $886 \pm 1078$  nei sani, a seguire miR-126-3p con una media di reads di  $780 \pm 644$  nei pazienti e  $652 \pm 1105$  nei sani. Il numero totale di EVs miRNA plasmatici analizzati è di 100.



*Tabella X. Profilo di espressione dei 20 miRNA esosomiali più rappresentativi del plasma di pazienti affetti da MII (in arancione) e di donatori sani (in blu)*

Il confronto di espressione dei EVs miRNA tra il gruppo dei sani e dei pazienti è stato eseguito direttamente dal software CLC Genomics che fornisce il valore di “Fold Change” e il “p-value”.

Il “Fold Change” viene calcolato come rapporto tra il valore medio delle *reads* normalizzate tra i due gruppi per ciascun miRNA; valori di Fold Change superiori a 1 indicano un aumento di espressione (up-regolazione), valori inferiori a -1 indicano una riduzione di espressione (down-regolazione), mentre un valore di Fold Change compreso tra 1 e -1 indica che non vi è nessun cambiamento di espressione.

Il “p-value” viene calcolato direttamente dal metodo di normalizzazione “Trimmed Mean of M” (edge R), utilizzato dal software CLC Genomics.

EVs miRNA plasmatici	Fold Change	p-value	SANI/PAZIENTI
<b>hsa-miR-451a</b>	1,919321	0,0000759	Up-regolato
<b>hsa-miR-15a-5p</b>	1,275568	0,022154	Up-regolato
<b>hsa-miR-486-5p</b>	1,446866	0,00114	Up-regolato
<b>hsa-miR-222-3p</b>	1,845142	0,001526	Up-regolato
<b>hsa-miR-32-5p</b>	1,778544	0,018901	Up-regolato
<b>hsa-miR-185-5p</b>	1,454742	0,00529	Up-regolato
<b>hsa-let-7e-5p</b>	-1,56348	0,00157	Down-regolato
<b>hsa-let-7a-5p</b>	-1,55167	0,001512	Down-regolato
<b>hsa-let-7f-5p</b>	-1,29617	0,018207	Down-regolato
<b>hsa-let-7b-5p</b>	-1,50724	0,000313	Down-regolato

Tabella XI. Lista dei miRNA statisticamente significativi nel confronto tra i due gruppi.

La Tabella XI riporta i valori di Fold Change e p-value dei 10 EVs miRNA più significativi nel confronto tra donatori sani e pazienti affetti da MII.

Per effettuare un confronto dell'espressione differenziale (*Differential Expression*, DE) dei microRNA tra i vari gruppi, i *reads* totali devono essere normalizzati in *counts per million* (CPM) dividendo i conteggi totali delle *reads* di un miRNA per i conteggi totali delle *reads* del campione, moltiplicando il numero che ne deriva per  $10^6$ .

Il primo confronto sulla DE dei microRNA è stato fatto tra i pazienti affetti da MII (n = 21) e i donatori sani (n = 21). Dall'analisi è emerso che vi è una DE dei seguenti miRNA tra pazienti e sani: **hsa-miR-451a** (rispettivamente  $46.146 \pm 25.901$  contro  $23.893 \pm 12.213$  [CPM]; p = 0,0010), **hsa-miR-486-5p** (rispettivamente  $27.153 \pm 9.402$  contro  $18.936 \pm 5.357$  [CPM]; p = 0,0012), **hsa-miR-222-3p** (rispettivamente  $961,3 \pm 828,3$  contro  $427,5 \pm 358,3$  [CPM]; p = 0,0098), **hsa-miR-185-5p** (rispettivamente  $2.084 \pm 882,9$  contro  $1.438 \pm 870$  [CPM]; p = 0,0217), **hsa-miR-32-5p** (rispettivamente  $926,6 \pm 641,6$  contro  $443,2 \pm 326,5$  [CPM]; p = 0,0038), **hsa-miR-15a-5p** (rispettivamente  $2.432 \pm 1.122$  contro  $1.598 \pm 808,9$  [CPM]; p = 0,0086) che risultano essere up-regolati nei pazienti affetti da MII; **hsa-let-7b-5p** (rispettivamente  $24.784 \pm 11.158$  contro  $37.575 \pm 15.988$  [CPM]; p = 0,0046), **hsa-let-7a-5p** (rispettivamente  $49.910 \pm 17.929$  contro  $77.529 \pm 36.163$  [CPM]; p = 0,0032), **hsa-let-7e-5p** (rispettivamente  $1.167 \pm 529$  contro  $1.873 \pm 1.143$  [CPM]; p = 0,014), **hsa-let-7f-5p** (rispettivamente  $35.943 \pm 14.566$  contro  $47.198 \pm 13.218$  [CPM]; p = 0,0123) risultano, al contrario, down-regolati nei pazienti.

Le *Figure 13 e 14* riportano i grafici a violino della DE dei 10 microRNA tra i due gruppi.

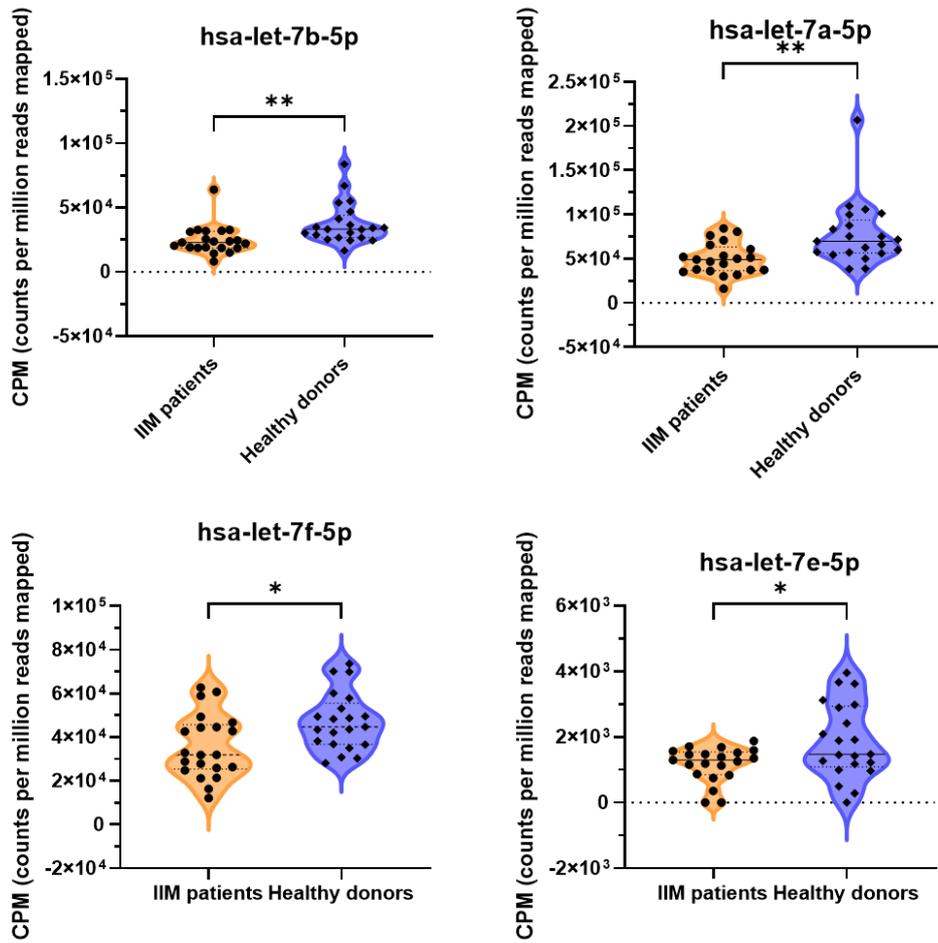


Figura 123. Confronto dell'espressione di 4 miRNA (*let-7b-5p*, *let-7a-5p*, *let-7f-5p*, *let-7e-5p*) tra pazienti affetti da MII e donatori sani.

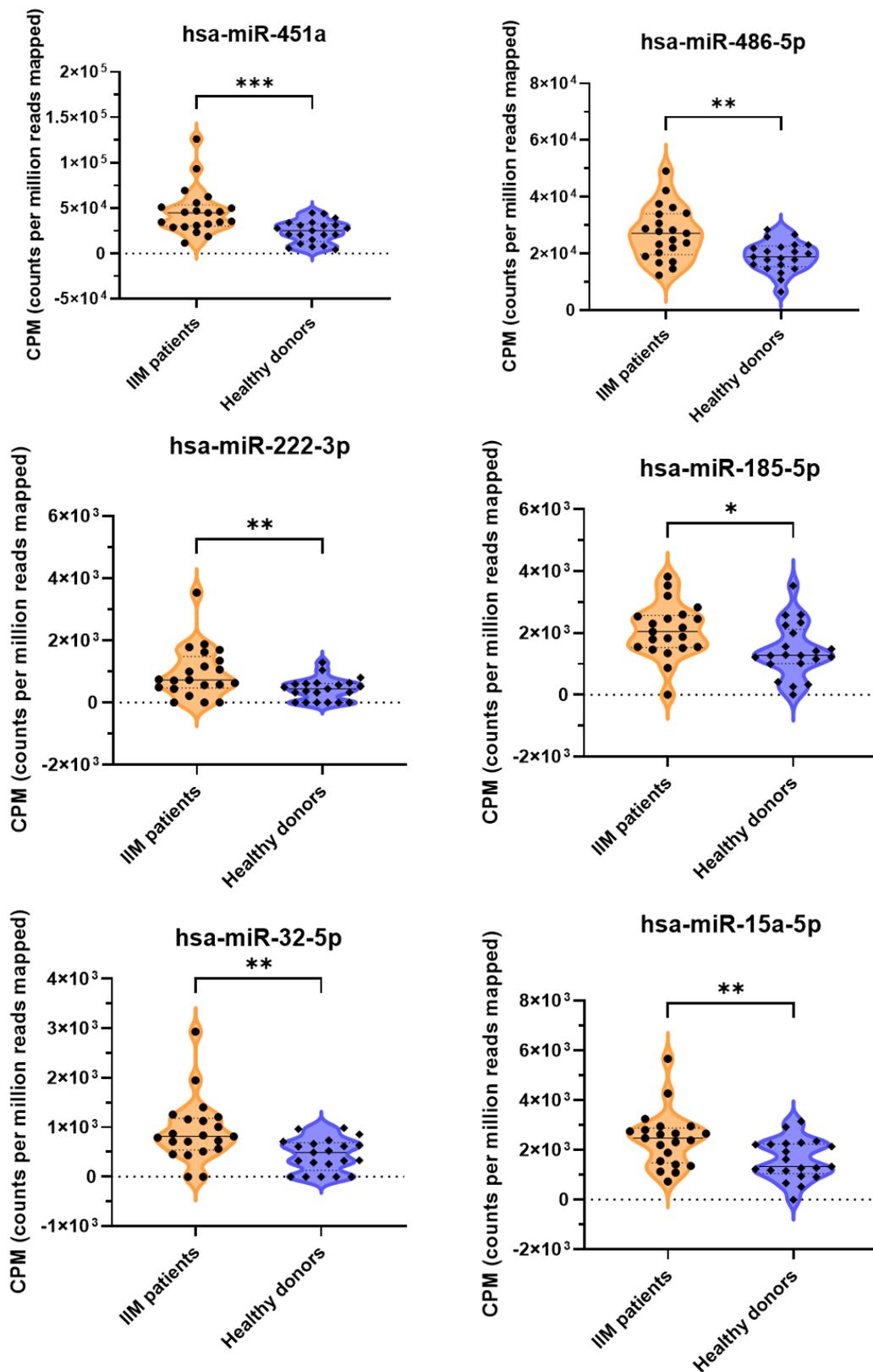
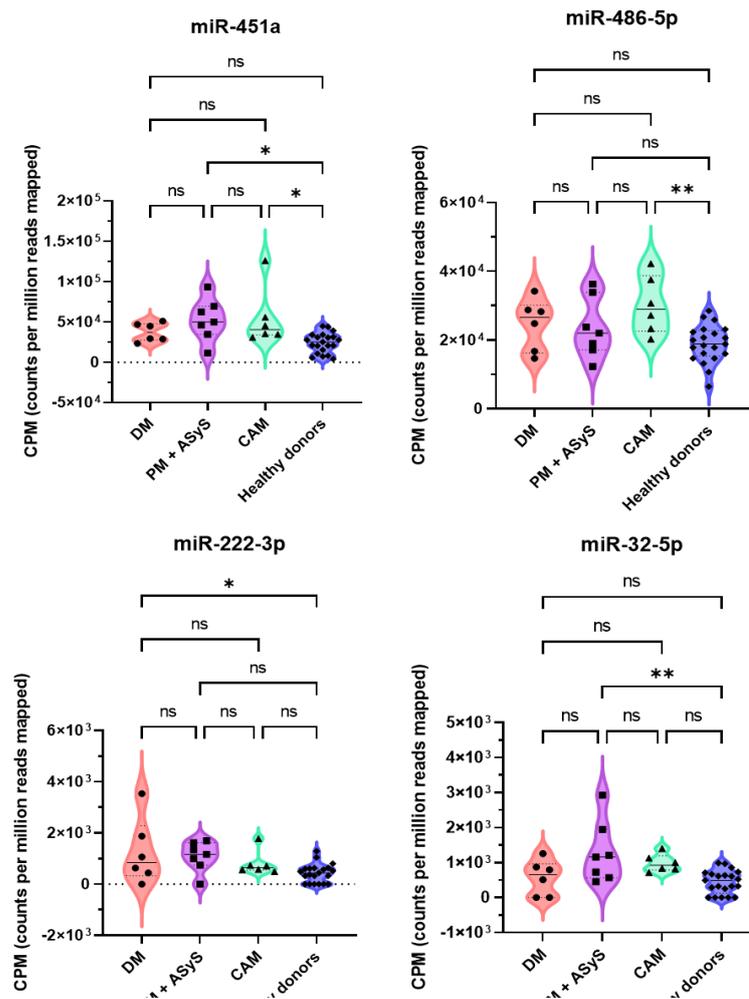


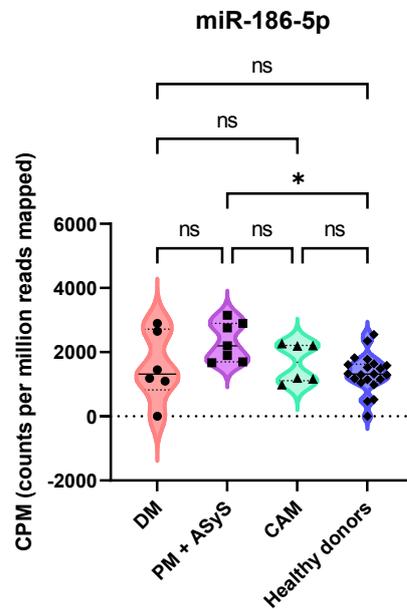
Figura 134. Confronto dell'espressione di 6 miRNA (miR-451a, miR-486-5p, miR-222-3p, miR-185-5p, miR-32-3p, miR-15a-5p) tra pazienti affetti da IIM e donatori sani.

In seguito è stata confrontata la DE dei suddetti microRNA tra i sani (n = 21) e i diversi sottotipi di MII suddivise in DM (n = 6), PM + ASyS (n = 7) e CAM (n = 6). Per hsa-miR-451a è stata rilevata una differenza significativa nel confronto tra sani e il gruppo CAM (rispettivamente  $23.893 \pm 12.213$  contro  $54.631 \pm 36.145$  [CPM]; p = 0,0120) e tra sani e il gruppo PM + ASyS (rispettivamente  $23.893 \pm 12.213$  contro  $52.325 \pm 26.170$  [CPM]; p = 0,0142); per hsa-miR-486-5p si è vista una differenza significativa tra sani e il gruppo CAM (rispettivamente  $18.936 \pm 5.357$  contro  $30.215 \pm 8.415$  [CPM]; p = 0,0061); per hsa-miR-222-3p c'è una significatività tra i sani e il gruppo DM (rispettivamente  $427,5 \pm 358,3$  contro  $1.258 \pm 1.285$  [CPM]; p = 0,0408); per hsa-miR-32-5p si è osservata una differenza significativa tra i sani e il gruppo PM + ASyS (rispettivamente  $443,2 \pm 326,5$  contro  $1.284 \pm 884,4$  [CPM]; p = 0,0019). Nella *Figura 15*, si osservano i confronti relativi ai quattro microRNA.



*Figura 145. Confronto dell'espressione differenziale di 4 miRNA (miR-451a, miR-486-5p, miR-222-3p, miR-32-5p) emersi dal confronto tra donatori sani e i principali fenotipi di MII (DM, PM + ASyS, CAM).*

Dal confronto tra questi gruppi è emersa anche una differenza significativa di un altro microRNA, hsa-miR-186-5p, tra i sani e il gruppo di PM + ASyS (rispettivamente  $1.337 \pm 580,3$  contro  $2.325 \pm 607,9$  [CPM];  $p = 0,0119$ ), come visibile in *Figura 16*.



*Figura 156. Profilo di espressione differenziale di miR-186-5p nel confronto tra sani e fenotipi di MII (DM, PM + ASyS, CAM).*

Successivamente sono stati eseguiti dei confronti a due a due tra i 3 sottotipi di MII, DM ( $n = 6$ ), ASyS ( $n = 5$ ), CAM ( $n = 6$ ), e tra ciascuno dei sottotipi rispetto ai sani.

Confrontando i gruppi DM e CAM si è osservata una differenza significativa di hsa-miR-23b-3p (rispettivamente  $1.681 \pm 638,4$  contro  $737,2 \pm 260$  [CPM];  $p = 0,0073$ ) e di hsa-miR-223-3p (rispettivamente  $28.584 \pm 8.758$  contro  $44.775 \pm 14.627$  [CPM];  $p = 0,0423$ ), come riportato nella *Figura 17*.

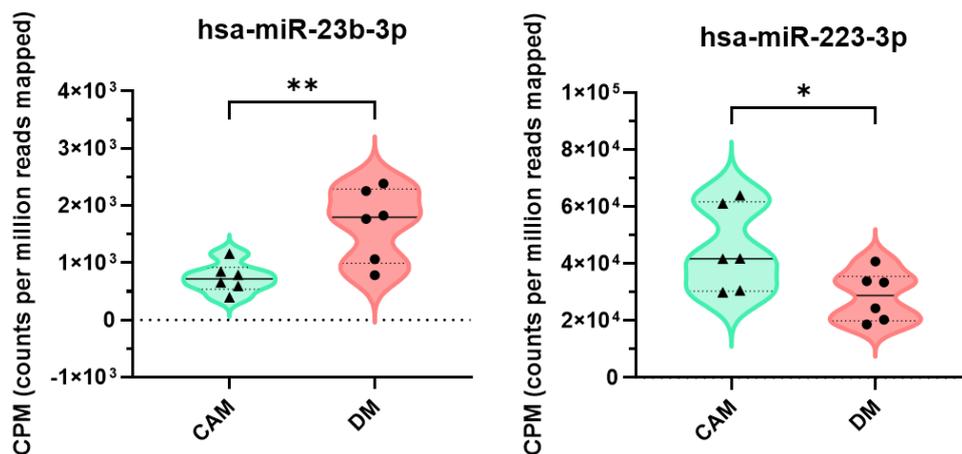


Figura 167. Confronto CAM e DM: si riporta l'espressione differenziale di miR-23b-3p e miR-223-3p.

Si riporta una differenza significativa tra i sottotipi ASyS e CAM che riguarda hsa-miR-23b-3p (rispettivamente  $1.311 \pm 467,3$  contro  $737,2 \pm 260$  [CPM];  $p = 0,0295$ ) e hsa-miR-374a-5p (rispettivamente  $1.472 \pm 845,7$  contro  $2.621 \pm 406,8$  [CPM];  $p = 0,0159$ ), come si vede in Figura 18.

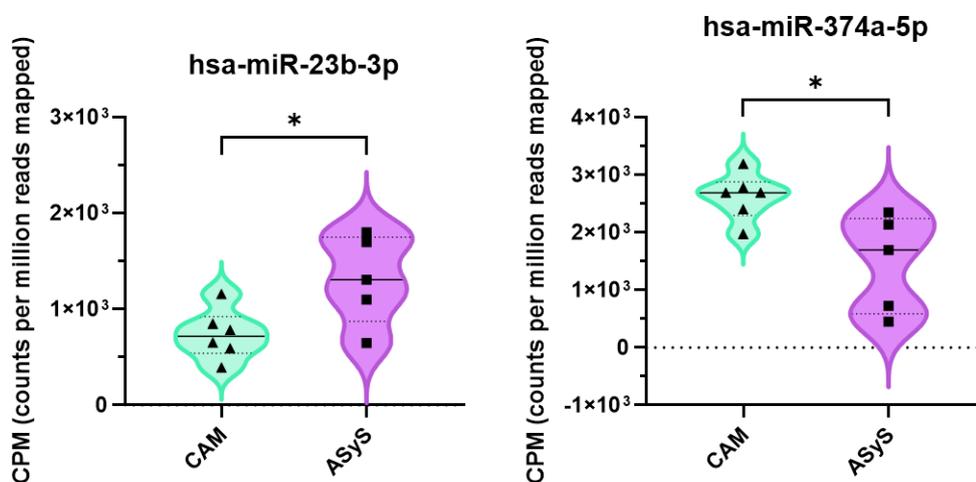
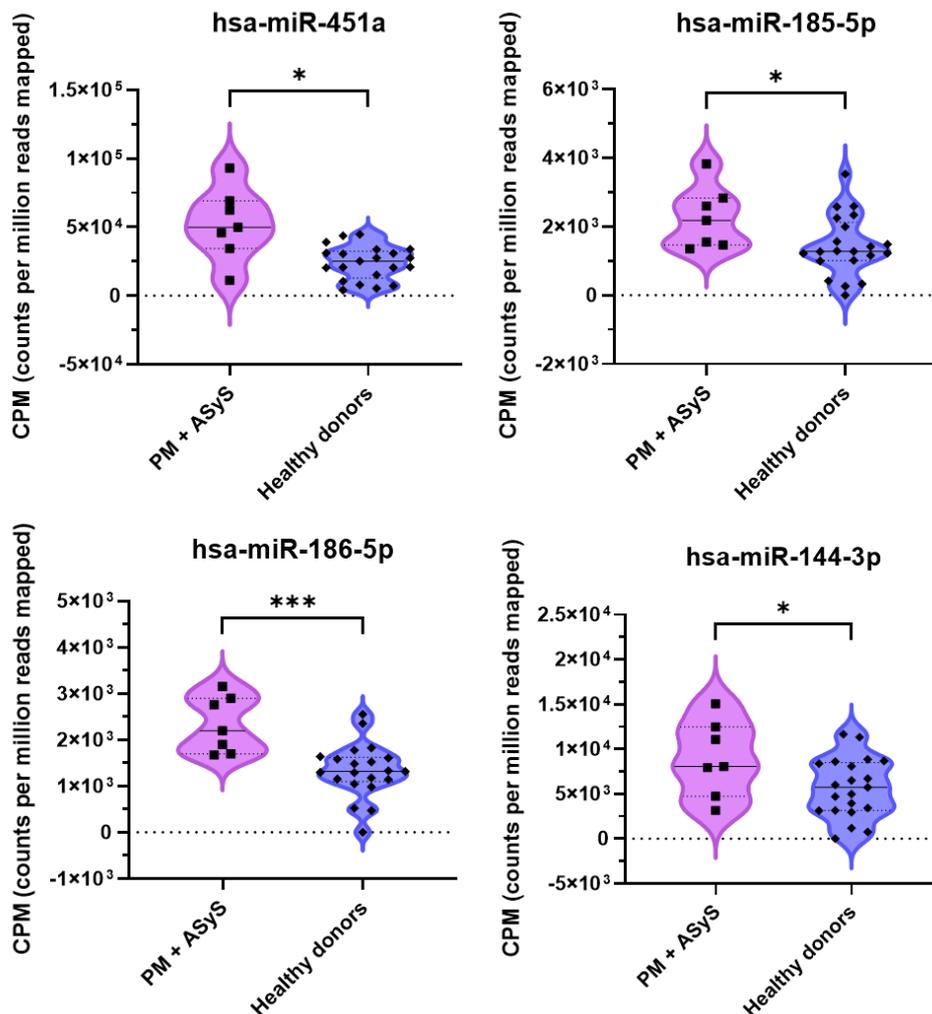


Figura 178. Confronto CAM e ASyS: si riporta l'espressione differenziale di miR-23b-3p e miR-374a-5p.

È stata poi analizzata la differenza di espressione di miRNA tra il gruppo dei sani e il gruppo PM + ASyS ed è emersa una differenza significativa dei seguenti microRNA: hsa-miR-451a (rispettivamente  $23.893 \pm 12.213$  contro  $52.325 \pm 26.170$  [CPM];  $p = 0,0279$ ), hsa-miR-185-5p (rispettivamente  $1.438 \pm 870$  contro  $2.257 \pm 899,4$  [CPM];  $p = 0,0420$ ), hsa-miR-186-5p (rispettivamente  $1.337 \pm 580,3$  contro  $2.325 \pm 607,9$  [CPM];  $p = 0,0007$ ) e hsa-miR-144-3p (rispettivamente  $5.664 \pm 3.294$  contro  $8.931 \pm 4.236$  [CPM];  $p = 0,0439$ ), come è riportato in *Figura 19*.



*Figura 19. Confronto gruppo PM + ASyS e donatori sani: si riporta l'espressione differenziale di miR-451a, miR-185-5p, miR-186-5p, miR-144-3p.*

Per quanto riguarda invece il confronto tra i donatori sani e il gruppo CAM sono risultate le seguenti significatività: hsa-miR-23b-3p (rispettivamente  $1.549 \pm 912,9$  contro  $2.375 \pm 708,1$  [CPM];  $p = 0,0398$ ), hsa-miR-185-5p (rispettivamente  $1.438 \pm 870$  contro  $2.179 \pm 423$  [CPM];  $p = 0,0099$ ), miR-486-5p (rispettivamente  $18.936 \pm 5.357$  contro  $30.215 \pm 8.415$  [CPM];  $p = 0,0005$ ) e hsa-let-7b-5p (rispettivamente  $37.575 \pm 15.988$  contro  $21.072 \pm 3.886$  [CPM];  $p = 0,0205$ ), come è mostrato nella *Figura 20*.

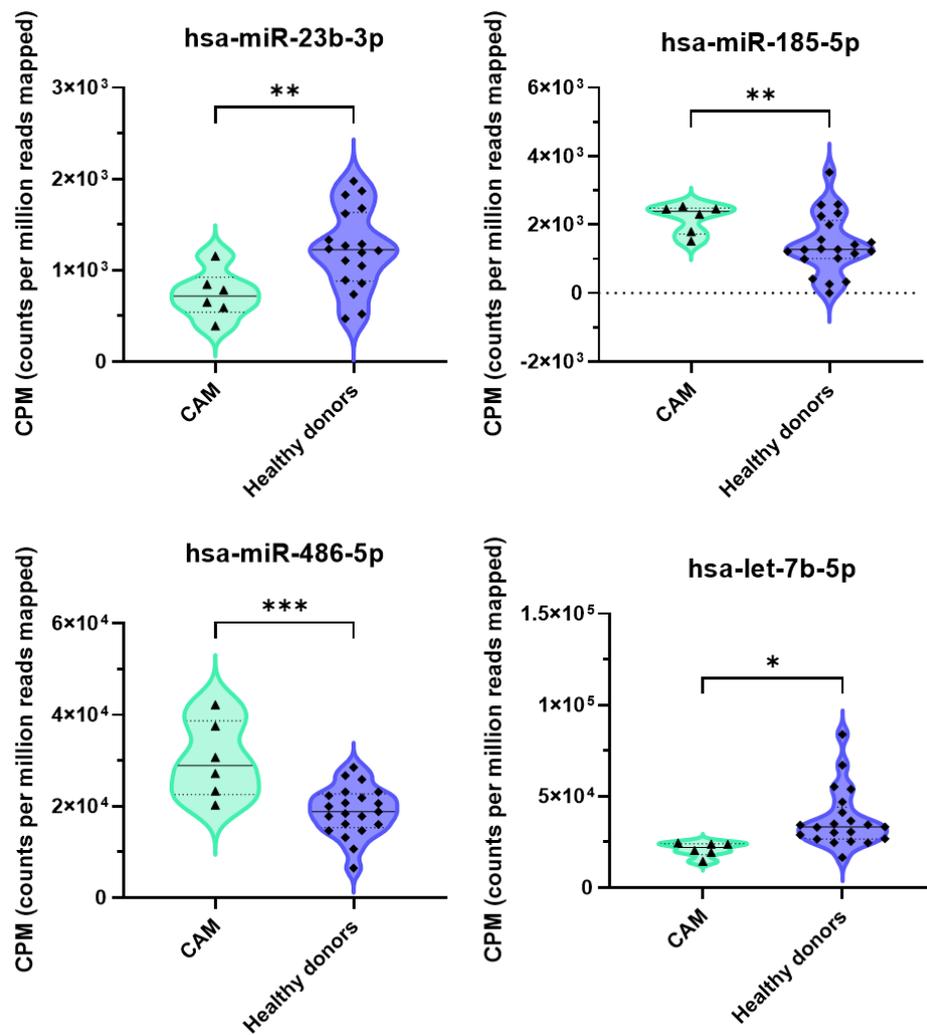


Figura 180. Confronto gruppo CAM e donatori sani: si riporta l'espressione differenziale di miR-23b-3p, miR-185-5p, miR-486-5p, let-7b-5p.

Infine è stata svolta un'analisi per comparare i pazienti con CAM (n = 6) rispetto quelli con diagnosi di MII che non è associata al cancro (n = 15). Dal confronto è emerso che presentano una differente significatività hsa-miR-23b-3p (rispettivamente  $737,2 \pm 260$  contro  $1.357 \pm 935,2$  [CPM]; p = 0,0303) e hsa-miR-374a-5p (rispettivamente  $2.621 \pm 406,8$  contro  $1.726 \pm 940,3$  [CPM]; p = 0,0068), come si osserva nella *Figura 21*.

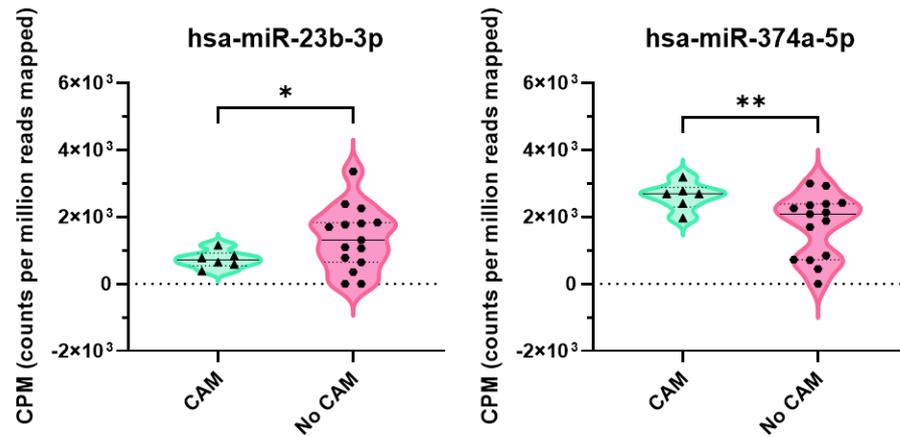


Figura 191. Confronto tra pazienti affetti da MII suddivisi in CAM e no CAM: si riporta l'espressione differenziale di miR-23b-3p, miR-374a-5p.

## 5. DISCUSSIONE

Negli ultimi anni sta diventando sempre più chiaro che le vescicole extracellulari giocano un ruolo centrale come mediatori nella comunicazione intercellulare in un gran numero di scenari fisiologici e patologici.

Infatti le EVs rilasciate da diversi tipi cellulari sono in grado di modulare la funzione immunitaria e modificazioni del loro cargo possono contribuire allo sviluppo di diverse malattie autoimmunitarie<sup>132</sup> come le connettiviti, tra le quali sono comprese le MII, oggetto di questo studio.

Di conseguenza, le EVs sono ottime candidate per il loro utilizzo come biomarcatori a carattere diagnostico e prognostico in numerose condizioni, soprattutto in ambito oncologico e reumatologico.

In questo studio, è stata confermata l'efficienza del metodo attraverso il quale sono state isolate le EVs dal plasma. Infatti si raccomanda la SEC seguita dalla ultrafiltrazione, sostituendo il metodo dell'ultracentrifugazione per evitare di danneggiare le EVs e il loro contenuto. Ciò è dimostrato anche dall'adeguatezza dei risultati sui microRNA estratti dalle vescicole.

L'NTA ha confermato ulteriormente la validità del metodo di isolamento, identificando un pool di EVs di piccole dimensioni le cui concentrazioni misurate sono risultate compatibili con i valori riportati in letteratura ( $\sim 10^{10}$  EVs/mL).

Pertanto è stato possibile confrontare la concentrazione delle EVs tra i sani e i pazienti affetti da MII. È risultato che i pazienti con MII presentano una concentrazione di EVs più elevata rispetto ai controlli sani in accordo con quanto emerso da altri studi<sup>134,135</sup>. Questo risultato non sorprende in quanto è sempre più chiaro che le EVs sono coinvolte in numerosi processi che riguardano l'immunità come l'infiammazione (le EVs promuovono l'attivazione dell'endotelio, la diapedesi leucocitaria e trasportano diverse citochine pro-infiammatorie), la presentazione dell'antigene e l'attivazione dei linfociti T e B<sup>205</sup>, processi che sono implicati e disregolati in malattie autoimmuni come le MII.

Sono richiesti comunque altri studi per stabilire con precisione il ruolo patogenetico delle EVs nei diversi sottotipi di MII nell'ottica di un possibile risvolto diagnostico e terapeutico.

Per quanto riguarda le differenze di concentrazione delle EVs tra i vari sottotipi di MII e i donatori sani, il gruppo delle CAM ha evidenziato una concentrazione aumentata di EVs sia rispetto al gruppo non-CAM ( $p = 0,0249$ ) e soprattutto rispetto ai donatori sani ( $p = 0,0029$ ).

Abbiamo ipotizzato che questo notevole aumento 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 sottotipo, facilitando la diffusione di auto-antigeni dal microambiente neoplastico attraverso una prolungata ed estesa presentazione dell'antigene che, a sua volta, innesca potenti risposte immunitarie con conseguente sviluppo delle manifestazioni paraneoplastiche muscolari<sup>43</sup>.

Bisogna considerare inoltre che nelle neoplasie le EVs 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 mediante il favorire lo "switch angiogenico" e il trasferimento di fattori di crescita<sup>206</sup>.

Perciò l'aumento dei livelli di EVs nelle CAM potrebbe essere spiegato sia da un ruolo nell'indurre la miosite come sindrome paraneoplastica che come meccanismo per promuovere la stessa neoplasia.

A proposito dell'intensità del trattamento farmacologico, abbiamo confrontato i pazienti che assumevano solo CS e quelli che assumevano la terapia in associazione CS + IS, con maggiore effetto immunosoppressivo. Infatti, in quest'ultimo gruppo la concentrazione di EVs si riduce nettamente rispetto ai pazienti trattati con solo CS. I livelli di EVs significativamente più bassi in pazienti trattati con immunosoppressione sistemica suggerisce un impatto dell'intensità dell'immunosoppressione sulla produzione o trafficking delle EVs.

Il passo successivo è stato quello di analizzare il profilo di espressione dei marcatori di superficie delle EVs. Oltre alle tetraspanine (CD9, CD63 e CD81) che hanno confermato si tratti di EVs per lo più di piccole dimensioni, l'analisi con i marcatori linfocitari, CD3 e CD19, ha evidenziato che l'immunofenotipo predominante è CD3<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> che risulta essere notevolmente più rappresentato rispetto a quello CD3<sup>+</sup>. Questo immunofenotipo suggerisce una potenziale origine di queste particelle dalle cellule linfocitarie di tipo B.

Questo risultato trova riscontro in letteratura. Infatti le EVs derivate da linfociti B trasportano complessi peptide-MHC-II, oltre a molecole costimolatorie e di adesione, capaci di attivare cellule T specifiche per quell'antigene, dimostrando la capacità di presentazione dell'antigene da parte delle EVs di derivazione B<sup>207</sup>. La maggiore derivazione delle EVs da parte dei linfociti B è anche concorde con la centrale importanza del braccio umorale dell'immunità adattativa nella patogenesi delle MII come confermato dalle numerose specificità auto-anticorpali che si rilevano in queste malattie.

Sempre più studi confermano il ruolo che le EVs hanno nella patogenesi di numerose malattie autoimmuni in quanto veicolano diversi antigeni (DNA e nucleosomi,  $\alpha$ -enolasi, peptidi citrullinati, gli antigeni SS-A e SS-B e l'antigene Smith) capaci di agire da trigger per scatenare e amplificare i fenomeni autoimmunitari<sup>205</sup>.

Nel contesto delle MII, le EVs ottenute da pazienti con DM sono potenti induttori del rilascio di citochine pro-infiammatorie della famiglia dell'interferone di tipo I, specialmente IFN- $\beta$ , attraverso la pathway di STING attivata dal contenuto di DNA a doppio filamento (dsDNA) presente nelle vescicole extracellulari<sup>208</sup>.

Quindi oltre a quantificare e caratterizzare l'immunofenotipo delle EVs, questo studio ha analizzato il cargo delle EVs in termini di microRNA. L'analisi del cargo delle EVs può essere la chiave di volta per comprendere dal punto di vista meccanicistico e patogenetico in che modo le vescicole influenzino l'attività di cellule immunitarie e tessuti.

La letteratura non presenta numerose evidenze sul cargo di microRNA delle EVs essendo un ambito di ricerca recente, specialmente per patologie rare come le MII.

Nel nostro studio, l'analisi sull' EVs-miRNA condotta in maniera preliminare su 21 pazienti affetti da MII e 21 donatori sani, ha fatto emergere un profilo di espressione differenziale dei EVs-miRNA tra i due gruppi.

Vengono di seguito analizzati gli EVs-miRNA emersi dalle indagini e dai confronti eseguiti sulla coorte oggetto di studio.

**miR-451a** è risultato up-regolato nei pazienti affetti da MII e nel confronto tra i vari sottotipi di MII è up-regolato sia nelle CAM che nel gruppo PM + ASyS rispetto ai donatori sani.

miR-451a presenta effetti anti-infiammatori e anti-migrazione cellulare mediati dalla soppressione dell'espressione di IL-6 e TNF- $\alpha$ ; un lavoro<sup>209</sup> descrive che alti livelli di miR-451a nei PBMC di soggetti in uno stadio pre-clinico di AR (positività agli anticorpi anti-peptidi citrullinati in assenza di segni clinici di malattia) sono potenziali biomarcatori di un rischio più elevato di sviluppare AR nella forma conclamata<sup>209</sup>. È interessante osservare come la letteratura riporta che una down-regolazione di miR-451a esosomiale dal liquido sinoviale di pazienti affetti da AR è associato ad una infiammazione articolare di basso grado<sup>210</sup> e che una down-regolazione di miR-451a esosomiale dal siero di pazienti affetti da LES correla con malattia attiva e coinvolgimento renale<sup>211</sup>. Sebbene i nostri risultati riportino un incremento di questo miRNA nei pazienti affetti da MII, bisognerebbe capire come varia l'andamento di miR-451a stratificando i pazienti in relazione all'attività di malattia con l'obiettivo di poter utilizzare questo microRNA come biomarcatore clinico in grado di prevedere eventuali *flare* di malattia prima della comparsa della sintomatologia.

miR-451a sopprime l'invasività e la migrazione delle cellule neoplastiche in diverse neoplasie, dove è spesso down-regolato. Nel nostro studio, il riscontro di una up-regolazione di miR-451a nella CAM potrebbe riflettere l'impronta reattiva di questa manifestazione rispetto all'insorgenza della neoplasia, in quanto si ritiene

che lo sviluppo di una CAM clinicamente evidente correla con una insufficiente risposta del sistema immunitario nel contrastare la neoplasia<sup>44</sup>.

**miR-486-5p** risulta up-regolato, rispetto ai controlli sani, nei pazienti affetti da MII e più specificamente nel gruppo delle miositi associate a cancro.

miR-486-5p è over-espresso assieme ad altri microRNA esosomiali nell'adenocarcinoma polmonare dove, secondo questo studio<sup>212</sup>, possono essere usati come biomarcatori di diagnosi precoce. La funzione di miR-486-5p non è ancora ben caratterizzata tuttavia secondo *Cai et al.*<sup>213</sup> l'oncogene EVI5 è regolato direttamente da miR-486-5p, e l'asse miR-486-5p-EVI5 è responsabile della migrazione e dell'invasività delle cellule neoplasiche di NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer) attraverso la via di segnale di TGF- $\beta$ /Smad.

miR-486-5p è stato trovato disregolato anche nel carcinoma prostatico dove la sua over-espressione stimola diverse vie oncogeniche attraverso la soppressione di FOXO1 e PTEN che agiscono come regolatori negativi del signaling di PI3K/Akt<sup>214</sup>.

Verosimilmente questo miR-486-5p svolge anche funzioni immunomodulatorie dato che dall'analisi bioinformatica è emerso il coinvolgimento di questo microRNA nelle vie di signaling tipo MAPK, PI3K/Akt e mTOR che sono cruciali anche per le cellule immunitarie.

I nostri dati confermano che questo microRNA è implicato soprattutto nelle miositi associate a cancro risultando infatti up-regolato rispetto ai sani e agli altri sottotipi di miosite analizzati.

Le analisi su **miR-222-3p** mostrano che è up-regolato nei pazienti affetti da MII rispetto ai sani; infatti questo miRNA è coinvolto nella regolazione dell'immunità. miR-222-3p (indotto trascrizionalmente da NF- $\kappa$ B) controlla negativamente TNFAIP3 che inibisce il signaling del TNF $\alpha$ . Inoltre un altro target di miR-222-3p è IRF-2, fattore di trascrizione che inibisce l'attivazione di IFN $\alpha$ / $\beta$ . Si tratta quindi di un microRNA che regola in maniera importante l'immunità innata; una sua up-regolazione si traduce perciò in uno stimolo pro-infiammatorio guidato da TNF $\alpha$  e IFN $\alpha$ / $\beta$ <sup>215</sup>.

Inoltre nel confronto dei diversi sottotipi di MII, è emerso che miR-222-3p è up-regolato in maniera significativa nei soggetti con DM. Questo dato è interessante poiché è noto che nella DM un ruolo patogenetico importante è affidato al pathway dell'interferone (IFN- $\beta$ ) e miR-222-3p promuove in maniera particolare la sua up-regolazione.

Una disregolazione del miR-222-3p è stata riportata anche nei pazienti affetti da sindrome di Sjögren primaria dove regola, assieme ad altri miRNA, la funzione delle cellule B e T nel tessuto delle ghiandole salivari<sup>216</sup>.

Sono però pochi i lavori pubblicati sull'espressione di miR-222-3p contenuto nelle vescicole extracellulari, soprattutto nell'ambito delle connettiviti. Tuttavia, questo lavoro<sup>217</sup> ha dimostrato che gli esosomi rilasciati dal cancro ovarico di tipo epiteliale contengono elevati livelli di miR-222-3p che sono capaci di indurre nei macrofagi associati alla neoplasia una polarizzazione verso il fenotipo M2. Questo aspetto interessante potrebbe essere messo in relazione con il fatto che l'analisi sierica del profilo citochinico in pazienti con PM/DM associate a ILD, secondo quanto riportato da uno studio<sup>218</sup>, ha evidenziato che i livelli sierici di M-CSF e IL-10 (citochine associate al fenotipo macrofagico M2) sono risultati più elevati delle citochine del profilo macrofagico M1 nei pazienti con DM positiva per anti-MDA5 rispetto ai pazienti con sindrome anti-sintetetica.

**miR-185-5p** si è visto essere coinvolto nelle vie di segnale mediate da citochine e tra i suoi geni target presenta *TGFB1*, *IGF1R* e *VEGFA*. Uno studio<sup>210</sup> ha valutato l'espressione differenziale dei microRNA esosomiali, ottenuti da campioni di liquido sinoviale, nei pazienti affetti da artrite reumatoide suddivisi in alto e basso grado di infiammazione articolare, in base alla conta leucocitaria sinoviale. È emerso che il miR-185-5p è up-regolato nel gruppo di pazienti con infiammazione di alto grado insieme ad altri 77 EVs miRNA. Si tratta quindi di un microRNA ad azione flogistica seppur i meccanismi d'azione precisi non sono stati ancora identificati.<sup>210</sup>

Nel cancro il ruolo di miR-185-5p è ambiguo, tuttavia sempre più evidenze propendono verso un suo ruolo come oncosoppressore essendo down-regolato in diverse neoplasie come NSCLC, carcinoma mammario, cancro gastrico e

glioblastoma nelle quali la sua soppressione garantisce alla neoplasia la capacità di invadere e metastatizzare mediante la transizione epitelio-mesenchimale<sup>219</sup>.

I nostri dati evidenziano come questo miRNA sia up-regolato nei pazienti affetti da MII e anche nel confronto tra sani e pazienti con CAM appare up-regolato. Quest'ultimo dato è interessante perché sebbene nelle neoplasie miR-185-5p sia down-regolato, bisogna tenere presente che le CAM sono manifestazioni reattive nelle quali il processo immunitario scatenato dalla neoplasia espone neo-antigeni che sono poi capaci di agire da trigger nel muscolo e nella cute (come accade per il già citato TIF1- $\gamma$ ). Le CAM sono quindi il risultato di una neoplasia alla quale si aggiunge il danno immuno-mediato ad altri tessuti; di conseguenza la sovrapposizione di questi fenomeni potrebbe riflettersi anche nel contenuto di miRNA nelle EVs. Altre indagini potrebbero essere utili per chiarire questo aspetto e creare un pannello che differenzi una CAM da una neoplasia nella quale non vi è quel coinvolgimento paraneoplastico.

**miR-32-5p** è up-regolato nei pazienti affetti da MII e nel confronto tra i fenotipi di miopatie infiammatorie e sani è risultato up-regolato nel gruppo PM + ASyS. Non sono state riportate in letteratura specifiche funzioni immuno-regolatorie di tale microRNA per cui il suo aumento nel gruppo di miositi e, più precisamente, nei sottotipi PM e ASyS non è chiaro e richiede ulteriori indagini. Neppure altre patologie reumatiche o malattie autoimmuni hanno mai riportato questo miRNA. In letteratura è stato invece studiato come regolatore cruciale del processo di metastatizzazione e di chemio-resistenza. A tal proposito, uno studio ha riportato che l'over-espressione di miR-32-5p esosomiale ha attivato la via PI3K/Akt mediante la soppressione di PTEN e ha indotto chemio-resistenza, promuovendo l'angiogenesi e la transizione epitelio-mesenchimale (EMT)<sup>220</sup>. Un altro studio ha osservato che l'up-regolazione di miR-32-5p contribuisce al dolore neuropatico degradando la proteina Dusp5, una fosfatasi che controlla negativamente la via di signaling delle MAPK, nella microglia. Inoltre l'up-regolazione di miR-32-5p ha aumentato la produzione di citochine pro-infiammatorie e la neuro-infiammazione<sup>221</sup>.

**miR-15a-5p** è risultato up-regolato nei pazienti con MII rispetto ai sani. Questo miRNA ha importanti funzioni immuno-regolatorie soprattutto a carico dell'immunità adattativa come dimostrato nel LES, in cui la sua up-regolazione, agendo su geni target coinvolti nel ciclo cellulare (ciclina D1) e nell'apoptosi (Bcl-2), promuove la sopravvivenza di linfociti B reattivi e incrementa la produzione di auto-anticorpi anti-dsDNA<sup>184</sup>. È quindi verosimile, dato l'importanza che riveste la produzione anticorpale nelle MII, che questo miRNA agisca in modalità simili anche nelle miositi.

I microRNA della **famiglia let-7**, in modo particolare let-7a-5p, let-7b-5p, let-7e-5p e let-7f-5p, sono risultati down-regolati nel gruppo dei pazienti affetti da MII rispetto ai donatori sani. Inoltre il let-7b-5p, stratificando le MII tra diversi fenotipi di malattia, si è mantenuto down-regolato nel gruppo delle CAM rispetto ai sani.

Questa famiglia di miRNA svolge numerose funzioni anti-infiammatorie modulando l'attività dell'IL-6, del TNF- $\alpha$  e il signaling dei Toll-like receptor (TLR)<sup>215</sup>, ed è disregolato in numerose patologie autoimmuni reumatiche come LES e la sclerosi sistemica<sup>222,223</sup>.

Il ruolo di questi miRNA nelle MII non è stato ancora ben definito e studiato, tuttavia il nostro risultato appare concorde con la funzione anti-infiammatoria di questi microRNA e con il riscontro della loro down-regolazione in numerose malattie autoimmuni.

È interessante che, nel confronto tra i diversi fenotipi di malattia, let-7b-5p si è mantenuto significativamente down-regolato nel gruppo CAM rispetto ai controlli sani. Infatti questa famiglia di miRNA è implicata nel cancro come miRNA ad azione oncosoppressoria e regolatoria negativa delle cellule staminali cancerose (*Cancer Stem Cells*, CSC) ed è down-regolato in numerose neoplasie<sup>224</sup>. Tuttavia è necessario aumentare la numerosità dei pazienti per capire se questa down-regolazione si mantiene significativa anche per altri fenotipi di MII dove verosimilmente questa famiglia di miRNA può essere coinvolta per il suo ruolo anti-infiammatorio.

**miR-223-3p** è significativamente disregolato nel confronto tra il gruppo CAM e quello delle DM, dove risulta down-regolato. Questo miRNA è implicato nella dermatomiosite nella quale la sua down-regolazione è stata associata alla comparsa delle papule di Gottron<sup>199</sup>; inoltre i livelli plasmatici di questo miRNA sono più bassi tanto maggiore ed esclusivo è il coinvolgimento cutaneo. Sarebbe interessante, con analisi successive, andare a valutare se i livelli di questo miRNA correlano con l'attività di malattia della DM e se sono maggiormente down-regolati in fenotipi di DM ad esclusivo coinvolgimento cutaneo come le CADM.

**miR-186-5p** è risultato up-regolato nel gruppo di pazienti con PM + ASyS rispetto agli altri fenotipi di MII analizzati (DM e CAM) e ai controlli sani; è inoltre up-regolato anche nel confronto tra donatori sani e il gruppo PM + ASyS.

Le funzioni di questo miRNA sono numerose e coinvolgono diverse malattie, dal cancro alle patologie cardiovascolari. Sono poche le informazioni di miR-186-5p come immuno-modulatore tuttavia è risultato significativamente aumentato nei PBMC dei pazienti affetti da LES<sup>225</sup>. I dati del nostro studio si inseriscono in questo contesto e richiedono ulteriori indagini. È interessante come miR-186-5p sia specificamente up-regolato nel gruppo di pazienti con sindrome anti-sintetasi perciò si potrebbe valutare l'espressione di questo miRNA in relazione ad alcuni parametri clinici di questa sindrome, come la presenza di ILD, oppure in relazione al pattern anticorpale specifico.

**miR-374a-5p** è risultato specificamente aumentato nel gruppo con ASyS quando confrontato con le CAM. Il ruolo di miR-374a-5p nelle malattie autoimmuni reumatiche non è stato ancora esplorato per cui l'interpretazione del nostro risultato richiede ancora ulteriori approfondimenti.

Il **miR-23b-3p** presenta una espressione differenziale tra i vari fenotipi di malattia. È risultato sempre down-regolato nel gruppo CAM quando confrontato con DM, con ASyS, con i donatori sani e nel confronto CAM rispetto a tutte le altre miositi non associate al cancro.

Si tratta di un dato significativo perché questo miRNA ha le potenzialità di essere un biomarcatore specifico per le miositi associate al cancro permettendo di

distinguerle non solo dai controlli sani ma anche, e soprattutto, dagli altri fenotipi di malattia. Poiché le CAM sono sindromi paraneoplastiche nella quale la manifestazione muscolo-cutanea può anticipare anche di due anni l'esordio clinico della neoplasia, avere a disposizione l'EVs miR-23b-3p potrebbe essere un valido aiuto per indirizzare questi pazienti a controlli mirati per la ricerca della neoplasia. In letteratura tuttavia il ruolo di miR-23b-3p nella biologia del cancro è complesso in quanto può agire sia da miRNA oncosoppressore (*tumor suppressor microRNA*, ts-miRNA) che da miRNA oncogenico (onco-miRNA). miR-23b-3p regola il ciclo cellulare, il signaling di fattori di crescita, il rimodellamento del citoscheletro, la sopravvivenza cellulare e l'apoptosi, l'autofagia, la migrazione e l'adesione cellulare e la differenziazione cellulare. Sono stati infatti riconosciuti più di 1.332 trascritti come possibili target di miR-23b-3p; questo rende un'idea della complessità dell'attività di questo miRNA<sup>226</sup>.

A titolo d'esempio, miR-23b-3p regola negativamente l'oncogene MET agendo così da oncosoppressore; la sua down-regolazione promuove la trasformazione neoplastica e la metastatizzazione in diverse neoplasie come epatocarcinoma, carcinoma vescicale, carcinoma squamoso del cavo orale e carcinoma della cervice (alcuni dei quali presenti nella nostra casistica di CAM). È stato inoltre caratterizzato il ruolo di questo miRNA negli esosomi rilasciati dal microambiente tumorale che sono capaci di agire in maniera paracrina, e anche endocrina, per promuovere l'invasività e il processo di metastasi<sup>226</sup>.

Complessivamente, i nostri dati, benché preliminari, hanno evidenziato la disregolazione in senso di iper- o ipo-espressione di miRNA appartenenti a diverse famiglie nelle MII, la cui funzione nell'ambito dei subset specifici di malattia richiede comunque ulteriori approfondimenti e saggi funzionali. I nostri risultati suggeriscono un razionale nell'ulteriore caratterizzazione degli EVs-miRNA nelle MII come possibili biomarcatori di uno specifico subset di malattia, nell'ottica di una diagnosi precoce basata sulla stratificazione endotipica dei soggetti.

In questa prospettiva, la caratterizzazione di una impronta epigenetica per fenotipi specifici di MII potrebbe inoltre aprire la strada all'identificazione di nuove pathway implicate in queste malattie e, da qui, indirizzare al meglio i trattamenti terapeutici.

## 6. CONCLUSIONI

In conclusione, questo studio ha mostrato come le vescicole extracellulari siano coinvolte nelle miopatie infiammatorie idiopatiche e che le loro modificazioni riflettono diversi fenotipi di malattia.

La caratterizzazione dell'immunofenotipo delle EVs ha dimostrato la plausibile origine cellulare da parte dei linfociti B, confermando che il braccio umorale dell'immunità adattiva è maggiormente coinvolto nel processo autoimmune di queste patologie.

L'analisi preliminare sul cargo di miRNA delle EVs ha aperto il mondo della regolazione epigenetica fondamentale nell'innescare e nel mantenimento del processo autoimmunitario che caratterizza queste patologie.

Dall'analisi dei nostri dati è emerso che nel gruppo dei pazienti affetti da MII sono disregolati numerosi miRNA (10 identificati) che svolgono diverse funzioni immunoregatorie a carico dell'immunità innata e adattativa. Alcuni di questi hanno trovato riscontro anche in altre patologie reumatiche autoimmuni.

Ancora più interessante è stata l'analisi dell'espressione differenziale degli EVs-miRNA tra i diversi fenotipi di MII rispetto ai sani. Questo dato, al di là delle funzioni patogenetiche dei miRNA che dovranno essere caratterizzate, indirizza verso la definizione di EVs-miRNA disregolati in uno specifico fenotipo di miopatia infiammatoria idiopatica.

La maggiore limitazione del nostro studio risiede ancora nella limitata numerosità campionaria dei singoli sottotipi di malattia, per cui i dati sono ancora preliminari. D'altra parte, il punto di forza maggiore è la caratterizzazione ad ampio spettro non solo dell'assetto quantitativo ma anche qualitativo/fenotipico delle EVs e del loro contenuto in malattie rare come le MII, che apre la strada alla identificazione di EVs miRNA come biomarcatori specifici di MII e, in misura ancora più importante, specifici per i numerosi fenotipi di miopatie infiammatorie.

In questo modo può essere possibile determinare con un pannello di EVs miRNA l'impronta epigenetica di ogni tipologia di malattia racchiusa da una variegata e, ormai fin troppo, eterogenea definizione di MII.

## BIBLIOGRAFIA

1. Punzi L., Doria A. *Core Curriculum. Reumatologia. McGraw-Hill.*; 2014.
2. Lundberg IE, Fujimoto M, Vencovsky J, et al. Idiopathic inflammatory myopathies. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1). doi:10.1038/s41572-021-00321-x
3. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and Dermatomyositis. *New England Journal of Medicine*. 1975;292(7):344-347. doi:10.1056/NEJM197502132920706
4. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and Dermatomyositis. *New England Journal of Medicine*. 1975;292(8):403-407. doi:10.1056/NEJM197502202920807
5. Lundberg IE, de Visser M, Werth VP. Classification of myositis. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(5):269-278. doi:10.1038/nrrheum.2018.41
6. Tanimoto K, Nakano K, Kano S, et al. Classification criteria for polymyositis and dermatomyositis. *J Rheumatol*. 1995;22(4):668-674.
7. Targoff IN, Miller FW, Medsger TA, Oddis C v. Classification criteria for the idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol*. 1997;9(6):527-535. doi:10.1097/00002281-199711000-00008
8. Dalakas MC, Hohlfeld R. Polymyositis and dermatomyositis. *The Lancet*. 2003;362(9388):971-982. doi:10.1016/S0140-6736(03)14368-1
9. Troyanov Y, Targoff IN, Tremblay JL, Goulet JR, Raymond Y, Sénécal JL. Novel classification of idiopathic inflammatory myopathies based on overlap syndrome features and autoantibodies: Analysis of 100 French Canadian patients. *Medicine*. 2005;84(4):231-249. doi:10.1097/01.md.0000173991.74008.b0
10. Hoogendijk JE, Amato AA, Lecky BR, et al. 119th ENMC international workshop: Trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10-12 October 2003, Naarden, The Netherlands. In: *Neuromuscular Disorders*. Vol 14. ; 2004:337-345. doi:10.1016/j.nmd.2004.02.006
11. Allenbach Y, Drouot L, Rigolet A, et al. Anti-HMGCR autoantibodies in european patients with autoimmune necrotizing myopathies: Inconstant exposure to statin. *Medicine (United States)*. 2014;93(3):150-157. doi:10.1097/MD.0000000000000028

12. Lundberg IE, Tjärnlund A, Bottai M, et al. 2017 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies and their major subgroups. In: *Annals of the Rheumatic Diseases*. Vol 76. ; 2017:1955-1964. doi:10.1136/annrheumdis-2017-211468
13. Noguchi E, Uruha A, Suzuki S, et al. Skeletal muscle involvement in antisynthetase syndrome. *JAMA Neurol*. 2017;74(8):992-999. doi:10.1001/jamaneurol.2017.0934
14. Mahler M, Miller FW, Fritzler MJ. Idiopathic inflammatory myopathies and the anti-synthetase syndrome: A comprehensive review. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4-5):367-371. doi:10.1016/j.autrev.2014.01.022
15. Connors GR, Christopher-Stine L, Oddis C v, Danoff SK. Interstitial lung disease associated with the idiopathic inflammatory myopathies: what progress has been made in the past 35 years? *Chest*. 2010;138(6):1464-1474. doi:10.1378/chest.10-0180
16. Solomon J, Swigris JJ, Brown KK. Doença pulmonar intersticial relacionada a miosite e a síndrome antissintetase. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2011;37(1):100-109. doi:10.1590/S1806-37132011000100015
17. So H, So J, Lam TT, et al. Performance of the 2017 EULAR/ACR classification criteria in anti-MDA5 associated idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis & Rheumatology*. Published online July 26, 2022. doi:10.1002/art.42150
18. Jones J, Wortmann R. Idiopathic inflammatory myopathies—a review. *Clin Rheumatol*. 2015;34(5):839-844. doi:10.1007/s10067-015-2891-4
19. Hengstman GJD, van Venrooij WJ, Vencovsky J, Moutsopoulos HM, van Engelen BGM. The relative prevalence of dermatomyositis and polymyositis in Europe exhibits a latitudinal gradient. *Ann Rheum Dis*. 2000;59(2):141-142. doi:10.1136/ard.59.2.141
20. Meyer A, Meyer N, Schaeffer M, Gottenberg JE, Geny B, Sibilia J. Incidence and prevalence of inflammatory myopathies: A systematic review. *Rheumatology (United Kingdom)*. 2014;54(1):50-63. doi:10.1093/rheumatology/keu289
21. Rothwell S, Cooper RG, Lundberg IE, 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):1558-1566. doi:10.1136/annrheumdis-2015-208119
22. Miller FW, Lamb JA, Schmidt J, Nagaraju K. Risk factors and disease mechanisms in myositis. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(5):255-268. doi:10.1038/nrrheum.2018.48
  23. Rothwell S, Chinoy H, Lamb JA, et al. Focused HLA analysis in Caucasians with myositis identifies significant associations with autoantibody subgroups. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(7):996-1002. doi:10.1136/annrheumdis-2019-215046
  24. Dalakas MC. Inflammatory myopathies: Update on diagnosis, pathogenesis and therapies, and COVID-19-related implications. *Acta Myologica*. 2020;39(4):289-301. doi:10.36185/2532-1900-032
  25. Dalakas MC, Rakocevic G, Shatunov A, Goldfarb L, Raju R, Salajegheh M. Inclusion body myositis with human immunodeficiency virus infection: Four cases with clonal expansion of viral-specific T cells. *Ann Neurol*. 2007;61(5):466-475. doi:10.1002/ana.21103
  26. Burd CJ, Kinyamu HK, Miller FW, Archer TK. UV radiation regulates Mi-2 through protein translation and stability. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(50):34976-34982. doi:10.1074/jbc.M805383200
  27. Mammen AL, Chung T, Christopher-Stine L, et al. Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Rheum*. 2011;63(3):713-721. doi:10.1002/art.30156
  28. Allenbach Y, Benveniste O, Stenzel W, Boyer O. Immune-mediated necrotizing myopathy: clinical features and pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol*. 2020;16(12):689-701. doi:10.1038/s41584-020-00515-9
  29. Liu SW, Velez NF, Lam C, et al. Dermatomyositis induced by anti-tumor necrosis factor in a patient with juvenile idiopathic arthritis. *JAMA Dermatol*. 2013;149(10):1204-1208. doi:10.1001/jamadermatol.2013.5220
  30. Carroll GJ, Will RK, Peter JB, Garlepp MJ, Dawkins RL. Penicillamine induced polymyositis and dermatomyositis. *J Rheumatol*. 1987;14(5):995-1001.

31. Rothwell S, Chinoy H, Lamb JA. Genetics of idiopathic inflammatory myopathies: Insights into disease pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol*. 2019;31(6):611-616. doi:10.1097/BOR.0000000000000652
32. Iaccarino L, Ghirardello A, Bettio S, et al. The clinical features, diagnosis and classification of dermatomyositis. *J Autoimmun*. 2014;48-49:122-127. doi:10.1016/j.jaut.2013.11.005
33. Dalakas MC. Inflammatory Muscle Diseases. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(18):1734-1747. doi:10.1056/NEJMra1402225
34. Greenberg SA. Dermatomyositis and type 1 interferons. *Curr Rheumatol Rep*. 2010;12(3):198-203. doi:10.1007/s11926-010-0101-6
35. Loredó Martínez M, Zampieri S, Franco C, Ghirardello A, Doria A, Gatto M. Nonimmune mechanisms in idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol*. 2020;32(6):515-522. doi:10.1097/BOR.0000000000000748
36. Greenberg SA. Inclusion body myositis: clinical features and pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol*. 2019;15(5):257-272. doi:10.1038/s41584-019-0186-x
37. Greenberg SA. Proposed immunologic models of the inflammatory myopathies and potential therapeutic implications. *Neurology*. 2007;69(21):2008-2019. doi:10.1212/01.WNL.0000291619.17160.b8
38. Arouche-Delaperche L, Allenbach Y, Amelin D, et al. Pathogenic role of anti-signal recognition protein and anti-3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase antibodies in necrotizing myopathies: Myofiber atrophy and impairment of muscle regeneration in necrotizing autoimmune myopathies. *Ann Neurol*. 2017;81(4):538-548. doi:10.1002/ana.24902
39. Grable-Esposito P, Katzberg HD, Greenberg SA, Srinivasan J, Katz J, Amato AA. Immune-mediated necrotizing myopathy associated with statins. *Muscle Nerve*. 2010;41(2):185-190. doi:10.1002/mus.21486
40. Casciola-Rosen L, Nagaraju K, Plotz P, et al. Enhanced autoantigen expression in regenerating muscle cells in idiopathic inflammatory myopathy. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;201(4):591-601. doi:10.1084/jem.20041367

41. Gallay L, Gayed C, Hervier B. Antisynthetase syndrome pathogenesis: knowledge and uncertainties. *Curr Opin Rheumatol.* 2018;30(6):664-673. doi:10.1097/BOR.0000000000000555
42. Opinc AH, Makowska JS. Antisynthetase syndrome – much more than just a myopathy. *Semin Arthritis Rheum.* 2021;51(1):72-83. doi:10.1016/j.semarthrit.2020.09.020
43. Suber TL, Casciola-Rosen L, Rosen A. Mechanisms of disease: Autoantigens as clues to the pathogenesis of myositis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008;4(4):201-209. doi:10.1038/ncprheum0760
44. de Vooght J, Vulsteke JB, de Haes P, Bossuyt X, Lories R, de Langhe E. Anti-TIF1-γ autoantibodies: Warning lights of a tumour autoantigen. *Rheumatology (United Kingdom).* 2020;59(3):469-477. doi:10.1093/rheumatology/kez572
45. Ghirardello A, Zampieri S, Tarricone E, Iaccarino L, Gorza L, Doria A. Cutting edge issues in polymyositis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011;41(2):179-189. doi:10.1007/s12016-010-8238-7
46. Manger B, Schett G. Paraneoplastic syndromes in rheumatology. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(11):662-670. doi:10.1038/nrrheum.2014.138
47. Larson ST, Wilbur J. Muscle Weakness in Adults: Evaluation and Differential Diagnosis. *Am Fam Physician.* 2020;101(2):95-108.
48. Gadiparthi C, Hans A, Potts K, Ismail MK. Gastrointestinal and Hepatic Disease in the Inflammatory Myopathies. *Rheumatic Disease Clinics of North America.* 2018;44(1):113-129. doi:10.1016/j.rdc.2017.09.006
49. Mammen AL. Autoimmune myopathies: Autoantibodies, phenotypes and pathogenesis. *Nat Rev Neurol.* 2011;7(6):343-354. doi:10.1038/nrneurol.2011.63
50. Witt LJ, Curran JJ, Streck ME. The Diagnosis and Treatment of Antisynthetase Syndrome. *Clin Pulm Med.* 2016;23(5):218-226. doi:10.1097/CPM.0000000000000171
51. Long K, Danoff SK. Interstitial Lung Disease in Polymyositis and Dermatomyositis. *Clin Chest Med.* 2019;40(3):561-572. doi:10.1016/j.ccm.2019.05.004

52. Graham J, Bauer Ventura I, Newton CA, et al. Myositis-specific antibodies identify a distinct interstitial pneumonia with autoimmune features phenotype. *European Respiratory Journal*. 2020;56(6):2001205. doi:10.1183/13993003.01205-2020
53. Gasparotto M, Gatto M, Saccon F, Ghirardello A, Iaccarino L, Doria A. Pulmonary involvement in antisynthetase syndrome. *Curr Opin Rheumatol*. 2019;31(6):603-610. doi:10.1097/BOR.0000000000000663
54. Barba T, Mainbourg S, Nasser M, Lega JC, Cottin V. Lung Diseases in Inflammatory Myopathies. *Semin Respir Crit Care Med*. 2019;40(02):255-270. doi:10.1055/s-0039-1685187
55. Hallowell R, Ascherman D, Danoff S. Pulmonary Manifestations of Polymyositis/Dermatomyositis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2014;35(02):239-248. doi:10.1055/s-0034-1371528
56. Hayashi S, Tanaka M, Kobayashi H, et al. High-resolution computed tomography characterization of interstitial lung diseases in polymyositis/dermatomyositis. *J Rheumatol*. 2008;35(2):260-269.
57. Nombel A, Fabien N, Coutant F. Dermatomyositis With Anti-MDA5 Antibodies: Bioclinical Features, Pathogenesis and Emerging Therapies. *Front Immunol*. 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.773352
58. Rasuli B, Weerakkody Y. Usual interstitial pneumonia. In: *Radiopaedia.Org*. Radiopaedia.org; 2012. doi:10.53347/rID-16895
59. Jayakumar D, Zhang R, Wasserman A, Ash J. Cardiac Manifestations in Idiopathic Inflammatory Myopathies. *Cardiol Rev*. 2019;27(3):131-137. doi:10.1097/CRD.0000000000000241
60. Lundberg IE. The heart in dermatomyositis and polymyositis. *Rheumatology*. 2006;45(suppl\_4):iv18-iv21. doi:10.1093/rheumatology/ke1311
61. Rai SK, Choi HK, Sayre EC, Aviña-Zubieta JA. Risk of myocardial infarction and ischaemic stroke in adults with polymyositis and dermatomyositis: a general population-based study. *Rheumatology*. Published online September 30, 2015:kev336. doi:10.1093/rheumatology/kev336

62. Oldroyd A, Chinoy H. Recent developments in classification criteria and diagnosis guidelines for idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol*. 2018;30(6):606-613. doi:10.1097/BOR.0000000000000549
63. Lloyd TE, Mammen AL, Amato AA, Weiss MD, Needham M, Greenberg SA. Evaluation and construction of diagnostic criteria for inclusion body myositis. *Neurology*. 2014;83(5):426-433. doi:10.1212/WNL.0000000000000642
64. Briani C, Doria A, Sarzi-Puttini P, Dalakas MC. Update on idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity*. 2006;39(3):161-170. doi:10.1080/08916930600622132
65. Ghirardello A, Bassi N, Palma L, et al. Autoantibodies in Polymyositis and Dermatomyositis. *Curr Rheumatol Rep*. 2013;15(6):335. doi:10.1007/s11926-013-0335-1
66. Alenzi F. Myositis Specific Autoantibodies: A Clinical Perspective. *Open Access Rheumatol*. 2020;Volume 12:9-14. doi:10.2147/OARRR.S231195
67. Liang L, Zhang YM, Chen H, et al. Anti-Mi-2 antibodies characterize a distinct clinical subset of dermatomyositis with favourable prognosis. *European Journal of Dermatology*. 2020;30(2):151-158. doi:10.1684/ejd.2020.3750
68. McHugh NJ, Tansley SL. Autoantibodies in myositis. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(5):290-302. doi:10.1038/nrrheum.2018.56
69. Fiorentino D, Chung L, Zwerner J, Rosen A, Casciola-Rosen L. The mucocutaneous and systemic phenotype of dermatomyositis patients with antibodies to MDA5 (CADM-140): A retrospective study. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65(1):25-34. doi:10.1016/j.jaad.2010.09.016
70. Jia E, Wei J, Geng H, et al. Diffuse pruritic erythema as a clinical manifestation in anti-SAE antibody-associated dermatomyositis: a case report and literature review. *Clin Rheumatol*. 2019;38(8):2189-2193. doi:10.1007/s10067-019-04562-w
71. Fiorentino DF, Chung LS, Christopher-Stine L, et al. Most Patients With Cancer-Associated Dermatomyositis Have Antibodies to Nuclear Matrix Protein NXP-2 or Transcription Intermediary Factor 1γ. *Arthritis Rheum*. 2013;65(11):2954-2962. doi:10.1002/art.38093

72. Hengstman GJD, ter Laak HJ, Vree Egberts WTM, et al. Anti-signal recognition particle autoantibodies: marker of a necrotising myopathy. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(12):1635-1638. doi:10.1136/ard.2006.052191
73. Greenberg SA. Cytoplasmic 5'-nucleotidase autoantibodies in inclusion body myositis: Isotypes and diagnostic utility. *Muscle Nerve*. 2014;50(4):488-492. doi:10.1002/mus.24199
74. del Grande F, Carrino JA, del Grande M, Mammen AL, Stine LC. Magnetic Resonance Imaging of Inflammatory Myopathies. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*. 2011;22(2):39-43. doi:10.1097/RMR.0b013e31825b2c35
75. Tanboon J, Nishino I. Classification of idiopathic inflammatory myopathies: pathology perspectives. *Curr Opin Neurol*. 2019;32(5):704-714. doi:10.1097/WCO.0000000000000740
76. de Bleecker JL, Lundberg IE, de Visser M. 193rd ENMC International workshop Pathology diagnosis of idiopathic inflammatory myopathies 30 November – 2 December 2012, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular Disorders*. 2013;23(11):945-951. doi:10.1016/j.nmd.2013.07.007
77. de Bleecker JL, de Paepe B, Aronica E, et al. 205th ENMC International Workshop: Pathology diagnosis of idiopathic inflammatory myopathies Part II 28–30 March 2014, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular Disorders*. 2015;25(3):268-272. doi:10.1016/j.nmd.2014.12.001
78. Rider LG, Aggarwal R, Machado PM, et al. Update on outcome assessment in myositis. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(5):303-318. doi:10.1038/nrrheum.2018.33
79. Rider LG, Werth VP, Huber AM, et al. Measures of adult and juvenile dermatomyositis, polymyositis, and inclusion body myositis: Physician and Patient/Parent Global Activity, Manual Muscle Testing (MMT), Health Assessment Questionnaire (HAQ)/Childhood Health Assessment Questionnaire (C-HAQ),. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63(S11):S118-S157. doi:10.1002/acr.20532
80. Munters LA, Loell I, Ossipova E, et al. Endurance Exercise Improves Molecular Pathways of Aerobic Metabolism in Patients With Myositis. *Arthritis & Rheumatology*. 2016;68(7):1738-1750. doi:10.1002/art.39624

81. Castro C, Gourley M. Diagnosis and treatment of inflammatory myopathy: issues and management. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2012;4(2):111-120. doi:10.1177/1759720X11425092
82. Lundberg I, Kratz AK, Alexanderson H, Patarroyo M. Decreased expression of interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and cell adhesion molecules in muscle tissue following corticosteroid treatment in patients with polymyositis and dermatomyositis. *Arthritis Rheum*. 2000;43(2):336. doi:10.1002/1529-0131(200002)43:2<336::AID-ANR13>3.0.CO;2-V
83. Oddis C v., Aggarwal R. Treatment in myositis. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(5):279-289. doi:10.1038/nrrheum.2018.42
84. Dalakas MC. Immunotherapy of myositis: issues, concerns and future prospects. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(3):129-137. doi:10.1038/nrrheum.2010.2
85. Ernste FC, Reed AM. Idiopathic Inflammatory Myopathies: Current Trends in Pathogenesis, Clinical Features, and Up-to-Date Treatment Recommendations. *Mayo Clin Proc*. 2013;88(1):83-105. doi:10.1016/j.mayocp.2012.10.017
86. Ruperto N, Pistorio A, Oliveira S, et al. Prednisone versus prednisone plus ciclosporin versus prednisone plus methotrexate in new-onset juvenile dermatomyositis: a randomised trial. *The Lancet*. 2016;387(10019):671-678. doi:10.1016/S0140-6736(15)01021-1
87. Bunch TW. Prednisone and azathioprine for polymyositis. Long-term followup. *Arthritis Rheum*. 1981;24(1):45-48. doi:10.1002/art.1780240107
88. Wang DX, Shu XM, Tian XL, et al. Intravenous immunoglobulin therapy in adult patients with polymyositis/dermatomyositis: a systematic literature review. *Clin Rheumatol*. 2012;31(5):801-806. doi:10.1007/s10067-012-1940-5
89. Nalotto L, Iaccarino L, Zen M, et al. Rituximab in refractory idiopathic inflammatory myopathies and antisynthetase syndrome: personal experience and review of the literature. *Immunol Res*. 2013;56(2-3):362-370. doi:10.1007/s12026-013-8408-9
90. Oddis C v., Reed AM, Aggarwal R, et al. Rituximab in the treatment of refractory adult and juvenile dermatomyositis and adult polymyositis: A randomized, placebo-phase trial. *Arthritis Rheum*. 2013;65(2):314-324. doi:10.1002/art.37754

91. Efthimiou P. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Inflammatory Myopathies: Pathophysiology and Therapeutic Implications. *Semin Arthritis Rheum.* 2006;36(3):168-172. doi:10.1016/j.semarthrit.2006.07.003
92. Tjärnlund A, Tang Q, Wick C, et al. Abatacept in the treatment of adult dermatomyositis and polymyositis: a randomised, phase IIb treatment delayed-start trial. *Ann Rheum Dis.* 2018;77(1):55-62. doi:10.1136/annrheumdis-2017-211751
93. Paik JJ, Shneyderman M, Gutierrez-Alamillo L, et al. Long-term extension study of tofacitinib in refractory dermatomyositis. *Arthritis & Rheumatology.* 2022;74(2):371-372. doi:10.1002/art.41944
94. Pineton de Chambrun M, Hervier B, Chauveau S, Tandjaoui-Lambiotte Y, Combes A, Uzunhan Y. Tofacitinib in antisynthetase syndrome-related rapidly progressive interstitial lung disease. *Rheumatology.* 2020;59(12):e142-e143. doi:10.1093/rheumatology/keaa323
95. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, 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.* 2018;7(1):1535750. doi:10.1080/20013078.2018.1535750
96. He C, Zheng S, Luo Y, Wang B. Exosome Theranostics: Biology and Translational Medicine. *Theranostics.* 2018;8(1):237-255. doi:10.7150/thno.21945
97. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(4):213-228. doi:10.1038/nrm.2017.125
98. Kowal J, Tkach M. Dendritic cell extracellular vesicles. In: ; 2019:213-249. doi:10.1016/bs.ircmb.2019.08.005
99. Liu ML, Williams KJ, Werth VP. Microvesicles in Autoimmune Diseases. In: ; 2016:125-175. doi:10.1016/bs.acc.2016.06.005
100. Andreu Z, Yáñez-Mo M. Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function. *Front Immunol.* 2014;5. doi:10.3389/fimmu.2014.00442
101. Roucourt B, Meeussen S, Bao J, Zimmermann P, David G. Heparanase activates the syndecan-syntenin-ALIX exosome pathway. *Cell Res.* 2015;25(4):412-428. doi:10.1038/cr.2015.29

102. Fares J, Kashyap R, Zimmermann P. Syntenin: Key player in cancer exosome biogenesis and uptake? *Cell Adh Migr.* 2017;11(2):124-126. doi:10.1080/19336918.2016.1225632
103. Kalra H, Drummen G, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci.* 2016;17(2):170. doi:10.3390/ijms17020170
104. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol.* 2019;21(1):9-17. doi:10.1038/s41556-018-0250-9
105. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015;4(1):27066. doi:10.3402/jev.v4.27066
106. Doyle L, Wang M. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells.* 2019;8(7):727. doi:10.3390/cells8070727
107. Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie.* 2007;89(2):205-212. doi:10.1016/j.biochi.2006.10.014
108. Alexander M, Hu R, Runtsch MC, et al. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat Commun.* 2015;6(1):7321. doi:10.1038/ncomms8321
109. Buzas EI, György B, Nagy G, Falus A, Gay S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(6):356-364. doi:10.1038/nrrheum.2014.19
110. McGough IJ, Vincent JP. Exosomes in developmental signalling. *Development.* 2016;143(14):2482-2493. doi:10.1242/dev.126516
111. Karasu E, Eisenhardt SU, Harant J, Huber-Lang M. Extracellular Vesicles: Packages Sent With Complement. *Front Immunol.* 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.00721
112. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(3):195-208. doi:10.1038/nri3622

113. Tung SL, Boardman DA, Sen M, et al. Regulatory T cell-derived extracellular vesicles modify dendritic cell function. *Sci Rep*. 2018;8(1):6065. doi:10.1038/s41598-018-24531-8
114. Marar C, Starich B, Wirtz D. Extracellular vesicles in immunomodulation and tumor progression. *Nat Immunol*. 2021;22(5):560-570. doi:10.1038/s41590-021-00899-0
115. Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell*. 2016;30(6):836-848. doi:10.1016/j.ccell.2016.10.009
116. Zhang L, Zhang S, Yao J, et al. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature*. 2015;527(7576):100-104. doi:10.1038/nature15376
117. Tauro BJ, Mathias RA, Greening DW, et al. Oncogenic H-Ras Reprograms Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Cell-derived Exosomal Proteins Following Epithelial-Mesenchymal Transition. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2013;12(8):2148-2159. doi:10.1074/mcp.M112.027086
118. Kong J, Tian H, Zhang F, et al. Extracellular vesicles of carcinoma-associated fibroblasts creates a pre-metastatic niche in the lung through activating fibroblasts. *Mol Cancer*. 2019;18(1):175. doi:10.1186/s12943-019-1101-4
119. Zhou W, Fong MY, Min Y, et al. Cancer-Secreted miR-105 Destroys Vascular Endothelial Barriers to Promote Metastasis. *Cancer Cell*. 2014;25(4):501-515. doi:10.1016/j.ccr.2014.03.007
120. Maione F, Cappellano G, Bellan M, Raineri D, Chiocchetti A. Chicken-or-egg question: Which came first, extracellular vesicles or autoimmune diseases? *J Leukoc Biol*. 2020;108(2):601-616. doi:10.1002/JLB.3MR0120-232R
121. Ståhl A, Johansson K, Mossberg M, Kahn R, Karpman D. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatric Nephrology*. 2019;34(1):11-30. doi:10.1007/s00467-017-3816-z
122. Dieker J, Tel J, Pieterse E, et al. Circulating Apoptotic Microparticles in Systemic Lupus Erythematosus Patients Drive the Activation of Dendritic Cell Subsets and Prime Neutrophils for NETosis. *Arthritis & Rheumatology*. 2016;68(2):462-472. doi:10.1002/art.39417

123. Salvi V, Gianello V, Busatto S, et al. Exosome-delivered microRNAs promote IFN- $\alpha$  secretion by human plasmacytoid DCs via TLR7. *JCI Insight*. 2018;3(10). doi:10.1172/jci.insight.98204
124. Zhu T, Wang Y, Jin H, Li L. The role of exosome in autoimmune connective tissue disease. *Ann Med*. 2019;51(2):101-108. doi:10.1080/07853890.2019.1592215
125. López P, Rodríguez-Carrio J, Caminal-Montero L, Suárez A. Relationship Between T-Cell Exosomes and Cellular Subsets in SLE According to Type I IFN-Signaling. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7. doi:10.3389/fmed.2020.604098
126. Zhang B, Zhao M, Lu Q. Extracellular Vesicles in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Functions and Applications. *Front Immunol*. 2021;11. doi:10.3389/fimmu.2020.575712
127. Østergaard O, Nielsen CT, Iversen L v., et al. Unique protein signature of circulating microparticles in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. Published online June 2013:n/a-n/a. doi:10.1002/art.38065
128. Turpin D, Truchetet ME, Faustin B, et al. Role of extracellular vesicles in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2016;15(2):174-183. doi:10.1016/j.autrev.2015.11.004
129. Pásztói M, Sódar B, Misják P, et al. The recently identified hexosaminidase D enzyme substantially contributes to the elevated hexosaminidase activity in rheumatoid arthritis. *Immunol Lett*. 2013;149(1-2):71-76. doi:10.1016/j.imlet.2012.10.012
130. Skriner K, Adolph K, Jungblut PR, Burmester GR. Association of citrullinated proteins with synovial exosomes. *Arthritis Rheum*. 2006;54(12):3809-3814. doi:10.1002/art.22276
131. Zhang HG, Liu C, Su K, et al. A Membrane Form of TNF- $\alpha$  Presented by Exosomes Delays T Cell Activation-Induced Cell Death. *The Journal of Immunology*. 2006;176(12):7385-7393. doi:10.4049/jimmunol.176.12.7385
132. Xu K, Liu Q, Wu K, et al. Extracellular vesicles as potential biomarkers and therapeutic approaches in autoimmune diseases. *J Transl Med*. 2020;18(1). doi:10.1186/s12967-020-02609-0

133. Kim S, Lee MJ, Choi JY, et al. Roles of Exosome-Like Vesicles Released from Inflammatory C2C12 Myotubes: Regulation of Myocyte Differentiation and Myokine Expression. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;48(5):1829-1842. doi:10.1159/000492505
134. Baka Z, Senolt L, Vencovsky J, et al. Increased serum concentration of immune cell derived microparticles in polymyositis/dermatomyositis. *Immunol Lett*. 2010;128(2):124-130. doi:10.1016/j.imlet.2009.12.018
135. Shirafuji T, Hamaguchi H, Higuchi M, Kanda F. Measurement of platelet-derived microparticle levels using an enzyme-linked immunosorbent assay in polymyositis and dermatomyositis patients. *Muscle Nerve*. 2009;39(5):586-590. doi:10.1002/mus.21311
136. Jiang K, Karasawa R, Hu Z, et al. Plasma exosomes from children with juvenile dermatomyositis are taken up by human aortic endothelial cells and are associated with altered gene expression in those cells. *Pediatric Rheumatology*. 2019;17(1):41. doi:10.1186/s12969-019-0347-0
137. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. 2003;9(3):277-279. doi:10.1261/rna.2183803
138. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y
139. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: Approaches and considerations. *Nat Rev Genet*. 2012;13(5):358-369. doi:10.1038/nrg3198
140. Kalla R, Ventham NT, Kennedy NA, et al. MicroRNAs: New players in IBD. *Gut*. 2015;64(3):504-517. doi:10.1136/gutjnl-2014-307891
141. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The Mirtron Pathway Generates microRNA-Class Regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*. 2007;130(1):89-100. doi:10.1016/j.cell.2007.06.028
142. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol*. 2019;234(5):5451-5465. doi:10.1002/jcp.27486

143. Blahna MT, Hata A. Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis. *FEBS Lett.* 2012;586(14):1906-1912. doi:10.1016/j.febslet.2012.01.041
144. Beezhold KJ, Castranova V, Chen F. *Open Access REVIEW Microprocessor of MicroRNAs: Regulation and Potential for Therapeutic Intervention.*; 2010. <http://www.molecular-cancer.com/content/9/1/134>
145. Wong ACH, Rasko JEJ. Splice and dice: intronic micrornas, splicing and cancer. *Biomedicines.* 2021;9(9). doi:10.3390/biomedicines9091268
146. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(2):126-139. doi:10.1038/nrm2632
147. Bushati N, Cohen SM. MicroRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:175-205. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123406
148. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing. *Cell.* 2008;132(1):9-14. doi:10.1016/j.cell.2007.12.024
149. Parker R, Sheth U. P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Mol Cell.* 2007;25(5):635-646. doi:10.1016/j.molcel.2007.02.011
150. Nsengimana B, Khan FA, Ngowi EE, et al. Processing body (P-body) and its mediators in cancer. *Mol Cell Biochem.* 2022;477(4):1217-1238. doi:10.1007/s11010-022-04359-7
151. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;87:3-14. doi:10.1016/j.addr.2015.05.001
152. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(2):111-122. doi:10.1038/nri2708
153. Roy S. miRNA in Macrophage Development and Function. *Antioxid Redox Signal.* 2016;25(15):795-804. doi:10.1089/ars.2016.6728
154. Xiao C, Calado DP, Galler G, et al. MiR-150 Controls B Cell Differentiation by Targeting the Transcription Factor c-Myb. *Cell.* 2016;165(4):1027. doi:10.1016/j.cell.2016.04.056
155. Faruq O, Vecchione A. microRNA: Diagnostic perspective. *Front Med (Lausanne).* 2015;2(AUG). doi:10.3389/fmed.2015.00051

156. Dangwal S, Bang C, Thum T. Novel techniques and targets in cardiovascular microRNA research. *Cardiovasc Res.* 2012;93(4):545-554. doi:10.1093/cvr/cvr297
157. Ruiz MA, Chakrabarti S. MicroRNAs: The Underlying Mediators of Pathogenetic Processes in Vascular Complications of Diabetes. *Can J Diabetes.* 2013;37(5):339-344. doi:10.1016/j.jcjd.2013.07.003
158. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, et al. Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 2007;67(6):2456-2468. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2698
159. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. *MiR-15 and MiR-16 Induce Apoptosis by Targeting BCL2.*; 2005. www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0506654102
160. Sengupta D, Deb M, Kar S, et al. Dissecting miRNA facilitated physiology and function in human breast cancer for therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol.* 2021;72:46-64. doi:10.1016/j.semcancer.2020.05.017
161. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 2005;120(5):635-647. doi:10.1016/j.cell.2005.01.014
162. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - MicroRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(4):259-269. doi:10.1038/nrc1840
163. Mishra S, Yadav T, Rani V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;98:12-23. doi:10.1016/j.critrevonc.2015.10.003
164. Amadori A, Zanovello P. *Lezioni Di IMMUNOLOGIA e IMMUNOPATOLOGIA.*; 2021.
165. Xiao C, Nemazee D, Gonzalez-Martin A. MicroRNA control of B cell tolerance, autoimmunity and cancer. *Semin Cancer Biol.* 2020;64:102-107. doi:10.1016/j.semcancer.2019.04.004
166. Simpson LJ, Ansel KM. MicroRNA regulation of lymphocyte tolerance and autoimmunity. *Journal of Clinical Investigation.* 2015;125(6):2242-2249. doi:10.1172/JCI78090
167. Schell SL, Rahman ZSM. miRNA-Mediated Control of B Cell Responses in Immunity and SLE. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.683710

168. Soltanzadeh-Yamchi M, Shahbazi M, Aslani S, Mohammadnia-Afrouzi M. MicroRNA signature of regulatory T cells in health and autoimmunity. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018;100:316-323. doi:10.1016/j.biopha.2018.02.030
169. Lorenzi JCC, Brum DG, Zanette DL, et al. miR-15a and 16-1 Are Downregulated in CD4<sup>+</sup> T Cells of Multiple Sclerosis Relapsing Patients. *International Journal of Neuroscience*. 2012;122(8):466-471. doi:10.3109/00207454.2012.678444
170. Guerau-de-Arellano M, Smith KM, Godlewski J, et al. Micro-RNA dysregulation in multiple sclerosis favours pro-inflammatory T-cell-mediated autoimmunity. *Brain*. 2011;134(12):3578-3589. doi:10.1093/brain/awr262
171. Gao Y, Han D, Feng J. MicroRNA in multiple sclerosis. *Clinica Chimica Acta*. 2021;516:92-99. doi:10.1016/j.cca.2021.01.020
172. Wu D, Cerutti C, Lopez-Ramirez MA, et al. Brain Endothelial miR-146a Negatively Modulates T-Cell Adhesion through Repressing Multiple Targets to Inhibit NF-κB Activation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2015;35(3):412-423. doi:10.1038/jcbfm.2014.207
173. Kimura K, Hohjoh H, Fukuoka M, et al. Circulating exosomes suppress the induction of regulatory T cells via let-7i in multiple sclerosis. *Nat Commun*. 2018;9(1):17. doi:10.1038/s41467-017-02406-2
174. Regev K, Healy BC, Paul A, et al. Identification of MS-specific serum miRNAs in an international multicenter study. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*. 2018;5(5):e491. doi:10.1212/NXI.0000000000000491
175. Mycko MP, Baranzini SE. microRNA and exosome profiling in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2020;26(5):599-604. doi:10.1177/1352458519879303
176. Ebrahimkhani S, Vafae F, Young PE, et al. Exosomal microRNA signatures in multiple sclerosis reflect disease status. *Sci Rep*. 2017;7(1):14293. doi:10.1038/s41598-017-14301-3
177. Evangelatos G, Fragoulis GE, Koulouri V, Lambrou GI. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: From pathogenesis to clinical impact. *Autoimmun Rev*. 2019;18(11):102391. doi:10.1016/j.autrev.2019.102391

178. Tavasolian F, Abdollahi E, Rezaee R, Momtazi-borojeni AA, Henrotin Y, Sahebkar A. Altered Expression of MicroRNAs in Rheumatoid Arthritis. *J Cell Biochem.* 2018;119(1):478-487. doi:10.1002/jcb.26205
179. Sharma AR, Sharma G, Lee SS, Chakraborty C. miRNA-Regulated Key Components of Cytokine Signaling Pathways and Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Med Res Rev.* 2016;36(3):425-439. doi:10.1002/med.21384
180. Alevizos I, Illei GG. MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(7):391-398. doi:10.1038/nrrheum.2010.81
181. Greisen SR, Yan Y, Hansen AS, et al. Extracellular Vesicles Transfer the Receptor Programmed Death-1 in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol.* 2017;8. doi:10.3389/fimmu.2017.00851
182. Safari F, Damavand E, Rostamian AR, et al. Plasma Levels of MicroRNA-146a-5p, MicroRNA-24-3p, and MicroRNA125a-5p as Potential Diagnostic Biomarkers for Rheumatoid Arthritis. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* Published online June 8, 2021. doi:10.18502/ijaai.v20i3.6334
183. Krintel SB, Dehlendorff C, Hetland ML, et al. Prediction of treatment response to adalimumab: a double-blind placebo-controlled study of circulating microRNA in patients with early rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J.* 2016;16(2):141-146. doi:10.1038/tpj.2015.30
184. Chi M, Ma K, Li Y, et al. Immunological Involvement of MicroRNAs in the Key Events of Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.699684
185. Yang B, Huang X, Xu S, et al. Decreased miR-4512 Levels in Monocytes and Macrophages of Individuals With Systemic Lupus Erythematosus Contribute to Innate Immune Activation and Neutrophil NETosis by Targeting TLR4 and CXCL2. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.756825
186. Ibrahim SA, Afify AY, Fawzy IO, El-Ekiaby N, Abdelaziz AI. The curious case of miR-155 in SLE. *Expert Rev Mol Med.* 2021;23:e11. doi:10.1017/erm.2021.11
187. Yan S, Yim LY, Lu L, Lau CS, Chan VSF. MicroRNA Regulation in Systemic Lupus Erythematosus Pathogenesis. *Immune Netw.* 2014;14(3):138. doi:10.4110/in.2014.14.3.138

188. So BYF, Yap DYH, Chan TM. MicroRNAs in lupus nephritis—role in disease pathogenesis and clinical applications. *Int J Mol Sci.* 2021;22(19). doi:10.3390/ijms221910737
189. Zeng L, Wu J li, Liu L min, et al. Serum miRNA-371b-5p and miRNA-5100 act as biomarkers for systemic lupus erythematosus. *Clinical Immunology.* 2018;196:103-109. doi:10.1016/j.clim.2018.10.004
190. Reale M, D'Angelo C, Costantini E, Laus M, Moretti A, Croce A. MicroRNA in Sjögren's syndrome: Their potential roles in pathogenesis and diagnosis. *J Immunol Res.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/7510174
191. Kapsogeorgou E, Tzioufas A. Role of miR200b-5p miRNA in lymphomagenesis associated with Sjögren's syndrome (SS). *Mediterr J Rheumatol.* 2018;29(1):56-58. doi:10.31138/mjr.29.1.56
192. Gao S, Zhang H, Zuo X, et al. Integrated comparison of the miRNAome and mRNAome in muscles of dermatomyositis and polymyositis reveals common and specific miRNA-mRNAs. *Epigenomics.* 2019;11(1):23-33. doi:10.2217/epi-2018-0064
193. Yin Y, Li F, Shi J, Li S, Cai J, Jiang Y. MIR-146a Regulates Inflammatory Infiltration by Macrophages in Polymyositis/Dermatomyositis by Targeting TRAF6 and Affecting IL-17/ICAM-1 Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2016;40(3-4):486-498. doi:10.1159/000452563
194. Jiang T, Huang Y, Liu H, et al. Reduced miR-146a Promotes REG3A Expression and Macrophage Migration in Polymyositis and Dermatomyositis. *Front Immunol.* 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.00037
195. Ye Q, Chen Z. MicroRNA-409-3p regulates macrophage migration in polymyositis through targeting CXCR4. *Autoimmunity.* 2021;54(6):353-361. doi:10.1080/08916934.2021.1937610
196. Yutao L, Yuan G, Jing Y, Changhe S, Yanlin W, Yuming X. MicroRNA-381 reduces inflammation and infiltration of macrophages in polymyositis via downregulating HMGB1. *Int J Oncol.* 2018;53(3):1332-1342. doi:10.3892/ijo.2018.4463
197. Parkes JE, Thoma A, Lightfoot AP, Day PJ, Chinoy H, Lamb JA. MicroRNA and mRNA profiling in the idiopathic inflammatory myopathies. *BMC Rheumatol.* 2020;4(1). doi:10.1186/s41927-020-00125-8

198. Hirai T, Ikeda K, Tsushima H, et al. Circulating plasma microRNA profiling in patients with polymyositis/dermatomyositis before and after treatment: miRNA may be associated with polymyositis/dermatomyositis. *Inflamm Regen*. 2018;38(1). doi:10.1186/s41232-017-0058-1
199. Inoue K, Jinnin M, Yamane K, et al. Down-regulation of miR-223 contributes to the formation of Gottron's papules in dermatomyositis via the induction of PKCε. *European Journal of Dermatology*. 2013;23(2):160-167. doi:10.1684/ejd.2013.1959
200. Georgantas RW, Streicher K, Greenberg SA, 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*. 2014;66(4):1022-1033. doi:10.1002/art.38292
201. Tang X, Tian X, Zhang Y, et al. Correlation between the frequency of Th17 cell and the expression of MicroRNA-206 in patients with dermatomyositis. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/345347
202. Ye L, Zuo Y, Yang H, et al. Specific Autoantibodies and Clinical Phenotypes Correlate with the Aberrant Expression of Immune-Related MicroRNAs in Dermatomyositis. *J Immunol Res*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/2927061
203. Zhong D, Wu C, Xu D, Bai J, Wang Q, Zeng X. Plasma-Derived Exosomal hsa-miR-4488 and hsa-miR-1228-5p: Novel Biomarkers for Dermatomyositis-Associated Interstitial Lung Disease with Anti-Melanoma Differentiation-Associated Protein 5 Antibody-Positive Subset. *Biomed Res Int*. 2021;2021. doi:10.1155/2021/6676107
204. Bozzini S, Zanframundo G, Codullo V, et al. Plasma derived-exosome microRNAs in Idiopathic Pulmonary Fibrosis of Anti-synthetase syndrome Disease patients. In: *Mechanisms of Lung Injury and Repair*. European Respiratory Society; 2021:PA726. doi:10.1183/13993003.congress-2021.PA726
205. Buzas EI. The roles of extracellular vesicles in the immune system. *Nat Rev Immunol*. Published online 2022. doi:10.1038/s41577-022-00763-8
206. Taylor DD, Gercel-Taylor C. Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. *Semin Immunopathol*. 2011;33(5):441-454. doi:10.1007/s00281-010-0234-8

207. Lindenbergh MFS, Stoorvogel W. Antigen Presentation by Extracellular Vesicles from Professional Antigen-Presenting Cells. *Annu Rev Immunol*. 2018;36(1):435-459. doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055700
208. Li Y, Bax C, Patel J, et al. Plasma-derived DNA containing-extracellular vesicles induce STING-mediated proinflammatory responses in dermatomyositis. *Theranostics*. 2021;11(15):7144-7158. doi:10.7150/thno.59152
209. Prajzlerová K, Kryštůfková O, Hánová P, et al. High miR-451 expression in peripheral blood mononuclear cells from subjects at risk of developing rheumatoid arthritis. *Sci Rep*. 2021;11(1):4719. doi:10.1038/s41598-021-84004-3
210. Foers AD, Garnham AL, Chatfield S, et al. Extracellular vesicles in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients contain mirnas with capacity to modulate inflammation. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9). doi:10.3390/ijms22094910
211. Tan L, Zhao M, Wu H, et al. Downregulated Serum Exosomal miR-451a Expression Correlates With Renal Damage and Its Intercellular Communication Role in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol*. 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.630112
212. Chen X, Yu L, Hao K, et al. Fucosylated exosomal miRNAs as promising biomarkers for the diagnosis of early lung adenocarcinoma. *Front Oncol*. 2022;12. doi:10.3389/fonc.2022.935184
213. Cai T, Zhou J, Zeng Y, et al. EVI5 is an oncogene that regulates the proliferation and metastasis of NSCLC cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2020;39(1):84. doi:10.1186/s13046-020-01585-z
214. ElKhouly AM, Youness RA, Gad MZ. MicroRNA-486-5p and microRNA-486-3p: Multifaceted pleiotropic mediators in oncological and non-oncological conditions. *Noncoding RNA Res*. 2020;5(1):11-21. doi:10.1016/j.ncrna.2020.01.001
215. Nejad C, Stunden HJ, Gantier MP. A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses. *FEBS Journal*. 2018;285(20):3695-3716. doi:10.1111/febs.14482
216. Wang-Renault SF, Boudaoud S, Nocturne G, et al. Deregulation of microRNA expression in purified T and B lymphocytes from patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(1):133-140. doi:10.1136/annrheumdis-2017-211417

217. Ying X, Wu Q, Wu X, et al. Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages. *Oncotarget*. 2016;7(28):43076-43087. doi:10.18632/oncotarget.9246
218. Matsuda S, Kotani T, Ishida T, et al. Exploration of pathomechanism using comprehensive analysis of serum cytokines in polymyositis/dermatomyositis-interstitial lung disease. *Rheumatology*. 2020;59(2):310-318. doi:10.1093/rheumatology/kez301
219. Yin C, Zhang G, Sun R, et al. miR-185-5p inhibits F-actin polymerization and reverses epithelial mesenchymal transition of human breast cancer cells by modulating RAGE. *Mol Med Rep*. Published online July 16, 2018. doi:10.3892/mmr.2018.9294
220. Fu X, Liu M, Qu S, et al. Exosomal microRNA-32-5p induces multidrug resistance in hepatocellular carcinoma via the PI3K/Akt pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018;37(1):52. doi:10.1186/s13046-018-0677-7
221. Yan T, Zhang F, Sun C, et al. miR-32-5p-mediated Dusp5 downregulation contributes to neuropathic pain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(1):506-511. doi:10.1016/j.bbrc.2017.11.013
222. Chen W, Liu D, Li QZ, Zhu H. The function of ncRNAs in rheumatic diseases. *Epigenomics*. 2019;11(7):821-833. doi:10.2217/epi-2018-0135
223. Salvi V, Gianello V, Tiberio L, Sozzani S, Bosisio D. Cytokine targeting by miRNAs in autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2019;10(JAN). doi:10.3389/fimmu.2019.00015
224. Ma Y, Shen N, Wicha MS, Luo M. The roles of the let-7 family of microRNAs in the regulation of cancer stemness. *Cells*. 2021;10(9). doi:10.3390/cells10092415
225. Singh RP, Hahn BH, Bischoff DS. Identification and Contribution of Inflammation-Induced Novel MicroRNA in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol*. 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.848149
226. Grossi I, Salvi A, Baiocchi G, Portolani N, de Petro G. Functional Role of microRNA-23b-3p in Cancer Biology. *MicroRNA*. 2018;7(3):156-166. doi:10.2174/2211536607666180629155025