

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE**

**Corso di Dottorato di Ricerca in**

Genetica e Biologia Cellulare - XXVIII Ciclo.

**I microRNA circolanti come nuovi marcatori diagnostici di patologie pediatriche**

**BIO/11**

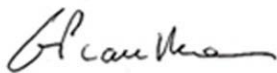
**Tesi di dottorato di:**

Dott.ssa Antonella Baldassarre

**Coordinatore del corso**

Prof. Giorgio Prantera

Firma



**Tutore**

Dott. Andrea Masotti

Firma



**6 Maggio 2016**

## Indice

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUZIONE GENERALE.....                                                         | 4  |
| 1.1 I MICRORNA.....                                                                | 4  |
| 1.1.1 Organizzazione genomica dei micro-RNA.....                                   | 5  |
| 1.1.2 Biogenesi dei microRNA .....                                                 | 7  |
| 1.1.3 Regolazione post-trascrizionale.....                                         | 10 |
| 1.2 BIOGENESI, STABILITA' E RICONOSCIMENTO CELLULARE DEI MICRORNA CIRCOLANTI ..... | 16 |
| 1.2.1 Quantificazione e analisi dei miRNA circolanti.....                          | 20 |
| Bibliografia.....                                                                  | 22 |
| SCOPO DELLA TESI .....                                                             | 32 |
| Bibliografia.....                                                                  | 36 |
| OTTIMIZZAZIONE DEI PROTOCOLLI DI ESTRAZIONE.....                                   | 37 |
| 2.1 INTRODUZIONE.....                                                              | 37 |
| 2.2 MATERIALI E METODI .....                                                       | 42 |
| 2.2.1 Prelievo dei campioni biologici.....                                         | 42 |
| 2.2.2 Estrazione di RNA .....                                                      | 42 |
| 2.2.3 Profili di espressione di miRNA circolanti.....                              | 42 |
| 2.3 RISULTATI.....                                                                 | 43 |
| 2.3.1 Confronto di due kit di estrazione di RNA da biofluidi .....                 | 43 |
| 2.3.2 Confronto siero-saliva .....                                                 | 49 |
| 2.4 DISCUSSIONE .....                                                              | 55 |
| Bibliografia.....                                                                  | 56 |
| INSULINO RESISTENZA IN BAMBINI OBESI .....                                         | 57 |
| 3.1 INTRODUZIONE.....                                                              | 57 |
| 3.2 MATERIALI E METODI .....                                                       | 58 |
| 3.2.1 Reclutamento dei pazienti.....                                               | 58 |
| 3.2.2 Valutazione clinica e stima della composizione corporea.....                 | 58 |
| 3.2.3 Esami di laboratorio.....                                                    | 58 |
| 3.2.4 Valutazioni ecografiche .....                                                | 58 |
| 3.2.5 Definizione dei pazienti IS e IR.....                                        | 59 |
| 3.2.6 Estrazione di RNA .....                                                      | 59 |
| 3.2.7 Analisi qPCR.....                                                            | 59 |

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.8 Analisi bioinformatica dei putativi geni bersaglio dei miRNA .....             | 59 |
| 3.2.9 Analisi statistica .....                                                       | 60 |
| 3.3 RISULTATI.....                                                                   | 61 |
| 3.3.1 Descrizione della popolazione studiata.....                                    | 61 |
| 3.3.2 miRNA differenzialmente espressi in pazienti IR in condizioni di digiuno ..... | 62 |
| 3.3.3 miRNA differenzialmente espressi nei pazienti IR a 120 min dopo OGTT .....     | 65 |
| 3.4 DISCUSSIONE .....                                                                | 69 |
| 3.4.1 miRNA a digiuno .....                                                          | 70 |
| 3.4.2 miRNA dopo l'OGTT.....                                                         | 71 |
| 3.4.3 miRNA a digiuno e post OGTT .....                                              | 71 |
| Bibliografia.....                                                                    | 73 |
| LA SINDROME FIBROMIALGICA (FIBROMIALGIA).....                                        | 76 |
| 4.1 INTRODUZIONE.....                                                                | 76 |
| 4.1.1 Quadro clinico.....                                                            | 76 |
| 4.1.2 Epidemiologia .....                                                            | 76 |
| 4.1.3 Eziopatogenesi.....                                                            | 77 |
| 4.1.4 Terapia.....                                                                   | 78 |
| Scopo dello studio .....                                                             | 78 |
| 4.2 MATERIALI E METODI .....                                                         | 79 |
| 4.2.1 Pazienti .....                                                                 | 79 |
| 4.2.2 Prelievo campioni biologici e isolamento RNA.....                              | 79 |
| 4.2.3 Profili di espressione di miRNA circolanti.....                                | 80 |
| 4.2.4 Analisi dei dati .....                                                         | 80 |
| 4.3 RISULTATI.....                                                                   | 81 |
| 4.3.1 Espressione dei miRNA nei pool FM.....                                         | 82 |
| 4.3.2 Espressione dei miRNA nei sieri dei singoli pazienti FM .....                  | 82 |
| 4.3.3 Correlazione tra i miRNA e i parametri clinici e clinimetrici.....             | 84 |
| 4.3.4 Curve ROC (receiver operating characteristics).....                            | 84 |
| 4.3.5 Espressione dei miRNA nella saliva .....                                       | 85 |
| 4.4 DISCUSSIONE .....                                                                | 87 |
| Bibliografia.....                                                                    | 92 |

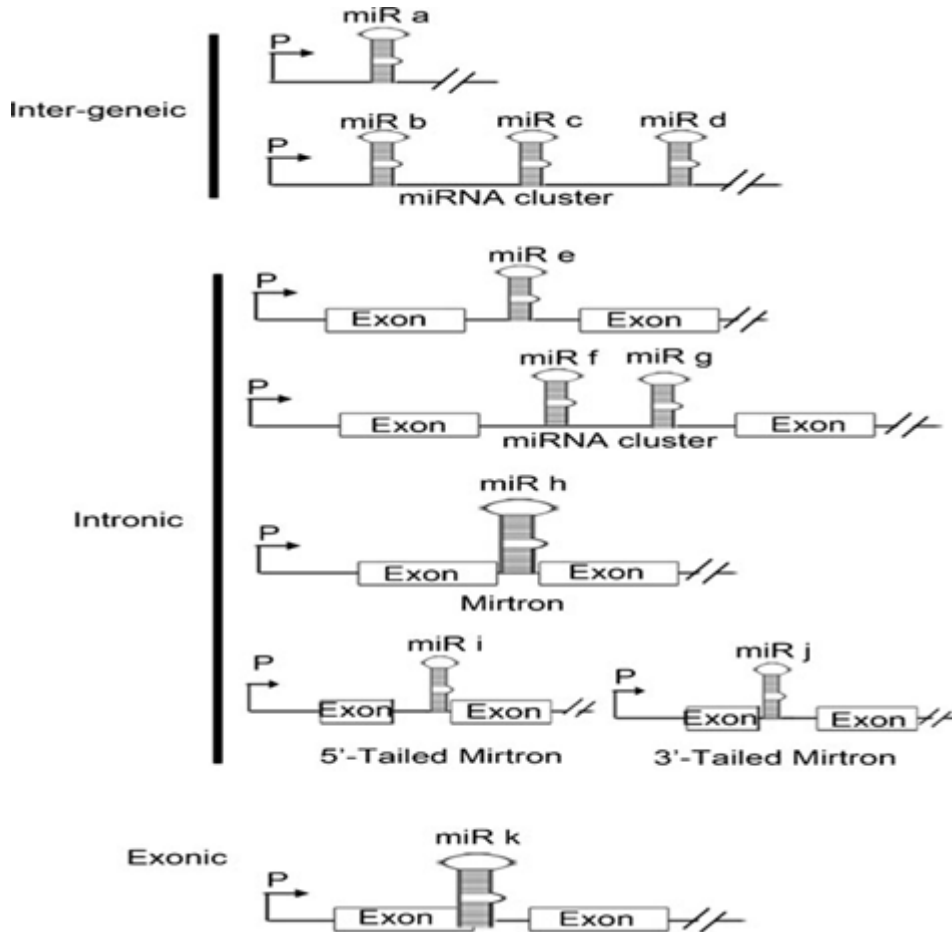
## INTRODUZIONE GENERALE

### 1.1 I MICRORNA

L'identificazione negli anni '90 dei microRNA (miRNA) ha aperto una nuova era nella comprensione dei processi regolatori post-trascrizionali dell'espressione genica. I miRNA sono una ampia classe di piccoli RNA non codificanti formati da 19-25 nucleotidi che regolano negativamente l'espressione genica a livello posttrascrizionale, inducendo la degradazione di specifici RNA messaggeri (mRNA), o impedendone la traduzione in proteina (1). Le prime evidenze dell'esistenza e del ruolo dei miRNA nella regolazione traduzionale furono osservate in *Caenorhabditis elegans*. Il primo gene codificante per uno di questi piccoli RNA ad essere descritto, *lin-4*, è un regolatore essenziale della divisione cellulare allo stadio larvale. Esso dà origine ad un piccolo RNA di 22 nucleotidi di lunghezza, perfettamente complementare ad un tratto della regione 3' non tradotta (3'UTR) dell'mRNA codificante per la proteina LIN-14, precedentemente dimostrata, tramite approccio genetico, essere controllata da *lin-4* (2). Successivamente, fu scoperto che *lin-4* era in grado di regolare negativamente anche il gene *lin-28* coinvolto in uno stadio più avanzato dello sviluppo larvale di *C. elegans* (3). Negli anni successivi, sono stati scoperti molti miRNA e sono stati dimostrati regolare non solo le fasi di sviluppo, ma anche molte altre funzioni cellulari, come l'apoptosi, la proliferazione e la differenziazione (4). È stato dimostrato che i miRNA possono avere profili di espressione specifici per stadi di sviluppo, tessuti e varie patologie. Ciò comporta che ciascun tessuto è caratterizzato da uno specifico set di miRNA, il cui profilo di espressione è distintivo di quel tessuto (5). Inoltre, i miRNA sono stati scoperti indurre silenziamento trascrizionale mediante modificazioni del DNA e/o della cromatina in lievito, piante e animali (6); (7); (8); (9); (10); (11). I miRNA sono altamente conservati in sequenza tra organismi lontani collegati, indicando la loro partecipazione essenziale nei processi biologici. Qualsiasi disregolazione nelle proteine coinvolte nella loro biogenesi, la loro espressione e il loro legame all'mRNA bersaglio è noto per avere effetti deleteri sulla fisiologia cellulare. Attualmente sono stati individuati, mediante tecniche di clonazione tradizionale in associazione ad ausili bioinformatici, più di 1000 (1881 precursors, 2588 mature) (12), 900 miRNA negli esseri umani, i quali regolano più del 30% di tutti i geni umani, nonostante costituiscano solo 1% -3% del genoma umano (13); (14). Pertanto, attualmente i miRNA costituiscono la più grande classe di geni regolatori. I miRNA attivi nella regolazione dei loro mRNA bersaglio sono definiti miRNA "maturi". Funzionalmente i miRNA attivi agiscono in associazione con un complesso multiproteico, denominato RNA Induced Silencing Complex (miRISC; (15)).

### 1.1.1 Organizzazione genomica dei micro-RNA

I geni per i miRNA sono stati mappati su tutti i cromosomi,. Sulla base della loro posizione genomica, i geni per i miRNA sono classificati come: intergenici, intronici e esonici (16); Fig. 1).



**Figura. 1 Organizzazione genomica dei miRNA.** Un miRNA intergenico è sotto il controllo del proprio promotore, sia come singolo gene (miR a) che in gruppo (miR b-d). Un miRNA intronico è presente nella regione intronica di una unità trascrizionale funzionale ed è sotto il controllo di un promotore codificante proteine come singolo miRNA intronico (miR e) o gruppo di miRNA (miR intronici f, miR g) o come un mirtrone (miR h) nel quale l'introne agisce come un miRNA e quindi un step di microprocessore non è necessario in questo caso. I Mirtroni aventi un'estensione di sequenza all'estremità 5' sono chiamati mirtroni con coda al 5' (miR i), mentre mirtroni aventi un'estensione di sequenza all'estremità 3' sono chiamati mirtroni con coda al 3' (miR j). I miRNA esonici (miR k) sono rari.

Le caratteristiche dei geni miRNA sono discussi qui di seguito:

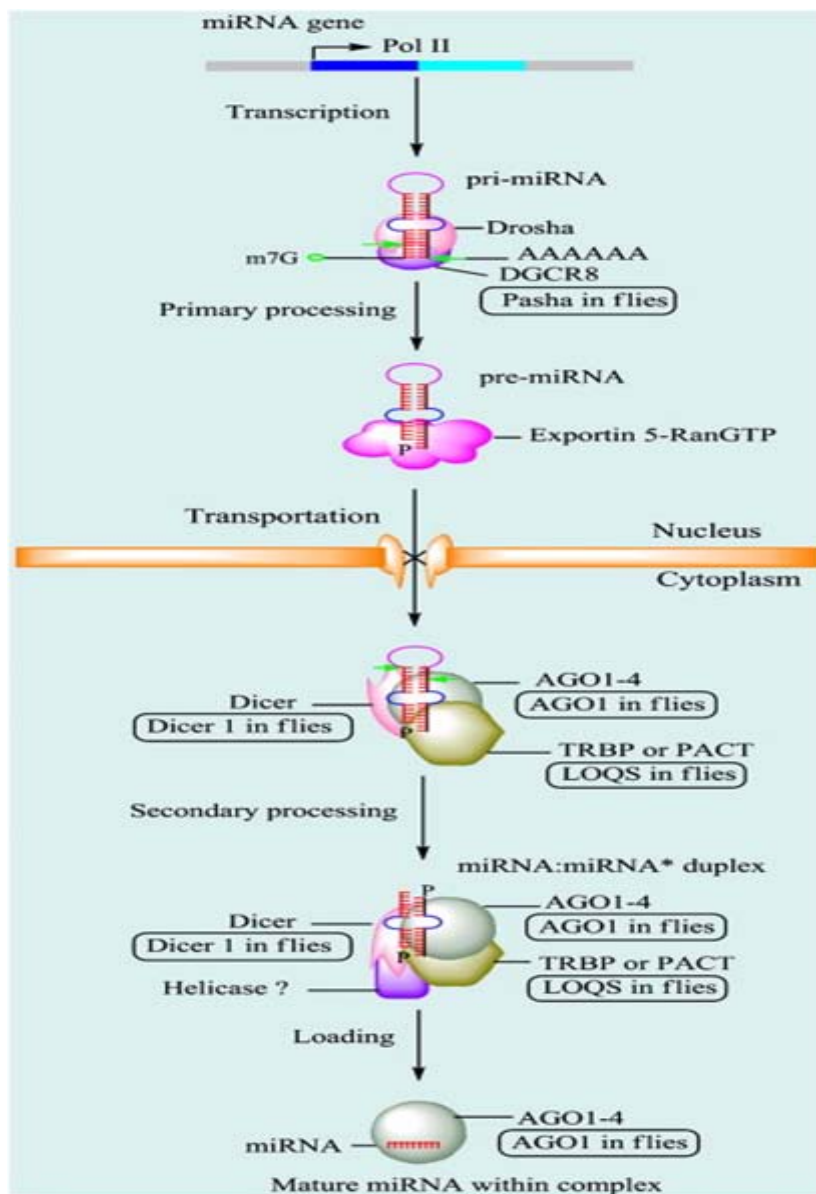
*Intergenici:* i miRNA intergenici si trovano in regioni genomiche distinte dalla nota unità di trascrizione funzionale. Possono essere monocistronici o policistronici (Fig. 1) e sono noti per avere i propri promotori e altri elementi regolatori. Sono trascritti soprattutto dai promotori dell'RNA Pol II e sono noti per essere poliadenilati e dotati di cap così come lo sono altri trascritti dell'RNA polimerasi II (17). Sulla base di varie osservazioni sperimentali e di predizione, la maggioranza dei miRNA intergenici sono considerati avere un trascritto primario di 3-4 kb di lunghezza, con un delineato sito di inizio della trascrizione e un segnale di poly(A) (18); (19).

*Intronici:* i miRNA intronici si trovano negli introni di geni noti che codificano/non codificano proteine (20); (21); (22). Questi miRNA possono essere presenti come un singolo miRNA o come un cluster di diversi miRNA (15);. Fig. 1). Possono essere trascritti dallo stesso promotore dei loro geni ospiti e processati dagli introni dei trascritti del gene ospite. Ad esempio, il miR-186 umano e di topo sono entrambi situati nell'introne 8 del pre-mRNA della proteina zinc finger 265 (23). Questi geni dei miRNA condividono lo stesso promotore con il trascritto ospite e di solito hanno profili di espressione simili a quelli del gene ospite (24). Tuttavia, sono anche noti, esempi di geni dei miRNA e cluster che risiedono negli introni, ma che sono sotto il controllo dei propri promotori, come il cluster miR-17-92, che si trova nell'introne 3 del gene C13orf25 (13 aperto reading frame 25 cromosomi) (25). È interessante notare che la posizione di alcuni miRNA intronici è ben conservata tra le specie diverse, indicando la loro importanza nel coordinamento di vari processi fisiologici. Inoltre, in alcuni casi, l'intero introne del gene codificante proteine può agire come l'esatta sequenza dei pre-miRNA con siti di splicing su entrambi i lati (Fig. 1). Tali introni sono chiamati mirtroni e, poiché questi vengono processati dal macchinario di splicing, il primo step coinvolto nella loro biogenesi non è richiesto per la loro maturazione (26). Tuttavia, sono state trovate alcune forme varianti del mirtrone con estensioni ulteriori alla sequenza presente all'estremità 5' o 3' dell'hairpin di splicing. Tali mirtroni sono noti come mirtroni dalla coda al 5' o 3' (27). Fig. 1). L'esistenza della coda nel mirtrone implica che la macchina di splicing genera un RNA intermedio che può subire un ulteriore processamento nucleolitico. Inoltre, alcuni miRNA (MMU-miR-1839) sono noti per essere generati da piccoli RNA nucleolari (snoRNAs; (28). Gli SnoRNA sono una classe di piccole molecole di RNA che guidano soprattutto modificazioni chimiche di altri RNA, soprattutto RNA ribosomiale, tRNA e piccoli RNA nucleari.

*Esonici*: i miRNA esonici sono molto rari e spesso si formano da un esone e un introne di un gene non codificante (Fig. 1). Si pensa che questi miRNA possano essere trascritti dal promotore del loro gene ospite e la loro maturazione spesso esclude la funzione del gene ospite (16).

### 1.1.2 Biogenesi dei microRNA

Il processo mediante il quale si giunge alla formazione dei miRNA maturi è piuttosto complesso e si compone di numerose tappe: esso ha origine nel nucleo e giunge a completamento a livello del citoplasma (Figura 2).



**Figura. 2. Biogenesi dei miRNA.** I geni per i microRNA (miRNA) sono trascritti dall'RNA polimerasi II (Pol II), che determina la produzione di un pri-miRNA. Drosha, insieme con DGCR-8 (detto anche Pasha nelle mosche),

media lo step iniziale di processamento (prima trasformazione) che produce un pre-miRNA di ~65 nucleotidi (nt). Il pre-miRNA ha un breve sporgenza di 2-3 nt al 3', che è riconosciuta dall' esportina 5 (EXP5) che media il trasporto nel citoplasma. Nel citoplasma, una RNasi III, Dicer catalizza la seconda fase di processamento, che genera un duplex miRNA/miRNA\*. Dicer, TRBP o PACT (LOQ nelle mosche), e Argonaute1-4 (Ago 1-4) sono responsabili del processamento del pre-miRNA e dell'assemblaggio del RISC (RNA-induced silencing complex). Un'elicasi non nota media lo svolgimento del duplex. Su un filamento del duplex rimane il miRNA maturo (miRNA) con le proteine Ago, mentre il miRNA\* o filamento complementare viene degradato.

La biogenesi dei miRNA ha inizio con la trascrizione di una breve sequenza genomica che dà origine ad un "microRNA primitivo" (pri-miRNA). Esso viene trascritto nel nucleo della cellula dalla RNA polimerasi II (RNAPol II) oppure, meno frequentemente, dalla RNA polimerasi III (RNAPol III; (29). I pri-miRNA, così come avviene per gli altri mRNA di classe II, subiscono modificazioni post-trascrizionali quali l'aggiunta del cappuccio di 7-metil-guanosina all'estremità 5' e della coda di poli(A) all'estremità 3' (22). La loro lunghezza può variare da qualche centinaia fino ad alcune migliaia di basi e possono contenere uno o più precursori dei miRNA (pre-miRNA) in forma policistronica. I pri-miRNA si ripiegano fino ad assumere una tipica struttura secondaria caratterizzata da uno o più diversi ripiegamenti a forcina ("stem-loop"), ognuno dei quali darà in seguito origine ad un miRNA diverso. Questa molecola subisce dei tagli sequenziali catalizzati da due endonucleasi, Drosha e Dicer, le quali agiscono all'interno di complessi proteici contenenti domini in grado di legare molecole di RNA a doppio filamento (*dsRNA binding domains* -dsRBDs) (Figura 2). Le proteine Drosha e Dicer possiedono degli specifici domini catalitici RNasi di tipo III (RIIIda, RRIIDb) conservati, che agiscono generando delle estremità 3' sporgenti di 2 nucleotidi. I pri-miRNA vengono riconosciuti da Drosha a livello dei ripiegamenti a forcina e tagliati alla base di tali strutture. Come risultato del taglio si ha la formazione dell'intermedio successivo, il pre-miRNA, della lunghezza di 60-70 nucleotidi e caratterizzato da una peculiare estremità di 2 nucleotidi a singolo filamento alle terminazioni 3' (30). Questa estremità asimmetrica al 3' è legata dalla proteina Esportina-5, il recettore di trasporto nucleare dipendente da RanGTP, che permette la traslocazione nel citoplasma del pre-miRNA (31); (32). Ran-GTP agisce come un canale attivato dalla proteina GAP (GTPase Activator Protein), la quale idrolizza il GTP a GDP+Pi attivando il canale di passaggio dal nucleo al citoplasma e permettendo così il trasporto di sequenze di RNA da parte delle esportine. L'ambiente citoplasmatico impedisce la permanenza di molecole di RNA che non devono essere tradotte: questo rappresenta un sistema di auto-controllo per evitare la diffusione di sequenze errate di RNA che potrebbero condurre a traduzioni errate. In *Drosophila* e nei mammiferi esistono anche vie non canoniche di processamento dei miRNA, che portano

alla formazione di un pre-miRNA attraverso meccanismi indipendenti da Drosha. In genere, questi meccanismi riguardano miRNA localizzati in brevi introni (miRtrons), trasportati nel citoplasma direttamente dopo lo splicing (33). Il pre-miRNA, traslocato nel citoplasma, viene riconosciuto a livello della protrusione al 3' da un complesso multienzimatico con attività endonucleasica, chiamato Dicer, che completa la maturazione dei miRNA tagliandolo nella forma finale a doppio filamento di 22 nucleotidi con 2 nucleotidi sporgenti all'estremità 3' (34). Dicer è una proteina altamente conservata che esiste in quasi tutti gli organismi eucariotici. Alcuni organismi hanno più tipi di Dicer; per esempio, *D. melanogaster* contiene Dicer-1 e Dicer-2, ognuno con diversi ruoli. Dicer-1 è necessario per la maturazione del miRNA, mentre Dicer-2 è necessario per la maturazione di siRNA (35). Dicer lavora a stretto contatto con altre proteine, tra cui RDE-4 in *C. elegans*, R2D2 ed FMR1 in *D. melanogaster*, e le proteine della famiglia Argonauta in molti altri organismi (36); (37); (38); (39). Recentemente, è stato dimostrato che in *D. melanogaster* Dicer-1 richiede Loquace (LOQ), la quale contiene tre domini di legame all'RNA a doppio filamento per il processamento del pre-miRNA (40); (41); (42). Dicer umana è associata a due proteine strettamente correlate, TRBP e, PRKRA, noto anche come PACT (43); (44); (45). Le proteine associate a Dicer non sembrano essere necessarie per il processamento stesso, ma contribuiscono alla formazione del complesso di silenziamento indotto da RNA (43) ; (44); (45). Le proteine Ago fanno parte di una antica famiglia, le Argonaute, presenti in tutti gli eucarioti e dotate anch'esse di motivi specifici: i domini PAZ e MID per l'ancoraggio dell'RNA *target* al 3' e 5' e il dominio PIWI per il taglio (Figura 2). Nel complesso del miRISC, oltre alle proteine Ago, sono state trovate proteine della famiglia GW182 (TNRC6A, TNRC6B, TNRC6C nei mammiferi), contenenti glicina e triptofano e del peso di 182 kDa, che sembrerebbero avere un ruolo importante nella repressione trascrizionale mediata dai miRNA (46) e agirebbero come cofattori delle Ago. A questo punto i miRNA vengono incorporati nel complesso ribonucleoproteico dei miRNA (miRNP), noto anche come complesso silenziatore indotto da RNA (RISC). Quando il miRNA viene caricato sul RISC uno dei due filamenti viene allontanato e degradato. Il filamento che viene a far parte del RISC è in genere quello con l'estremità 5' con energia libera minore (47). Una volta avvenuta la formazione del miRISC, contenente il miR-maturo, può avvenire l'appaiamento di questo con il messaggero *target*.

### 1.1.3 Regolazione post-trascrizionale

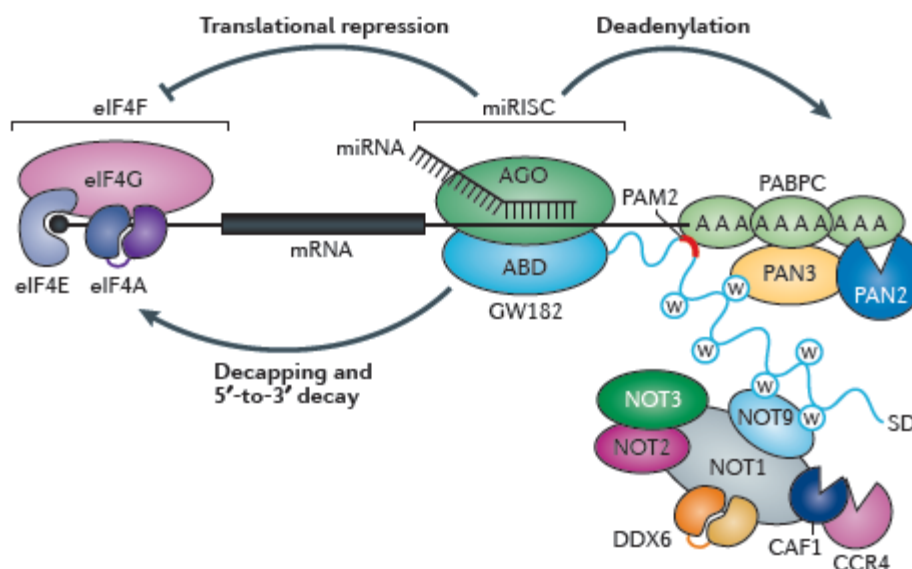
Il controllo dell'espressione genica avviene a livello post-trascrizionale, inducendo la degradazione di specifici mRNA oppure impedendo la traduzione della proteina (48); (49). Il meccanismo d'azione che porta al silenziamento genico dipende dal grado di complementarità tra il miRNA e il suo mRNA bersaglio. Il grado di complementarità, che si limita ad una regione di 6-8 nucleotidi all'estremità 5' del miRNA detta "seed", è una caratteristica fondamentale per il destino dell'mRNA dopo il reclutamento del RISC. Una ridotta omologia di sequenza porta generalmente alla repressione traduzionale senza la degradazione dell'mRNA bersaglio, mentre se l'appaiamento alla regione 3'UTR degli mRNA bersaglio è perfetto, come nei miRNA delle piante o in alcuni miRNA animali, si verifica il taglio del messaggero, catalizzato dal complesso RISC reclutato dal miRNA stesso, che porta infine alla degradazione dell'mRNA bersaglio (4). Una volta associato all'mRNA bersaglio, la funzione inibitoria del complesso RISC si esplica mediante diversi possibili meccanismi illustrati nella Figura 3 e che ricadono in due grandi categorie:

o Inibizione della sintesi proteica

o Deadenilazione dell'mRNA cui consegue la degradazione della stessa molecola a causa di un'aumentata instabilità dell'mRNA

Nel corso degli ultimi anni, notevoli progressi sono stati fatti nella comprensione della struttura base della degradazione del bersaglio dei miRNA. Tuttavia, meno si sa circa i meccanismi con cui i miRNA animali reprimono la traduzione in assenza di degradazione dell'mRNA. Prove cumulative hanno indicato che la degradazione dei targets dei miRNA è catalizzata da enzimi coinvolti nel pathway di degradazione cellulare dell'mRNA (50); (51). In questo pathway, gli mRNA vengono prima deadenilati dall'azione consecutiva e ridondante di PAN2-PAN3 e dal complesso di deadenilasi CCR4-NOT (52). Gli mRNA deadenilati sono poi decappati dalla proteina di decapping 2 (DCP2), che richiede per la piena attività ulteriori cofattori. Nei metazoi, questi cofattori includono DCP1, EDC3, EDC4, PATL1 e DDX6 (53). Infine, gli mRNA deadenilati e decappati sono degradati da una nucleasi citoplasmatica, l'esoribonucleasi 1 (XRN1). Le fasi consecutive nel pathway di degradazione dell' mRNA sono accoppiate attraverso una rete di interazioni dirette tra le subunità dei complessi catalitici coinvolti. Ad esempio, nei metazoi, il complesso CCR4-NOT interagisce con i fattori di decapping DDX6 e PATL1, che a loro volta interagiscono con componenti aggiuntivi del complesso di decapping, fornendo un collegamento fisico tra le coppie di deadenilazione e di decapping.(54); (51); (53).

Inoltre, i fattori di decapping (EDC4 nei vertebrati e DCP1 in *Drosophila melanogaster*) interagiscono con XRN1. Queste interazioni assicurano che XRN1 venga reclutato nella posizione in cui gli mRNA decappati sono prodotti. Il miRISC utilizza questo macchinario di degradazione tramite il reclutamento delle proteine adattatrici GW182. Le proteine AGO interagiscono con la proteina GW182, che a sua volta interagisce con la proteina citoplasmatica legante il polyA (PABPC) e con i complessi citoplasmatici deadenilasi PAN2-PAN3 e CCR4-NOT. I complessi PAN2-PAN3 e CCR4-NOT catalizzano la deadenilazione dell'mRNA target (FIGURA 3) (55). Le proteine GW182 sono costituite da un dominio amino-terminale che lega AGO (ABD) e un dominio di silenziamento (SD). Nelle cellule animali, gli mRNA deadenilati sono decappati e rapidamente degradati dall'esoribonucleasi 1 (XRN1) (56); (57).

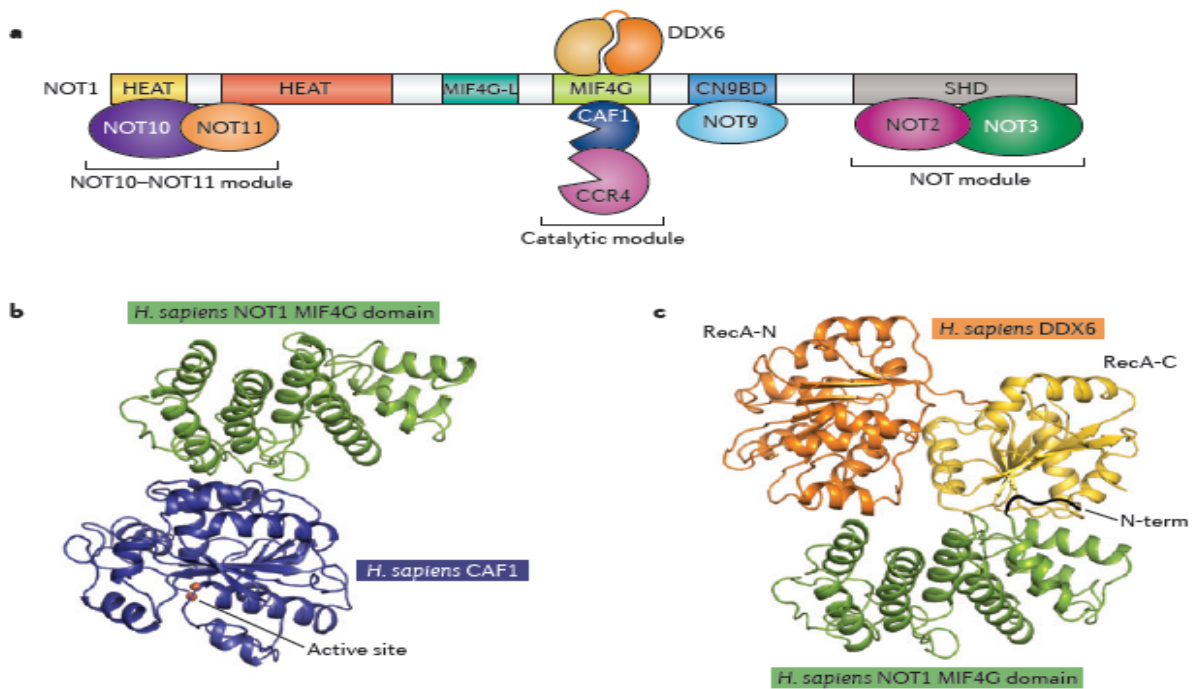


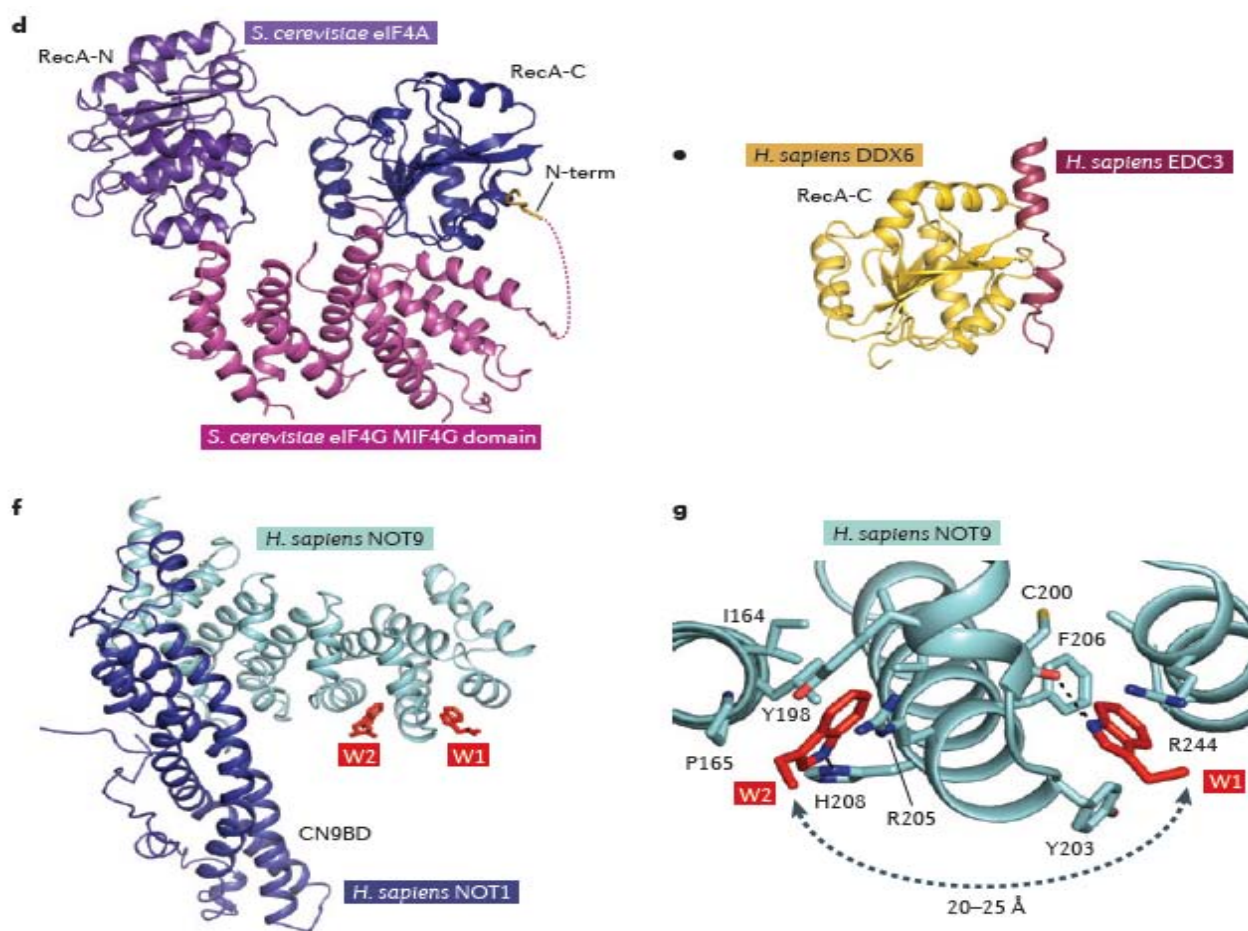
**Figura 3:** Overview del silenziamento genico miRNA mediato negli animali.

Inoltre, i miRNA reprimono la traduzione, ma il meccanismo molecolare preciso rimane poco chiaro. I modelli attuali sono legati alle RNA elicasi: essi coinvolgono sia il fattore di iniziazione eIF4A2 e il paralogo eIF4A1 che il repressore della traduzione e attivatore del decapping DDX6. Tuttavia, è importante notare che altre proteine, tra cui EDD97 (anche conosciuto come UBR5) e TRIM32, sono implicate nella regolazione della repressione della traduzione da parte dei miRNA attraverso le interazioni con DDX6 (58); (59). Le RNA elicasi eIF4A sono fattori di inizio di traduzione che srotolano le strutture secondarie all'interno delle regioni non tradotte al 5' dell'mRNA (UTR), permettendo ai complessi di pre-iniziazione 43S di eseguire la scansione del 5'UTR verso il codone di inizio (60). Molti studi indicano che i miRISCs interferiscono con

questo processo di scansione del ribosoma ad opera di eIF4A (61). Tuttavia, studi individuali divergono su come questa interferenza avvenga, e mancano dati su come eIF4A contribuisca al silenziamento. Uno studio ha dimostrato che i miRISC in cellule umane reclutano specificatamente eIF4A2 (ma non il suo paralogo eIF4A1) attraverso le interazioni con il complesso CCR4-NOT. In modo specifico, il dominio MIF4G di NOT1 interagisce con eIF4A2 in modo analogo all'interazione di eIF4G con eIF4A (Fig. 4d). L'interazione con NOT1 blocca eIF4A2 sul 5'UTR dell'mRNA, creando quindi un blocco per la scansione da parte del complesso 43S e conseguentemente la repressione dell'inizio di traduzione(62). Questo modello è stato messo in discussione in studi successivi mostrando che il dominio MIF4G di NOT1 umano si lega direttamente all' RNA elicasi putativa DDX6 ma non a eIF4A2 (63). Inoltre, esperimenti in mammiferi e in *D. melanogaster* hanno indicato che i miRNA reprimono la traduzione rilasciando, piuttosto che reclutando, eIF4A e che non vi è alcuna distinzione tra il rilascio di eIF4A1 e il rilascio di eIF4A2 dall' mRNA. In estratti privi di cellule di *D. melanogaster*, GW182 legandosi all'mRNA causa lo spostamento di eIF4A nonché della proteina eIF4E che lega il cap, anche se non è stato determinato se questa dissociazione richiede l'interazione con il complesso CCR4-NOT o con altri partner (61). Analogamente, non è stato direttamente indagato se il complesso CCR4-NOT è necessario per il rilascio di eIF4A1 o eIF4A2 nelle cellule umane. In particolare, in estratti privi di cellule di *D. melanogaster*, AGO1 potrebbe anche promuovere lo spostamento di eIF4A indipendentemente da GW182, fornendo ulteriore sostegno all'idea che un meccanismo repressivo GW182- e CCR4-NOT indipendente operi nelle cellule dell'insetto (64). Indipendentemente dal fatto che eIF4A venga reclutato o rilasciato, un importante risultato dei modelli che coinvolgono eIF4A è che i miRNA possono reprimere solo gli mRNA che sono tradotti tramite un meccanismo eIF4A-dipendente. Coerentemente con questo modello, un mRNA con un 5'UTR destrutturato, che non richiede l'attività di eIF4A per la traduzione, ha dimostrato essere resistente al silenziamento (62). Tuttavia, un altro studio non ha rilevato una correlazione tra la struttura secondaria del 5'UTR e la repressione dei miRNA. Allo stesso modo, i farmaci che inibiscono l'attività di eIF4A hanno dato risultati contraddittori, molto probabilmente a causa della difficoltà di trovare appropriati controlli di normalizzazione che non sono affetti dal trattamento (62). Forse la prova più convincente che miRNA interferiscono con la scansione del ribosoma deriva dall'uso di siti interni di entrata ribosomiale (IRESS) che guidano la traduzione dei miRNA. IRESS bypassano specifici step nell'inizio canonico di traduzione cap-dipendente e possono quindi contribuire a individuare la fase di traduzione che è guidata dai miRNA (60). In particolare, diversi studi

hanno riferito che i miRNA non riescono a reprimere la traduzione avviata da IRESS che bypassano la scansione, allo stesso tempo altri studi hanno dimostrato che i miRNA non reprimono la traduzione guidata da IRESS che richiedono l'attività di eIF4A. Numerosi studi hanno riportato che solo l'inizio della traduzione cap-mediata, e non IRES-mediata, è sensibile alla repressione miRNA-mediata. Nonostante queste incongruenze, il quadro che emerge da questi e ulteriori studi è che i miRNA interferiscono con l'assemblaggio e / o la funzione del complesso eIF4F targettato da eIF4E, eIF4G o eIF4A (65); (66). Il complesso formato da DDX6 e il dominio MIF4G di NOT1 è strutturalmente correlato al complesso eIF4A-eIF4G, e le interfacce coinvolgono elementi strutturali equivalenti (Fig. 4a, c, d).





**Figura 4:** Assemblaggio e interazione del complesso CCR4-NOT con le proteine GW182. **a)** NOT1 è costituito da domini alfa-elica piegati in modo indipendente, che sono strutturalmente correlati ai domini heat repeats. Due domini mostrano ulteriore omologia con il dominio centrale del fattore di iniziazione della traduzione eucariotica 4G (EIF4G): MIF4G-L e MIF4G. Inoltre, NOT1 contiene un dominio di legame a CAF40/NOT9 (CN9BD) e dominio carbossi-terminale (SHD). **b)** Struttura del dominio MIF4G di NOT1 in Homo sapiens legato alla deadenilasi CAF1. **c)** struttura cristallina del dominio umano MIF4G di NOT1 legato alla proteina 6 con dominio DEAD (DDX6). Confronto di strutture in **b** e **c** indicano che CAF1 e DDX6 potrebbero legarsi a NOT1 contemporaneamente. **d)** Il dominio MIF4Gb di eIF4G di Saccharomyces cerevisiae legato a eIF4A. **e)** Struttura del dominio RecA-C di DDX6 umana legato a un enhancer di decapping (EDC3). **f)** Cristallo struttura del CN9BD legato alla subunità NOT9. **g)** tasche leganti il triptofano di NOT9 viste da vicino.

Allo stesso modo tutte le proteine con domini di morte, DDX6 e eIF4A consistono di domini in tandem simili a RecA. Questi domini interagiscono con i domini MIF4G di NOT1 e eIF4G, rispettivamente, in maniera simile a quelli descritti per altre proteine con domini DEAD e domini MIF4G in una vasta gamma di proteine (63); (67). Sebbene il legame sia mediato da elementi strutturali equivalenti, la specificità è impartita da differenze nella sequenza di aminoacidi delle coppie leganti. La somiglianza strutturale tra i complessi eIF4G-eIF4A e NOT1-DDX6 si

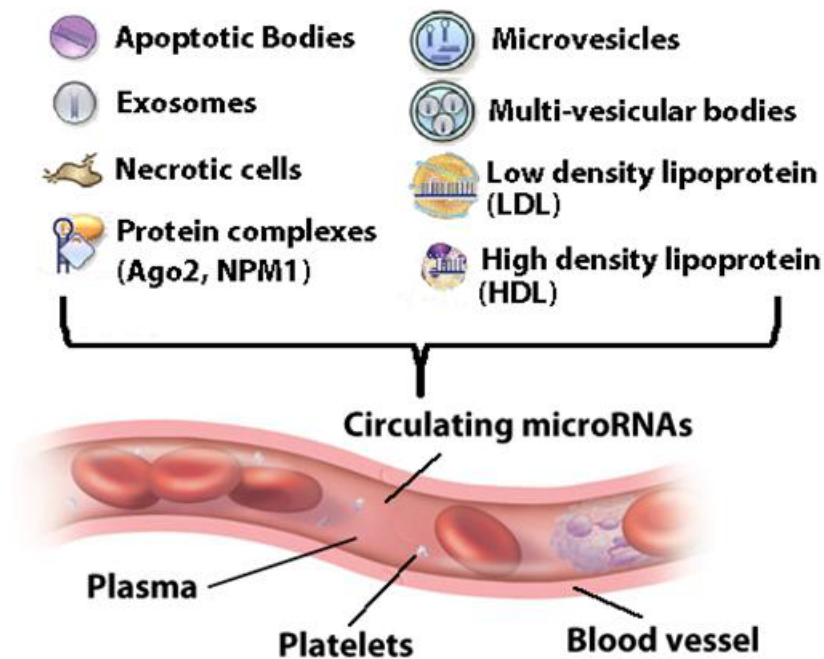
estende al di là delle interazioni mediate dai domini RecA e MIF4G. Infatti, nel complesso eIF4G-eIF4A, l'interfaccia è allungata per via delle interazioni mediate dalla coda N-terminale non strutturata del dominio MIF4G di eIF4G, che contatta la superficie laterale del dominio C-terminale RecA (Reca-C) di eIF4A (67). Questa estensione contribuisce all'affinità dell'interazione nel complesso eIF4G-eIF4A. Una interazione analoga tra la coda N-terminale non strutturata del dominio MIF4G di NOT1 e il dominio RecA-C di DDX6 si osserva nel complesso NOT1-DDX6, e questo è in grado di contribuire alla specificità di NOT1 per DDX6. Inoltre, in seguito al legame, il dominio MIF4G di NOT1 induce cambiamenti conformazionali in DDX6 che stimolano la sua attività ATPasi, in modo simile alla stimolazione dell'attività di eIF4A da parte di eIF4G (67). La struttura del complesso DDX6-NOT1 ha rivelato un legame molecolare diretto a lungo cercato tra i macchinari di deadenilazione e decapping e, insieme con le strutture precedenti, ha consentito il collegamento di passaggi consecutivi nel pathway di degradazione 5'-3' dell'mRNA (Figura 5).

**Figura 5:** Struttura modello del silenziamento mediato dai miRNA.

chiave rimanente è come DDX6 reprime la traduzione. DDX6 interagisce con il trasportatore eIF4E (4E-T, conosciuto anche come EIF4ENIF1), una proteina legante eIF4E che compete con eIF4G per il legame di eIF4E e reprime l'inizio della traduzione (69). Tuttavia, la deplezione di 4E-T attenua solo parzialmente il silenziamento. Questo implica che DDX6, oltre l'interruzione dell' interazione eIF4E-eIF4G, può utilizzare meccanismi aggiuntivi di repressione della traduzione che sono finora sconosciute. In questo contesto, è interessante notare che l'attività ATPasica di DDX6, che è stimolata da NOT1, è richiesta per il silenziamento miRNA-mediato (51).

## **1.2 BIOGENESI, STABILITA' E RICONOSCIMENTO CELLULARE DEI MICRORNA CIRCOLANTI**

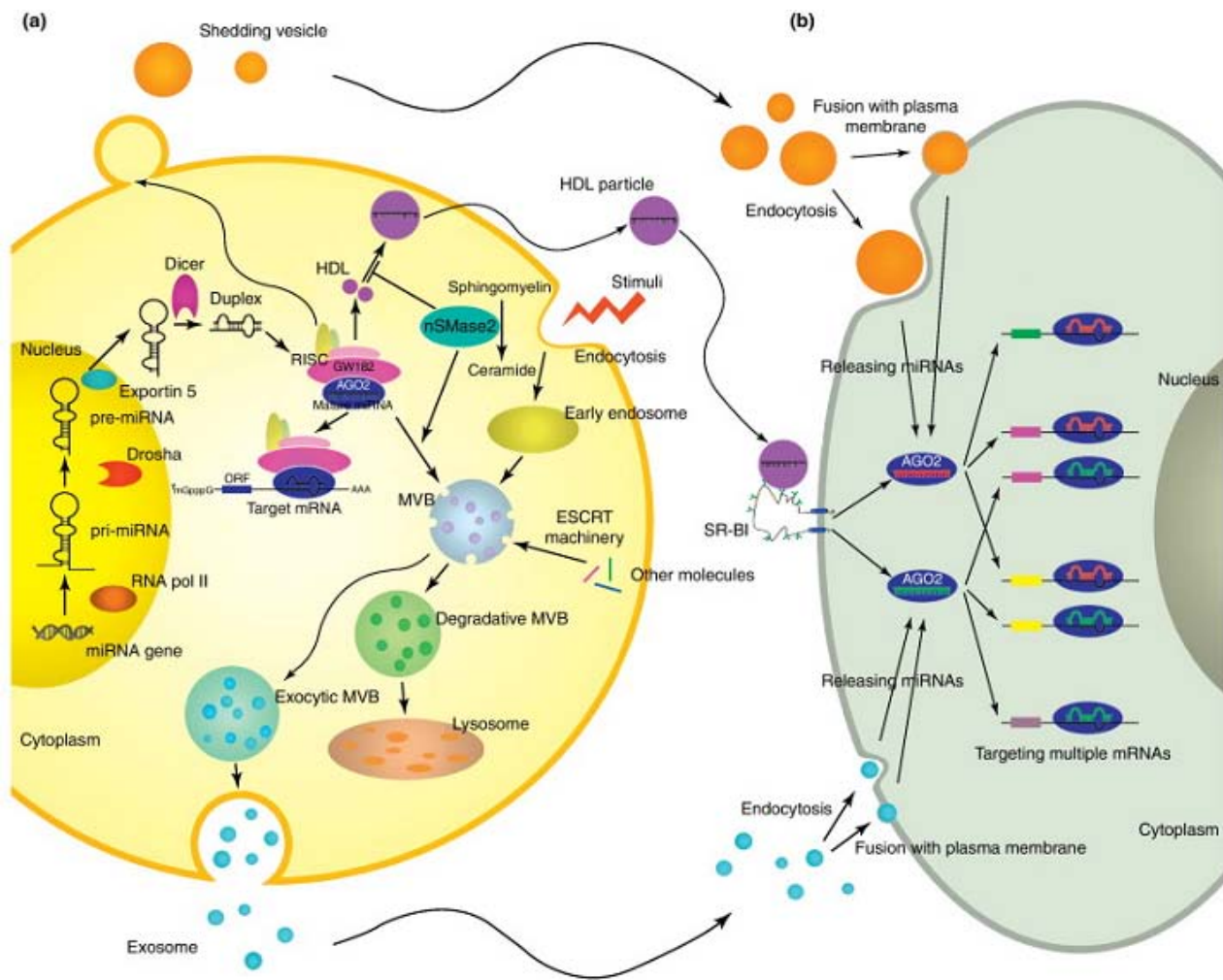
Negli ultimi anni, la scoperta dei miRNA nei fluidi biologici ha generato un grande interesse per il loro uso potenziale come biomarcatori. I biomarcatori circolanti giocano un ruolo significativo in applicazioni cliniche soprattutto per la diagnosi di malattie, per monitorare l'effetto terapeutico di un farmaco o predire la recidiva tumorale in pazienti trattati con chemioterapia (70). I miRNA circolanti hanno molte delle caratteristiche essenziali di un buon biomarcatore: sono stabili in circolo, resistenti alla digestione da parte delle RNAsi, a pH estremi, alle alte temperature, alla conservazione prolungata e a multipli cicli di congelamento-scongelo (71); (72). In molti casi, i cambiamenti nei livelli di espressione dei miRNA circolanti sono stati associati con diverse malattie o alcune fasi biologiche/patologiche. I miRNA circolanti vengono rilasciati nel flusso sanguigno in molte forme (Figura 6), anche se la loro origine e il meccanismo del loro rilascio non sono stati completamente chiariti.



**Figura 6. Differenti specie di miRNA circolanti nel flusso sanguigno:** I miRNA possono entrare in circolo attraverso tre percorsi: (i) rilascio passivo; (ii) secrezione attiva attraverso microvescicole; e (iii) secrezione attiva in combinazione con la lipoproteine ad alta densità (HDL) e proteine leganti l'RNA. Altre proteine leganti l'RNA, tra cui Argonaute 2 (AGO2) e nucleofosmina 1 (NPM1), legano i miRNA circolanti; però è attualmente poco chiaro se AGO2- o NPM1 leganti i miRNA siano attivamente rilasciati dalle cellule e possano essere assorbiti dalle cellule riceventi. Il rilascio dei miRNA via microvescicole e HDL è un processo attivo e richiede un dispendio energetico (energia dipendente), e questa è la caratteristica fondamentale che distingue i miRNA secreti dai miRNA rilasciati passivamente.

Le ragioni della elevata stabilità dei miRNA in circolazione restano in gran parte sconosciute, anche se sono state proposte molte ipotesi (73). In primo luogo, i miRNA circolanti potrebbero avere modifiche uniche, come la metilazione, l'adenilazione, e l'uridilazione che aumentano la loro stabilità e così li proteggono contro le RNasi(74);. In secondo luogo, i miRNA circolanti sono protetti dall'incapsulamento nelle microvescicole derivati da cellule (75) o attraverso specifiche proteine leganti l'RNA (76); (77);. Nonostante le poche informazioni circa la biogenesi e la stabilità dei miRNA circolanti, un po' di più si sa circa il loro ruolo funzionale nel determinare un effetto biologico anche in luoghi distanti del corpo. In realtà, sono state suggerite tre diverse ipotesi che spiegano l'origine e la stabilità dei miRNA nei fluidi corporei circolanti (73). La prima suggerisce un rilascio passivo di miRNA da cellule apoptotiche e necrotiche e

tessuti danneggiati, o da cellule con una breve emivita, come le piastrine. Il secondo suggerisce una secrezione attiva attraverso microvescicole di derivazione cellulare, compresi esosomi e shedding vesicles, che sono frammenti cellulari delimitati da membrana rilasciate dalle cellule, in condizioni sia normali e patologiche ( figura 7) (73). Gli esosomi sono formati attraverso la gemmazione interna delle prime membrane endosomiali, dando origine a corpi multivescicolari intracellulari che poi si fondono con la membrana plasmatica e vengono rilasciati nell'ambiente extracellulare. Le shedding vesicles sono vescicole più grandi che sono generate da uscita una estroflessione della membrana plasmatica. Il caricamento dei miRNA in microvescicole sembra essere controllato da proteine specifiche del complesso di silenziamento indotto dall'RNA (78). L'ultima ipotesi prevede la secrezione attiva da parte delle cellule di miRNA e complessi di proteine leganti l'RNA. Alcune di queste proteine leganti l'RNA sono rappresentate da nucleofosmina (cioè la fosfoproteina nucleolare NMP1) (73), lipoproteine ad alta/bassa densità (79) e Argonauta 2 (75); (80); (76) (figura 7). In uno studio recente, il rilascio di miRNA nel sangue ha dimostrato essere controllato da sfingomielinasi neutra 2 e attraverso il macchinario di secrezione ceramide-dipendente (79). Questi risultati suggeriscono l'esistenza di uno specifico sistema di esportazione dei miRNA da parte di alcune cellule, e di riconoscimento e internalizzazione da parte di altre.



**Figura 7 La biogenesi dei microRNA (miRNA) secreti.** (a) descrizione schematica della selezione e rilascio dei miRNA secreti i miRNA Possono essere complessati e trasportati verso l'ambiente extracellulare attraverso tre diversi percorsi. (i) La generazione di miRNA esosomiali richiede la produzione di ceramide sul lato citosolico da parte della sfingomielinasi neutra 2 (nSMase2), e altre molecole indirizzate ai lisosomi dipendono dal complesso di smistamento endosomiale necessario per il macchinario di trasporto (ESCRT). Così, un percorso ESCRT-indipendente e ceramide-dipendente può controllare l'incorporazione dei miRNA negli esosomi. Inoltre, gli esosomi possono fornire componenti cellulari al complesso di silenziamento indotto dall'RNA (RISC), come GW182 e Argonaute2 (AGO2), per migliorare la funzione biologica dei miRNA secreti. (ii) le vescicole sparse sono formate dal processo di blebbing o distacco dalla membrana plasmatica. (iii) i miRNA all'interno della cellula donatrice, come lipoproteine ad alta densità (HDL. (b) descrizione schematica della cattura dei miRNA secreti in cellule riceventi. Gli esosomi e le vescicole possono donare i loro miRNA alle cellule riceventi tramite il processo di endocitosi, la fagocitosi o fusione diretta con la membrana plasmatica. I miRNA associati alle HDL si legano alle cellule riceventi attraverso il legame a recettori "spazzini" di classe B di tipo I (SR-BI) presenti sulla membrana cellulare della cellula ricevente.

### 1.2.1 Quantificazione e analisi dei miRNA circolanti

L'espressione dei miRNA circolanti può essere facilmente valutata con vari metodi (ad esempio, PCR quantitativa, microarray e sequenziamento di nuova generazione) (81); (82); (83). Uno dei metodi più sensibili per l'analisi dei miRNA circolanti è la PCR quantitativa (qPCR), che generalmente prevede l'uso di un primer stem-loop (84). Questo metodo, messo a punto per la rilevazione di miRNA cellulari, può essere impiegato, in linea di principio, anche per il rilevamento di miRNA circolanti che sono generalmente poco espressi, sebbene l'utilità di tale metodo sia stato recentemente dibattuto (85). Il profiling di miRNA circolanti tramite microarrays è una tecnica largamente impiegata in quegli studi che permettono di avere una quantità di materiale di partenza superiore alla quantità convenzionale utilizzata per la qRT-PCR. Inoltre, la necessità di sviluppare sonde aggiornate e condizioni di ibridazione destinate alla rilevazione di diversi miRNA contemporaneamente, in qualche modo hanno ostacolato l'uso di questa tecnica (70); (86). Negli ultimi anni, il sequenziamento di nuova generazione (deep sequencing) si è dimostrato essere una tecnica molto promettente per l'identificazione di nuovi miRNA come biomarcatori (86). Questa tecnologia è stata utilizzata per identificare mRNA tessuto e stadio specifico e l'espressione di miRNA, e per confrontare il profilo dei miRNA in diverse malattie (87); (88); (89). Come illustrato nei paragrafi precedenti, gli esosomi circolanti contengono miRNA che possono essere sequenziati. Bellingham e collaboratori hanno eseguito il primo esperimento di RNA-Seq per indagare il profilo di miRNA contenuti in esosomi rilasciati da cellule neuronali infettati da prioni (83). Essi hanno dimostrato che gli esosomi neuronali contengono una vasta gamma di specie di RNA: aree ripetute di RNA retrovirale, frammenti di mRNA, tRNA, RNA non codificanti, piccoli RNA nucleari, piccoli RNA nucleolare, altri RNA e anche nuovi candidati miRNA. I risultati illustrati in questo lavoro hanno chiaramente dimostrato che è possibile avere una 'firma di miRNA' da esosomi e che tale firma può essere potenzialmente sfruttata non solo per meglio comprendere la patogenesi di queste malattie, ma anche per la loro diagnosi. Il sequenziamento dei miRNA circolanti è stato anche sfruttato per identificare nuovi marcatori clinici predittivi del carcinoma mammario localmente avanzato (64). In realtà, gli autori hanno utilizzato un nuovo approccio di sequenziamento completo e identificato specifici gruppi di miRNA che sono stati associati con i vari parametri istopatologici e due di loro (miR-375 e miR-122) sono associati con gli esiti clinici (maggiori livelli di questi miRNA sono associati con recidive metastatiche) in pazienti con carcinoma mammario (stadio II-III). Questi risultati sono degni di nota e possono consentire trattamenti di

chemioterapia ottimizzati e preventivi interventi anti-metastasi in applicazioni cliniche. Tuttavia, uno dei problemi principali quando si tratta di quantificare i miRNA circolanti è la riproducibilità tra diverse piattaforme (86) o metodi diversi (ad esempio, microarrays o low-density arrays per qPCR) (90) e diversi protocolli per la preparazione del campione (91) e l'isolamento dei miRNA (87). Inoltre, anche l'analisi dei dati è inevitabilmente diversa dal metodo classico del  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (92). Infatti, uno dei problemi più comuni è la strategia di normalizzazione da adottare dopo l'esecuzione del profiling con qPCR (93). Finora, diverse strategie di normalizzazione sono state utilizzate per l'analisi dei miRNA circolanti. Inizialmente, alcuni autori hanno usato dei calibratori impiegati classicamente per la normalizzazione dei dati qPCR dell'mRNA (cioè GAPDH, RNU6B, 18S, 5S) (94), ma la loro espressione è variabile o assente in circolo ed eventuali degradazioni ne impediscono l'utilizzo (95). Altre strategie prevedono l'utilizzo di miRNA sintetici di *C. elegans* senza omologia con miRNA umani, come cel-miR-39 e cel-miR-54, come spike-in e controlli di normalizzazione (96); (97). Tuttavia, poiché non sono miRNA endogeni, l'utilizzo come normalizzatori non è metodologicamente corretto. Come strategia alternativa per la normalizzazione è stato utilizzato un miRNA espresso costitutivamente (cioè, il miR-16) (98); (99). Anche se abbastanza stabile e altamente espresso in molte condizioni, questo miRNA non è adatto per questo scopo poiché è stato trovato modulato in molte malattie e nei tumori (100). Per ovviare a tutti questi problemi, Mestdagh e collaboratori hanno introdotto il metodo della media globale per normalizzare il profiling di miRNA ottenuti con qPCR (101). Infatti, in questi studi vengono valutati un gran numero di miRNA e questa strategia è stata dimostrata superare altre strategie di normalizzazione (101).

## Bibliografia

1. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Nov;1803(11):1231-43.
2. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.
3. Turner MJ, Jiao AL, Slack FJ. Autoregulation of *lin-4* microRNA transcription by RNA activation (RNAa) in *C. elegans*. *Cell Cycle*. 2014;13(5):772-81.
4. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):350-5.
5. Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jan;8(1):23-36.
6. Noma K, Sugiyama T, Cam H, Verdel A, Zofall M, Jia S, et al. RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. *Nat Genet*. 2004 Nov;36(11):1174-80.
7. Matzke M, Aufsatz W, Kanno T, Daxinger L, Papp I, Mette MF, et al. Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Mar 15;1677(1-3):129-41.
8. Pulukuri SM, Rao JS. Small interfering RNA directed reversal of urokinase plasminogen activator demethylation inhibits prostate tumor growth and metastasis. *Cancer Res*. 2007 Jul 15;67(14):6637-46.
9. Aravin AA, Sachidanandam R, Girard A, Fejes-Toth K, Hannon GJ. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science*. 2007 May 4;316(5825):744-7.
10. Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*. 2004 Aug 27;305(5688):1289-92.
11. Kim DH, Villeneuve LM, Morris KV, Rossi JJ. Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 Sep;13(9):793-7.

12. Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 Aug;14(8):475-88.
13. Ghildiyal M, Xu J, Seitz H, Weng Z, Zamore PD. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA\* strands into the RNA interference pathway. *RNA.* 2010 Jan;16(1):43-56.
14. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):281-97.
15. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* 2002 Mar 15;16(6):720-8.
16. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004 Oct;14(10A):1902-10.
17. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* 2004 Dec;10(12):1957-66.
18. Corcoran DL, Pandit KV, Gordon B, Bhattacharjee A, Kaminski N, Benos PV. Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data. *PLoS One.* 2009;4(4):e5279.
19. Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Nov 6;104(45):17719-24.
20. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001 Oct 26;294(5543):853-8.
21. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 2001 Oct 26;294(5543):858-62.
22. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2002 Sep 2;21(17):4663-70.

23. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. *RNA*. 2003 Feb;9(2):175-9.
24. Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*. 2005 Mar;11(3):241-7.
25. Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res*. 2004 May 1;64(9):3087-95.
26. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*. 2007 Jul 13;130(1):89-100.
27. Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blelloch R. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev*. 2008 Oct 15;22(20):2773-85.
28. Ender C, Krek A, Friedlander MR, Beitzinger M, Weinmann L, Chen W, et al. A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol Cell*. 2008 Nov 21;32(4):519-28.
29. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 Dec;13(12):1097-101.
30. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):415-9.
31. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004 Jan 2;303(5654):95-8.
32. Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene*. 2006 Oct 9;25(46):6156-62.
33. Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell*. 2007 Oct 26;28(2):328-36.

34. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):343-9.
35. Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, et al. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*. 2004 Apr 2;117(1):69-81.
36. Tabara H, Yigit E, Siomi H, Mello CC. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell*. 2002 Jun 28;109(7):861-71.
37. Liu Q, Rand TA, Kalidas S, Du F, Kim HE, Smith DP, et al. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science*. 2003 Sep 26;301(5641):1921-5.
38. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*. 2001 Aug 10;293(5532):1146-50.
39. Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev*. 2002 Nov 1;16(21):2733-42.
40. Forstemann K, Tomari Y, Du T, Vagin VV, Denli AM, Bratu DP, et al. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol*. 2005 Jul;3(7):e236.
41. Jiang F, Ye X, Liu X, Fincher L, McKearin D, Liu Q. Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in *Drosophila*. *Genes Dev*. 2005 Jul 15;19(14):1674-9.
42. Saito K, Ishizuka A, Siomi H, Siomi MC. Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells. *PLoS Biol*. 2005 Jul;3(7):e235.
43. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005 Aug 4;436(7051):740-4.

44. Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Laine S, Sack R, Gatignol A, et al. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep.* 2005 Oct;6(10):961-7.
45. Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 2006 Feb 8;25(3):522-32.
46. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 2008 Feb;9(2):102-14.
47. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* 2003 Oct 17;115(2):199-208.
48. Finnegan EF, Pasquinelli AE. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2013 Jan-Feb;48(1):51-68.
49. Zhang Z, Qin YW, Brewer G, Jing Q. MicroRNA degradation and turnover: regulating the regulators. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2012 Jul-Aug;3(4):593-600.
50. Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell.* 2005 Aug 26;122(4):553-63.
51. Mathys H, Basquin J, Ozgur S, Czarnocki-Cieciura M, Bonneau F, Aartse A, et al. Structural and biochemical insights to the role of the CCR4-NOT complex and DDX6 ATPase in microRNA repression. *Mol Cell.* 2014 Jun 5;54(5):751-65.
52. Wahle E, Winkler GS. RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-not and Pan2-Pan3 complexes. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Jun-Jul;1829(6-7):561-70.
53. Jonas S, Izaurralde E. The role of disordered protein regions in the assembly of decapping complexes and RNP granules. *Genes Dev.* 2013 Dec 15;27(24):2628-41.
54. Chen Y, Boland A, Kuzuoglu-Ozturk D, Bawankar P, Loh B, Chang CT, et al. A DDX6-CNOT1 complex and W-binding pockets in CNOT9 reveal direct links between miRNA target recognition and silencing. *Mol Cell.* 2014 Jun 5;54(5):737-50.

55. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet.* 2015 Jul;16(7):421-33.
56. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet.* 2011 Feb;12(2):99-110.
57. Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol.* 2012 Jun 5;19(6):586-93.
58. Su H, Meng S, Lu Y, Trombly MI, Chen J, Lin C, et al. Mammalian hyperplastic discs homolog EDD regulates miRNA-mediated gene silencing. *Mol Cell.* 2011 Jul 8;43(1):97-109.
59. Nicklas S, Okawa S, Hillje AL, Gonzalez-Cano L, Del Sol A, Schwamborn JC. The RNA helicase DDX6 regulates cell-fate specification in neural stem cells via miRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2015 Mar 11;43(5):2638-54.
60. Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Feb;11(2):113-27.
61. Fukao A, Mishima Y, Takizawa N, Oka S, Imataka H, Pelletier J, et al. MicroRNAs trigger dissociation of eIF4AI and eIF4AII from target mRNAs in humans. *Mol Cell.* 2014 Oct 2;56(1):79-89.
62. Meijer HA, Kong YW, Lu WT, Wilczynska A, Spriggs RV, Robinson SW, et al. Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science.* 2013 Apr 5;340(6128):82-5.
63. Rouya C, Siddiqui N, Morita M, Duchaine TF, Fabian MR, Sonenberg N. Human DDX6 effects miRNA-mediated gene silencing via direct binding to CNOT1. *RNA.* 2014 Sep;20(9):1398-409.
64. Wu X, Somlo G, Yu Y, Palomares MR, Li AX, Zhou W, et al. De novo sequencing of circulating miRNAs identifies novel markers predicting clinical outcome of locally advanced breast cancer. *J Transl Med.* 2012 Mar 8;10:42,5876-10-42.

65. Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, et al. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*. 2007 Sep 21;317(5845):1764-7.
66. Zdanowicz A, Thermann R, Kowalska J, Jemielity J, Duncan K, Preiss T, et al. *Drosophila* miR2 primarily targets the m<sup>7</sup>GpppN cap structure for translational repression. *Mol Cell*. 2009 Sep 24;35(6):881-8.
67. Tritschler F, Braun JE, Eulalio A, Truffault V, Izaurralde E, Weichenrieder O. Structural basis for the mutually exclusive anchoring of P body components EDC3 and Tral to the DEAD box protein DDX6/Me31B. *Mol Cell*. 2009 Mar 13;33(5):661-8.
68. Fromm SA, Truffault V, Kamenz J, Braun JE, Hoffmann NA, Izaurralde E, et al. The structural basis of Edc3- and Scd6-mediated activation of the Dcp1:Dcp2 mRNA decapping complex. *EMBO J*. 2012 Jan 18;31(2):279-90.
69. Rolland T, Tasan M, Charloreaux B, Pevzner SJ, Zhong Q, Sahni N, et al. A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell*. 2014 Nov 20;159(5):1212-26.
70. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*. 2010 Oct;101(10):2087-92.
71. Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008 Mar;54(3):482-90.
72. Ge Q, Zhou Y, Lu J, Bai Y, Xie X, Lu Z. miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions. *Molecules*. 2014 Jan 27;19(2):1568-75.
73. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 Jun 7;8(8):467-77.
74. Katoh T, Sakaguchi Y, Miyauchi K, Suzuki T, Kashiwabara S, Baba T, et al. Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes Dev*. 2009 Feb 15;23(4):433-8.

75. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun;9(6):654-9.
76. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 22;108(12):5003-8.
77. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem.* 2010 Jun 4;285(23):17442-52.
78. Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol.* 2009 Sep;11(9):1143-9.
79. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* 2011 Apr;13(4):423-33.
80. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2010 Nov;38(20):7248-59.
81. Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, Munro S, Kumar A, Anderson B. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One.* 2009 Jul 14;4(7):e6229.
82. Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol.* 2009 Jan;112(1):55-9.
83. Bellingham SA, Coleman BM, Hill AF. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res.* 2012 Nov;40(21):10937-49.
84. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005 Nov 27;33(20):e179.

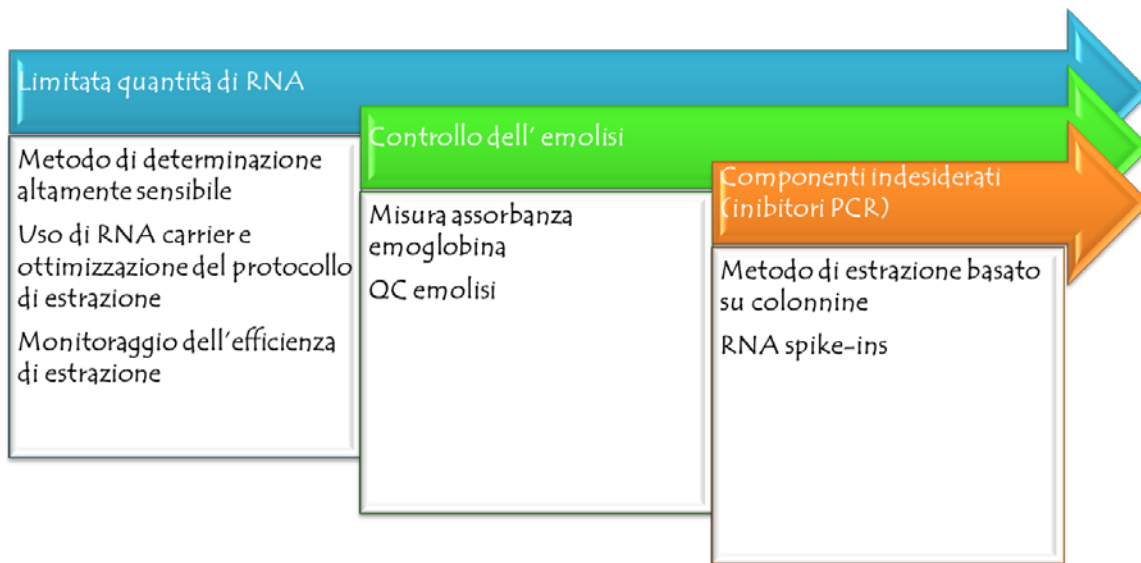
85. Schamberger A, Orban TI. 3' IsomiR species and DNA contamination influence reliable quantification of microRNAs by stem-loop quantitative PCR. *PLoS One*. 2014 Aug 29;9(8):e106315.
86. Mestdagh P, Hartmann N, Baeriswyl L, Andreassen D, Bernard N, Chen C, et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods*. 2014 Aug;11(8):809-15.
87. McAlexander MA, Phillips MJ, Witwer KW. Comparison of Methods for miRNA Extraction from Plasma and Quantitative Recovery of RNA from Cerebrospinal Fluid. *Front Genet*. 2013 May 16;4:83.
88. Han Y, Chen J, Zhao X, Liang C, Wang Y, Sun L, et al. MicroRNA expression signatures of bladder cancer revealed by deep sequencing. *PLoS One*. 2011 Mar 28;6(3):e18286.
89. Wach S, Nolte E, Szczyrba J, Stohr R, Hartmann A, Orntoft T, et al. MicroRNA profiles of prostate carcinoma detected by multiplatform microRNA screening. *Int J Cancer*. 2012 Feb 1;130(3):611-21.
90. Chen Y, Gelfond JA, McManus LM, Shireman PK. Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. *BMC Genomics*. 2009 Aug 28;10:407,2164-10-407.
91. Cheng HH, Yi HS, Kim Y, Kroh EM, Chien JW, Eaton KD, et al. Plasma processing conditions substantially influence circulating microRNA biomarker levels. *PLoS One*. 2013 Jun 7;8(6):e64795.
92. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8.
93. D'haene B, Mestdagh P, Hellemans J, Vandesompele J. miRNA expression profiling: from reference genes to global mean normalization. *Methods Mol Biol*. 2012;822:261-72.
94. Lardizabal MN, Nocito AL, Daniele SM, Ornella LA, Palatnik JF, Veggi LM. Reference genes for real-time PCR quantification of microRNAs and messenger RNAs in rat models of hepatotoxicity. *PLoS One*. 2012;7(5):e36323.

95. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*. 2008;3(11):e3694.
96. Zhu W, Qin W, Atasoy U, Sauter ER. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC Res Notes*. 2009 May 19;2:89,0500-2-89.
97. Ho AS, Huang X, Cao H, Christman-Skieller C, Bennewith K, Le QT, et al. Circulating miR-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer. *Transl Oncol*. 2010 Apr;3(2):109-13.
98. Zhao H, Shen J, Medico L, Wang D, Ambrosone CB, Liu S. A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer. *PLoS One*. 2010 Oct 29;5(10):e13735.
99. Roth C, Rack B, Muller V, Janni W, Pantel K, Schwarzenbach H. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(6):R90.
100. Qu KZ, Zhang K, Li H, Afdhal NH, Albitar M. Circulating microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol*. 2011 Apr;45(4):355-60.
101. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol*. 2009;10(6):R64,2009-10-6-r64. Epub 2009 Jun 16.

## SCOPO DELLA TESI

La recente scoperta che i microRNA (o miRNA) sono presenti anche nei liquidi biologici ha suscitato un grande interesse per il loro potenziale uso come biomarcatori. Negli ultimi anni, i miRNA nelle biopsie liquide hanno mostrato il loro grande potenziale come biomarcatori diagnostici poco invasivi per un grande numero di malattie. Questi piccoli RNA regolatori hanno un grande potenziale biologico, sono in numero limitato e sono relativamente stabili nel siero/plasma, nelle urine e in altri fluidi biologici. L'obiettivo di questa tesi è stato l'isolamento e la quantificazione dei livelli di miRNA circolanti nel siero e nella saliva per validare il loro utilizzo quali biomarcatori per la diagnosi di alcune patologie pediatriche. Tuttavia, il profiling dei miRNA nei biofluidi è una procedura sperimentale piuttosto complessa per vari motivi. In particolare, i biofluidi contengono bassi livelli di RNA, ciò significa che il normale controllo di qualità e quantità dell'RNA utilizzando tecniche quali il Bioanalyzer o spettrofotometria non è adatto per questo tipo di campione. In secondo luogo, i miRNA rilevati nei biofluidi possono avere un'origine cellulare o extracellulare. Tuttavia, se l'obiettivo è quello di analizzare il profilo dei miRNA extracellulari nei biofluidi, è importante evitare la contaminazione cellulare e l'emolisi. In terzo luogo, i biofluidi, oltre a contenere basse quantità di RNA, hanno anche livelli elevati di inibitori enzimatici che possono influenzare l'efficienza delle reazioni di PCR per la loro quantificazione. Infine, la normalizzazione dei dati di qPCR dei campioni di biofluidi deve essere condotta con particolari metodi matematici e non mediante i classici normalizzatori endogeni (house-keeping genes). L'efficacia clinica dei miRNA circolanti come biomarcatori può essere inficiata, come si è visto, da una serie di variabili che vanno dalla raccolta del sangue all'analisi del dato di qPCR, pertanto per far fronte a queste difficoltà tecniche, parte del mio lavoro di tesi è stato dedicato all'ottimizzazione di vari aspetti legati all'estrazione e al processamento del campione iniziale per arrivare ad ottenere un metodo di analisi affidabile e sensibile. In particolare, per far fronte ai bassi livelli di RNA presenti nei biofluidi, all'elevato rischio che una parte significativa dell'RNA venga perso durante l'estrazione e per aumentare la riproducibilità nell'estrazione è stata confermata la validità dell'aggiunta di un RNA carrier durante la procedura di purificazione. Inoltre, è stato utilizzato un metodo di determinazione dei miRNA altamente sensibile, specifico e preciso che prevede l'utilizzo di primers specifici contenenti nucleotidi ad LNA, i quali mostrano una maggiore stabilità termica e una maggiore affinità verso il target. Per monitorare l'efficienza di isolamento dell'RNA, la sintesi del cDNA e l'amplificazione della PCR, sono stati utilizzati degli RNA sintetici (spike-in). L'emolisi è stata monitorata sia qualitativamente (osservando il colore del campione) che quantitativamente

mediante lettura spettrofotometrica dell'emoglobina libera o tramite confronto dei livelli di espressione di un miRNA altamente espresso nei globuli rossi (il miR-451a) con un miRNA non affetto da emolisi (il miR-23a-3p). Per minimizzare la presenza di inibitori nel campione dell'RNA e massimizzarne la resa è stato individuato e validato sperimentalmente un metodo di purificazione basato su colonnine. Il workflow seguito per la parte sperimentale di ottimizzazione è illustrato nella Figura 1.



**Figura 1.** Biofluidi: sfide e soluzioni

Successivamente, per poter valutare la possibilità di utilizzare la saliva quale biomarcatore alternativo al siero, in tutti quei casi in cui il prelievo di sangue è considerato una procedura invasiva, soprattutto in ambito pediatrico, è stata condotta una serie di prove (estrazione e profiling di miRNA) per valutare l'affidabilità di tale misura e la presenza di una eventuale correlazione esistente tra i livelli di miRNA nel siero e nella saliva.

Dopo aver messo a punto protocolli di isolamento e ottimizzato il metodo di analisi, l'obiettivo successivo è stato quello di isolare e quantificare i livelli di miRNA circolanti in due patologie con l'intento di individuare possibili biomarcatori di malattia. Le patologie considerate sono l'insulino sensibilità/resistenza in bambini obesi e la fibromialgia.

La prevalenza dell'obesità infantile nel mondo è aumentata in maniera esponenziale nel corso degli ultimi anni. L'obesità aumenta notevolmente il rischio di presentare precocemente disturbi come la sindrome metabolica (SM), il diabete di tipo 2 (T2D), dislipidemie e malattie cardiovascolari (CVD) (1). L'insulino resistenza (IR) è cruciale nella patogenesi di queste anomalie metaboliche e molto probabilmente precede la loro comparsa (1). L'IR è fisiologica in certe fasi della vita, promuove l'accrescimento del corpo e lo sviluppo puberale. Il test di tolleranza al glucosio orale (OGTT) fornisce una visione dinamica del glucosio e dell'insulina fisiologica e permette di stimare meglio l'IR (1). L'OGTT, poiché consiste nel somministrare al paziente un bolo di glucosio (il cosiddetto 'carico di glucosio'), può anche agire come stimolo in grado di modulare l'espressione dei miRNA (2). Per tali motivi l'obiettivo è stato quello di studiare il profilo di espressione dei miRNA circolanti sia a digiuno che 120 minuti dopo il carico di glucosio in un campione di 6 bambini obesi in età prescolare con insulino resistenza (IR) e confrontarlo con 6 bambini obesi sensibili all'insulina (IS) di pari indice di massa corporea (BMI) ed età. L'intento è stato quello di individuare miRNA circolanti che possano rappresentare dei possibili biomarcatori di IR, ampliare la nostra conoscenza sulla modulazione precoce dei miRNA nei primi stati di malattia e portare quindi all'individuazione tempestiva di soggetti a rischio. Questo lavoro è stato oggetto di una pubblicazione sulla rivista *Pediatric Obesity* (A. Masotti, A. Baldassarre, M. Fabrizi, G. Olivero, M. C. Loreti, P. Giammaria, P. Veronelli, M. P. Graziani and M. Manco, Oral glucose tolerance test unravels circulating miRNAs associated with insulin resistance in obese preschoolers, *Pediatric Obesity*, 2016, Article first published online : 5 APR 2016, DOI: 10.1111/ijpo.12133)

L'altra patologia presa in esame è la Fibromialgia (FM). La FM è una sindrome caratterizzata da dolore cronico diffuso e molteplici sintomi associati, ad eziologia non del tutto nota, la cui prevalenza nella popolazione generale è del 1-3% e colpisce prevalentemente il sesso femminile (3). La FM sembra essere frequente anche nei bambini con una prevalenza del 6% (4). La patogenesi della FM è complessa e sembrerebbe coinvolgere un meccanismo di interazione tra predisposizione genetica, fattori esterni tra cui stress fisico e psicologico, neurotrasmettitori, ormoni, citochine e fattori immunitari (5). Il principale meccanismo apparentemente implicato nella patogenesi della malattia è la sensibilizzazione neuronale in diverse aree del sistema nervoso centrale (SNC) che porta ad una percezione anormale degli stimoli dolorosi (6). Un'altra ipotesi patogenetica prevede la disfunzione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), che è

responsabile di una risposta alterata allo stress (7). L'obiettivo è stato quello di analizzare l'espressione dei miRNA circolanti nel siero di pazienti affetti da fibromialgia (FM) e di determinare una correlazione con i parametri clinici e clinimetrici per facilitare la classificazione dei diversi sottogruppi della malattia. La FM è una patologia particolarmente diffusa ma gli studi epidemiologici sono pochi e a volte i risultati sono contrastanti a causa delle popolazioni non omogenee sia per quanto riguarda l'età ma anche per la diversa estrazione sociale. I miRNA trovati differenzialmente espressi in maniera statisticamente significativa nel siero dei pazienti FM rispetto ai controlli sono stati analizzati anche nella saliva. I risultati di questo studio hanno sottolineato che tutti i miRNA deregolati nei nostri pazienti hanno diversi legami con la biologia e il funzionamento del sistema nervoso centrale, muscolo scheletrico o hanno molte connessioni con l'attività fisica, il dolore, lo stress, disturbi dell'umore e sintomi depressivi. Inoltre, abbiamo suggerito che la combinazione di diversi miRNA deregolati può rappresentare la base per ottenere un buon modello predittivo ad alto potere diagnostico. Questa parte di lavoro è stata inviata per la pubblicazione sulla rivista *Rheumatology* (A. Masotti, A. Baldassarre et al. *Circulating microRNA profiles as liquid biopsies for the characterization and diagnosis of fibromyalgia syndrome* 2016).

In conclusione, questo lavoro di tesi ha mostrato che la disregolazione significativa di miRNA sierici circolanti può essere considerato un ottimo metodo sperimentale per la caratterizzazione e la diagnosi non invasiva di numerose patologie anche in ambito pediatrico.

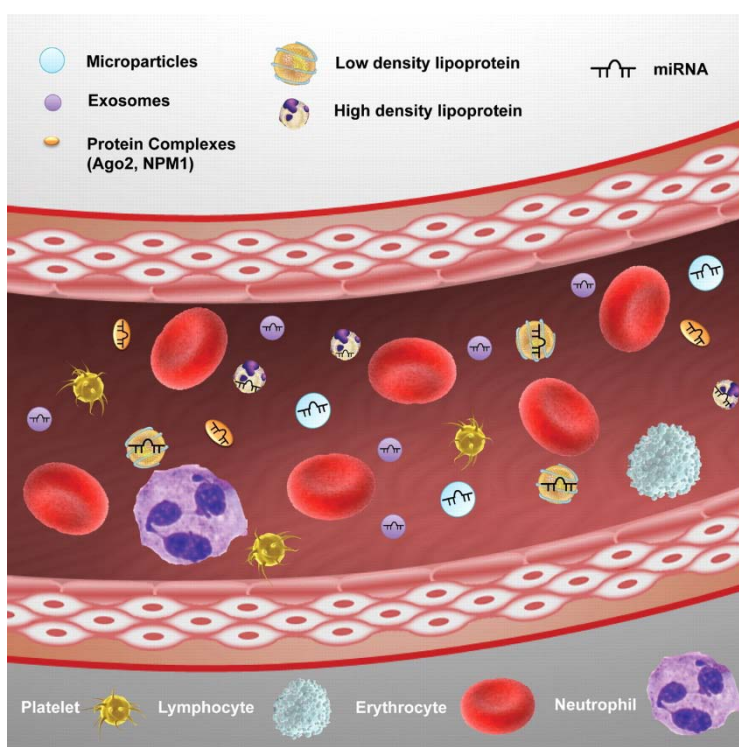
## Bibliografia

1. Shashaj B, Bedogni G, Graziani MP, Tozzi AE, DiCorpo ML, Morano D, et al. Origin of cardiovascular risk in overweight preschool children: a cohort study of cardiometabolic risk factors at the onset of obesity. *JAMA Pediatr.* 2014 Oct;168(10):917-24.
2. Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell.* 2012 Mar 16;148(6):1172-87.
3. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 1990 Feb;33(2):160-72.
4. Buskila D. Pediatric fibromyalgia. *Rheum Dis Clin North Am.* 2009 May;35(2):253-61.
5. Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Mease PJ. Chronic widespread pain: from peripheral to central evolution. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2011 Apr;25(2):133-9.
6. Yunus MB. Central sensitivity syndromes: a new paradigm and group nosology for fibromyalgia and overlapping conditions, and the related issue of disease versus illness. *Semin Arthritis Rheum.* 2008 Jun;37(6):339-52.
7. Crofford LJ. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2002 Mar;31(1):1-13.

## OTTIMIZZAZIONE DEI PROTOCOLLI DI ESTRAZIONE

### 2.1 INTRODUZIONE

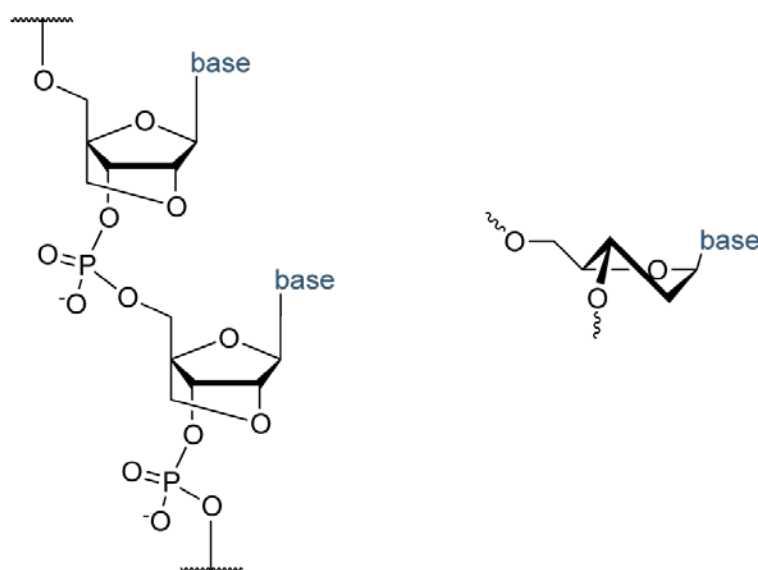
Negli ultimi anni, molti lavori hanno dimostrato che alcuni dei miRNA precedentemente identificati in cellule e tessuti sono anche presenti nei fluidi biologici extracellulari quali siero, plasma, saliva e urine (1). È stato osservato che la varietà e il livello di espressione di questi miRNA extracellulari sono strettamente correlati con la malattia o la sua progressione (2); (3). Questi risultati hanno pertanto suggerito che i miRNA extracellulari potrebbero essere impiegati come potenziali biomarcatori di patologia.



**Figura 1.** Rappresentazione schematica dei miRNA nel circolo sanguigno legati a molecole di diverso tipo

Dal punto di vista analitico, è stato dimostrato che i miRNA nel siero e nel plasma sono stabili per un massimo di 48 ore, anche se conservati a temperatura ambiente e dopo più cicli di congelamento-scongelo (4), (5). Tuttavia misurare accuratamente e in maniera affidabile i miRNA nei biofluidi è difficile per tutta una serie di fattori. In primo luogo, gli stessi miRNA sono RNA con una sequenza molto corta e con un contenuto di GC molto variabile. Questa variabilità di contenuto impartisce una temperatura di ibridazione molto diversa tra le varie molecole di miRNA, rendendo la loro misurazione simultanea (per es. con tecnologia microarrays) tecnicamente molto difficile proprio a causa della diversa proprietà di ibridazione con il filamento complementare. Anche se i miRNA hanno in generale sequenze molto diverse

tra loro, i membri di una stessa famiglia di miRNA sono molto simili e il più delle volte variano solo in un singolo nucleotide. In secondo luogo, la quantità di RNA e di miRNA in particolare, che è presente in campioni quali siero e plasma è complessivamente molto bassa. Infine, l'isolamento riproducibile dei miRNA da siero e da plasma è un altro ostacolo che può essere superato procedendo con l'aggiunta di RNA carrier (per es. l'RNA del batteriofago MS2) durante la procedura di isolamento (6), (7). E' anche essenziale utilizzare un metodo di determinazione dei miRNA altamente sensibile, specifico e preciso che permetta il rilevamento di miRNA in maniera lineare anche quando la loro concentrazione è molto bassa. Entrambe queste sfide possono essere superate con l'uso di primers specifici, chiamati 'locked nucleic acids' o LNA molto specifici per i miRNA.

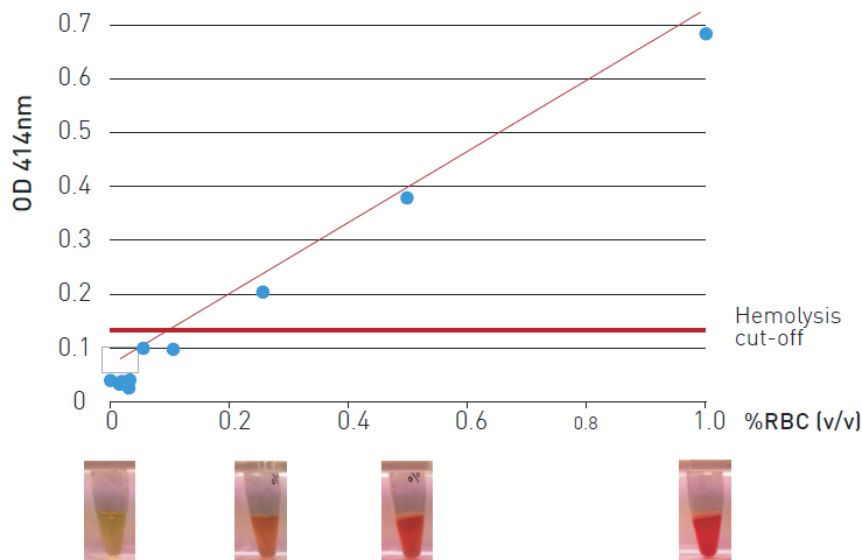


**Figura 2.** Disegno della struttura di un oligonucleotide a LNA.

Gli LNA sono una classe di analoghi degli acidi nucleici nei quali l'anello di ribosio è chiuso da un ponte chimico che congiunge l'atomo di ossigeno al 2' con l'atomo di carbonio al 4' (Figura X). Gli oligonucleotidi a LNA mostrano una maggiore stabilità termica e una maggiore affinità verso il target (8).

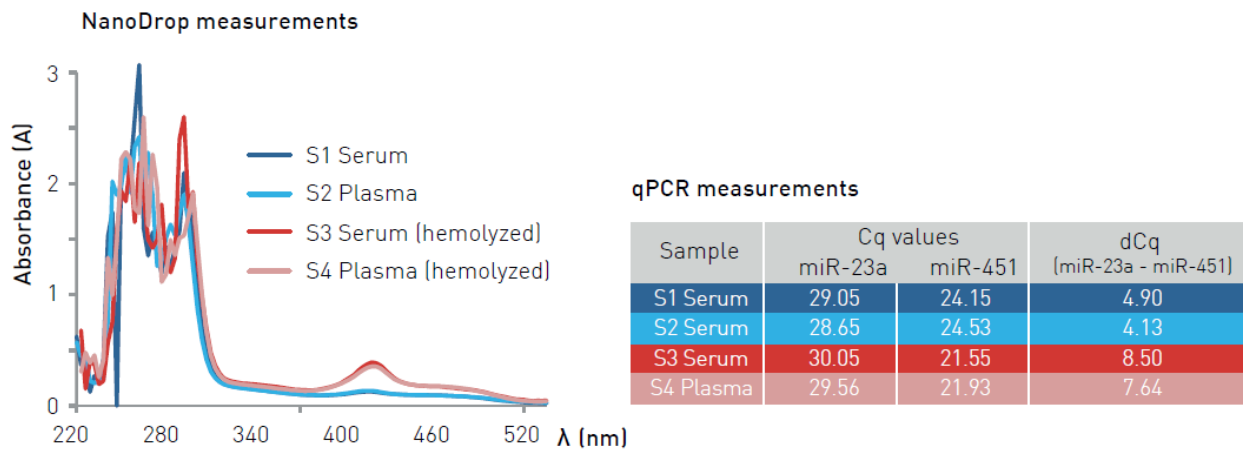
Il campionamento e la preparazione del campione così come l'isolamento di RNA e la conservazione possono essere fonti di variazione pre-analitica. Una serie di recenti lavori ha discusso diverse variabili pre-analitiche per il profiling di miRNA da siero e/o plasma (9). Questi studi hanno dimostrato che la contaminazione delle cellule e l'emolisi dei campioni di plasma (e siero) sono una delle principali cause di variazione dei livelli di miRNA non correlate con la patologia in esame. Il monitoraggio dell'emolisi in campioni di siero e plasma può essere

condotto sia qualitativamente per via diretta, osservando cioè il colore del campione, che quantitativamente utilizzando metodi spettrofotometrici per la misura dei livelli di emoglobina libera.



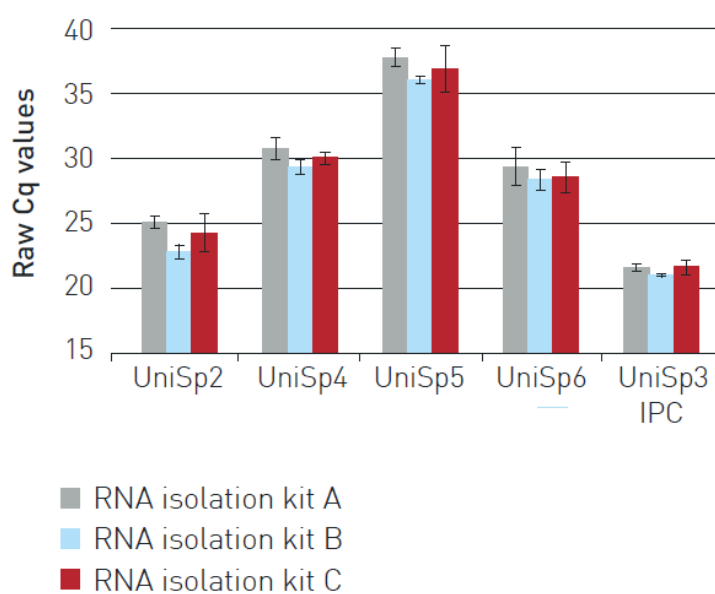
**Figura 3:** Contaminazione del plasma a seguito di emolisi (lisi degli eritrociti) che porta al rilascio di emoglobina e di RNA contenuti nei globuli rossi. Per dimostrare l'aumento dell'assorbanza a 414 nm, ad un campione di plasma non emolizzato è stata aggiunta una quantità crescente di globuli rossi lisati.

Tuttavia, se l'RNA è già stato estratto o il campione originale non è più disponibile, una strategia alternativa potrebbe essere quella di confrontare il livello di un miRNA altamente espresso nei globuli rossi (hsa-miR-451a), con un miRNA non affetto da emolisi (hsa-miR-23a-3p). E' stato dimostrato che il delta Cq (hsa-miR-23a-3p – hsa-miR-451a) è una buona misura del grado di emolisi dove valori maggiori di cinque sono indicatori di possibile contaminazione dei miRNA da eritrociti e un delta Cq di 7-8 o più indica un rischio elevato di emolisi (10).



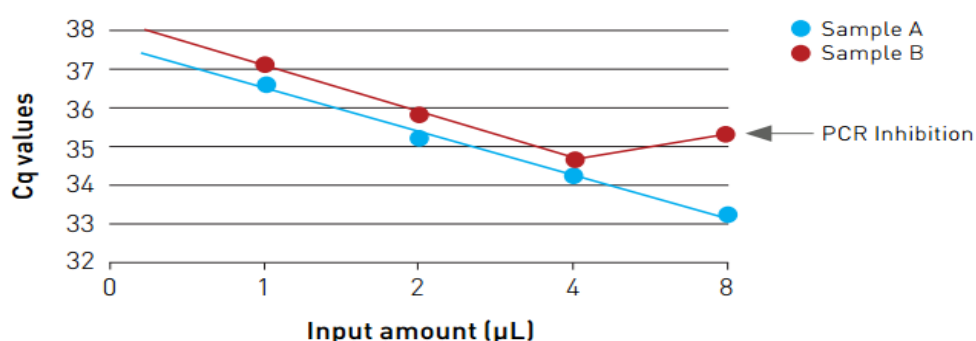
**Figura 4:** Indicatore di emolisi basato su miRNA per RNA. A sinistra: Spettro di assorbanza di campioni di siero e plasma non emolizzati (curva blu e curva celeste) ed emolizzati (curva rosa e curva rossa). I campioni emolizzati mostrano un picco a 414 nm. A destra: Se il campione originale di siero o di plasma non è più disponibile, il delta Cq tra il miR-23a e il miR-451 può essere usato come un indicatore di emolisi nei campioni di siero o plasma. Se il delta Cq è inferiore a 7 il campione è utilizzabile per misure di qPCR. Se il delta Cq è uguale o superiore a 7 il campione è da considerarsi non utilizzabile perché verosimilmente il siero di partenza era emolizzato.

Un'altra fonte piuttosto comune di variabilità nella quantificazione è la contemporanea purificazione di inibitori di qPCR presenti nel siero (o plasma) assieme al campione stesso di RNA. La quantità di RNA che può essere estratta, nonché la quantità di inibitori dopo l'estrazione può quindi variare da campione a campione e può variare anche a seconda del kit di estrazione utilizzato.



**Figura 5:** Esempio di confronto di tre kit commerciali per la determinazione della resa di isolamento di miRNA circolanti mediante l'utilizzo di RNA sintetici (spike-in). I pannelli di miRNA per qPCR sono un metodo conveniente per la determinazione della resa di isolamento di RNA.

Può succedere che nella fase di retro-trascrizione all'aumentare del volume di RNA nella reazione non corrisponda un aumento lineare del prodotto di PCR, ma al contrario si osservi una riduzione. Questo fenomeno accade perché nella reazione di retro-trascrizione per l'ottenimento del cDNA sono stati aggiunti, oltre che all'RNA, anche molti inibitori che impediscono un'amplificazione lineare (si veda l'esempio del campione B in Figura 6).



**Figura 6:** Esempio di qPCR a partire da quantità crescenti di RNA per la valutazione della presenza di inibitori. A seconda della purezza dei campioni estratti si possono avere due condizioni differenti, la prima (Campione A) non mostra inibizione (segnale lineare fino a 8 μL di campione), mentre nel secondo campione (Campione B) si nota una inibizione alla concentrazione più elevata (8 μL).

Per fronteggiare queste difficoltà tecniche e per ottimizzare il sistema di analisi qPCR applicata ai campioni reali di pazienti affetti da varie patologie pediatriche, parte del mio lavoro di tesi è stato dedicato all'ottimizzazione di vari aspetti legati all'estrazione e al processamento del campione iniziale per arrivare ad ottenere un metodo di analisi miRNA altamente sensibile e preciso.

Per quanto riguarda l'estrazione del campione di RNA sono stati pertanto confrontati i due kit più diffusi e disponibili in commercio per l'estrazione di RNA da biofluidi, sono stati valutati gli effetti dell'aggiunta di RNA carrier nella fase di estrazione dell'RNA e la resa dell'estrazione di RNA a partire da volumi diversi di siero. Successivamente, per quanto riguarda la verifica di linearità della reazione di retro-trascrizione, sono state effettuate prove con volumi diversi di RNA iniziale per verificare la quantità di inibitori e confrontare le efficienze di estrazione dei

due kit considerati. Infine, per poter valutare la possibilità di utilizzare la saliva quale biomarcatore alternativo al siero, soprattutto per ridurre il disagio del prelievo di sangue al bambino, è stata condotta una serie di prove (estrazione e profiling di miRNA) per valutare la correlazione esistente tra livelli di miRNA nei due biofluidi.

## **2.2 MATERIALI E METODI**

### **2.2.1 Prelievo dei campioni biologici**

Il siero è stato ottenuto dopo centrifugazione delle provette di sangue a 1.800 g per 15 minuti e conservato a -80°C. La raccolta della saliva è stata effettuata con il soggetto in posizione seduta, con la testa leggermente inclinata in avanti, limitando i movimenti oro-facciali per ridurre al minimo l'influenza sul flusso salivare. I campioni di saliva sono stati conservati a -80°C. Prima del processamento i campioni sono stati centrifugati a 1.500 g per 10 minuti, al fine di eliminare eventuali cellule presenti e i detriti cellulari.

### **2.2.2 Estrazione di RNA**

I miRNA circolanti sono stati estratti dal siero dei controlli utilizzando differenti metodi: il “miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids” (Exiqon) e il “Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA Purification” (Norgen) seguendo le istruzioni del produttore. Per la valutazione dell'efficienza di estrazione, sono stati aggiunti al tampone di lisi prima dell'estrazione gli spike-in (spike-in kit RNA, Exiqon) e in alcuni casi l'RNA carrier (MS2, Roche). 100 e 200 µl sono stati utilizzati come volumi di partenza nel caso del siero e 50, 100, 200, 400 e 800 per la saliva. I campioni estratti sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'uso.

### **2.2.3 Profili di espressione di miRNA circolanti**

Il campione di RNA estratto è stato retrotrascritto in un volume di 10 µl finali utilizzando il kit miRCURY LNA™ universal RT cDNA Synthesis (Exiqon) seguendo le istruzioni del produttore. Per controllare l'efficienza della retrotrascrizione (RT), prima della reazione sono stati aggiunti alla soluzione due controlli (cel-miR-39 e UniSp6 – Exiqon) anch'essi retrotrascritti assieme ai miRNA. Al fine di identificare l'input ottimale di RNA senza avere inibizione della reazione di RT, sono state testate diverse quantità iniziali di RNA (0.5 µl, 1.0 µl, 2.0 µl, e 4.0 µl in 10 µl finali). I livelli di espressione dei miRNA circolanti sono stati valutati utilizzando specifici primer a LNA. I miRNA valutati mediante qPCR sono hsa-miR-16-5p, hsa-miR-103a-3p e il hsa-miR-191-5p. Per confrontare i miRNA espressi nel siero e nella saliva ed analizzare l'eventuale correlazione nei due biofluidi, i miRNA circolanti sono stati analizzati

utilizzando il pannello Serum/Plasma Focus miRNA PCR Panel I+II (Exiqon). I due pannelli contengono un totale di 179 miRNA assieme a miRNA di riferimento e 5 set di miRNA di controllo (spike-in). Tre miRNA (hsa-miR-16-5p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-191-5p) sono stati impiegati come controlli endogeni anche se solo il hsa-miR-16-5p è stato impiegato per la normalizzazione.

## 2.3 RISULTATI

### 2.3.1 Confronto di due kit di estrazione di RNA da biofluidi

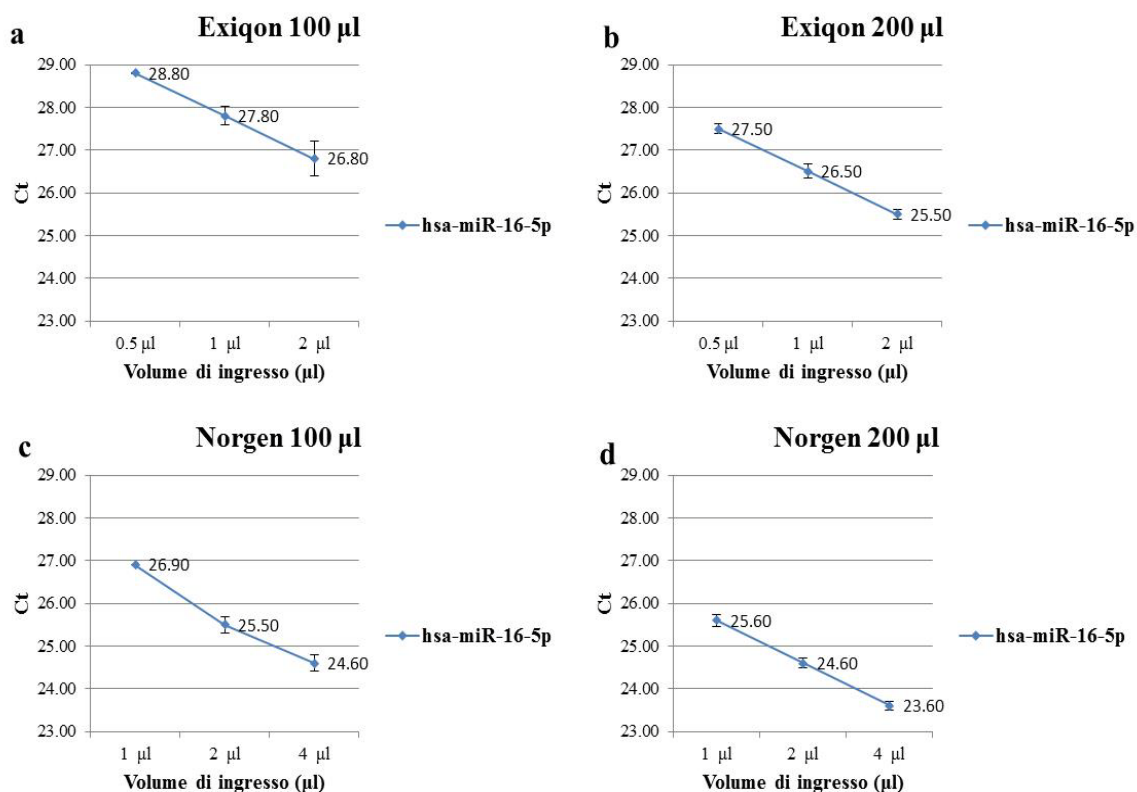
Per valutare quale kit di estrazione di RNA da biofluidi consenta di ottenere la massima resa, sono stati confrontati due kit di estrazione commerciali: il kit Exiqon e il kit Norgen. Per l'isolamento di miRNA da siero e da saliva è stato utilizzato un solo campione per tutte le prove.

#### *Estrazione da siero*

In primo luogo, è stata valutata la quantità di RNA recuperato e la linearità dell'estrazione a partire da volumi diversi di siero (100 e 200 µl).

Sono state testate diverse quantità iniziali di RNA (0.5, 1.0 e 2.0 µl) per il kit Exiqon e (1.0, 2.0 e 4.0 µl) per il kit Norgen in 10 µl finali di RT utilizzando campioni di RNA estratti da 100 e 200 µl di siero. La diversa quantità di RNA di input iniziale per i due kit è dovuta al fatto che con il kit Exiqon l'RNA estratto da siero viene eluito in 50 µl finali, mentre nel kit Norgen in 100 µl finali, pertanto quest'ultimo campione è concentrato la metà rispetto al primo. Un'altra differenza tra i due kit consiste nell'aggiunta di un RNA carrier (MS2) nel kit Exiqon, mentre non si effettua nessuna aggiunta nel kit Norgen.

Sono possibili due confronti: il primo riguarda la valutazione della quantità di RNA recuperato da quantità doppie di siero, la seconda riguarda la valutazione della linearità della reazione di RT usando quantità di RNA una doppia dell'altra.



**Figura 7:** Confronto di metodi di isolamento di miRNA da siero. a) estrazione a partire da 100  $\mu$ l di siero con il kit Exiqon, b) estrazione a partire da 200  $\mu$ l di siero con il kit Exiqon, c) estrazione a partire da 100  $\mu$ l di siero con il kit Norgen, d) estrazione a partire da 200  $\mu$ l di siero con il kit Norgen. I livelli di espressione dei miRNA circolanti sono stati valutati utilizzando il miR-16-5p.

Per quanto riguarda la valutazione della quantità di RNA estratto, è stata utilizzata la sonda per il miR-16-5p nella reazione di qPCR e volumi variabili di cDNA di partenza. In figura 7 (pannelli a e b) è possibile osservare che il kit Exiqon mostra una ottima linearità al variare della concentrazione (diluizioni 1:2 e 1:4 con un  $\Delta$ Ct di circa 1, come atteso, tra un valore e l'altro) per entrambe le quantità di siero iniziale.

Ovviamente, utilizzando 200  $\mu$ l di siero si hanno valori di Ct superiori ma proporzionali alle quantità utilizzate: per esempio il valore di Ct ottenuto con 2  $\mu$ l di cDNA estratto da 100  $\mu$ l di siero corrispondono, in valore, a quello ottenuto da 1  $\mu$ l di cDNA estratto da 200  $\mu$ l di siero e la stessa cosa si osserva per valori di 1  $\mu$ l di cDNA (100  $\mu$ l di siero) rispetto a 0.5  $\mu$ l di cDNA (200  $\mu$ l di siero). Utilizzando una quantità di 2  $\mu$ l di cDNA da un campione di RNA estratto da 200  $\mu$ l di siero, si raggiunge il più basso valore di Ct che corrisponde a  $25.50 \pm 0.12$

Le stesse considerazioni valgono per il kit Norgen (Figura 7 pannelli c-d) per quanto riguarda la linearità del saggio e la proporzionalità tra le quantità da due diverse quantità iniziali di siero. In

questo secondo caso però, utilizzando una quantità di 4 µl di cDNA da un campione di cDNA da un campione di RNA estratto da 200 µl di siero, si raggiunge il più basso valore di Ct che corrisponde a  $23.60 \pm 0.11$ .

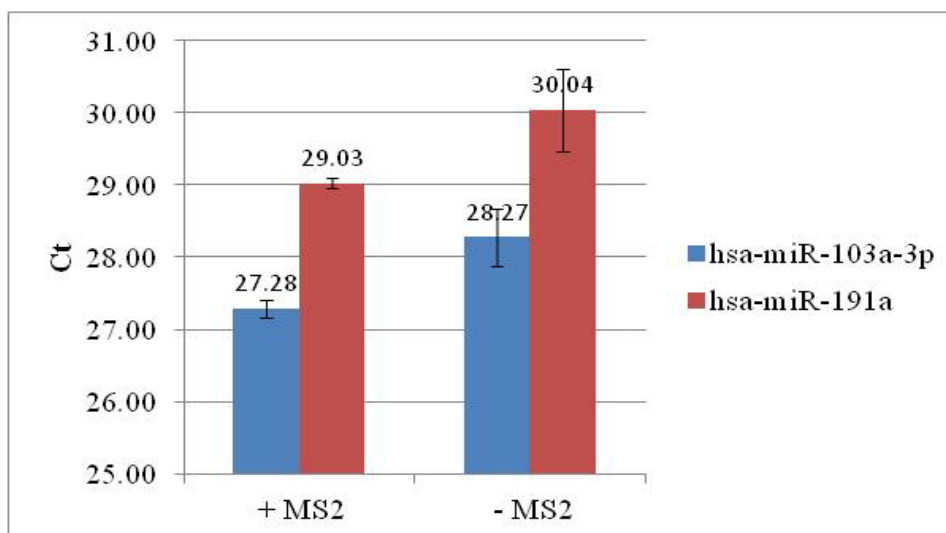
Questo dato suggerisce che il kit migliore (tra Exiqon e Norgen) per l'estrazione di RNA da siero (100 o 200 µl) sembra essere il kit Norgen. In particolare si è osservato che il kit Norgen consente di ottenere un campione con la stessa quantità di RNA del kit Exiqon ma partendo da quantità di siero iniziali di quattro volte inferiori (verosimilmente una quantità di 50 µl). Da queste prove non è però chiaro se il maggior segnale osservato in qPCR sia dovuto ad una reale maggiore quantità di RNA estratta o ad una minore quantità di inibitori presenti nel campione. Entrambe queste variabili infatti potrebbero portare ad una effettiva diminuzione del valore di Ct osservato. Per tale motivo sono stati effettuati ulteriori esperimenti mirati alla determinazione dell'influenza dell'aggiunta di RNA carrier e alla determinazione indiretta dalla quantità di inibitori presenti nel campione di RNA estratto.

#### *Influenza dell'aggiunta di MS2*

Per quanto riguarda l'estrazione di miRNA da siero con il kit Exiqon, la casa produttrice consiglia l'aggiunta di un RNA carrier (generalmente MS2) per massimizzare la quantità di RNA recuperato e migliorare la riproducibilità dell'estrazione. Per tale motivo in tutte le estrazioni con questo kit è stato aggiunto un RNA carrier.

Per quanto riguarda invece il kit Norgen, la casa produttrice non suggerisce l'uso di tale procedura, pertanto abbiamo cercato di capire se l'aggiunta di MS2 potesse migliorare il recupero di miRNA.

E' stato quindi fatto un confronto tra l'espressione di due miRNA in un campione di siero al quale era stato aggiunto MS2 e in un campione senza aggiunta di MS2 (Figura 8).



**Figura 8.** Confronto tra estrazioni con e senza l'RNA carrier MS2 con il kit Norgen

Dai valori di Ct misurati per il miR-103a-3p e il miR-191a è stato possibile notare che dal campione nel quale è stato aggiunto l'RNA carrier è possibile estrarre una quantità maggiore di RNA e che le misure sono molto più riproducibili (deviazione standard più bassa). Infatti per il miR-103a-3p si ha un valore di Ct=27.3 in presenza di MS2 e Ct=28.3 in assenza di MS2. Stessa cosa per il miR-191a che ha un Ct di 29 e 30, rispettivamente in presenza e assenza di MS2 nel siero.

Pertanto è possibile ipotizzare che, modificando opportunamente il protocollo di estrazione della casa produttrice Norgen, si possa arrivare a ottenere un maggior recupero di miRNA.

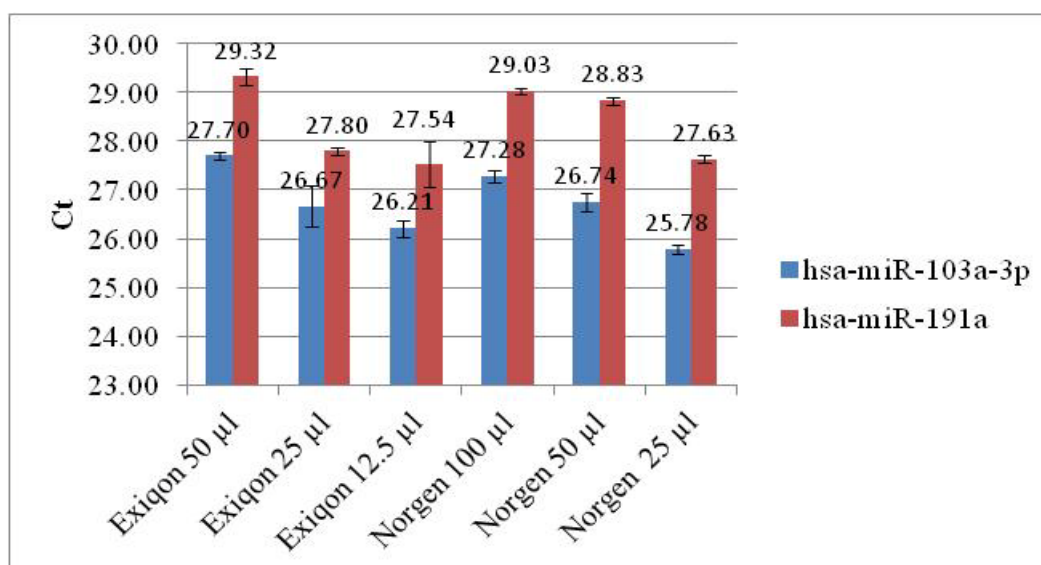
#### **Presenza di inibitori**

Per valutare la presenza di inibitori nel campione di RNA estratto, è stata condotta una valutazione indiretta, ovvero è stata valutata la capacità da parte di tali molecole di inibire la reazione di PCR. Questa loro capacità sarà tanto più alta quanto più alta è la loro concentrazione nel campione. Alle condizioni sperimentali di misura generalmente utilizzati (elevato volume di eluizione e piccola quantità di RNA per la reazione di RT) non si evidenziano fenomeni di inibizione e questo indica una bassa concentrazione di inibitori nel campione di RNA estratto.

Per monitorare quale kit di estrazione di RNA riuscisse a estrarre la quantità più bassa di inibitori, i campioni estratti con il kit Exiqon e il kit Norgen sono stati concentrati serialmente. Per il kit Exiqon abbiamo preparato tre campioni identici eluiti in 50 µl finali, due dei quali sono stati poi concentrati per evaporazione del solvente fino a 25 e 12.5 µl. Per il kit Norgen abbiamo preparato tre campioni identici eluiti in 100 µl finali, due dei quali sono stati poi concentrati per

evaporazione del solvente fino a 50 e 25  $\mu$ l. Poiché i tre campioni hanno concentrazioni crescenti e una doppia dell'altra, ci si deve attendere che le curve di amplificazione dei miRNA escano ad un  $\Delta$ Ct  $\sim$ 1 l'una dall'altra. Nel caso in cui si abbia inibizione, il  $\Delta$ Ct sarà inferiore a 1.

La Figura 9 riporta il confronto tra le varie soluzioni utilizzando come miRNA di controllo il miR-103a-3p e il miR-191a. Prendendo in considerazione il kit Exiqon è possibile osservare che il Ct di uscita del miR-103a-3p varia da 29.3 a 27.5 ( $\Delta$ Ct =1.8), mentre il miR-191a varia da 27.7 a 26.2 ( $\Delta$ Ct =1.5) contro un  $\Delta$ Ct atteso di 2. Prendendo invece in considerazione il kit Norgen si nota che il Ct di uscita del miR-103a-3p varia da 27.3 a 25.8 ( $\Delta$ Ct =1.5), mentre il miR-191a varia da 29.0 a 27.6 ( $\Delta$ Ct =1.4) contro un  $\Delta$ Ct atteso di 2.



**Figura 9.** Concentrazione seriale dei campioni estratti con i kit Exiqon e Norgen per la valutazione degli inibitori

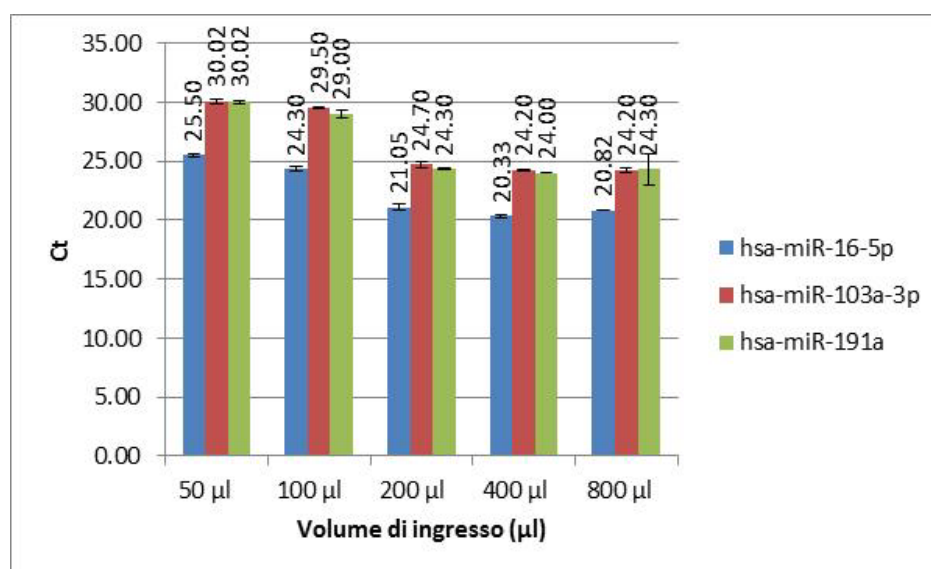
Anche se la variazione complessiva in termini di  $\Delta$  Ct non è in linea con quanto atteso, il dato interessante si nota tra la concentrazione intermedia e quella finale (campione più concentrato). Per il kit Exiqon il Ct di uscita del miR-103a-3p varia da 26.7 a 26.2 ( $\Delta$  Ct =0.5), mentre il miR-191a varia da 27.8 a 27.5 ( $\Delta$  Ct =0.3). Per il kit Norgen il Ct di uscita del miR-103a-3p varia da 26.7 a 25.8 ( $\Delta$  Ct =0.9), mentre il miR-191a varia da 28.8 a 27.6 ( $\Delta$  Ct =1.2). Da questi risultati si può quindi ricavare un dato interessante e cioè che la variazione di  $\Delta$  Ct per il kit Exiqon è più limitata rispetto al kit Norgen, mentre quest'ultimo mostra una buona linearità e non mostra significativa inibizione all'aumentare della concentrazione del campione ( $\Delta$  Ct prossimo al

valore di 1, come atteso). Pertanto possiamo ragionevolmente affermare che il kit Norgen, non solo è in grado di recuperare una maggiore quantità di RNA ma anche di limitare, meglio del kit Exiqon, la quantità di inibitori nel campione di RNA, grazie anche al maggior volume di eluizione finale (100 anziché 50 µl).

#### *Estrazione da saliva*

Per la valutazione della quantità di RNA estratto al variare della quantità di materiale di partenza, si è pensato di confrontare le seguenti quantità: 50, 100, 200, 400 e 800 µl di saliva. Per l'estrazione di miRNA da saliva è stato utilizzato inizialmente solo il kit Norgen perché è l'unico kit che permette di utilizzare volumi iniziali fino a 5 ml, mentre il kit Exiqon consiglia di usare solo volumi di 200 µl. Nella reazione di RT è stata utilizzata una quantità di 2 µl di RNA.

La Figura 10 mostra la quantificazione dei livelli dei miR-16-5p, miR-103a-3p e miR-191a nella saliva al variare della concentrazione di materiale di partenza (saliva) estratta.



**Figura 10:** Livelli di espressione dei miRNA estratti da saliva con il kit Norgen. I miRNA considerati sono stati il hsa-miR-16-5p, il hsa-miR-103a-3p e il hsa-miR-191a.

I risultati ottenuti hanno mostrato che i volumi di saliva pari a 50 µl e 100 µl danno un segnale di amplificazione piuttosto elevato (Ct superiore a 24.3) e lineare tra le due condizioni: si osserva una differenza di un Ct se si prende in considerazione il miR-16-5p (Ct tra 25.5 e 24.3) e il miR-191a (Ct tra 30.02 e 29). Il miR-103a-3p ha invece un andamento meno lineare rispetto agli altri due. A partire da volumi superiori a 200 µl non si osserva un cambiamento nei valori di Ct per i

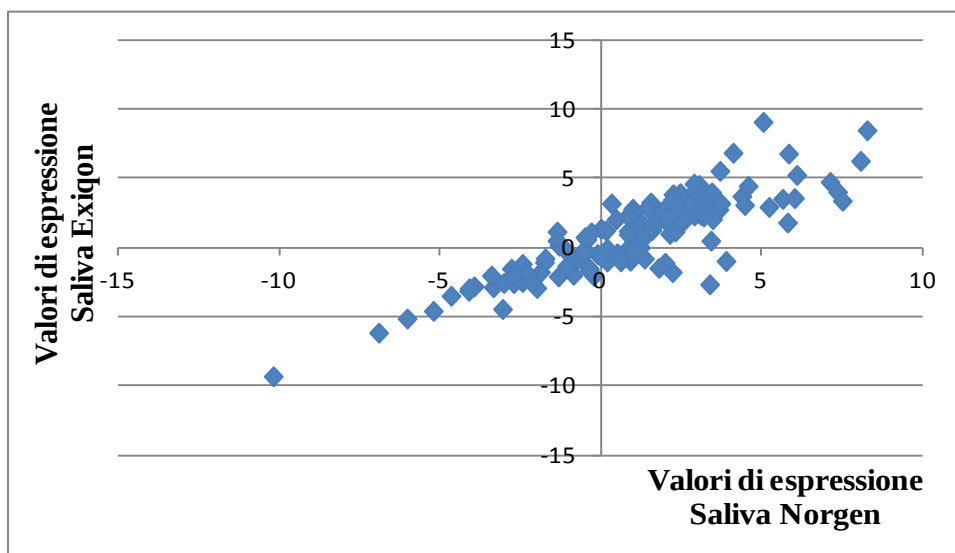
vari miRNA e questo indica una possibile inibizione del segnale all'aumentare della quantità iniziale di campione di partenza. Infatti per tutti i miRNA considerati si osserva una inibizione della reazione di RT condotta a partire da campioni estratti da un volume di saliva maggiore di 200 µl.

Pertanto, per non avere fenomeni di inibizione, è stato scelto di usare un volume di 200 µl che consente anche l'utilizzo del kit di estrazione da biofluidi Exiqon. Nei successivi esperimenti è stato pertanto fatto un confronto dei kit Exiqon e Norgen anche per le salive.

### 2.3.2 Confronto siero-saliva

Per valutare le differenze e la capacità di estrazione di miRNA da saliva mediante kit commerciali per l'estrazione di miRNA da siero, sono state condotti alcuni confronti. Per l'estrazione sono stati utilizzati entrambi i kit (Norgen ed Exiqon), partendo da un volume iniziale di saliva di 200 µl e un volume di 2 µl di RNA per la reazione di RT, in entrambi i casi. I miRNA circolanti sono stati valutati utilizzando il pannello Serum/Plasma Focus miRNA PCR Panel I+II (Exiqon).

Dapprima è stato confrontato il profilo di espressione dei miRNA circolanti nella saliva estratti con i due kit per valutare eventuali differenze di estrazione. La figura XXX riporta lo scatter-plot dei valori di espressione dei miRNA estratti con i due kit (Exiqon e Norgen).

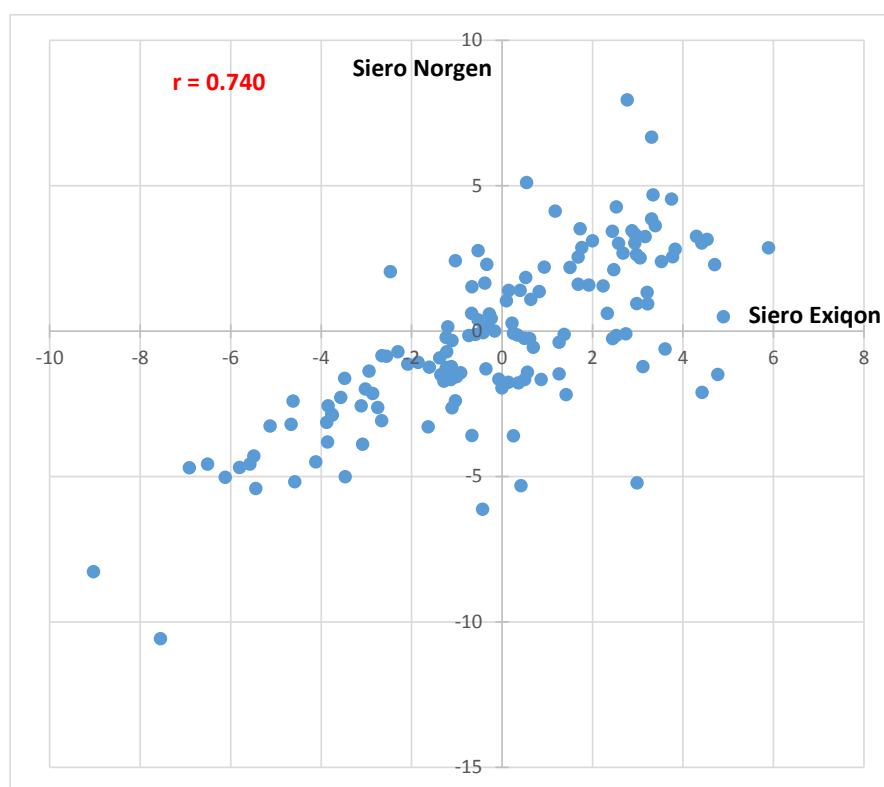


**Figura 11.** Confronto siero-saliva. Correlazione saliva estratta con il kit della Norgen e con il kit dell'Exiqon.

Il coefficiente di correlazione ottenuto è piuttosto alto ( $r=0.861$ ) e indica che ci sono poche differenze nell'utilizzo dei due kit per l'estrazione di miRNA circolanti da saliva.

Dal confronto delle due serie di dati (profilo della saliva estratta con il kit Exiqon e con il kit Norgen) è possibile anche concludere che si ha una resa maggiore utilizzando il kit Exiqon (media Ct nella saliva estratta con il kit Norgen = 32.6, media Ct nella saliva estratta con il kit Exiqon = 31.2). In generale è stato osservato che la viscosità della saliva potrebbe causare problemi nel momento in cui viene aggiunta al buffer di lisi e alla resina nel protocollo della Norgen. Il kit Exiqon, inoltre, prevede uno step aggiuntivo di precipitazione proteica, che potrebbe, nel caso della saliva permettere un recupero maggiore. Questo dato è interessante perché indica, ancora una volta, che l'ottimizzazione delle procedure di estrazione per ogni campione biologico prima di qualsiasi altra analisi quantitativa è di fondamentale importanza.

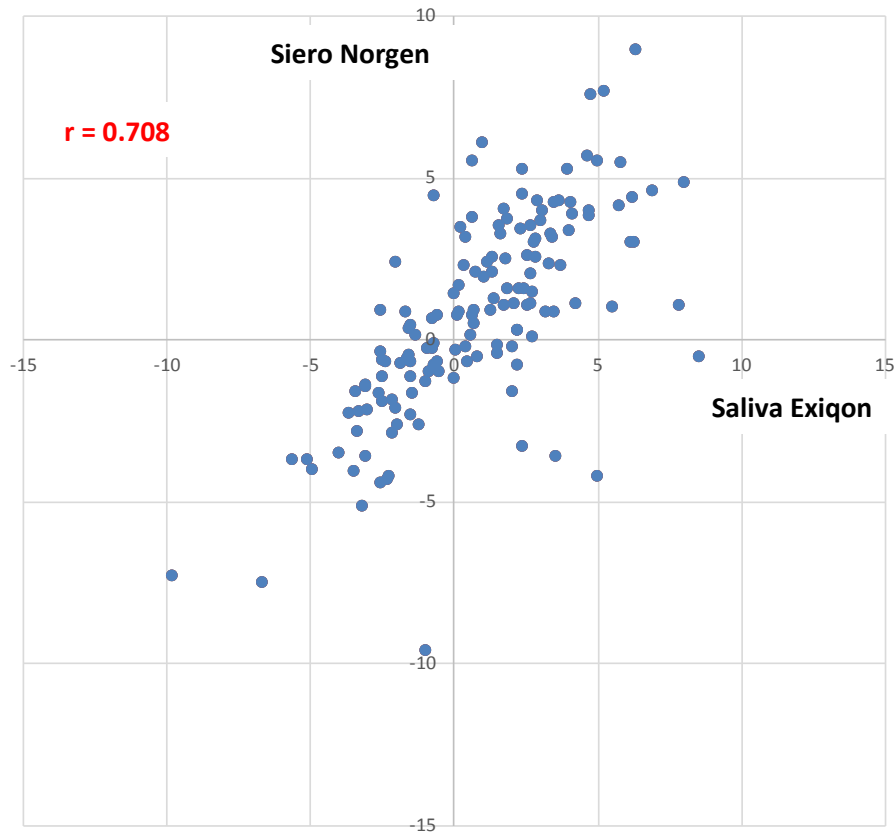
Per poter fare alcune considerazioni sulla correlazione esistente tra profili di espressione di miRNA estratti da siero e da saliva, è stato paragonata la correlazione dei profili di miRNA da siero ottenuti dopo estrazione con i due kit (Figura 12)



**Figura 12.** Correlazione tra siero estratto con il kit della Norgen e con il kit dell'Exiqon.

Per quanto riguarda il siero è stato notato che il coefficiente di correlazione è un po' più basso ( $r=0.740$ ) e ciò può indicare che vi siano delle differenze di estrazione tra i due kit.

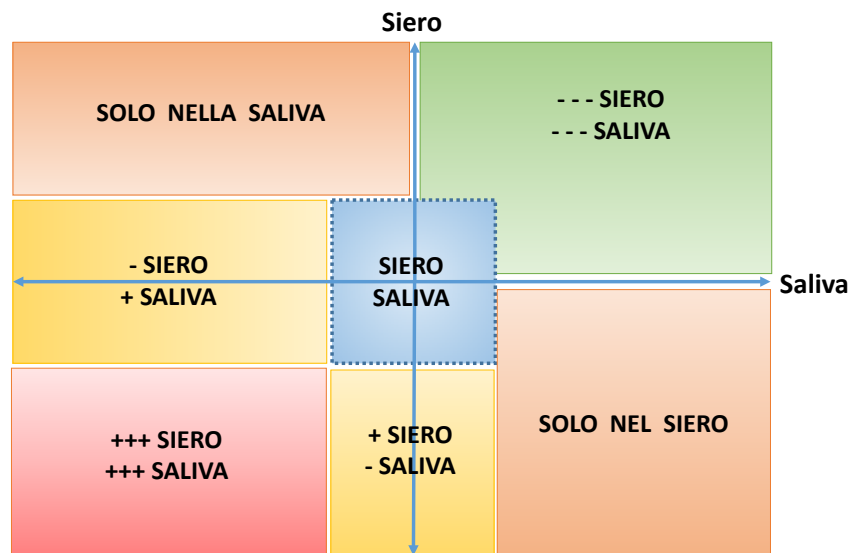
Per cercare di capire se l'espressione dei miRNA salivari correla con quella dei miRNA sierici, è stato confrontato il profilo di espressione nei due casi migliori (saliva Exiqon – siero Norgen) in Figura 13.



**Figura 13.** Confronto siero-saliva.

E' possibile osservare che la correlazione tra i due fluidi biologici, sebbene piuttosto elevata ( $r = 0.708$ ), non raggiunge i valori di correlazione osservati a partire dallo stesso fluido biologico (saliva o siero) estratto con kit diversi, ma sia comunque inferiore. Questo indica che, non essendo verosimilmente questa differenza imputabile al diverso tipo di kit di estrazione, la diminuzione del coefficiente di correlazione va ricercata nella diversità dei due fluidi biologici. Il fatto che il coefficiente di correlazione non sia molto alto indica che i due fluidi hanno un profilo di espressione di miRNA leggermente diverso tra loro, e questo fatto conferma che i due fluidi abbiano una “signature” specifica proprio perché provengono da due distretti diversi.

Dai valori di espressione dei miRNA ottenuti dal confronto siero-saliva è possibile ricavare graficamente la distribuzione dei vari miRNA espressi (o non espressi) in siero, in saliva o in entrambi i fluidi biologici (Figura 14).



**Figura 14.** Distribuzione dei vari miRNA espressi (o non espressi) in siero, in saliva o in entrambi i fluidi biologici

Dai valori numerici di Ct normalizzati mediante media globale è possibile estrapolare varie liste di miRNA che sono espressi (o non espressi) solo in siero o solo in saliva, nei due fluidi o in uno solo dei due (Tabelle 1-3).

**Tabella 1.** miRNA espressi mediamente in siero e in saliva

| Mediamente espressi in siero e saliva |
|---------------------------------------|
| hsa-let-7a-5p                         |
| hsa-let-7b-3p                         |
| hsa-let-7b-5p                         |
| hsa-let-7c                            |
| hsa-let-7d-3p                         |
| hsa-let-7d-5p                         |
| hsa-let-7e-5p                         |
| hsa-let-7f-5p                         |
| hsa-let-7g-5p                         |
| hsa-let-7i-5p                         |
| hsa-miR-101-3p                        |
| hsa-miR-103a-3p                       |
| hsa-miR-106a-5p                       |
| hsa-miR-106b-5p                       |
| hsa-miR-107                           |
| hsa-miR-125b-5p                       |
| hsa-miR-126-3p                        |
| hsa-miR-128                           |
| hsa-miR-130a-3p                       |
| hsa-miR-130b-3p                       |
| hsa-miR-140-3p                        |
| hsa-miR-140-5p                        |
| hsa-miR-141-3p                        |
| hsa-miR-142-3p                        |
| hsa-miR-142-5p                        |
| hsa-miR-143-3p                        |
| hsa-miR-144-3p                        |
| hsa-miR-145-5p                        |
| hsa-miR-146a-5p                       |
| hsa-miR-146b-5p                       |
| hsa-miR-148a-3p                       |
| hsa-miR-148b-3p                       |
| hsa-miR-150-5p                        |
| hsa-miR-151a-5p                       |
| hsa-miR-152                           |
| hsa-miR-155-5p                        |
| hsa-miR-15a-5p                        |
| hsa-miR-15b-3p                        |
| hsa-miR-15b-5p                        |
| hsa-miR-16-2-3p                       |
| hsa-miR-17-5p                         |
| hsa-miR-181a-5p                       |
| hsa-miR-185-5p                        |
| hsa-miR-186-5p                        |
| hsa-miR-18a-3p                        |
| hsa-miR-18a-5p                        |
| hsa-miR-18b-5p                        |

| Mediamente espressi in siero e saliva |
|---------------------------------------|
| hsa-miR-191-5p                        |
| hsa-miR-192-5p                        |
| hsa-miR-193b-3p                       |
| hsa-miR-194-5p                        |
| hsa-miR-197-3p                        |
| hsa-miR-19a-3p                        |
| hsa-miR-19b-3p                        |
| hsa-miR-200a-3p                       |
| hsa-miR-200c-3p                       |
| hsa-miR-205-5p                        |
| hsa-miR-20a-3p                        |
| hsa-miR-20a-5p                        |
| hsa-miR-210                           |
| hsa-miR-2110                          |
| hsa-miR-215                           |
| hsa-miR-21-5p                         |
| hsa-miR-221-3p                        |
| hsa-miR-222-3p                        |
| hsa-miR-223-5p                        |
| hsa-miR-22-3p                         |
| hsa-miR-22-5p                         |
| hsa-miR-23a-3p                        |
| hsa-miR-23b-3p                        |
| hsa-miR-24-3p                         |
| hsa-miR-25-3p                         |
| hsa-miR-26a-5p                        |
| hsa-miR-26b-5p                        |
| hsa-miR-27a-3p                        |
| hsa-miR-27b-3p                        |
| hsa-miR-28-3p                         |
| hsa-miR-28-5p                         |
| hsa-miR-29a-3p                        |
| hsa-miR-29b-3p                        |
| hsa-miR-29c-3p                        |
| hsa-miR-30a-5p                        |
| hsa-miR-30b-5p                        |
| hsa-miR-30c-5p                        |
| hsa-miR-30d-5p                        |
| hsa-miR-30e-3p                        |
| hsa-miR-30e-5p                        |
| hsa-miR-320a                          |
| hsa-miR-320b                          |
| hsa-miR-324-3p                        |
| hsa-miR-324-5p                        |
| hsa-miR-32-5p                         |
| hsa-miR-326                           |
| hsa-miR-328                           |

| Mediamente espressi in siero e saliva |
|---------------------------------------|
| hsa-miR-331-3p                        |
| hsa-miR-335-5p                        |
| hsa-miR-338-3p                        |
| hsa-miR-339-3p                        |
| hsa-miR-339-5p                        |
| hsa-miR-33a-5p                        |
| hsa-miR-342-3p                        |
| hsa-miR-346                           |
| hsa-miR-34a-5p                        |
| hsa-miR-361-3p                        |
| hsa-miR-363-3p                        |
| hsa-miR-365a-3p                       |
| hsa-miR-374a-5p                       |
| hsa-miR-374b-5p                       |
| hsa-miR-378a-3p                       |
| hsa-miR-421                           |
| hsa-miR-423-3p                        |
| hsa-miR-424-5p                        |
| hsa-miR-425-3p                        |
| hsa-miR-425-5p                        |
| hsa-miR-484                           |
| hsa-miR-485-3p                        |
| hsa-miR-486-5p                        |
| hsa-miR-500a-5p                       |
| hsa-miR-501-3p                        |
| hsa-miR-502-3p                        |
| hsa-miR-532-3p                        |
| hsa-miR-532-5p                        |
| hsa-miR-574-3p                        |
| hsa-miR-590-5p                        |
| hsa-miR-629-5p                        |
| hsa-miR-652-3p                        |
| hsa-miR-660-5p                        |
| hsa-miR-766-3p                        |
| hsa-miR-92a-3p                        |
| hsa-miR-93-3p                         |
| hsa-miR-93-5p                         |
| hsa-miR-99a-5p                        |
| hsa-miR-99b-5p                        |

**Tabella 2.** miRNA che sono espressi (o non espressi) solo in siero o solo in saliva

|                                               |                                                        |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>miRNA molto espressi in siero e saliva</b> | <b>miRNA non espressi né nel siero né nella saliva</b> |
| hsa-miR-16-5p                                 | hsa-miR-107                                            |
| hsa-miR-223-3p                                | hsa-miR-130b-3p                                        |
|                                               | hsa-miR-192-5p                                         |
|                                               | hsa-miR-210                                            |
|                                               | hsa-miR-22-5p                                          |
|                                               | hsa-miR-23b-3p                                         |
|                                               | hsa-miR-27a-3p                                         |
|                                               | hsa-miR-485-3p                                         |
|                                               | hsa-miR-501-3p                                         |
|                                               | hsa-miR-99a-5p                                         |
| <b>miRNA espressi solo nella saliva</b>       |                                                        |
| - - -                                         |                                                        |
|                                               |                                                        |
| <b>espressi solo nel siero</b>                |                                                        |
| hsa-miR-140-5p                                |                                                        |
|                                               |                                                        |
| <b>meno nel siero e più nella saliva</b>      |                                                        |
| - - -                                         |                                                        |
|                                               |                                                        |
| <b>più nel siero e meno nella saliva</b>      |                                                        |
| hsa-miR-885-5p                                |                                                        |

**Tabella 3.** miRNA non espressi né in siero né in saliva.

|                                  |                               |
|----------------------------------|-------------------------------|
| <b>non espressi nella saliva</b> | <b>non espressi nel siero</b> |
| hsa-miR-1                        | hsa-let-7i-3p                 |
| hsa-miR-10b-5p                   | hsa-miR-106b-3p               |
| hsa-miR-122-5p                   | hsa-miR-132-3p                |
| hsa-miR-125a-5p                  | hsa-miR-208a                  |
| hsa-miR-133a                     | hsa-miR-29a-5p                |
| hsa-miR-139-5p                   | hsa-miR-375                   |
| hsa-miR-144-5p                   | hsa-miR-423-5p                |
| hsa-miR-154-5p                   | hsa-miR-92b-3p                |
| hsa-miR-190a                     |                               |
| hsa-miR-195-5p                   |                               |
| hsa-miR-199a-3p                  |                               |
| hsa-miR-199a-5p                  |                               |
| hsa-miR-204-5p                   |                               |
| hsa-miR-301a-3p                  |                               |
| hsa-miR-376a-3p                  |                               |
| hsa-miR-382-5p                   |                               |
| hsa-miR-409-3p                   |                               |
| hsa-miR-551b-3p                  |                               |
| hsa-miR-584-5p                   |                               |
| hsa-miR-885-5p                   |                               |
|                                  |                               |

## 2.4 DISCUSSIONE

Per un uso clinico dei miRNA come biomarcatori è importante standardizzare l'estrazione, la preparazione e il profiling dei miRNA estratti dal campione. Il primo fattore che può influenzare la riproducibilità dei risultati è la qualità dell'RNA isolato dai campioni di sangue umano. In questa parte dello studio, abbiamo effettuato un confronto di due procedure di estrazione per l'isolamento dei miRNA da sangue e da saliva utilizzando il kit Exiqon e il kit Norgen. Tale confronto è servito per trovare le condizioni più adatte per ottimizzare il protocollo di estrazione dell'RNA ed ottenere un protocollo per il rilevamento dei miRNA altamente sensibile e preciso. In particolare, è stato dimostrato che a parità di volume iniziale di siero, il kit che permette di avere una resa maggiore di miRNA circolanti è il kit della Norgen. La condizione migliore per la reazione di RT è utilizzare un volume iniziale di siero di 200 µl e utilizzare 2 µl di RNA perché l'aggiunta di una quantità elevata di RNA alla reazione di RT porta all'inibizione della reazione di PCR. Per quanto riguarda l'utilizzo del carrier (MS2), nel caso del kit Norgen, l'aggiunta sembra migliorare la resa finale, anche se nel nostro protocollo abbiamo preferito utilizzare tecniche già messe a punto dalla stessa casa produttrice delle sonde a LNA specifiche per la rilevazione dei miRNA circolanti.

Per quanto riguarda la saliva, il volume ottimale di materiale di partenza per avere una buona estrazione e un buon segnale di qPCR senza avere inibizione è 200 µl. Con volumi maggiori si osserva inibizione. Infine, dal confronto dei profili di espressione dei miRNA circolanti in siero e saliva è stato possibile identificare un set di miRNA che risulta essere espresso sia nel siero che nella saliva, sebbene alcuni miRNA siano espressi in maniera specifica nell'uno o nell'altro biofluido.

I dati e i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi serviranno come base per ulteriori studi, volti all'utilizzo del profiling di miRNA come una "biopsia liquida" e mirati alla diagnosi di varie patologie anche in ambito pediatrico.

## Bibliografia

1. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010 Nov;56(11):1733-41.
2. Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 2009 Jun;9(6):703-11.
3. Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol*. 2010 Nov-Dec;28(6):655-61.
4. Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008 Mar;54(3):482-90.
5. Ge Q, Zhou Y, Lu J, Bai Y, Xie X, Lu Z. miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions. *Molecules*. 2014 Jan 27;19(2):1568-75.
6. Andreasen D, Fog JU, Biggs W, Salomon J, Dahlsveen IK, Baker A, et al. Improved microRNA quantification in total RNA from clinical samples. *Methods*. 2010 Apr;50(4):S6-9.
7. Kim YK, Yeo J, Kim B, Ha M, Kim VN. Short structured RNAs with low GC content are selectively lost during extraction from a small number of cells. *Mol Cell*. 2012 Jun 29;46(6):893-5.
8. Mestdagh P, Hartmann N, Baeriswyl L, Andreasen D, Bernard N, Chen C, et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods*. 2014 Aug;11(8):809-15.
9. Sourvinou IS, Markou A, Lianidou ES. Quantification of circulating miRNAs in plasma: effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability. *J Mol Diagn*. 2013 Nov;15(6):827-34.
10. Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, Andreasen D, Mouritzen P, Wrang Teilum M, et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods*. 2013 Jan;59(1):S1-6.

## INSULINO RESISTENZA IN BAMBINI OBESI

### 3.1 INTRODUZIONE

La prevalenza dell'obesità infantile nel mondo è aumentata in maniera esponenziale nel corso degli ultimi anni. L'obesità aumenta notevolmente il rischio di presentare precocemente disturbi come la sindrome metabolica (SM), il diabete di tipo 2 (T2D), dislipidemie e malattie cardiovascolari (CVD) (1). L'insulino resistenza (IR) è cruciale nella patogenesi di queste anomalie metaboliche e molto probabilmente precede la loro comparsa (1). L'IR è fisiologica in certe fasi della vita, promuove l'accrescimento del corpo e lo sviluppo puberale. Il calo fisiologico della sensibilità all'insulina inizia qualche anno prima della pubertà, più o meno in concomitanza del passaggio dalla scuola materna all'età dell'obbligo scolastico e l'obesità anticipa e aggrava la sensibilità all'insulina (2).

Come abbiamo precedentemente discusso, i microRNA (miRNA) controllano l'espressione genica a livello post trascrizionale inibendo la traduzione di proteine, o destabilizzando o degradando l'mRNA bersaglio (3). Alcuni miRNA sono significativamente deregolati in condizioni infiammatorie o di IR, nell'obesità (3), nelle malattie coronariche (4) e in altre anomalie cardiometaboliche (5). Le concentrazioni dei miRNA circolanti cambiano in base agli stati fisiologici e patologici e il loro ruolo funzionale nell'obesità rimane ancora da determinare (6). Vista la stabilità dei miRNA circolanti, questi possono servire come biomarcatori per la diagnosi della malattia e per la sua caratterizzazione.

Il test di tolleranza al glucosio orale (OGTT) fornisce una visione dinamica del glucosio e dell'insulina fisiologica e permette di stimare meglio l'IR (1). L'OGTT, poiché consiste nel somministrare al paziente un bolo di glucosio (il cosiddetto 'carico di glucosio'), può anche agire come stimolo in grado di modulare l'espressione dei miRNA (7). Per tali motivi abbiamo studiato il profilo di espressione dei miRNA circolanti sia a digiuno che 120 minuti dopo il carico di glucosio in un campione di 6 bambini obesi in età prescolare con insulino resistenza (IR) e li abbiamo confrontati con 6 bambini obesi sensibili all'insulina (IS) di pari indice di massa corporea (BMI) ed età. Il nostro obiettivo è stato individuare miRNA circolanti che potessero rappresentare dei possibili biomarcatori di IR, ampliare la nostra conoscenza sulla modulazione precoce dei miRNA nei primi stati di malattia e portare quindi all'individuazione tempestiva di soggetti a rischio.

## **3.2 MATERIALI E METODI**

### **3.2.1 Reclutamento dei pazienti**

Dodici bambini obesi in età prescolare sono stati arruolati a partire da una coorte più grande (studio chiamato ORIGIN) (1). Lo studio ha incluso i bambini (di età da 2.0 a 5.8 anni) il cui indice di massa corporea passa da un peso normale al sovrappeso/obesità entro 12 mesi precedenti la data di reclutamento. I criteri di esclusione sono stati malattie endocrine, sovrappeso/obesità oltre 12 mesi dal reclutamento, malattie genetiche, malattie croniche, consumo di farmaci che possano influenzare la crescita o il metabolismo dei carboidrati (1).

### **3.2.2 Valutazione clinica e stima della composizione corporea**

Le misure antropometriche e la stima della pressione arteriosa sistolica e diastolica (SBP e DBP) sono state eseguite secondo una procedura standardizzata. Le classificazioni di peso normale/sovrappeso/obesità sono state definite in base ai criteri della Obesity Task Force Internazionale (1).

### **3.2.3 Esami di laboratorio**

I trigliceridi a digiuno, il colesterolo HDL, il colesterolo LDL e il colesterolo totale sono stati valutati utilizzando kit colorimetrici (sistemi Roche/Hitachi modulari P/S, Can 433), la proteina C-reattiva ad alta sensibilità (Hs-CRP) mediante nefelometria (Dade Behring, BN), il glucosio nel sangue mediante la tecnica della glucosio ossidasi (Cobas Integra, Roche) e l'insulina con un metodo immunologico chemiluminescente (ADVIA Centaur analizzatore; Bayer Diagnostics). E' stato effettuato l'OGTT (1.75 g di glucosio/kg di peso corporeo fino a un massimo di 75 g). Sono stati calcolati anche L'HOMA-IR (homeostasis model assessment of IR) e il WBISI (whole-body insulin sensitivity) (1).

### **3.2.4 Valutazioni ecografiche**

Gli esami ecografici sono stati eseguiti in tempo reale utilizzando un sistema a ultrasuoni Siemens Acuson Antares (Siemens, Monaco, Germania). Lo spessore del tessuto adiposo viscerale (IVA) è stata definito come lo spessore del tessuto grasso tra il bordo posteriore dei muscoli addominali e la colonna lombare, e lo spessore del tessuto grasso sottocutaneo addominale (SAT) come lo spessore del tessuto adiposo tra l'interfase pelle-grasso e la linea alba (1).

### **3.2.5 Definizione dei pazienti IS e IR**

All'interno della distribuzione del campione iniziale (N = 219 bambini) sono stati identificati il 90° e il 10° percentile dell'HOMA-IR. Sono stati scelti quindi sei pazienti per ciascuna delle due categorie (superiore al 90° percentile e inferiore al 10° percentile).

### **3.2.6 Estrazione di RNA**

I miRNA circolanti sono stati estratti dal siero dei pazienti e dei controlli utilizzando il miRCURY RNA Isolation Kit – per biofluidi (Exiqon) seguendo le istruzioni del produttore. Prima dell'estrazione, è stata controllata l'emolisi allo spettrofotometro (414 nm). Per la valutazione dell'efficienza di estrazione, sono stati aggiunti al tampone di lisi prima dell'estrazione gli spike-in (spike-in kit RNA, Exiqon) e l'RNA carrier (MS2, Roche). I campioni estratti sono stati conservati a -80 ° C fino al momento dell'uso.

### **3.2.7 Analisi qPCR**

Ogni campione di RNA (2 µl) è stato mescolato con due RNA artificiali (RNA spike-in) utilizzati come controlli di RT, e la miscela (20 microlitri) è stato retrotrascritta a 42 ° C per 60 min usando il miRCURY LNA™ Kit Universale RT cDNA Synthesis (Exiqon) seguendo le istruzioni del produttore. I miRNA circolanti ed i controlli (estrazione, RT e emolisi) sono stati valutati utilizzando il pannello Serum/Plasma Focus miRNA PCR Panel I+II ((96-pozzetti, Exiqon) per qPCR (7900HT, Applied Biosystems). Le curve di amplificazione sono state analizzate utilizzando il software Genex (Ver.5, Exiqon) e normalizzate per media globale. Sono stati ottenuti miRNA statisticamente significativi ( $p < 0.05$ ) con un “fold change” (FC) minore di -1.5 ( $FC < -1.5$ ) e maggiore di 1,5 ( $FC > 1.5$ ) rispetto ai controlli.

### **3.2.8 Analisi bioinformatica dei putativi geni bersaglio dei miRNA**

Per discutere il potenziale ruolo biologico dei putativi geni bersaglio regolati dai miRNA deregolati nei pazienti IR rispetto a IS, abbiamo effettuato una analisi bioinformatica utilizzando il database di miR-Ontology Miro (<http://ferrolab.dmi.unict.it/miro/>). Questo strumento permette di personalizzare la ricerca per ottenere i target dei miRNA validati e/o putativi appartenenti ad un processo biologico ben definito o fenotipo di annotazione (malattia). Come criterio di selezione, abbiamo selezionato solo i bersagli appartenenti a fenotipi correlati alla patologia in esame (ad esempio T2D, IR, tolleranza al glucosio, obesità).

### 3.2.9 Analisi statistica

I dati continui sono stati riportati come medie e deviazioni standard (SD), i dati categorici come conte e percentuali. E' stato eseguito un confronto inter-gruppo utilizzando il t-test di Wilcoxon e un'analisi di correlazione con il test di Spearman. Abbiamo stimato l'accuratezza dei miRNA deregolati calcolando l'area sotto la curva ROC (AUROC). Le AUROCs sono state calcolate solo per i 10 miRNA espressi in tutti i pazienti. I miRNA espressi in modo differenziale sono stati utilizzati assieme al BMI z-score in modelli di regressione lineare stepwise per identificare i migliori predittori della HOMA-IR o WBISI dopo aggiustamento per età e sesso. Le correlazioni sono state eseguite utilizzando il software SPSS (SPSS, REL 18.0, Chicago, IL, USA). E' stato considerato significativo un valore di  $p < 0.05$ .

### 3.3 RISULTATI

#### 3.3.1 Descrizione della popolazione studiata

La tabella 1 riporta le caratteristiche antropometriche e di laboratorio dei 12 individui considerati. Rispetto ai pazienti IS di pari età e indice di massa corporea, i pazienti IR hanno peso corporeo ( $p = 0.008$ ) e altezza ( $p = 0.01$ ) significativamente più alti mentre non presentano un BMI e BMI-Z score statisticamente diverso.

|                                                   | <b>IR Patients<br/>(n=6)</b> | <b>IS Patients<br/>(n=6)</b> | <b>p-value</b> |
|---------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------|
| <b>Age (years)</b>                                | 4.63 ± 1.82                  | 4.35 ± 0.85                  | 0.09           |
| <b>Weight (kg)</b>                                | 30.88 ± 9.26                 | 17.67 ± 2.50                 | 0.008          |
| <b>Height (m)</b>                                 | 1.21 ± 0.16                  | 0.98 ± 0.08                  | 0.014          |
| <b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>                     | 20.87 ± 2.86                 | 18.52 ± 1.23                 | 0.1            |
| <b>BMI SDS</b>                                    | 1.68 ± 0.27                  | 2.05 ± 0.61                  | 0.2            |
| <b>Fasting glucose (mg/dl)</b>                    | 92.29 ± 7.95                 | 68.67 ± 29.30                | 0.06           |
| <b>Cholesterol (mg/dl)</b>                        | 134.86 ± 13.09               | 160.17 ± 18.49               | 0.015          |
| <b>Chol.HDL (mg/dl)</b>                           | 47.43 ± 10.08                | 61.00 ± 6.69                 | 0.02           |
| <b>Chol.LDL (mg/dl)</b>                           | 73.00 ± 6.56                 | 86.67 ± 19.94                | 0.1            |
| <b>Triglycerides(mg/dl)</b>                       | 58.29 ± 15.35                | 39.17 ± 17.54                | 0.06           |
| <b>Aspartate Aminotransferases (IU/l)</b>         | 26.43 ± 5.29                 | 27.67 ± 4.23                 | 0.65           |
| <b>Alanine Aminotransferases (IU/l)</b>           | 41.00 ± 6.14                 | 30.67 ± 3.67                 | 0.004          |
| <b>γ-glutamyl transferases (IU/l)</b>             | 20.43 ± 5.06                 | 20.00 ± 1.79                 | 0.8            |
| <b>Fasting insulin (μUI/ml)</b>                   | 11.89 ± 4.56                 | 2.93 ± 1.50                  | 0.001          |
| <b>Uric acid (mg/dl)</b>                          | 3.87 ± 0.55                  | 3.50 ± 0.45                  | 0.2            |
| <b>hs C-Reactive protein (mg/dl)</b>              | 4.45 ± 7.56                  | 1.41 ± 2.30                  | 0.4            |
| <b>2h Glucose (mg/dl)</b>                         | 89.86 ± 16.26                | 87.33 ± 20.50                | 0.8            |
| <b>2h Insulin (μUI/ml)</b>                        | 31.66 ± 16.71                | 12.93 ± 6.15                 | 0.025          |
| <b>HOMA-IR</b>                                    | 4.81 ± 2.73                  | 0.42 ± 0.21                  | <0.0001        |
| <b>WBISI</b>                                      | 0.80 ± 0.35                  | 2.70 ± 1.07                  | 0.002          |
| <b>Visceral Adipose Tissue thickness (mm)</b>     | 62.42 ± 16.33                | 53.93 ± 10.85                | 0.3            |
| <b>Subcutaneous Adipose Tissue thickness (mm)</b> | 12.74 ± 3.75                 | 4.33 ± 1.16                  | 0.001          |
| <b>Epicardial Adipose Tissue thickness (mm)</b>   | 2.84 ± 1.01                  | 1.53 ± 0.36                  | 0.02           |

**Tabella 1:** Descrizione del campione: caratteristiche antropometriche e di laboratori

I pazienti IR presentano livelli più elevati di ALT (quattro pazienti hanno valori > 40 UI/l), insulina a digiuno ( $p = 0.001$ ) e dopo il carico di glucosio ( $p = 0.01$  a 30 min e  $p = 0.03$  a 2 ore), un colesterolo HDL inferiore ( $p = 0.02$ ) e un maggiore spessore del grasso sottocutaneo ed epicardico ( $p = 0.001$  e  $p = 0.02$  rispettivamente). I pazienti IS, stranamente, mostrano un colesterolo totale più elevato ( $p = 0.02$ ) dei coetanei IR.

### 3.3.2 miRNA differenzialmente espressi in pazienti IR in condizioni di digiuno

Quattordici su 179 miRNA analizzati erano significativamente ( $p < 0.05$ ) deregolati nel siero di pazienti IR rispetto a quelli IS (Tabella 2).

|                    | <b>Differentially regulated miRNAs<br/>(IR vs IS)</b> |                     |                             |                     |
|--------------------|-------------------------------------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
|                    | <i>Fasting</i>                                        |                     | <i>Post glucose load</i>    |                     |
| <b>miRNA name</b>  | <b>Fold Change<br/>(FC)</b>                           | <b>P-<br/>value</b> | <b>Fold Change<br/>(FC)</b> | <b>P-<br/>Value</b> |
| miR-505-3p         | <b>3.11 ± 0.65</b>                                    | <b>0.025</b>        | <i>0.89 ± 0.91</i>          | <i>0.710</i>        |
| miR-122-5p         | <b>2.82 ± 0.49</b>                                    | <b>0.034</b>        | <i>3.3 ± 1.35</i>           | <i>0.064</i>        |
| miR-34a-5p         | <b>2.41 ± 0.39</b>                                    | <b>0.020</b>        | <i>1.94 ± 0.45</i>          | <i>0.075</i>        |
| miR-26b-5p         | <b>1.63 ± 0.17</b>                                    | <b>0.008</b>        | <i>0.66 ± 0.83</i>          | <i>0.125</i>        |
| miR-320a           | <b>1.55 ± 0.11</b>                                    | <b>0.002</b>        | <i>1.74 ± 0.46</i>          | <i>0.271</i>        |
| miR-146a-5p        | <b>1.48 ± 0.09</b>                                    | <b>0.001</b>        | <i>1.11 ± 0.63</i>          | <i>0.608</i>        |
| miR-148b-3p        | <b>1.47 ± 0.18</b>                                    | <b>0.027</b>        | <i>0.62 ± 0.54</i>          | <i>0.110</i>        |
| miR-342-3p         | <b>1.46 ± 0.25</b>                                    | <b>0.050</b>        | <i>1 ± 0.47</i>             | <i>0.982</i>        |
| <b>miR-190a</b>    | <b>- 3.04 ± 0.39</b>                                  | <b>0.011</b>        | <b>2.04 ± 0.77</b>          | <b>0.044</b>        |
| <b>miR-200c-3p</b> | <b>- 2.78 ± 0.46</b>                                  | <b>0.016</b>        | <b>3.88 ± 0.82</b>          | <b>0.002</b>        |
| miR-205-5p         | <b>- 2.60 ± 0.44</b>                                  | <b>0.016</b>        | <i>0.61 ± 1.3</i>           | <i>0.300</i>        |
| <b>miR-95</b>      | <b>- 1.72 ± 0.26</b>                                  | <b>0.026</b>        | <b>-3.31 ± 1.35</b>         | <b>0.024</b>        |
| miR-19a-3p         | <b>- 1.55 ± 0.21</b>                                  | <b>0.024</b>        | <i>1.06 ± 0.62</i>          | <i>0.816</i>        |
| miR-660-5p         | <b>- 1.50 ± 0.19</b>                                  | <b>0.025</b>        | <i>1.29 ± 0.42</i>          | <i>0.213</i>        |
| miR-30b-5p         | <i>1.13 ± 0.71</i>                                    | <i>0.666</i>        | <b>-1.82 ± 0.54</b>         | <b>0.008</b>        |
| miR-194-5p         | <i>1.34 ± 1.00</i>                                    | <i>0.362</i>        | <b>2.05 ± 0.53</b>          | <b>0.011</b>        |

|             |                  |          |                  |              |
|-------------|------------------|----------|------------------|--------------|
| miR-885-5p  | $1.01 \pm 1.87$  | $> 0.99$ | $4.42 \pm 1.42$  | <b>0.027</b> |
| miR-424-5p  | $1.14 \pm 0.52$  | 0.689    | $-2.06 \pm 0.84$ | <b>0.031</b> |
| miR-301a-3p | $1.24 \pm 0.68$  | 0.462    | $-2.50 \pm 1.07$ | <b>0.003</b> |
| miR-130b-3p | $-1.03 \pm 0.91$ | 0.932    | $-2.32 \pm 0.92$ | <b>0.043</b> |
| miR-584-5p  | $1.38 \pm 0.97$  | 0.419    | $2.45 \pm 1.08$  | <b>0.046</b> |

**Tabella 2.** FC medio (FC $\pm$ SD) dei miRNA circolanti rilevato nei pazienti insulino-resistenti rispetto agli insulino sensibili in condizioni di digiuno e dopo carico di glucosio.

Otto miRNA (miR-505-3p, miR-122-5p, miR-34a-5p, miR-26b-5p, miR-320a, miR-146a-5p, miR-148b-3p e miR-342-3p) sono up-regolati, mentre sei miRNA (miR-660-5p, miR-19a-3p, miR-95, miR-205-5p, miR-200c-3p e miR-190a) sono down-regolati. Tre miRNA (miR-146a, miR-148b-3p e miR-342-3p) presentano un FC  $<1.5$  sebbene la loro espressione sia ancora significativamente differente tra i gruppi. L'espressione di alcuni miRNA è stata correlata con i parametri metabolici, come HOMA-IR, WBISI, basale e dopo il carico di glucosio, colesterolo, insulina basale, insulina dopo 30 min, l'insulina a 2h e SAT (Tabella 3). miR-505-3p (AUROC = 0.833, 95% CI 0.3588-0.9958,  $p = 0.04$ ); miR-660-5p (AUROC = 0.928; 95% CI 0.3588-0.9958;  $p = 0.01$ ); miR-205-5p (AUROC = 0.952, 95% CI 0.3588-0.9958;  $p = 0.006$ ); miR-200C-3p (AUROC = 0.95; 95% CI 0.1941-0.9937;  $p = 0.02$ ) e miR-95 (AUROC = 0.92, 95% CI 0.2836-0.9949;  $p = 0.028$ ) identificano in maniera significativa i pazienti IR con una buona precisione. Questi ultimi miRNA sono stati inclusi insieme con il BMI z-score per predire HOMA-IR e WBISI in modelli di regressione lineari. miR-205-5p è il microRNA che predice in maniera migliore l'HOMA-IR ( $R^2 = 0.604$ ;  $p = 0.003$ ;  $\beta = -0.963$ ; 95% CI -1.513 a -0.413); mentre miR-660-5p il WBISI ( $R^2 = 0.81$ ;  $p < 0.0001$ ;  $\beta = 3.520$ ; 95% CI 2.344-4.696).

| Fasting miRNAs   | HOMA-IR                         | WBISI                              | Basal glucose                   | 30 min glucose                  | Cholesterol                     | Basal Insulin                   | 30 min insulin                  | 2h insulin                      | SAT                                 |
|------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| miR-146a-5p      | 0.176<br>(0.566)                | -0.170<br>(0.578)                  | 0.135<br>(0.661)                | 0.182<br>(0.553)                | <b>-0.784</b><br><b>(0.002)</b> | 0.377<br>(0.204)                | 0.071<br>(0.817)                | 0.066<br>(0.831)                | 0.253<br>(0.405)                    |
| miR-26b-5p       | 0.273<br>(0.367)                | -0.185<br>(0.546)                  | 0.164<br>(0.592)                | -0.091<br>(0.767)               | <b>-0.570</b><br><b>(0.042)</b> | 0.472<br>(0.104)                | 0.091<br>(0.768)                | 0.041<br>(0.893)                | 0.273<br>(0.367)                    |
| miR-19a-3p       | -0.524<br>(0.08)                | 0.566<br>(0.055)                   | <b>-0.760</b><br><b>(0.004)</b> | -0.217<br>(0.498)               | -0.140<br>(0.664)               | -0.406<br>(0.19)                | -0.566<br>(0.055)               | -0.531<br>(0.075)               | -0.531<br>(0.075)                   |
| miR-505-3p       | 0.544<br>(0.055)                | <b>-0.599</b><br><b>(0.031)</b>    | 0.349<br>(0.242)                | <b>0.580</b><br><b>(0.038)</b>  | <b>-0.608</b><br><b>(0.027)</b> | 0.512<br>(0.074)                | <b>0.604</b><br><b>(0.029)</b>  | <b>0.599</b><br><b>(0.031)</b>  | 0.500<br>(0.082)                    |
| miR-660-5p       | <b>-0.781</b><br><b>(0.002)</b> | <b>0.685</b><br><b>(0.01)</b>      | <b>-0.782</b><br><b>(0.002)</b> | -0.212<br>(0.487)               | 0.337<br>(0.259)                | <b>-0.636</b><br><b>(0.019)</b> | <b>-0.787</b><br><b>(0.001)</b> | <b>-0.556</b><br><b>(0.049)</b> | <b>-0.872</b><br><b>(&lt;0.001)</b> |
| miR-205-5p       | <b>-0.731</b><br><b>(0.005)</b> | <b>0.841</b><br><b>(&lt;0.001)</b> | <b>-0.586</b><br><b>(0.035)</b> | <b>-0.597</b><br><b>(0.031)</b> | 0.371<br>(0.212)                | <b>-0.715</b><br><b>(0.006)</b> | <b>-0.703</b><br><b>(0.007)</b> | <b>-0.709</b><br><b>(0.007)</b> | <b>-0.731</b><br><b>(0.005)</b>     |
| miR-200c-3p      | <b>-0.636</b><br><b>(0.048)</b> | <b>0.782</b><br><b>(0.008)</b>     | <b>-0.705</b><br><b>(0.023)</b> | -0.394<br>(0.26)                | 0.042<br>(0.907)                | <b>-0.576</b><br><b>(0.082)</b> | <b>-0.661</b><br><b>(0.038)</b> | <b>-0.733</b><br><b>(0.016)</b> | -0.600<br>(0.067)                   |
| miR-190a         | -0.643<br>(0.119)               | 0.536<br>(0.215)                   | <b>-0.786</b><br><b>(0.036)</b> | -0.396<br>(0.379)               | 0.321<br>(0.482)                | -0.631<br>(0.129)               | -0.286<br>(0.535)               | -0.679<br>(0.094)               | -0.607<br>(0.148)                   |
| miR-95           | <b>-0.855</b><br><b>(0.002)</b> | <b>0.782</b><br><b>(0.008)</b>     | <b>-0.650</b><br><b>(0.042)</b> | -0.418<br>(0.229)               | 0.103<br>(0.777)                | <b>-0.709</b><br><b>(0.022)</b> | <b>-0.685</b><br><b>(0.029)</b> | <b>-0.648</b><br><b>(0.043)</b> | <b>-0.818</b><br><b>(0.004)</b>     |
| Post OGTT miRNAs |                                 |                                    |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |                                     |
| miR-30b-5p       | -0.275<br>(0.364)               | 0.456<br>(0.117)                   | -0.176<br>(0.565)               | -0.429<br>(0.143)               | -0.124<br>(0.687)               | -0.206<br>(0.499)               | -0.511<br>(0.074)               | <b>-0.577</b><br><b>(0.039)</b> | -0.418<br>(0.156)                   |
| miR-194-5p       | 0.126<br>(0.681)                | -0.203<br>(0.505)                  | 0.226<br>(0.459)                | 0.325<br>(0.279)                | <b>-0.663</b><br><b>(0.014)</b> | 0.360<br>(0.226)                | 0.209<br>(0.494)                | 0.214<br>(0.482)                | 0.033<br>(0.915)                    |
| miR-95           | <b>-0.657</b><br><b>(0.015)</b> | <b>0.839</b><br><b>(&lt;0.001)</b> | -0.529<br>(0.063)               | <b>-0.700</b><br><b>(0.008)</b> | 0.305<br>(0.31)                 | <b>-0.618</b><br><b>(0.024)</b> | <b>-0.766</b><br><b>(0.002)</b> | <b>-0.669</b><br><b>(0.012)</b> | -0.460<br>(0.114)                   |
| miR-424-5p       | -0.374<br>(0.209)               | 0.549<br>(0.052)                   | -0.195<br>(0.523)               | -0.525<br>(0.065)               | 0.008<br>(0.979)                | -0.325<br>(0.279)               | <b>-0.604</b><br><b>(0.029)</b> | -0.533<br>(0.061)               | -0.363<br>(0.223)                   |
| miR-301a-3p      | <b>-0.558</b><br><b>(0.047)</b> | <b>0.721</b><br><b>(0.005)</b>     | -0.295<br>(0.328)               | <b>-0.683</b><br><b>(0.01)</b>  | 0.041<br>(0.893)                | -0.496<br>(0.085)               | <b>-0.553</b><br><b>(0.05)</b>  | -0.528<br>(0.064)               | -0.402<br>(0.174)                   |
| miR-130b-3p      | -0.523<br>(0.067)               | <b>0.575</b><br><b>(0.04)</b>      | -0.251<br>(0.409)               | -0.248<br>(0.414)               | -0.220<br>(0.469)               | -0.449<br>(0.124)               | -0.531<br>(0.062)               | -0.380<br>(0.201)               | -0.421<br>(0.152)                   |

**Tabella 3.** Coefficiente di correlazione e significatività statistica (tra parentesi) dei miRNA regolati in maniera differenziale e parametri clinici. I valori statisticamente significativi sono riportati in grassetto.

### 3.3.3 miRNA differenzialmente espressi nei pazienti IR a 120 min dopo OGTT

Dieci miRNA sono significativamente ( $p < 0.05$ ) deregolati nei pazienti IR rispetto ai pazienti IS dopo OGTT (Tabella 1), cinque miRNA sono up-regolati (miR-190a, miR-200c-3p, miR-194-5p, miR-885-5p e miR-584-5p) e cinque miRNA sono down-regolati (miR-95, miR-30b-5p, miR-424-5p, miR-301a-3p e miR-130b-3p). In totale, 21 miRNA sono regolati in modo diverso tra i pazienti IS e IR (Tabella 1), 11 solo in caso di digiuno, 7 dopo l'OGTT e 3 sia in condizioni di digiuno che post-carico. Il miR-190a e miR-200c-3p è downregolato in condizioni di digiuno, ma upregolato dopo il carico di glucosio. Il miR-95 è, al contrario, down-regolato sia in condizioni di digiuno che post-carico, anche se la maggiore variazione è stata osservata dopo OGTT.

Nella tabella 3, abbiamo riportato le correlazioni significative tra tutti questi miRNA in condizioni di digiuno e dopo il carico di glucosio e i parametri metabolici.

Le tabelle 4 e 5 mostrano i FC dei miRNA statisticamente significativi come effetto del carico di glucosio nei pazienti IS, e IR, rispettivamente.

| Differentially regulated miRNAs (IS OGTT vs IS) |                  |         |                    |                  |         |
|-------------------------------------------------|------------------|---------|--------------------|------------------|---------|
| Downregulated miRNAs                            |                  |         | Upregulated miRNAs |                  |         |
| miRNA name                                      | Fold Change (FC) | P-value | miRNA name         | Fold Change (FC) | P-Value |
| miR-27a-3p                                      | -5.93±0.83       | <0.001  | miR-2110           | 5.24±0.39        | <0.001  |
| miR-142-3p                                      | -5.6±0.94        | <0.001  | miR-20b-5p         | 3.96±1.08        | 0.010   |
| miR-374a-5p                                     | -5.28±1.03       | <0.001  | miR-605            | 3.94±1.26        | 0.026   |
| miR-26a-5p                                      | -3.75±1.05       | 0.003   | miR-128            | 3.65±0.27        | 0.012   |
| miR-409-3p                                      | -3.22±1.39       | 0.035   | miR-501-3p         | 3.37±0.85        | 0.012   |
| miR-28-5p                                       | -3.14±1.15       | 0.007   | miR-485-3p         | 3.32±1.03        | 0.016   |
| miR-584-5p                                      | -3.11±0.96       | 0.015   | miR-320b           | 3.16±0.80        | 0.001   |
| miR-200c-3p                                     | -2.92±1.04       | 0.012   | miR-95             | 3.03±0.99        | 0.004   |
| miR-382-5p                                      | -2.78±0.94       | 0.008   | let-7b-5p          | 3.01±0.82        | 0.003   |
| miR-374b-5p                                     | -2.78±0.68       | 0.003   | miR-34a-5p         | 2.93±1.23        | 0.034   |
| miR-32-5p                                       | -2.69±1.12       | 0.030   | miR-423-5p         | 2.37±0.98        | 0.032   |
| miR-18a-5p                                      | -2.68±1.10       | 0.014   | miR-22-3p          | 2.28±0.90        | 0.022   |
| miR-339-3p                                      | -2.66±1.15       | 0.046   | miR-222-3p         | 2.26±0.56        | 0.001   |
| miR-376a-3p                                     | -2.63±1.10       | 0.028   | miR-93-5p          | 2.03±0.95        | 0.042   |
| miR-19a-3p                                      | -2.45±0.75       | 0.003   | miR-143-3p         | 1.94±0.82        | 0.035   |
| miR-30d-5p                                      | -2.03±0.69       | 0.007   | miR-99a-5p         | 1.87±0.78        | 0.020   |

|             |            |              |             |           |              |
|-------------|------------|--------------|-------------|-----------|--------------|
| miR-151a-3p | -1.98±0.47 | <b>0.005</b> | miR-652-3p  | 1.71±0.56 | <b>0.017</b> |
| miR-21-5p   | -1.78±0.23 | <b>0.001</b> | miR-342-3p  | 1.67±0.32 | <b>0.025</b> |
| miR-660-5p  | -1.67±0.57 | <b>0.016</b> | miR-125b-5p | 1.64±0.58 | <b>0.045</b> |
| miR-30c-5p  | -1.66±0.58 | <b>0.040</b> | miR-146a-5p | 1.4±0.38  | <b>0.028</b> |

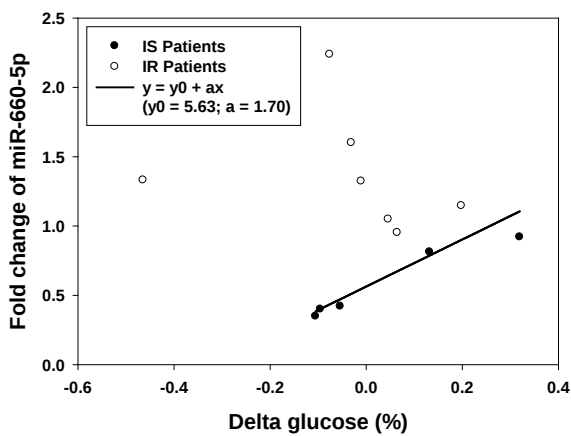
**Tabella 4:** FC medio (FC±SD) dei miRNA circolanti rilevati in pazienti insulino sensibili dopo carico di glucosio rispetto alla loro condizione di digiuno.

| <b>Differentially regulated miRNAs (IR OGTT vs IR)</b> |                         |                  |                           |                         |                  |
|--------------------------------------------------------|-------------------------|------------------|---------------------------|-------------------------|------------------|
| <i>Downregulated miRNAs</i>                            |                         |                  | <i>Upregulated miRNAs</i> |                         |                  |
| <b>miRNA name</b>                                      | <b>Fold Change (FC)</b> | <b>P-value</b>   | <b>miRNA name</b>         | <b>Fold Change (FC)</b> | <b>P-Value</b>   |
| miR-142-3p                                             | -4.89±0.67              | <b>&lt;0.001</b> | miR-346                   | 6.00±1.26               | <b>0.004</b>     |
| miR-339-5p                                             | -4.76±0.75              | <b>&lt;0.001</b> | miR-190a                  | 4.87±2.28               | <b>&lt;0.001</b> |
| miR-374b-5p                                            | -4.04±1.06              | <b>0.007</b>     | miR-30e-3p                | 4.75±1.33               | <b>0.001</b>     |
| miR-27b-3p                                             | -3.96±1.91              | <b>0.005</b>     | let-7b-5p                 | 4.02±1.65               | <b>&lt;0.001</b> |
| let-7f-5p                                              | -3.63±1.73              | <b>0.005</b>     | miR-500a-5p               | 3.61±0.84               | <b>0.001</b>     |
| miR-27a-3p                                             | -3.46±1.39              | <b>0.001</b>     | miR-200c-3p               | 3.39±1.09               | <b>0.002</b>     |
| miR-301a-3p                                            | -3.28±1.16              | <b>0.004</b>     | miR-320b                  | 3.27±1.24               | <b>&lt;0.001</b> |
| miR-409-3p                                             | -3.12±1.08              | <b>0.038</b>     | miR-122-5p                | 3.04±0.64               | <b>0.038</b>     |
| miR-495-3p                                             | -3.04±1.37              | <b>0.049</b>     | miR-486-5p                | 2.93±0.85               | <b>0.017</b>     |
| miR-141-3p                                             | -2.83±1.68              | <b>0.011</b>     | miR-133b                  | 2.83±1.08               | <b>0.001</b>     |
| miR-30b-5p                                             | -2.68±1.50              | <b>0.001</b>     | miR-95                    | 2.63±0.82               | <b>0.002</b>     |
| miR-374a-5p                                            | -2.62±0.80              | <b>0.032</b>     | miR-1                     | 2.36±1.17               | <b>0.004</b>     |
| miR-424-5p                                             | -2.57±1.63              | <b>0.003</b>     | miR-34a-5p                | 2.33±1.22               | <b>0.002</b>     |
| miR-26a-5p                                             | -2.52±0.84              | <b>0.001</b>     | miR-501-3p                | 2.05±0.68               | <b>0.026</b>     |
| miR-26b-5p                                             | -2.47±0.86              | <b>0.003</b>     | miR-532-5p                | 1.92±1.04               | <b>0.001</b>     |
| miR-328                                                | -2.31±0.63              | <b>0.016</b>     | miR-423-5p                | 1.84±0.54               | <b>0.003</b>     |
| miR-30c-5p                                             | -2.19±0.93              | <b>0.001</b>     | miR-140-3p                | 1.83±0.80               | <b>0.026</b>     |
| miR-28-5p                                              | -2.13±0.56              | <b>0.020</b>     | miR-93-5p                 | 1.75±0.55               | <b>0.032</b>     |
| miR-148b-3p                                            | -2.08±0.89              | <b>0.001</b>     | miR-378a-3p               | 1.74±0.91               | <b>0.025</b>     |
| miR-151a-3p                                            | -1.98±0.50              | <b>0.013</b>     | miR-222-3p                | 1.66±0.68               | <b>0.048</b>     |
| miR-30d-5p                                             | -1.81±0.75              | <b>0.027</b>     |                           |                         |                  |
| miR-21-5p                                              | -1.71±0.71              | <b>0.030</b>     |                           |                         |                  |
| let-7d-3p                                              | -1.69±0.72              | <b>0.016</b>     |                           |                         |                  |
| miR-148a-3p                                            | -1.56±0.73              | <b>0.038</b>     |                           |                         |                  |
| miR-101-3p                                             | -1.51±0.70              | <b>0.047</b>     |                           |                         |                  |
| miR-126-3p                                             | -1.46±0.54              | <b>0.037</b>     |                           |                         |                  |

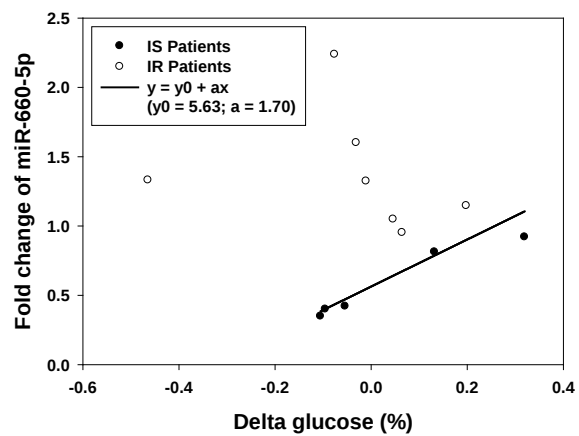
**Tabella 5:** FC medio (FC  $\pm$ SD) dei miRNA circolanti rilevati in pazienti insulino resistenti dopo carico di glucosio rispetto alla loro condizione di digiuno.

La figura 1 (pannello da A ad H) riporta le correlazioni di alcuni dei miRNA sopra elencati e  $\Delta$ glucose<sub>0-120</sub> o  $\Delta$ insulin<sub>0-120</sub>. Queste associazioni sono significative solo nei controlli e non sono stati associati con gli indici di adiposità.

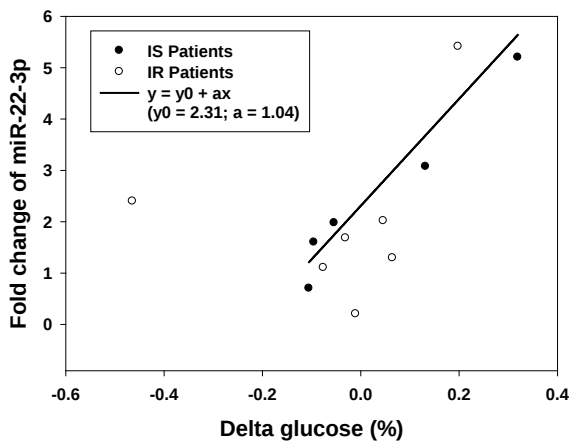
**A**



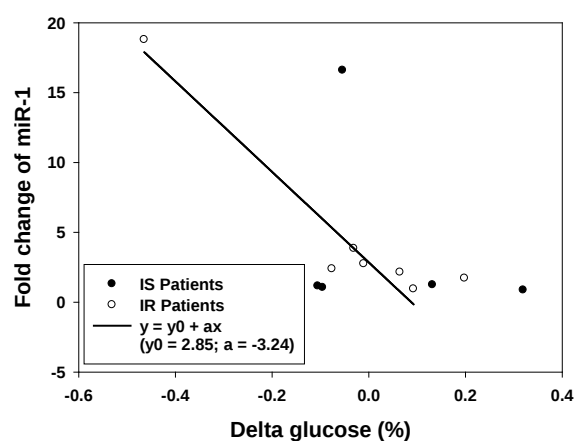
**B**

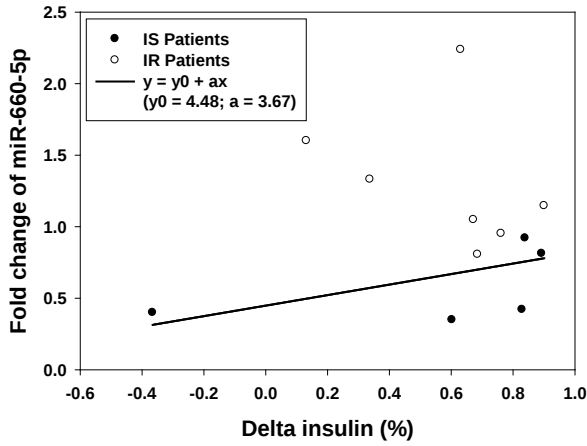
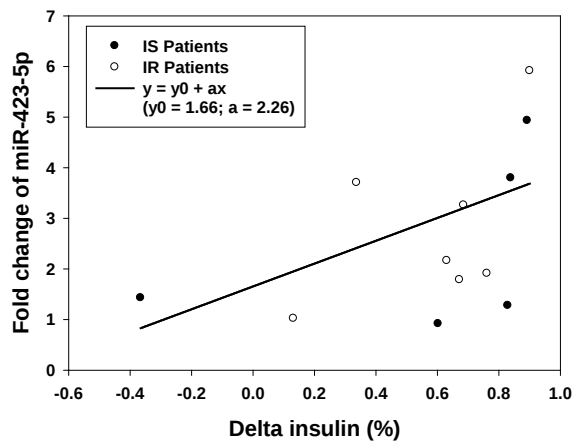
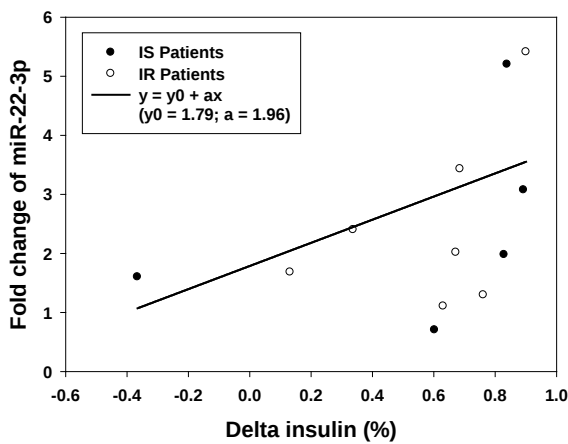
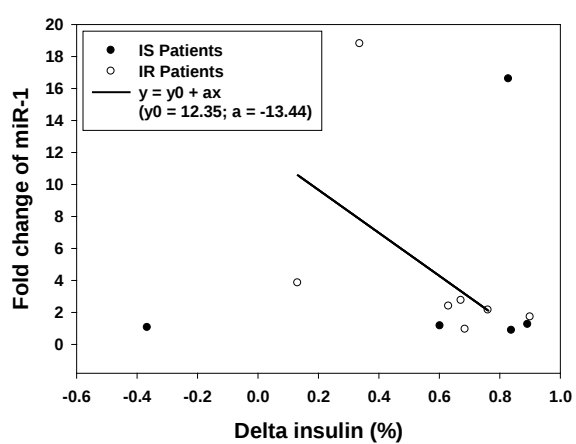


**C**



**D**



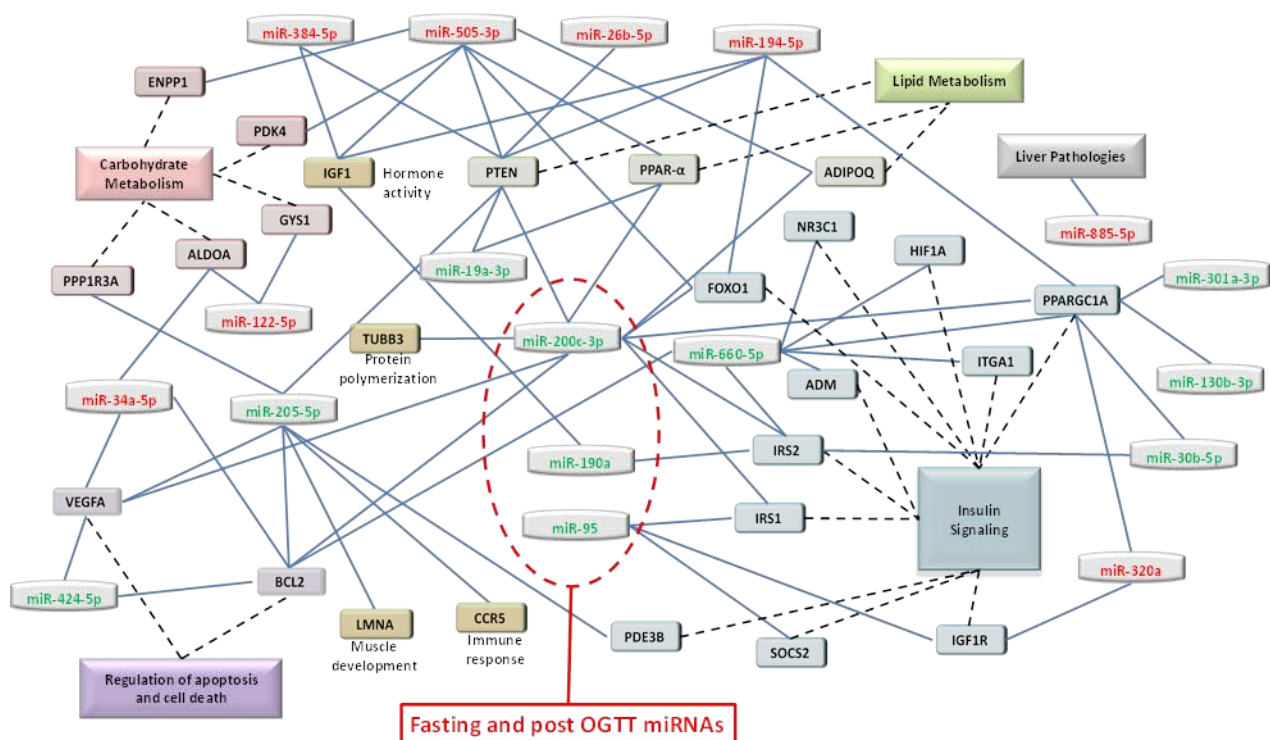
**E****F****G****H**

**Figura 1.** Grafici di correlazione e analisi di regressione. Nei controlli (n = 6, punti neri), correlazione del fold change (FC) del miR-660 con  $\Delta$ glucose<sub>0-120</sub> (Pannello A; r = 0.943; p = 0.005) e  $\Delta$ insulin<sub>0-120</sub> (Pannello B; r = 0,886; p = 0,02); FC del miR-26b-5p con  $\Delta$ glucose<sub>0-120</sub> (Panel C; r = -0,943; p = 0,005); FC del miR-423-5p con  $\Delta$ insulin<sub>0-120</sub> (pannello D; r = 0.829; p = 0,042); FC del miR-22-3p con  $\Delta$ glucose<sub>0-120</sub> (pannello E; r = 0.943; p = 0.005) e  $\Delta$ insulin<sub>0-120</sub> (Pannello di F; r = 0,886; p = 0,02).

Nei pazienti insulino-resistenti (n = 6, cerchi vuoti); la correlazione del FC del miR-1 con  $\Delta$ glucose<sub>0-120</sub> (Pannello di G; r = -0,786; p = 0,036) e  $\Delta$ insulin<sub>0-120</sub> (pannello H; r = -0,821; p = 0,023)

### 3.4 DISCUSSIONE

Negli ultimi anni sono stati prodotti molti dati che suggeriscono un ruolo attivo dei miRNA in molti processi metabolici legati all'obesità e al diabete di tipo 2 (T2D) (5) e che i miRNA circolanti rappresentano potenziali biomarcatori di malattie metaboliche. Nel presente studio, abbiamo svelato, per la prima volta, le associazioni significative tra alcuni miRNA circolanti e bambini obesi IR in età prescolare. Sono state studiate associazioni a digiuno e dopo carico di glucosio. Abbiamo identificato 14 miRNA differenzialmente espressi in condizione di digiuno e 10 miRNA deregolati dopo il carico di glucosio. Tre miRNA sono deregolati in entrambe le condizioni metaboliche (Figura 1). Il mir-200c-3p e il miR-190a sono overespressi in seguito al carico, mentre sono downregolati in condizioni di digiuno. Il mir-95 è downregolato sia in condizioni di digiuno che dopo carico di glucosio. Le variazioni post-carico del miR-660, miR26b-5p e miR-1 sono associate con i cambiamenti delle concentrazioni di glucosio e di insulina, senza alcuna relazione con gli indici di adiposità. Come è stato recentemente dimostrato (8), la maggior parte dei miRNA differenzialmente espressi nei pazienti IR vs IS sono coinvolti nella differenziazione degli adipociti (miR-34a-5p; miR-26b, miR-130, miR-30; miR-194-5p) (9); (10); (11); (12) o delle cellule mesenchimali derivanti dalle isole pancreatiche (miR-30) (13), nelle alterazioni del metabolismo del glucosio (14); (15); (16) o nella patogenesi della steatosi epatica (miR-34a-5p and miR-122) (17). I principali targets di questi miRNA sono descritti nella Figura 2. I fold change (FC) di questi miRNA dopo l'OGTT sono stati in alcuni casi associati ai livelli di colesterolo e / o trigliceridi a digiuno; solo i cambiamenti del miR-34a-5p e del miR-200c-3p sono stati associati all' adiposità.



**Figura 2:** Network di interazione tra i miRNA deregolati e i loro potenziali target implicati nel metabolismo dei carboidrati e dei lipidi, nella risposta immunitaria, nello sviluppo muscolare, nell'attività ormonale, nella regolazione dell'apoptosi / morte cellulare, nella segnalazione dell'insulina e altre patologie del fegato. I miRNA up- e down regolati sono rappresentati in rosso e verde, rispettivamente. Le linee nere tratteggiate rappresentano i geni legati a un particolare percorso biologico, le linee blu indicano una interazione diretta tra un miRNA e il suo target(s) o malattia. I miRNA deregolati sia a digiuno che post OGTT sono rappresentati nel cerchio rosso tratteggiato nel mezzo della rappresentazione schematica.

### 3.4.1 miRNA a digiuno

Il **miR-122** è altamente espresso nel fegato, modula la sintesi del colesterolo, il metabolismo degli acidi grassi e l'omeostasi energetica (18). E' overespresso in pazienti con iperlipidemia e malattia coronarica (19) correlando in entrambi i casi con la gravità delle condizioni. I nostri risultati confermano uno studio precedente che ha trovato il miR-122 upregolato nel siero dei bambini obesi in età prepuberale rispetto ai coetanei normopeso (20). Il mir-26b promuove la differenziazione degli adipociti (10) e la sua espressione nel tessuto adiposo sottocutaneo (SAT) di pazienti obesi è significativamente correlata alla infiltrazione tissutale da parte dei macrofagi (21).

E' stato visto in letteratura che i livelli del **miR-660** circolante diminuiscono dopo il clamp euglicemico iperinsulinemico (EHC) e aumentano dopo l'infusione di insulina intralipidica in

volontari sani (16). Considerando i risultati di questo nostro studio è evidente un effetto diretto del glucosio e dell'insulina sui livelli del miR-660 circolante oppure un ruolo di questo miRNA sulla produzione di glucosio epatico.

Il **mir-320a** sembra essere coinvolto precocemente nella patogenesi di iperglicemia (5, 21) e potrebbe rappresentare un marker di T2D.

#### 3.4.2 miRNA dopo l'OGTT

Questo è il primo studio che ha valutato l'effetto del carico di glucosio orale sulla modulazione dei livelli di espressione dei miRNA circolanti. Un recente studio ha rilevato che anche gli acidi grassi polinsaturi, che perennemente arricchiscono la dieta, influenzano il profilo dei miRNA nel siero (22). Nella nostra serie, il **miR-130** è stato trovato down regolato di due volte. Questo miRNA interviene nell'adipogenesi (11) e la sua espressione è downregolata in pazienti obesi senza T2D (9) e presenta un'ulteriore diminuzione nei pazienti con T2D (16).

Il **miR-30b-5p** è stato trovato down-regolato, ma in misura minore. Il cluster del miR-30 (miR-30a, b, c, d ed e) è correlato alla differenziazione degli adipociti e cellule mesenchimali derivanti dalle isole pancreatiche (13).

E' stato recentemente riportato il contributo di **miR-301a** nell'insulino resistenza indotta da IL-6 tramite la diretta regolazione di PTEN (23).

#### 3.4.3 miRNA a digiuno e post OGTT

La famiglia del miR-200 è differenzialmente espressa nei tessuti periferici di vari modelli murini obesi e con T2D. In modelli murini con una dieta ad alto contenuto di grassi, la sua espressione è ridotta nel tessuto adiposo (24) e aumentata nel fegato (25). Il **miR-200a** ha anche un ruolo putativo nella regolazione dell'assunzione di cibo e di accrescimento della massa corporea. Nell'ipotalamo di topi, l'espressione del miR-200a è aumentata in parallelo con l'aumento del peso corporeo, ma è diminuita in seguito ad un peggioramento della IR. Gli autori hanno concluso che l'espressione di miR-200a diminuisce con il diabete, ma aumenta nei casi di obesità o quando il diabete è associato con l'obesità. Nei topi ob/ob, al contrario, l'inibizione dell'espressione ipotalamica del miR-200a riduce il peso corporeo, migliora la sensibilità di tutto il corpo all'insulina (26). Considerando il comportamento opposto del miR-200 in risposta al carico di glucosio, il suo ruolo nel controllo dell'assunzione di cibo insieme alla sua diversa espressione nei tessuti insulino-sensibili, il miR-200 rappresenta un ottimo candidato per un ulteriore studio sulla patogenesi dell'IR e sulla sindrome metabolica. IGF1 è uno dei target del

**miR-190b** (27), mentre IRS2 è un target predetto. Nella nostra serie, **miR-95** (in condizioni di digiuno) è inversamente correlato con lo spessore di grasso sottocutaneo ed epicardico. In studi precedenti, l'espressione di questo miRNA era legato alla dimensione degli adipociti sia del tessuto adiposo viscerale che del tessuto adiposo sottocutaneo (20), e aumenta in modo significativo durante la differenziazione degli adipociti (9).

La forza del nostro lavoro consiste nell'aver selezionato accuratamente i pazienti da una coorte molto più grande e nell'aver disegnato lo studio prevedendo l'uso del carico di glucosio come stimolo. Tutti i bambini in età prescolare nei 12 mesi precedenti lo studio si trovavano in una situazione di sovrappeso e non presentavano altre anomalie metaboliche tranne IR. Il campione analizzato trovandosi all'inizio della storia naturale dell'obesità ha consentito di identificare miRNA associati all'IR e non con altre anomalie metaboliche (cioè dislipidemia, fegato grasso o basso grado di infiammazione) che potrebbero influire sul profilo dei miRNA. La maggior parte degli studi in letteratura riguarda giovani pazienti obesi già affetti da comorbidità, o pazienti adulti e questo contribuirebbe a spiegare alcuni risultati contrastanti. Tuttavia, anche nei nostri pazienti abbiamo trovato miRNA deregolati coinvolti nella patogenesi della steatosi epatica, dislipidemia e altri disturbi metabolici. Uno studio longitudinale potrà chiarire se questi miRNA possano essere coinvolti direttamente nella patologia o ne possano prevedere la progressione. I pazienti IR e IS hanno presentato un aumento statisticamente significativo dello spessore del tessuto adiposo sottocutaneo. Questo risultato è probabilmente in accordo con il loro diverso grado di IR. Non si può escludere che per alcuni miRNA, chiaramente implicati nell'adipogenesi (miR-95, miR-34a-5p, miR-26b, miR-130, miR-30b-5p), la diversa distribuzione del tessuto adiposo possa aver contribuito alla caratteristica specifica dell'IR.

D'altra parte, questo è uno studio pilota e i risultati devono essere ulteriormente validati in una coorte più ampia per provare l'accuratezza come biomarcatori di IR dei miRNA sopra menzionati.

## Bibliografia

1. Shashaj B, Bedogni G, Graziani MP, Tozzi AE, DiCorpo ML, Morano D, et al. Origin of cardiovascular risk in overweight preschool children: a cohort study of cardiometabolic risk factors at the onset of obesity. *JAMA Pediatr.* 2014 Oct;168(10):917-24.
2. Manco M, Spreghini MR, Luciano R, Pensini C, Sforza RW, Rustico C, et al. Insulin sensitivity from preschool to school age in patients with severe obesity. *PLoS One.* 2013 Jul 31;8(7):e68628.
3. Can U, Buyukinan M, Yerlikaya FH. The investigation of circulating microRNAs associated with lipid metabolism in childhood obesity. *Pediatr Obes.* 2015 Jul 30.
4. Gao W, He HW, Wang ZM, Zhao H, Lian XQ, Wang YS, et al. Plasma levels of lipometabolism-related miR-122 and miR-370 are increased in patients with hyperlipidemia and associated with coronary artery disease. *Lipids Health Dis.* 2012 May 15;11:55,511X-11-55.
5. Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, Sepramaniam S, Pek SL, Wong MT, et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Dec;97(12):E2271-6.
6. Ortega FJ, Mercader JM, Catalan V, Moreno-Navarrete JM, Pueyo N, Sabater M, et al. Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clin Chem.* 2013 May;59(5):781-92.
7. Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell.* 2012 Mar 16;148(6):1172-87.
8. Deiuliis JA. MicroRNAs as regulators of metabolic disease: pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *Int J Obes (Lond).* 2016 Jan;40(1):88-101.
9. Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Pardo G, Sabater M, Hummel M, Ferrer A, et al. MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PLoS One.* 2010 Feb 2;5(2):e9022.
10. Song G, Xu G, Ji C, Shi C, Shen Y, Chen L, et al. The role of microRNA-26b in human adipocyte differentiation and proliferation. *Gene.* 2014 Jan 10;533(2):481-7.

11. Lee EK, Lee MJ, Abdelmohsen K, Kim W, Kim MM, Srikantan S, et al. miR-130 suppresses adipogenesis by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Mol Cell Biol*. 2011 Feb;31(4):626-38.
12. Qin L, Chen Y, Niu Y, Chen W, Wang Q, Xiao S, et al. A deep investigation into the adipogenesis mechanism: profile of microRNAs regulating adipogenesis by modulating the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *BMC Genomics*. 2010 May 23;11:320,2164-11-320.
13. Joglekar MV, Parekh VS, Hardikar AA. New pancreas from old: microregulators of pancreas regeneration. *Trends Endocrinol Metab*. 2007 Dec;18(10):393-400.
14. Kaur K, Vig S, Srivastava R, Mishra A, Singh VP, Srivastava AK, et al. Elevated Hepatic miR-22-3p Expression Impairs Gluconeogenesis by Silencing the Wnt-Responsive Transcription Factor Tcf7. *Diabetes*. 2015 Nov;64(11):3659-69.
15. Prats-Puig A, Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Moreno M, Bonet N, et al. Changes in circulating microRNAs are associated with childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Oct;98(10):E1655-60.
16. Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Rovira O, Guerra E, Esteve E, et al. Profiling of circulating microRNAs reveals common microRNAs linked to type 2 diabetes that change with insulin sensitization. *Diabetes Care*. 2014;37(5):1375-83.
17. Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos MJ, Mirshahi F, Maher JW, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology*. 2008 Dec;48(6):1810-20.
18. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab*. 2006 Feb;3(2):87-98.
19. Coenen-Stass AM, Mager I, Wood MJ. Extracellular microRNAs in Membrane Vesicles and Non-vesicular Carriers. *EXS*. 2015;106:31-53.
20. Prats-Puig A, Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Moreno M, Bonet N, et al. Changes in circulating microRNAs are associated with childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Oct;98(10):E1655-60.

21. Kloting N, Berthold S, Kovacs P, Schon MR, Fasshauer M, Ruschke K, et al. MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PLoS One*. 2009;4(3):e4699.
22. Ortega FJ, Cardona-Alvarado MI, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Moreno M, Sabater M, et al. Circulating profiling reveals the effect of a polyunsaturated fatty acid-enriched diet on common microRNAs. *J Nutr Biochem*. 2015 Oct;26(10):1095-101.
23. Dou L, Wang S, Sui X, Meng X, Shen T, Huang X, et al. MiR-301a mediates the effect of IL-6 on the AKT/GSK pathway and hepatic glycogenesis by regulating PTEN expression. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(4):1413-24.
24. Chartoumpekis DV, Zaravinos A, Ziros PG, Iskrenova RP, Psyrogiannis AI, Kyriazopoulou VE, et al. Differential expression of microRNAs in adipose tissue after long-term high-fat diet-induced obesity in mice. *PLoS One*. 2012;7(4):e34872.
25. Alisi A, Da Sacco L, Bruscalupi G, Piemonte F, Panera N, De Vito R, et al. Mirnome analysis reveals novel molecular determinants in the pathogenesis of diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Lab Invest*. 2011 Feb;91(2):283-93.
26. Crepin D, Benomar Y, Riffault L, Amine H, Gertler A, Taouis M. The over-expression of miR-200a in the hypothalamus of ob/ob mice is linked to leptin and insulin signaling impairment. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Mar 25;384(1-2):1-11.
27. Hung TM, Ho CM, Liu YC, Lee JL, Liao YR, Wu YM, et al. Up-regulation of microRNA-190b plays a role for decreased IGF-1 that induces insulin resistance in human hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2014 Feb 20;9(2):e89446.

## LA SINDROME FIBROMIALGICA (FIBROMIALGIA)

### 4.1 INTRODUZIONE

La Fibromialgia (FM) è una sindrome caratterizzata da dolore cronico diffuso e da molteplici sintomi associati, ad eziologia non del tutto nota, la cui prevalenza nella popolazione generale è dell'1-3% e colpisce prevalentemente il sesso femminile. Nei criteri classificativi dell'American College of Rheumatology (ACR) del 1990, la FM viene definita una patologia caratterizzata dalla presenza di dolore diffuso presente da più di tre mesi e dalla dolorabilità alla palpazione di almeno 11 su 18 punti dolorosi, detti Tender Points (TP) (1). Nel 2010 l'ACR ha elaborato dei nuovi criteri diagnostici che non considerano i TP per la diagnosi, ma altri due parametri, il Widespread Pain Index (WPI) e il Symptom Severity (SS). Tali criteri valutano il punteggio dell'indice di dolore diffuso (WPI) che è determinato contando il numero delle aree del corpo dove il paziente ha avvertito dolore nell'ultima settimana, e una scala della gravità dei sintomi (SS) che prende in considerazione l'astenia, i disturbi del sonno e quelli cognitivi insieme ai sintomi somatici (1).

#### 4.1.1 Quadro clinico

La malattia decorre alternando periodi di remissione parziale o totale ad altri di ricomparsa e intensificazione della sintomatologia. Quasi sempre è presente un andamento stagionale, con peggioramento della sintomatologia nella stagione invernale. Il sintomo cardine è il dolore diffuso, lamentato sia a livello articolare che muscolare (artro-mialgie diffuse). Il dolore può insorgere, o essere esacerbato, dopo uno stress psicologico o fisico. Caratteristiche tipiche del dolore della FM sono l'allodinia (dolore dovuto ad uno stimolo normalmente non algogeno) e l'iperalgisia (stato di eccessiva risposta dolorosa a stimoli dolorosi di lieve entità) (2).

#### 4.1.2 Epidemiologia

La FM è una patologia particolarmente diffusa ma gli studi epidemiologici sono pochi e a volte riportano risultati contrastanti a causa delle difficoltà classificative, della popolazione esaminata non omogenea sia per quanto riguarda l'età ma anche per la diversa estrazione sociale. La prevalenza cambia a seconda del sesso: nei maschi tra lo 0% ed il 3.9% e nelle donne tra il 2.5% ed il 10% e varia, inoltre, con l'avanzare dell'età. (3); (4); (5). La FM sembra essere frequente anche nei bambini con una prevalenza del 6%. (6). Tra i fattori di rischio per la FM i principali sono il sesso femminile e lo stato civile, un basso livello di istruzione, un basso reddito, la storia riproduttiva e la storia familiare di depressione (7).

#### 4.1.3 Eziopatogenesi

La patogenesi della FM è complessa e, nonostante siano stati effettuati numerosi studi, essa non è del tutto conosciuta, ma sembrerebbe coinvolgere un meccanismo di interazione tra predisposizione genetica, fattori esterni tra cui stress fisico e psicologico, neurotrasmettitori, ormoni, citochine e fattori immunitari. Fattori scatenanti, sia di tipo fisico che psichico, possono intervenire sul sistema nervoso autonomo (SNA) e l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene ossia i principali sistemi coinvolti nella risposta allo stress, alterandone le normali funzioni e facilitando l'instaurarsi di patologie croniche stress-correlate, tra cui la FM (8); (9). Diversi studi hanno messo in evidenza un'incidenza maggiore tra i familiari dei pazienti (10) ed è stata valutata la prevalenza della sindrome in parenti di primo grado di pazienti affetti da FM (10). Basandosi sull'evidenza che nella FM esista un'aggregazione familiare, sono stati condotti diversi studi genetici per identificare la modalità di trasmissione della FM; alcuni autori hanno evidenziato una co-aggregazione della FM con disturbi dell'umore nei familiari (11). E' stato ipotizzato che diversi polimorfismi genici possano contribuire alla suscettibilità della FM, ma in letteratura sono presenti pochi studi condotti su piccoli numeri per cui i risultati non sono omogenei (12). Un'altra ipotesi patogenetica coinvolge la disfunzione asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), che è responsabile di una risposta allo stress alterata (9). Inoltre, insieme con il sistema nervoso autonomo (ANS) l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene contribuisce a preservare l'omeostasi attraverso il rilascio di neurotrasmettitori (13). Molti autori hanno suggerito la presenza di un collegamento tra l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, SNA, i linfociti T e le citochine e hanno concentrato la loro ricerca sul profiling delle citochine o sullo studio di disfunzioni ormonali in pazienti FM, ma i risultati sono contraddittori (14). Per studiare il ruolo del sistema immunitario, alcuni autori hanno valutato la presenza dell'anticorpo anti-polimero (APA) in pazienti affetti da FM poiché tali anticorpi sono stati precedentemente riscontrati in donne che, in seguito ad impianto di protesi mammarie in silicone, sviluppavano una sintomatologia simile alla FM (15). La concentrazione degli APA è stata correlata negativamente con l'intensità del dolore e con l'astenia in un gruppo di pazienti FM, ma tali anticorpi non hanno mostrato una particolare specificità nel diagnosticare la FM rispetto ad altre patologie reumatologiche, per cui gli APA non possono essere considerati come markers di malattia per la FM. Il meccanismo principalmente implicato nella patogenesi della FM è la sensibilizzazione centrale caratterizzata da un aumento della nocicezione periferica e da un'anomalia nella processazione del dolore a livello del sistema nervoso centrale (SNC), per cui i soggetti affetti da FM presentano una reazione quantitativamente e qualitativamente anormale nella percezione degli stimoli dolorosi

(8). Questo meccanismo è responsabile dell'iperalgisia (aumentata sensibilità al dolore) e dell'allodinia (dolore non dovuto a stimolo doloroso) caratteristiche tipiche della FM.

#### 4.1.4 Terapia

Vista la molteplicità dei sintomi, la terapia non può essere standardizzata ma deve essere scelta in base alle caratteristiche individuali del singolo paziente e condivisa con il paziente stesso. Gli obiettivi del trattamento farmacologico della FM sono rappresentati dalla riduzione del dolore, dei sintomi associati e dal miglioramento della qualità della vita. Ciò è possibile solo con un approccio multidisciplinare, come sottolineato nelle raccomandazioni dell'European League Against Rheumatism (EULAR), con una combinazione di terapie farmacologiche e l'attività fisica, la terapia cognitivo-comportamentale, le terapie complementari (16). I farmaci che si sono dimostrati maggiormente efficaci nel trattamento della FM sono quelli che agiscono a livello del SNC come gli antidepressivi, i miorilassanti, gli anticonvulsivanti (17). Tuttavia i farmaci non sono sempre efficaci e, inoltre, possono causare numerosi effetti collaterali. L'esercizio fisico riveste un ruolo molto importante in quanto aiuta il paziente a muoversi maggiormente e a sentirsi meglio, interrompendo il circolo vizioso del dolore cronico (18). Anche la combinazione di agopuntura somatica e addominale si è dimostrata essere un trattamento utile nella FM non solo per il controllo del dolore ma anche per migliorare i sintomi associati e la qualità della vita dei pazienti fibromialgici (19). Tra le terapie complementari, l'alimentazione sta recentemente acquisendo un ruolo di spicco per il trattamento della FM. In particolare, esistono evidenze scientifiche che mostrano come una dieta ricca di antiossidanti e l'apporto di micronutrienti siano correlati al miglioramento dei sintomi della FM (20).

#### Scopo dello studio

Scopo del presente studio è stato quello di analizzare l'espressione dei miRNA circolanti nel siero e nella saliva di pazienti affetti da FM correlandoli con i parametri clinici e clinimetrici e proporre un modello matematico che possa essere utilizzato come strumento di supporto nella diagnosi di FM. Inoltre è stata effettuata un'analisi bioinformatica dei targets dei miRNA per ricavare i processi biologici rilevanti relativi alla sindrome di FM e caratterizzare in dettaglio la malattia. Questo studio è, secondo le nostre conoscenze, il primo ad aver confrontato il profilo dei miRNA circolanti sierici e salivari in una coorte di pazienti fibromialgici.

## 4.2 MATERIALI E METODI

### 4.2.1 Pazienti

Durante un periodo di un anno, sono stati arruolati consecutivamente quattordici soggetti adulti affetti da FM, che si rivolgevano per la prima volta all'ambulatorio dedicato alla diagnosi e terapia della FM della UOC di Reumatologia, Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche della Sapienza Università di Roma. La diagnosi è stata posta in accordo con entrambi i criteri classificativi (ACR) del 1990 e del 2010 (N ACR1990,2010), sono stati arruolati esclusivamente i pazienti che riferivano una VAS (scala visiva analogica) per il dolore maggiore di 6 (range tra 0 e 10), con positività di almeno 14 TP e che non assumevano terapia farmacologica al momento dell'arruolamento. Nello stesso periodo sono stati arruolati quattordici controlli sani che non lamentavano una storia di dolore né cronico e né al momento dell'arruolamento. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad esame clinico con valutazione dei TP; sia i pazienti che i controlli sono stati sottoposti a valutazione clinimetrica mediante somministrazione dei seguenti questionari: Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ), Fibromyalgia Assessment Status (FAS), Health Assessment Questionnaire (HAQ), Zung Self-Rating Anxiety and Zung Self-Rating Depression Scale (ZSAS, ZSDS), nella versione italiana validata. Sono stati esclusi pazienti con malattie infiammatorie o autoimmuni e con disturbi neurologici o psichiatrici. Dopo aver firmato un consenso informato, i pazienti ed i controlli sono stati sottoposti a prelievo ematico e hanno raccolto un campione di saliva. Tutti i dati clinici, clinimetrici e di laboratorio sono stati archiviati in un formato elettronico standardizzato per la valutazione statistica.

### 4.2.2 Prelievo campioni biologici e isolamento RNA

Al momento del prelievo dei campioni biologici i pazienti ed i controlli erano a digiuno. I campioni di sangue sono stati conservati a temperatura ambiente per 30 minuti fino alla completa coagulazione e sono stati processati entro 2 ore dal prelievo. Il siero è stato ottenuto dopo centrifugazione delle provette a 1.800 g per 15 minuti e conservati a -80 ° C. La raccolta della saliva è stata effettuata con il soggetto in posizione seduta, con la testa leggermente inclinata in avanti, limitando i movimenti oro-facciali per ridurre al minimo l'influenza sul flusso salivare. I campioni di saliva sono stati conservati a -80 ° C. Prima del processamento i campioni sono stati centrifugati a 1.500 g per 10 minuti, al fine di abbattere le cellule e detriti cellulari. I miRNA circolanti sono stati estratti dal siero e dalla saliva utilizzando miRCURY RNA Isolation Kit -

biofluidi (Exiqon) seguendo le istruzioni del produttore. Per la valutazione dell'efficienza dell'estrazione sono stati aggiunti al tampone di lisi, prima dell'estrazione, opportuni controlli interni o spike-ins (kit spike-in RNA, Exiqon) e RNA carrier (MS2, Roche) per facilitare l'estrazione. L'RNA estratto è stato conservato a -80 ° C fino al momento dell'uso.

#### 4.2.3 Profili di espressione di miRNA circolanti

Per i profili di espressione di miRNA circolanti, pazienti e controlli sono stati divisi in due gruppi di pari età e il siero (~ 30 µl per ogni soggetto) è stato raccolto in due pool (~ 200 µl) per gruppo. Il campione di RNA estratto è stato retrotrascritto in 20 µl utilizzando il kit miRCURY LNA™ universal RT cDNA Synthesis (Exiqon) seguendo le istruzioni del produttore. Per controllare l'efficienza della retrotrascrizione (RT), sono stati aggiunti alla soluzione due controlli (CEL-miR-39 e UniSp6 – Exiqon). I miRNA circolanti ed i controlli (estrazione, RT e emolisi) sono stati valutati utilizzando il pannello Serum/Plasma Focus miRNA PCR Panel I+II ((96-pozzetti, Exiqon) per qPCR (7900HT, Applied Biosystems). I due pannelli contengono un totale di 179 miRNA assieme a miRNA di riferimento e 5 set di miRNA di controllo (spike-in). I livelli di espressione dei miRNA circolanti selezionati sono stati ulteriormente valutati mediante saggi singoli utilizzando specifici primer LNA™ PCR. Tre miRNA (miR-16-5p, miR-103a-3P, miR-191-5p) sono stati impiegati come controlli endogeni anche se solo il miR-16-5p è stato impiegato per la normalizzazione.

#### 4.2.4 Analisi dei dati

I valori grezzi (Cq) delle curve di amplificazione sono stati analizzati utilizzando il software di analisi Genex qPCR (versione 5, Exiqon) seguendo le raccomandazioni del produttore. Le piastre sono state normalizzate con il metodo della media globale. Sono stati ottenuti miRNA statisticamente significativi ( $p < 0.05$ ) con un “fold change” (FC) minore di -1.5 ( $FC < -1.5$ ) e maggiore di 1.5 ( $FC > 1.5$ ) rispetto ai controlli. I valori di espressione dei miRNA statisticamente significativi per ogni paziente sono stati correlati (Spearman's correlation) con i parametri clinici e clinimetrici considerati nella FM. L'analisi statistica e le correlazioni sono state eseguite utilizzando il software SPSS (ver.12), mentre le curve (ROC) per ogni miRNA sono state calcolate con SigmaPlot (Ver.10). Per ottenere un modello predittivo che prenda in considerazione più di un miRNA, abbiamo calcolato un modello lineare generalizzato sulla base di varie combinazioni dei miRNA statisticamente significativi. A questo scopo, abbiamo utilizzato la funzione glm in R Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>).

### 4.3 RISULTATI

La popolazione in studio consiste di 14 pazienti di sesso femminile e 14 controlli sani appaiati per sesso ed età. L'età media è di 43.8 anni (da 24 a 56) nel gruppo dei pazienti FM e 42.3 anni (da 28 a 56) nel gruppo di controllo. Le pazienti, al momento dell'arruolamento non assumevano farmaci. In accordo ai criteri ACR del 2010 tutte le pazienti hanno un punteggio dell'indice del dolore diffuso (WPI)  $> 7$  e un punteggio della scala della gravità dei sintomi (SS)  $> 5$  (oppure WPI da 3 a 6 e SS  $> 9$ ) con una differenza statisticamente significativa rispetto ai controlli ( $p < 0.001$ ). La media dei TP dolenti nel gruppo delle pazienti è di 15.6 (da 14 a 18). Il punteggio del FIQ è più elevato nel gruppo delle pazienti rispetto ai controlli sani ( $p < 0.001$ ) così come le singole scale visive analogiche (VAS) che lo compongono: VAS abilità lavorativa, VAS dolore, VAS astenia, VAS qualità del sonno, VAS rigidità, VAS ansia, VAS depressione ( $p < 0.001$ ). Inoltre tutte le altre scale utilizzate (HAQ, FAS, ZSAS, ZSDS) hanno rilevato punteggi più alti nel gruppo delle pazienti rispetto ai controlli ( $p < 0.001$ ). In particolare i questionari per la valutazione dei sintomi di ansia e depressione hanno mostrato, rispettivamente, punteggi medi di 50.1 (da 36 a 63) e di 48.1 (da 35 a 59) indicativi di uno stato di ansia e di depressione di entità lieve. I dati clinici e clinimetrici dei due gruppi sono riportati in tabella 1.

|                               | Controlli sani<br>(n=14) | Pazienti FM<br>(n=14) | Significatività<br>(p-value) |
|-------------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------------|
| <b>Età (anni)</b>             | 42.3 (28-56)             | 43.8 (24-56)          | 0.652                        |
| <b>WPI</b>                    | 1.9 (0-5)                | 11.6 (6-15)           | $< 0.001$                    |
| <b>SS</b>                     | 2.3 (0-5)                | 10.4 (8-12)           | $< 0.001$                    |
| <b>TP</b>                     | - - -                    | 15.6 (14-18)          | - - -                        |
| <b>FIQ</b>                    | 5.708 (0-23.43)          | 68.6 (41.9-99.0)      | $< 0.001$                    |
| <b>VAS abilità lavorativa</b> | 0.2 (0-1)                | 7.5 (4-10)            | $< 0.001$                    |
| <b>VAS dolore</b>             | 0.4 (0-3)                | 8.4 (5-10)            | $< 0.001$                    |
| <b>VAS astenia</b>            | 0.8 (0-4)                | 8.6 (5-10)            | $< 0.001$                    |
| <b>VAS qualità del sonno</b>  | 0.6 (0-2)                | 8.4 (5-10)            | $< 0.001$                    |
| <b>VAS rigidità</b>           | 0.6 (0-4)                | 7.9 (3-10)            | $< 0.001$                    |
| <b>VAS ansia</b>              | 0.7 (0-3)                | 7.2 (1-10)            | $< 0.001$                    |
| <b>VAS depressione</b>        | 0.2 (0-1)                | 5.1 (0-10)            | $< 0.001$                    |
| <b>HAQ</b>                    | 0.2 (0-1)                | 1.0 (0-2.4)           | $< 0.001$                    |
| <b>FAS</b>                    | 1.4 (0-5)                | 8.0 (5.3-10)          | $< 0.001$                    |
| <b>ZSAS</b>                   | 27.8 (20-35)             | 50.1 (36-63)          | $< 0.001$                    |
| <b>ZSDS</b>                   | 28.0 (20-50)             | 48.1 (35-59)          | $< 0.001$                    |

**Tabella 1.** Caratteristiche demografiche, cliniche e clinimetriche dei pazienti FM e dei controlli sani. I valori riportati sono espressi come valori medi (i valori minimo e massimo sono riportati in parentesi).

#### 4.3.1 Espressione dei miRNA nei pool FM

La valutazione iniziale dei profili di miRNA circolanti ha rivelato che cinque miRNA sono significativamente ( $p < 0.05$ ) e diversamente regolati in pazienti con FM rispetto ai controlli sani (tabella 2). In particolare, tre miRNA (miR-10a-5p, miR-320b e miR-424-5p) sono up-regolati (con un FC superiore a 1.59), mentre due miRNA (miR-20a-3p e miR-139-5p) sono down-regolati (con un FC inferiore a -1.57). Inoltre, abbiamo rilevato che i livelli di espressione di miR-10a-5p e miR-139-5p sono trascurabili e molto vicini al limite di rilevazione.

| miRNA          | Pazienti FM      |                           |
|----------------|------------------|---------------------------|
|                | Fold Change (FC) | Significatività (p-value) |
| hsa-miR-10a-5p | 1.59             | 0.026                     |
| hsa-miR-320b   | 1.65             | 0.030                     |
| hsa-miR-424-5p | 1.75             | 0.036                     |
| hsa-miR-20a-3p | -2.92            | 0.037                     |
| hsa-miR-139-5p | -1.57            | 0.031                     |

**Tabella 2.** MiRNA differenzialmente espressi nel pool di sieri di pazienti FM.

#### 4.3.2 Espressione dei miRNA nei sieri dei singoli pazienti FM

Per confermare la diversa espressione dei miRNA riscontrati nella valutazione iniziale, abbiamo deciso di includere altri miRNA nell'analisi dei singoli campioni. Abbiamo selezionato alcuni miRNA risultati up- o down-regolati in uno o nell'altro dei due pool, o che appartenevano alla stessa famiglia di miRNA o ad un cluster di quei miRNA trovati significativamente deregolati

nell'analisi. In particolare, abbiamo deciso di includere i seguenti miRNA: miR-1, miR-133a, miR-10b-5p, mir-143-3p, mir-29b-2-5p, miR-346 e mir-320a. Quindi, abbiamo valutato l'espressione di un totale di 17 miRNA, di cui 5 controlli (ad esempio, miR-23a-3p e miR-451a per valutare l'emolisi e miR-103, miR-191 e miR-16 come controlli endogeni). Abbiamo valutato la stabilità dei tre controlli endogeni controllando la variazione relativa (cioè, la deviazione standard) di valori Cq tra i diversi campioni, e abbiamo trovato che miR-16 era il controllo endogeno più stabile rispetto agli altri due. Pertanto, abbiamo impiegato questo miRNA per un'ulteriore normalizzazione e analisi. Di questi miRNA, solo sei sono risultati significativamente alterati (tabella 3). È interessante notare che il livello di espressione dei miRNA analizzati è risultato down-regolato quando è stata applicata la normalizzazione con miR-16. In particolare, il miR-1 ha mostrato la maggiore down-regolazione (FC = -3.29). E' da notare che il miR-23a-3p ha mostrato una significativa down-regolazione (FC = -2.94) nei pazienti FM, e ciò ha impedito la verifica dell'emolisi mediante qPCR.

|                | Pazienti FM      |                           |
|----------------|------------------|---------------------------|
| miRNA          | Fold Change (FC) | Significatività (p-value) |
| hsa-miR-23a-3p | -2.94            | 0.015                     |
| hsa-miR-1      | -3.29            | 0.013                     |
| hsa-miR-133a   | -2.49            | 0.037                     |
| hsa-miR-346    | -1.80            | 0.032                     |
| hsa-miR-139-5p | -2.09            | 0.029                     |
| hsa-miR-320b   | -1.59            | 0.008                     |

**Tabella 3.** MiRNA differenzialmente espressi nei sieri individuali dei pazienti FM.

#### 4.3.3 Correlazione tra i miRNA e i parametri clinici e clinimetrici

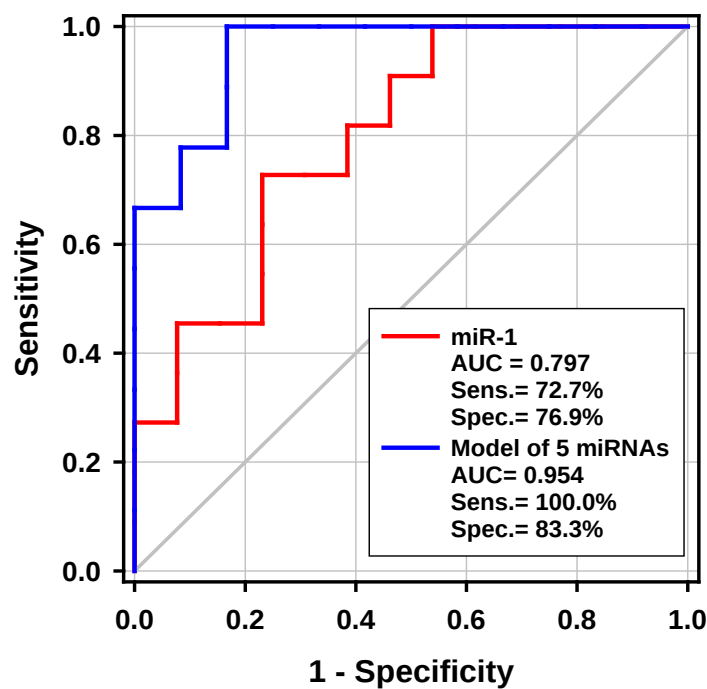
Abbiamo esaminato la correlazione tra il livello dei miRNA differenzialmente espressi nei pazienti fibromialgici ed i parametri clinici e clinimetrici. Tra tutti i parametri considerati abbiamo trovato solo una correlazione negativa significativa ( $r = -0.608$ ;  $p = 0.036$ ) tra il miR-320b e il punteggio relativo ai sintomi depressivi riferiti dai pazienti, ottenuto tramite la scala di auto valutazione per la depressione di Zung (ZSDS).

#### 4.3.4 Curve ROC (receiver operating characteristics)

Per valutare se i miRNA significativamente deregolati possano essere utilizzati come predittori di malattia nella FM, abbiamo calcolato le curve ROC (receiver operating characteristics) per ognuno dei miRNA (tabella 4). Abbiamo notato che i singoli miRNA mostrano un'area sotto la curva (AUC) maggiore di  $\sim 0.7$ . Il miR-1 mostra la AUC più alta (0.7970) con una specificità del 76.9% e una sensibilità del 72.7%, mentre il miR-133a mostra la AUC più bassa (0.6859), con una sensibilità di 53.8% ma una specificità del 100% (tabella 4). Abbiamo, quindi, calcolato un modello lineare generalizzato sulla base dei miRNA statisticamente significativi nella FM rispetto ai controlli. Il modello migliore è stato ottenuto prendendo in considerazione solo cinque miRNA: miR-23a-3p, miR-1, miR-133a, miR-346 e miR-320b. Nel nostro schema sperimentale, questo modello è stato in grado di ottenere una sensibilità del 100% e una specificità elevata (83.3%) (figura 4). L'aggiunta del miR-139-5p non modifica la capacità predittiva del modello e pertanto non è stato preso in considerazione nell'analisi.

|                   | AUC   | Sensibilità (%) | Specificità (%) | Cut-off |
|-------------------|-------|-----------------|-----------------|---------|
| hsa-miR-23a-3p    | 0.769 | 61.5            | 92.3            | 26.16   |
| hsa-miR-1         | 0.797 | 72.7            | 76.9            | 31.90   |
| hsa-miR-133a      | 0.686 | 53.8            | 100.0           | 31.10   |
| hsa-miR-346       | 0.724 | 50.0            | 92.3            | 32.83   |
| hsa-miR-139-5p    | 0.736 | 41.7            | 100.0           | 30.40   |
| hsa-miR-320b      | 0.782 | 75.0            | 84.6            | 28.49   |
| Modello (5 miRNA) | 0.954 | 100.0           | 83.3            | - - -   |

**Tabella 4.** Curve ROC. Area sotto la curva (AUC) per ogni miRNA e per un modello di 5 miRNA insieme alla sensibilità e specificità corrispondenti.



**Figura 4.** Curva ROC del miR-1 (rosso) e del modello cumulativo (blu) ottenuto dalla combinazione di cinque diversi miRNA (miR-23a-3p, miR-1, miR-133b, miR-346 e miR-320b).

#### 4.3.5 Espressione dei miRNA nella saliva

I sei miRNA trovati differenzialmente espressi in maniera statisticamente significativa nel siero dei pazienti FM rispetto ai controlli sono stati analizzati anche nella saliva. Come per i sieri, abbiamo utilizzato miR-16 e miR-191a per la normalizzazione dei dati. In seguito alla normalizzazione con il miR-16, ciò che emerge è che tre dei miRNA espressi nel siero non risultano espressi nella saliva (miR-1, miR-133a e miR-139-5p) mentre i restanti tre miRNA sono espressi ma non in maniera statisticamente significativi (miR-23a-3p,  $p=0.33$ ; miR-346,  $p=0.58$ ; miR-320b,  $p=0.32$ ) rispetto ai controlli. Lo stesso risultato si ottiene in seguito alla normalizzazione con il miR-191a (tabella 5).

|                | Fold Change<br>(FC)        | Significatività<br>(p-value) |
|----------------|----------------------------|------------------------------|
|                | <b>mir-16 pazienti FM</b>  |                              |
| hsa-miR-23a-3p | 1.43                       | 0.33                         |
| hsa-miR-1      | ---                        | ---                          |
| hsa-miR-133a   | ---                        | ---                          |
| hsa-miR-346    | 1.70                       | 0.58                         |
| hsa-miR-139-5p | ---                        | ---                          |
| hsa-miR-320b   | 1.76                       | 0.32                         |
|                | <b>mir-191 pazienti FM</b> |                              |
| hsa-miR-23a-3p | 1.04                       | 0.87                         |
| hsa-miR-1      | ---                        | ---                          |
| hsa-miR-133a   | ---                        | ---                          |
| hsa-miR-346    | 1.24                       | 0.81                         |
| hsa-miR-139-5p | ---                        | ---                          |
| hsa-miR-320b   | 1.28                       | 0.59                         |

**Tabella 5.** Espressione dei miRNA nei campioni di saliva dei pazienti FM.

#### 4.4 DISCUSSIONE

La patogenesi della FM non è ancora del tutto chiarita e sembra coinvolgere l'interazione tra il sistema nervoso e quello neuro-endocrino in soggetti geneticamente predisposti. La molteplicità dei sintomi presentati dai pazienti fa sì che, a tutt'oggi, non esistano biomarcatori diagnostici e trattamenti terapeutici standardizzati. Negli ultimi decenni i miRNA sono stati coinvolti nella patogenesi di numerose patologie (21). Recenti studi hanno focalizzato l'attenzione sul coinvolgimento dei miRNA nelle condizioni cliniche caratterizzate da dolore cronico in quanto essi regolano l'espressione di specifici geni nel SNC correlati al dolore (22); (23); (24). In letteratura sono presenti numerosi studi condotti su modelli murini di dolore infiammatorio e di dolore neuropatico che hanno descritto numerose, ma spesso contrastanti, variazioni dell'espressione di miRNA sia a livello del SNC che in quello periferico (24). Negli ultimi anni sono stati ricercati miRNA circolanti in soggetti affetti da sindromi caratterizzate da dolore cronico quali la sindrome da dolore regionale complesso, la sindrome dell'intestino irritabile, l'endometriosi, l'artrosi del ginocchio e la FM (24). Bjersing e colleghi hanno valutato l'espressione di miRNA circolanti nel liquido cefalorachidiano e successivamente nel siero di pazienti fibromialgici, valutando la correlazione dei miRNA e delle principali caratteristiche cliniche della FM ossia dolore e astenia. Gli autori hanno identificato nove microRNA downregolati nel CSF rispetto ai soggetti di controllo, e solo il miR-145 è stato associato con i sintomi caratteristici della FM. In quel lavoro non è stata eseguita un'analisi bioinformatica per prevedere i geni bersaglio putativi di questo gruppo di miRNA selezionato, riducendo l'impatto di questa osservazione all'interpretazione fisiopatologica della FM (25). Nel secondo studio sui miRNA circolanti, Bjersing ha identificato otto miRNA differenzialmente espressi nei pazienti FM, sette down-regolati e solo uno upregolato rispetto ai controlli sani, il miR-320a. Nella fase successiva è stata effettuata la correlazione dei microRNA associati alla malattia con dolore, la fatica e il sonno nei pazienti FM (26). Quel lavoro presenta però numerose limitazioni: i) l'uso di farmaci, per es. inibitori del reuptake della serotonina e della noradrenalina (SSRI e SNRI), un fattore confondente per l'analisi dei miRNA; ii) il miR-103a-3p che potrebbe essere usato come controllo endogeno, appartiene al gruppo di otto miRNA espressi in modo significativo. L'obiettivo dello studio di Cerda-Olmedo et al. del 2015 è quello di identificare il profilo dei miRNA (miRNome) dei pazienti FM finalizzato a costruire un metodo diagnostico quantitativo della FM. È stato eseguito il profilo di espressione dei miRNA nelle cellule periferiche mononucleate del sangue (PBMC) di undici pazienti FM e dieci controlli appaiati per età. Sono stati trovati 5 miRNA downregolati nei pazienti FM rispetto ai controlli. Inoltre, non è stata

trovata alcuna correlazione tra i livelli di espressione dei miRNA e i sintomi cardinali nei pazienti FM. In questo piccolo gruppo di miRNA è stato indicato il miR-451, un miRNA abbondante nel sangue, frequentemente utilizzato come controllo interno nell'analisi dei miRNA circolanti. Da questi studi sui microRNA circolanti possiamo osservare che miR-223-3p, miR-145-5p e miR-21-5p sono downregolati nel liquor e nei PBMC, ma non nel siero di pazienti FM e la correlazione con i sintomi cardinali nella FM è molto bassa (27). Un problema comune di questi studi, tra cui il nostro, è il piccolo numero di pazienti FM analizzati. Ovviamente noi consideriamo questo lavoro sperimentale come esplorativo e preliminare per i biomarcatori della FM. I risultati ottenuti nel nostro studio, hanno mostrato la presenza di un totale di sei miRNA (miR-23a-3p, miR-1, miR-133a, miR-346, miR-139-5p, miR-320b) significativamente deregolati nel siero di in una coorte di 14 pazienti fibromialgici rispetto ai controlli sani, mentre l'analisi dei campioni di saliva non ha evidenziato differenze significative. Il miR-320b ha mostrato una correlazione negativa significativa con il punteggio relativo ai sintomi depressivi riferiti dai pazienti, ottenuto tramite la scala di auto valutazione per la depressione di Zung. Tale questionario è ampiamente usato come strumento di screening per la valutazione di sintomi affettivi, psicologici e somatici associati alla depressione. Il punteggio totale varia da 20 a 80 e si ottiene sommando i singoli punteggi di ogni item. Nei pazienti è stato rilevato un punteggio medio indicativo di uno stato di depressione di lieve entità. L'analisi delle curve ROC ha mostrato che la combinazione di cinque miRNA ha valore diagnostico, con una AUC di 0.925.

Analizzando il ruolo dei singoli miRNA, il miR-23a è il primo membro del cluster miR-23a/27a/24-2, la cui espressione è correlata a diversi processi fisiologici tra cui la proliferazione e la differenziazione cellulare (28). L'alterata espressione di tutti e tre i miRNA del cluster miR-23a/27a/24-2 è stata evidenziata in diversi processi patologici, in particolare il miR-23a è coinvolto in numerose forme tumorali, nell'ipertrofia cardiaca e nell'atrofia muscolare (28). La regolazione di miR-23a potrebbe avere un ruolo nel mantenimento dello stato di salute del muscolo scheletrico in quanto è stato dimostrato che esso regola l'espressione della catena pesante della miosina (29). Livelli di espressione alterati del miR-23 a sono stati riscontrati, inoltre, nei disordini dello spettro autistico (down-regolati) e nell'epilessia (up-regolati) (30); (31). Il miR-23a-3p e il miR-23b-3p sono risultati deregolati nel liquido cefalorachidiano di un gruppo di pazienti fibromialgici, ma non sono state riscontrate correlazioni significative con i sintomi cardine della FM (25). E' stato dimostrato che il miR-23b regola l'espressione del recettore  $\mu$ -oppioidi 1-MOR1 e che la tolleranza agli oppioidi, associata alla prolungata

somministrazione di morfina, potrebbe essere una conseguenza della up-regolazione del miR-23b; tale miRNA, quindi, interverrebbe nei meccanismi di modulazione del dolore (32). Il miR-23b, inoltre, sopprime l'attività di alcune citochine pro-infiammatorie quali l'interleuchina 17 e il tumor necrosis factor alfa (TNF- $\alpha$ ) contenendo l'infiammazione nelle malattie autoimmuni. E' stato dimostrato, infatti, che il miR-23b è down-regolato sia nei modelli murini che nei soggetti affetti da malattie autoimmuni quali il LES e l'AR (33). Molti miRNA sono espressi in maniera tessuto-specifica, in particolare esistono miRNA che sono espressi nel tessuto muscolare e non in altri. Il miR-1 e il miR-133a sono muscolo-specifici ed il loro ruolo nella miogenesi è stato ampiamente discusso in letteratura. Entrambi sono espressi sia nel muscolo cardiaco che in quello scheletrico ma il miR-1 aumenta la differenziazione dei mioblasti promuovendo la formazione dei miotubi mentre il miR-133a aumenta la proliferazione dei mioblasti (34). Il miR-1 e il miR-133a, inoltre, sono down-regolati in diverse patologie oncologiche (35). Recentemente è stato messo in evidenza il ruolo di miR-1 nella modulazione dell'espressione del "brain-derived neurotrophic factor" (BDNF), una proteina appartenente alla famiglia delle neurotrofine che ha un'importante funzione nello sviluppo cerebrale, nella sinaptogenesi, nell'apprendimento e nella memoria ma anche in diversi processi non cerebrali tra cui l'angiogenesi e la miogenesi. L'alterazione del BDNF è stata associata a numerosi disturbi del sistema nervoso tra cui la malattia di Huntington, la depressione e l'ansia. La relazione tra miR-1 e BDNF è stata ipotizzata poiché miR-1 è espresso nel mesencefalo, nell'ippocampo e in altre popolazioni neuronali del SNC ed è noto che adeguati livelli di BDNF sono necessari per regolare il numero dei neuroni dopaminergici nella sostanza nera mesencefalica e che la regolazione dell'espressione di BDNF nell'ippocampo è fondamentale nei processi di memoria e di apprendimento (36). Il miR-346 gioca un ruolo fondamentale nel controllo della risposta infiammatoria; è stato infatti dimostrato come il miR-346 controlli in maniera negativa il rilascio di TNF- $\alpha$  nei fibroblasti nell'AR inibendo la trascrizione del gene Btk implicato nella stabilizzazione del mRNA del TNF- $\alpha$  (37). In un recente studio il miR-346 è stato identificato come regolatore positivo dell'osteogenesi nelle cellule staminali mesenchimali del midollo osseo umano, suggerendo come il miR-346 possa essere un target terapeutico nelle patologie caratterizzate da perdita della massa ossea (38). E' stato ipotizzato un possibile ruolo di miR-346 nel mantenimento dell'omeostasi della risposta ormonale e del metabolismo poiché modula l'attività della proteina RIP140 (receptor-interacting protein 140), che regola diversi geni coinvolti nel metabolismo (39). Il miR-346 è localizzato in un introne del gene GRID1, gene associato alla schizofrenia. L'analisi dell'espressione di miR-364 e di GRID1 nell'encefalo di soggetti affetti da tale patologia, ha evidenziato una down-

regolazione di questo miRNA nella corteccia dorsolaterale prefrontale dei pazienti rispetto ai controlli, suggerendo un ruolo di miR-346 nella regolazione di importanti mRNA target nella schizofrenia (40). (Il miR-139-5p è stato correlato all'oncogenesi nell'uomo e recentemente è stato ipotizzato il suo uso nella pratica clinica come biomarcatore e come target terapeutico (41). Alcuni autori hanno valutato il cambiamento nell'espressione di miRNA circolanti dopo esercizio fisico mostrando che dopo un'ora di esercizio fisico intenso alcuni miRNA, fra cui il miR-139-5p, sono up-regolati mentre nelle due ore successive aumentava anche l'espressione di miR-1 e miR-133a, i miRNA muscolo specifici precedentemente citati (42). Anche ratti che sono diventati resistenti allo stress presentano livelli di espressione ridotti del miR-139-5p (43). Inoltre è stata riscontrata una down-regolazione di miR-139-5p nei neuroni di topi dopo ischemia e ipossia con una conseguente up-regolazione della HGTD-P (human growth transformation dependent protein) che promuove l'apoptosi neuronale dopo danno ipossico, suggerendo quindi un ruolo protettivo di miR-139-5p nei confronti del danno cerebrale post-ischemia (44). Numerosi geni coinvolti nello sviluppo di disturbi neuropsichiatrici, tra cui schizofrenia, depressione e autismo, sono localizzati nel braccio corto del cromosoma 8. Tale regione cromosomica contiene, inoltre, sette miRNA tra cui il miR-124-1 e il miR-320 che sembrerebbero avere un ruolo critico nello sviluppo del SNC e in varie patologie nell'uomo (45). Il miR-320 promuove la crescita dei neuriti giocando un ruolo fondamentale nello sviluppo neuronale e potrebbe essere un target per migliorare la rigenerazione neuronale dopo un danno (46). Alcuni autori hanno dimostrato livelli up-regolati di miR-320 in biopsie vescicali di pazienti con sindrome da dolore vescicale, una sindrome caratterizzata da dolore cronico in regione pelvica e urgenza minzionale in assenza di cause specifiche. Gli autori hanno dimostrato come, l'esposizione prolungata alla sostanza P, comporti una down-regolazione del mRNA del recettore per la neurokinina 1 ed una iper-espressione di alcuni miRNA tra cui il miR-320 (47). In un altro studio è stata evidenziata post-mortem la deregolazione del miR-320 nella corteccia cerebellare di soggetti affetti da disturbi dello spettro autistico(30). Il miR-320b è stato riscontrato down-regolato nel siero di pazienti affetti dalla sindrome dolorosa regionale complessa, una sindrome caratterizzata da dolore neuropatico cronico che può interessare uno o più arti (48). Alcuni autori hanno ipotizzato una relazione tra il miR-320b ed i suoi geni bersaglio correlati ai neuroni dimostrando che, tale miRNA, si localizza preferenzialmente a livello dei neuroni della corteccia prefrontale nell'uomo ossia la zona dell'encefalo deputata al pensiero astratto, alla pianificazione, all'intelligenza sociale e alla memoria di lavoro (45). In letteratura sono presenti, inoltre, dati interessanti circa i paraloghi del miR-320b. Il miR-320a è

stato recentemente riscontrato up-regolato nel siero di pazienti fibromialgici ed i valori di espressione hanno mostrato una correlazione inversa con il dolore (26). Uno studio condotto su tessuto autoptico proveniente dalla corteccia prefrontale di soggetti suicidi, ha mostrato livelli up-regolati di miR320c. Gli autori hanno ipotizzato che alcuni miRNA, tra cui il miR-320c, possano influenzare la disregolazione dei geni STAT1 e SMOX i cui livelli di espressione down-regolati sono stati dimostrati in soggetti suicidi rispetto a controlli sani. E' stata evidenziata, infatti, una forte correlazione negativa tra miR-320c e l'espressione di tali geni, suggerendo un possibile ruolo chiave di questo miRNA nelle normali funzioni cognitive nell'uomo (28). Quindi, la downregolazione del miR-320b mostrata nei nostri pazienti FM potrebbe essere spiegata con il ruolo pleiotropico di questa molecola nel sistema nervoso. Tutti i miRNA deregolati nei nostri pazienti sono espressi nel SNC e nel tessuto muscolare con effetti multipli su diversi cluster cellulari. Quindi è possibile che diversi miRNA deregolati nei pazienti con FM potrebbero regolare i principali sintomi della FM come il dolore, la fatica e i disturbi dell'umore (p.es. il miR-320b è risultato significativamente anti-correlato con il punteggio relativo ai sintomi depressivi riferiti dai pazienti, ottenuto tramite la scala di autovalutazione per la depressione di Zung). Tale questionario è ampiamente usato come strumento di screening per la valutazione di sintomi affettivi, psicologici e somatici associati alla depressione. Nei pazienti è stato rilevato un punteggio medio indicativo di uno stato di depressione di lieve entità. Nessuna correlazione significativa si trova con altri sintomi e non sappiamo se il motivo è il piccolo numero di pazienti.

Tutti i miRNA deregolati nei nostri pazienti hanno diversi legami con la biologia e il funzionamento del sistema nervoso centrale, muscolo scheletrico o hanno molte connessioni con l'attività fisica, il dolore, lo stress, disturbi dell'umore e sintomi depressivi. Inoltre, suggeriamo che la combinazione di diversi miRNA deregolati può rappresentare la base per ottenere un buon modello predittivo ad alto potere diagnostico. La scelta della 'biopsia liquida' (cioè, CSF, siero, saliva) è un'altra variabile da considerare per limitare la variabilità. In realtà, non abbiamo trovato alcuna correlazione tra i miRNA circolanti nel siero e nella saliva, mentre altri non hanno trovato alcuna sovrapposizione tra siero e CSF.

In conclusione, il nostro studio, anche se limitato ad una piccola coorte, sottolinea che la disregolazione significativa di diversi miRNA sierici circolanti legati alla FM può avere origine neurologica e muscolare e che ulteriori studi dovrebbero essere dedicati a rafforzare questi risultati preliminari.

## Bibliografia

1. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 1990 Feb;33(2):160-72.
2. Yasui M, Yoshimura T, Takeuchi S, Tokizane K, Tsuda, M., et al. A chronic fatigue syndrome model demonstrates mechanical allodynia and muscular hyperalgesia via spinal microglial activation. *Glia.* 2014 Sep;62(9):1407-17. doi: 10.1002/glia.22687. Epub 2014 May 23. 2014;62(9):1407-17.
3. Miro E, Diener FN, Martinez MP, Sanchez AI, Valenza MC. Fibromyalgia in men and women: comparison of the main clinical symptoms. *Psicothema.* 2012 Feb;24(1):10-5.
4. Neumann L, Buskila D. Epidemiology of fibromyalgia. *Curr Pain Headache Rep.* 2003 Oct;7(5):362-8.
5. Wolfe F, Ross K, Anderson J, Russell IJ, Hebert L. The prevalence and characteristics of fibromyalgia in the general population. *Arthritis Rheum.* 1995 Jan;38(1):19-28.
6. Buskila D. Pediatric fibromyalgia. *Rheum Dis Clin North Am.* 2009 May;35(2):253-61.
7. Regal Ramos RJ. Epidemiological characteristics of patients evaluated with fibromyalgia in the Assessment of Disability Unit of Madrid. *Semergen.* 2016 Feb 5.
8. Yunus MB. Central sensitivity syndromes: a new paradigm and group nosology for fibromyalgia and overlapping conditions, and the related issue of disease versus illness. *Semin Arthritis Rheum.* 2008 Jun;37(6):339-52.
9. Crofford LJ. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2002 Mar;31(1):1-13.
10. Buskila D, Neumann L. Fibromyalgia syndrome (FM) and nonarticular tenderness in relatives of patients with FM. *J Rheumatol.* 1997 May;24(5):941-4.
11. Arnold LM, Hudson JI, Hess EV, Ware AE, Fritz DA, Auchenbach MB, et al. Family study of fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 2004 Mar;50(3):944-52.

12. Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Candidate gene studies of fibromyalgia: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatol Int.* 2012 Feb;32(2):417-26.
13. Di Franco M, Iannuccelli C, Valesini G. Neuroendocrine immunology of fibromyalgia. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Apr;1193:84-90.
14. Rodriguez-Pinto I, Agmon-Levin N, Howard A, Shoenfeld Y. Fibromyalgia and cytokines. *Immunol Lett.* 2014 Oct;161(2):200-3.
15. Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Di Franco M, Lama N, Batticciotto A, Iannuccelli C, et al. Anti-polymer antibodies are correlated with pain and fatigue severity in patients with fibromyalgia syndrome. *Autoimmunity.* 2008 Feb;41(1):74-9.
16. Carville SF, Arendt-Nielsen L, Bliddal H, Blotman F, Branco JC, Buskila D, et al. EULAR evidence-based recommendations for the management of fibromyalgia syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2008 Apr;67(4):536-41.
17. Di Franco M, Iannuccelli C, Atzeni F, Cazzola M, Salaffi F, Valesini G, et al. Pharmacological treatment of fibromyalgia. *Clin Exp Rheumatol.* 2010 Nov-Dec;28(6 Suppl 63):S110-6.
18. dos Santos MR, Moro CM, Vosgerau DS. Protocol for physical assessment in patients with fibromyalgia syndrome. *Rev Bras Reumatol.* 2014 Mar-Apr;54(2):117-23.
19. Iannuccelli C, Mannocci F, Guzzo MP, Olivieri M, Gerardi MC, Atzeni F, et al. Complementary treatment in fibromyalgia: combination of somatic and abdominal acupuncture. *Clin Exp Rheumatol.* 2012 Nov-Dec;30(6 Suppl 74):112-6.
20. Rossi A, Di Lollo AC, Guzzo MP, Giacomelli C, Atzeni F, Bazzichi L, et al. Fibromyalgia and nutrition: what news? *Clin Exp Rheumatol.* 2015 Jan-Feb;33(1 Suppl 88):S117-25.
21. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.* 2010 Oct;101(10):2087-92.
22. Poh KW, Yeo JF, Ong WY. MicroRNA changes in the mouse prefrontal cortex after inflammatory pain. *Eur J Pain.* 2011 Sep;15(8):801.e1,801.12.

23. Bai G, Ambalavanar R, Wei D, Dessem D. Downregulation of selective microRNAs in trigeminal ganglion neurons following inflammatory muscle pain. *Mol Pain*. 2007 Jun 8;3:15.
24. Andersen HH, Duroux M, Gazerani P. MicroRNAs as modulators and biomarkers of inflammatory and neuropathic pain conditions. *Neurobiol Dis*. 2014 Nov;71:159-68.
25. Bjersing JL, Lundborg C, Bokarewa MI, Mannerkorpi K. Profile of cerebrospinal microRNAs in fibromyalgia. *PLoS One*. 2013 Oct 25;8(10):e78762.
26. Bjersing JL, Bokarewa MI, Mannerkorpi K. Profile of circulating microRNAs in fibromyalgia and their relation to symptom severity: an exploratory study. *Rheumatol Int*. 2015 Apr;35(4):635-42.
27. Cerda-Olmedo G, Mena-Duran AV, Monsalve V, Oltra E. Identification of a microRNA signature for the diagnosis of fibromyalgia. *PLoS One*. 2015 Mar 24;10(3):e0121903.
28. Lopez JP, Fiori LM, Gross JA, Labonte B, Yerko V, Mechawar N, et al. Regulatory role of miRNAs in polyamine gene expression in the prefrontal cortex of depressed suicide completers. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014 Jan;17(1):23-32.
29. Wada S, Kato Y, Sawada S, Aizawa K, Park JH, Russell AP, et al. MicroRNA-23a has minimal effect on endurance exercise-induced adaptation of mouse skeletal muscle. *Pflugers Arch*. 2015 Feb;467(2):389-98.
30. Abu-Elneel K, Liu T, Gazzaniga FS, Nishimura Y, Wall DP, Geschwind DH, et al. Heterogeneous dysregulation of microRNAs across the autism spectrum. *Neurogenetics*. 2008 Jul;9(3):153-61.
31. Henshall DC. MicroRNA and epilepsy: profiling, functions and potential clinical applications. *Curr Opin Neurol*. 2014 Apr;27(2):199-205.
32. Ni J, Gao Y, Gong S, Guo S, Hisamitsu T, Jiang X. Regulation of mu-opioid type 1 receptors by microRNA134 in dorsal root ganglion neurons following peripheral inflammation. *Eur J Pain*. 2013 Mar;17(3):313-23.

33. Zhu S, Pan W, Song X, Liu Y, Shao X, Tang Y, et al. The microRNA miR-23b suppresses IL-17-associated autoimmune inflammation by targeting TAB2, TAB3 and IKK-alpha. *Nat Med*. 2012 Jul;18(7):1077-86.
34. Wang XH. MicroRNA in myogenesis and muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013 May;16(3):258-66.
35. Nohata N, Hanazawa T, Enokida H, Seki N. microRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: dysregulation and functional roles in human cancers. *Oncotarget*. 2012 Jan;3(1):9-21.
36. Varendi K, Kumar A, Harma MA, Andressoo JO. miR-1, miR-10b, miR-155, and miR-191 are novel regulators of BDNF. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Nov;71(22):4443-56.
37. Semaan N, Frenzel L, Alsaleh G, Suffert G, Gottenberg JE, Sibilia J, et al. miR-346 controls release of TNF-alpha protein and stability of its mRNA in rheumatoid arthritis via tristetraprolin stabilization. *PLoS One*. 2011;6(5):e19827.
38. Wang Q, Cai J, Cai XH, Chen L. miR-346 regulates osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by targeting the Wnt/beta-catenin pathway. *PLoS One*. 2013 Sep 4;8(9):e72266.
39. Tsai NP, Lin YL, Wei LN. MicroRNA mir-346 targets the 5'-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression. *Biochem J*. 2009 Dec 10;424(3):411-8.
40. Zhu Y, Kalbfleisch T, Brennan MD, Li Y. A MicroRNA gene is hosted in an intron of a schizophrenia-susceptibility gene. *Schizophr Res*. 2009 Apr;109(1-3):86-9.
41. Zhang HD, Jiang LH, Sun DW, Li J, Tang JH. MiR-139-5p: promising biomarker for cancer. *Tumour Biol*. 2015 Mar;36(3):1355-65.
42. Nielsen S, Akerstrom T, Rinnov A, Yfanti C, Scheele C, Pedersen BK, et al. The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. *PLoS One*. 2014 Feb 19;9(2):e87308.

43. Chen RJ, Kelly G, Sengupta A, Heydendael W, Nicholas B, Beltrami S, et al. MicroRNAs as biomarkers of resilience or vulnerability to stress. *Neuroscience*. 2015 Oct 1;305:36-48.
44. Qu Y, Wu J, Chen D, Zhao F, Liu J, Yang C, et al. MiR-139-5p inhibits HGTD-P and regulates neuronal apoptosis induced by hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Neurobiol Dis*. 2014 Mar;63:184-93.
45. Somel M, Liu X, Tang L, Yan Z, Hu H, Guo S, et al. MicroRNA-driven developmental remodeling in the brain distinguishes humans from other primates. *PLoS Biol*. 2011 Dec;9(12):e1001214.
46. White RE, Giffard RG. MicroRNA-320 induces neurite outgrowth by targeting ARPP-19. *Neuroreport*. 2012 Jul 11;23(10):590-5.
47. Sanchez Freire V, Burkhard FC, Kessler TM, Kuhn A, Draeger A, Monastyrskaya K. MicroRNAs may mediate the down-regulation of neurokinin-1 receptor in chronic bladder pain syndrome. *Am J Pathol*. 2010 Jan;176(1):288-303.
48. Orlova IA, Alexander GM, Qureshi RA, Sacan A, Graziano A, Barrett JE, et al. MicroRNA modulation in complex regional pain syndrome. *J Transl Med*. 2011 Nov 10;9:195,5876-9-195.