



SAPIENZA UNIVERSITA' DI ROMA
Facoltà di Medicina e Odontoiatria

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN:
TECNOLOGIE BIOMEDICHE INNOVATIVE IN MEDICINA CLINICA
XXXIII CICLO

Dipartimento di Medicina Traslazionale e di Precisione

**Individuazione di biomarcatori specifici di cachessia
neoplastica e di cachessia associata a scompenso
cardiaco: valutazione comparativa di miRNA, GDF15 e
FGF21**

Tutor:

Prof. Maurizio Muscaritoli

Candidata:

Dott.ssa Roberta Belli

Coordinatore:

Prof. Marcello Arca

A Renato

INDICE:

1	INTRODUZIONE	5
1.1	LA CACHESSIA	5
1.1.1	<i>La Cachessia Neoplastica</i>	6
1.1.2	<i>La Cachessia Cardiaca</i>	10
1.2	IL TESSUTO MUSCOLARE SCHELETRICO	12
1.3	PATHWAYS DI “MUSCLE WASTING” DURANTE LA CACHESSIA	13
1.3.1	<i>Pathways coinvolti nella crescita muscolare</i>	14
1.3.2	<i>Pathways coinvolti nell’atrofia muscolare</i>	15
1.4	LA BIOPSIA LIQUIDA NEL CANCRO	17
1.5	LA BIOPSIA LIQUIDA COME POTENZIALE FONTE DI BIOMARCATORI DI “MUSCLE WASTING” IN CORSO DI CACHESSIA	18
1.5.1	<i>Il Growth and Differentiation Factor 15 (GDF15) e le citochine pro-infiammatorie</i>	19
1.5.2	<i>Il Fibroblast Growth Factor 21 e gli Ormoni coinvolti nel “food intake”</i>	22
1.5.3	<i>Altri fattori circolanti</i>	23
1.6	I miRNA	24
1.6.1	<i>La Biogenesi dei miRNA</i>	24
1.6.2	<i>I miRNA circolanti</i>	27
1.6.3	<i>miRNA coinvolti nell’omeostasi del tessuto muscolare scheletrico</i>	31
1.7	I miRNA COINVOLTI NEI PATHWAYS DI “MUSCLE WASTING”	33
1.7.1	<i>myomiRNA coinvolti nella via di segnalazione IGF1/Akt/mTOR</i>	33
1.7.2	<i>myomiRNA coinvolti nella via di segnalazione Miostatina/Smad</i>	35
1.7.3	<i>Altri miRNA coinvolti nei pathways di “muscle wasting”</i>	35
2	RATIONALE DEL PROGETTO DI RICERCA	38
3	MATERIALI E METODI	39
3.1	CARATTERISTICHE CLINICHE DEI PAZIENTI	40
3.2	DIAGNOSI DI CACHESSIA, SARCOPENIA E STUDIO DELLA COMPOSIZIONE CORPOREA	41
3.3	VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI ANORESSIA IN PAZIENTI ONCOLOGICI E CON SCOMPENSO CARDIACO	43
3.4	RACCOLTA, PREPARAZIONE ED ANALISI PER I CAMPIONI DI PAZIENTI ONCOLOGICI E DEL RELATIVO GRUPPO DI CONTROLLO	43
3.5	RACCOLTA, PREPARAZIONE E ANALISI DEI CAMPIONI DI PAZIENTI CON SCOMPENSO CARDIACO E DEL RELATIVO GRUPPO DI CONTROLLO	47
3.6	ANALISI STATISTICA	49
4	RISULTATI	50

4.1	CARATTERISTICHE GENERALI DEI PARTECIPANTI ALLO STUDIO.....	50
4.2	TESSUTO MUSCOLARE SCHELETRICO DEI PAZIENTI ONCOLOGICI E DEL RELATIVO GRUPPO DI CONTROLLO.....	58
4.3	PLASMA DEI PAZIENTI ONCOLOGICI E DEL RELATIVO GRUPPO DI CONTROLLO	62
4.4	PLASMA DEI PAZIENTI CON SCOMPENSO CARDIACO E RELATIVO GRUPPO DI CONTROLLO.....	67
4.5	LIVELLI SIERICI DI CITOCHINE GDF15 E FGF21	71
4.6	MODULAZIONE DI miRNA E CITOCHINE IN FUNZIONE DEL GENERE	75
4.7	CORRELAZIONI TRA PARAMETRI CLINICI, CITOCHINE E miRNA	79
5	DISCUSSIONE.....	83
6	CONCLUSIONI.....	95
	APPENDICE 1.....	97
7	BIBLIOGRAFIA.....	100

Abstract

Scopo del progetto: L'obiettivo di questo progetto è identificare micro-RNA (miRNA) e citochine associati alla cachessia neoplastica e cardiaca valutando quali sono comuni alle 2 forme di cachessia e quali, invece, sono specifici di ogni singola forma.

Materiali e metodi: Sono stati arruolati 25 pazienti neoplastici (CP) e 15 controlli, nonché 27 pazienti con scompenso cardiaco (HF) e 17 relativi controlli sani. Per i pazienti neoplastici e con scompenso cardiaco è stato definito lo stato di cachessia e sono stati valutati i livelli sierici di GDF15 e FGF21. L'RNA (muscolare e plasmatico) dei pazienti CP e dei controlli è stato sottoposto al sequenziamento del miRnome (NGS). I livelli dei miRNA circolanti risultati modulati mediante NGS e potenzialmente coinvolti nei pathways di "muscle wasting" (miR15b-3p, miR21-5p, miR29a-3p, miR29b-3p, miR133a-3p, miR206, miR486-5p, miR203a-3p) sono stati analizzati tramite RT-PCR in tutti i partecipanti.

Risultati: I livelli di GDF15 sono più elevati nei pazienti CP e HF rispetto ai controlli ($p < 0.02$). FGF21 risulta più elevato solo nei pazienti con cachessia, sia neoplastica che cardiaca ($p = 0.017$ e $p = 0.046$). I livelli di miR15b-3p sono ridotti nel tessuto muscolare e nel plasma dei pazienti sia CP che HF ($p < 0.02$). Nei pazienti oncologici non cachettici i livelli plasmatici di miR21-5p e miR133a-3p sono più elevati rispetto ai controlli ($p < 0.02$). Inoltre, nei pazienti maschi i livelli plasmatici di miR133a-3p e miR206 sono aumentati sia rispetto al totale dei controlli sia rispetto alle pazienti femmine ($p < 0.05$). Infine, i pazienti HF cachettici mostrano una riduzione dei livelli plasmatici di miR29b-3p ed un aumento di miR486-5p ($p < 0.05$) e nelle pazienti femmine HF il miR486-5p aumenta rispetto ai controlli femmine ($p = 0.027$).

Conclusioni: Il GDF15 aumenta sia nei pazienti oncologici che con scompenso cardiaco. FGF21 aumenta nei pazienti oncologici e con cachessia neoplastica e da scompenso cardiaco. Il miRNA15b-3p risulta ridotto e mostra una correlazione negativa con il GDF15 in entrambe le coorti di partecipanti. I pazienti CP non cachettici mostrano aumento dei miRNA associati al muscolo che suggeriscono l'attivazione di meccanismi atrofici probabilmente durante la pre-cachessia. Nei pazienti HF con cachessia il profilo di espressione di alcuni miRNA risulta alterato in maniera peculiare rispetto alla cachessia neoplastica. L'alterazione dei miRNA in funzione del genere merita ulteriore approfondimento sia nei soggetti sani che nei malati, oncologici e cardiologici.

Abbreviazioni

AGO: Argonauta

AGO2: Argonauta 2

Akt: anche detta Protein Kinase B (PKB)

AP: Area Postrema

BIA: Body Impedence Assessment

BMI: Body Mass Index

BNIP3: BCL2-Interacting Protein 3

CAF: C-terminal Agrin Fragment

cfNAs: cell free Nucleic Acids

CKD: Chronic Kidney Disease

CNVs: Copy Number Variants

CRP: C Reactive Protein (Proteina C Reattiva)

CTCs: Circulating Tumor Cells

ECM: Extra Cellular Matrix

eGFR: estimated Glomerular Filtration Rate

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

emPCR: emulsion Polimerase Chain Reaction

ERK: Extracellular signal PI3K-Regulated Kinase

ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport

ESPEN: European Society for Clinical Nutrition and Metabolism

EVs: Extra-cellular Vescicles

FAACT: Functional Assessment of Anorexia/Cachexia Therapy

FFMI: Fat-Free Mass Index

FGF21: Fibroblast Growth Factor 21

FOS: FBJ murine osteosarcoma viral oncogene

FoxO: Forkhead box O

GDF8: Growth and Differentiation Factor 8

GDF15: Growth and Differentiation Factor-15 (anche noto come MIC-1, Macrophage Inhibitory Cytokine-1)

GFRAL: glial-derived neurotrophic factor (GDNF) receptor alpha-like

GLUT4: GLUcose Transporter Type 4

Hb: Hemoglobin

HDL: High Density Lipoprotein

HF: Heart Failure

HFpEF: Heart Failure preserved Ejection Fraction

HFrEF: Heart Failure reduced Ejection Fraction

IGF1: Insuline-like Growth Factor 1

IGF1R: Insuline-like Growth Factor 1 Receptor

IL-1 β : Interleukine-1 beta

IL-6: Interleukine-6

INF- γ : Interferon-gamma

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

LC3: Microtubule-associated protein 1A/1B-light Chain

LDL: Low Density Lipoprotein

lncRNA: long non-coding RNA

LVM: Left Ventricular Mass

LVMI: Left Ventricular Mass Index

L3: terza vertebra lombare

L3-SMI: third lumbar vertebra Skeletal Muscle Index

Mabs: Mesoangioblasts

MAFbx: Muscle Atrophy Fbox, anche detta Atrogin1

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

Mef2: Myocyte enhancer factor 2

miRNA: microRNA

mRNA: messenger RNA

mTOR: mammalian target of rapamycin

MURF1: Muscle Ring Finger 1

MVB: Multivesicular Body

MyHC: Myosin Heavy Chain

Myf5: Myogenic factor

MyoD: Myoblast Determination protein

NCI: U.S. National Cancer Institute

NF-kB: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells

NGS: Next Generation Sequencing

NPY: neuropeptide Y

NTS: Nucleo del Tratto Solitario
NYHA: New York Heart Association
Pasha/ DGCR8: Di George syndrome Chromosomal Region 8
Pax7: Paired box 7
PCR: Polimerase Chain Reaction
PIP2: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP3: Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
Pomc: pro-opiomelanocortin
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog
P3NP: N-terminal Peptide of Procollagen type III
PI3K: Phosphoinositide 3-kinases
SBS: Sequencing By Synthesis
SC: Satellite Cells
SIRT4: Sirtuina 4
Smad2: small mother against decapentaplegic 2
Smad3: small mother against decapentaplegic 3
SMI: Skeletal Muscle Index
SNIPS: Single Nucleotide Polymorphisms
SR-BI: Scavenger Receptor class B type I
Srf2: Serum response factor
TC multistrato: Tomografia Computerizzata multistrato
TGF- β : Transforming Growth Factor-beta
TLR7 e TLR8: Toll-like Receptor 7 e Toll-like Receptor 8
TK2: Tymidine Kinase 2
TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha
UTR: Untranslated Region
WT: Wild-Type
YY1: Yin-Yang 1

1 INTRODUZIONE

1.1 LA CACHESSIA

La cachessia è una sindrome multifattoriale, associata a patologie croniche quali il cancro, lo scompenso cardiaco, la broncopneumopatia cronica ostruttiva, la malattia renale cronica e la sindrome da immunodeficienza acquisita (Muscaritoli, 2010).

Nonostante la cachessia sia una condizione nota e descritta da tempo (Muscaritoli, 2010) essa resta ancora oggi un problema clinico largamente irrisolto (Fearon, 2011; von Haehling, 2017). La mancanza di una definizione univoca ed universalmente accettata della cachessia associata alle diverse patologie primarie rende tale sindrome difficile da diagnosticare in una fase precoce determinando errori clinicamente rilevanti: un ritardo nell'identificazione, una prevenzione inadeguata e spesso trattamenti inefficaci (Evans, 2008; Muscaritoli, 2010; Argilés and Muscaritoli, 2017). È pertanto necessario identificare molecole coinvolte nella patofisiologia della cachessia, che possano essere utilizzate come potenziali biomarcatori e/ o bersagli terapeutici che rendano possibile l'intervento tempestivo e la possibilità di migliorare la qualità di vita del paziente.

La caratteristica comune alle diverse forme di cachessia è la perdita involontaria di peso, dovuta alla riduzione di massa magra con o senza riduzione di massa grassa (Evans, 2008) La riduzione della massa muscolare, è legata all'instaurarsi di uno squilibrio tra i meccanismi catabolici e anabolici, sostenuto principalmente da un aumento della degradazione proteica intramuscolare, cui concomitano alterazioni sistemiche a carico del metabolismo intermedio di carboidrati, grassi e proteine (Costelli, 2003, Evans, 2008).

Anche se la perdita di massa muscolare è la caratteristica clinica più importante della cachessia, ci sono diverse condizioni (fisiologiche e patologiche) caratterizzate dalla riduzione della massa muscolare come l'invecchiamento, il digiuno, la malnutrizione, una prolungata inattività fisica, ma anche spedizioni nello spazio (Biolo, 2003; Barendregt, 2004; Biolo, 2005; Thomas, 2007). Va specificato che, tale riduzione della massa, associata a riduzione della forza muscolare è una condizione definita "sarcopenia" che viene riscontrata prevalentemente nelle persone anziane (sarcopenia primaria), a causa dell'invecchiamento fisiologico del tessuto muscolare scheletrico. La sarcopenia però non è specifica degli anziani, ma può essere presente in alcune condizioni patologiche (sarcopenia secondaria), tra cui proprio la cachessia (Muscaritoli, 2010).

Altre caratteristiche tipiche della cachessia sono l'aumento dello stato infiammatorio (quasi sempre presente in corso di malattie croniche), alterazioni metaboliche e riduzione dell'appetito (anoressia) con conseguente riduzione nella assunzione di nutrienti (ipofagia) (Evans, 2008; Muscarioli, 2010; Argilés and Muscaritoli, 2017). Questa condizione, spesso definita anoressia secondaria per distinguerla dalla forma primaria (anoressia psichica) è ritenuta una conseguenza della risposta infiammatoria che, a livello ipotalamico, induce una disregolazione dei segnali neuronali che regolano il senso di fame e di sazietà e contribuisce in maniera significativa ad indurre la perdita di peso e le modificazioni della composizione corporea tipiche di tutte le forme di cachessia (Muscaritoli, 2010). Sebbene il ruolo dell'infiammazione sistemica nella patogenesi della cachessia sia ormai largamente riconosciuto (Baracos, 2018), recentemente è stato ipotizzato il ruolo di altri mediatori circolanti. Tra questi, i microRNA (miRNA), potrebbero essere coinvolti nella patogenesi della cachessia delle malattie croniche (Carthew, 2009), con rapporti di causa-effetto con l'infiammazione sistemica ancora largamente sconosciuti.

1.1.1 La Cachessia Neoplastica

La cachessia neoplastica insorge in circa metà dei pazienti con cancro ed è la causa diretta di morte nel 20% di questi (Aversa, 2017; Baracos, 2018; Molino, 2018; Calore, 2018). Sulla base delle manifestazioni cliniche, tale sindrome può essere divisa in tre stadi: pre-cachessia, cachessia conclamata e cachessia refrattaria (Fearon, 2011) (Figura 1).

Durante la pre-cachessia, insorgono alterazioni metaboliche, alterazione dei parametri ematochimici e anoressia. Nonostante queste alterazioni si verificano generalmente prima di una consistente perdita di peso involontaria, nei pazienti pre-cachettici è frequente una riduzione del peso < 5%. Durante la cachessia conclamata, la principale caratteristica clinica rilevata, è la riduzione involontaria del peso corporeo > 5% nei 6 mesi precedenti la diagnosi, rispetto al peso corporeo abituale. Inoltre, i pazienti con cachessia conclamata possono mostrare una riduzione del peso > 2% associata ad un Body Mass Index (BMI) < 20 kg/m²; oppure la presenza di sarcopenia definita sulla base della valutazione dello Skeletal Muscle Index (SMI), associata ad una perdita di peso > 2% (Fearon, 2011). A volte durante la cachessia può essere riscontrato un aumento di ritenzione idrica, come conseguenza di una severa ipoalbuminemia e questo può portare ad un aumento di peso del paziente, nascondendo la severa riduzione della massa corporea (Muscaritoli, 2010). La cachessia refrattaria è lo stadio più tardivo e severo di questa sindrome; a questo stadio l'aspettativa di vita dei pazienti non supera i 3 mesi e

generalmente gli interventi terapeutici mirano ad alleviare i sintomi e ridurre lo stress, sia per il paziente che per la sua famiglia, piuttosto che curare la patologia (Hopkinson, 2006; Muscaritoli, 2010; Fearon, 2011).

I pazienti non attraversano tutti e tre gli stadi della cachessia; la progressione di tale sindrome dipende da molti fattori come il tipo e lo stadio del tumore, la presenza o meno di infiammazione sistemica, la resistenza/tossicità ai farmaci chemioterapici, la riduzione dell'appetito e/o dell'introito calorico (Fearon, 2011; Muscaritoli, 2011). L'assunzione e l'assorbimento dei nutrienti sono influenzati dalla progressione della cachessia, per questo spesso si osserva l'insorgenza della malnutrizione associata alla malattia (Muscaritoli, 2019).

È importante sottolineare che l'effetto del trattamento terapeutico non diminuisce soltanto durante lo stadio della cachessia refrattaria, ma anche durante la cachessia conclamata. I farmaci chemioterapici sono spesso tossici per i pazienti cachettici e questo rende necessario la riduzione della dose o l'interruzione del trattamento farmacologico. In questo modo l'efficacia della terapia contro la patologia oncologica viene drasticamente ridotta (Fearon, 2011; Muscaritoli, 2019). In oncologia la mancanza o il ritardo nell'identificazione/diagnosi della cachessia comporta la scelta di un trattamento terapeutico inefficace, spesso limitato ad una consulenza alimentare, mirata a rallentare o evitare la riduzione del peso corporeo (Muscaritoli, 2010; Muscaritoli, 2016). Proprio per questo, l'obiettivo futuro dovrebbe essere quello di riconoscere precocemente l'insorgenza della cachessia, potendo così intervenire tempestivamente nella perdita involontaria di peso e nella riduzione della massa muscolare, contribuendo a migliorare l'efficacia del trattamento terapeutico per i pazienti con cancro.

Negli ultimi anni sta diventando sempre più evidente che la cachessia non insorge esclusivamente come conseguenza della presenza di una neoplasia (o di una patologia cronica), ma tra le cause che possono portare alle alterazioni metaboliche riscontrate in questa sindrome, sembrerebbero esserci anche alcuni chemioterapici e più in generale trattamenti anticancro (Caille, 2017; da Rocha, 2019; Tahaghoghi-Hajghorbani, 2019). I trattamenti chemioterapici possono avere effetti collaterali come: percezione alterata degli odori e del gusto, avversione per il cibo, nausea, vomito, costipazione, diarrea nonché sazietà precoce ed insorgenza di anoressia (Caillet, 2017; Molino, 2020). Questi effetti hanno un impatto negativo sullo stato nutrizionale del paziente oncologico che spesso incorre nella malnutrizione (Caillet, 2017; Muscaritoli, 2017). Va sottolineato che i dati presenti in letteratura dimostrano l'esistenza di una correlazione tra l'anoressia indotta dalla chemioterapia e l'aumento dei livelli circolanti di GDF15 (Borner, 2020). Sembrerebbe infatti che il cisplatino, presente nei farmaci

chemioterapici, induca l'aumento di livelli circolanti di GDF15 sia nell'uomo che in modelli murini. L'aumento di tale citochina altera la segnalazione neuronale a livello ipotalamico (Area Postrema e Nucleo del Tratto Solitario) con conseguente insorgenza di nausea, avversione al cibo ed anoressia, che restano dei problemi clinici rilevanti nel trattamento dei pazienti neoplastici (Borner, 2020; Molfino, 2020). Oltre ad alterare lo stato nutrizionale, la chemioterapia può avere anche un effetto diretto sulla muscolatura scheletrica, contribuendo al "muscle wasting" ed alla perdita di massa corporea (Caillet, 2017; da Rocha, 2019). La riduzione della massa muscolare è spesso associata alla tossicità alla chemioterapia ed a peggiori outcome clinici (da Rocha, 2019).

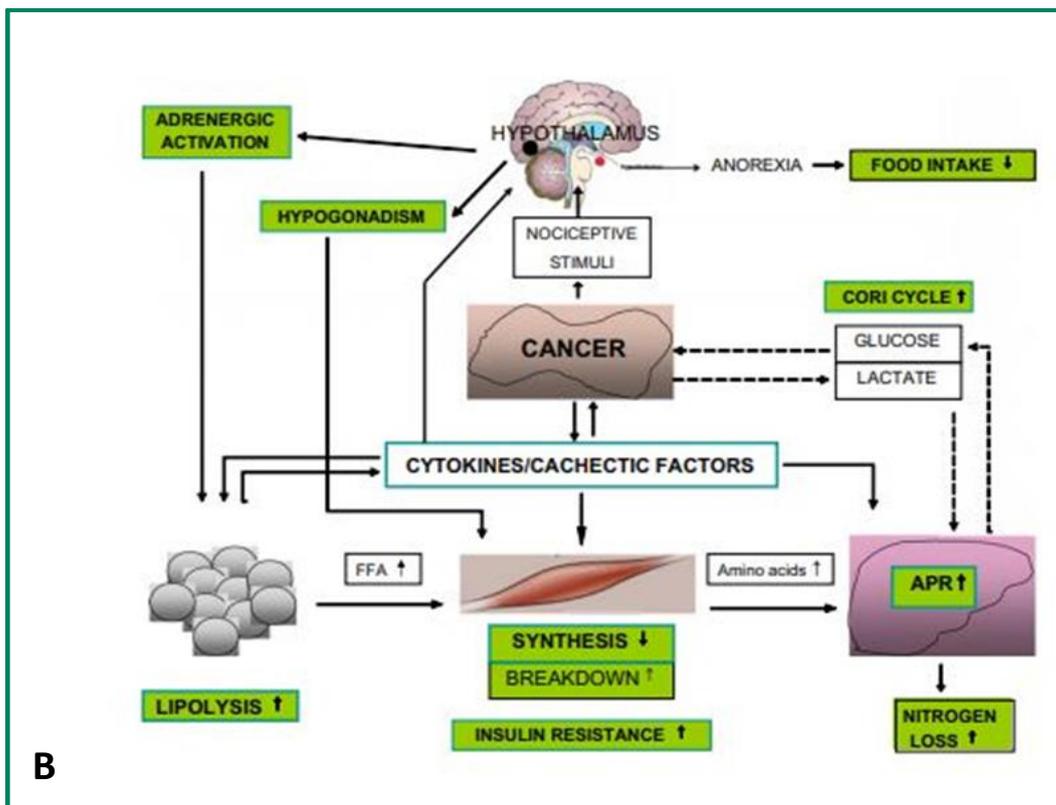
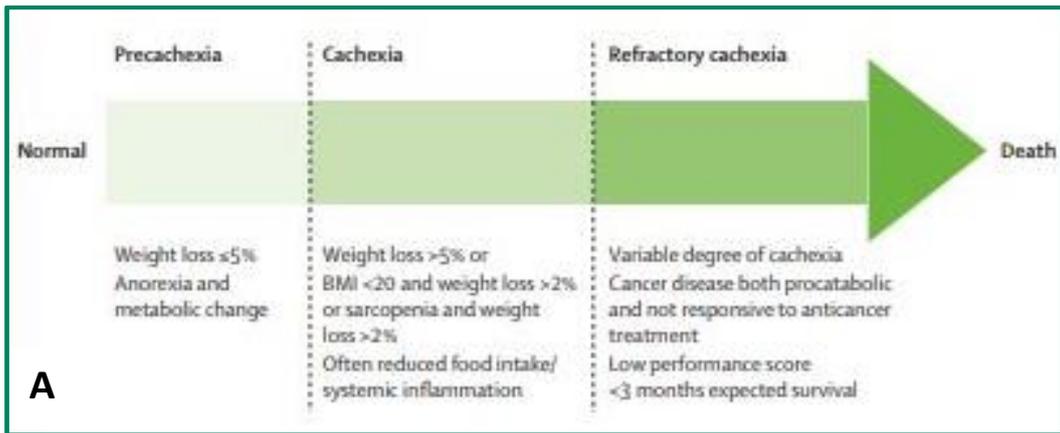


Figura 1. A) Rappresentazione schematica degli stadi della cachessia oncologica. I pazienti oncologici non attraversano necessariamente tutti e tre gli stadi della cachessia. (Fearon *et al.* 2011). B) Rappresentazione delle risposte pro-infiammatorie e neuroendocrine innescate dal tumore. Questo comporta: diminuzione del senso di fame; stimolo dei processi lipolitici; alterazione del metabolismo del tessuto muscolare scheletrico con conseguente “muscle wasting”; esporto di proteine sintetizzate nel fegato come risposta alla fase acuta di infiammazione (Sandri, 2007)

1.1.2 *La Cachessia Cardiaca*

La cachessia cardiaca insorge nel 10-15% dei pazienti affetti da scompenso cardiaco (HF) (von Haehling, 2017) e può arrivare ad una prevalenza del 39%, nei pazienti con uno stadio avanzato della patologia (e.g. classi NYHA III e IV) (Valentova M 2020). È la causa diretta di morte per più del 50% dei pazienti HF nei successivi 18 mesi di follow-up (von Haehling, 2017) (Figura 2)

La cachessia cardiaca viene diagnosticata in pazienti con HF cronico, che presentino una riduzione involontaria del peso > 6%, in un periodo compreso tra i 6 e 12 mesi precedenti la diagnosi (Anker, 2004). A causa della mancanza di una definizione univoca di cachessia, il cut-off di riduzione del peso è stato a lungo oggetto di dibattito (Anker, 2004; Valentova, 2020). È importante sottolineare che per i pazienti con scompenso cardiaco, la riduzione involontaria del peso deve essere considerata in assenza di edema, questo perché molto spesso tali pazienti presentano ritenzione di liquidi e la sottoposizione a trattamenti diuretici può determinare una riduzione del peso, che potrebbe essere erroneamente interpretata nella diagnosi di cachessia (Anker, 2004). Generalmente la riduzione del peso nei pazienti con cachessia cardiaca è un processo lento, nel caso in cui tale riduzione si sviluppi rapidamente deve essere valutata la concomitante presenza di edema o neoplasie (Valentova, 2020). Nonostante i pazienti con scompenso cardiaco presentino una riduzione del peso che si manifesta più lentamente rispetto a quanto accade per i pazienti oncologici, in entrambe le tipologie di pazienti una consistente perdita di peso involontaria è associata a peggiori outcome clinici (Anker, 2003; Doehner, 2020; Valentova, 2020). Per la diagnosi di cachessia cardiaca si devono tenere in considerazione anche le alterazioni di alcuni parametri ematochimici, nonostante i loro valori di cut-off siano ancora oggetto di dibattito, in particolare l'aumento dei livelli della Proteina C Reattiva (C Reactive Protein, CRP > 5mg/l), la riduzione dell'albumina sierica (< 3.2 g/dl) e l'anemia (Hb < 12 g/dl) (Valentova, 2020).

Come nel caso della cachessia oncologica, anche la cachessia cardiaca è caratterizzata da uno squilibrio dei processi catabolici ed anabolici, in parte determinato da una condizione di ipossia cellulare (Anker, 2004). I meccanismi di transizione dallo scompenso cardiaco alla cachessia cardiaca non sono completamente noti, ma sembrerebbero essere legati ad una carenza di nutrienti per malassorbimento e/o perdita attraverso l'apparato digerente e urinario (Anker, 2004). Lo squilibrio metabolico determina anche per i pazienti con cachessia cardiaca, la riduzione della massa muscolare, che ne influenza negativamente la prognosi e la qualità di vita (von Haehling, 2017; Valentova, 2020). È importante sottolineare che la riduzione della

massa muscolare inizia già durante uno stato precoce dello scompenso cardiaco cronico, prima che una consistente riduzione del peso permetta la diagnosi di cachessia (Valentova, 2020). Due dei principali segni clinici per la diagnosi di HF cronico sono “fatigue” e debolezza muscolare, dovuti proprio alla riduzione della massa magra (Anker, 2004). Tali sintomi sono riscontrati anche nei pazienti con cachessia cardiaca, a cui si aggiungono però riduzione della massa grassa e della densità minerale ossea (Anker, 2004; Valentova, 2020). Inoltre, pazienti con cachessia cardiaca mostrano una riduzione della sopravvivenza a lungo termine, legata al deterioramento della massa miocardica (Anker, 2004; von Haehling, 2017; Valentova, 2020)

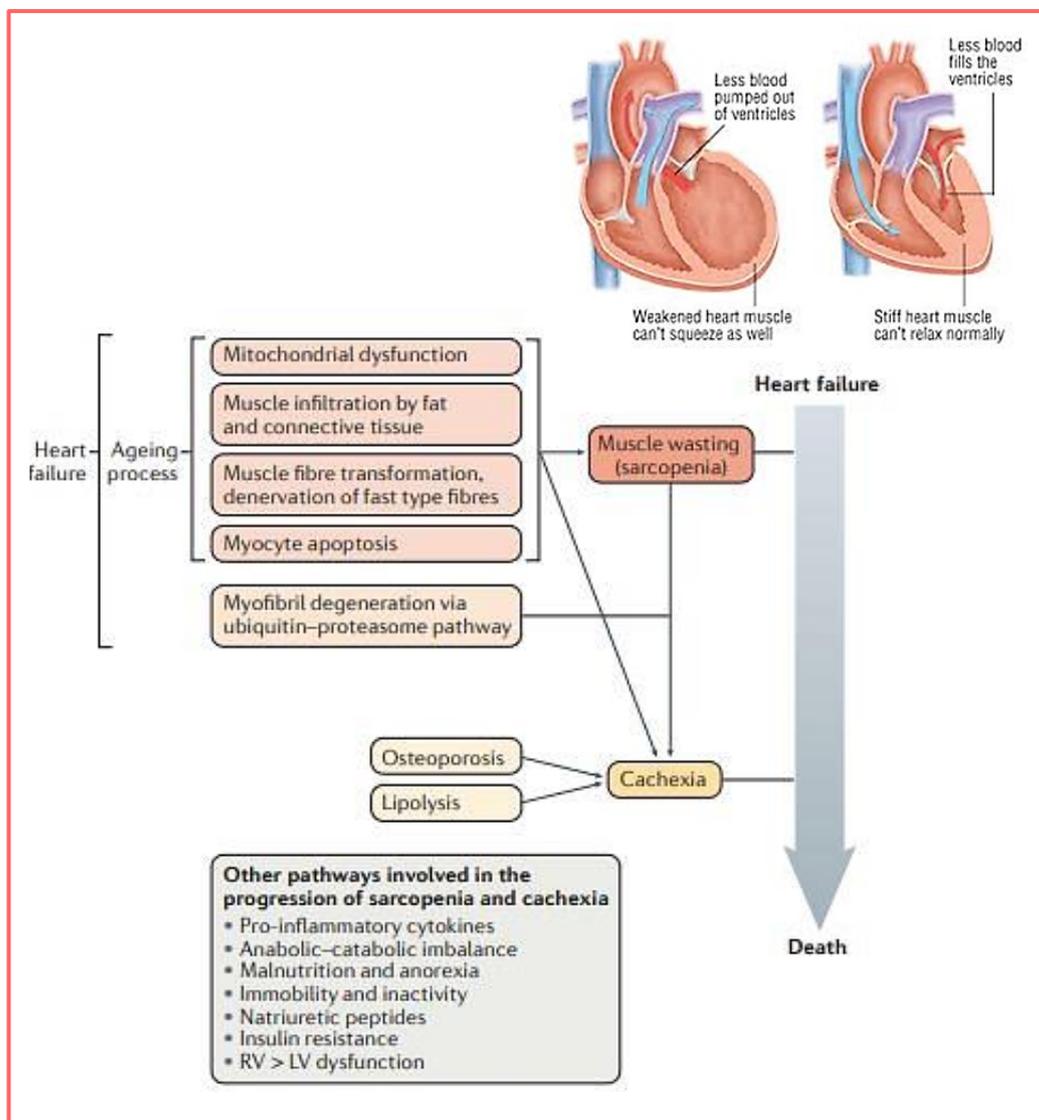


Figura 2. Alterazioni metaboliche in corso di cachessia da scompenso cardiaco (von Haehling *et al.* 2017).

1.2 IL TESSUTO MUSCOLARE SCHELETRICO

Nell'uomo, come in tutti i vertebrati, sono presenti tre tipologie di tessuto muscolare: il tessuto muscolare scheletrico striato, responsabile dei movimenti volontari e della locomozione che costituisce il 30-40% della massa corporea; il tessuto muscolare cardiaco, che costituisce il cuore ed ha attività indipendente dalla volontà; il tessuto muscolare liscio, che riveste le pareti interne dei vasi e dei visceri e ne garantisce la motilità, anch'essa involontaria (Monesi, 2002). Il tessuto muscolare scheletrico è costituito da elementi contrattili di forma cilindrica denominati miofibre, sincizi polinucleati che si originano durante lo sviluppo embrionale e fetale dalla fusione dei mioblasti, cellule mononucleate. Le fibre muscolari sono associate in fasci tenuti insieme dal tessuto connettivo. Ogni fibra è avvolta dal sarcolemma e irrorata da numerosi vasi sanguigni e ampiamente innervata. Caratteristica del tessuto muscolare scheletrico è la disposizione periferica dei nuclei cellulari, poiché gran parte del sarcoplasma è occupato dalle miofibrille, costituite dalle unità strutturali di tale tessuto: i sarcomeri. Le proteine localizzate in prossimità del sarcolemma formano un reticolo molecolare trasversale che ancora l'apparato contrattile del sarcomero al sarcolemma ed alla matrice extracellulare (ECM), distribuendo correttamente la forza e garantendo protezione dai danni indotti dalla contrazione muscolare (Alberts, 2005). Il tessuto muscolare scheletrico produce calore per mantenere costante la temperatura degli organi interni, immagazzina metaboliti come aminoacidi e carboidrati ed utilizza una grande quantità di ossigeno e di substrati durante la contrazione muscolare. Tutto ciò conferisce al tessuto muscolare una funzione chiave nella regolazione del metabolismo e del mantenimento dell'omeostasi corporea (Frontera, 2015).

Il tessuto muscolare scheletrico è relativamente stabile ed ha uno scarso turn-over cellulare. Il processo rigenerativo del tessuto muscolare scheletrico avviene grazie a cellule di tipo staminale. I più importanti progenitori miogenici sono le cellule satelliti (SC): individuate già nel 1961, sono associate ad ogni fibra e localizzate tra la lamina basale ed il sarcolemma, in una regione definita "nicchia" (Mauro, 1961; Tedesco, 2010). In condizioni fisiologiche le SC sono in uno stato quiescente, caratterizzate dall'espressione di elevati livelli di Pax7, fattore di trascrizione cruciale per lo sviluppo e la rigenerazione muscolare (Seale, 2000; Sambasivan, 2011). In seguito ad uno stimolo attivato dal danno tissutale, le SC vengono attivate (Forcina, 2019), aumentando la produzione dei fattori di trascrizione MyoD e Myf5 che stimolano il differenziamento cellulare (Yamamoto, 2018). Tale processo è asimmetrico: alcune cellule si differenzieranno in mioblasti, altre avranno le caratteristiche tipiche delle cellule staminali, mantenendo il pool di cellule quiescenti della "nicchia" (Tedesco, 2010).

Una popolazione di cellule staminali muscolari, di più recente scoperta e alternativa alle SC sono i Mesoangioblasti (Mabs) (Cossu, 2003). Tali cellule possiedono caratteristiche staminali e miogeniche e sono progenitori cellulari multipotenti, a differenza delle SC (unipotenti). Proprio questa caratteristica le rende promettenti nella terapia clinica per il trattamento di patologie muscolari (Cossu, 2003).

Va sottolineato che la popolazione di cellule staminali muscolari (sia le SC che i Mabs) si riduce con l'aumentare dell'età (Charge, 2004; Rotini, 2017). La capacità rigenerativa del tessuto muscolare è fisiologicamente ridotta negli anziani (Conboy, 2005), ma anche in alcune condizioni patologiche come nel caso della cachessia. In tale sindrome, la ridotta capacità rigenerativa del tessuto muscolare sembrerebbe legata ad una incapacità per le SC di formare nuove miofibre, probabilmente dovuta ad uno squilibrio dell'omeostasi cellulare, o come conseguenza di una disfunzione delle SC (He 2013; Inaba 2018).

1.3 PATHWAYS DI “MUSCLE WASTING” DURANTE LA CACHESSIA

Come riportato precedentemente, la perdita di massa muscolare durante la cachessia è dovuta ad uno squilibrio tra il tasso di sintesi e degradazione proteica (Muscaritoli, 2010; Aversa, 2017). Nel muscolo dei pazienti cachettici, si osservano anomalie del metabolismo proteico e degli aminoacidi, che contribuiscono all'instaurarsi di un bilancio negativo di azoto all'interno delle miofibre (Argilés, 2014). Nel caso della cachessia oncologica, è stato recentemente dimostrato che non è solo la presenza del tumore a determinare il “muscle wasting” riscontrato durante la cachessia, ma anche i trattamenti chemioterapici contribuiscono alle alterazioni metaboliche del tessuto muscolare scheletrico (Ballarò, 2019). Esperimenti *in vitro* ed *in vivo*, hanno dimostrato che i principali pathways molecolari, modulati durante la cachessia, sono quelli che regolano da un lato la crescita e, dall'altro, l'atrofia muscolare (Soares, 2014; Margolis, 2017; Marinho, 2018). (Figura 3)

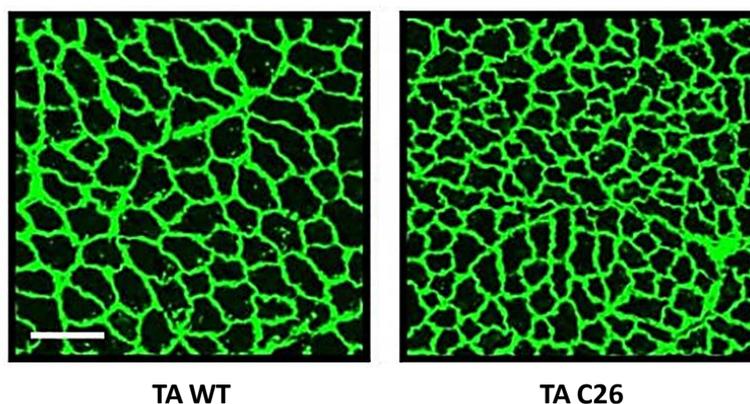


Figura 3. Colorazione in immunofluorescenza di sezioni di tessuto muscolare scheletrico (Tibiale Anteriore) di topi wild type (WT) e modello di cachessia oncologica, C26 Tumor-bearing mice (C26) per il rilevamento di laminina (verde). Scale bar: 100 μ m. Le sezioni mostrano una riduzione della dimensione delle miofibre nel modello murino di cachessia (C26) (Molinari *et al.* 2017).

1.3.1 *Pathways coinvolti nella crescita muscolare*

Nel tessuto muscolare scheletrico, la crescita delle miofibre è regolata da due fattori: il fattore di crescita insulino-simile (Insuline-like Growth Factor 1, IGF1) e la Miostatina. IGF1 interagisce con il proprio recettore, IGF1-R localizzato sulla membrana sarcoplasmatica e attraverso la PI3K (fosfoinositide 3-chinasi), che mediante la fosforilazione di PIP2 in PIP3 è in grado di attivare la via Akt/mTOR. La PI3K attiva inoltre la via MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal PI3K-regulated kinase), anch'essa responsabile della crescita delle miofibre (Schiaffino, 2013). I mediatori a valle della via IGF1/Akt/mTOR innescano la sintesi proteica e la biogenesi mitocondriale, quest'ultima promossa dal fattore Yin-Yang 1 (YY1). Un regolatore negativo della sintesi proteica è PTEN (Phosphatase and TENsin homolog), generalmente i livelli di espressione di tale proteina sono bassi nel tessuto muscolare. Tuttavia, un suo aumento determina l'inibizione della sintesi proteica, poiché PTEN inibisce la fosforilazione di PIP2 in PIP3 e di conseguenza blocca la via Akt/mTOR (Sandri, 2008; Schiaffino, 2013).

La via innescata dalla Miostatina, invece, è responsabile dell'inibizione della crescita miofibrillare (Schiaffino, 2013). La Miostatina (anche nota come Growth and Differentiation Factor 8, GDF8) è una citochina appartenente alla superfamiglia del TGF- β ed agisce come regolatore negativo della crescita muscolare attraverso l'attivazione dei fattori di trascrizione Smad2 e Smad3 (small mother against decapentaplegic2/3) (Fearon, 2012; Schiaffino, 2013; Manole, 2018).

1.3.2 *Pathways coinvolti nell'atrofia muscolare*

Per quanto riguarda la patogenesi dell'atrofia muscolare, essa si realizza attraverso l'azione di due meccanismi principali: l'attivazione del sistema ubiquitina-proteasoma e un sistema di autofagia mediato dai lisosomi (Schiaffino, 2013). Attraverso il sistema dell'ubiquitina-proteasoma, gli enzimi E3 ligasi, promuovono la ubiquitinazione delle proteine che necessitano di essere rimosse. Questo sistema di "etichettatura" permette di trasportare verso il proteasoma, solo le proteine che devono essere degradate. Le E3-ligasi muscolo specifiche sono: Atrogin1/MAFbx (muscle atrophy Fbox) e MURF1 (Muscle Ring Finger 1). Quando questi enzimi sono espressi in elevate concentrazioni, si riscontra l'aumento della degradazione proteica e l'atrofia delle miofibre. Infatti, numerose proteine sarcomeriche e fattori di trascrizione che regolano la proliferazione dei miociti (e.g. MyoD) sono bersagli molecolari di Atrogin1 e MURF1 (Sandri, 2008; Schiaffino, 2013). Durante la cachessia, le citochine pro-infiammatorie, specialmente il TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha), attivano la via NF-kB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) nel tessuto muscolare scheletrico (Fearon, 2012; Schiaffino, 2013). NF-kB attivo trasloca nel nucleo e promuove la trascrizione solo di MURF1 innescando la via di degradazione proteica. Un altro effetto del TNF- α è l'inibizione della via di segnalazione IGF1/Akt/mTOR (Fearon, 2012). Attraverso questi pathways l'infiammazione determinerebbe il "muscle wasting" riscontrato durante la cachessia (Schiaffino, 2013) (Figura 4 A)

Il secondo meccanismo responsabile della atrofia muscolare è l'autofagia, processo regolato da elementi della famiglia FoxO (Forkhead box O), che include tre isoforme: FoxO1, FoxO3 e FoxO4. Gli elementi FoxO sono resi inattivi nel citoplasma, dalla fosforilazione mediata da Akt quando presente in elevate concentrazioni. L'inibizione della via IGF1/Akt determina, pertanto, la defosforilazione degli elementi FoxO che, migrando nel nucleo, promuovono la trascrizione di Atrogin1 e MURF1. Oltre alle E3-ligasi muscolo specifiche, vengono trascritti altri geni che codificano per proteine associate ai meccanismi di autofagia, come LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light Chain) e BNIP3 (BCL2-Interacting Protein 3) (Schiaffino, 2013). Queste proteine vengono espresse generalmente in seguito a danno mitocondriale e promuovono il reclutamento di un autofagosoma in prossimità dei mitocondri danneggiati permettendone la rimozione (Schiaffino, 2013). (Figura 4 B).

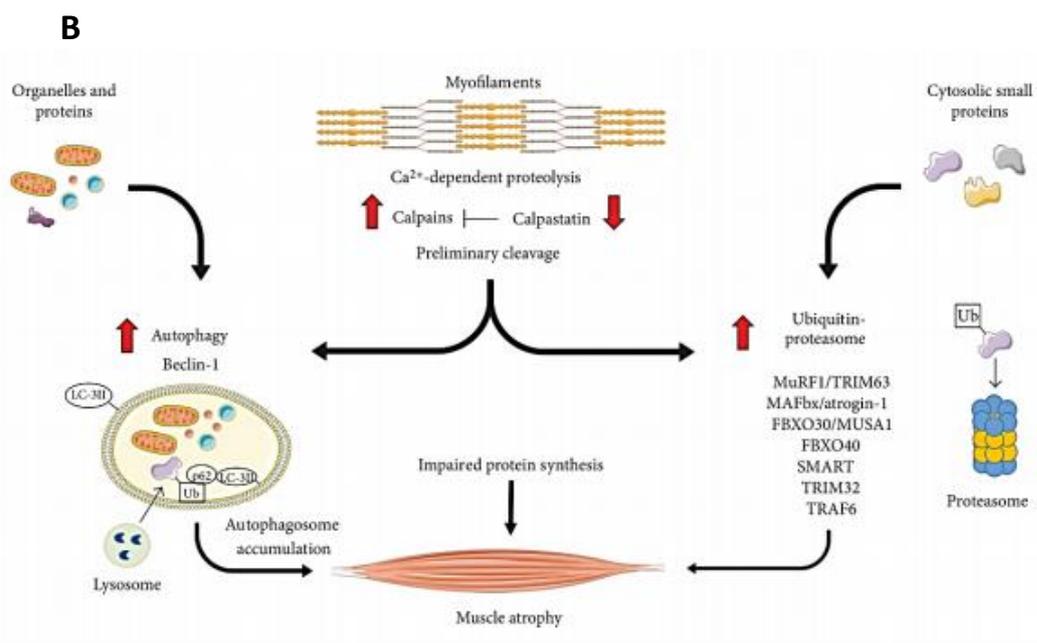
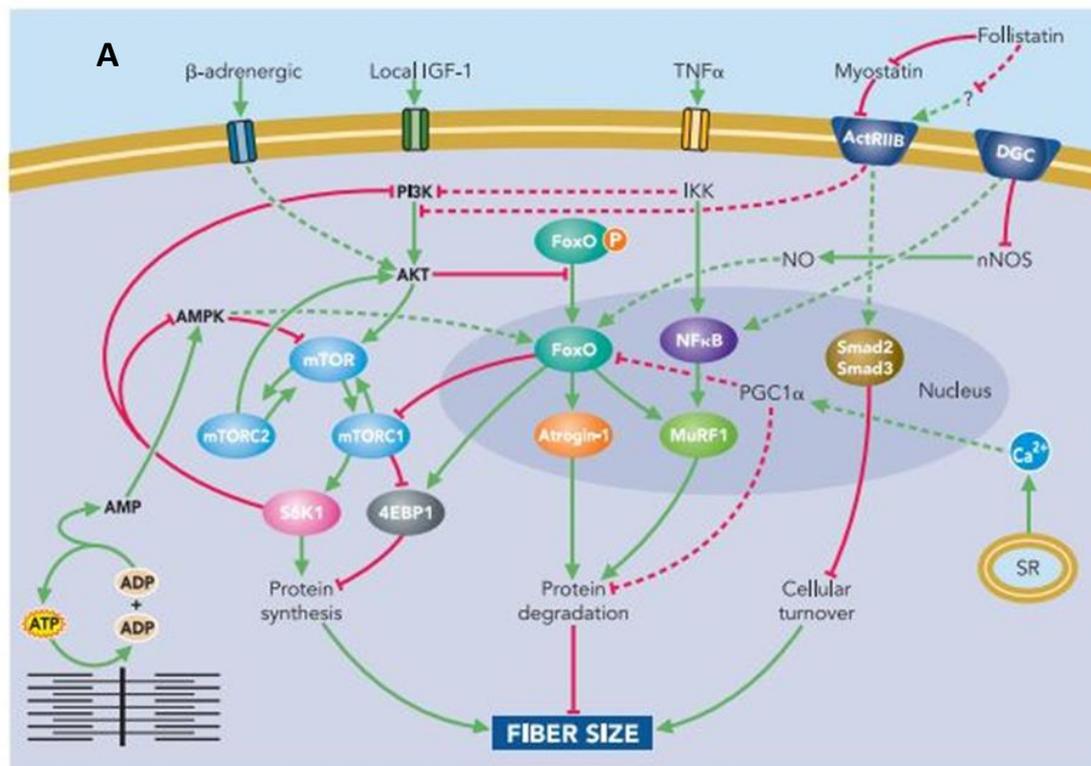


Figura 4. Pathways che determinano il muscle wasting durante la cachessia. A) Rappresentazione schematica dei principali meccanismi molecolari che regolano la crescita delle miofibre (Sandri, 2008). B) Illustrazione dei principali meccanismi che portano all'atrofia muscolare (Penna *et al.* 2018)

1.4 LA BIOPSIA LIQUIDA NEL CANCRO

La biopsia liquida è una tecnica che sta acquistando sempre maggiore interesse, soprattutto nel campo dell'oncologia, poiché utilizza i fluidi biologici come surrogati tissutali per ottenere informazioni sul tipo di tumore del paziente (Izzotti, 2016). Ad oggi, però, la biopsia tissutale rimane ancora la tecnica migliore per la diagnosi e la scelta del trattamento terapeutico per molti tipi di cancro (Domínguez-Vigil, 2017).

Inizialmente, nel campo dell'oncologia, la biopsia liquida è stata utilizzata per rilevare cellule tumorali circolanti (CTCs). Infatti, la prima definizione fornita dal "U.S National Cancer Institute (NCI)" identificava tale tecnica come "un test fatto su un campione di sangue per cercare cellule cancerose o porzioni del DNA derivanti dal tumore, che circolano all'interno del torrente sanguigno" (National Cancer Institute). Tuttavia, negli ultimi anni questa definizione è stata ampliata ed altri elementi circolanti sono stati identificati all'interno delle biopsie liquide (Alix-Panabieres, 2013) come: acidi nucleici (cfNAs), microvescicole ed esosomi (Qi, 2018). In particolare, in una biopsia liquida possiamo trovare elementi cellulari (CTCs), elementi subcellulari (vescicole extracellulari, EVs) ed elementi molecolari derivanti dal tumore (DNA, miRNA, lncRNA, mRNA, proteine) (Palmirotta, 2018; Ravegnini G 2019). Questi elementi danno informazioni sulle aberrazioni tumore-specifiche o le modulazioni a carico di proteine e/o RNA (Palmirotta, 2018).

Le analisi che permettono il rilevamento e l'isolamento di queste particelle circolanti nei campioni di sangue (Qi, 2018) sono comunemente eseguite, poiché fonte di informazioni sulla genomica e proteomica del cancro (Palmirotta, 2018). È però importante sottolineare che le CTCs, i cfNAs, le microvescicole e gli esosomi sono presenti anche in altri fluidi biologici come le urine, la saliva e il fluido cerebrospinale, quindi anche questi possono essere analizzati come biopsie liquide (Chen, 2008; Cogswell, 2008; Weber; 2010; Arroyo, 2011; Gallo, 2012; Zhou, 2012; da Silveira, 2012; Ravegnini, 2019).

Il crescente interesse della comunità scientifica verso le biopsie liquide dipende dalla possibilità di ottenere delle informazioni relative al cambiamento ed alla progressione tumorale, con una modalità poco invasiva, meno pericolosa e meno costosa rispetto alla biopsia tissutale (Ilié, M 2016; Izzotti, 2016; Malara, 2018; Haranguş, 2019; García-Olmo, 2020). Infatti, nonostante la biopsia tissutale fornisca informazioni dirette sul tipo di tumore, ha alcuni svantaggi (i.e. limitata accessibilità al tessuto tumorale, emorragie o infezioni) (Bedard, 2013; Ko, 2015; Rijavec, 2019). La biopsia liquida, ottenuta con un semplice prelievo ematico, è

invece in grado di superare molte di queste limitazioni (Jung, 2018) e potrebbe essere utilizzata come un rapido strumento per la diagnosi, il monitoraggio della progressione ed evoluzione tumorale, nonché per la valutazione della risposta al trattamento terapeutico (Malara, 2018) (Crowley, 2013; Diaz, 2014) (Tabella 1). Prima che la biopsia liquida possa essere incorporata nella pratica clinica, ci sono ancora dei limiti che devono essere superati, tra questi la bassa specificità e la bassa sensibilità che riflettono i cambiamenti che avvengono nei fluidi biologici e nel tumore stesso (Qi, 2018; Mathai, 2019).

Advantages	Disadvantages
<ul style="list-style-type: none"> • Helps in understanding the spatial and temporal heterogeneity of cancer [17]. • Requires only a small amount of blood (usually 6–10 mL of blood) [18]. • Minimally invasive [19]. • Early detection of cancer [20]. • Real time monitoring for treatment responses and resistance could be performed by repeated analysis [21]. • Shorter turnaround time for genotyping mutations [18]. • Aid precision oncology [22]. 	<ul style="list-style-type: none"> • Lack of standardization of the techniques [23]. • Sufficient clinical and technical validation is not yet attained, that is required for the routine clinical implementation [24]. • In some cancers (e.g., lung cancers), the diagnosis and subtyping cannot be done by liquid biopsy and can be established by only histology [25].

Tabella 1. Rappresentazione schematica dei vantaggi e degli svantaggi della biopsia liquida per la diagnosi di neoplasie (Mathai *et al.* 2019).

1.5 LA BIOPSIA LIQUIDA COME FONTE DI POTENZIALI INDICATORI DI “MUSCLE WASTING” IN CORSO DI CACHESSIA

Nonostante la biopsia liquida sia prevalentemente utilizzata nel campo dell'oncologia, tale tecnica potrebbe essere applicata per monitorare diverse patologie e/o condizioni patologiche, come la cachessia. Il tessuto muscolare scheletrico ed il tessuto adiposo sono gli organi più colpiti dalle alterazioni metaboliche che si riscontrano durante la cachessia. La biopsia liquida potrebbe essere un'alternativa alle biopsie di tessuto muscolare (e adiposo) per ottenere informazioni sui cambiamenti che intervengono in questi organi durante la progressione di tale sindrome. Per esempio, potrebbero essere ottenute informazioni relative allo stato dei processi di atrofia muscolare, senza dover eseguire invasive biopsie tissutali. Nei pazienti cachettici, la riduzione della massa muscolare è cruciale, poiché, in particolare nei pazienti con cachessia oncologica, influenza la sopravvivenza e la risposta al trattamento terapeutico. Perciò un biomarcatore ideale per la cachessia dovrebbe essere un marker dei

processi di “muscle wasting” piuttosto che della massa muscolare in sé (Loumaye, 2017). Inoltre, un indicatore prognostico della risposta terapeutica sarebbe fondamentale per il successo del trattamento (Martins, 2014; Loumaye, 2017). A causa della natura multifattoriale della cachessia, una molecola che soddisfi le caratteristiche di un biomarcatore ideale (i.e. di facile accesso, sensibile, riproducibile ed economico) non è stato ancora identificato (Martins, 2014; Molinari, 2016; Loumaye, 2017). Essere in grado di individuare mediatori molecolari comuni o meno alla cachessia associata alle diverse patologie primarie, potrebbe permettere di riconoscere precocemente l’insorgenza di tale sindrome ed intervenire con terapie mirate.

Negli ultimi anni, è stato evidenziato il ruolo di alcune molecole nella patofisiologia della cachessia, ma l’esatto ruolo che questi mediatori molecolari hanno nell’insorgenza e/o progressione di tale sindrome, non è ancora completamente chiaro (Loumaye, 2017). L’interesse verso questi elementi deriva dal fatto che la loro concentrazione è diversa nel sangue dei pazienti cachettici rispetto ai soggetti sani e questo rende tali molecole attrattive come fonte di informazioni sullo stato del paziente, poiché facilmente accessibili con un prelievo ematico (Molinari, 2016; Mathai, 2019). Tra queste ci sono:

- a) **Citochine pro-infiammatorie**, tra cui membri del Transforming Growth Factor- β (TGF- β)
- b) **Ormoni**
- c) **microRNA**.

1.5.1 Il Growth and Differentiation Factor 15 (GDF15) e le citochine pro-infiammatorie

Tra le citochine prodotte durante lo stato infiammatorio cronico, il TNF- α , sembrerebbe giocare un ruolo importante nella patogenesi della cachessia associata alle diverse patologie primarie (Molinari, 2016). I livelli sierici di TNF- α sono elevati in tutte le forme di cachessia, nel tessuto muscolare sembrerebbero innescare processi di degradazione proteica e apoptosi delle miofibre (Mann, 2001; von Haehling, 2002). Altre citochine pro-infiammatorie che sembrano avere un ruolo nella patogenesi della cachessia sono l’interleuchina-1 β (IL-1 β), l’interleuchina-6 (IL-6) e l’interferone- γ (INF- γ) regolate dalla via NF-kB, (Gielen, 2012). Anche l’aumento dei livelli ematici di CRP e la riduzione dell’albumina sierica, sembrano avere un ruolo nella patogenesi della cachessia (Dev, 2019) ed in associazione alle citochine pro-infiammatorie, potrebbero essere utilizzate come indicatori della perdita di peso involontaria (Molinari, 2016).

Ad oggi, il ruolo di queste citochine pro-infiammatorie nella patogenesi della cachessia è ben documentato, mentre solo negli ultimi anni le citochine appartenenti alla superfamiglia del TGF- β sono state identificate come potenziali mediatori nell'insorgenza e progressione della cachessia (Molinari, 2016). In particolare, grande interesse è stato dedicato al **Growth and Differentiation Factor 15 (GDF15)**, anche noto come citochina inibitoria dei macrofagi-1, MIC-1). In condizioni fisiologiche questa citochina è espressa in basse concentrazioni, da diversi tessuti e tipi cellulari come rene, polmone e muscolatura scheletrica nonché macrofagi e cardiomiociti (Emmerson, 2018; Nakajima, 2019). I livelli circolanti aumentano nei soggetti anziani in seguito a disfunzioni mitocondriali legate all'età, ma anche in risposta a condizioni patologiche, come l'infiammazione (Conte, 2020). In particolare, proprio IL-1 β , IL-6 e il TNF- α sembrerebbero essere responsabili di un aumento dell'espressione del GDF15 durante la risposta infiammatoria (Emmerson, 2018, Conte, 2020). Ci sono pareri contrastanti sul ruolo del GDF15 soprattutto nella patologia oncologica (Zimmers, 2010; Husaini, 2012). Secondo quanto proposto da *Emmerson et al.* la discrepanza dei risultati presenti in letteratura potrebbe essere dovuta ad un diverso ruolo del GDF15 nelle fasi di crescita e progressione tumorale: inizialmente protettivo verso la crescita, con l'instaurarsi di uno stato infiammatorio cronico, il GDF15 potrebbe diventare un promotore tumorale e contribuire alla progressione della neoplasia (Emmerson, 2018; Tsai, 2018).

Il GDF15 sembrerebbe svolgere un ruolo nella regolazione dell'appetito a livello del sistema nervoso centrale (Molinari, 2016). Studi sperimentali, condotti su modelli animali, suggeriscono che il GDF15 potrebbe indurre l'insorgenza dell'anoressia riscontrata durante la cachessia, agendo direttamente a livello dell'ipotalamo (Johnen, 2007; Tsai, 2013) e probabilmente causando l'alterazione del food-intake (Molinari, 2016; Molfino, 2020). In particolare, è stato dimostrato in modelli murini che l'infusione di GDF15 determina una rapida attivazione dei fattori di trascrizione FOS (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene) ed ERK1/2, ma non delle proteine SMAD, a livello del rombencefalo (Tsai, 2018). I principali siti cerebrali in cui il GDF15 svolge la sua azione anoressigenica sono l'area postrema (AP) e il nucleo del tratto solitario (NTS) entrambi localizzati nell'ipotalamo (Tsai, 2018; Borner, 2020; Lockhart, 2020), poiché il recettore specifico del GDF15, GFRAL (glial-derived neurotrophic factor (GDNF) receptor alpha-like) è maggiormente espresso in queste regioni del sistema nervoso centrale (Borner, 2020; Lockhart, 2020). L'aumento del GDF15 in tale sede induce la riduzione dell'espressione del Neuropeptide Y (NPY) ed aumentando l'espressione della pro-opiomelanocortina (Pomc), molecole coinvolte nella regolazione del senso di fame (Borner, 2020; Lockhart, 2020). Inoltre, il GDF15 sembrerebbe compromettere l'assunzione di cibo,

agendo direttamente anche su organi e tessuti dell'apparato digerente. In particolare, ridurrebbe la motilità gastrica, attraverso l'interazione con le giunzioni neuronali a livello di stomaco e colon (Xiong, 2017; Tsai, 2018).

È stato osservato che il GDF15 agisce anche a livello periferico innescando pathways di "muscle wasting" (Joulia, 2003; Nakajima, 2019) in particolare, Wang *T et al.* (2017) hanno osservato che, in bambini affetti da patologie cardiache, il GDF15 inibisce il rilascio di IGF1 influenzando la crescita corporea ed impattando sul muscolo scheletrico (Nakajima, 2019). Studi *in vitro* hanno dimostrato che il trattamento di cellule C2C12 con GDF15 induce un aumento dell'espressione di geni associati all'atrofia muscolare, determinando degradazione delle miofibre (Wang, 2012). In modelli murini l'aumento dei livelli di espressione del GDF15 sembra avere un ruolo nella riduzione del peso, della massa muscolare e del tessuto adiposo, con conseguente insorgenza della cachessia (Loncar, 2014). L'azione del GDF15 nella patofisiologia di tale sindrome sembrerebbe essere legata ad una riduzione dell'intake energetico, piuttosto che una azione diretta sul muscolo, dato che il recettore GFRAL non sembra essere presente a livello delle miofibre (Bloch, 2015; Tsai, 2018). In modelli murini che esprimono elevate concentrazioni di GDF15 gli effetti di tale citochina sembrerebbero essere dovuti alla modulazione di miRNA coinvolti nei pathways delle SMAD, che determinano la regolazione dei geni associati all'atrofia muscolare (Bloch, 2015; Tsai, 2018).

Va sottolineato che anche pazienti con patologie cardiache mostrano un aumento dei livelli circolanti del GDF15 (Kempf, 2007; Wollert, 2017). Sembrerebbe infatti che a seguito di uno stato pressorio elevato o di ischemia cardiaca, i cardiomiociti aumentino l'espressione di GDF15, agendo nel rimodellamento del muscolo cardiaco attraverso un'azione paracrina/autocrina (Gaggin, 2013; Wang, 2017). Poiché l'aumento dei livelli circolanti del GDF15 è associato ad un aumento della gravità dei sintomi dello scompenso cardiaco e ad una prognosi sfavorevole, recentemente tale citochina è stata proposta come biomarcatore di lesioni cardiache (Emmerson, 2018) e come predittore di rischio cardiovascolare in diverse condizioni patologiche (Gaggin, 2013). Nonostante gli studi citati dimostrino che i livelli circolanti di GDF15 siano associati con un peggioramento della prognosi nelle patologie cardiache, l'esatta funzione di tale citochina nel sistema cardiocircolatorio in condizioni fisiologiche e patologiche è ancora poco conosciuta (Emmerson, 2018).

Infine, vale la pena sottolineare il ruolo del GDF15 nell'omeostasi mitocondriale. Infatti, alcuni studi (sia su modelli murini che nell'uomo) hanno dimostrato che si osserva un aumento dei livelli sierici di GDF15 in patologie genetiche in cui sono presenti disfunzioni mitocondriali

(come riportato da Tsai et al. 2018). In particolare, il primo legame tra elevati livelli di GDF15 e disfunzione mitocondriale è stato dimostrato da *Kalko et al.* (2014), in cui pazienti con encefalomiopatia mitocondriale secondaria, dovuta alla mutazione del gene della Timidina Chinasi 2 (Thymidine Kinase 2, TK2), mostravano un aumento dei livelli sierici di GDF15 ed una up-regolazione dei geni bersaglio di p53, nel muscolo scheletrico, che sembrerebbe essere responsabile di un cambiamento nell'utilizzo ed immagazzinamento del glucosio, nonché del metabolismo lipidico e degli aminoacidi (Kalko, 2014; Tsai, 2018).

1.5.2 *Il Fibroblast Growth Factor 21 e gli Ormoni coinvolti nel "food intake"*

La perdita di appetito, il malassorbimento dei nutrienti e la conseguente insorgenza di anoressia, sono spesso presenti nei pazienti con cachessia associata alle diverse patologie primarie. La leptina e la grelina sono i due ormoni antagonisti, maggiormente coinvolti nella regolazione dell'omeostasi energetica e dell'appetito (Molinari F 2016). La grelina stimola il senso di fame, mentre la leptina ha il ruolo di ridurre il food-intake. Alcuni studi dimostrano che i pazienti cachettici hanno uno squilibrio del sistema leptina-grelina, (Nagaya, 2001; 2004) probabilmente come conseguenza delle elevate concentrazioni di citochine pro-infiammatorie (tra cui il GDF15) nel torrente sanguigno (Molinari, 2016).

Tra gli ormoni coinvolti nella regolazione dell'omeostasi energetica, c'è anche il **Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21)**. La modulazione dei livelli circolanti e/o tissutali di questa citochina sembrerebbe avere un ruolo nella patogenesi della cachessia (Holm, 2019; Oost, 2019). L'FGF21 è un ormone peptidico, prodotto in risposta ad una fase di digiuno prolungata, in cui l'organismo si trova in carenza di nutrienti (Tezze, 2019). Il fegato è il principale produttore di tale citochina, tuttavia altri tessuti come quello adiposo, il cuore ed il muscolo scheletrico contribuiscono alla produzione ed al suo rilascio nel circolo sanguigno (Dolegowska, 2019; Tezze, 2019).

L'FGF21 è considerato un mediatore di cross-talk tra i tessuti periferici ed il sistema nervoso centrale, essendo in grado di regolare l'omeostasi lipidica, penetrando la barriera ematoencefalica e agendo a livello dell'ipotalamo, determinando inoltre il controllo circadiano del metabolismo e la sintesi degli ormoni riproduttivi femminili (Dolegowska, 2019). In condizioni fisiologiche, l'FGF21 regola la risposta adattativa al digiuno, inducendo processi di chetogenesi, gluconeogenesi, lipolisi e β -ossidazione degli acidi grassi ed aumenta la sensibilità all'insulina, garantendo all'organismo l'energia di cui ha bisogno (Dolegowska, 2019).

Generalmente, la produzione di FGF21 da parte del tessuto muscolare scheletrico è bassa, ma aumenta in seguito ad esercizio fisico determinando un aumento della fosforilazione di Akt e la traslocazione del trasportatore del glucosio (GLUT4) sulla membrana plasmatica delle miofibre. Questo permette l'uptake del glucosio (Trovato, 2019). L'aumento di FGF21 nel muscolo si osserva specialmente in condizioni di stress cellulare come: disfunzioni mitocondriali, stress ossidativo nonché nell'invecchiamento, traducendosi in un aumento dei livelli circolanti di tale citochina (Oost, 2019; Tezze, 2019). In particolare, è stato dimostrato *in vivo* che l'aumento dell'espressione di FGF21 nel tessuto muscolare scheletrico è in grado di indurre la formazione dell'autofagosoma per rimuovere i mitocondri danneggiati (Oost, 2019). Inoltre, *Tezze et al.* hanno dimostrato che l'aumento dell'espressione dei livelli circolanti di FGF21, prodotto dal tessuto muscolare scheletrico, possa determinare infiammazione e senescenza precoce (Tezze, 2017). Aver identificato negli ultimi anni questo ruolo di regolatore dei processi del catabolismo muscolare ha reso eleggibile l'utilizzo dei livelli circolanti di FGF21 come biomarcatore di "muscle wasting" e di cachessia (Manole, 2018; Oost, 2019).

1.5.3 *Altri fattori circolanti*

Le molecole precedentemente elencate sono tutte potenziali biomarcatori di cachessia, ottenibili con una biopsia liquida. Va sottolineato il crescente interesse della comunità scientifica verso i neopitopi che potrebbero essere associati alla degenerazione del tessuto muscolare, come il frammento C-terminale dell'agrina (CAF) (Fragala, 2014), il frammento N-terminale del propeptide del collagene di tipo III (P3NP), nonché l'actina e la miosina che vengono rilasciati in seguito alla proteolisi muscolare (Molinari, 2016). Sono necessari ulteriori studi per comprendere in che modo questi mediatori molecolari intervengano nello sviluppo e progressione della cachessia associata alle diverse patologie primarie (Molinari, 2016; Marinho, 2018).

Inoltre, negli ultimi anni particolare interesse è stato suscitato dagli RNA non codificanti che si trovano in circolo (Moran, 2017; Finotti, 2018; Rijavec, 2019; Mathai 2019). In particolare, i microRNA (**miRNA**) sono stati identificati come molecole particolarmente attrattive da un punto di vista diagnostico e prognostico (Skog J, 2008; Taylor, 2008; Rabinowits, 2009), poiché modulazioni a carico di questi elementi sono state riscontrate in diverse patologie compreso il cancro e in diversi stadi delle neoplasie.

Recentemente è stato proposto che l'alterazione del "network" tra miRNA e mRNA bersaglio possa essere responsabile dell'insorgenza e/o della progressione della cachessia nonché dell'infiammazione sistemica associata a tale sindrome sebbene ad oggi non siano ancora stati chiariti i rapporti di causa effetto tra infiammazione e modulazione della espressione di miRNA nella patogenesi della cachessia (Carthew, 2009; Soares, 2014; Camargo, 2015; Lee, 2017; Moraes, 2017; Calore, 2018). Per questo motivo diversi gruppi di ricerca si sono concentrati sui miRNA per tentare di comprendere e contrastare i meccanismi alla base della cachessia (Izzotti, 2016; Calore, 2018; Mathai, 2019). In particolare, l'attenzione è rivolta a miRNA circolanti, prodotti dal tessuto muscolare scheletrico o associati ad esso, che possano essere ottenuti mediante biopsia liquida, come alternativa alla biopsia solida di tessuto muscolare. La crescente attenzione verso i miRNA circolanti è legata principalmente alle caratteristiche che tali molecole hanno in comune con un biomarcatore ideale: sono stabili nei fluidi biologici, resistenti alla digestione da parte delle RNAsi, a temperature e pH estremi e a ripetuti cicli di congelamento-scongelo (Chen, 2008; Ge, 2014; Haranguş, 2019). Inoltre, sono facilmente accessibili attraverso il prelievo dei fluidi biologici che risulta ripetibile e meno invasivo della biopsia solida (Qi, 2018; Mathai, 2019).

1.6 I miRNA

I miRNA rientrano nella categoria dei cfNAs, identificati nel plasma umano per la prima volta nel 1948 (Mandel P 1948). I miRNA sono piccoli RNA non codificanti lunghi circa 22 nucleotidi. La scoperta di questi elementi risale al 1993, sono presenti in tutti gli organismi viventi (virus, alghe, piante, invertebrati, vertebrati) e alcuni mostrano omologia di sequenza tra le specie (Pasquinelli, 2000; Lee, 2001; Griffiths-Jones, 2008; Moran, 2017). Ad oggi, nel genoma umano, sono stati identificati più di 2'500 miRNA maturi e questo numero è destinato ad aumentare nei prossimi anni (Friedman, 2009). I miRNA possono essere suddivisi in due categorie: a) miRNA espressi in modo ubiquitario da diversi tipi cellulari/tissutali; b) miRNA presenti ed espressi solo da alcuni tessuti (definiti tessuto-specifici) (Lee, 2008; Hitachi and Tsuchida, 2014).

1.6.1 *La Biogenesi dei miRNA*

La biogenesi dei miRNA inizia all'interno del nucleo, dove la RNA polimerasi II sintetizza un trascritto primario, che prende il nome di **pri-miRNA**, successivamente sottoposto a numerosi processi di maturazione in diversi compartimenti cellulari (Kim, 2007). I pri-miRNA sono

singoli filamenti di RNA con una lunghezza di circa 100 nucleotidi che vengono trascritti a partire dal proprio promotore, che può essere localizzato in una regione intragenica (generalmente introni, ma anche esoni) oppure in una regione intergenica (Ha, 2014; de Rie, 2017). I pri-miRNA presentano sequenze ripetute molto vicine tra loro, che si ripiegano su sé stesse a formare delle strutture a forcina. Da un pri-miRNA vengono formati due miRNA maturi; uno ha origine dal braccio 5' e l'altro dal braccio 3' dello stesso pri-miRNA, prendendo rispettivamente il suffisso -5p o -3p (Ha, 2014) (Figura 5A). In alcuni casi un singolo e lungo trascritto primario può dare origine a più di un miRNA maturo diverso, in questo caso si parla di cluster ed i miRNA contenuti in esso costituiscono una famiglia: per esempio i miR29a, miR29b e miR29c appartengono tutti alla stessa famiglia (Tanzer, 2004; Wang, 2013)

I pri-miRNA vengono successivamente tagliati da un complesso multiproteico costituito da Drosha, (una RNasi III nucleare) e dalla proteina Pasha (nell'uomo nota come Di George syndrome chromosomal region 8, DGCR8), che riconosce e lega l'RNA a doppio filamento (Denli AM 2004). L'associazione del complesso multiproteico al pri-miRNA ne determina il clivaggio in una corta struttura a doppia elica, che prende il nome di **pre-miRNA**. Tale doppia elica, migra fuori dal nucleo attraverso l'Esportina5 e viene riversata nel citoplasma (Ha, 2014). A questo punto, Dicer (una RNasi III citoplasmatica) rimuove le strutture a forcina dalla doppia elica, formando un duplex miRNA/miRNA*, costituito da un filamento guida e uno passeggero (generalmente contrassegnato con un asterisco). Successivamente, le proteine Argonata (AGO2) endoribonucleasi leganti l'RNA, si associano al duplex di miRNA per formare il complesso di silenziamento dell'RNA (RISC), dove il duplex di miRNA viene disassemblato, lasciando il filamento guida, associato alle proteine AGO2. Sarà questo filamento ad essere prevalentemente presente nelle cellule/tessuti (Ha, 2014). A questo punto il miRNA è nella forma matura, pronto per svolgere la sua funzione biologica: silenziare gli mRNA bersaglio. Tale silenziamento può avvenire sia nella cellula di formazione, che a distanza. Il filamento passeggero può essere degradato, oppure anch'esso può venir esocitato dalla cellula donatrice (O'Brien, 2018) (Figura 5B). La scelta di quale dei due filamenti del duplex miRNA/miRNA* sarà il filamento guida e quale il passeggero, è legata alla stabilità termodinamica ed alla composizione dei due filamenti. Generalmente, il filamento guida è quello con una minore stabilità termodinamica alla regione 5' o che contiene un Uracile in tale regione (Hu, 2009) (O'Brien, 2018).

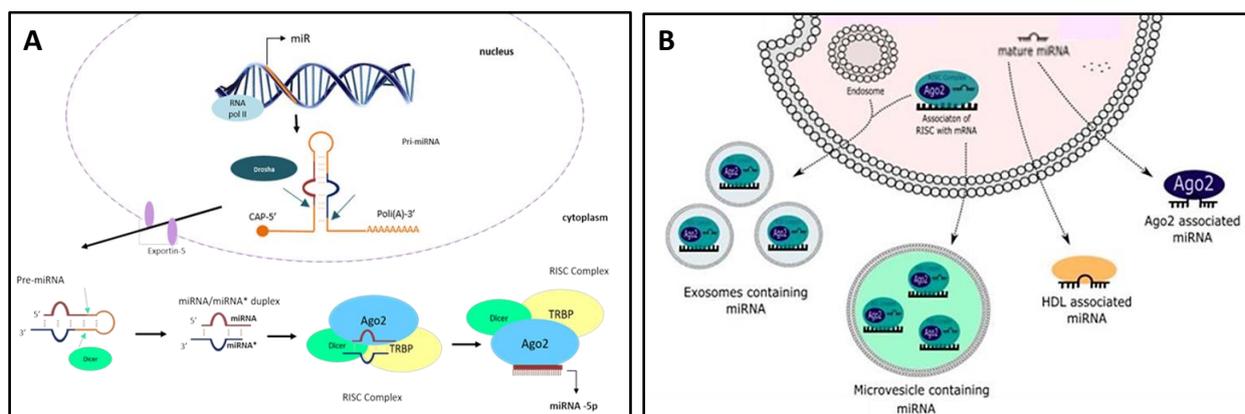


Figura 5. Rappresentazione schematica della biogenesi dei miRNA. A) Illustrazione dei passaggi di maturazione del miRNA durante la biogenesi canonica, con formazione del braccio “-5p”. B) Illustrazione dei destini che possono essere intrapresi dal miRNA maturo: svolgere il ruolo di silenziatore dell’espressione genica nella cellula in cui è stato sintetizzato, oppure a distanza in una cellula bersaglio (Thomas *et al.* 2018).

Va sottolineato che esiste una via alternativa alla biogenesi dei miRNA appena descritta. Questa seconda via, recentemente identificata, prende il nome di “Biogenesi non Canonica”, (O'Brien, 2018). In questa via di sintesi, il processo di maturazione dei miRNA è indipendente dalle proteine Drosha/DGCR8 e/o Dicer. Tuttavia, il risultato finale è lo stesso: le proteine AGO2 legano il miRNA maturo per formare il complesso RISC e silenziare gli mRNA bersaglio (O'Brien, 2018).

Nel complesso RISC, il miRNA maturo si associa con il suo mRNA bersaglio, che possiede una sequenza complementare a quella del miRNA. In questo modo, la regolazione dell’espressione genica avviene a livello post-trascrizionale, attraverso la degradazione o l’inibizione della traduzione dell’RNA messaggero (Finnegan, 2013; O'Brien, 2018). Un singolo miRNA può silenziare molti mRNA diversi ed un singolo RNA messaggero può essere il bersaglio di più miRNA. Generalmente, i miRNA legano la regione 3’UTR dell’RNA messaggero, tuttavia può avvenire un legame anche a livello della regione 5’UTR o con una regione codificante dell’mRNA, nonostante queste interazioni sembrano essere meno frequenti (Broughton, 2016). Il meccanismo di silenziamento indotto dal miRNA dipende dal grado di complementarità del legame con l’mRNA. Una bassa complementarità determina l’inibizione della traduzione, mentre un appaiamento perfettamente complementare induce la degradazione dell’RNA messaggero (Ambros, 2004).

Recentemente, è stato dimostrato che durante il processo di autofagia, l'enzima Dicer e le proteine AGO vengono degradate. Poiché questi componenti sono essenziali per la biogenesi dei miRNA, è possibile che già negli stadi precoci dell'atrofia muscolare possa essere presente una riduzione dei miRNA, dovuta alla degradazione di Dicer e AGO, dipendente dall'autofagia (O'Brien, 2018).

1.6.2 *I miRNA circolanti*

I miRNA furono identificati inizialmente nei tessuti e successivamente nei fluidi biologici. La concentrazione totale e la composizione dei miRNA variano nelle diverse tipologie di biofluidi. L'identificazione di miRNA extracellulari ha generato stupore nella comunità scientifica poiché è noto che i fluidi biologici contengono elevate quantità di RNAsi, enzimi deputati alla rimozione degli acidi nucleici esogeni, svolgendo una funzione protettiva per l'organismo (Weber, 2010) (Figura 6A) È stato successivamente dimostrato, che i miRNA sono molto stabili nei fluidi biologici, poiché in grado di eludere l'attività delle RNAsi attraverso due modalità (Huan, 2013; O'Brien, 2018):

- a) “impacchettati” all'interno di vescicole extracellulari (EVs)
- b) associati a proteine di trasporto (EVs-free)

1.6.2.1 *miRNA “impacchettati” nelle EVs*

Le EVs sono piccole particelle costituite da una membrana plasmatica che racchiude alcune molecole citosoliche (miRNA, mRNA, DNA, proteine e lipidi) derivanti dalla cellula donatrice (Akers, 2013; Ravegnini, 2019). Le RNAsi non sono in grado di penetrare nelle EVs, pertanto non possono degradare gli acidi nucleici in esse contenuti (Izzotti, 2016). Le EVs costituiscono una popolazione eterogenea di particelle, differenti per dimensione, composizione chimica, densità, origine tissutale, biogenesi e funzione (Colombo, 2014; Théry, 2018). Recentemente, le EVs sono state suddivise, in base alla dimensione e al meccanismo di biogenesi, in tre classi: i) **Esosomi**; ii) **Ectosomi/Microvescicole**; iii) **Corpi Apoptotici** (Trovato, 2019) (Figura 6B)

Esosomi: sono delle nano-vescicole (30-150 nm) di origine endosomiale, che vengono rilasciate attraverso un processo attivo e finemente regolato, nel comparto extracellulare attraverso la fusione della membrana dell'endosoma e quella cellulare. In particolare, un endosoma precoce dà origine ad un endosoma tardivo, anche chiamato corpo multivescicolare (MVB) che contiene al suo interno alcune piccole vescicole. L'MVB può fondersi con i

lisosomi oppure con la membrana plasmatica della cellula, in quest'ultimo caso rilascia il proprio contenuto esosomiale nel comparto extracellulare. Gli esosomi possono essere generati attraverso due vie: la via dipendente dal Complesso di Smistamento Endosomiale Richiesto per il Trasporto (Endosomal Sorting Complex Required for Transport, ESCRT) ed una via indipendente da tale complesso ESCRT (Izzotti, 2016; Wang, 2017; Trovato, 2019). Tutti i tipi cellulari sono in grado di rilasciare esosomi, ed il carico trasportato da queste vescicole nonché i marcatori di superficie, permettono di identificare la cellula/tessuto di origine (Izzotti, 2016) (Masaoutis, 2018).

Ectosomi: anche detti **Microvescicole** hanno una dimensione di 100-1000 nm ed originano dalla protrusione (o germogliamento) della membrana plasmatica (Willms, 2018). In seguito ad un segnale extracellulare, la cellula donatrice forma una estrusione della membrana plasmatica, che staccandosi dà origine a questo tipo di vescicola (Turturici, 2014; Cocucci, 2015; Trovato, 2019).

Corpi Apoptotici: sono vescicole con una dimensione maggiore di 800 nm. Sono prodotti e rilasciati nello spazio extracellulare, dalla frammentazione di cellule apoptotiche. (Coleman, 2001; Atkin-Smith, 2015).

Una caratteristica tipologia di vescicola extracellulare sono gli Oncosomi, vescicole che vengono attivamente prodotte dalle cellule tumorali e rilasciate nei fluidi biologici. Sulla superficie della membrana plasmatica vescicolare, esse esprimono metalloproteasi che conferiscono capacità invasiva (Colombo, 2014). Gli Oncosomi, come le altre EVs, contengono al proprio interno miRNA, mRNA e proteine, che possono svolgere la propria funzione biologica in sedi diverse rispetto quella tumorale (Colombo, 2014; Trovato, 2019).

Attraverso la produzione delle EVs gli organi possono impacchettare selettivamente molecole specifiche (inclusi i miRNA) e rilasciarli nei fluidi corporei (Zhang, 2010; Hergenreider, 2012; Masaoutis, 2018). Una volta rilasciati nei biofluidi, i miRNA possono agire come messaggeri e regolare le funzioni cellulari con modalità autocrina, paracrina o endocrina (Mittelbrunn, 2012; Iftikhar, 2016). I miRNA impacchettati nelle EVs non sono solo miRNA maturi. Infatti, anche i pre-miRNA possono essere incorporati per es. negli esosomi e rilasciati nei fluidi biologici (Cortez, 2011). Successivamente alla fusione delle EVs con la membrana plasmatica della cellula bersaglio, il pre-miRNA internalizzato può completare in tale cellula il processo di maturazione ed eseguire qui la sua funzione biologica (Cortez, 2011). Si sa ancora poco dei meccanismi di uptake dei miRNA circolanti, si pensa che i miRNA impacchettati all'interno

delle EVs possano entrare nella cellula bersaglio attraverso meccanismi di endocitosi, fagocitosi o fusione diretta della membrana plasmatica (Cortez, 2011; Trovato, 2019).

1.6.2.2 *miRNA EVs-Free*

La seconda modalità con cui i miRNA eludono l'attività delle RNAsi è attraverso l'associazione con proteine. *Arroyo* e colleghi sono stati i primi ad ipotizzare che i miRNA non fossero rilasciati nei fluidi biologici soltanto racchiusi all'interno di EVs, ma che potessero essere liberi da questo involucro. È stato infatti osservato che dopo l'ultracentrifugazione di siero e plasma, una sostanziale quantità di miRNA era presente nel sovranatante (*Arroyo*, 2011) ed è stato ipotizzato che tali miRNA potessero derivare dalla rottura delle EVs durante i passaggi di ultracentrifugazione, oppure da un incompleto recupero di tutte le vescicole presenti nel fluido biologico analizzato. Tuttavia, è stata considerata anche una terza ipotesi, ovvero che i miRNA nel sovrinatante fossero associati a degli elementi che li rendessero stabili e protetti dall'azione delle RNAsi (*Arroyo*, 2011). Con successivi esperimenti *Arroyo* e colleghi hanno infatti dimostrato che i miRNA possono essere associati a complessi ribonucleoproteici che danno loro stabilità e protezione (*Arroyo*, 2011). Ulteriori studi sperimentali hanno evidenziato che i miRNA nei fluidi biologici si trovano associati alle proteine AGO2 e alla proteina nucleofosmina (*Wang*, 2010; *Arroyo*, 2011; *Turchinovich*, 2012) e si pensa che possano esistere altre proteine leganti i miRNA, ancora sconosciute (*Cortez* 2011). Nel torrente sanguigno, i miRNA possono essere associati anche con le lipoproteine ad alta e bassa densità (HDL e LDL). Non è chiaro però se siano impacchettati all'interno delle lipoproteine insieme alle proteine AGO2 (*Vickers*, 2011; *Tabet*, 2014), oppure se i miRNA maturi siano associati con la Apolipoproteina-I, formando così un complesso proteina-acido nucleico (*Vickers*, 2011; *Turchinovich*, 2013; *Michell*, 2016). Inoltre, non è ancora completamente nota la modalità con cui le lipoproteine siano in grado di distribuire i miRNA alle cellule bersaglio (*Vickers*, 2011).

Ad oggi sappiamo che non solo i miRNA racchiusi nelle EVs, ma anche quelli EVs-free possono essere introdotti nelle cellule bersaglio e svolgere in esse la propria funzione biologica. I miRNA associati ad un complesso proteico possono essere legati a specifici recettori transmembrana ed essere internalizzati in cellule distanti rispetto quella di produzione (*Cortez*, 2011; *Chen*, 2012). Sembrerebbe per esempio, che i miRNA associati con le HDL siano introdotti nelle cellule bersaglio mediante il legame con il recettore scavenger classe B di tipo I delle HDL (Scavenger Receptor BI, SR-BI) (*Vickers*, 2011; *Tabet*, 2014). Studi *in vitro* hanno inoltre dimostrato che i miRNA possono essere scambiati tra cellule vicine, attraverso le gap-junction o attraverso un contatto diretto cellula-cellula (*Aucher*; 2013). L'esatto meccanismo del rilascio dei miRNA nel comparto extracellulare non è ancora del tutto noto. Sono stati

proposti due possibili meccanismi: un meccanismo passivo ed uno attivo (Turchinovich, 2012) (Figura 6C). Il meccanismo passivo prevede che i miRNA vengano rilasciati come prodotti di “scarto” della cellula donatrice e possano essere sia impacchettati nelle EVs che associati a proteine (Turchinovich, 2011; Trovato, 2019), per esempio in seguito a processi di apoptosi, necrosi o lisi cellulare (Valadi, 2007; Atkin-Smith, 2015; Thomas, 2018; Trovato, 2019). Il secondo meccanismo ipotizzato è un rilascio attivo, in cui i miRNA possono essere esocitati all’interno di vescicole extracitoplasmatiche oppure associati a complessi proteici (Valadi, 2007; Wang, 2010; Arroyo, 2011; Vickers, 2011). In seguito ad un segnale extracellulare, la cellula rilascerebbe i miRNA per comunicare con cellule bersaglio più o meno vicine, al fine di regolare l’espressione genica, in risposta ad uno specifico stimolo (Valadi, 2007; Teplyuk, 2012).

Infine, vale la pena di sottolineare che la forma in cui i miRNA si trovano maggiormente presenti nel comparto extracellulare è ancora oggetto di discussione. Alcuni studi riportano che la maggior parte (90%) dei miRNA presenti nei fluidi biologici sia associata a complessi proteici (quindi EVs-free), specialmente con AGO2 (Arroyo, 2011; Turchinovich, 2011), mentre un solo studio suggerisce che gli esosomi siano la forma predominante di trasporto dei miRNA extracellulari (Gallo, 2012). Secondo quanto proposto da *O’Brian et al.*, la forma prevalente in cui i miRNA si trovano nel comparto extracellulare potrebbe dipendere da diversi fattori, tra cui il tipo di miRNA considerato, il tipo di cellula/organo o tessuto donatore ed il tipo di fluido biologico analizzato (O’Brien, 2018).

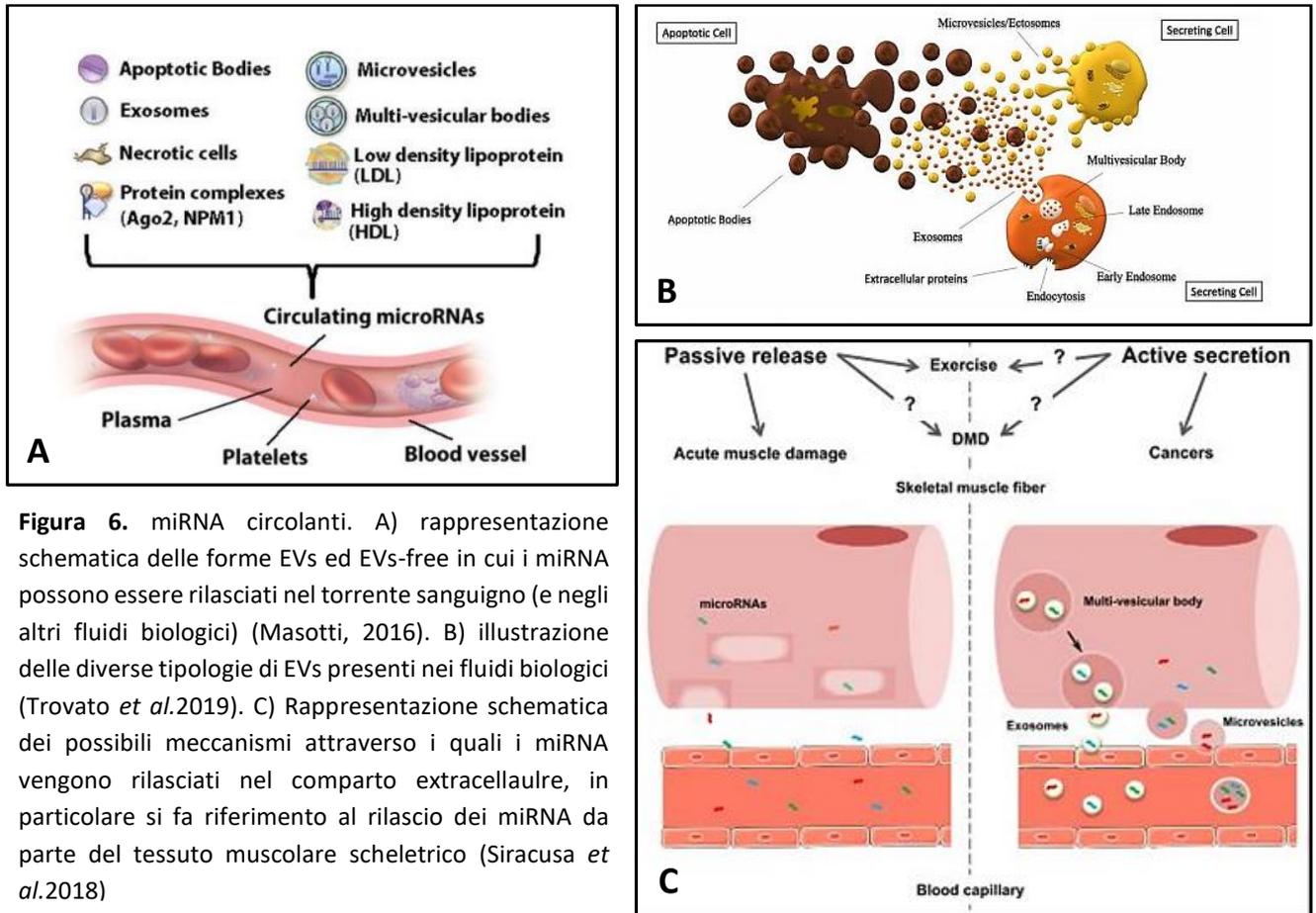


Figura 6. miRNA circolanti. A) rappresentazione schematica delle forme EVs ed EVs-free in cui i miRNA possono essere rilasciati nel torrente sanguigno (e negli altri fluidi biologici) (Masotti, 2016). B) illustrazione delle diverse tipologie di EVs presenti nei fluidi biologici (Trovato *et al.*2019). C) Rappresentazione schematica dei possibili meccanismi attraverso i quali i miRNA vengono rilasciati nel comparto extracellulare, in particolare si fa riferimento al rilascio dei miRNA da parte del tessuto muscolare scheletrico (Siracusa *et al.*2018)

1.6.3 miRNA coinvolti nell'omeostasi del tessuto muscolare scheletrico

Come descritto in dettaglio nel successivo capitolo, durante la cachessia la riduzione della massa muscolare è il risultato dello squilibrio tra il tasso di sintesi/degradazione proteica ed i cambiamenti metabolici che avvengono nel tessuto muscolare scheletrico (Costelli, 2003; Muscaritoli, 2010; Aversa Z 2017). Le alterazioni che avvengono nel complesso “network” di miRNA e mRNA bersaglio potrebbero essere responsabili dell’insorgenza della cachessia (o dell’inflammation sistemica associata a tale sindrome). Per questo motivo, negli ultimi anni alcuni gruppi di ricerca si sono focalizzati nello studio dei miRNA coinvolti nei pathways di crescita e atrofia muscolare, per tentare di comprendere i meccanismi alla base della cachessia (Muscaritoli, 2010; Soares, 2014; Gatta, 2017; Lee, 2017; Margolis, 2017; Marinho, 2018; Penna, 2019). Esperimenti *in vitro* ed *in vivo* (modelli murini) hanno mostrato che i principali pathways alterati nel “muscle wasting” durante la cachessia sono la crescita e l’atrofia

muscolare. I miRNA specifici del tessuto muscolare scheletrico e cardiaco sono chiamati myomiRNA. Tuttavia, ci sono anche miRNA espressi ubiquitariamente, che possono agire regolando l'omeostasi delle miofibre (Camargo, 2015; Siracusa, 2018). I myomiRNA sono espressi in modo specifico dal tessuto muscolare poiché le sequenze che codificano per tali miRNA sono localizzate nelle regioni introniche del gene della catena pesante della miosina (MyHC), oppure perché sono direttamente controllate da fattori di trascrizione specifici del tessuto muscolare come MyoD, Mef2 (Myocyte enhancer factor 2) o Srf (Serum response factor) (Kim, 2006; Rao, 2006; Liu, 2007; Yeung, 2012) (Figura 7). Tra i miRNA associati al tessuto muscolare, quelli che sembrerebbero avere un ruolo maggiore nella patogenesi e/o progressione della cachessia sono: **miR1**, **miR133a**, **miR133b**, **miR206**, **miR486**, (myomiRNA); tra i non specifici del tessuto muscolare: **miR21**, la famiglia **miR29** ed il **miR181a** (He, 2014; Camargo, 2015; Bloch, 2015; Lee, 2017; Moraes, 2017; Calore, 2018; Marinho, 2018; Naguibneva, 2006). Questi miRNA modulano direttamente i processi di miogenesi, crescita, differenziamento ed apoptosi delle miofibre regolando la sintesi proteica e più in generale l'omeostasi del tessuto muscolare scheletrico (McCarthy, 2011; Goljanek-Whysall, 2012; Diniz, 2016). Alcuni di questi possono essere rilasciati nei fluidi biologici e svolgere la loro funzione in siti distanti da quello di produzione. Per esempio, i miRNA rilasciati da altri tessuti possono così modulare l'omeostasi ed il metabolismo delle miofibre, influenzandone la crescita o i processi di degradazione. Inoltre, essendo facilmente accessibili con le biopsie liquide, tali miRNA sono considerati elegibili come potenziali biomarcatori di "muscle wasting" (Barendregt, 2004; Hitachi and Tsuchida, 2014; Lee, 2017; Camargo, 2015; Calore, 2018; Marinho, 2018).

Recentemente sono stati identificati altri miRNA muscolo-specifici, modulati durante la cachessia oncologica. In uno studio del 2017, eseguito su campioni di tessuto muscolare scheletrico umano (retto dell'addome), sono stati identificati 8 miRNA tissutali, modulati nei pazienti cachettici rispetto ai non cachettici: let-7d, miR199a, miR345, miR423, miR423, miR532, miR1296 e miR3184 (Narasimhan, 2017). Come riportato da *van de Worp*, altri myomiRNA sembrerebbero essere coinvolti nella cachessia oncologica: miR18a, miR23, miR27a, miR27b, miR208a, miR208b, miR422a, miR542 e due cluster: miR-424/miR-503, miR144/451a che sono risultati modulati nel muscolo vasto laterale di pazienti con cachessia da cancro al polmone (van de Worp, 2018; van de Worp, 2020). Anche il **miR15b**, nonostante non sia specifico del tessuto muscolare scheletrico, sembrerebbe avere un ruolo nell'omeostasi di questo tessuto (Kura, 2019; Liu, 2018). Va sottolineato, però, che prima di poter utilizzare

questi miRNA come biomarcatori in biopsie liquide, sarà necessario valutare la presenza e la modulazione di tali molecole nei fluidi biologici durante la cachessia.

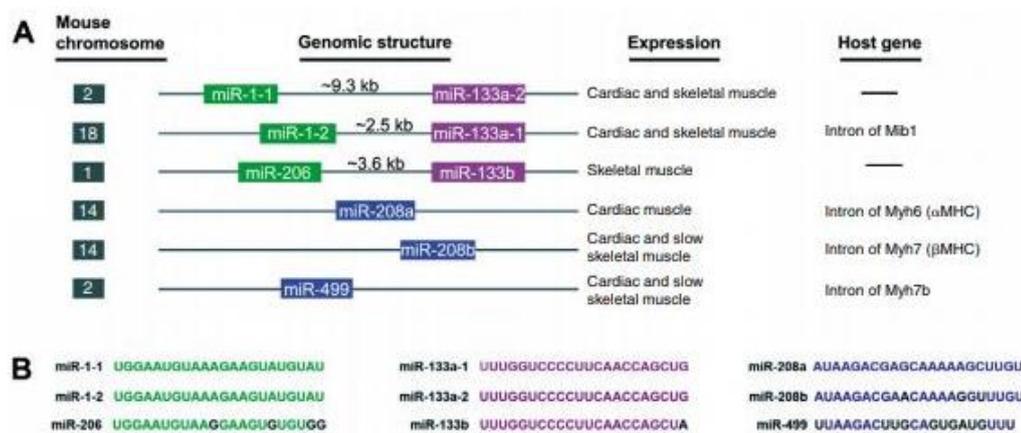


Figura 7. Struttura genica dei myomiRNA su cromosomi murini. A) illustrazione della localizzazione dei geni in cui sono codificati i myo-miRNA, l'espressione tissutale e il gene dell'ospite in cui essi risiedono nei cromosomi murini. B) Confronto delle sequenze nucleotidiche dei myomiRNA. È possibile osservare l'elevata omologia di sequenza tra i myomiRNA, rappresentata da nucleotidi con lo stesso colore tra le sequenze. I nucleotidi colorati di nero, evidenziano invece le differenze (Chen *et al.* 2009).

1.7 I miRNA COINVOLTI NEI PATHWAYS DI "MUSCLE WASTING"

1.7.1 *myomiRNA coinvolti nella via di segnalazione IGF1/Akt/mTOR*

Il **miR1**, **miR133a/b** ed il **miR206** sono tutti prodotti dal tessuto muscolare scheletrico, il miR1 ed il miR133a anche dal muscolo cardiaco (Hitachi and Tsuchida, 2014; Shi, 2016; Vegter, 2016). Tutti questi miRNA sono localizzati in diverse posizioni geniche e cromosomiche e clusterizzati come segue: miR1-1/miR133a-2, miR1-2/miR133a-1, miR133b/miR206 (Goljanek-Whysall, 2012) (Figura 7). Va sottolineato che anche se due miRNA sono localizzati nello stesso cluster genico, possono essere trascritti separatamente (Cacchiarelli, 2010). I myomiRNA possono essere espressi in modo diverso, in base alla tipologia di miofibra. Per esempio, il miR1 è maggiormente espresso nelle fibre glicolitiche, a contrazione veloce, mentre il miR206 nelle fibre ossidative, a contrazione lenta (Liu, 2013) (Muroya, 2013). Questi due miRNA hanno lo stesso bersaglio molecolare: IGF1, perciò livelli elevati dei miR1 e miR206 nel circolo sanguigno, hanno la capacità di inibire la via di

segnalazione IGF1/Akt/mTOR. Tale via risulta essere il principale pathway nella regolazione della crescita muscolare, attraverso l'attivazione della sintesi proteica e della biogenesi mitocondriale (Fearon, 2012; Schiaffino, 2013). L'inibizione della via IGF1/Akt/mTOR comporta l'aumento della degradazione proteica e induce atrofia delle miofibre (Kukreti, 2013; Hitachi and Tsuchida, 2014). Questa stessa via di segnalazione è inibita anche da un aumento dei livelli circolanti di miR133a/b, poiché il bersaglio molecolare di questi myomiRNA è il recettore per l'IGF1, IGF1R (Hitachi and Tsuchida, 2014). L'aumento dei livelli circolanti dei miR1, miR133 e miR206 è stato osservato in pazienti con distrofia muscolare di Duchenne, suggerendo che l'inibizione della via di segnalazione IGF1/Akt/mTOR da parte di questi miRNA possa essere responsabile dei processi di muscle wasting (Cacchiarelli, 2010). È bene riportare quanto ipotizzato da Köberle *et al.* ovvero che con la progressiva riduzione della massa muscolare durante la cachessia si osserverebbe una riduzione dei livelli circolanti dei myomiRNA (specialmente miR1), non per la diminuita espressione dei miRNA in sé, quanto per l'avanzato "muscle wasting" che determinerebbe un esiguo numero di cellule in grado di produrre i myomiRNA (Köberle, 2013; Siracusa, 2018). I miR1 e miR206 potrebbero avere un ruolo anche nella regolazione del differenziamento miogenico. MyoD e Miogenina sembrano promuovere l'aumento dell'espressione dei miR1 e miR206 ed è stato dimostrato che livelli elevati di questi miRNA determinano una riduzione dell'espressione di Pax7, necessario per mantenere il pool di cellule satelliti, che in questo modo vengono indotte al differenziamento. L'aumento di miR1 e miR206 ha quindi come effetto finale, anche quello di ridurre la popolazione di cellule staminali muscolari (Rao, 2006; Chen, 2010; Gatta, 2017; Penna, 2019; Penna, 2019).

Il **miR486** è definito non come myomiRNA ma piuttosto come "muscle-enriched" poiché è presente anche in tessuti diversi da quello muscolare, tuttavia i livelli di espressione sono più elevati nel muscolo rispetto agli altri tessuti (Lee, 2008; Siracusa, 2018). In condizioni fisiologiche, il miR486 mantiene inattivo FoxO1, inibendo l'autofagia e l'atrofia delle miofibre (Xu, 2012; Camargo, 2015). Tra i bersagli molecolari del miR486 c'è anche PTEN. La riduzione dei livelli tissutali di questo miRNA comporta una diminuzione nella sintesi proteica mediata da PTEN ed aumento di FoxO1 con conseguente atrofia delle miofibre, dovuta all'azione delle E3 ligasi muscolo-specifiche (Small, 2010; Hitachi, 2014). MyoD regola l'espressione anche del miR486 e l'aumento di tale miRNA sembrerebbe promuovere il differenziamento dei mioblasti (Hitachi and Tsuchida, 2014; Hitachi, 2014).

Va sottolineato che oltre questi miRNA, recentemente altri myomiRNA sono stati identificati nella regolazione della via di segnalazione IGF1/ Akt/mTOR: miR18a, miR182, miR199a e miR345. La modulazione dei livelli tissutali di questi miRNA induce l'aumento di espressione di Atrogin1 e MURF1, determinando atrofia delle miofibre (Narasimhan, 2017; van de Worp, 2018; Connolly, 2018). Tra i bersagli molecolari di miR182 c'è FoxO3, quindi la riduzione di questo miRNA porterebbe agli stessi effetti descritti per il miR486 (Hudson, 2014) (Figura 8).

1.7.2 *myomiRNA coinvolti nella via di segnalazione Miostatina/Smad*

La via di segnalazione Miostatina/Smad è il pathway principale nell'inibizione della crescita del tessuto muscolare scheletrico (Hitachi and Tsuchida, 2014; van de Worp, 2018) (Figura 8). In base a quanto ottenuto da predizioni *in silico*, molecole appartenenti alla via di segnalazione Miostatina/Smad, sembrerebbero essere bersagli molecolari dei miR27a/b, miR208a/b, miR422a, miR499 e miR542. Modulazioni di questi miRNA, pertanto, potrebbero influenzare la crescita delle miofibre. Ci sono però ancora pochi dati in letteratura per confermare tale funzione (Hitachi, 2014; . van de Worp, 2018; van de Worp, 2020), mentre mancano ancora evidenze che possano suggerirne un ruolo patogenetico nella cachessia.

1.7.3 *Altri miRNA coinvolti nei pathways di "muscle wasting"*

Il **miR15b**, il **miR21** e la famiglia **miR29** non sono prodotti in modo specifico dalle miofibre, ma negli ultimi anni studi sperimentali hanno dimostrato che tali miRNA hanno un ruolo nell'omeostasi del tessuto muscolare (Soriano-Arroquia, 2016; Moraes, 2017; Calore, 2018; Liu, 2018). Il miR15b sembrerebbe avere un ruolo nella progressione ed invasione tumorale poiché tra i suoi bersagli molecolari ci sono inibitori delle metalloproteasi (Zhang, 2015; Li, 2016). Oltre che a livello delle cellule tumorali, il miR15b agisce in diversi tipi cellulari (e.g. cardiomiociti e fibroblasti), studi su modelli sperimentali (*in vitro* ed *in vivo*) hanno dimostrato che lo stress ossidativo è in grado di determinare la riduzione dei livelli di miR15b, alterando i processi di riparazione della doppia elica del DNA e accentuando lo squilibrio redox all'interno della cellula (Simone, 2009). La riduzione del miR15b determinerebbe un aumento di espressione della Sirtuina4 (SIRT4) con conseguente aumento della permeabilità della membrana mitocondriale e attivazione dell'apoptosi cellulare (Lang, 2016; Liu, 2018).

Il miR21 sembrerebbe essere rilasciato in circolo prevalentemente dalle cellule tumorali. Esperimenti *in vitro* ed *in vivo* suggeriscono che, quando circolante, tale miRNA possa entrare nelle miofibre, interagire con i Toll-Like Receptor7/8 (TLR7 o TLR8), attivare la via di segnalazione c-junK/ NF-kB e determinare l'aumento di espressione di Atrogin1 e MURF1 portando all'atrofia muscolare (He, 2013; Soares, 2014; Camargo, 2015; Calore, 2018). Tuttavia, studi *in vitro* hanno dimostrato che il solo aumento dei livelli circolanti e/o tissutali di miR21, non è sufficiente a determinare la riduzione della sintesi proteica e l'attivazione della atrofia muscolare. Affinché questo avvenga, è necessario il sinergistico aumento tissutale di un myomiRNA: il miR206 (Sacheck, 2007; Soares, 2014). Inoltre, il miR21 all'interno del tessuto muscolare scheletrico, sembrerebbe indurre anomalie anche nella biogenesi mitocondriale, poiché uno dei suoi bersagli molecolari è il fattore YY1 (Soares, 2014).

La famiglia dei miR29 comprende miR29a, miR29b e miR29c (Wang, 2013). Questi miRNA sembrerebbero essere coinvolti sia nella regolazione dei processi di biogenesi mitocondriale, poiché uno dei loro bersagli molecolari è il fattore YY1 (Wang, 2011; Schiaffino, 2013), ma anche nei processi di differenziamento dei mioblasti (Winbanks, 2011). Inoltre, il miR29a può essere anch'esso prodotto dalle cellule tumorali e rilasciato in circolo promuoverebbe processi di atrofia muscolare con le stesse modalità descritte per il miR21 (Calore, 2018). Recentemente, *Moraes* e colleghi hanno dimostrato che i miR29a/b svolgono un ruolo nei processi di rimodellamento della ECM, poiché hanno come bersagli molecolari mRNA che codificano per le proteine della matrice, incluse le diverse isoforme di collagene. Attraverso esperimenti *in vitro* ed *in vivo* (su modelli murini di cachessia cardiaca), è stato osservato che entrambi i miRNA sono ridotti a livello tissutale con conseguente transdifferenziamento dei mioblasti in miofibroblasti ed aumento di fibrosi intramuscolare. Inoltre, in questo studio è stato dimostrato che aumentando l'espressione del miR29a e miR29b tale fibrosi può essere ridotta (Moraes, 2017).

Infine, l'aumento dei livelli circolanti dei miR29a e miR21 sembrerebbe promuovere l'attivazione della via JNK/NF-kB mediata dai TLR, anche nelle cellule del sistema immunitario, con conseguente rilascio di citochine pro-infiammatorie (specialmente IL-6 e TNF- α) (Marinho, 2018) (Figura 8).

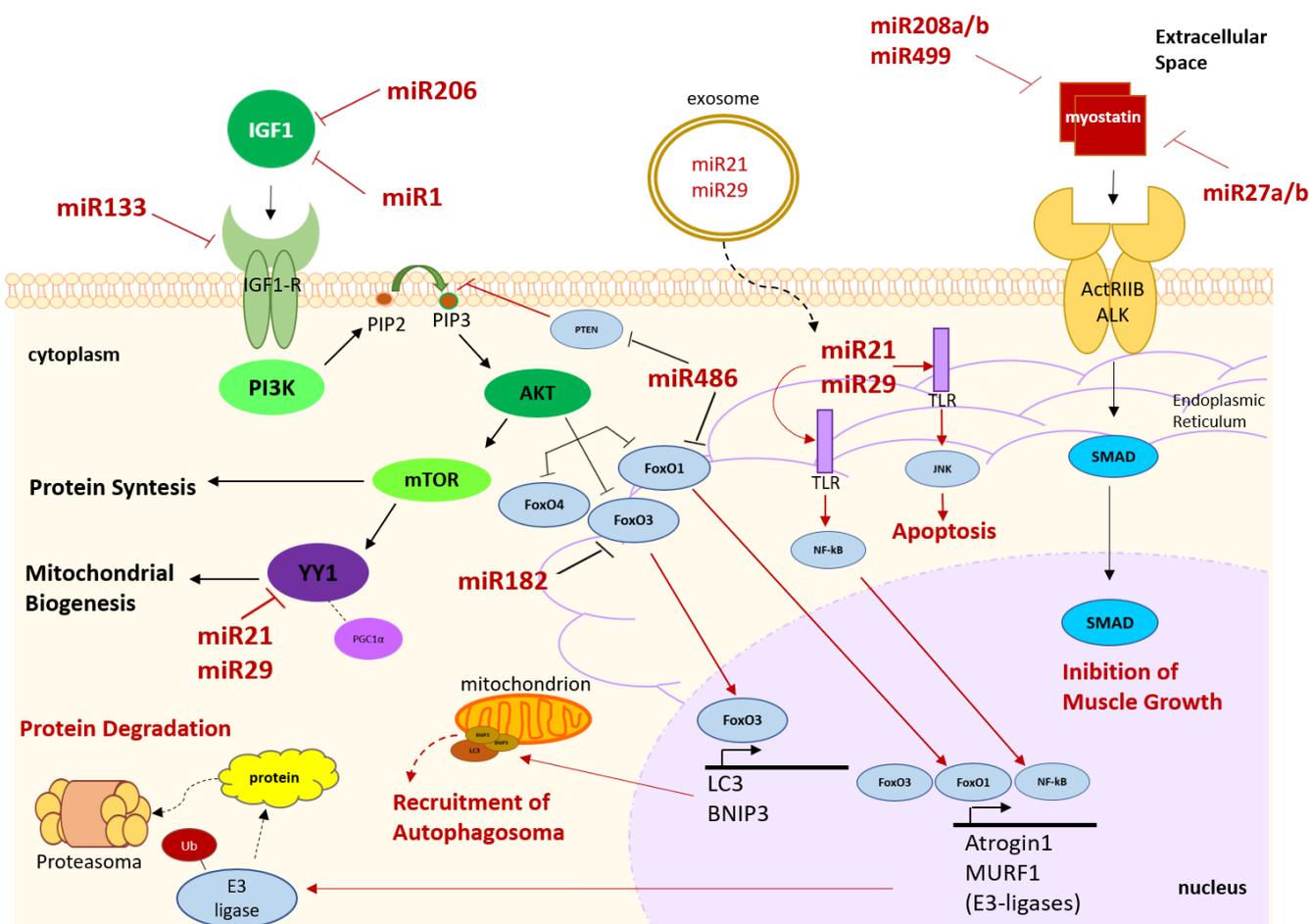


Figura 8. Rappresentazione schematica dei miRNA coinvolti nella regolazione dei processi di atrofia e crescita muscolare. Studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che livelli circolanti elevati dei miR1, miR133a/b e miR206 regolano negativamente la via di segnalazione IGF1/Akt/mTOR, attraverso il legame di tali miRNA con i regolatori positivi della via, IGF1 e IGF1R, promuovendo la degradazione delle miofibre. Anche la riduzione dei livelli tissutali dei miR486 e miR182 sembrerebbe promuovere atrofia muscolare, a causa dell'attivazione di PTEN e dei fattori di trascrizione FoxO che determinano, rispettivamente, inibizione della sintesi, degradazione proteica e mitofagia. miR21 e miR29 contenuti all'interno degli esosomi possono penetrare all'interno della miofibra determinando: i) attivazione della via c-JNK mediata dai TLR7/8 che induce apoptosi delle miofibre ii) attivazione della via NF-κB che, migrando nel nucleo, promuove la trascrizione delle E3 ligasi, responsabili della degradazione proteica. L' aumento dei miR21 e miR29 nel tessuto muscolare scheletrico è inoltre responsabile dell'inibizione della biogenesi mitocondriale. Infine, i miR27a/b, miR208a/b e miR499 sembrerebbero essere in grado di regolare la crescita delle miofibre attraverso l'inibizione della via di segnalazione Miostatina/Smad. Le frecce rosse indicano i pathways che portano al "muscle wasting". Le linee rosse indicano la funzione inibitoria dei miRNA nei pathways di crescita muscolare. Le frecce nere indicano la funzione dei mediatori molecolari in condizioni fisiologiche.

2 RATIONALE DEL PROGETTO DI RICERCA

Nonostante la cachessia sia una sindrome metabolica identificata molto tempo fa (Muscaritoli, 2010), la sua definizione ha una età più recente (Fearon, 2011). Ad oggi, la diagnosi di cachessia si basa su metodi di tipo osservazionale, che ne determinano l'identificazione in uno stadio tardivo rispetto alle alterazioni metaboliche che portano ad una riduzione della massa muscolare scheletrica ed al ridotto introito calorico. La mancanza di "biomarker" specifici, comuni alla cachessia associata alle diverse patologie primarie, contribuisce a ritardarne la diagnosi.

La principale caratteristica della cachessia è la perdita involontaria del peso corporeo, determinata da una riduzione della massa muscolare scheletrica (con o senza diminuzione del tessuto adiposo) (Muscaritoli, 2010). La scoperta dei miRNA nei fluidi biologici, le modulazioni riscontrate in numerose e diverse patologie, nonché il loro ruolo come regolatori dell'espressione genica, rendono queste molecole attraenti per molti gruppi di ricerca sia come potenziali biomarcatori prognostici e predittivi del decorso patologico, che come potenziali bersagli terapeutici. Negli ultimi anni alcuni gruppi che studiano modelli sperimentali di cachessia oncologica e cardiaca (He, 2014; Soares, 2014; Lee, 2017; Moraes, 2017, Calore, 2018), si sono approcciati all'analisi delle modulazioni del profilo dei miRNA, coinvolti nei processi di atrofia muscolare.

Questa tesi prende spunto proprio da queste evidenze di letteratura, analizzando le variazioni dei miRNA coinvolti nei pathways di "muscle wasting" nell'uomo.

SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo di questo studio è stato quello di analizzare miRNA e citochine espressi in pazienti con cachessia oncologica e da scompenso cardiaco, al fine di identificare eventuali profili di espressione comuni o "signatures" peculiari di ciascuna di queste condizioni. La modulazione peculiare di queste molecole nella cachessia associata al tipo di malattia primaria potrebbe, allo stesso modo, fornire informazioni importanti sulla patofisiologia di tale devastante condizione patologica. Inoltre, analizzando le citochine sieriche ed il profilo circolante dei miRNA possono essere evidenziate quelle molecole potenzialmente utili come biomarcatori per la diagnosi precoce di cachessia, o da considerare come possibili bersagli terapeutici.

3 MATERIALI E METODI

Il lavoro è stato articolato nelle seguenti fasi:

- Valutazione del profilo di espressione dei miRNA tissutali e circolanti nei pazienti oncologici, mediante NGS. L'obiettivo di questa fase era identificare modulazioni comuni ai due tipi di campioni per poter eseguire una valutazione comparativa dei miRNA circolanti espressi nei pazienti con scompenso cardiaco.
- Analisi di un gruppo ristretto di miRNA potenzialmente coinvolti in pathways di “muscle wasting” sia a livello tissutale che circolante, nei pazienti oncologici. L'obiettivo di questa fase era quello di valutare se le modulazioni osservate nei modelli sperimentali di cachessia fossero presenti anche nell'uomo e se i cambiamenti che avvengono a livello tissutale si riflettono nel torrente sanguigno.
- Valutazione comparativa di miRNA circolanti e citochine in pazienti con cachessia oncologica e da scompenso cardiaco.
- Analisi dell'espressione dei miRNA relativi allo stato della massa muscolare scheletrica in entrambe le coorti di pazienti.

Lo studio è stato condotto su due coorti di soggetti. La prima è costituita da pazienti affetti da neoplasia del tratto gastrointestinale candidati a chirurgia ed il relativo gruppo di controllo (pazienti candidati a chirurgia addominale non oncologica). I soggetti appartenenti a questa coorte sono stati arruolati presso il Dipartimento di Scienze Medico-Chirurgiche, Azienda Ospedaliera Universitaria di Roma Sant'Andrea. La seconda coorte di soggetti è costituita da pazienti affetti da scompenso cardiaco secondo la classificazione riportata dalla New York Heart Association (NYHA; classi II, III e IV) (Ponikowski, 2016) ed il relativo gruppo di controllo (volontari sani). I soggetti appartenenti a questa coorte sono stati arruolati presso il Dipartimento di Medicina Traslazionale e di Precisione, Sapienza Università di Roma - Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico Umberto I.

I criteri di inclusione utilizzati per l'arruolamento dei pazienti oncologici sono stati: età \geq di 18 anni; diagnosi istologica di cancro pancreatico, gastrico o del colon-retto; pazienti naive alla chemioterapia, metastasi linfonodali e/o viscerali; intervento chirurgico programmato e la capacità di esprimere il consenso volontario allo studio. Il relativo gruppo di controllo era costituito da pazienti sottoposti ad un intervento chirurgico dell'addome a seguito di patologie

benigne non acute. I criteri di inclusione erano: età \geq di 18 anni ed una anamnesi negativa per patologie oncologiche in atto o pregresse.

I criteri di inclusione utilizzati per l'arruolamento dei pazienti con scompenso cardiaco sono stati: età \geq di 50 anni; diagnosi di scompenso cardiaco della durata di almeno tre mesi; segni clinici e sintomi di scompenso cardiaco cronico, con una frazione di eiezione del ventricolo sinistro ridotta \leq 40% (Heart Failure reduced Ejection Fraction, HFrEF) o conservata \geq 40% (Heart Failure preserved Ejection Fraction, HFpEF); anamnesi negativa per patologie oncologiche in atto o pregresse e la capacità di esprimere il consenso volontario allo studio. Il relativo gruppo di controllo era costituito da soggetti sani. I criteri di inclusione erano: età \geq 50 anni ed una anamnesi negativa per patologie oncologiche e cardiache in atto o pregresse.

I criteri di esclusione per entrambi le coorti di soggetti sono stati: il rifiuto a partecipare allo studio; concomitante presenza di patologie croniche o acute in grado di determinare una alterazione dei parametri ematochimici o uno stato di malnutrizione, come malattia renale cronica, broncopneumopatia cronica ostruttiva, cirrosi, alterazioni dello stato cognitivo, disfagia e malattie autoimmuni. Lo studio è stato disegnato in accordo con la dichiarazione di Helsinki e ha ottenuto l'approvazione da parte del Comitato Etico locale. Tutte le procedure sono state eseguite previo ottenimento del consenso informato.

3.1 CARATTERISTICHE CLINICHE DEI PAZIENTI

3.1.1 *Pazienti Oncologici*

Sono state raccolte le caratteristiche cliniche e demografiche nonché i parametri antropometrici dei pazienti tra cui età, sesso, peso, altezza e BMI. È stata valutata la massa muscolare scheletrica mediante TC multistrato, la terza vertebra lombare (L3) è scelta come punto di riferimento per la valutazione dei valori di cut-off per la diagnosi di sarcopenia. Sono state inoltre registrate la perdita di peso involontaria riferita ai 6 mesi precedenti la visita, alterazioni dello stato nutrizionale (presenza/assenza di anoressia), presenza di eventuali comorbilità e terapie in atto. Infine, sono stati raccolti i dati clinico-laboratoristici del ricovero tra cui: emocromo, albumina, proteina-C reattiva (CRP) e creatinina.

3.1.2 *Pazienti con Scompenso Cardiaco*

Sono state raccolte le caratteristiche cliniche e demografiche nonché i parametri antropometrici dei pazienti tra cui età, sesso, peso, altezza e BMI. È stata valutata la massa del ventricolo sinistro (Left Ventricular Mass, LVM) e calcolato il valore del Left Ventricular Mass Index (LVMI). È stata registrata la composizione corporea attraverso la Bioimpedenziometria (BIA), anche se per i pazienti con pacemaker non è stato possibile eseguire tale valutazione. Sono state inoltre registrate la perdita di peso involontaria riferita ai 6 mesi precedenti la visita, alterazioni dello stato nutrizionale (presenza/assenza di anoressia), presenza di eventuali comorbilità e terapie in atto. Infine, sono stati raccolti i dati clinico-laboratoristici del ricovero tra cui: emocromo, albumina, proteina-C reattiva (CRP) e creatinina.

3.2 DIAGNOSI DI CACHESSIA, SARCOPENIA E STUDIO DELLA COMPOSIZIONE CORPOREA

3.2.1 *Cachessia, pre-cachessia e sarcopenia nei pazienti Oncologici*

I pazienti oncologici sono stati suddivisi in cachettici e non cachettici, secondo i criteri proposti dalla consensus del 2011 e approvati dalla Società Europea di Nutrizione Clinica e Metabolismo (ESPEN) (Fearon, 2011). Il paziente è stato definito cachettico sulla base della perdita involontaria di peso e in particolare quando fosse presente almeno uno dei 3 criteri per la diagnosi:

- I. Perdita di peso involontaria > del 5% nei precedenti 6 mesi
- II. Perdita di peso involontaria > 2% nei precedenti 6 mesi ed un BMI < 20 kg/m²
- III. Presenza di sarcopenia, associata ad una perdita di peso involontaria > 2%

I pazienti oncologici possono mostrare anche una fase di pre-cachessia (Fearon, 2011) in cui non sono ancora molto evidenti i segni clinici della sindrome. La pre-cachessia viene diagnosticata sulla base della contemporanea presenza di perdita di peso involontaria (nei precedenti 6 mesi) < 5%, anoressia ed alterazione dei parametri ematochimici.

Per la valutazione della sarcopenia nei pazienti oncologici, sono state utilizzate le immagini della TC multistrato, eseguite prima dell'intervento chirurgico. Attraverso il software Slice- O-Matic V5.0 (Tomovision) e l'ausilio di un radiologo, è stato possibile calcolare l'area totale di una sezione trasversale di tessuto muscolare scheletrico a livello della terza vertebra lombare (L3). La L3 è scelta come riferimento per la stima della distribuzione della massa

muscolare totale (Prado, 2008). Tale stima, viene indicata come indice di massa muscolare scheletrica (L3-SMI). I valori di cut-off riportati da *Prado et al.* per l'identificazione della sarcopenia sono $L3-SMI \leq 38.5 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ per le donne e $\leq 52.4 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ per gli uomini. Poiché secondo tali valori, i pazienti oncologici che rientravano nella classificazione di sarcopenia erano più dell'80%, è stato scelto di calcolare attraverso il metodo dei terzili, il valore di L3-SMI che ricadeva nel terzile sesso-specifico più basso (van Dijk, 2017) al fine di identificare pazienti con un grado più avanzato di sarcopenia. In questo modo è stato possibile suddividere i pazienti oncologici in due gruppi, paragonabili in termini di numerosità campionaria (terzile I+II vs terzile III) e valutare il profilo di espressione dei mediatori cellulari rispetto alla massa muscolare scheletrica.

3.2.2 *Cachessia e Sarcopenia nei pazienti con Scompensso Cardiaco*

I pazienti con scompensso cardiaco sono stati suddivisi in cachettici e non cachettici, secondo i criteri proposti da *Anker et al.* ovvero il paziente è stato definito cachettico, quando presentasse perdita involontaria di peso $> 6\%$, riferita ai precedenti 6 mesi (Anker, 2004).

Poiché il 74% dei pazienti con scompensso cardiaco aveva in precedenza subito un intervento di resincronizzazione cardiaca ed era pertanto portatore di pacemaker, per la diagnosi della sarcopenia, non è stato possibile eseguire la valutazione della composizione corporea attraverso la BIA. Pertanto, per i pazienti con scompensso cardiaco, è stato calcolato il valore del Fat Free Mass Index (FFMI, kg/m^2), stimato su età, peso corporeo (kg), altezza (cm) e creatinina urinaria (mg/die), secondo quanto riportato da *Narumi et al.* Tale metodologia è stata precedentemente utilizzata per la diagnosi clinica della sarcopenia in pazienti con scompensso cardiaco (Narumi, 2015). La valutazione della sarcopenia sulla base della stima del FFMI non è influenzata dallo stato edematoso dei pazienti con scompensso cardiaco (Narumi, 2015). A questo punto, stimati i valori di FFMI per i pazienti con scompensso cardiaco, è stato calcolato il valore del terzile sesso-specifico più basso, al fine di identificare i pazienti con scompensso cardiaco sarcopenici (terzile III).

3.3 VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI ANORESSIA IN PAZIENTI ONCOLOGICI E CON SCOMPENSO CARDIACO

La presenza di anoressia, per entrambe le coorti di pazienti, è stata valutata attraverso il FAACT Score, ottenuto dalla compilazione di un questionario validato ed approvato dall'ESPEN. Tale questionario consiste di 12 domande, ognuna con un valore che va da 0 a 5, dove 0 equivale a “per nulla” e 5 a “molto”, in relazione all' appetito e all'assunzione di cibo. Attraverso la compilazione del questionario da parte del paziente, è possibile identificare la presenza di anoressia. Sulla base di studi precedenti (Molfino, 2016; Muscaritoli, 2017), valori di FAACT score ≤ 30 sono stati considerati indicativi di anoressia.

3.4 RACCOLTA, PREPARAZIONE ED ANALISI PER I CAMPIONI DI PAZIENTI ONCOLOGICI E DEL RELATIVO GRUPPO DI CONTROLLO

3.4.1 *Preparazione del Tessuto Muscolare Scheletrico ed estrazione RNA*

Sia per i pazienti oncologici che per i soggetti di controllo, è stato prelevato un campione di tessuto muscolare scheletrico (retto dell'addome), durante le prime fasi dell'intervento chirurgico. Il prelievo di tessuto muscolare, delle dimensioni di 1 cm³ è stato eseguito successivamente all'incisione cutanea, ed è stato immediatamente immerso in azoto liquido e quindi congelato. I campioni di tessuto muscolare scheletrico sono stati conservati a -80° C fino al momento dell'uso.

L'RNA totale è stato estratto da circa 100mg di tessuto muscolare scheletrico, mediante lisi con 1 ml di TRIzol (Thermo Fisher Scientific), seguendo il protocollo fornito dalla ditta e risospeso in 40 µl di acqua “RNAse/DNAse free”. L'RNA estratto dai campioni di tessuto muscolare, sia dei pazienti che dei soggetti di controllo, è stato quantificato mediante Nanodrop 2000 (Thermofisher) e conservato a -80° C, fino al momento della preparazione della Library di cDNA.

3.4.2 *Preparazione dei campioni di Plasma ed isolamento di microvescicole ed esosomi*

Prima dell'operazione chirurgica, sono stati prelevati campioni ematici sia dai pazienti oncologici che dai soggetti di controllo a digiuno. I campioni ematici sono stati raccolti in

provette con EDTA (vacutainers K2EDTA), al fine di separare il plasma. I campioni ematici sono stati centrifugati a 23'000 rpm, per 15 min a Temperatura Ambiente. Da ogni provetta, il plasma è stato diviso in due aliquote di 1 ml ciascuna e conservato a -80° C fino al momento dell'uso. Tutti i campioni ematici sono stati centrifugati e processati entro 2h dal prelievo.

Completata la raccolta dei campioni, sono state isolate le vescicole extracellulari (microvescicole ed esosomi) contenute nel plasma. I campioni sono stati scongelati in ghiaccio e 1.5 ml sono stati centrifugati a 2'000g per 10 min a 4° C. Successivamente, il sovrnatante è stato raccolto e trasferito in tubi da 2 ml (Safe-Lock Tubes 2.0mL, Eppendorf) e centrifugato nuovamente a 10'000g per 30 min a 4° C. Queste due centrifugazioni sono state eseguite al fine di rimuovere i detriti cellulari. Il sovrnatante è stato poi raccolto e trasferito in tubi da ultracentrifuga (Centrifuge Tubes 1X 31/2 in. 25x89 mm, Beckman Coulter) precedentemente lavati con etanolo 100%. Circa 1.5ml di sovrnatante è stato diluito con 33.5 ml di Phosphate-buffered saline (PBS, VWR Life Science) 1X, sterile. I campioni così diluiti sono stati ultracentrifugati a 100'000g per 70 min a 4° C, al fine di pellettare le microvescicole e gli esosomi. Successivamente, il sovrnatante è stato delicatamente rimosso ed il pellet è stato risospeso in 35 ml di PBS 1X e centrifugato nuovamente a 100'000g per 70 min a 4°C. Infine, il PBS è stato rimosso e dal pellet è stato estratto l'RNA mediante l'uso di 1 ml di TRIzol (Thermo Fisher Scientific), in accordo con le istruzioni fornite dalla ditta. L'RNA è stato risospeso in 15 µl di acqua "RNase/DNase free", quantificato mediante Qubit 2.0 Fluorometer, utilizzando il Qubit microRNA Assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ed è stato conservato a -80°C, fino al momento della preparazione della Library di cDNA.

3.4.3 Analisi NGS dei campioni tissutali e plasmatici dei pazienti oncologici e del relativo gruppo di controllo

Per il sequenziamento mediante Next Generation sequencing (NGS), i piccoli trascritti di RNA sono stati convertiti in "barcoded cDNA Libraries". Le Library sono state preparate con NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina (New England BioLabs, USA) e sono state analizzate con Illumina HiSeq2000 platform (Illumina, USA) La medesima procedura di preparazione delle Library di cDNA è stata effettuata sugli RNA estratti sia dai campioni di tessuto muscolare scheletrico, che dalle microvescicole ed esosomi dei 40 soggetti arruolati in questo studio. I campioni per il sequenziamento sono stati preparati ed analizzati presso il laboratorio dell'Università degli studi di Torino, Dipartimento di Scienze Cliniche e

Biologiche, Unità di Medicina Sperimentale e Patologia Clinica; responsabile Prof.ssa P. Costelli. (Per approfondire la metodica NGS vedi Appendice 1)

3.4.4 Validazione dei risultati NGS attraverso Real-Time PCR

I miRNA che sono risultati modulati nei pazienti oncologici rispetto ai soggetti di controllo, sono stati validati mediante analisi in Real-Time PCR, eseguita sull'RNA precedentemente estratto dai campioni di tessuto muscolare scheletrico. 2µg di RNA sono stati retrotrascritti utilizzando miScript PCR kit (Qiagen), il cDNA è stato amplificato utilizzando miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen) ed i primers miScript Primers Assay (Qiagen) per i seguenti miRNA: hsa-miR15b-3p; hsa-miR16-2-3p; hsa-miR142a-3p; hsa-miR144-3p; hsa-miR200b-3p e hsa-miR203a-3p, in accordo con le istruzioni riportate nel protocollo. Il cDNA di ogni campione è stato amplificato in duplicato, analizzato mediante CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad) ed RNU6 (RNA U6 Small Nuclear 1) è stato utilizzato come controllo endogeno. L'espressione relativa dei livelli tissutali dei miRNA è stata calcolata mediante il metodo del delta delta CT (Livak, 2003). Le validazioni mediante Real-Time PCR sono state eseguite presso il laboratorio dell'Università degli studi di Torino, Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Unità di Medicina Sperimentale e Patologia Clinica; responsabile Prof.ssa P. Costelli.

Poiché dalle analisi in NGS non sono risultate differenze tra pazienti e controlli per il profilo di espressione dei miRNA contenuti all'interno delle vescicole extracellulari, non sono state eseguite analisi di validazione.

3.4.5 Analisi in Real-Time PCR di miRNA tissutali potenzialmente coinvolti nei pathways di "muscle wasting"

2µg di RNA precedentemente estratto dal tessuto muscolare scheletrico, sono stati retrotrascritti per ogni campione, utilizzando miScript PCR kit (Qiagen). Il cDNA è stato amplificato utilizzando miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen) ed i primers miScript Primers Assay (Qiagen) per i seguenti miRNA: hsa-miR21-5p; hsa-miR29a-3p; hsa-miR29b-3p; hsa-miR29c-3p; hsa-miR133a-3p; hsa-miR181a-5p; hsa-miR206-3p; hsa-miR375-3p e hsa-miR455-5p, in accordo con le istruzioni fornite dalla ditta. Il cDNA di ogni campione è stato amplificato in duplicato, analizzato mediante CFX Connect Real-Time PCR Detection System

(Biorad) ed RNU6 è stato utilizzato come controllo endogeno. L'espressione relativa dei livelli tissutali dei miRNA è stata calcolata mediante il metodo del delta delta CT (Livak, 2003). Le analisi dei miRNA tissutali sono state svolte in collaborazione con il laboratorio dell'Università degli studi di Torino, Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Unità di Medicina Sperimentale e Patologia Clinica; responsabile Prof.ssa P. Costelli.

3.4.6 Estrazione RNA totale ed analisi in Real-Time PCR di miRNA circolanti coinvolti nei pathways di "muscle wasting"

I campioni di plasma dei pazienti oncologici e del relativo gruppo di controllo sono stati scongelati in ghiaccio, successivamente 250 µl di plasma sono stati raccolti e trasferiti in un nuovo tubo da 2.0 ml (Safe-Lock Tubes 2.0mL, Eppendorf) e centrifugati a 16'000g per 15 min a 4° C, al fine di rimuovere i detriti cellulari. L'RNA totale è stato poi estratto da 200 µl di plasma, attraverso il miRneasy Serum/Plasma kit (Qiagen), come da protocollo. Per confermare la presenza e quantificare i miRNA estratti, i campioni sono stati misurati utilizzando lo spettrofotometro Multiskan Sky (Thermo Scientific). La resa dell'RNA e la purezza è stata valutata utilizzando il software Multiskan Sky (Version 1.055, Thermo Scientific). I campioni di RNA sono stati conservati a -80°C, fino al momento dell'uso.

10ng di RNA estratto dal plasma, sono stati retrotrascritti utilizzando TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis kit (Applied Biosystem), in accordo con le istruzioni fornite dalla ditta. Il cDNA è stato diluito 1:5 in acqua "RNase/DNase free" e analizzato mediante Step-One Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizzando TaqMan Fast Advanced master mix (Applied Biosystems) e le sonde TaqMan miRNA Assay per i seguenti miRNA: hsa-miR15b-3p; hsa-miR21-5p; hsa-miR29a-3p; hsa-miR29b-3p; hsa-miR133a-3p, hsa-miR206 e hsa-miR486-5p. Il cDNA di ogni campione è stato amplificato in duplicato. Il profilo termico era 95° C per 20 sec, seguito da 45 cicli a 95°C per 1 sec e 60°C per 20 sec. hsa-miR16-5p è stato utilizzato come controllo endogeno, dopo aver verificato la stabilità dell'espressione. I dati sono stati elaborati utilizzando il software Step-One v 2.3. L'espressione relativa dei miRNA è stata calcolata mediante il metodo del delta delta CT (Livak, 2003).

3.4.7 Preparazione dei campioni di siero e saggio E.L.I.S.A.

Prima dell'operazione chirurgica, sono stati prelevati campioni ematici sia dai pazienti oncologici che dai soggetti di controllo, a digiuno. I campioni ematici sono stati raccolti in provette con gel separatore, al fine di ottenere il siero. I campioni ematici sono stati centrifugati a 23'000 rpm, per 15 min a Temperatura Ambiente. Da ogni provetta, il siero è stato diviso in due aliquote di 1 ml ciascuna e conservato a -80° C, fino al momento dell'uso. Tutti i campioni ematici sono stati centrifugati e processati entro 2h dal prelievo.

In tutti i partecipanti, i livelli sierici di GDF15 e FGF21 sono stati analizzati mediante saggio ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) Cat. N° DGD150, (R&D) e Cat. N° DF2100 (R&D) rispettivamente. I campioni sono stati scongelati in ghiaccio e diluiti 1:2 per entrambe le citochine, successivamente 100 µl sono stati caricati in doppio nella piastra per il saggio ELISA. Nella stessa piastra è stata caricata anche la curva standard costituita da 8 punti a concentrazioni note della citochina da analizzare, secondo le istruzioni riportate nel protocollo. Ogni punto della curva è stato anch'esso caricato in doppio. La quantità di citochina presente nei campioni è stata rilevata alla lunghezza d'onda (λ) di 450 nm, mediante lo Spettrofotometro Multiskan Sky (Thermo Scientific), attraverso il calcolo di interpolazione della curva standard e della media aritmetica tra i doppietti.

3.5 RACCOLTA, PREPARAZIONE E ANALISI DEI CAMPIONI DI PAZIENTI CON SCOMPENSO CARDIACO E DEL RELATIVO GRUPPO DI CONTROLLO

3.5.1 Preparazione dei campioni di plasma

Sia dai pazienti con scompenso cardiaco che dai soggetti di controllo a digiuno, sono stati prelevati campioni ematici. I campioni sono stati raccolti in provette con EDTA (vacutainers K2EDTA), al fine di separare il plasma. I campioni di sangue sono stati centrifugati a 23'000 rpm, per 15 min a Temperatura Ambiente. Da ogni provetta, il plasma è stato diviso in due aliquote di 1 ml ciascuna e conservato a -80° C, fino al momento dell'uso. Tutti i campioni ematici sono stati centrifugati e processati entro 2h dal prelievo.

3.5.2 Estrazione RNA totale ed analisi in Real-Time PCR di miRNA circolanti coinvolti nei pathways di “muscle wasting”

Completata la raccolta dei campioni di plasma della seconda coorte di soggetti, i campioni sono stati scongelati in ghiaccio. Successivamente 250 µl di plasma sono stati raccolti e trasferiti in un nuovo tubo da 2.0 ml (Safe-Lock Tubes 2.0mL, Eppendorf) e centrifugati a 16'000g per 15 min a 4° C, al fine di rimuovere i detriti cellulari. L'RNA totale è stato poi estratto da 200 µl di plasma, attraverso il miRneasy Serum/Plasma kit (Qiagen), in accordo con il manuale fornito dalla ditta. Per confermare la presenza e quantificare i miRNA estratti, i campioni sono stati misurati utilizzando lo spettrofotometro Multiskan Sky (Thermo Scientific). La resa dell'RNA e la purezza è stata valutata utilizzando il software Multiskan Sky (Version 1.055, Thermo Scientific). I campioni di RNA sono stati conservati a -80° C, fino al momento dell'uso.

10ng di RNA estratto dal plasma sono stati retrotrascritti utilizzando TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis kit (Applied Biosystem), in accordo con le istruzioni fornite dalla ditta. Il cDNA è stato diluito 1:5 in acqua “RNase/DNase free” e analizzato mediante Step-One Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizzando TaqMan Fast Advanced master mix (Applied Biosystems) e le sonde TaqMan miRNA Assay per i seguenti miRNA: hsa-miR15b-3p; hsa-miR21-5p; hsa-miR29a-3p; hsa-miR29b-3p; hsa-miR133a-3p, hsa-miR206 e hsa-miR486-5p. Il cDNA di ogni campione è stato amplificato in duplicato. Il profilo termico era 95° C per 20 sec, seguito da 45 cicli a 95°C per 1 sec e 60°C per 20 sec. hsa-miR16-5p è stato utilizzato come controllo endogeno, dopo aver verificato la stabilità dell'espressione. I dati sono stati elaborati utilizzando il software Step-One v 2.3. L'espressione relativa dei miRNA è stata calcolata mediante il metodo del delta delta CT (Livak, 2003).

3.5.3 Preparazione dei campioni di siero e saggio E.L.I.S.A.

Sia dai pazienti con scompenso cardiaco che dai soggetti appartenenti al gruppo di controllo a digiuno, sono stati prelevati campioni ematici. I campioni sono stati raccolti in provette con gel separatore, al fine di ottenere il siero. I campioni di sangue sono stati centrifugati a 23'000 rpm, per 15 min a Temperatura Ambiente. Da ogni provetta, il siero è stato diviso in due aliquote di 1 ml ciascuna e conservato a -80° C, fino al momento dell'uso. Tutti i campioni ematici sono stati centrifugati e processati entro 2h dal prelievo.

In tutti i partecipanti, i livelli sierici di GDF15 e FGF21 sono stati analizzati mediante saggio ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) Cat. N° ELH-GDF15-1 (RayBiotech) e Cat. N° ELH-FGF21-1 (RayBiotech), rispettivamente. I campioni sono stati scongelati in ghiaccio e diluiti 1:3 per il dosaggio di GDF15 e 1:2 per il dosaggio di FGF21. Successivamente, 100 µl sono stati caricati in doppio nella piastra per il saggio ELISA. Nella stessa piastra è stata caricata anche la curva standard costituita da 8 punti a concentrazioni note della citochina da analizzare, secondo le istruzioni riportate nel manuale. Ogni punto della curva è stato anch'esso caricato in doppio. La quantità di citochina presente nei campioni è stata rilevata alla lunghezza d'onda (λ) di 450 nm, mediante lo Spettrofotometro Multiskan Sky (Thermo Scientific), attraverso il calcolo di interpolazione della curva standard e della media aritmetica tra i doppietti.

3.6 ANALISI STATISTICA

Le caratteristiche dei pazienti sono state descritte come media \pm deviazione standard per le variabili continue che seguono la distribuzione normale. Le variabili che non seguono una distribuzione normale, invece, sono state riportate come mediana con i valori del 25° e 75° percentile (mediana; range IQ). Il test del Chi-Quadro è stato utilizzato per valutare se ci fosse associazione tra variabili categoriche, in particolare per valutare la prevalenza della cachessia e della sarcopenia nei pazienti (oncologici/ con scompenso cardiaco maschi e femmine). Per le variabili continue che seguono una distribuzione normale, per il confronto tra due gruppi, è stato utilizzato il test parametrico T-Test. Invece, per le variabili continue che non seguono una distribuzione normale, per il confronto tra due gruppi, è stato utilizzato il test non parametrico Mann-Whitney U. Per il confronto tra più di due gruppi, è stato utilizzato il test non parametrico ANOVA 1WAY nel caso di variabili continue che seguissero la distribuzione normale, mentre il test ANOVA 1 WAY di Kruskal-Wallis è stato utilizzato per variabili continue che non seguissero la distribuzione normale. Il valore di $p < 0.05$ è stato considerato significativo. Per valutare le relazioni tra due variabili continue è stato utilizzato l'indice di correlazione di Pearson nel caso di variabili che seguissero una distribuzione normale e l'indice di correlazione di Spearman, per variabili che invece non sono normalmente distribuite. Coefficienti di correlazione vicini ad 1.0 (o -1.0) indicano una relazione positiva (o negativa, rispettivamente) tra le due variabili. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con il software SPSS v 25.0. Le tabelle ed i grafici sono state eseguiti utilizzando il pacchetto Microsoft Office (Excel e Power Point).

4 RISULTATI

4.1 CARATTERISTICHE GENERALI DEI PARTECIPANTI ALLO STUDIO

4.1.1 *Pazienti Oncologici e Soggetti di Controllo*

Sono stati arruolati 40 pazienti di cui 25 (62.5%) erano affetti da tumore gastro-intestinale eleggibili per chirurgia, e 15 (37.5%) affetti da patologia chirurgica benigna, considerati come gruppo di controllo. Le caratteristiche dei partecipanti allo studio sono riportate in Tabella 2.

L'età media dei pazienti oncologici era di 71.64 ± 11.23 anni. Il gruppo di controllo era costituito da soggetti affetti da patologia benigna come ernia inguinale o addominale, con età media di 58.13 ± 13.88 anni. I pazienti oncologici mostravano livelli ematici di emoglobina (g/dl) (media \pm DS) e di albumina (g/dl) (mediana; IQ) ridotti nei confronti dei controlli (11.27 ± 2.44 vs 14.01 ± 2.00 ; $p=0.001$ e 3.20 (2.95; 3.55) vs 4.00 (3.70; 4.00); $p < 0.001$, rispettivamente). Inoltre, i pazienti oncologici mostravano una perdita involontaria di peso corporeo (% in 6 mesi), più elevata rispetto ai soggetti di controllo (4.23 (3.41; 8.20) vs 0.00 (0.00;0.00); $p < 0.001$). Nonostante la differenza non risultasse statisticamente significativa, i pazienti oncologici mostravano una tendenza ad avere livelli circolanti di CRP (mg/dl), maggiori rispetto ai controlli (1.42 (0.20; 3.46) vs 0.27 (0.18; 0.50), $p= 0.050$). I due gruppi risultavano comparabili per sesso e BMI e non mostravano differenze nei valori di creatinina sierica (Tabella 2).

Dei 25 pazienti con tumore gastro-intestinale, 9 (36%) erano affetti da tumore pancreatico, 9 (36%) da tumore del colon-retto e 7 (28%) da tumore gastrico. Stratificando per tipo di tumore, i livelli di emoglobina (media \pm DS) sia dei pazienti con tumore gastrico che dei pazienti con tumore del colon-retto risultavano ridotti nei confronti dei controlli (10.00 ± 2.91 vs 14.01 ± 2.00 ; $p= 0.002$ e 11.02 ± 2.46 vs 14.01 ± 2.00 , $p= 0.013$, rispettivamente). Non erano presenti differenze nei livelli di emoglobina dei pazienti affetti da tumore del pancreas rispetto ai controlli ($p > 0.05$). I pazienti con tumore pancreatico mostravano un aumento (mediana; range IQ) dei livelli circolanti di CRP rispetto ai controlli (1.56 (0.36; 3.85) vs 0.27 (0.18; 0.50); $p= 0.008$). Non erano presenti differenze nei livelli di CRP tra i pazienti con tumore gastrico e del colon ($p > 0.05$). I livelli sierici di Creatinina erano più elevati nei pazienti con tumore gastrico, sia nei confronti dei controlli (1.27 (0.88; 2.15) vs 0.79 (0.70; 0.98), $p= 0.041$) che dei pazienti con tumore pancreatico (1.27 (0.88; 2.15) vs 0.70 (0.65; 0.97); $p= 0.048$). Non sono state osservate differenze significative tra i tre gruppi di pazienti oncologici per i livelli sierici di

albumina, per i valori di BMI ed in termini di perdita di peso involontaria (% in 6 mesi) ($p > 0.05$).

4.1.2 *Prevalenza di Cachessia e Sarcopenia nei pazienti oncologici*

Nel gruppo dei pazienti oncologici, 15 (60%) risultavano cachettici, con un valore mediano di perdita di peso involontaria a 6 mesi del 6.38 (4.11; 8.47) %. Tra i pazienti affetti da tumore pancreatico la cachessia è stata diagnosticata nel 70% dei casi, così come per i pazienti affetti da tumore del colon-retto, mentre tra i pazienti affetti da tumore gastrico il 43% risultavano cachettici. Dei 15 pazienti cachettici, 8 (53%) erano maschi e 7 (47%) erano femmine. 10 (40%) pazienti neoplastici risultavano non cachettici e di questi 4 (40%) erano maschi e 6 (60%) femmine.

I pazienti cachettici mostravano livelli circolanti di CRP più elevati (mediana; range IQ) rispetto ai controlli (1.80 (0.39; 3.80) vs 0.27 (0.18; 0.50); $p = 0.016$), mentre mostravano una riduzione (media \pm SD) dei livelli ematici di emoglobina rispetto ai controlli (10.90 ± 2.36 vs 14.01 ± 2.00 ; $p = 0.002$). Anche i pazienti non cachettici mostravano una tendenza alla riduzione dei livelli ematici di emoglobina rispetto ai controlli, sebbene non fosse statisticamente significativa (11.83 ± 2.60 vs 14.01 ± 2.00 ; $p = 0.063$). Entrambe i gruppi di pazienti (cachettici e non cachettici) mostravano una riduzione (mediana; range IQ) dell'albumina sierica, rispetto ai soggetti di controllo (3.20 (2.90; 3.60) vs 4.00 (3.70; 4.00); $p = 0.014$ e 3.40 (2.85; 3.58) vs 4.00 (3.70; 4.00); $p = 0.002$, rispettivamente). Tra i pazienti cachettici e non cachettici, non erano state osservate differenze per i livelli circolanti di albumina, emoglobina, creatinina né per i valori di BMI ed L3-SMI ($p > 0.05$) (Tabella 3).

I valori mediani di L3-SMI dei pazienti oncologici erano 34.75 (32.48; 44.73) negli uomini e 29.19 (24.65; 36.65) nelle donne. Secondo i valori di cut-off indicati da *Prado et al.* (Prado, 2008), i pazienti maschi che mostrano un valore di L3-SMI ≤ 52.4 cm²/m² e le pazienti femmine con L3-SMI ≤ 38.5 cm²/m² sono definiti sarcopenici. Poiché più dell'80% dei pazienti oncologici risultavano sarcopenici, sono stati considerati i valori di L3-SMI che ricadevano nel terzile inferiore sesso-specifico, per identificare i pazienti con uno stato più avanzato di sarcopenia. Sulla base di questa classificazione, tali pazienti sarcopenici appartengono al III terzile sesso-specifico, e mostravano livelli di L3-SMI inferiori o uguali a 33.75 cm²/m², per gli uomini e inferiori o uguali a 28.56 cm²/m² per le donne. I pazienti sarcopenici appartenenti al

III terzile erano 9 (36%), 4 (44%) maschi con un valore medio di L3SMI di 26.93 (\pm 2.21) e 5 (56%) femmine, con un valore medio di L3SMI di 25.65 (\pm 2.68). Tra i pazienti affetti da tumore pancreatico il 44% ricadeva nel III terzile, così come per i pazienti con il tumore del colon-retto. Solo il 12% dei pazienti con tumore gastrico apparteneva al III terzile. I pazienti appartenenti al I + II terzile, erano 16 (64%), 8 (50%) maschi e 8 (50%) femmine, di cui il 31% con tumore del pancreas, il 31% del colon-retto e il 38% con tumore gastrico. Inoltre, i 9 (100%) pazienti sarcopenici appartenenti al III terzile erano tutti cachettici, mentre dei 16 pazienti sarcopenici appartenenti al I + II terzile, 6 (37.5%) erano cachettici.

I pazienti sarcopenici appartenenti al III terzile mostravano un aumento (mediana; range IQ) dei livelli circolanti di CRP rispetto ai soggetti di controllo (2.88 (0.68; 3.85) vs 0.27 (0.18; 0.50); $p= 0.036$). Entrambi i gruppi di pazienti (sarcopenici appartenenti al III terzile e al I + II terzile) mostravano una significativa riduzione (media \pm DS) dei livelli ematici di emoglobina rispetto ai soggetti di controllo (10.57 ± 2.07 vs 14.01 ± 2.00 ; $p= 0.003$ e 11.67 ± 2.61 vs 14.01 ± 2.00 ; $p= 0.008$, rispettivamente). Anche per i livelli sierici di albumina era stata riscontrata una differenza tra i gruppi. Entrambi i gruppi di pazienti (sarcopenici appartenenti al III terzile e al I + II terzile) infatti, mostravano una significativa riduzione (mediana; range IQ) dell'albumina sierica rispetto ai controlli (3.10 (2.45; 3.50) vs 4.00 (3.70; 4.00); $p= 0.005$ e 3.35 (3.03; 3.73) vs 4.00 (3.70; 4.00); $p= 0.004$, rispettivamente). Infine, i due gruppi di pazienti sarcopenici (III terzile vs I + II terzile) non mostravano tra loro differenze né in termini di perdita di peso involontaria e BMI, né per i livelli circolanti di CRP, albumina, emoglobina e creatinina ($p > 0.05$) (Tabella 4).

4.1.3 Pazienti con Scompenso Cardiaco e soggetti di controllo

Sono stati arruolati 44 soggetti di cui 27 (61%) erano affetti da scompenso cardiaco, appartenenti alle classi NYHA II (11%), III (30%), IV (59%) e 17 (39%) soggetti sani, considerati come gruppo di controllo. Le caratteristiche dei partecipanti allo studio sono riportate in Tabella 5.

L'età media dei pazienti con scompenso cardiaco era di 79.00 ± 7.18 anni, mentre per i soggetti di controllo l'età media era di 57.65 ± 11.08 anni. I pazienti con scompenso cardiaco, sia maschi che femmine, mostravano un Left Ventricular Mass Index (LVMI) medio maggiore rispetto ai controlli (maschi= 164.00 ± 43.22 vs 101.80 ± 11.58 , $p= 0.002$; femmine = 155.73 ± 43.61 vs 86.67 ± 10.21 ; $p= 0.002$). Inoltre, i pazienti con scompenso cardiaco mostravano una riduzione

involontaria del peso (% in 6 mesi), più elevata (mediana; range IQ) rispetto ai controlli (1.10 (0.00; 6.99) vs 0.00 (0.00; 0.00); $p= 0.001$). I due gruppi risultavano comparabili per sesso e BMI ($p > 0.05$).

4.1.4 Prevalenza di Cachessia e Sarcopenia nei pazienti con Scompenso

Cardiaco

Nel gruppo dei pazienti con scompenso cardiaco, 10 (37%) risultavano cachettici, con un valore mediano di perdita involontaria di peso a 6 mesi, del 7.47 (6.38; 11.65) %. Di questi, 6 (60%) erano maschi e 4 (40%) erano femmine. I pazienti cachettici mostravano un aumento (mediana; range IQ) dei livelli sierici di CRP rispetto ai pazienti non cachettici (2.69 (1.56; 8.57) vs 1.06 (0.13; 2.37); $p= 0.030$). Inoltre, le pazienti cachettiche femmine, mostravano un LVMI medio molto più elevato (media \pm DS) dei controlli, sia maschi (192.67 ± 366 vs 101.80 ± 11.58 ; $p= 0.014$) che femmine (192.67 ± 366 vs 86.67 ± 10.21 ; $p= 0.010$). Mentre erano i pazienti maschi non cachettici a mostrare un LVMI medio più elevato nei confronti dei controlli, maschi e femmine (188.67 ± 50.21 vs 101.80 ± 11.58 ; $p= 0.020$ e 188.67 ± 50.21 vs 86.67 ± 10.21 ; $p= 0.014$, rispettivamente). Tra i due gruppi di pazienti (cachettici e non cachettici) non erano presenti differenze per i livelli circolanti di albumina, emoglobina e creatinina, né per i valori di LVMI, FFMI e BMI ($p > 0.05$) (Tabella 6).

I valori mediani di FFMI dei pazienti con scompenso cardiaco erano 19.80 (18.76; 20.67) negli uomini e 19.53 (17.37; 20.73) nelle donne. Per identificare i pazienti sarcopenici, sono stati considerati i valori di FFMI stimato (Narumi, 2015) che ricadevano nel terzile inferiore sesso-specifico, poiché 20 (74%) dei pazienti con scompenso cardiaco era portatore di pacemaker. Per i pazienti con scompenso cardiaco senza pacemaker e per i soggetti di controllo è stato possibile misurare tramite BIA il FFMI, che ha mostrato una ottima correlazione con il FFMI calcolato, come riportato in Figura 9 ($R= 0.806$; $p= 0.0005$). Tale correlazione dimostra che i valori di FFMI calcolati, sono sovrapponibili ai valori di FFMI misurati, pertanto utilizzabili per la valutazione della sarcopenia. Sulla base di tale classificazione i pazienti sarcopenici (III terzile) mostravano valori di FFMI ≤ 19.54 kg/m² per gli uomini e ≤ 18.50 kg/m² per le donne. I pazienti sarcopenici erano 10 (37%), 4 (40%) maschi, con un valore medio di FFMI di $18.60 (\pm 0.82)$; e 6 (60%) femmine, con un valore medio di FFMI di $18.60 (\pm 0.82)$. I pazienti non sarcopenici erano 17 (63%), 6 (35%) maschi e 11 (65%) femmine. I pazienti sarcopenici maschi mostravano un valore medio di LVMI più elevato sia

dei controlli maschi (183.50 ± 43.72 vs 101.80 ± 11.58 ; $p= 0.030$) che dei controlli femmine (183.50 ± 43.72 vs 86.67 ± 10.21 ; $p= 0.022$). Nonostante la differenza non risultasse statisticamente significativa, anche le pazienti sarcopeniche femmine mostravano una tendenza all'aumento dei livelli medi di LVMI sia rispetto i controlli maschi (172.00 ± 47.94 vs 101.80 ± 11.58 ; $p= 0.079$) che femmine (172.00 ± 47.94 vs 86.67 ± 10.21 ; $p= 0.053$). Non erano presenti differenze per i valori di LVMI tra i pazienti sarcopenici e non sarcopenici ($p > 0.05$). I pazienti sarcopenici mostravano un valore di BMI (mediana; range IQ) ridotto sia verso i controlli (21.86 (18.98 ; 23.60) vs 25.02 (23.87 ; 26.86); $p= 0.010$), sia rispetto i pazienti non sarcopenici (21.86 (18.98 ; 23.60) vs 26.06 (24.90 ; 29.14); $p < 0.001$). Tra i due gruppi di pazienti (sarcopenici e non sarcopenici) non erano state osservate differenze per i livelli circolanti di CRP, albumina, emoglobina e creatinina, in termini di perdita involontaria di peso né per i valori di BMI ($p > 0.05$) (Tabella 7).

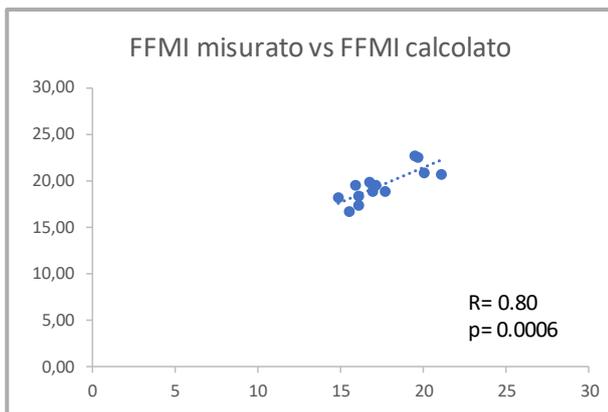


Figura 9. Regressione lineare che mostra la correlazione tra valore del FFMI misurato attraverso la BIA e calcolato secondo la formula indicata da Narumi *et al.* (2015)

Partecipanti N= 40	Pazienti Oncologici N= 25	Controlli N= 15	p-value
Maschi/Femmine	12/ 13	6/ 9	p= 0.622
Età, anni	71.64 ± 11.23	58.13 ± 13.88	p= 0.002
BMI, kg/ m ²	27.03 ± 3.22	28.00 ± 4.25	p= 0.451
Perdita peso (% in 6 mesi)	4.23 (3.41; 8.20)	0.00 (0.00;0.00)	p < 0.001
CRP, mg/dl	1.42 (0.20; 3.46)	0.27 (0.18; 0.50)	p= 0.050
Emoglobina, g/dl	11.27 ± 2.44	14.01 ± 2.00	p= 0.001
Albumina, g/dl	3.20 (2.95; 3.55)	4.00 (3.70; 4.00)	p < 0.001
Creatinina, mg/dl	0.83 (0.72; 1.26)	0.79 (0.70; 0.98)	p= 0.391
<i>Tipo di tumore:</i>			
Pancreas, n (%)	9 (36)		
Colon, n (%)	9 (36)		
Stomaco, n (%)	7 (28)		

Tabella 2. Caratteristiche cliniche dei pazienti oncologici e dei controlli. I valori sono riportati come media ± deviazione standard, oppure come mediana (range interquartile).

Partecipanti N= 45	Pazienti Cachettici N= 15	Pazienti Non Cachettici N= 10	Controlli N= 15	p- value
Maschi/Femmine	8/ 7	4/ 6	6/ 9	p= 0.714
Età, anni	71.73 ± 12.17	71.50 ± 10.27	58.13 ± 13.88	p= 0.008
BMI, kg/ m ²	26.30 ± 2.84	28.12 ± 3.61	28.00 ± 4.25	p= 0.344
Perdita peso (% in 6 mesi)	6.38 (4.11; 8.47)	3.87 (3.16; 4.33)	0.00 (0.00;0.00)	p< 0.001
L3-SMI, cm ² / m ² Maschi*	33.86 (26.44; 46.29)	34.89 (34.60; 34.89)	-	p= 0.330
L3-SMI, cm ² / m ² Femmine*	28.56 (24.04; 23.71)	32.10 (29.07; 39.79)	-	
CRP, mg/dl	1.80 (0.39; 3.80)	0.88 (0.10; 2.56)	0.27 (0.18; 0.50)	p= 0.061
Emoglobina, g/dl	10.90 ± 2.36	11.83 ± 2.60	14.01 ± 2.00	p= 0.002
Albumina, g/dl	3.20 (2.90; 3.60)	3.40 (2.85; 3.58)	4.00 (3.70; 4.00)	p= 0.001
Creatinina, mg/dl	0.81 (0.70;1.31)	0.91 (0.72; 1.13)	0.79 (0.70; 0.98)	p= 0.669

Tabella 3. Caratteristiche cliniche dei partecipanti. I pazienti oncologici sono suddivisi in cachettici e non cachettici. I valori sono riportati come media ± deviazione standard, oppure come mediana (range interquartile). Per i valori di L3SMI il confronto è stato fatto tra i gruppi di pazienti maschi e femmine, poiché per i controlli non è stata eseguita la TC-multistrato.

* Valori di cut-off sarcopenia secondo Prado et al. (2008): L3-SMI ≤ 52.40 cm²/ m² per i maschi; L3-SMI ≤ 38.50 cm²/ m² per le femmine.

Partecipanti N= 45	Pazienti Sarcopenici (III) N= 9	Pazienti Sarcopenici (I + II) N= 16	Controlli N= 15	p- value
Maschi/Femmine	4/ 5	8/ 8	6/ 9	p= 0.855
Età, anni	77.26 ± 7.23	68.31 ± 11.87	58.13 ± 13.88	p= 0.041
BMI, kg/ m ²	26.24 ± 3.32	27.48 ± 3.19	28.00 ± 4.25	p= 0.336
Perdita peso (% in 6 mesi)	4.17 (2.30; 7.43)	5.05 (3.60; 8.20)	0.00 (0.00;0.00)	p< 0.001
L3-SMI, cm ² / m ² Maschi*	26.93 ± 2.21	42.07 ± 8.12	-	p < 0.001
L3-SMI, cm ² / m ² Femmine*	25.65 ± 2.68	33.89 ± 5.14	-	
CRP, mg/dl	2.88 (0.68; 3.85)	0.50 (0.10; 3.00)	0.27 (0.18; 0.50)	p= 0.042
Emoglobina, g/dl	10.57 ± 2.07	11.67 ± 2.61	14.01 ± 2.00	p= 0.002
Albumina, g/dl	3.10 (2.45; 3.50)	3.35 (3.03; 3.73)	4.00 (3.70; 4.00)	p= 0.001
Creatinina, mg/dl	0.81 (0.72; 1.49)	0.86 (0.71; 1.12)	0.79 (0.70; 0.98)	p= 0.660

Tabella 4. Caratteristiche cliniche dei partecipanti. I pazienti oncologici sarcopenici sono suddivisi in relazione allo stato della massa muscolare. I valori sono riportati come media ± deviazione standard, oppure come mediana (range interquartile). Per i valori di L3SMI il confronto è stato fatto tra i gruppi di pazienti maschi e femmine, poiché per i controlli non è stata eseguita la TC-multistrato.

* Valori di cut-off sarcopenia secondo Prado et al. (2008): L3-SMI ≤ 52.40 cm²/ m² per i maschi; L3-SMI ≤ 38.50 cm²/ m² per le femmine.

Partecipanti N= 44	Pazienti con Scopenso Cardiaco (classi NYHA II, III e IV) N= 27	Controlli N= 17	p - value
Maschi/ Femmine	10/ 17	7/ 10	p= 0.784
Età, anni	79.00 ± 7.18	57.65 ± 11.08	p= 0.001
BMI, kg/ m ²	25.02 (22.51; 26.51)	25.02 (23.87; 26.86)	p= 0.638
Perdita peso (% in 6 mesi)	1.10 (0.00; 6.99)	0.00 (0.00; 0.00)	p = 0.001
FFMI, kg/ m ² Maschi	19.80 (18.76; 20.67)	19.94 (19.49; 20.67)	p= 0.564
FFMI, kg/ m ² Femmine	19.53 (17.37; 20.73)	18.97 (18.24; 20.45)	
LVMI, g/ m ² Maschi	164.00 ± 43.22	101.80 ± 11.58	p = 0.002
LVMI, g/m ² Femmine	155.73 ± 43.61	86.67 ± 10.21	

Tabella 5. Caratteristiche cliniche dei pazienti con scopenso cardiaco e controlli sani. I valori sono riportati come media ± deviazione standard, oppure come mediana (range interquartile).

Partecipanti N= 44	Pazienti Cachettici N= 10	Pazienti Non Cachettici N= 17	Controlli N= 17	p- value
Maschi/ Femmine	6 / 4	4 / 13	7/ 10	p= 0.165
Età, anni	77.60 ± 6.85	79.82 ± 7.45	57.65 ± 11.08	p < 0.001
BMI, (kg/ m ²)	23.70 ± 4.13	25.71 ± 3.45	25.02 (23.87; 26.86)	p= 0.484
Perdita peso (% in 6 mesi)	7.47 (6.38; 11.65)	0.00 (0.00; 0.98)	0.00 (0.00; 0.00)	p < 0.001
CRP, mg/ dl	2.69 (1.56; 8.57)	1.06 (0.13; 2.37)	-	p= 0.030
Albumina, g/dl	3.50 (3.2; 3.75)	3.80 (3.20; 4.00)	-	p= 0.182
Creatinina, mg/dl	0.99 (0.86; 1.75)	0.93 (0.73; 1.24)	-	p= 0.386
Emoglobina, g/dl	11.28 ± 1.65	11.35 ± 1.57	-	p= 0.911
FFMI, kg/ m ² Maschi	19.98 ± 1.87	19.68 ± 0.59	19.94 (19.49; 20.67)	p= 0.640
FFMI, kg/ m ² Femmine	18.50 ± 1.33	19.76 ± 2.17	18.97 (18.24; 20.45)	
LVMI, g/ m ² Maschi	145.50 ± 31.48	188.67 ± 50.21	101.80 ± 11.58	p= 0.002
LVMI, g/m ² Femmine	192.67 ± 36.61	141.88 ± 39.11	86.67 ± 10.21	

Tabella 6. Caratteristiche cliniche pazienti con scompenso cardiaco suddivisi in cachettici e non cachettici. I valori sono riportati come media ± deviazione standard, oppure come mediana (range interquartile).

Partecipanti N= 27	Pazienti Sarcopenici N= 10	Pazienti Non Sarcopenici N= 17	Controlli N= 17	p- value
Maschi/ Femmine	4/ 6	6/ 11	7/ 10	p= 0.935
Età, anni	79.00 ± 7.66	78.00 ± 7.13	57.65 ± 11.08	p < 0.001
BMI, kg/ m ²	21.86 (18.98; 23.60)	26.06 (24.90; 29.14)	25.02 (23.87; 26.86)	p < 0.001
Perdita peso (% in 6 mesi)	1.38 (0.00; 5.58)	1.10 (0.00; 7.12)	0.00 (0.00; 0.00)	p= 0.001
CRP, mg/dl	1.81 (0.54; 6.97)	1.45 (0.24; 4.89)	-	p= 0.653
Albumina, g/dl	3.60 (3.20; 3.80)	3.55 (3.20; 4.08)	-	p= 0.751
Creatinina, mg/dl	0.99 (0.84; 1.26)	0.93 (0.77; 1.35)	-	p= 0.902
Emoglobina, g/dl	11.10 ± 1.43	11.46 ± 1.67	-	p= 0.098
FFMI, kg/ m ² Maschi	18.60 ± 0.82	20.70 ± 1.11	19.94 (19.49; 20.67)	p= 0.001
FFMI, kg/ m ² Femmine	17.40 ± 0.59	20.59 ± 1.58	18.97 (18.24; 20.45)	
LVMI, g/ m ² Maschi	183.50 ± 43.72	138.00 ± 31.05	101.80 ± 11.58	p= 0.008
LVMI, g/m ² Femmine	172.00 ± 47.94	146.43 ± 41.75	86.67 ± 10.21	

Tabella 7. Caratteristiche cliniche pazienti con scompenso cardiaco suddivisi in sarcopenici e non sarcopenici. I valori sono riportati come media ± deviazione standard, oppure come mediana (range interquartile).

4.2 TESSUTO MUSCOLARE SCHELETRICO DEI PAZIENTI ONCOLOGICI E DEL RELATIVO GRUPPO DI CONTROLLO

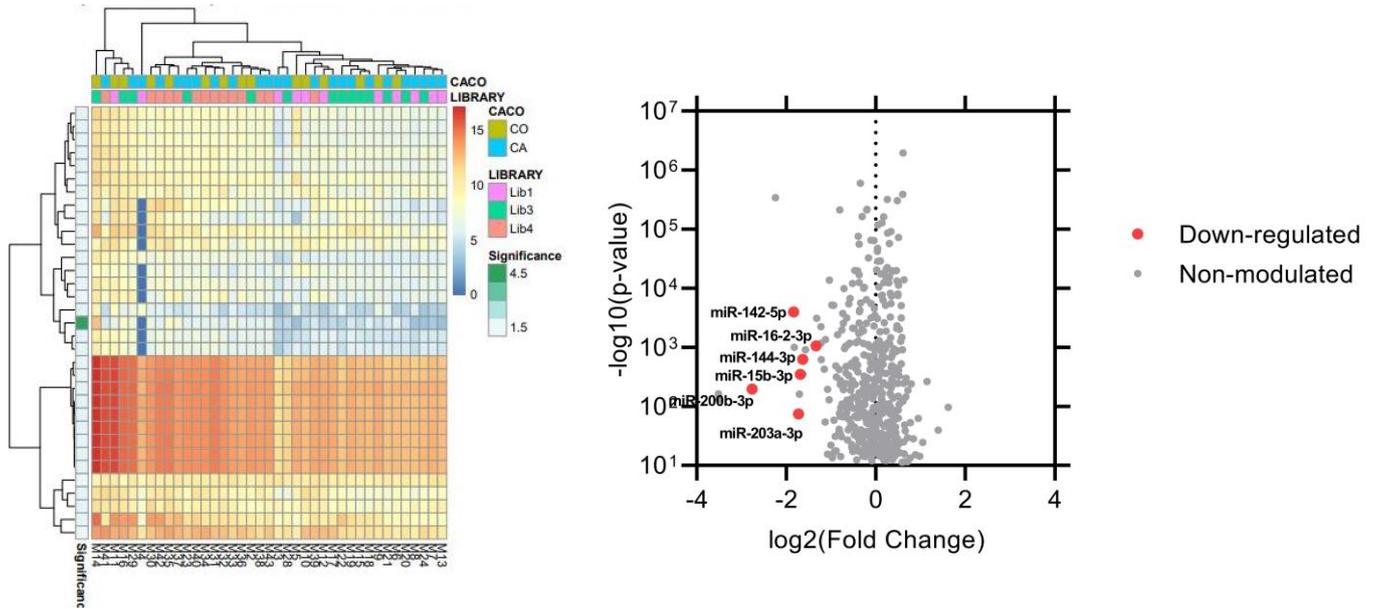
4.2.1 *Analisi Next Generation Sequencing (NGS)*

La valutazione del miRnoma ovvero il profilo di espressione dei miRNA, presenti nei campioni di tessuto muscolare scheletrico sottoposti a NGS, è stata eseguita per tutti i 40 soggetti arruolati nello studio (25 pazienti oncologici e 15 soggetti di controllo). Tale analisi ha mostrato una significativa riduzione ($p < 0.05$) di 6 miRNA nel tessuto muscolare scheletrico dei pazienti oncologici, rispetto ai soggetti di controllo: miR15b-3p; miR16-2-3p; miR142a-5p; miR144-3p; miR200b-3p e miR203a-3p (Figura 10 A).

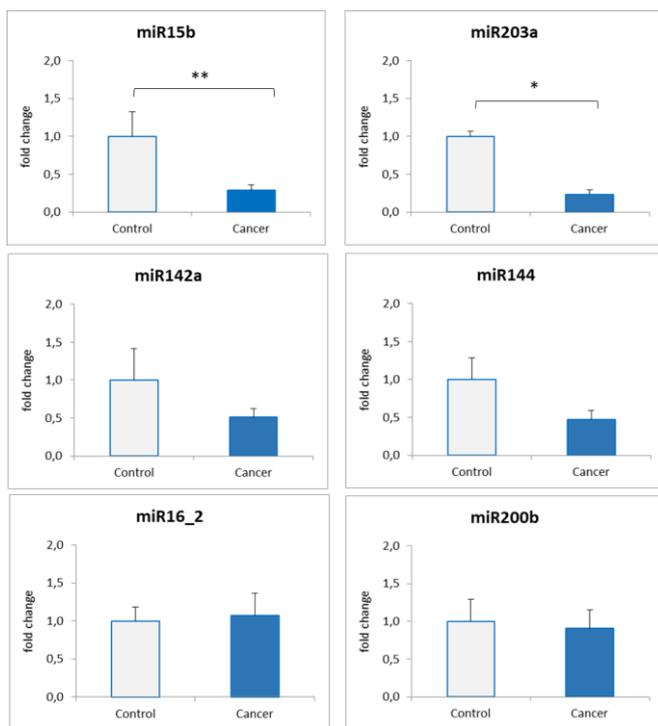
4.2.2 *Analisi Real-Time dei miRNA tissutali in pazienti oncologici*

4.2.2.1 *Validazione dei risultati NGS:*

Per confermare la ridotta espressione dei 6 miRNA (miR15b-3p; miR16-2-3p; miR142a-5p; miR144-3p; miR200b-3p e miR203a-3p) identificati nella valutazione iniziale, sono stati analizzati i livelli di espressione tissutale mediante Real-Time PCR. Di questi miRNA solo 2 sono risultati significativamente ridotti (media \pm DS) nel tessuto muscolare scheletrico dei pazienti oncologici nei confronti dei controlli: miR15b-3p e miR203a-3p (0.08 ± 0.09 vs 0.28 ± 0.33 ; $p= 0.016$ e 0.39 ± 0.45 vs 1.66 ± 0.45 ; $p= 0.021$, rispettivamente). Per miR142-5p e miR144-3p invece, è stata rilevata una tendenza alla riduzione per i livelli tissutali nel muscolo dei pazienti oncologici rispetto ai controlli (0.76 ± 0.77 vs 1.49 ± 2.31 ; $p= 0.195$ e 0.61 ± 0.68 vs 1.30 ± 1.38 ; $p= 0.06$). Infine, per i miR200b-3p e 16-2-3p non sono state confermate differenze dei livelli tissutali tra pazienti e controlli ($p > 0.05$) (Figura 10B).



A



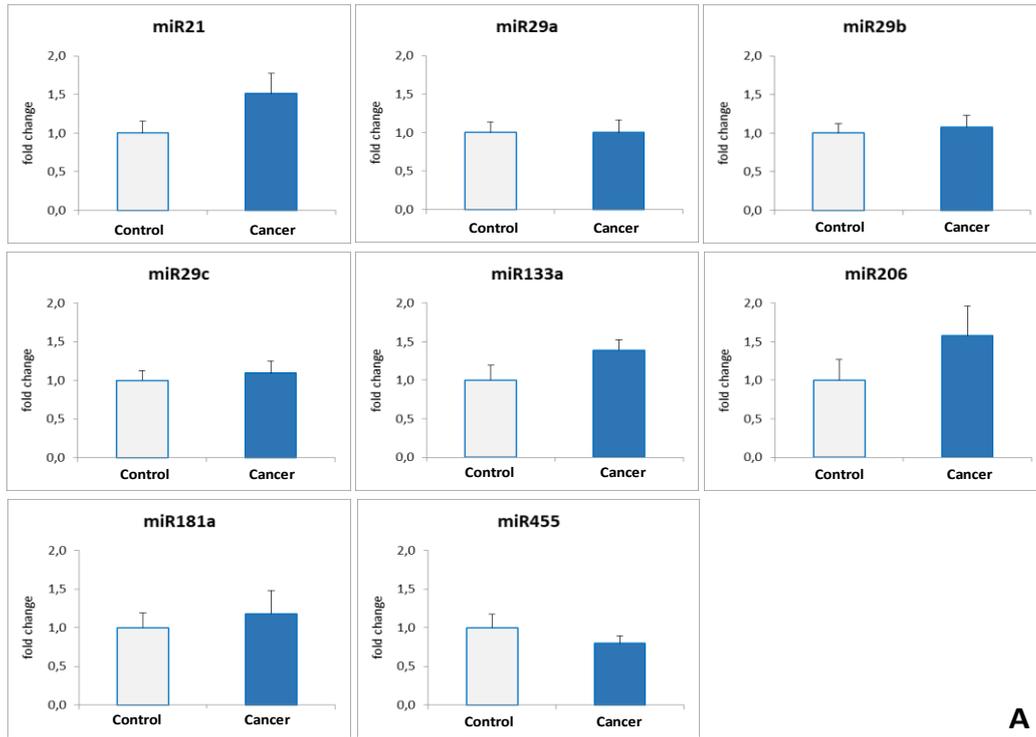
B

Figura 10. miRNA tissutali. A) Heatmap degli “small-RNA” saggiati durante la “Discovery Phase”, diversamente espressi nel muscolo dei pazienti (CA, azzurro) rispetto ai controlli (CO, ocra). La significatività statistica è stata calcolata come $-\log_{10}(\text{p-value})$ che va da 1.5 a 4.5, rappresentata dalla gradazione di colore verde riportata nella legenda della Heatmap. Il dotplot mostra la distribuzione \log_2 dei miRNA identificando quelli che sono diversamente espressi nel muscolo dei pazienti oncologici rispetto ai controlli, secondo il valore del p-value. I “dot” rossi evidenziano i miRNA down-regolati nel muscolo dei pazienti oncologici rispetto ai controlli. B) Validazione dei risultati NGS. Espressione relativa dei miRNA nel tessuto muscolare dei partecipanti allo studio ($*p < 0.05$; $**p < 0.02$; Control $N= 15$, Cancer $N= 25$). I risultati sono riportati standardizzati ponendo per il gruppo di controllo, il valore di espressione dei miRNA = 1.0)

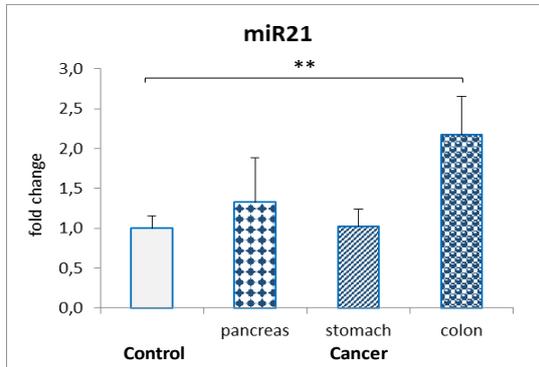
4.2.2.2 *Analisi di miRNA Tissutali potenzialmente coinvolti nei pathways di “muscle wasting”:*

In base ai dati presenti in letteratura, abbiamo deciso di includere nelle analisi di Real-Time-PCR alcuni miRNA che sembrerebbero coinvolti nei pathways di “muscle wasting”, seppure dall’analisi NGS non fossero emerse differenze significative per altri miRNA. Pertanto, sul tessuto muscolare dei 40 soggetti, sono stati analizzati i livelli tissutali di: miR21-5p; miR29a-3p; miR29b-3p; miR29c-3p; miR181a-5p; miR133a-3p; miR206-3p e miR455-5p, tutti miRNA coinvolti (più o meno direttamente) nell’omeostasi del tessuto muscolare scheletrico. Dei 25 pazienti oncologici, 9 presentavano tumore del pancreas, 7 dello stomaco e 9 del colon. Inoltre, 15 erano cachettici e 9 sarcopenici appartenenti al III terzile. Confrontando i pazienti rispetto ai controlli, non sono state rilevate differenze significative nei livelli tissutali dei miRNA precedentemente elencati ($p > 0.05$) (Figura 11A).

Stratificando i pazienti per tipo di tumore, invece, è stata osservata una differenza nei livelli tissutali di miR21-5p. In particolare, i pazienti affetti da tumore del colon-retto mostravano livelli di miR21-5p tissutali più elevati (mediana; range IQ) sia verso i controlli che verso i pazienti con tumore gastrico, nonostante quest’ultima differenza non fosse statisticamente significativa (1.56 (1.37; 2.25) vs 0.75 (0.43; 1.15); $p= 0.011$ e 1.56 (1.37; 2.25) vs 0.86 (0.49; 1.35); $p= 0.053$, rispettivamente)(Figura 11B). Non sono state osservate differenze significative per gli altri 8 miRNA analizzati ($p > 0.05$)



A



B

Figura 11. Espressione relativa dei miRNA tissutali. A) Livelli di espressione di miRNA selezionati, analizzati nel tessuto muscolare dei pazienti oncologici e del relativo gruppo di controllo. B) Confronto dei livelli di espressione del miR21 nel tessuto muscolare dei pazienti oncologici, suddivisi per tipologia di tumore: pancreas, stomaco e colon. ** $p < 0.02$; tutti i risultati sono stati standardizzati ponendo per il gruppo di controllo, il valore di espressione dei miRNA = 1.0

4.3 PLASMA DEI PAZIENTI ONCOLOGICI E DEL RELATIVO GRUPPO DI CONTROLLO

4.3.1 *Analisi NGS su microvescicole ed esosomi isolati da plasma*

La valutazione del profilo di espressione dei miRNA presenti nelle microvescicole ed esosomi, isolati dai campioni di plasma e sottoposti ad NGS, è stata eseguita per tutti i 40 soggetti arruolati nello studio (25 pazienti oncologici e 15 soggetti di controllo). Da tale analisi non sono state riscontrate differenze significative tra pazienti e controlli, per i livelli circolanti dei miRNA racchiusi nelle vescicole extracellulari.

4.3.2 *Analisi Real-Time PCR di miRNA circolanti potenzialmente coinvolti in pathways di “muscle wasting”*

Non essendo state rilevate differenze significative tra i pazienti oncologici ed i controlli per l'espressione dei miRNA contenuti nelle vescicole extracellulari, abbiamo deciso di considerare i miRNA totali, presenti all'interno del plasma. Sulla base dei dati presenti in letteratura, sono stati scelti alcuni miRNA circolanti che sembrerebbero coinvolti (più o meno direttamente) nei pathways di muscle wasting: miR21-5p; miR29a-3p e miR29b-3p tra i miRNA associati al muscolo scheletrico e miR133a-3p, miR206 e miR486-5p tra i myomiRNA. Sono stati dosati i livelli circolanti anche dei miRNA15b-3p e miR203a-3p, per analizzare il loro comportamento nel torrente sanguigno. I miRNA circolanti sono stati valutati in 24/25 pazienti e in 14/15 controlli, poiché il plasma di due soggetti è stato escluso a causa di deterioramento.

Per il miR203a-3p i livelli circolanti non sono stati rilevabili in nessuno dei campioni analizzati (pazienti oncologici e controlli). I livelli plasmatici di miR15b-3p sono risultati molto ridotti (mediana; range IQ) nei pazienti oncologici rispetto ai controlli (12.28 (1.11; 173.05 vs 237.65 (55.69; 728.49); $p= 0.019$) (Figura 12a). I livelli plasmatici del miR21-5p e miR133a-3p sono risultati più elevati nel sangue dei pazienti oncologici nei confronti dei controlli (1.85 (1.02; 2.86) vs 1.35 (0.34; 1.71); $p= 0.021$ e 6.98 (1.09; 13.76) vs 0.90 (0.03; 1.42); $p= 0.021$, rispettivamente) (Figura 12b). Inoltre, nonostante la differenza non fosse statisticamente significativa, i pazienti oncologici mostravano una tendenza all'aumento dei livelli plasmatici di miR29a-3p, rispetto ai soggetti di controllo (2.83 (2.17; 5.03 vs 1.33 (0.54; 4.15); $p= 0,093$)

(Figura 12c). Non sono state rilevate differenze significative nei livelli circolanti dei miR29b-3p, miR486-5p e miR206, tra pazienti e controlli ($p > 0.05$) (Figura 12d, e, f, g)

Stratificando per tipo di tumore, i pazienti con tumore al colon-retto mostravano livelli circolanti di miR15b-3p ridotti (mediana; range IQ) rispetto ai soggetti di controllo, (6.74 (0.41; 141.57) vs 237.65 (55.69; 728.49); $p= 0.042$). Anche i pazienti con tumore al pancreas e allo stomaco mostravano una riduzione dei livelli circolanti di miR15b-3p nei confronti dei controlli, nonostante tali differenze non fossero statisticamente significative (1.64 (0.12; 130.54) vs 237.65 (55.69; 728.49); $p= 0.062$, e 47.84 (4.24; 211.57) vs 237.65 (55.69; 728.49); $p= 0.224$ rispettivamente) (Figura 13a). I pazienti con tumore al colon-retto e pancreas, mostravano livelli plasmatici di miR21-5p più elevati sia nei confronti dei controlli (1.63 (1.21; 2.28) vs 0.87 (0.52; 1.42); $p= 0.022$ e 1.72 (0.94; 2.33) vs 0.87 (0.52; 1.42); $p= 0.017$), che dei pazienti con tumore gastrico (1.63 (1.21; 2.28) vs 0.62 (0.55; 0.74); $p= 0.043$ e 1.72 (0.94; 2.33) vs 0.62 (0.55; 0.74); $p= 0.056$, rispettivamente) (Figura 13b). I pazienti con tumore del colon mostravano un aumento dei livelli plasmatici del miR29a-3p sia rispetto ai soggetti di controllo (5.43 (2.67; 6.55) vs 1.33 (0.54; 4.15); $p= 0.013$), che verso i pazienti con tumore gastrico (5.43 (2.67; 6.55) vs 2.49 (0.46; 2.83); $p= 0.021$) (Figura 13c). Sempre i pazienti con tumore al colon-retto mostravano livelli circolanti di miR133a-3p più elevati sia rispetto i controlli (1.56 (0.78; 1.96) vs 0.11 (0.01; 1.02); $p= 0.013$) che nei confronti dei pazienti con tumore gastrico (1.56 (0.78; 1.96) vs 0.49 (0.15; 4.44), $p= 0.074$), nonostante per questi ultimi tale differenza non fosse statisticamente significativa (Figura 13e). Anche per il miR206 i pazienti con tumore al colon mostravano un aumento dei livelli plasmatici sia nei confronti dei controlli (266.97 (2.19; 2101.45) vs 0.81 (0.26; 12.70); $p= 0.035$) che dei pazienti con tumore gastrico (266.97 (2.19; 2101.45) vs 0.40 (0.25; 0.56); $p= 0.009$) (Figura 13f). Per i livelli circolanti di miR486-5p, i pazienti con tumore al colon (1.18 (0.98; 1.66) e al pancreas (1.27 (1.00; 2.24)) mostravano un aumento rispetto i pazienti con tumore gastrico (0.76 (0.61; 1.10); $p= 0.031$ e $p= 0.040$, rispettivamente) (Figura 13g).

Stratificando i pazienti in cachettici e non cachettici, questi ultimi mostravano una significativa riduzione (mediana; range IQ) dei livelli circolanti del miR15b-3p rispetto ai soggetti di controllo (4.24 (0.13; 87.43) vs 237.65 (55.69; 728.49); $p= 0.044$), mentre la differenza per i livelli plasmatici di tale miRNA tra pazienti non cachettici e controlli non era statisticamente significativa ($p > 0.05$) (Figura 14a). Per il miR21-5p circolante, i pazienti non cachettici (media \pm DS) mostravano un aumento dei livelli plasmatici rispetto i controlli (2.38 \pm 1.64 vs 1.10 \pm 0.71; $p= 0.016$) (Figura 14b). I pazienti non cachettici mostravano un

significativo aumento (mediana; range IQ) dei livelli plasmatici di miR133a-3p nei confronti sia dei soggetti di controllo (7.35 (6.60; 51.58) vs 0.90 (0.03; 6.00); $p= 0.012$) che dei pazienti cachettici, nonostante tale differenza non fosse statisticamente significativa (7.35 (6.60; 51.58) vs 2.04 (0.05; 11.73); $p= 0.081$) (Figura 14e). Infine, non erano state rilevate differenze significative per i livelli circolanti dei miR29a-3p, miR29b-3p, miR206 e miR486-5p nei gruppi analizzati (pazienti cachettici vs pazienti non cachettici vs controlli, $p > 0.05$) (Figura 14c, d, f, g).

Dei 25 pazienti oncologici, 9 erano sarcopenici appartenenti al III terzile sesso-specifico. Stratificando i pazienti in relazione allo stato della massa muscolare scheletrica, sia i sarcopenici appartenenti al terzile III che quelli appartenenti ai terzili I + II, mostravano livelli circolanti di miR15b-3p ridotti (mediana; range IQ) rispetto i controlli (4.21 (0.10; 435.79) vs 237.65 (55.69; 728.49); $p=0.033$ e 32.90 (1.64; 163.65) vs 237.65 (55.69; 728.49); $p= 0.083$) nonostante quest'ultima differenza non fosse statisticamente significativa (Figura 15a). I pazienti sarcopenici I + II, mostravano un aumento (media \pm DS) dei livelli circolanti di miR21-5p rispetto ai controlli (2.15 ± 1.34 vs 1.10 ± 0.7 ; $p= 0.026$) (Figura 15b) e un aumento (mediana; range IQ) dei livelli plasmatici di miR133a-3p sia nei confronti dei controlli (7.71 (6.45; 29.78) vs 0.90 (0.03; 6.00); $p=0.002$) che rispetto i pazienti sarcopenici III (7.71 (6.45; 29.78) vs 0.56 (0.02; 6.40); $p=0.006$) (Figura 15e). Per i livelli circolanti di miR486-5p erano ancora i pazienti sarcopenici I + II a mostrare una differenza. Infatti, il miR486-5p era ridotto nei pazienti sarcopenici I + II rispetto i controlli (0.79 (0.58; 1.00) vs 1.15 (0.78; 1.69); $p=0.033$) (Figura 15g).

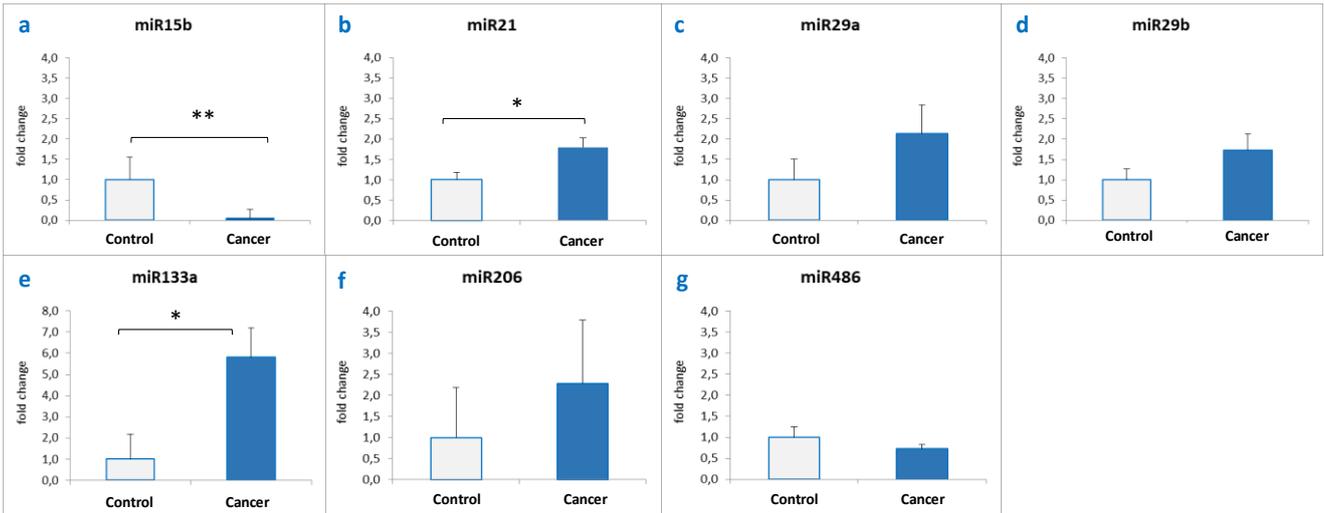


Figura 12. Livelli di espressione di miRNA selezionati, estratti da plasma dei pazienti oncologici e del relativo gruppo di controllo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$; Control $N = 14$, Cancer $N = 24$. Tutti i risultati sono stati standardizzati ponendo per il gruppo di controllo, il valore di espressione relativa dei miRNA = 1.0

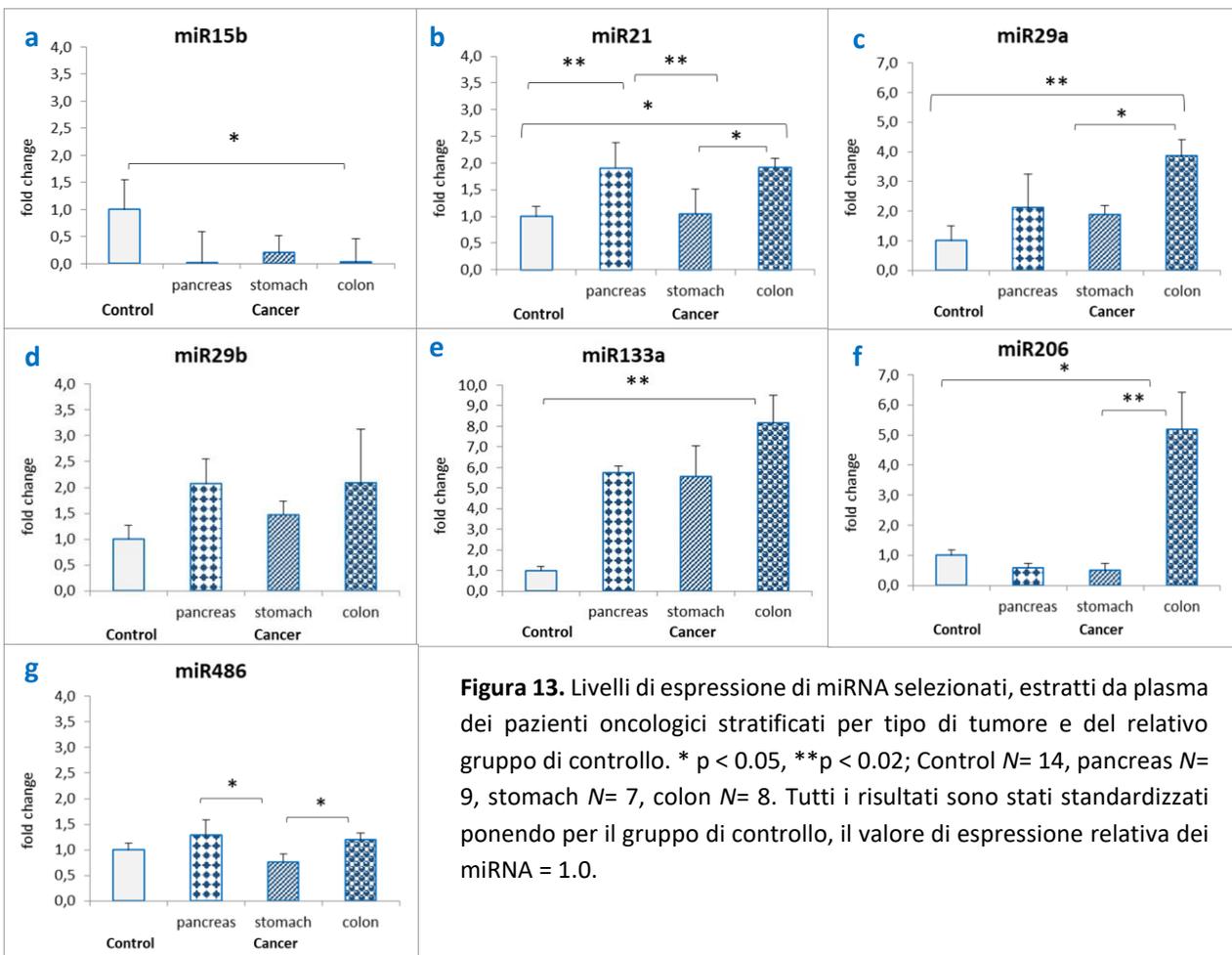


Figura 13. Livelli di espressione di miRNA selezionati, estratti da plasma dei pazienti oncologici stratificati per tipo di tumore e del relativo gruppo di controllo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$; Control $N = 14$, pancreas $N = 9$, stomach $N = 7$, colon $N = 8$. Tutti i risultati sono stati standardizzati ponendo per il gruppo di controllo, il valore di espressione relativa dei miRNA = 1.0.

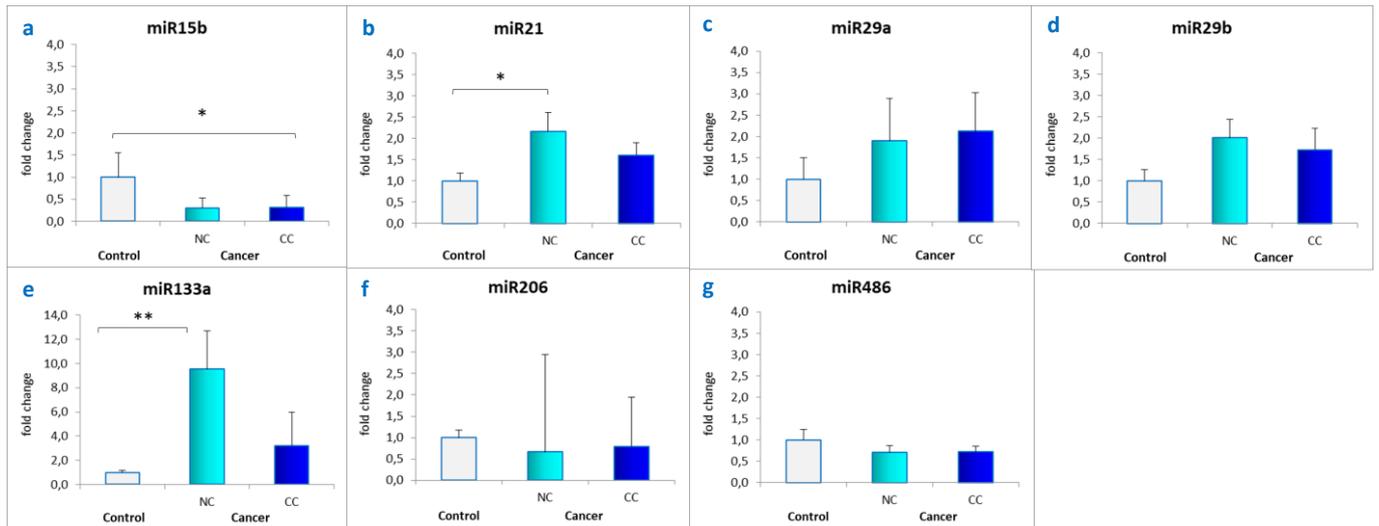


Figura 14. Livelli di espressione di miRNA selezionati, estratti da plasma dei pazienti oncologici, stratificati per la presenza e del relativo gruppo di controllo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$; Control $N = 14$, Not Cachectic (NC) $N = 9$, Cancer Cachexia (CC) $N = 7$. Tutti i risultati sono stati standardizzati ponendo per il gruppo di controllo, il valore di espressione relativa dei miRNA = 1.0

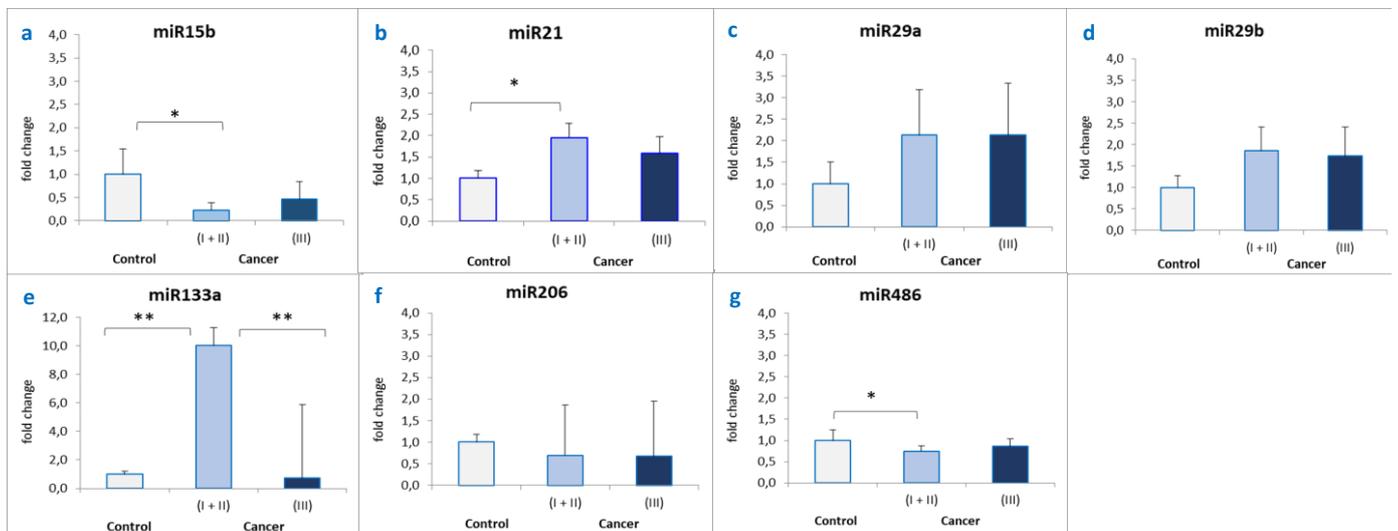


Figura 15. Livelli di espressione di miRNA selezionati, estratti da plasma dei pazienti oncologici, stratificati in relazione alla massa muscolare e del relativo gruppo di controllo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$; Control $N = 14$, Cancer group I+II tertile of L3SMI (I+II) $N = 16$, Cancer group III tertile of L3SMI (III) $N = 9$. Tutti i risultati sono stati standardizzati ponendo per il gruppo di controllo, il valore di espressione relativa dei miRNA = 1.0.

4.4 PLASMA DEI PAZIENTI CON SCOMPENSO CARDIACO E RELATIVO

GRUPPO DI CONTROLLO

4.4.1 *Analisi Real-Time PCR di miRNA circolanti potenzialmente coinvolti nei pathways di “muscle wasting”*

Gli stessi miRNA dosati per i pazienti oncologici, sono stati valutati anche nel plasma di pazienti con scompenso cardiaco. Sono stati quindi analizzati i livelli circolanti di miR21-5p, miR29a-3p e miR29b-3p, tra i miRNA associati al muscolo scheletrico e miR133a-3p, miR206 e miR486-5p tra i myomiRNA. È stato introdotto in questa analisi il miR15b-3p per vedere se fosse modulato anche nei pazienti con scompenso cardiaco. I miRNA circolanti sono stati analizzati nei 44 partecipanti: 27 pazienti con scompenso cardiaco e 17 controlli sani. Dei pazienti con scompenso cardiaco 10 erano cachettici e 10 sarcopenici.

I livelli circolanti di miR15b-3p e miR206 erano significativamente ridotti (mediana; range IQ e media \pm DS) nel sangue dei pazienti con scompenso cardiaco, nei confronti dei controlli (0.80 (0.50; 1.76) vs 2.00 (1.08; 5.03) $p=0.002$ e 0.10 ± 0.28 vs 0.96 ± 1.68 ; $p=0.012$, rispettivamente) (Figura 16a). I livelli plasmatici di miR29b-3p tendevano ad essere ridotti nel sangue dei pazienti con scompenso cardiaco rispetto ai controlli, nonostante la differenza non fosse statisticamente significativa (0.95 (0.62; 1.69) vs 1.60 (0.88; 1.88); $p=0.065$) (Figura 16d). I livelli circolanti di miR486-5p risultavano invece più elevati nei pazienti con scompenso cardiaco rispetto ai controlli (0.28 (0.21; 0.37) vs 0.20 (0.14; 0.24); $p=0.014$) (Figura 16g). Non erano state osservate differenze significative nei livelli circolanti di miR21-5p, miR29a-3p e miR133a-3p ($p > 0.05$) (Figura 16b, c, e).

Stratificando i pazienti con scompenso cardiaco in cachettici e non cachettici, entrambi i gruppi mostravano una riduzione (mediana; range IQ) dei livelli plasmatici di miR15b-3p rispetto ai controlli (cachettici: 1.05 (0.09; 2.07) vs 2.00 (1.08; 5.03); $p=0.036$ e non cachettici: 0.80 (0.67; 1.45) vs 2.00 (1.08; 5.03), $p=0.019$) (Figura 17a). Per i livelli plasmatici di miR206 era stata osservata una riduzione significativa nei pazienti cachettici rispetto ai controlli (0.01 (0.01; 0.01) vs 0.96 (0.01; 1.62); $p=0.032$). Anche i pazienti non cachettici mostravano una riduzione dei livelli plasmatici di miR206, seppure non significativa (0.01 (0.01; 0.07) vs 0.96 (0.01; 1.62); $p=0.073$) (Figura 17f). I pazienti con cachessia da scompenso cardiaco mostravano una riduzione anche dei livelli plasmatici di miR29b-3p, rispetto ai controlli (0.94 (0.61; 1.49) vs 1.60 (0.88; 1.89); $p=0.046$) (Figura 17d) e mostravano un aumento di miR486-5p sempre rispetto ai controlli (0.30 (0.26; 0.35) vs 0.20 (0.14; 0.24); $p=0.036$) (Figura 17g).

Non erano state osservate differenze per i livelli circolanti di miR21-5p, miR29a-3p e miR133a-3p nei gruppi analizzati (pazienti cachettici vs non cachettici vs controlli, $p > 0.05$) (Figura 17b, c, e)

Stratificando i pazienti in sarcopenici (cioè appartenenti III terzile sesso specifico, calcolato sulla base del FFMI) e non sarcopenici (appartenenti ai terzili I + II), i pazienti non sarcopenici mostravano una riduzione (mediana; IQ) dei livelli circolanti di miR15b-3p rispetto i controlli (0.75 (0.49; 1.53) vs 2.00 (1.08; 5.03); $p = 0.003$). Nonostante la differenza non fosse statisticamente significativa, i pazienti sarcopenici mostravano anch'essi una tendenza alla riduzione dei livelli plasmatici di miR15b-3p rispetto i controlli (0.90 (0.67; 4.18) vs 2.00 (1.08; 5.03); $p = 0.091$) (Figura 18a). Entrambi i gruppi di pazienti mostravano una riduzione dei livelli circolanti di miR206 rispetto ai controlli, seppure tra sarcopenici e controlli la differenza non fosse statisticamente significativa (non sarcopenici = 0.01 (0.01; 0.01) vs 0.96 (0.01; 1.62); $p = 0.020$ e sarcopenici = 0.01 (0.01; 0.04) vs 0.96 (0.01; 1.62); $p = 0.059$) (Figura 18f). I pazienti non sarcopenici mostravano una riduzione nei confronti dei controlli, sia dei livelli plasmatici di miR21-5p (mediana; range IQ) che di miR29b-3p (media \pm DS) (2.17 (0.94; 4.47) vs 5.01 (2.46; 6.87); $p = 0.026$; e 0.98 ± 0.48 vs 1.63 ± 0.65 ; $p = 0.032$, rispettivamente) (Figura 17b, d). Inoltre, per i livelli plasmatici di miR29a-3p, i pazienti non sarcopenici mostravano una tendenza alla riduzione (media \pm DS) rispetto ai pazienti sarcopenici, nonostante tale differenza non fosse statisticamente significativa (1.21 ± 0.82 vs 2.01 ± 1.34 ; $p = 0.088$) (Figura 17c). Entrambi i gruppi di pazienti (sarcopenici e non sarcopenici) mostravano un aumento (mediana; range IQ) dei livelli circolanti di miR486-5p nei confronti dei soggetti di controllo (non sarcopenici = 0.29 (0.20; 0.36) vs 0.20 (0.14; 0.24); $p = 0.036$ e sarcopenici: 0.27 (0.21; 0.38) vs 0.20 (0.14; 0.24); $p = 0.039$; $p = 0.039$, rispettivamente) (Figura 17g). Non erano state rilevate differenze per i livelli circolanti di miR133a-3p, tra nessuno dei gruppi analizzati (pazienti sarcopenici vs pazienti non sarcopenici vs controlli, $p > 0.05$) (Figura 17e).

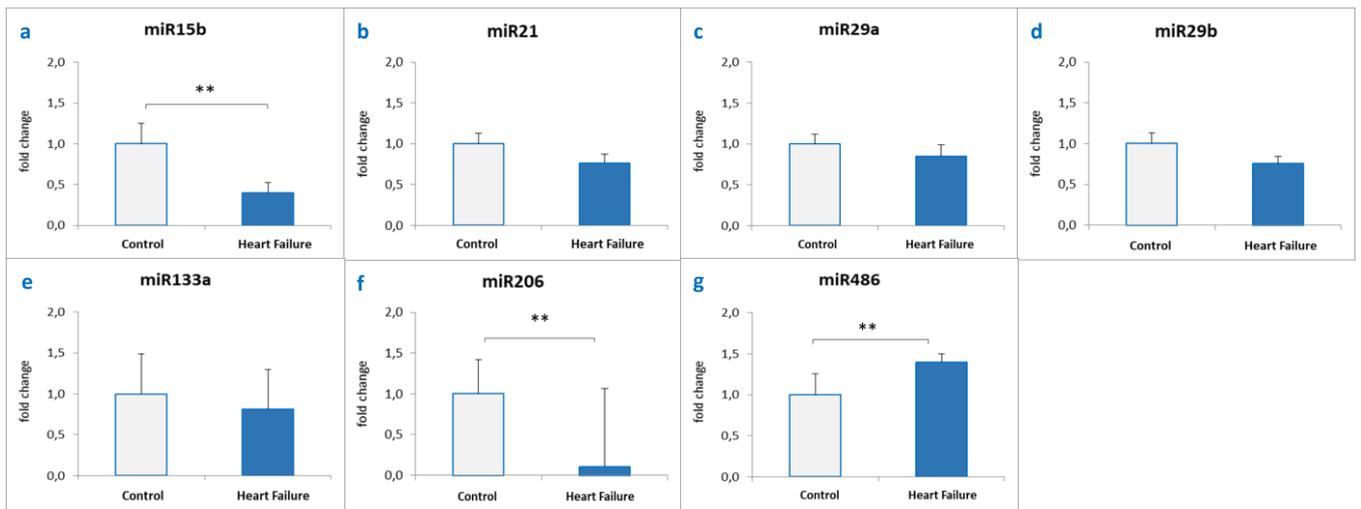


Figura 16. Livelli di espressione di miRNA selezionati, estratti da plasma dei pazienti con scompenso cardiaco e del relativo gruppo di controllo. ** $p < 0.02$; Control $N = 17$, Heart Failure $N = 27$. Tutti i risultati sono stati standardizzati ponendo per il gruppo di controllo, il valore di espressione relativa dei miRNA = 1.0

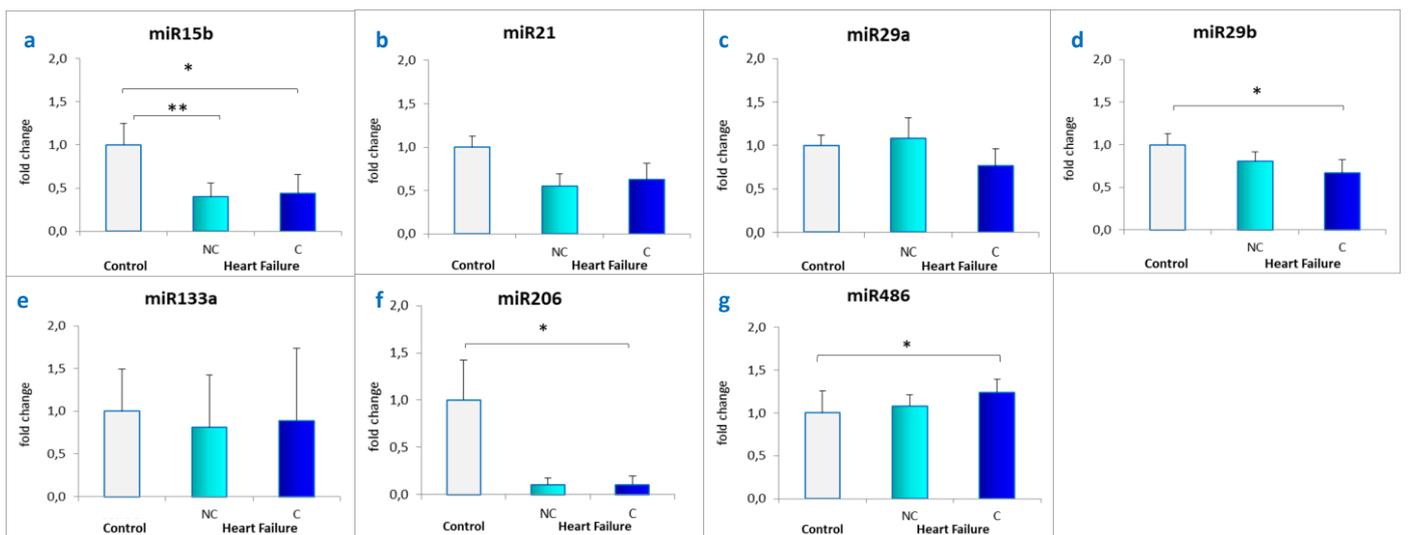


Figura 17. Livelli di espressione di miRNA selezionati, estratti da plasma dei pazienti con scompenso cardiaco stratificati per la presenza di cachessia e del relativo gruppo di controllo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$; Control $N = 17$, Not Cachectic (NC) $N = 17$, Cachectic (C) $N = 10$. Tutti i risultati sono stati standardizzati ponendo per il gruppo di controllo, il valore di espressione relativa dei miRNA = 1.0

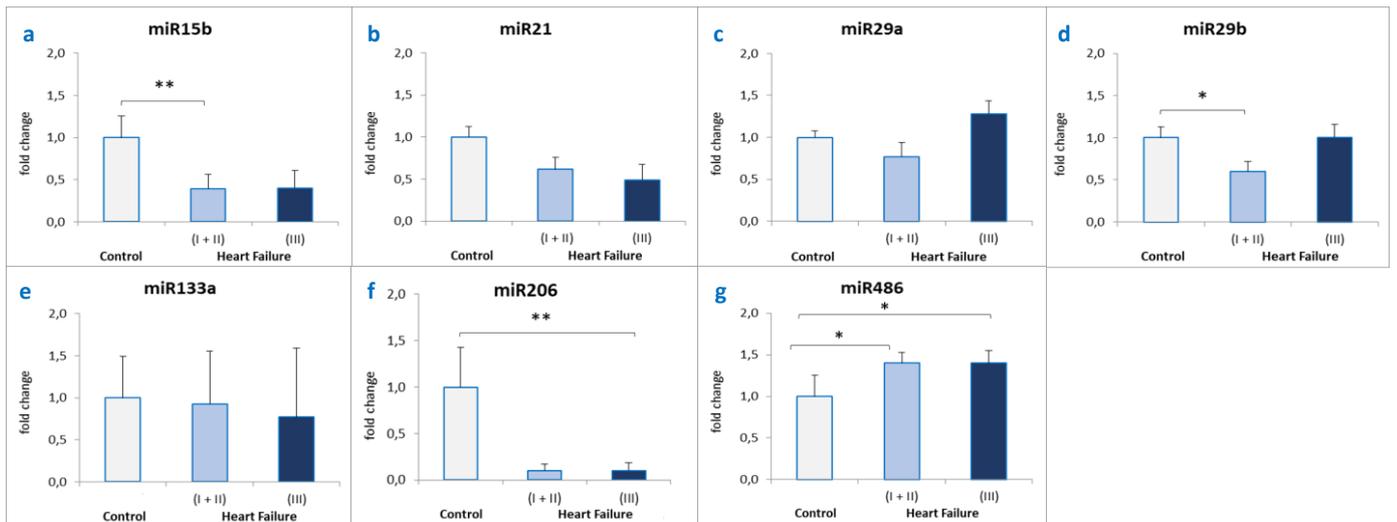


Figura 18. Livelli di espressione di miRNA selezionati, estratti da plasma dei pazienti con scompenso cardiaco, stratificati in sarcopenici e non sarcopenici e del relativo gruppo di controllo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$; Control $N = 14$, Heart Failure group I+II tertile of FFMI (I+II) $N = 17$, Heart Failure III tertile of FFMI (III) $N = 10$. Tutti i risultati sono stati standardizzati ponendo per il gruppo di controllo, il valore di espressione relativa dei miRNA = 1.0

4.5 LIVELLI SIERICI DI CITOCHINE GDF15 E FGF21

4.5.1 *Dosaggio su campioni di siero nei pazienti oncologici e relativo gruppo di controllo*

Sul siero dei 25 pazienti oncologici e dei 15 controlli, sono stati dosati i livelli circolanti di GDF15 e FGF21. I pazienti neoplastici mostravano un aumento (mediana; range IQ) dei livelli sierici sia di GDF15 che di FGF21 rispetto ai soggetti di controllo (GDF15: 1732.63 (846.71; 2633.39) vs 645.53 (413.45; 1506.17) $p= 0.018$ e FGF21: 516.00 (151.86; 674.69) vs 184.08 (125.18; 256.15); e $p= 0.008$). (Figura 19)

Stratificando i pazienti in cachettici e non cachettici, entrambi i gruppi mostravano livelli sierici di GDF15 più elevati (mediana; range IQ) nei confronti dei controlli (pazienti cachettici= 1794.14 (789.95; 3518.26) vs 619.83 (409.97; 1104.64); $p= 0.031$ e pazienti non cachettici= 1527.17 (935.69; 2209.04) vs 619.83 (409.97; 1104.64); $p= 0.034$). Mentre per FGF21, i pazienti cachettici mostravano un significativo aumento dei livelli sierici rispetto ai controlli, ed i pazienti non cachettici una tendenza all'aumento (pazienti cachettici= 545.80 (231.20; 730.82) vs 167.80 (123.28; 247.83); $p= 0.017$ e pazienti non cachettici= 516.00 (151.86; 803.23) vs 167.80 (123.28; 247.83); $p= 0.078$) (Figura 20)

Stratificando i pazienti in relazione alla massa muscolare scheletrica, entrambi i gruppi mostravano un aumento dei livelli sierici del GDF15 rispetto ai controlli, ma solo per i pazienti sarcopenici (III) tale aumento era significativo (pazienti sarcopenici III= 2272.15 (1018.08; 3770.19) vs 619.83 (409.97; 1104.64); $p= 0.025$ e pazienti sarcopenici I + II= 1527.17 (793.00; 2121.48) vs 619.83 (409.97; 1104.64); $p= 0.810$). I livelli sierici di FGF21 erano più elevati in entrambi i gruppi di pazienti rispetto ai soggetti di controllo (pazienti sarcopenici III= 545.80 (224.28; 830.26) vs 167.80 (123.28; 247.83); $p= 0.035$ e pazienti sarcopenici I + II= 516.00 (157.06; 730.82) vs 167.80 (123.28; 247.83); $p= 0.033$) (Figura 21)

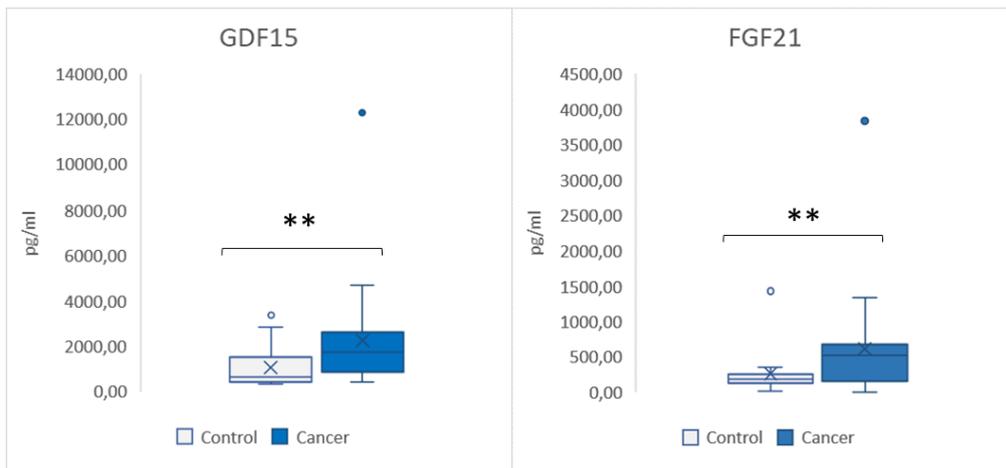


Figura 19. Livelli sierici delle citochine GDF15 e FGF21 in pazienti oncologici e controlli. ** $p < 0.02$; Control $N=15$, Cancer $N=25$.

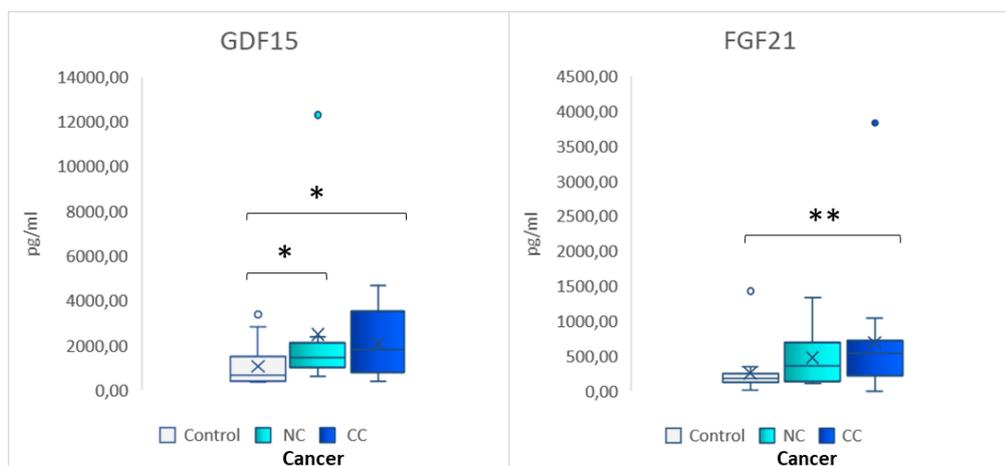


Figura 20. Livelli sierici delle citochine GDF15 e FGF21 in pazienti oncologici stratificati per la presenza di cachessia e controlli. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$; Control $N=15$, Not Cachectic (NC) $N=10$, Cancer Cachexia (CC) $N=15$.

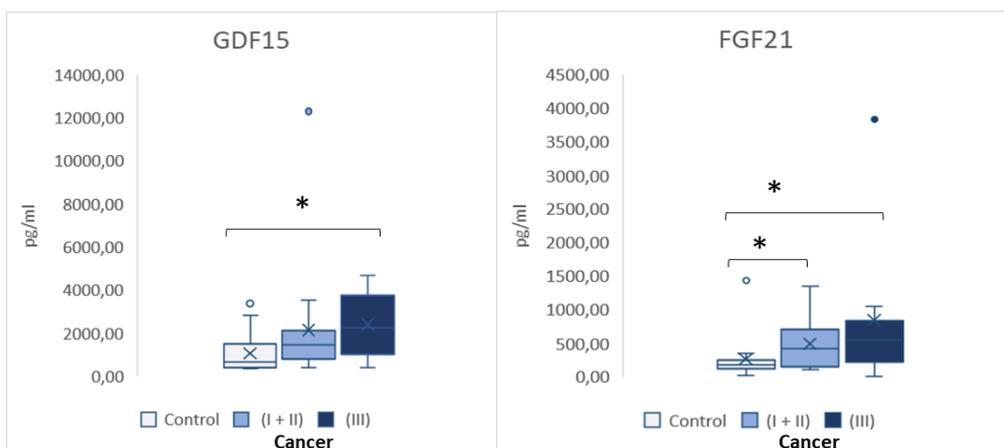


Figura 21. Livelli sierici delle citochine GDF15 e FGF21 in pazienti oncologici stratificati sulla base della massa muscolare e controlli.

* $p < 0.05$, Control $N=15$, Cancer group I+II tertile of L3SMI (I+II) $N=17$, Cancer group III tertile of L3SMI (III) $N=9$.

4.5.2 *Dosaggio su campioni di siero in pazienti con scompenso cardiaco e relativo gruppo di controllo*

I livelli sierici delle citochine GDF15 e FGF21 sono stati dosati sui 44 partecipanti allo studio: 27 pazienti con scompenso cardiaco e 17 soggetti di controllo. I pazienti con scompenso cardiaco mostravano un aumento dei livelli sierici di GDF15 rispetto ai controlli (1065.60 (838.50; 1284.00) vs 418.80 (352.05; 639.75); $p < 0.001$). Mentre non sembravano esserci differenze per i livelli circolanti di FGF21 nel siero dei pazienti con scompenso cardiaco rispetto ai soggetti di controllo ($p > 0.05$) (Figura 22)

Stratificando i pazienti in cachettici e non cachettici, entrambi i gruppi mostravano un aumento dei livelli sierici di GDF15 nei confronti dei controlli (cachettici: 899.25 (696.15; 1275.68) vs 418.80 (352.05; 639.75); $p < 0.001$ e non cachettici: 1111.80 (997.95; 1565.40); $p = 0.038$). I pazienti cachettici mostravano un aumento anche dei livelli sierici di FGF21 nei confronti dei pazienti non cachettici ((412.30 (299.85; 1159.20) vs 201.60 (117.39; 499.30); $p = 0.046$), mentre non sono state dimostrate differenze significative rispetto ai controlli ($p > 0.05$) (Figura 23).

Stratificando i pazienti in sarcopenici e non sarcopenici, entrambi i gruppi mostravano un aumento dei livelli sierici di GDF15 verso i soggetti di controllo (sarcopenici= 1057.05 (815.10; 1856.93) vs 418.80 (352.05; 639.75); $p < 0.001$ e non sarcopenici= 1065.60 (907.05; 1278.45) vs 418.80 (352.05; 639.75); $p = 0.002$). Non erano state rilevate invece differenze per i livelli sierici di FGF21 tra i gruppi analizzati (pazienti sarcopenici vs non sarcopenici vs controlli, $p > 0.05$) (Figura 24).

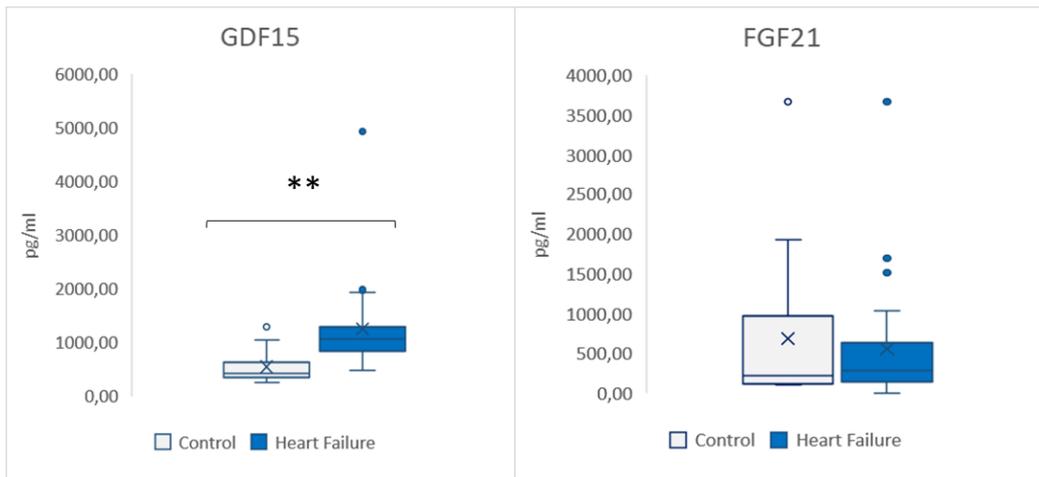


Figura 22. Livelli sierici delle citochine GDF15 e FGF21 in pazienti con scompenso cardiaco e controlli. **p < 0.02; Control N= 17, Heart Failure N= 27.

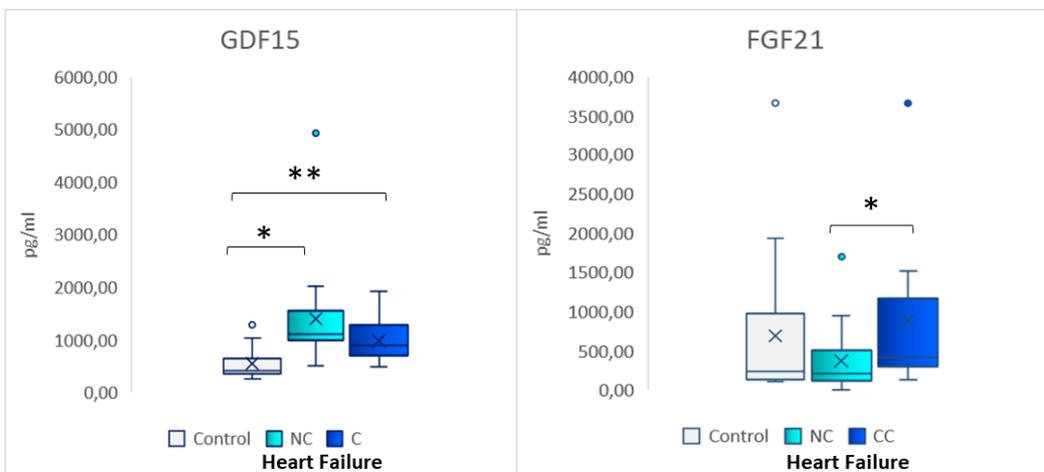


Figura 23. Livelli sierici delle citochine GDF15 e FGF21 in pazienti con scompenso cardiaco stratificati per la presenza di cachessia e controlli. * p < 0.05, **p < 0.02; Control N= 17, Not Cachectic (NC) N= 17, Cachectic (C) N= 10.

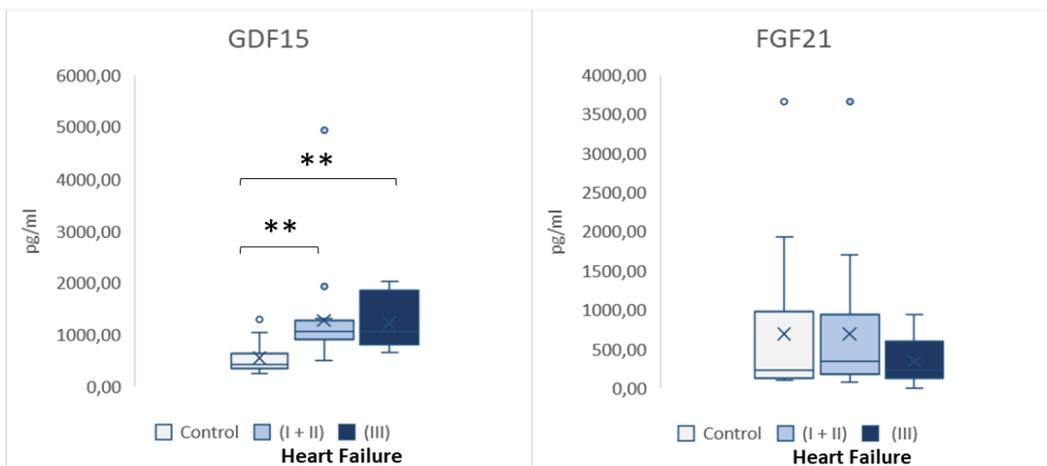


Figura 24. Livelli sierici delle citochine GDF15 e FGF21 in pazienti con scompenso cardiaco stratificati per la presenza di sarcopenia e controlli. ** p < 0.02, Control N= 17, Heart Failure group I+II tertile of FFMI (I+II) N= 17, Heart Failure III tertile of FFMI (III) N= 10.

4.6 MODULAZIONE DI miRNA E CITOCHINE IN FUNZIONE DEL GENERE

4.6.1 *miRNA circolanti e citochine in pazienti oncologici e controlli, Maschi e Femmine*

Dei 25 pazienti oncologici arruolati, 12 (48%) erano maschi e 13 (52%) erano femmine. Dei 15 soggetti di controllo arruolati 6 (40%) erano maschi e 9 (60%) erano femmine. A causa della degradazione dei campioni, 1 paziente maschio ed un soggetto di controllo femmina sono stati esclusi dalle analisi sui miRNA circolanti.

I livelli circolanti di miR133a-3p erano più elevati nel plasma dei pazienti maschi rispetto ai soggetti femmine, sia controlli che pazienti (1.81 (0.60; 2.38) vs 0.10 (0.01; 0.93); $p=0.010$ e 1.81 (0.60; 2.38) vs 0.35 (0.11; 0.86); $p=0.047$, rispettivamente). Inoltre, i pazienti maschi mostravano una tendenza all'aumento dei livelli di miR133a-3p rispetto ai controlli maschi, nonostante tale differenza non fosse statisticamente significativa (1.81 (0.60; 2.38) vs 0.44 (0.01; 1.14); $p=0.056$) (Figura 25a). I pazienti maschi mostravano un significativo aumento anche dei livelli circolanti di miR206 nei confronti sia dei controlli maschi, che delle pazienti femmine (5.99 (1.31; 3758.01) vs 0.38 (0.14; 0.73); $p=0.012$, e 5.99 (1.31; 3758.01) vs 0.52 (0.30; 2.68); $p=0.034$, rispettivamente) (Figura 25b). Non sono state rilevate differenze per i livelli plasmatici di miR21-5p, miR29a-3p, miR29b-3p e miR486-5p tra i gruppi analizzati (pazienti maschi e femmine vs controlli maschi e femmine, $p > 0.05$).

Stratificando i pazienti per la presenza di cachessia, dei 15 pazienti cachettici 8 (53%) erano maschi e 7 (47%) femmine. Dei 10 pazienti non cachettici, 4 (40%) erano maschi e 6 (60%) femmine. 1 paziente maschio non cachettico è stato escluso dall'analisi sui miRNA circolanti, a causa della degradazione del campione di plasma. I pazienti maschi non cachettici mostravano livelli circolanti di miR133a-3p più elevati (mediana; range IQ) dei soggetti femmine, sia controlli che con cachessia (1.98 (1.06; 1.98) vs 0.10 (0.01; 0.94); $p=0.048$ e 1.98 (1.06; 1.98) vs 0.49 (0.02; 0.69); $p=0.017$, rispettivamente). Anche i pazienti maschi cachettici mostravano una tendenza all'aumento dei livelli circolanti di miR133a-3p nei confronti dei controlli femmine, nonostante tale differenza non fosse statisticamente significativa (1.56 (0.32; 2.26) vs 0.10 (0.01; 0.94); $p=0.065$) (Figura 26a). Per quanto riguarda i livelli circolanti di miR206-3p, i pazienti maschi non cachettici mostravano livelli circolanti più elevati (mediana; range IQ) nei confronti dei controlli maschi (1.57 (0.69; 1.57) vs 0.38 (0.14; 0.72); $p=0.048$). Anche i pazienti cachettici maschi mostravano un significativo aumento dei livelli di miR206-3p sia rispetto ai controlli maschi, che verso le pazienti cachettiche femmine (71.57 (1.91;

2863.50) vs 0.38 (0.14; 0.72); p= 0.008 e 71.57 (1.91; 2863.50) vs 0.52 (0.30; 1.80); p= 0.021, rispettivamente) (Figura 26b).

Stratificando i pazienti in relazione allo stato della massa muscolare scheletrica, i pazienti sarcopenici appartenenti al terzo terzile (III) erano 9, di cui 4 (44%) maschi e 5 (56%) femmine. Dei 16 pazienti appartenenti al primo e secondo terzile (I + II), 8 (50%) erano maschi e 8 (50%) femmine. 1 tra i pazienti maschi (I + II) è stato escluso dall'analisi sui miRNA circolanti, a causa della degradazione del campione di plasma. I pazienti maschi sarcopenici (I + II) mostravano un aumento (mediana; range IQ) dei livelli plasmatici di miR133a-3p nei confronti dei controlli, sia maschi che femmine, ma anche rispetto le pazienti femmine sarcopeniche (III) (1.98 (1.06; 4.43) vs 0.44 (0.01; 1.14); p= 0.022 e 1.98 (1.06; 4.43) vs 0.10 (0.01; 0.93); p= 0.014 e 1.98 (1.06; 4.43) vs 0.53 (0.02; 0.86); p= 0.010). (Figura 27a). I pazienti maschi sarcopenici (III) mostravano un aumento dei livelli plasmatici di miR206-3p nei confronti sia dei controlli maschi, che delle pazienti femmine sarcopeniche (III) (5.986 (0.69; 1242.31) vs 0.38 (0.14; 0.73); p= 0.009 e 5.986 (0.69; 1242.31) vs 0.52 (0.23; 1.16); p= 0.047, rispettivamente). Inoltre, anche i maschi sarcopenici (I + II) mostravano un aumento dei livelli di miR206-3p, nei confronti dei soggetti di controllo maschi e le pazienti femmine sarcopeniche (III) (7.43 (1.91; 2852.79) vs 0.38 (0.14; 0.73); p= 0.007 e 7.43 (1.91; 2852.79) vs 0.52 (0.23; 1.16), p= 0.030) (Figura 27b)

Per quanto riguarda i livelli sierici delle citochine non sono state rilevate differenze tra controlli e pazienti in funzione del genere.

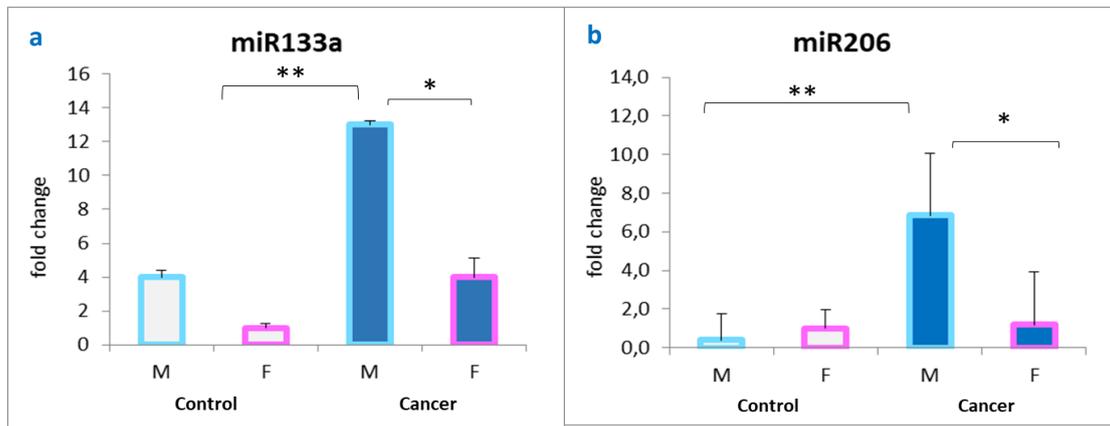


Figura 25. Livelli di espressione dei myomiRNA in pazienti oncologici e controlli, maschi e femmine. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$; Control male $N = 6$, Control Female $N = 8$; Cancer Male $N = 12$, Female $N = 12$. Tutti i risultati sono stati standardizzati ponendo per il gruppo dei controlli femmine, il valore di espressione relativa dei miRNA = 1.0

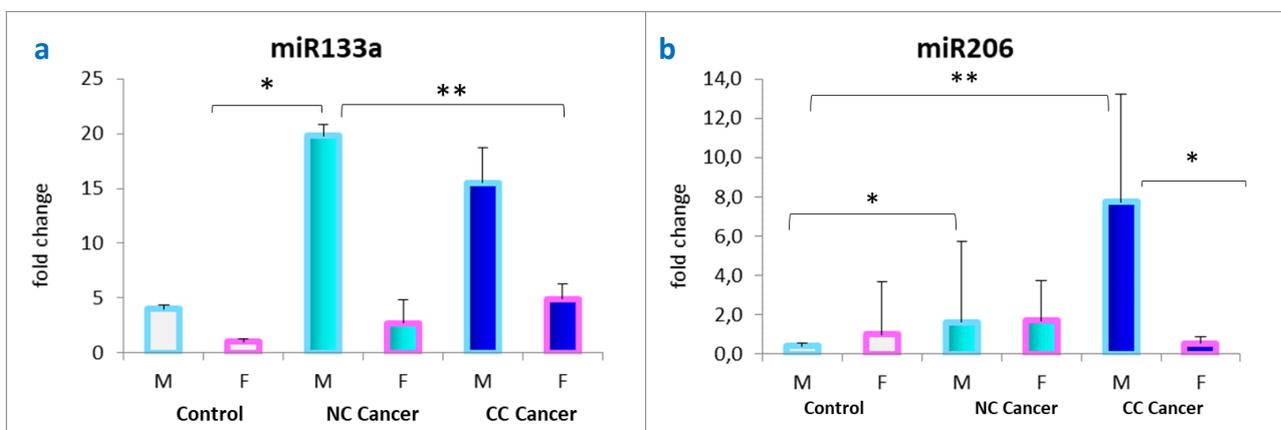


Figura 26. Livelli di espressione dei myomiRNA in pazienti oncologici stratificati per la presenza di cachessia e controlli, maschi e femmine. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$; Control Male $N = 6$, Female $N = 8$; Not Cachectic (NC) Male $N = 3$, (NC) Female $N = 6$, Cancer Cachexia (CC) Male $N = 8$, (CC) Female $N = 7$. Tutti i risultati sono stati standardizzati ponendo per il gruppo dei controlli femmine, il valore di espressione relativa dei miRNA = 1.0

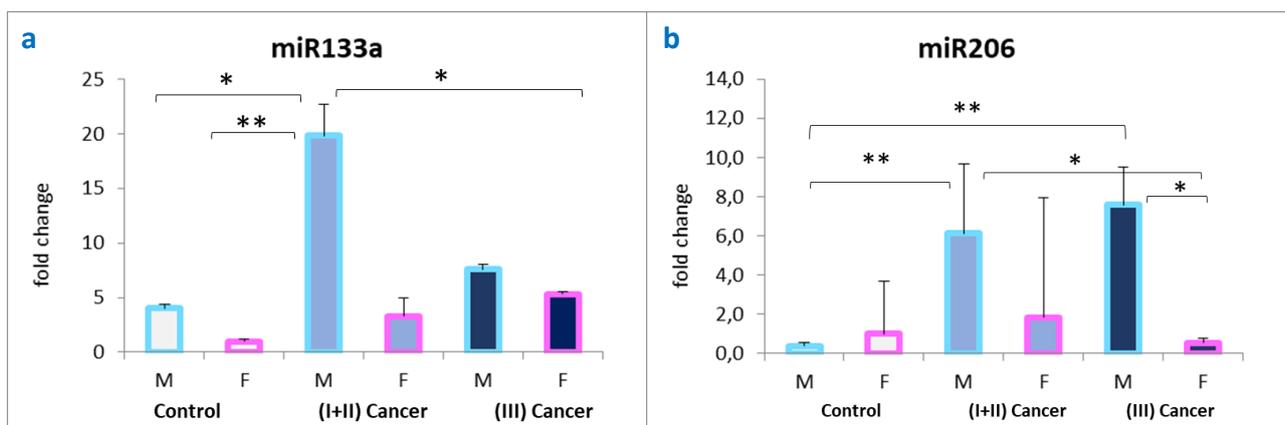


Figura 27. Livelli di espressione dei myomiRNA in pazienti oncologici stratificati in relazione alla massa muscolare e controlli, maschi e femmine. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$; Control male $N = 6$, Female $N = 8$; Cancer group I+II tertile of L3SMI (I+II) Male $N = 7$, (I+II) Female $N = 8$; Cancer group III tertile of L3SMI (III) Male $N = 4$, (III) Female $N = 5$. Tutti i risultati sono stati standardizzati ponendo per il gruppo dei controlli femmine, il valore di espressione relativa dei miRNA = 1.0

4.6.2 miRNA circolanti e citochine in pazienti con scompenso cardiaco e controlli, Maschi e Femmine

Dei 27 pazienti con scompenso cardiaco arruolati, 10 (37%) erano maschi e 17 (63%) femmine. Dei 17 soggetti di controllo arruolati, 7 (41%) erano maschi e 10 (59%) femmine.

Stratificando i pazienti in cachettici e non cachettici, dei 10 pazienti cachettici 6 (60%) erano maschi e 4 (40%) femmine. Dei 17 pazienti non cachettici 4 (24%) erano maschi e 13 (76%) femmine. Tra i due gruppi di pazienti, non sono state rilevate differenze dei livelli circolanti dei miRNA in funzione del genere. Invece, per quanto riguarda i livelli sierici delle citochine, le pazienti femmine cachettiche mostravano un aumento significativo dei livelli circolanti di FGF21 sia nei confronti delle pazienti femmine non cachettiche, che verso i pazienti maschi cachettici (1276.60 (563.00; 3121.35) vs 257.20 (136.94; 499.30); $p= 0.023$ e, 1276.60 (563.00; 3121.35) vs 348.80 (168.68; 525.95); $p= 0.038$, rispettivamente). Le differenze tra gli altri gruppi analizzati non risultavano statisticamente significative (Figura 28).

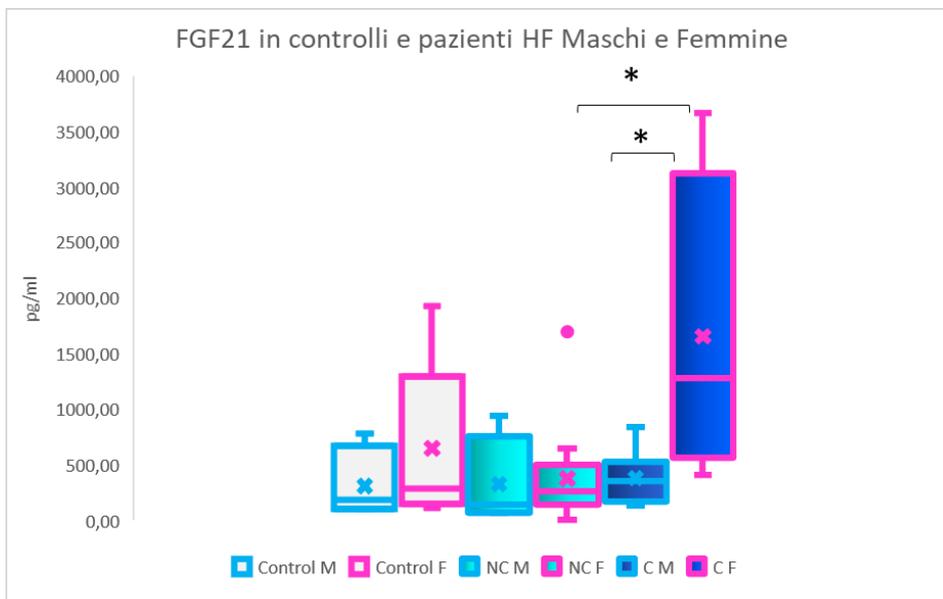


Figura 28. Livelli sierici di FGF21 in pazienti con scompenso cardiaco stratificati per la presenza di cachessia e controlli, maschi e femmine. * $p < 0.05$; Control Male $N = 7$, Female $N = 10$; Not Cachectic (NC) Male $N = 4$, (NC) Female $N = 13$; Cachectic (C) Male $N = 6$, (C) Female $N = 4$.

4.7 CORRELAZIONI TRA PARAMETRI CLINICI, CITOCINE E miRNA

4.7.1 *Infiammazione, Food Intake, GDF15 e miRNA in entrambe le coorti di partecipanti*

Nella prima coorte di soggetti arruolati, pazienti oncologici e relativo gruppo di controllo, è stata osservata una correlazione positiva tra i livelli sierici di GDF15 e CRP ($R=0.356$; $p=0.024$) (Figura 29a). Considerando invece solo i pazienti oncologici maschi, è stata rilevata una correlazione positiva tra i livelli sierici di CRP e plasmatici di miR21-5p ($R=0.682$; $p=0.021$) (Fig.29b). Sempre nei pazienti oncologici era stata osservata una correlazione tra GDF15 e miR21-5p, ma sono solo le pazienti femmine a mostrare una correlazione positiva tra i livelli sierici di GDF15 e circolanti di miR21-5p ($R=0.560$; $p=0.046$) (Fig. 29c)

È stata inoltre osservata una correlazione negativa tra i livelli sierici di GDF15 e miR15b-3p, in entrambi le coorti di partecipanti. Sia per i pazienti oncologici che per i pazienti con scompenso cardiaco (e dei relativi gruppi di controllo), all'aumentare del GDF15 i livelli plasmatici di miR15b-3p diminuiscono ($R=-0.403$; $p=0.012$ e $R=-0.329$; $p=0.029$, rispettivamente). (Figura 29d, e)

Non è stata invece osservata una correlazione significativa tra i livelli sierici del GDF15 e lo stato nutrizionale dei pazienti oncologici, sebbene il grafico mostri una tendenza all'aumento dei livelli sierici di GDF15 al diminuire del valore del FFACT. (Fig.29f)

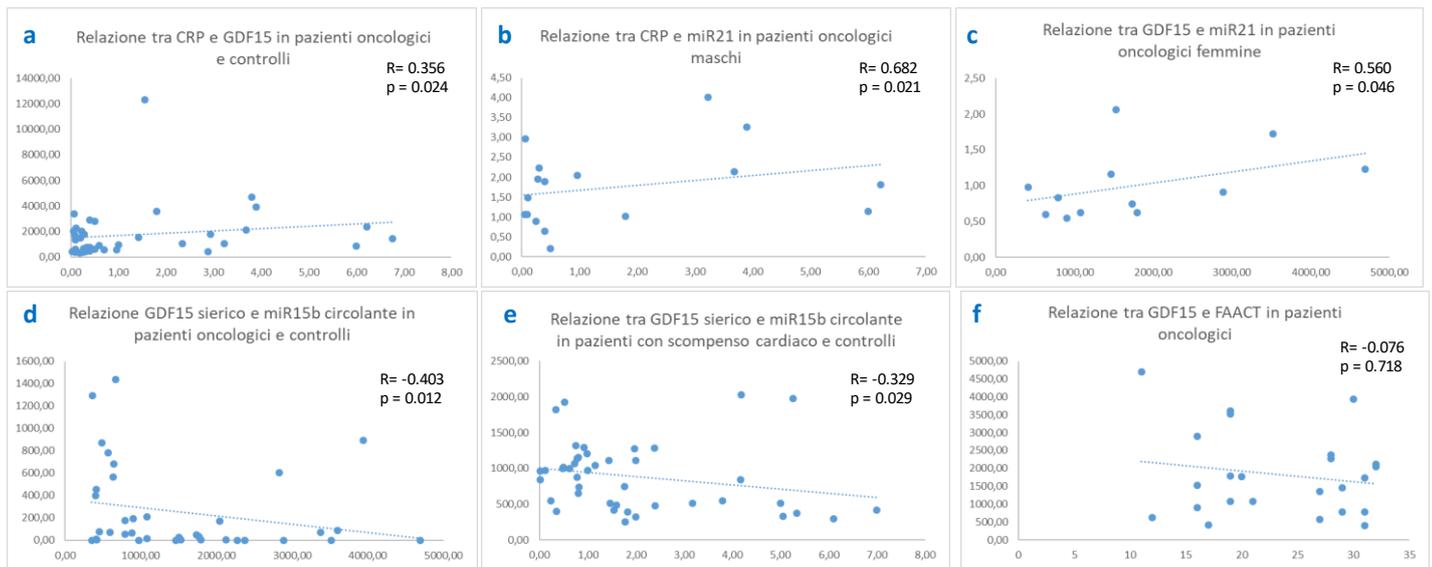


Figura 29. Correlazione di Spearman tra livelli sierici di GDF15, CRP e circolanti dimiR21 e miR15b. a) la regressione lineare mostra una correlazione positiva tra GDF15 e CRP nella prima coorte di pazienti. b) la regressione lineare mostra una correlazione positiva tra i livelli sierici di CRP e miR21 plasmatico, nei pazienti oncologici maschi. c) la regressione lineare mostra una correlazione positiva tra i livelli sierici di GDF15 e miR21 plasmatico, nei pazienti oncologici femmine. d, e) la regressione lineare mostra una correlazione negativa tra GDF15 e miR15b nella prima (d) e nella seconda (e) coorte di partecipanti. f) La regressione lineare mostra la relazione tra il Functional Assessment of Anorexia/Cachexia Therapy (FAACT) score ed i livelli sierici di GDF15, non è evidenziata una correlazione significativa.

4.7.2 MyomiRNA e status del Tessuto Muscolare Scheletrico in pazienti oncologici e gruppo di controllo

Nella prima coorte di partecipanti, pazienti oncologici e relativo gruppo di controllo, è stata osservata una correlazione positiva tra i livelli plasmatici dei myomiRNA, miR133a-3p e miR206-3p ($R = 0.479$; $p = 0.002$) (Figura 30a) ed una correlazione negativa tra i livelli circolanti di miR486-5p ed i livelli ematici di creatinina (corr. Di Spearman $R = -0.437$; $p = 0.006$) (Figura 30b). Considerando solo i pazienti oncologici, è stata osservata una correlazione positiva tra i livelli circolanti di miR133a-3p con i valori di L3-SMI ($R = 0.663$; $p < 0.001$) (Figura 30c).

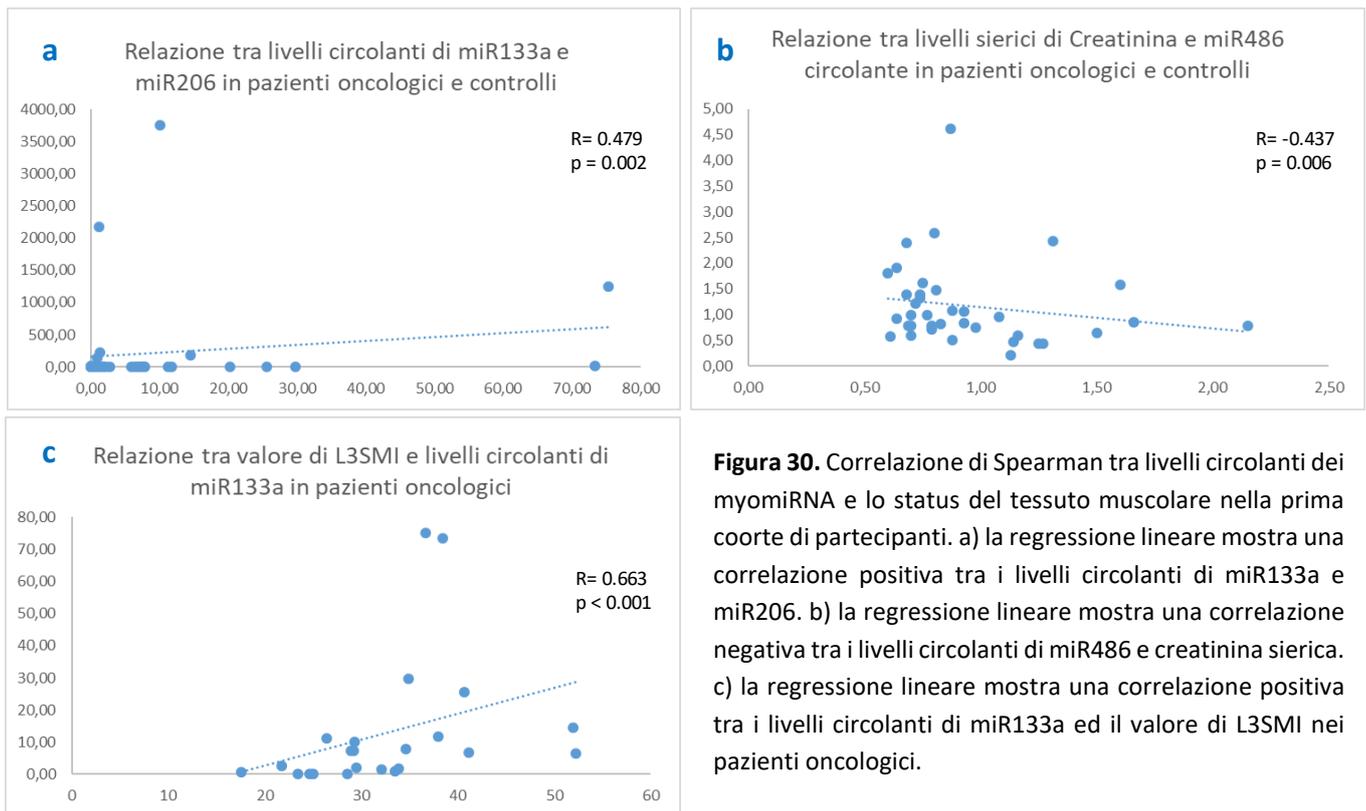


Figura 30. Correlazione di Spearman tra livelli circolanti dei myomiRNA e lo status del tessuto muscolare nella prima coorte di partecipanti. a) la regressione lineare mostra una correlazione positiva tra i livelli circolanti di miR133a e miR206. b) la regressione lineare mostra una correlazione negativa tra i livelli circolanti di miR486 e creatinina sierica. c) la regressione lineare mostra una correlazione positiva tra i livelli circolanti di miR133a ed il valore di L3SMI nei pazienti oncologici.

4.7.3 miRNA29 tissutali/circolanti e miR15b in entrambe le coorti di partecipanti

Nella prima coorte di partecipanti, pazienti oncologici e relativo gruppo di controllo, è stata osservata una correlazione positiva per i livelli tissutali dei miRNA appartenenti alla famiglia miR29. All'aumentare dei livelli tissutali di miR29c-3p, aumentano anche quelli del miR29a-3p tissutale ($R = 0.788$; $p < 0.001$) (Figura 31a) e del miR29b-3p tissutale ($R = 0.868$; $p < 0.001$) (Figura 31b). I miR29a-3p e miR29b-3p tissutali sono tra loro correlati ($R = 0.715$; $p < 0.001$) (Figura 31c). Lo stesso andamento è stato osservato per i livelli circolanti di tali miRNA: all'aumentare di miR29a-3p corrisponde un aumento di miR29b-3p ($R = 0.738$; $p < 0.001$) (Figura 31d). Invece, per il miR29b-3p si osserva una correlazione negativa tra i livelli circolanti e tissutali ($R = -0.351$; $p = 0.042$) (Figura 31e). Infine, in questa coorte di partecipanti, è stata rilevata una correlazione negativa tra i livelli circolanti di miR29a-3p, miR29b-3p e miR15b-3p ($R = -0.421$; $p = 0.009$; $R = -0.324$; $p = 0.047$, rispettivamente) (Figura 31f, g).

Anche nella seconda coorte di partecipanti (pazienti con scompenso cardiaco e relativo gruppo di controllo) è stata rilevata una correlazione positiva nei livelli circolanti dei miRNA

appartenenti alla famiglia miR29: all'aumentare dei livelli plasmatici di miR29a-3p corrisponde un aumento dei livelli di miR29b-3p ($R=0,750$; $p < 0,001$) (Figura 32a). Invece, il miR15b-3p mostra una correlazione positiva con i membri della famiglia miR29: al diminuire dei livelli di miR29a-3p e miR29b-3p, corrisponde una riduzione dei livelli plasmatici di miR15b ($R=0,328$; $p=0,030$ e $R=0,392$; $p=0,008$, rispettivamente) (Figura 32b, c)

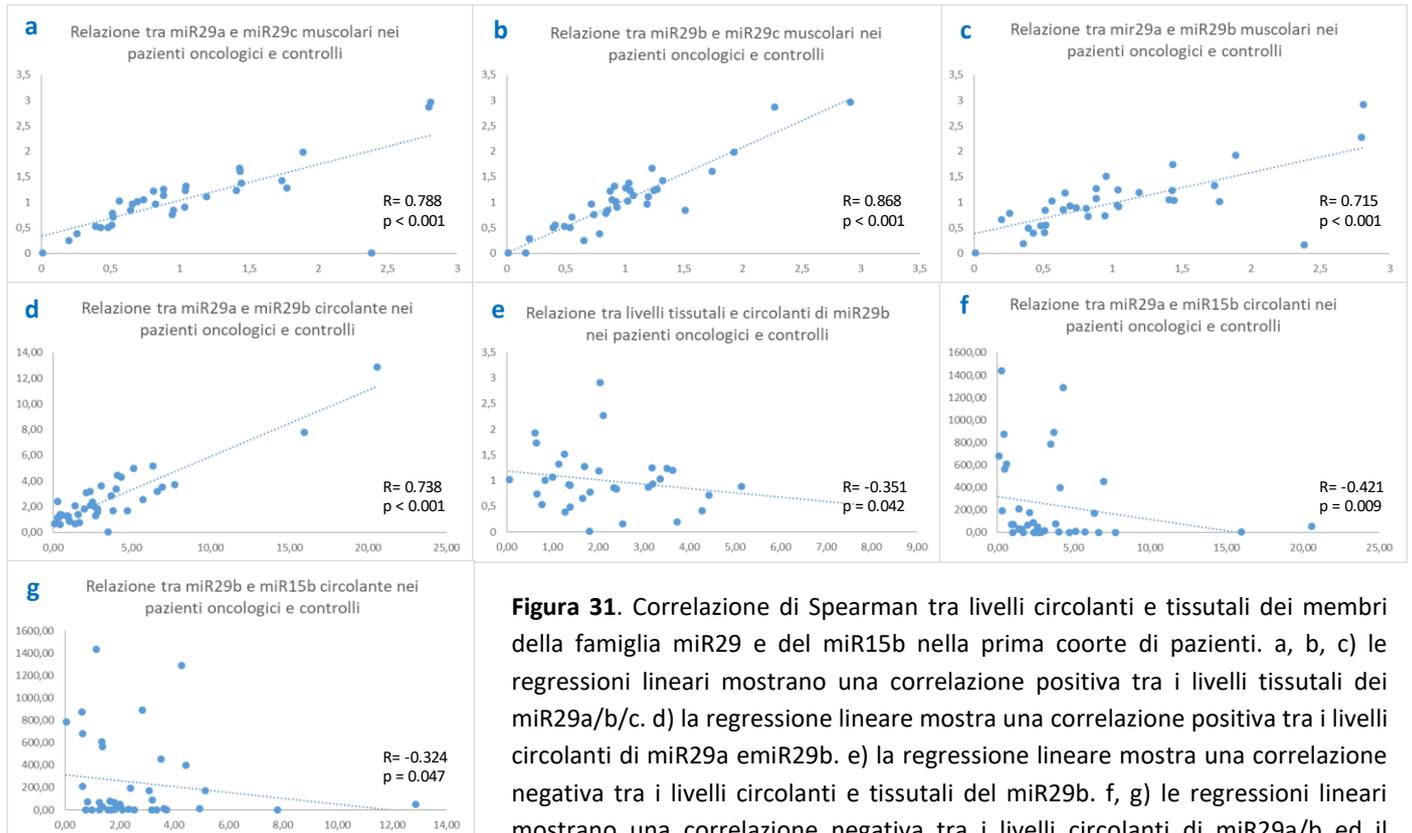


Figura 31. Correlazione di Spearman tra livelli circolanti e tissutali dei membri della famiglia miR29 e del miR15b nella prima coorte di pazienti. a, b, c) le regressioni lineari mostrano una correlazione positiva tra i livelli tissutali dei miR29a/b/c. d) la regressione lineare mostra una correlazione positiva tra i livelli circolanti di miR29a e miR29b. e) la regressione lineare mostra una correlazione negativa tra i livelli circolanti e tissutali del miR29b. f, g) le regressioni lineari mostrano una correlazione negativa tra i livelli circolanti di miR29a/b ed il miR15b.

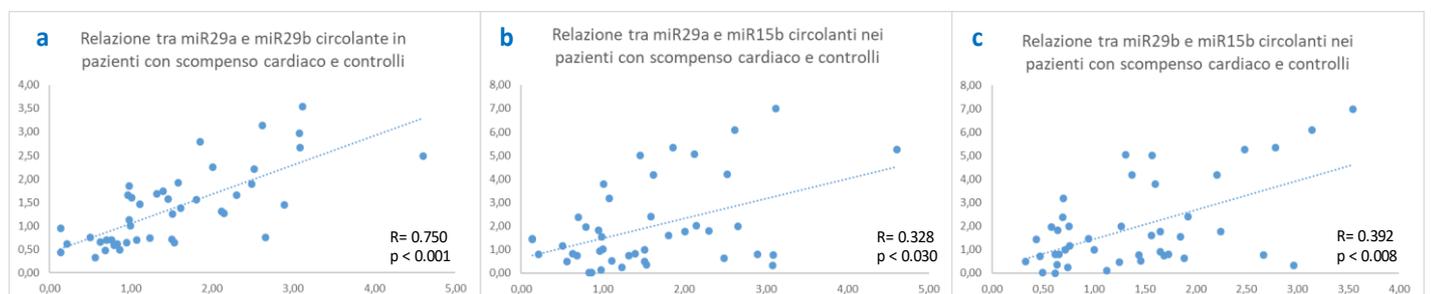


Figura 32. Correlazione di Spearman tra livelli circolanti dei membri della famiglia miR29 e del miR15b nella seconda coorte di pazienti. a) la regressione lineare mostra una correlazione positiva tra i livelli circolanti dei miR29a e miR29b. b, c) le regressioni lineari mostrano una correlazione positiva tra i livelli circolanti dei miR29a/b e del miR15b.

5 DISCUSSIONE

Lo studio condotto ha analizzato le alterazioni del profilo di miRNA e citochine in pazienti con cachessia associata a neoplasia gastrointestinale (pancreas, stomaco o colon-retto) e scompenso cardiaco, rispetto ad un gruppo di controllo. Nel gruppo di pazienti neoplastici la cachessia ha una prevalenza del 60%, mentre la pre-cachessia del 24%, che risulta sovrapponibile ai dati presenti in letteratura, in cui la prevalenza di cachessia è tra il 60 e il 70% in pazienti con tumore del tratto gastrointestinale non metastatici (71% in pancreas, 65% in gastro-esofageo e 56.7% in colon-retto) (Muscaritoli, 2017). Va considerato che i pazienti arruolati in questo studio, sono stati selezionati sulla base di criteri che prevedono l'indicazione ad intervento chirurgico, selezionando pertanto pazienti con uno stadio precoce di malattia.

Per quanto riguarda il gruppo dei pazienti con scompenso cardiaco, la cachessia ha una prevalenza del 37%, maggiore rispetto a quella riportata in letteratura, che si attesta generalmente intorno al 15-20% (von Haehling, 2017; Holm, 2019). Bisogna tuttavia precisare che la cachessia cardiaca è più frequente in pazienti con uno stato avanzato di malattia e in questi casi la prevalenza di cachessia ha un range che varia dal 15 al 39% (Valentova, 2020). La nostra coorte di pazienti è infatti costituita da soggetti con scompenso cardiaco appartenenti prevalentemente alle classi NYHA III e IV.

In merito alla definizione di cachessia, oncologica e cardiaca, va precisato che la diagnosi è stata effettuata attraverso l'utilizzo di criteri clinici specifici per la cachessia neoplastica (Fearon, 2011) e cardiaca (Anker, 2004, Evans, 2008).

Oltre alla valutazione della cachessia attraverso tali criteri, è stato valutato lo stato della massa muscolare per entrambi le coorti di pazienti, attraverso la suddivisione in terzili dei valori di L3-SMI per i pazienti oncologici e di FFMI per i pazienti con scompenso cardiaco. Non essendo lo scopo di questo studio un'analisi prospettica degli outcome clinici, l'utilizzo dei terzili di L3-SMI ha consentito di analizzare due gruppi di pazienti oncologici equilibrati in termini di numerosità, poiché se avessimo considerato i valori di cut-off indicati da *Prado et al* (2008) per la diagnosi di sarcopenia, la prevalenza sarebbe stata maggiore dell'80%. Per quanto riguarda invece, la prevalenza di sarcopenia nei pazienti con scompenso cardiaco essa risulta del 37%, sovrapponibile ai dati presenti in letteratura (Fülster, 2013).

In questo studio, il punto di partenza è stato l'analisi mediante Next Generation Sequencing (NGS) del profilo di espressione dei miRNA (miRnoma) in pazienti con tumori gastrointestinali poiché tipi di tumore altamente cachettizzanti. Le analisi NGS stanno

diventando negli ultimi anni molto frequenti, poiché permettono di identificare modulazioni dei miRNA ad ampio spettro ed offrono risultati sensibili e specifici (Narasimhan, 2017). In particolare, sono stati analizzati nei pazienti neoplastici, i miRNA provenienti da campioni di tessuto muscolare scheletrico (retto dell'addome), prelevati mediante biopsia in fase di intervento chirurgico, nonché i miRNA estratti da microvescicole ed esosomi isolati dal plasma. L'obiettivo era quello di identificare miRNA che risultassero modulati nei campioni dei pazienti oncologici al fine di poter eseguire una valutazione comparativa con i miRNA circolanti in pazienti affetti da scompenso cardiaco.

Mentre la maggior parte degli studi presenti in letteratura riporta alterazioni dei miRNA in modelli sperimentali di cachessia (cellule o modelli murini) (He, 2014; Lee, 2017; Moraes, 2017; Calore, 2018). Narasimhan e collaboratori hanno analizzato il profilo di espressione dei miRNA presenti nel tessuto muscolare scheletrico di pazienti con cachessia neoplastica (Narasimhan, 2017). Il nostro studio ha focalizzato l'attenzione su pazienti con cancro gastrointestinale analizzando le modulazioni dei miRNA muscolari e circolanti, rispetto un gruppo di soggetti di controllo.

Dalle analisi NGS, 6 miRNA mostravano una espressione ridotta nel muscolo scheletrico dei pazienti oncologici rispetto ai soggetti di controllo. Va sottolineato che nessuno di tali miRNA era specifico del tessuto muscolare scheletrico, né faceva parte di quel gruppo di miRNA che nei modelli sperimentali di cachessia sembrano essere coinvolti nei pathways di "muscle wasting" (He, 2014; Lee, 2017; Moraes, 2017; Calore, 2018). Di questi, solo due (il miR15b-3p ed il miR203a-3p) sono stati confermati come "down-regolati" dalle analisi di validazione mediante Real-Time PCR. La discrepanza tra risultati in NGS (o microarray) e Real-Time PCR, è stata riscontrato anche da altri gruppi di ricerca (Aoi and Sakuma, 2014; Harangus, 2019), in cui i risultati preliminari ottenuti mediante analisi di NGS non sono poi confermati. Nonostante l'NGS sia una metodica accurata e precisa, la ragione di tale discrepanza potrebbe essere legata alla difficoltà nel disegnare "probes" e "primers" specifici per i miRNA, elementi piccoli e con sequenze altamente simili tra loro (Aoi and Sakuma, 2014). Anche la difficoltà nella quantificazione dell'RNA estratto dal tessuto preso in considerazione può portare ad una differenza nella quantità di miRNA nei diversi campioni analizzati (Aoi and Sakuma, 2014). Un'altra fonte di discrepanza potrebbe essere legata alla scelta del gene "housekeeping" utilizzato per normalizzare i livelli di miRNA tissutali (Aoi and Sakuma, 2014). Tuttavia, non essendoci ancora una metodica standard per la valutazione dei miRNA,

l'analisi NGS associata alla validazione mediante Real-Time PCR, resta il metodo migliore per esplorare il profilo dei miRNA tissutali e circolanti (Harangus, 2019).

Al contrario di quanto atteso, non sono state rilevate differenze significative tra pazienti e controlli, per i livelli dei miRNA circolanti racchiusi nelle vescicole extracellulari.

Poiché entrambi i risultati ottenuti dalle analisi NGS non erano in linea con quanto riportato in letteratura, abbiamo comunque analizzato i miRNA potenzialmente coinvolti nei processi di atrofia muscolare, sia a livello tissutale che circolanti, attraverso la metodica della Real-Time PCR. Effettivamente, per quanto riguarda il tessuto muscolare, i risultati ottenuti con le analisi in Real-Time PCR non si discostavano molto da quanto ottenuto con l'NGS: è stata osservata solo una tendenza all'aumento dei livelli tissutali di miR21, miR133a e miR206 nel muscolo dei pazienti oncologici, rispetto ai controlli. Invece, per i miRNA circolanti abbiamo ottenuto dei risultati diversi tra analisi in Real-Time PCR e NGS. È bene sottolineare che per le analisi in Real-Time PCR sono stati estratti e considerati i miRNA totali presenti all'interno del torrente sanguigno, non solo quelli racchiusi in vescicole extracellulari, ma anche quelli che si trovano in forma "libera" (cioè associati a LDL e HDL oppure a proteine come le AGO2) (Arroyo, 2011; Tabet, 2014; Michell, 2016). Questo perché, se da una parte è vero che i miRNA che sono prodotti dal tumore viaggiano racchiusi all'interno di vescicole extracellulari (Trovato, 2019), dall'altra bisogna considerare che le alterazioni patofisiologiche che sottostanno all'insorgenza dei segni clinici della cachessia, potrebbero non essere dovute solo ed esclusivamente ai miRNA di origine tumorale. Infatti, come riportato da *Arroyo et al.* (2011), la maggior parte dei miRNA circolanti si trovano in forma libera e sono anch'essi responsabili della comunicazione a distanza tra cellule e tessuti. Inoltre, l'utilizzo dell'ultracentrifuga per isolare le vescicole extracellulari può facilmente determinare perdita di materiale, pertanto bisognerebbe partire da un volume elevato di plasma. Va sottolineato che, come riportato precedentemente (pag. 17, 23,24) il vantaggio di utilizzare i miRNA circolanti come molecole indice di alterazioni metaboliche e muscolari in corso di cachessia, è legato all'analisi di un campione facilmente accessibile (plasma) rispetto al tessuto muscolare che deve essere prelevato con intervento invasivo per il paziente (Mathai, 2019). Inoltre, come descritto nell'introduzione (pag.30, 31) non sappiamo ancora se i miRNA vengono rilasciati in circolo dal muscolo scheletrico attraverso un meccanismo passivo o attivo, nè quale impatto abbiano tali meccanismi abbiano impatto sulla segnalazione intercellulare (Siracusa, 2018).

Sulla base dei dati ottenuti per i pazienti neoplastici, sono stati estratti i miRNA totali presenti nel plasma dei pazienti con scompenso cardiaco e del relativo gruppo di controllo. Di

seguito è riportata una analisi comparativa dei risultati ottenuti nei dosaggi di miRNA, eseguiti nei pazienti oncologici e con scompenso cardiaco.

miR15b-3p - Tale miRNA non è esclusivamente espresso nel tessuto muscolare scheletrico, ma si trova in diversi tipi cellulari (Tijssen, 2014; Lang, 2016; Sun, 2017) poiché è un importante regolatore dei geni coinvolti nel riparo del danno al DNA (Simone, 2009), nel ciclo cellulare nonché nei processi di proliferazione e apoptosi (Sun, 2017). I nostri dati mostrano una riduzione del miR15b-3p sia nel tessuto muscolare che nel plasma dei pazienti oncologici (per tutte e tre le tipologie di tumore) rispetto ai soggetti di controllo. Tale dato sembra essere in accordo con quanto dimostrato su modelli sperimentali di neoplasie - cellulari (Chen LP, 2018) e murini (Lovat, 2015) - per cui la riduzione dell'espressione di tale miRNA nel tessuto tumorale, favorirebbe la progressione e la metastatizzazione neoplastica. I nostri dati mostrano una riduzione dell'espressione del miR15b-3p circolante anche in pazienti con scompenso cardiaco, suggerendo che la malattia oncologica non sia causa esclusiva della modulazione di tale miRNA. Simone e collaboratori hanno dimostrato *in vitro* che l'espressione del miR15b viene ridotta in risposta allo stress ossidativo, alterando i processi di riparazione della doppia elica del DNA e accentuando lo squilibrio redox all'interno della cellula (Simone, 2009). Inoltre, la riduzione del miR15b ed il conseguente aumento di uno dei suoi bersagli molecolari SIRT4, aumenta la permeabilità della membrana mitocondriale determinando un accumulo di ROS all'interno di questo organello. Tale meccanismo sembrerebbe portare alla frammentazione mitocondriale ed all'attivazione dei processi di apoptosi cellulare (Schiaffino, 2013; Liu, 2014; Lang, 2016; Liu, 2018). Nonostante tali risultati siano stati precedentemente ottenuti solo in fibroblasti umani, alla luce dei nostri dati sul tessuto muscolare scheletrico dei pazienti oncologici, potremmo ipotizzare che meccanismi di stress ossidativo possano essere innescati nelle miofibre contribuendo alla perdita di massa muscolare. Anche altri distretti potrebbero essere influenzati, poiché la ridotta espressione del miR15b nel torrente sanguigno potrebbe avere conseguenze nella segnalazione intercellulare. Infine, i nostri risultati mostrano una correlazione negativa tra il miR15b-3p e il GDF15 in entrambe le coorti di pazienti (oncologici e con scompenso cardiaco). All'aumentare dei livelli sierici di GDF15, i livelli plasmatici di miR15b-3p diminuiscono. Tijssen *et al.* (2014) hanno dimostrato, in cardiomiociti e fibroblasti murini, che il miR15b ha come bersaglio mediatori a valle della via di segnalazione mediata dal TGF- β e l'inibizione di tale miRNA determina l'aumento dei geni regolati a valle di questo. Il GDF15 è uno dei ligandi appartenenti alla superfamiglia del TGF- β e i risultati da noi ottenuti evidenziano una relazione tra miR15b e GDF15 nell'uomo. La down-regolazione dell'espressione del miR15b, sia a livello muscolare che nel circolo sanguigno, potrebbe ridurre

una delle sue funzioni biologiche, ovvero la regolazione dei segnali intracellulari innescati dal GDF15, in diversi tessuti e organi. L'aumento dell'espressione dei geni a valle di GDF15 potrebbe determinare così le alterazioni metaboliche osservate nelle patologie oncologiche e cardiache. Inoltre, è importante sottolineare che i livelli sierici di GDF15 aumentano in risposta ad uno stato di stress cellulare, come quello ossidativo (Nakajima, 2019) e proprio lo stress ossidativo sembra essere una delle cause della riduzione intracellulare del miR15b (Simone, 2009). I dati da noi riportati dimostrano una relazione *in vivo* tra GDF15 e miR15b, tuttavia sono necessari studi più approfonditi per delineare i meccanismi che legano le modulazioni osservate tra queste due molecole.

miR21-5p - Tale miRNA non è specifico del tessuto muscolare scheletrico, anzi spesso viene indicato come miRNA espresso da cellule tumorali (Vorvis, 2016; Orosz, 2018; Sharma, 2018; Wu, 2018). Tuttavia, i lavori del gruppo di Croce (2014 e 2018) hanno dimostrato che il miR21-5p ha un ruolo in modelli sperimentali (sia *in vitro* che *in vivo*) di cachessia oncologica e potrebbe quindi contribuire al “muscle wasting” in pazienti con neoplasie altamente cachettizzanti (He, 2014; Calore, 2018). I nostri risultati mostrano un aumento dei livelli circolanti di miR21-5p in pazienti oncologici, soprattutto nei pazienti con tumore del colon-retto e del pancreas. Tale dato è in accordo con quanto riportato da *Alemar et al.* (2016) e *Sabry et al.* (2019). Infatti, il tessuto tumorale sembra produrre elevate quantità di questo miRNA che sembrerebbe avere un ruolo nella progressione neoplastica (Nagao, 2012; Hansen, 2014; Yamada, 2015; Orosz, 2018). Inoltre, i pazienti con cancro al colon-retto mostrano un aumento del miR21-5p anche nel tessuto muscolare scheletrico. Questo risultato potrebbe essere una conferma del fatto che nel cancro del colon-retto, il miR21-5p prodotto dalla cellula tumorale raggiunga e venga internalizzato da organi bersaglio come il muscolo, dove potrebbe promuovere l'atrofia delle miofibre. Tuttavia, in apparente contraddizione con quanto atteso, i livelli plasmatici del miR21-5p sono risultati più elevati nei pazienti non cachettici e nei pazienti con un livello di sarcopenia meno pronunciato. Questi risultati necessitano quindi di essere approfonditi in casistiche più ampie. Per quanto riguarda i livelli plasmatici di miR21-5p, esso non sembra essere modulato durante lo scompenso cardiaco, né durante la cachessia che insorge a seguito di questa patologia primaria. Tale dato sembra quindi confermare che l'aumento dei livelli circolanti del miR21-5p sia dovuto alla presenza di una neoplasia. Infine, i nostri risultati mostrano, nei pazienti neoplastici maschi, una correlazione positiva tra miR21-5p circolante e CRP -quindi con l'infiammazione sistemica- (Sheedy, 2015), ma anche tra miR21-5p circolante e GDF15 nelle sole pazienti oncologiche femmine. Pertanto, i nostri dati sono in accordo con quanto riportato da *Ek et al.* (2016) che attraverso studi di metilazione sul DNA dei linfociti

hanno osservato una relazione tra l'aumento dei livelli circolanti del miR21-5p e del GDF15. Il motivo per cui questi dati non sono confermati anche negli altri pazienti (femmine e maschi, rispettivamente), potrebbe essere legato ad una bassa numerosità campionaria o ad un bias nel nostro studio.

miR29a-3p e miR29b-3p - Tali miRNA appartengono alla stessa famiglia (miR29) e generalmente le modulazioni che subiscono durante i processi patologici seguono lo stesso andamento (Wang, 2013; Peng, 2019). Ciò è dimostrato anche dai nostri risultati, sia in pazienti oncologici che con scompenso cardiaco. I membri della famiglia miR29, non sono miRNA specifici del tessuto muscolare, ma hanno un ruolo nella regolazione della miogenesi. Inoltre, tra i target molecolari di questi microRNA ci sono mRNA di geni che codificano per proteine della matrice extracellulare (ECM), ed è stato dimostrato in modelli sperimentali (*in vitro* e *in vivo*) che la loro modulazione può alterare la struttura intra ed extracellulare del tessuto muscolare scheletrico e cardiaco (van Rooji, 2008; Zhou, 2012; Moraes, 2017). I nostri risultati mostrano un significativo aumento dei livelli plasmatici del miR29a-3p nei pazienti con tumore al colon-retto e questo dato è in accordo con quanto riportato in letteratura (Tang, 2014; Yamada, 2015) e indica che il miR29a-3p potrebbe essere prodotto e rilasciato in circolo da questo tipo di tumore. Secondo quanto riportato dal gruppo di *Croce* (2014 e 2108) il miR29a verrebbe internalizzato nella miofibra e attiverebbe gli stessi pathways di atrofia muscolare attivati dal miR21 (He, 2014; Calore, 2018). Tuttavia, non abbiamo riscontrato aumenti significativi dei livelli intramuscolari del miR29a tali da confermare quanto accade nei modelli sperimentali proposti da *Croce*. A differenza di quanto osservato nei pazienti oncologici, i pazienti con scompenso cardiaco mostrano una tendenza alla riduzione dei livelli plasmatici di miR29a e miR29b. In particolare, il miR29b-3p è significativamente ridotto in pazienti con cachessia da scompenso cardiaco. Sia *Vegter et al.* (2015) che *Moraes et al.* (2017) hanno dimostrato come la riduzione del miR29b all'interno del tessuto muscolare (cardiaco e scheletrico) di topi modello di cachessia cardiaca, sia responsabile di un aumento della fibrosi. Non potendo analizzare campioni di tessuto muscolare dei pazienti con scompenso cardiaco e non essendoci dati sul coinvolgimento di questo miRNA circolante nella progressione della fibrosi tissutale in pazienti oncologici, possiamo solo ipotizzare che la riduzione dei livelli plasmatici del miR29b possa avere un ruolo nei pathways coinvolti nel "muscle wasting" durante la cachessia cardiaca. Inoltre, è stata osservata una relazione tra miR15b e miR29b: con la riduzione dei livelli plasmatici di miR29b anche i livelli circolanti di miR15b diminuiscono. *Tijssen et al.* (2014) ha dimostrato che la riduzione dei livelli tissutali di miR15b è responsabile dell'aumento della fibrosi nel muscolo cardiaco *in vivo* (modelli murini). Aver identificato una

relazione tra questi due miRNA nell'uomo, a livello circolante, merita studi più approfonditi per cercare di comprendere il ruolo che tali miRNA possano avere nel muscolo scheletrico e cardiaco dei pazienti con cachessia cardiaca.

Non sono state riscontrate differenze nei livelli tissutali di miR29b tra pazienti oncologici e controlli (né tra pazienti cachettici e non cachettici), ma all'aumentare dei livelli circolanti di miR29b-3p corrisponde una riduzione nei livelli muscolari. Questo ci lascia pensare che il miR29b circolante potrebbe anch'esso derivare dal tumore o venir rilasciato da un altro organo/tessuto e che non abbia un ruolo determinate durante la cachessia neoplastica, ma sia piuttosto legato a pathways coinvolti nell'insorgenza della cachessia associata a scompenso cardiaco. Ulteriori studi sono necessari per comprendere il ruolo dei membri della famiglia miR29 nelle due forme di cachessia.

MyomiRNA

I **miR133a-3p** e **miR206-3p** fanno entrambi parte del gruppo di miRNA prodotti dal tessuto muscolare scheletrico e perciò definiti myomiRNA. Entrambi regolano sia la miogenesi che i processi di atrofia muscolare, poiché tra i loro bersagli molecolari ci sono elementi della via di segnalazione IGF1-Akt-mTOR (Hitachi and Tsuchida, 2014). I nostri risultati mostrano un aumento dei livelli plasmatici sia di miR133a-3p che di miR206-3p nei pazienti oncologici rispetto ai controlli, in particolare il miR133a-3p è più elevato nei pazienti con cancro al colon e al pancreas, mentre il miR206-3p mostra un consistente aumento nel plasma dei pazienti con tumore al colon. Diversi studi hanno dimostrato che i livelli di questi miRNA sono ridotti nella sede tumorale in tutte e tre le tipologie di cancro gastrointestinale (colon, pancreas e stomaco Wang L, 2014; Chen, B 2018; Dong, 2018). Inoltre, Wang L *et al* (2014) hanno dimostrato che pazienti con tumore al colon presentano una riduzione dei livelli circolanti di miR133a rispetto ai controlli. Come ipotizzato da Siracusa *et al* (2018), il rilascio di questi due myomiRNA nel torrente sanguigno potrebbe essere dovuto sia ad un rilascio passivo a seguito di una lesione del tessuto muscolare che ad una secrezione attiva che ha lo scopo di comunicare con cellule dei tessuti/organi vicini (Guescini, 2015). È importante sottolineare che i nostri risultati mostrano una differenza per i livelli tissutali di miR133a-3p e miR206-3p tra pazienti e controlli, che però non è statisticamente significativa. Tale dato sembrerebbe essere in accordo con quanto dimostrato da Roberts *et al.* (2012) in modelli murini di Distrofia Muscolare di Duchenne, secondo cui un meccanismo di rilascio passivo dei myomiRNA dal tessuto muscolare da solo non basta a spiegare l'aumento nella circolazione sanguigna, che probabilmente è dovuto alla presenza di un concomitante meccanismo di rilascio attivo. Poiché i miR133a-3p e miR206-3p

hanno come bersaglio molecolare rispettivamente il recettore IGF1R ed il ligando IGF1, possiamo ipotizzare che l'aumento dei myomiRNA circolanti possa incrementare i processi di atrofia delle miofibre. Inoltre, livelli elevati di miR206 sembrano reprimere Pax7, promuovendo così il differenziamento dei mioblasti (Margolis, 2017). Questo suggerisce che un altro meccanismo che potrebbe essere modulato da un aumento dei livelli circolanti di miR206 è il mantenimento del pool di cellule staminali muscolari (cellule satelliti) che verrebbero così indotte al differenziamento. I nostri dati mostrano un aumento dei livelli plasmatici di miR133a-3p nei pazienti non cachettici, rispetto ai controlli. Mentre, non si osserva una significativa differenza tra i pazienti cachettici ed i controlli. Tale dato potrebbe sembrare contraddittorio, ma si può verosimilmente ipotizzare che i meccanismi miRNA-mediati che portano ad una riduzione della massa muscolare siano innescati prima di poter osservarne l'effetto sul catabolismo cellulare. I nostri risultati dimostrano che le modulazioni dei myomiRNA sono già presenti durante la fase di pre-cachessia, prima della comparsa dei segni clinici di tale sindrome, a conferma della precoce modulazione metabolica che si verifica in corso di neoplasia e che giustifica l'adozione di protocolli di trattamento precoce. Inoltre, abbiamo riscontrato che i livelli plasmatici di miR133a-3p, sono più elevati nei pazienti sarcopenici che ricadevano nel I e II terzile sesso-specifico sia rispetto ai soggetti di controllo che rispetto ai pazienti sarcopenici appartenenti al III terzile. Questo dato è in accordo con quanto sostenuto da *Köberle et al.* (2013) e *Siracusa et al.* (2018), ovvero che con il progredire della sarcopenia, il rilascio passivo e continuo di miRNA muscolo-specifici nonché una sostanziale riduzione della massa muscolare, potrebbero risultare in un abbassamento dei livelli circolanti di myomiRNA. Infatti, nei pazienti oncologici, è stato osservato che i livelli di miR133a-3p diminuiscono al ridursi della massa muscolare; la riduzione del valore di L3-SMI corrisponde ad una riduzione dei livelli plasmatici di miR133a-3p. Infine, è importante sottolineare che sia per il miR133a-3p che per il miR206-3p i livelli circolanti sono diversi tra maschi e femmine sia nei pazienti che nei controlli. In particolare, tutti i soggetti maschi mostrano un aumento di miR133a-3p e miR206 rispetto ai soggetti femmine (sia pazienti che controlli) e soprattutto i pazienti maschi (sia cachettici che non cachettici) mostrano un significativo aumento di entrambi i myomiRNA. Un risultato simile è stato riportato da *Pegoraro et al.* (2017), in pazienti con Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) in cui l'aumento dei miR133a e miR206 è stato riscontrato però nel tessuto muscolare dei pazienti maschi rispetto alle femmine. I risultati da noi ottenuti non hanno evidenziato differenze nei livelli muscolari di questi due myomiRNA, ma solo dei livelli circolanti. Vogliamo comunque sottolineare che il genere potrebbe avere un effetto sull'espressione dei miRNA associati al

tessuto muscolare. Alla luce delle differenze che sono presenti nella struttura muscolare dei soggetti maschi e femmine anche in condizioni fisiologiche (Welle, 2008), questo aspetto dovrebbe essere approfondito.

Per quanto riguarda i livelli plasmatici dei miR133a-3p e miR206 nei pazienti con scompenso cardiaco, non sono state riscontrate analogie con quanto ottenuto nei pazienti oncologici. Il miR133a-3p non mostra alcuna differenza nei pazienti con scompenso cardiaco rispetto ai controlli, neanche stratificando in maschi e femmine. Questo potrebbe far pensare che la modulazione di questo miRNA sia dovuta in qualche modo alla presenza della neoplasia che potrebbe modularne i livelli direttamente o indirettamente. I pazienti con scompenso cardiaco mostrano una significativa riduzione dei livelli plasmatici di miR206-3p, al contrario di quanto osservato per i pazienti oncologici. La riduzione dei livelli plasmatici di miR206-3p potrebbe avere un ruolo nella patofisiologia dello scompenso cardiaco, anche se in letteratura non sono presenti dati consistenti con tale ipotesi. Solo un lavoro (Jin, 2017) mostra la riduzione dei livelli circolanti del miR206 in pazienti con scompenso cardiaco sinistro, che evolvono in Ipertensione Polmonare.

Il **miR486-5p** è un miRNA espresso nel tessuto muscolare scheletrico e cardiaco (Small, 2010). Ha un ruolo nella regolazione della proliferazione e del differenziamento miogenico, nonché nell' atrofia muscolare. È stata riscontrata una modulazione del miR486-5p in presenza di numerosi tipi di neoplasie (Elkhouly, 2020), in particolare i livelli di tale miRNA risultano ridotti nel tessuto tumorale di pazienti con cancro al colon-retto e stomaco (Kelley, 2018; Oh, 2011), mentre è stato riscontrato un aumento dei livelli plasmatici di tale miRNA in pazienti con cancro al pancreas ed al colon (Xu, 2016; Liu X, 2018). I nostri risultati mostrano una riduzione dei livelli plasmatici del miR486-5p nei pazienti con tumore gastrico, rispetto ai pazienti con tumore del colon-retto e del pancreas. Non ci sono significative differenze tra i pazienti con tumore del colon e del pancreas, nei confronti dei soggetti di controllo. Inoltre, abbiamo osservato una significativa riduzione dei livelli plasmatici di miR486-5p nei pazienti oncologici meno sarcopenici (I e II terzile). Poiché l'espressione di tale miRNA non è stata valutata a livello del tessuto muscolare scheletrico, non possiamo affermare che i livelli plasmatici del miR486-5p corrispondano a quelli intramuscolari. Vogliamo sottolineare che anche in questo caso, come per il miR133a-3p, sono i pazienti con un grado meno pronunciato di sarcopenia a mostrare una significativa riduzione del miR486-5p, indicando ancora una volta che le modulazioni dei miRNA associati al muscolo sono già presenti durante una fase precoce di catabolismo cellulare (Lang, 2016), ma tendono ad attenuarsi con la progressiva perdita di

muscolo, suggerendo che essi possano rappresentare un “early biomarker” del “muscle wasting”.

Per quanto riguarda i pazienti con scompenso cardiaco, è stato invece riscontrato un aumento dei livelli plasmatici del miR486-5p rispetto ai soggetti di controllo, soprattutto nei pazienti con cachessia da scompenso cardiaco. Tale dato è opposto a quanto riscontrato in pazienti oncologici, tuttavia in accordo con quanto riportato in letteratura (Beg, 2017). Infatti, ci sono lavori che, nell’uomo, identificano un aumento dei livelli circolanti di miR486-5p in pazienti con scompenso cardiaco (o altre lesioni a livello miocardico) (Zhang R, 2015; Niculescu, 2015). Il miR486-5p è espresso anche dai cardiomiociti e sembrerebbe essere parte integrante dell’omeostasi miocardica, poiché regola la proliferazione ed il differenziamento delle cellule progenitrici cardiache (Beg, 2017). Inoltre, secondo quanto riportato in un recente studio da *Bakr Zaki et al.* (2019), il miR486-5p sembrerebbe essere coinvolto nella via di segnalazione NF- κ B, responsabile della trascrizione di mediatori dell’inflammazione, come TNF α e IL-6 (Guttridge, 1999). I nostri risultati però non mostrano alcuna correlazione tra miR486-5p e stato infiammatorio sistemico (livelli sierici di CRP), ma il dato da noi ottenuto potrebbe suggerire che questo miRNA avrebbe due ruoli diversi nelle patologie oncologiche e cardiache, nonché nella cachessia da scompenso cardiaco. Ci sono risultati controversi sul ruolo e sul profilo di espressione del miR486-5p (Hu, 2010; Solomides, 2012; Peng, 2013; Wang J, 2014; Li, 2015; Wang, 2016), alcuni riportano un aumento dei livelli plasmatici ed una prognosi infausta in caso di neoplasia, altri una riduzione in circolo e nel tessuto tumorale, mentre nel caso delle patologie cardiache i livelli circolanti del miR486-5p sono elevati (Zhang, 2015; Niculescu, 2015; Beg, 2017). Questi pareri contrastanti non permettono di comprendere chiaramente quale possa essere il ruolo del miR486-5p nei processi fisiopatologici del tessuto muscolare scheletrico e cardiaco, per tale motivo sono necessari ulteriori ed approfonditi studi.

Citochine

Il **GDF15** è una citochina prodotta da diversi tessuti, poco espressa in condizioni fisiologiche mentre aumenta in risposta a diversi stimoli, come lo stress ossidativo e metabolico, lesioni tissutali e inflammatione. I nostri dati dimostrano un aumento dei livelli sierici del GDF15 sia in pazienti con cancro gastrointestinale che con scompenso cardiaco, confermando quanto già riportato in letteratura (Nakajima, 2019). In particolare, i pazienti oncologici appartenenti al III terzile sesso-specifico, mostrano un sostanziale aumento dei livelli sierici di questa citochina rispetto ai soggetti di controllo. Inoltre, è stata osservata una tendenza

all'aumento dei livelli sierici di GDF15 in pazienti che presentano valori di "FAACT score" ridotti (≤ 30 o ≤ 24), nonostante tale correlazione non sia statisticamente significativa. Tale risultato potrebbe essere dovuto ad una bassa numerosità campionaria, poiché come dimostrato da *Molfino et al* (2020), ampliando la popolazione dei pazienti oncologici (considerando sia la neoplasia polmonare che del tratto gastro-intestinale) alla riduzione del "FAACT score" corrisponde un aumento dei livelli sierici di GDF15.

Va sottolineato che, come riportato da *Emmerson et al.* (2018), il tumore stesso può essere sorgente di GDF15. Il ruolo di tale citochina durante la progressione della neoplasia è tuttora controverso: durante la fase iniziale dello sviluppo tumorale, il GDF15 sembrerebbe avere attività di soppressore, mentre in una fase tardiva, il tumore stesso produrrebbe GDF15 in elevate quantità, favorendo la progressione verso una neoplasia maligna (Emmerson, 2018).

Per quanto riguarda i pazienti con scompenso cardiaco, invece, l'aumento dei livelli sierici di tale citochina, sembrerebbe essere indipendente dalla presenza/assenza di cachessia o dallo stato della massa muscolare, confermando quanto riportato da *George et al.* (2016) cioè che il GDF15 in questa categoria di pazienti, possa essere considerato un "biomarker" di danno cardiaco. È bene sottolineare che i livelli di GDF15 aumentano con l'aumentare dell'età (Nakajima, 2019) e poiché tale citochina aumenta in risposta a diversi stimoli, specialmente in caso di stress ossidativo e metabolico, potrebbe essere associata a disfunzioni endoteliali e patologie cardiovascolari subcliniche (Wang, 2006). Inoltre, recentemente è stato riportato che pazienti con malattia renale cronica (CKD) e conseguente ridotto tasso di filtrato glomerulare, eGFR (estimated glomerular filtration rate) mostrano livelli sierici elevati di GDF15 (Nakajima, 2019). Va pertanto specificato che nelle nostre coorti di pazienti (sia oncologici che affetti da scompenso cardiaco) non erano presenti pazienti con creatinina > 1.5 mg/dl, indice di insufficienza renale.

L'FGF21 è una citochina prodotta prevalentemente dal fegato e dal tessuto adiposo, ma anche da altri tipi di tessuti (compreso il muscolo scheletrico). In condizioni patologiche l'aumento dei livelli sierici di tale citochina si osserva prevalentemente in risposta a stress cellulare, ed è comune in diversi tipi di cancro (Akyol, 2017; Qian, 2018; Kang, 2019), nonostante non sia la cellula tumorale a produrre direttamente FGF21. Recentemente è stato documentato che il gene di FGF21 sembrerebbe essere ridotto e, in alcuni casi, silenziato nelle cellule di pazienti con una neoplasia pancreatico (Luo, 2019; Lu, 2021), mentre nel caso di neoplasie al colon-retto o gastrica, non ci sono ad oggi evidenze che dimostrino la produzione di FGF21 direttamente da parte della cellula tumorale.

I nostri risultati mostrano un aumento dei livelli sierici di FGF21 nei pazienti oncologici, indipendentemente dallo stato della massa muscolare. In particolare, sono i pazienti oncologici cachettici a mostrare livelli sierici più elevati rispetto ai soggetti di controllo, indicando che questa citochina potrebbe essere coinvolta nelle alterazioni metaboliche riscontrate durante la cachessia oncologica (Manole, 2018).

Va sottolineato che anche i pazienti con cachessia da scompenso cardiaco mostrano livelli sierici più elevati di FGF21 (Holm, 2019). Inoltre, sembrerebbe esserci una diversa espressione dell'FGF21 in funzione del genere. Un aumento sostanziale dei livelli sierici di tale citochina si riscontra nei soggetti femmine considerati in questo studio ed in particolar modo nelle pazienti femmine con cachessia da scompenso cardiaco, rispetto ai soggetti maschi, sia controlli che pazienti. Ad oggi sono pochi i dati in letteratura che riportano una differente espressione di FGF21 legata al genere. In particolare, un lavoro su modelli murini sottoposti a trattamenti di “fast-refeeding” dimostra che FGF21 è più elevato nel siero di topi femmine a digiuno rispetto ai maschi (Bazhan, 2019). Sono pertanto necessari studi più approfonditi per comprendere la relazione tra profilo ormonale ed espressione di mediatori molecolari.

6 CONCLUSIONI

La diagnosi di cachessia, oncologica e cardiaca, viene eseguita tardivamente se paragonata alle profonde alterazioni metaboliche che portano alla perdita di massa muscolare ed al ridotto “food intake” che si osservano tipicamente in questa sindrome. Per questo motivo è necessario identificare dei biomarcatori rilevabili in modo non invasivo, che permettano di diagnosticare precocemente la cachessia e poter sviluppare degli interventi mirati, al fine di ridurre la mortalità associata a tale sindrome. La scoperta dei miRNA circolanti e l'utilizzo delle biopsie liquide hanno aperto un nuovo scenario nel campo della ricerca scientifica. I miRNA circolanti e le citochine potrebbero avere un ruolo chiave come biomarcatori per identificare l'insorgenza e la progressione della cachessia. Alcuni studi sui modelli animali hanno dimostrato il coinvolgimento di myo-miRNA e miRNA associati al muscolo nella patofisiologia della cachessia. Gli studi che riguardano il ruolo dei miRNA nella cachessia umana sono estremamente limitati e le interazioni molecolari identificate nei tessuti dei modelli sperimentali non possono essere facilmente riportate a quanto accade nell'uomo. Questo è legato alla elevata variabilità che hanno i campioni umani, per cui non sempre le interazioni osservate nei modelli sperimentali riflettono esattamente quello che accade nell'uomo. Inoltre, tra i limiti della ricerca traslazionale c'è la difficoltà nel reperire campioni tissutali tramite metodiche invasive quali le biopsie, per patologie che non richiedono interventi chirurgici. È invece più semplice analizzare elementi presenti nel torrente sanguigno, reperibili da un prelievo ematico, che possano riflettere le alterazioni che avvengono a livello tissutale.

Le analisi NGS condotte in questo studio hanno identificato 6 miRNA espressi in modo differente, nel tessuto muscolare dei pazienti con cancro gastrointestinale, rispetto ai soggetti di controllo. Nessuno di questi miRNA è specifico del tessuto muscolare scheletrico né era stato riscontrato modulato in modelli sperimentali (*in vitro* e *in vivo*) di cachessia oncologica. La discrepanza riscontrata tra i dati ottenuti in NGS e la validazione in Real-Time PCR si è verificata anche in altri gruppi di ricerca. Tale incongruenza potrebbe essere legata ad una imprecisa quantificazione dei miRNA, alla elevata omologia di sequenza tra i miRNA, nonché alla mancanza di un “housekeeping” universalmente accettato.

La valutazione di un piccolo gruppo di miRNA potenzialmente coinvolti nei pathways di “muscle wasting” mediante Real-Time PCR, sia a livello tissutale che circolante, ha fornito risultati diversi soprattutto per quanto riguarda i miRNA plasmatici. Aver scelto di considerare i miRNA totali, rispetto ai soli racchiusi all'interno delle vescicole extracellulari (EVs), ha permesso di identificare modulazioni a livello circolante nei pazienti oncologici, che non erano

state invece rilevate analizzando i soli miRNA vescicolari. Inoltre, è stato possibile partire da un volume ridotto di campione plasmatico. Questo suggerisce che per la valutazione di miRNA circolanti coinvolti in una sindrome sistemica come la cachessia, sia più appropriato considerare i miRNA totali che non derivino necessariamente dal tumore o da uno specifico comparto tissutale. I risultati ottenuti dimostrano che nei pazienti oncologici i livelli circolanti di alcuni miRNA (miR21-5p e miR29a/b-3p) siano associati alla presenza del tumore. Inoltre, i pazienti oncologici presentano delle modulazioni dei miRNA associati al muscolo (miR21-5p e miR133a-3p) già durante la pre-cachessia. Per quanto riguarda i pazienti con cachessia da scompenso cardiaco, essi mostrano delle modulazioni peculiari dei miRNA circolanti coinvolti nei pathways di “muscle wasting” suggerendo che anche se l’outcome osservato nei pazienti con cachessia cardiaca e oncologica è lo stesso, le interazioni molecolari che coinvolgono questi miRNA potrebbero essere diverse. Le analisi condotte in questo studio hanno dimostrato che il miR15b-3p è ridotto sia nel tessuto muscolare che nel torrente sanguigno dei pazienti oncologici, facendoci propendere per un potenziale ruolo di questo miRNA nella riduzione della massa muscolare, ancora poco indagato negli studi su modelli sperimentali di cachessia oncologica. Inoltre, proprio questo miRNA mostra una riduzione dei livelli circolanti in entrambe le coorti di pazienti, identificando una modulazione comune alle due patologie. Vale la pena sottolineare che anche le citochine dosate nei partecipanti a questo studio hanno evidenziato profili di espressione comuni alle due patologie. In particolare, il GDF15 risulta aumentato rispetto ai controlli, sia nel siero dei pazienti oncologici che con scompenso cardiaco suggerendo che le alterazioni metaboliche mediate da questa citochina abbiano luogo in entrambe le patologie. Inoltre, abbiamo riscontrato una interessante relazione tra i livelli sierici di GDF15 e circolanti di miR15b-3p, che necessita di ulteriori approfondimenti per delineare il legame tra queste due componenti molecolari. I risultati ottenuti sui livelli sierici di FGF21 che risulta più elevato nei pazienti con cachessia oncologica e da scompenso cardiaco, conferma un coinvolgimento di questa citochina nelle alterazioni metaboliche osservate durante tale sindrome. Infine, i risultati ottenuti in questo studio dimostrano che ci sono delle modulazioni di myomiRNA (miR133a-3p e miR206) e di FGF21 diverse in base al genere, sia in soggetti sani che in pazienti oncologici. Questo risultato preliminare necessita di essere approfondito per comprendere e confermare il ruolo “gender-related” dei myomiRNA, e potrebbe aprire un nuovo scenario verso la medicina precisione.

Appendice 1

1.1 IL NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

Il Next Generation Sequencing (NGS), è una metodica che si è evoluta rapidamente negli ultimi 15 anni (Slatko, 2018). Il termine NGS comprende diverse tecniche che permettono di sequenziare contemporaneamente molti frammenti di DNA (Cavallini, 2012). Ad oggi l'evoluzione della tecnologia ha permesso di affinare sempre più tali metodi, che vengono continuamente commercializzati e resi disponibili per l'applicazione nella ricerca di base e clinica (Slatko, 2018).

La metodica NGS può essere suddivisa in due categorie:

- 1) il sequenziamento mediante ibridazione, generalmente utilizzato nella pratica clinica per identificare SNPS (Single Nucleotide Polymorphisms) associati a patologie genetiche, oppure per identificare anomalie cromosomiche (e.g. riarrangiamenti, delezioni, duplicazioni o variazioni nel numero di copie, CNVs)
- 2) il sequenziamento mediante sintesi (sequencing by synthesis, SBS), che deriva dal perfezionamento del più tradizionale sequenziamento di Sanger (sviluppato nel 1977), in cui venivano utilizzati dideossi-nucleotidi per identificare le basi costituenti le sequenze di DNA, ottenendo l'intero genoma.

Ad oggi, le tecnologie più utilizzate nella ricerca di base e clinica sono metodi che rientrano nella seconda categoria (SBS) (Slatko, 2018). Tali metodi permettono di identificare il genoma, ma anche il trascrittoma (ovvero tutti gli mRNA presenti in un campione) nonché il miRnoma (il profilo di espressione dei miRNA presenti in un campione) (Shendure, 2008). Tra questi metodi ci sono: a) il Pirosequenziamento-454 (Roche); b) la tecnologia Ion -Torrent (Applied Biosystems); c) la tecnologia Illumina (Solexa and Lynx Therapeutics).

Tutti questi metodi prevedono la frammentazione del DNA (creazione delle "DNA-Library") ed una fase di amplificazione. La successiva reazione di sequenziamento viene effettuata su di un supporto solido che può contenere dei micro-canali o dei pozzetti. (Slatko, 2018).

1.1.1 Il Pirosequenziamento-454

Questo metodo di NGS permette di identificare quale tipo di nucleotide viene incorporato in una catena di DNA in allungamento attraverso il rilevamento del pirofosfato, sottoprodotto della reazione

di legame. Il frammento da analizzare, della lunghezza di 400-700bp, viene associato ad un adattatore localizzato su una sferetta e successivamente amplificato mediante una “Emulsion Polymerase Chain Reaction” (emPCR). A questo punto le sequenze ottenute vengono incubate, come singolo filamento, in un supporto in cui sono presenti pozzetti contenenti i reagenti per il sequenziamento e i nucleotidi con una delle 4 basi azotate. Quando il nucleotide corretto viene incorporato nel filamento di nuova sintesi, la reazione di polimerizzazione determina il rilascio del pirofosfato e la produzione di un segnale luminoso. L’intensità del segnale sarà proporzionale al numero di ripetizioni della base azotata su quel filamento. Si aggiungono ciclicamente tutti i 4 diversi nucleotidi, al fine di ottenere la sequenza completa del frammento di DNA. Il pirosequenziamento-454 viene comunemente utilizzato per il sequenziamento del genoma, poiché permette di leggere sequenze di DNA lunghe e di ottenere un risultato accurato in breve tempo (Slatko, 2018).

1.1.2 La tecnologia Ion-Torrent

La tecnologia Ion-Torrent permette di convertire direttamente la sequenza nucleotidica in una informazione digitale. Il DNA viene frammentato in sequenze con una lunghezza che va dalle 200 alle 1500bp successivamente associate a degli adattatori, localizzati su di una sferetta. Ogni sequenza subisce poi un’amplificazione clonale mediante emPCR e così ogni sferetta presenterà milioni di copie del frammento di DNA iniziale. A questo punto, ogni sferetta verrà posizionata su di un supporto con dei pozzetti, in cui sono presenti i reagenti per il sequenziamento. A differenza del Pirosequenziamento-454, nella tecnologia Ion-Torrent, quando il nucleotide corretto è polimerizzato nella catena di DNA in allungamento, viene rilasciato uno ione idrogeno (H⁺). Questo determina il cambiamento del pH della soluzione di reazione, che viene registrato come cambiamento di voltaggio da un sensore di ioni H⁺ (Quail, 2012; Slatko, 2018). Con questo metodo possono essere eseguite diverse analisi, incluso il sequenziamento de novo di DNA e RNA, sequenziamento microbico ed il sequenziamento dei piccoli RNA (compresi i miRNA) (Quail, 2012).

1.1.3 La tecnologia Illumina

Il sequenziamento con il metodo Illumina è basato su una tecnica di amplificazione nota come “PCR a ponte” (bridge PCR), dove i frammenti di DNA (della lunghezza di 500bp) sono sequenziati su di un supporto solido costituito da un vetrino (Shendure, 2008). Ad entrambe le estremità dei frammenti vengono legate delle molecole adattatori. Successivamente i frammenti di DNA sono disposti su di

un vetrino che presenta sequenze oligonucleotidiche complementari agli adattatori (primer). Una estremità del frammento di DNA è ibridata al vetrino; l'estremità libera forma invece un ripiegamento (ovvero un ponte) legandosi ad un primer complementare all'altro adattatore. A questo punto i frammenti vengono sottoposti a diversi cicli di amplificazione mediante PCR e da ogni frammento di DNA verrà formato un "cluster" clonale, costituito da circa 1000 copie della sequenza nucleotidica iniziale. Al vetrino vengono poi addizionati i reagenti per la reazione di sequenziamento. In questa mix di reazione i nucleotidi con una delle 4 basi azotate, sono marcati con un fluorocromo diverso: ad ogni base corrisponde un colore. Quando questi nucleotidi vengono incorporati nel filamento di DNA di nuova sintesi, il segnale luminoso viene rilevato, permettendo l'identificazione del nucleotide e infine della sequenza del frammento (Shendure, 2008; Slatko, 2018). La tecnologia Illumina trova applicazione nel sequenziamento genomico, nella metagenomica, nonché nel sequenziamento dell'RNA e del contenuto esonico (piccoli RNA) (Slatko, 2018).

7 BIBLIOGRAFIA

- Akers JC, Gonda D, Kim R, *et al.* “Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies”. *J Neurooncol*, 2013: 113, 1–11.
- Akyol M, Alacacioglu A, Demir L, *et al.* “The alterations of serum FGF-21 levels, metabolic and body composition in early breast cancer patients receiving adjuvant endocrine therapy.” *Cancer Biomark*, 2017: 18(4):441-449.
- Alberts DB, Johnson A, Lewis J *et al.* *L'essenziale di Biologia Molecolare* (2nd edn). 2005.
- Aleamar B, Izetti P, Gregório C, *et al.* “miRNA-21 and miRNA-34a Are Potential Minimally Invasive Biomarkers for the Diagnosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma”. *Pancreas*, 2016: Jan;45(1):84-92.
- Alix-Panabieres C, Pantel K. “Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer”. *Clin Chem*, 2013: pp. 110-118.
- Ambros V. “The functions of animal microRNAs”. *Nature*, 2004: Sep 16;431(7006):350-5.
- Anker S, Negassa A, Coats A, *et al.* “Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study”. *Lancet*, 2003: Mar 29;361(9363):1077-83.
- Anker S, Steinborn W and Strassburg S. “Cardiac Cachexia”. *Annals of Medicine*, 2004: 36:7, 518-529.
- Aoi W, Sakuma K. “Does regulation of skeletal muscle function involve circulating microRNAs?” *Front Physiol*, 2014: Feb 17;5:39.
- Argilés, JM. *et al.* “Cancer cachexia: understanding the molecular basis”. *Nature Publishing Group, Nature reviews. Cancer.*, 2014: 14(11), pp. 754–762.
- Argilés JM and Muscaritoli M. “Unifying diagnostic criteria for cachexia: An urgent need.” *Clin Nutr*, 2017: Jun;36(3):910-911
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, *et al.* “Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011: 108:5003–8.
- Atkin-Smith GK, Tixeira R, Paone S, *et al.* “A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure”. *Nat Commun*, 2015: 6:7439.
- Aucher A, Rudnicka D, Davis DM. “MicroRNAs transfer from human macrophages to hepatocarcinoma cells and inhibit proliferation”. *J Immunol*, 2013: 191:6250–60.
- Aversa Z, Costelli P, Muscaritoli M. “Cancer-induced muscle wasting: latest findings in prevention and treatment”. *Ther Adv Med Oncol*, 2017: 9:369–382.
- Ballarò, R. *et al.* “Moderate exercise in mice improves cancer plus chemotherapy-induced muscle wasting and mitochondrial alterations”. *The FASEB Journal*, 2019: 33(4), pp. 5482–5494.

- Bakr Zaki M, Abulsoud AI, Elsisi AM *et al.* “Potential role of circulating microRNAs (486-5p, 497, 509-5p and 605) in metabolic syndrome Egyptian male patients”. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2019 May 6; 12:601-611
- Baracos VE, Martin L, Korc M, *et al.* “Cancer-associated cachexia”. *Nat Rev Dis Primers*, 2018; 4:17105.
- Barendregt k, Soeters PB, Allison SP, *et al.* “Simple and stress starvation”. In: *Sobotka L, editor. Clinical nutrition.* 3rd ed. Galen, 2004: p. 107–13.
- Bazhan N, Jakovleva T, Feofanova N, *et al.* “Sex Differences in Liver, Adipose Tissue, and Muscle Transcriptional Response to Fasting and Refeeding in Mice”. *Cells*, 2019: 8, 1529
- Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, *et al.* “Tumor heterogeneity in the clinic”. *Nature*, 2013: 501, 355–364.
- Beg F, Wang R, Saeed Z, *et al.* “Infammation-associated microRNA changes in circulating exosomes of heart failure patients”. *BMC Res Notes*, 2017: 10:751.
- Biolo G, Heer M, Narici M, *et al.* “Microgravity as a model of ageing”. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2003: 6(1):31–40
- Biolo G, Ciochi B, Stulle M, *et al.* “Metabolic consequences of physical inactivity”. *J Ren Nutr*, 2005: 15(1): 49–53.
- Bistrián B. “Systemic Response to Inflammation”. *Nutr Rev*, 2007: Dec; 65 (12pt 2): S170-2
- Bloch S, Donaldson A, Lewis A *et al.* “MiR-181a: a potential biomarker of acute muscle wasting following elective high-risk cardiothoracic surgery”. *Critical Care*, 2015: 19:147.
- Borner T, Shaulson ED, Ghidewon M, *et al.* “GDF15 Induces Anorexia through Nausea and Emesis”. *Cell Metab*, 2020: Feb 4;31(2):351-362.
- Broughton JP, LovciMT, Huang JL, *et al.* “Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity”. *Mol Cell*, 2016: 64:320–33.
- Cacchiarelli D, Martone J, Girardi E, *et al.* “MicroRNAs involved in molecular circuitries relevant for the Duchenne muscular dystrophy pathogenesis are controlled by the dystrophin/nNOS pathway”. *Cell Metab*, 2010: 12:341–351.
- Calore F, Londhe P, Fadda P, *et al.* “The TLR7/8/9 Antagonist IMO-8503 Inhibits Cancer-Induced Cachexia”. *Cancer Res*, 2018: Dec 1;78(23):6680-6690.
- Camargo RG, Quintas Teixeira Ribeiro H, Geraldo MV, *et al.* “Cancer Cachexia and MicroRNAs”. *Mediators Inflamm*, 2015: 2015: 367561.
- Carthew RW, and Sontheimer EJ. “Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs”. *Cell*, 2009: vol. 136, no. 4, pp. 642–655.
- Cavallini A, Natali L, and Giordani T. “Potential applications of next generation sequencing to the genomics of *Posidonia oceanica*”. *Front Plant Sci*, 2012: 3: 273.
- Charge SB, and Rudnicki MA. “Cellular and molecular regulation of muscle regeneration”. *Physiol Rev*, 2004: 84, 209-238.

Chen B, Li Q, Zhou Y, *et al.* “The long coding RNA AFAP1-AS1 promotes tumor cell growth and invasion in pancreatic cancer through upregulating the IGF1R oncogene via sequestration of miR-133a”. *Cell Cycle*, 2018;17(16):1949-1966

Chen J, Callis TE and Wang D. “microRNAs and muscle disorders”. *Journal of Cell Science*, 2009: 122, 13-20.

Chen JF, Tao Y, Li J, *et al.* “microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7”, *J Cell Biol* 2010, 2010: 190: 867–879.

Chen LP, Zhang N, Ren XQ, *et al.* “miR-103/miR-195/miR-15b Regulate SALL4 and Inhibit Proliferation and Migration in Glioma”. *Molecules*, 2018: 23, 2938.

Chen X, Ba Y, Ma L, *et al.* “Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases”. *Cell Res*, 2008: 18:997–1006.

Chen X, Liang H, Zhang J, *et al.* “Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication”. *Trends Cell Biol*, 2012: 22:125–32.

Cocucci E, and Meldolesi J. “Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles”. *Trends Cell Biol*, 2015: 25, 364–372.

Cogswell JP, Ward J, Taylor IA, *et al.* “Identification of miRNA changes in Alzheimer’s disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways”. *J Alzheimers Dis*, 2008: 14:27–41.

Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, *et al.* “Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I”. *Nat Cell Biol*, 2001: 3, 339–345.

Colombo M, Raposo G, and Thery C. “Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles”. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 2014: 30, 255–289.

Conboy IM, *et al.* “Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment”. *Nature*, 2005: 433(7027), pp. 760–4.

Connolly M, Paul R, Farre-Garros R, *et al.* “miR-424-5p reduces ribosomal RNA and protein synthesis in muscle wasting”. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2018: Apr; 9(2):400-416.

Conte M, Martucci M, Mosconi G, *et al.* “GDF15 Plasma Level Is Inversely Associated With Level of Physical Activity and Correlates With Markers of Inflammation and Muscle Weakness”. *Front Immunol*, 2020: May 12; 11:915.

Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, *et al.* “MicroRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers”. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011: Jun 7;8(8):467-77.

Cossu G, and Bianco P. “Mesoangioblasts-vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues”. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2003: 13, 537-542.

Costelli P, Baccino FM. “Mechanisms of skeletal muscle depletion in wasting syndromes: role of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis”. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2003: 6(4):407–12.

Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, *et al.* “Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood”. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013: 10:472–84.

- da Silveira JC, Veeramachaneni DN, Winger QA, *et al.* “Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle”. *Biol Reprod*, 2012: 86:71.
- de Rie D, Abugessaisa I, Alam T, *et al.* “An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse”. *Nat Biotechnol*, 2017: 35:872–8.
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, *et al.* “Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex”. *Nature*, 2004: 432:231–5.
- Dev R. “Measuring cachexia—diagnostic criteria”. *Ann Palliat Med*, 2019: Jan;8(1):24-32.
- Diaz LA, Bardelli A. *et al.* “Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA”. *Journal of Clinical Oncology*, 2014: 32:579–86.
- Diniz GP, Wang DZ *et al.* “Regulation of skeletal muscle by microRNAs”. *Compr Physiol*, 2016: 1279–1294.
- Doehner W, Mazighi M, Hofmann BM, *et al.* “Cardiovascular care of patients with stroke and high risk of stroke: The need of interdisciplinary action: A consensus report from the European Society of Cardiology Cardiovascular Round Table”. *Eur J Prev Cardiol*, 2020; May; 27(7):682-692.
- Dolegowska K, Marchelek-Mysliwiec M, Nowosiad-Magda M *et al.* “FGF19 subfamily members: FGF19 and FGF21”. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2019: 75:229–240.
- Domínguez-Vigil IG, Moreno-Martínez AK, Wang JY, *et al.* “The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer”. *Oncotarget*, 2017: 9, 2912–2922.
- Dong X, Su H, Feng Jiang F, *et al.* “miR-133a, directly targeted USP39, suppresses cell proliferation and predicts prognosis of gastric cancer”. *Oncol Lett*, 2018: Jun;15(6):8311-8318.
- Ek WE, Hedman AK, Enroth S, *et al.* “Genome-wide DNA methylation study identifies genes associated with the cardiovascular biomarker GDF-15”. *Hum Mol Genet*, 2016: February 15; 25(4): 817–827.
- Elkhouly AM, Younessb RA, Gada MZ, *et al.* “MicroRNA-486-5p and microRNA-486-3p: Multifaceted pleiotropic mediators in oncological and non-oncological conditions”. *Non-coding RNA Research*, 2020: 5, 11–21
- Emmerson PJ, Duffin KL, Chintharlapalli S, *et al.* “GDF15 and Growth Control”. *Frontiers in Physiology*, 2018: (Nov) 9:1712.
- Evans WJ, Morley JE, Argilés J, *et al.* “Cachexia: a new definition”. *Clin Nutr*, 2008: Dec;27(6):793-9.
- Fearon K, Glass DJ, and Guttridge DC. “Cancer Cachexia: Mediators, Signaling, and Metabolic Pathways”. Elsevier Inc. Cell Metabolism, 2012: vol 16, Aug 8, 153-166.
- Fearon K, Strasser F, Anker SD, *et al.* “Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus”. *Lancet Oncol*, 2011: May;12(5):489-95.
- Finnegan EF, Pasquinelli AE, *et al.* “MicroRNA biogenesis: regulating the regulators”. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013: Jan-Feb;48(1):51-68.

- Finotti A, Allegretti M, Gasparello J, *et al.* “Liquid biopsy and PCR-free ultrasensitive detection systems in oncology (Review)”. *Int J Oncol*, 2018: Oct;53(4):1395-1434.
- Forcina, L. *et al.* “An Overview About the Biology of Skeletal Muscle Satellite Cells”. *Current Genomics*, 2019: 20(1), pp. 24–37.
- Fouladiun M, Korner U, Bosaeus I, *et al.* “Body composition and time course changes in regional distribution of fat and lean tissue in unselected cancer patients on palliative care – correlations with food intake, metabolism, exercise capacity, and hormones”. *Cancer*, 2005: 103: 2189-98.
- Fragala MS, Jajtner AR, Beyer KS, *et al.* “Biomarkers of muscle quality: N-terminal propeptide of type III procollagen and C-terminal agrin fragment responses to resistance exercise training in older adults”. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 2014: 5 (2):139-148.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, *et al.* “Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs”. *Genome Res*, 2009: 19: 92-105.
- Frontera WR. and Ochala, J. “Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function”. *Behavior Genetics*, 2015: 45(2), pp. 183–195.
- Fülster S, Tacke M, Sandek A, *et al.* “Muscle wasting in patients with chronic heart failure: results from the studies investigating co-morbidities aggravating heart failure (SICA-HF)”. *Eur Heart J*, 2013: 34:512–519.
- Gaggin HK, Januzzi JL. “Biomarkers and diagnostics in heart failure”. *Biochim Biophys Acta*, 2013: Dec;1832(12):2442-50.
- Gallo A, Tandon M, Alevizos I, *et al.* “The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes”. *PLoS ONE*, 2012: 7: e30679.
- García-Olmo D, Olmedillas-López S, Cortés-Guiral D *et al.* “The role of mucin cell-free DNA detection as a new marker for the study of acellular pseudomyxoma peritonei of appendicular origin by liquid biopsy”. *Ther Adv Med Oncol*, 2020: Jun 24;12:1758835920928233.
- Gatta L, Vitiello L, Gorini S *et al.* “Modulating the metabolism by trimetazidine enhances myoblast differentiation and promotes myogenesis in cachectic tumor-bearing c26 mice”. *Oncotarget*, 2017: Dec 8;8(69):113938-113956.
- Ge Q, Zhou Y, Lu J, *et al.* “miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions”. *Molecules*, 2014: Jan 27;19(2):1568-75.
- George M, Jena A, Srivatsan V, *et al.* “GDF 15-A Novel Biomarker in the Offing for Heart Failure”. *Curr. Cardiol. Rev*, 2016: 12, 37–46.
- Gielen S, Sandri M, Kozarez I, *et al.* “Exercise training attenuates MuRF-1 expression in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure independent of age: the randomized Leipzig Exercise Intervention in Chronic heart failure and Aging catabolism study” *Circulation*, 2012: 125 (22):2716-2727.
- Goljanek-Whysall K, Sweetman D, Munsterberg AE. “microRNAs in skeletal muscle differentiation and disease”. *Clin Sci (Lond)*, 2012: 123:611–625.
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, *et al.* “Mirbase: Tools for microRNA genomics”. *Nucleic Acids Res*, 2008: 36, D154–D158.

- Guescini M, Canonico B, Lucertini F, *et al.* “Muscle releases alpha-sarcoglycan positive extracellular vesicles carrying miRNAs in the bloodstream”. *PLoS One*, 2015: 10: e0125094.
- Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS Jr. “NF- κ B controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1”. *Mol Cell Biol*. 1999;19(8):5785–99
- Ha M, Kim VN. “Regulation of microRNA biogenesis”. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014: Aug;15(8):509-24.
- Hansen TF, Kjær-Frifeldt S, Christensen, RD *et al.* “Redefining high-risk patients with stage II colon cancer by risk index and microRNA-21: results from a population-based cohort”. *British Journal of Cancer*, 2014: 111, 1285–1292.
- Haranguş A, Berindan-Neagoe I, Todea DA, *et al.* “Noncoding RNAs and Liquid Biopsy in Lung Cancer: A Literature Review”. *Diagnostics (Basel)*, 2019: Dec 9;9(4). pii: E216.
- He WA, Calore F, Londhe P *et al.* “Microvesicles containing miRNAs promote muscle cell death in cancer cachexia via TLR7”. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014: Mar 25;111(12):4525-9.
- He WA, *et al.* “NF- κ B-mediated Pax7 dysregulation in the muscle microenvironment promotes cancer cachexia”. *Journal of Clinical Investigation*, 2013: 123(11), pp. 4821–4835.
- Hergenreider E, Heydt S, Trèguer K *et al.* “Athero protective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs”. *Nat Cell Biol*, 2012: 14, 249–256.
- Hitachi K, Nakatani M, and Tsuchida K. “Myostatin signaling regulates Akt activity via the regulation of miR-486 expression”. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2014: vol. 47, no. 1, pp. 93–103.
- Hitachi K and Tsuchida K. “Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy”. *Front Physiol*, 2014: Jan 16; 4: 408.
- Holm MR, Christensen H, Rasmussen J *et al.* “Fibroblast growth factor 21 in patients with cardiac cachexia: a possible role of chronic inflammation”. *ESC Heart Failure*, 2019: 6: 983–991.
- Hopkinson JB, Wright DN, McDonald JW, *et al.* “Corner JL. The prevalence of concern about weight loss and change in eating habits in people with advanced cancer”. *J Pain Symptom Manage*, 2006: 32: 322–31.
- Hu HY, Yan Z, Xu Y, *et al.* “Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies”. *BMC Genomics*, 2009: 10: 413.
- Hu Z, Chen X, Zhao Y, *et al.* “Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer”. *J Clin Oncol*, 2010: 28:1721-6.
- Huan J, Hornick NI, Shurtleff MJ, *et al.* “RNA trafficking by acute myelogenous leukemia exosomes”. *Cancer Res*, 2013: 73: 918-929.
- Hudson MB, Rahnert JA, Zheng B, *et al.* “miR-182 attenuates atrophy-related gene expression by targeting FoxO3 in skeletal muscle”. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014: 307(4):C314–9.
- Husaini Y, Qiu MR, Lockwood GP, *et al.* “Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15) slows cancer development but increases metastases in TRAMP prostate cancer prone mice”. *PLoS One*, 2012: 7: e43833.

- Iftikhar H, Carney GE. “Evidence and potential in vivo functions for biofluid miRNAs: from expression profiling to functional testing: potential roles of extracellular miRNAs as indicators of physiological change and as agents of intercellular information exchange”. *Bioessays*, 2016: 38:367–78.
- Ilić M, Hofman P. “Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy?” *Transl. Lung Cancer Res*, 2016: 5, 420–423.
- Inaba, S. *et al.* “Muscle regeneration is disrupted by cancer cachexia without loss of muscle stem microenvironment promotes cancer cachexia”. *Journal of Clinical Investigation*, 2018: 123(11), pp. 4821–4835.
- Institute., National Cancer. “Definition of liquid biopsy – NCI Dictionary of Cancer Terms”. National Cancer Institute. [Google Scholar]
- Izzotti A, Carozzo S, Pulliero A, *et al.* “Extracellular MicroRNA in liquid biopsy: applicability in cancer diagnosis and prevention”. *Am J Cancer Res*, 2016: Jul 1;6(7):1461-93. eCollection.
- Jin P, Gu W, Lai Y, *et al.* “The Circulating MicroRNA-206 Level Predicts the Severity of Pulmonary Hypertension in Patients with Left Heart Diseases”. *Cell Physiol Biochem*, 2017: 41:2150-2160.
- Johnen H, Lin S, Kuner T, *et al.* “Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF-beta superfamily cytokine MIC-1”. *Nat. Med*, 2007: 13, 1333–1340.
- Jouliá D, Bernardi H, Garandel V, *et al.* “Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin”. *Experimental Cell Research*, 2003: vol. 286, no. 2, pp. 263–275.
- Jung A, Kirchner T. “Liquid Biopsy in Tumor Genetic Diagnosis”. *Dtsch Arztebl Int*, 2018: 115, 169–174.
- Kang YE, Kim JT, Lim MA, *et al.* “Association between Circulating Fibroblast Growth Factor 21 and Aggressiveness in Thyroid Cancer”. *Cancers (Basel)*, 2019: Aug 12;11(8):1154
- Kayacan O, Karnak D, Beder S, *et al.* “Impact of TNF-alpha and IL-6 levels on development of cachexia in newly diagnosed NSCLC patients”. *Am J Clin Oncol*, 2006: 29:328-35.
- Kelley A, Wieghard N, Chin Y, *et al.* “MiR-486-5p Downregulation Marks an Early Event in Colorectal Carcinogenesis”. *Dis Colon Rectum*, 2018: Nov;61(11):1290-1296.
- Kempf T, von Haehling S, Peter T, *et al.* “Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure”. *J. Am. Coll. Cardiol*, 2007: 50, 1054–1060.
- Kim VN, Nam J-W. “Genomics of microRNA”. *Trends Genet*, 2006: 22: 165–173.
- Kim YK, Kim VN. “Processing of intronic microRNAs”. *EMBO J*, 2007: 26:775–83.
- Ko J, Carpenter E, Issadore D. “Detection and isolation of circulating exosomes and microvesicles for cancer monitoring and diagnostics using micro-/nano-based devices”. *Analyst*, 2015: 141:450–60.
- Köberle V, Kronenberger B, Pleli T, *et al.* “Serum microRNA-1 and microRNA-122 are prognostic markers in patients with hepatocellular carcinoma”. *Eur J Cancer*, 2013: 49: 3442–3449.

- Kukreti H, Amuthavalli K, Harikumar A, *et al.* “Muscle-specific microRNA1 (miR1) targets heat shock protein 70 (HSP70) during dexamethasone-mediated atrophy”. *J Biol Chem*, 2013: 288(9):6663–78.
- Kura B, Kalocayova B, LeBaron TW *et al.* “Regulation of microRNAs by molecular hydrogen contributes to the prevention of radiation-induced damage in the rat myocardium”. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2019: 457:61–72.
- Lang, Grether-Beck S, Singh M *et al.* “MicroRNA-15b regulates mitochondrial ROS production and the senescence-associated secretory phenotype through sirtuin 4/SIRT4”. *AGING*, 2016: March Vol. 8 No.3.
- Lee DE, Brown JL, Rosa-Caldwell ME, *et al.* “Cancer cachexia-induced muscle atrophy: evidence for alterations in microRNAs important for muscle size”. *Physiol Genomics*, 2017: May 1;49(5):253-260.
- Lee EJ, Baek M, Gusev Y, *et al.* “Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors”. *RNA*, 2008: 14: 35–42.
- Lee RC, Ambros V. “An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*”. *Science*, 2001: 294, 862–864.
- Li J, Chen Y, Guo X, *et al.* “Inhibition of miR-15b decreases cell migration and metastasis in colorectal cancer”. *Tumour Biol*, 2016: 37: 8765-8773.
- Li W, Wang Y, Zhang Q, *et al.* “MicroRNA-486 as a Biomarker for Early Diagnosis and Recurrence of Non-Small Cell Lung Cancer”. *PLoS One*, 2015: 10:e0134220.
- Liu L, Zhang G, Liang Z, *et al.* “MicroRNA-15b enhances hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis of cardiomyocytes via a mitochondrial apoptotic pathway”. *Apoptosis*, 2014: volume 19, pages19–29.
- Liu N, Williams AH, Kim Y, *et al.* “An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133”. *Proc Natl Acad Sci*, 2007: 104: 20844–20849.
- Liu X, Chen X, Zeng K, *et al.* “DNA-methylation-mediated silencing of miR-486-5p promotes colorectal cancer proliferation and migration through activation of PLAGL2/IGF2/ β -catenin signal pathway”. *Cell Death and Disease*, 2018: 9:1037.
- Liu Y, Li M, Ma J, *et al.* “Identification of differences in microRNA transcriptomes between porcine oxidative and glycolytic skeletal muscles”. *BMC Mol Biol*, 2013: 14: 7.
- Liu Y, Yang L, Yin J *et al.* “MicroRNA-15b deteriorates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis by downregulating Bcl-2 and MAPK3”. *J Investig Med*, 2018: Jan;66(1):39-45.
- Livak KJ, Schmittgen TD. “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method”. *Methods*, 2003: 25: 402–408.
- Lockhart SM, Saudek V, O’Rahilly S. “GDF15: A Hormone Conveying Somatic Distress to the Brain”. *Endocr Rev*, 2020 Aug 1;41(4):610-642.
- Loncar G, Omersa D, Cvetinovic N, *et al.* “Emerging biomarkers in heart failure and cardiac cachexia”. *International journal of molecular sciences*, 2014: 15 (12):23878-23896.

- Loumaye A, Thissen JP. “Biomarkers of cancer cachexia”. *Clinical Biochemistry*, 2017: volume 50, issue 18, P1281-1288.
- Lovat F, Fassan M, Gasparinia P *et al.* “miR-15b/16-2 deletion promotes B-cell malignancies”. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015: Sep 15;112(37):11636-41.
- Lu W, Li X, Luo Y. “FGF21 in obesity and cancer: New insights”. *Cancer Letters* 2021; 499, 5-13.
- Luo Y, Yang Y, Liu M, *et al.* “Oncogenic KRAS reduces expression of FGF21 in acinar cells to promote pancreatic tumorigenesis in mice on a high-fat diet”. *Gastroenterology*, Nov 2019: 157, 5, 1413-1428.e11.
- Malara N, Gentile F, Coppedè N, *et al.* “Superhydrophobic lab-on-chip measures secretome protonation state and provides a personalized risk assessment of sporadic tumour”. *NPJ Precis Oncol*, 2018: Nov 19;2:26.
- Mandel P, Metais P. “Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l’homme”. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil*, 1948: 142, 241–243.
- Mann DL. “Recent insights into the role of tumor necrosis factor in the failing heart”. *heart failure reviews*, 2001: 6 (2):71-80.
- Manole E, Ceafalan LC, Popescu BO *et al.* “Myokines as Possible Therapeutic Targets in Cancer Cachexia”. *J Immunol Res*, 2018: Oct 22;2018: 8260742.
- Margolis LM, Rivas DA, Pasiakos SM, *et al.* “Upregulation of circulating myomiR following short-term energy restriction is inversely associated with whole body protein synthesis”. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2017: Sep 1;313(3): R298-R304.
- Marinho R, Alcântara PSM, Ottoch JP, *et al.* “Role of Exosomal MicroRNAs and myomiRs in the Development of Cancer Cachexia-Associated Muscle Wasting”. *Front Nutr*, 2018: Jan 9; 4: 69.
- Martins T, Vitorino R, Amado F, *et al.* “Biomarkers for cardiac cachexia: reality or utopia”. *Clin Chim Acta*, 2014: Sep 25; 436:323-8.
- Masaoutis C, Mihailidou C, Tsourouflis G, *et al.* “Exosomes in lung cancer diagnosis and treatment. From the translating research into future clinical practice”. *Biochimie*, 2018: 151, 27–36.
- Mathai RA, Vidya RVS, Reddy BS, *et al.* “Potential Utility of Liquid Biopsy as a Diagnostic and Prognostic Tool for the Assessment of Solid Tumors: Implications in the Precision Oncology”. *J Clin Med*. 2019, 2019: Mar 18;8(3). pii: E373.
- Mauro. “Satellite Cell of skeletal muscle fibers”. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1961: 9, 493-495.
- McCarthy JJ. “The MyomiR network in skeletal muscle plasticity”. *Exerc Sport Sci Rev*, 2011: 39: 150–154.
- McPherron AC, Lawler AM, and Lee SJ. “Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member”. *Nature*, 1997: vol. 387, no. 6628, pp. 83–90.
- Michell DL, Vickers KC. “Lipoprotein carriers of microRNAs”. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016: 1861, 2069–2074.

- Mittelbrunn M, Sanchez-Madrid F. “Intercellular communication: Diverse structures for exchange of genetic information”. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 2012: 13, 328–335.
- Molfino A, Amabile MI, Imbimbo G, *et al.* “Association between Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) Serum Levels, Anorexia and Low Muscle Mass among Cancer Patients”. *Cancers*, 2020: Dec 13, 13(1): 99.
- Molfino A, Amabile MI, Muscaritoli M. “Nutrition support for treating cancer-associated weight loss: an update”. *Curr Opin Support Palliat Care*, 2018: 12:434–438.
- Molfino A, Kaysen GA, Chertow GM, *et al.* “Validating Appetite Assessment Tools Among Patients Receiving Hemodialysis”. *J Ren Nutr*, 2016: 26(2):103-110.
- Molinari F, Malara N, Mollace V, *et al.* “Animal models of cardiac cachexia”. *Int J Cardiol*, 2016: Sep 15; 219:105-10.
- Monesi. *Istologia* (5th edn). 2002.
- Moraes LN, Fernandez GJ, Vechetti-Júnior IJ, *et al.* “Integration of miRNA and mRNA expression profiles reveals microRNA-regulated networks during muscle wasting in cardiac cachexia”. *Sci Rep*, 2017: Aug 1;7(1):6998.
- Moran Y, Agron M, Praher D, *et al.* “The evolutionary origin of plant and animal microRNAs”. *Nat. Ecol. Evol*, 2017: 1, 27.
- Muroya S, Taniguchi M, Shibata M, *et al.* “Profiling of differentially expressed microRNA and the bioinformatic target gene analyses in bovine fast- and slow-type muscles by massively parallel sequencing”. *J Anim Sci*, 2013: 91: 90–103.
- Muscaritoli M, Anker SD, Argilés J *et al.* “Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: Joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) “cachexia-anorexia in chronic wasting diseases” and “nutrition in geriatrics””. *Clinical Nutrition*, 2010: 29, 154–159.
- Muscaritoli M, Arends J, Aapro M. “From guidelines to clinical practice: a roadmap for oncologists for nutrition therapy for cancer patients”. *Ther Adv Med Oncol*, 2019: Nov 13; 11: 1758835919880084.
- Muscaritoli M, Molfino A, Gioia G, *et al.* “The “parallel pathway”: a novel nutritional and metabolic approach to cancer patients”. *Intern Emerg Med*, 2011: 6: 105–112.
- Muscaritoli M, Rossi Fanelli F, Molfino A. “Perspectives of health care professionals on cancer cachexia: results from three global surveys”. *Ann Oncol*, 2016: 27: 2230–2236.
- Muscaritoli M, Lucia S, Farcomeni A, *et al.* “Prevalence of malnutrition in patients at first medical oncology visit: the PreMiO study”. *Oncotarget*, 2017: 8, no. 45 (2017): 79884-79896.
- Nagao Y, Hisaoka M, Matsuyama A, *et al.* “Association of microRNA-21 expression with its targets, PDCD4 and TIMP3, in pancreatic ductal adenocarcinoma”. *Mod Pathol*, 2012: Jan;25(1):112-21.
- Nagaya N, Moriya J, Yasumura Y, *et al.* “Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure”. *Circulation*, 2004: 110 (24):3674-3679.

- Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, *et al.* “Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors”. *Circulation*, 2001; 104 (17):2034-2038.
- Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Polesskaya A, *et al.* “The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation”. *Nature Cell Biology*, 2006: volume 8, pages278–284.
- Nakajima T, Shibasaki I, Sawaguchi T *et al.* “Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) Is a Biomarker of Muscle Wasting and Renal Dysfunction in Preoperative Cardiovascular Surgery Patients”. *J. Clin. Med*, 2019: 8, 1576.
- Narasimhan A, Ghosh S, Stretch C, *et al.* “Small RNAome profiling from human skeletal muscle: novel miRNAs and their targets associated with cancer cachexia”. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2017: 8:405–16.
- Narumi T, Watanabe T, Kadowaki S *et al.* “Sarcopenia evaluated by fat-free mass index is an important prognostic factor in patients with chronic heart failure”. *Eur J Intern Med*, 2015: Mar;26(2):118-22.
- Niculescu LS, Simionescu N, Sanda GM, *et al.* “MiR486 and miR-92a identified in circulating HDL discriminate between stable and vulnerable coronary artery disease patients”. *PLoS ONE*, 2015: 10(10): e0140958
- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, *et al.* “Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation”. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018: Aug 3; 9:402.
- Oh H, Tan AL, Das K *et al.* “Genomic loss of miR-486 regulates tumor progression and the OLFM4 antiapoptotic factor in gastric cancer”. *Clin Cancer Res*, 2011: May 1;17(9):2657-67.
- Oost LJ, Kustermann M, Armani A *et al.* “Fibroblast growth factor 21 controls mitophagy and muscle mass”. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 2019: 10: 630–642.
- Orosz E, Kiss I, Gyöngy Z, *et al.* “Expression of Circulating miR-155, miR-21, miR-221, miR-30a, miR-34a and miR-29a: Comparison of Colonic and Rectal Cancer”. *in vivo*, 2018: 32:1333-1337
- Palmirotta R, Lovero D, Cafforio P, *et al.* “Liquid biopsy of cancer: A multimodal diagnostic tool in clinical oncology”. *Ther Adv Med Oncol*, 2018: 10, 1758835918794630.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, *et al.* “Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA”. *Nature*, 2000: 408:86–9.
- Pegoraro V, Merico A, Angelini C. “Micro-RNAs in ALS muscle: Differences in gender, age at onset and disease duration”. *J Neurol Sci*, 2017: Sep 15;380:58-63.
- Peng Q, Feng Z, Shen Y, *et al.* “Integrated analyses of microRNA-29 family and the related combination biomarkers demonstrate their widespread influence on risk, recurrence, metastasis and survival outcome in colorectal cancer”. *Cancer Cell Int*, 2019: 19:181.
- Peng Y, Dai Y, Hitchcock C, *et al.* “Insulin growth factor signaling is regulated by microRNA-486, an underexpressed microRNA in lung cancer.” *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013: 110:15043-8.
- Penna F, Ballarò R, Beltrà M *et al.* “The Skeletal Muscle as an Active Player Against Cancer Cachexia”. *Front Physiol*, 2019: Feb 18; 10:41.

- Penna F, Ballarò R, Martínez-Cristobal P *et al.* “Autophagy Exacerbates Muscle Wasting in Cancer Cachexia and Impairs Mitochondrial Function”. *J Mol Biol*, 2019: Jul 12;431(15):2674-2686.
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD *et al.* “2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure”. *European Heart Journal*, 2016: 37, 2129–2200.
- Prado CM, Lieffers JR, McCargar LJ, *et al.* “Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study”. *Lancet Oncol*, 2008: 9, no. 7 (2008): 629-635.
- Qi ZH, Xu HX, Zhang SR, *et al.* “The Significance of Liquid Biopsy in Pancreatic Cancer” *J Cancer*, 2018: Sep 8;9(18):3417-3426.
- Qian J, Tikik K, Weigl K, *et al.* “Fibroblast growth factor 21 as a circulating biomarker at various stages of colorectal carcinogenesis” *Randomized Controlled Trial Br J Cancer*, 2018: Nov;119(11):1374-1382.
- Quail MA, Smith M, Coupland P, *et al.* “A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers”. *BMC Genomics.*, 2012: 13:341.
- Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, *et al.* “Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer”. *Clin Lung Cancer*, 2009: 10, 42–46.
- Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, *et al.* “Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs”. *Proc Natl Acad Sci*, 2006: 103: 8721–8726.
- Ravegnini G, Sammarini G, Serrano C *et al.* “Clinical relevance of circulating molecules in cancer: focus on gastrointestinal stromal tumors”. *Ther Adv Med Oncol*, 2019: Mar 1;11:1758835919831902.
- Rijavec E, Coco S, Genova C, *et al.* “Liquid Biopsy in Non-Small Cell Lung Cancer: Highlights and Challenges”. *Cancers (Basel)*, 2019: Dec 19;12(1).
- Roberts TC, Blomberg KEM, McClorey G, *et al.* “Expression analysis in multiple muscle groups and serum reveals complexity in the microRNA transcriptome of the mdx mouse with implications for therapy”. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2012: 1: e39.
- Rotini, A. *et al.* “Aging affects the in vivo regenerative potential of human mesoangioblasts” *AgingCell*, 2017: (November), pp. 1–14.
- Sabry D, El Deek SEM, Maher M *et al.* “Role of miRNA-210, miRNA-21 and miRNA-126 as diagnostic biomarkers in colorectal carcinoma: impact of HIF-1 α -VEGF signaling pathway”. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2019: 454:177–189.
- Sacheck JM, Hyatt JP, Raffaello A *et al.* “Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases”. *FASEB J*, 2007: 21, 140–155.
- Sambasivan, R. *et al.* “Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration”. *Development*, 2011: 138(19), pp. 4333–4333.
- Sandri M. “Signaling in Muscle Atrophy and Hypertrophy”. *PHYSIOLOGY*, 2008: 23,160–170.
- Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, *et al.* “Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy”. *Febs J*, 2013: Sep;280(17):4294-314.

- Seale, P. *et al.* “Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells”. *Cell*, 2000: 102(6), pp.777–86.
- Sharma N and Baruah MM. “The microRNA signatures: aberrantly expressed miRNAs in prostate cancer”. *Clin Transl Oncol*: 2019 Feb;21(2):126-144.
- Sheedy FJ. “Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response”. *Front Immunol*, 2015: Jan 29;6:19.
- Shendure J, Ji H. “Next-generation DNA sequencing”. *Nat Biotechnol*, 2008: 26(10):1135–1145.
- Shi Q, Yang X. “Circulating microRNA and long noncoding RNA as biomarkers of cardiovascular diseases”. *J Cell Physiol*, 2016: 231: 751–755.
- Simone N, Soule BP, Ly D *et al.* “Ionizing Radiation-Induced Oxidative Stress Alters miRNA Expression”. *Plos One*, 2009: July, Vol 4, Issue 7, e6377.
- Siracusa J, Koulmann N, Banzet S. “Circulating myomiRs: a new class of biomarkers to monitor skeletal muscle in physiology and medicine”. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2018: Nov 28.
- Skog J, Würdinger T, van Rijn S, *et al.* “Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers”. *Nat. Cell Biol*, 2008: 10, 1470–1476.
- Slatko BE, Gardner AF, and Ausubel FM. “Overview of Next Generation Sequencing Technologies”. *Curr Protoc Mol Biol*, 2018: April; 122(1): e59.
- Small EM, O’Rourke JR, Moresi V, *et al.* “Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010: 107, 4218–4223.
- Soares RJ, Cagnin S, Chemello F, *et al.* “Involvement of microRNAs in the regulation of muscle wasting during catabolic conditions”. *J Biol Chem*, 2014: Aug 8;289(32):21909-25.
- Solomides CC, Evans BJ, Navenot JM, *et al.* “MicroRNA profiling in lung cancer reveals new molecular markers for diagnosis”. *Acta Cytol*, 2012: 56:645-54. 10.1159/000343473
- Soriano-Arroquia A, House L, Tregilgas L. *et al.* “The functional consequences of age-related changes in microRNA expression in skeletal muscle”. *Biogerontology*, 2016: 17:641–654.
- Sun W, Lan J, Chen L, *et al.* “A mutation in porcine pre-miR-15b alters the biogenesis of MiR-15b\16-1 cluster and strand selection of MiR-15b”. *PLoS ONE*, 2017: 12(5): e0178045.
- Tabet F, Vickers KC, Cuesta Torres LF, *et al.* “HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells”. *Nat Commun*, 2014: 5:3292.
- Tang W, Zhu Y, Gao J, *et al.* “MicroRNA-29a promotes colorectal cancer metastasis by regulating matrix metalloproteinase 2 and E-cadherin via KLF4”. *Br J Cancer*, 2014: Jan 21;110(2):450-8.
- Tanzer A, Stadler PF. “Molecular evolution of a microRNA cluster”. *J Mol Biol*, 2004: 339:327–35.
- Taylor DD, and Gercel-Taylor C. “MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer”. *Gynecol Oncol*, 2008: 110, 13–21.
- Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J *et al.* “Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells”. *J Clin Invest*, 2010: 120, 11-19.

- Teplyuk NM, Mollenhauer B, Gabriely G, *et al.* “MicroRNAs in cerebrospinal fluid identify glioblastoma and metastatic brain cancers and reflect disease activity”. *Neuro Oncol*, 2012: 14: 689-700.
- Tezze C, Romanello V and Marco Sandri. “FGF21 as Modulator of Metabolism in Health and Disease”. *Front Physiol*, 2019: Apr 17; 10:419.
- Tezze C, Romanello V, Desbats MA, *et al.* “Age-associated loss of OPA1 in muscle impacts muscle mass, metabolic homeostasis, systemic inflammation, and Epithelial Senescence”. *Cell Metab*, 2017: 25:1374–1389 e6.
- Théry C, Witwer KW, Aikawa E, *et al.* “Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014”. *J Extracell Vesicles*, 2018: Nov 23;7(1):1535750. .
- Thomas DR. “Loss of skeletal muscle mass in aging: examining the relationship of starvation, sarcopenia and cachexia”. *Clin Nutr*, 2007: 26:389–99.
- Thomas MJ, Fraser DJ, Bowen T. “Biogenesis, Stabilization, and Transport of microRNAs in Kidney Health and Disease”. *Noncoding RNA*, 2018: Nov 3;4(4). pii: E30.
- Tijssen AJ, van der Made I, van den Hoogenhof MM, *et al.* “The microRNA-15 family inhibits the TGF β -pathway in the heart”. *Cardiovascular Research*, 2014: 104, 61–71.
- Trovato E, Di Felice V, Barone R. “Extracellular Vesicles: Delivery Vehicles of Myokines”. *Front Physiol*, 2019: May 7; 10:522.
- Tsai VW, Husaini Y, Sainsbury A, *et al.* “The MIC-1/GDF15-GFRAL Pathway in Energy Homeostasis: Implications for Obesity, Cachexia, and Other Associated Diseases”. *Cell Metabolism*, 2018: 28 September 4,353-368.
- Tsai VW, Macia L, Johnen H *et al.* “TGF- β superfamily cytokine MIC-1/GDF15 is a physiological appetite and body weight regulator”. *PLoS ONE*, 2013: 8, e55174.
- Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, *et al.* “Circulating miRNAs: cell-cell communication function?”. *Front Genet*, 2013: Jun 28; 4:119.
- Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. “Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function”. *Trends Biochem Sci*, 2012: 37:460–5.
- Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, *et al.* “Characterization of extracellular circulating microRNA”. *Nucleic Acids Res*, 2011: 39:7223–33.
- Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G, *et al.* “Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages”. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014: 306, C621–C633.
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, *et al.* “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.
- Valentova M, Anker S and von Haehling S. “Cardiac cachexia Revisited. The Role of Wasting in Heart Failure”. *Heart Failure Clin*, 2020: 16, 61-69.

- van de Worp WRP, Schols AMWJ, Dingemans AMC, *et al.* “Identification of microRNAs in skeletal muscle associated with lung cancer cachexia”. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2020: Apr;11(2):452-463.
- van de Worp WRP, Theys J, van Helvoort, *et al.* “Regulation of muscle atrophy by microRNAs: ‘AtromiRs’ as potential target in cachexia”. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2018: Nov;21(6):423-429.
- van Dijk DP, Bakens MJ, Coolen MM, *et al.* “Low skeletal muscle radiation attenuation and visceral adiposity are associated with overall survival and surgical site infections in patients with pancreatic cancer”. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2017: 8(2):317-3.
- van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, *et al.* “Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis”. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008: Sep 2;105(35):13027-32.
- Vegter EL, van der Meer P, de Windt LJ, *et al.* “MicroRNAs in heart failure: from biomarker to target for therapy”. *Eur J Heart Fail*, 2016: 18: 457–468.
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, *et al.* “MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins”. *Nat Cell Biol*, 2011: 13:423–33.
- von Haehling S, Ebner N, dos Santos M *et al.* “Muscle wasting and cachexia in heart failure: mechanisms and therapies”. *Nat Rev Cardiol*, 2017: vol14, Jun, 323-330.
- von Haehling S, Genth-Zotz S, Anker SD, *et al.* “Cachexia: a therapeutic approach beyond cytokine antagonism”. *International journal of cardiology*, 2002: 85 (1):173-183.
- Vorvis C, Koutsoumpa M, & Iliopoulos D. “Developments in miRNA gene signaling pathways in pancreatic cancer”. *Future Oncol*, 2016: 12(9), 1135–1150
- Wan TM, Lam CS, Ng L, *et al.* “The clinicopathological significance of miR-133a in colorectal cancer”. *Dis Markers*, 2014: 2014:919283.
- Wang J, Tian X, Han R, *et al.* “Downregulation of miR-486-5p contributes to tumor progression and metastasis by targeting protumorigenic ARHGAP5 in lung cancer”. *Oncogene*, 2014: 33:1181-9.
- Wang K, Zhang S, Weber J, *et al.* “Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells”. *Nucleic Acids Res*, 2010: Nov;38(20):7248-59.
- Wang L, Du L, Li J, *et al.* “Decreased expression of miR-133a correlates with poor prognosis in colorectal cancer patients”. *World J Gastroenterol*. 2014 Aug 28;20(32):11340-6
- Wang M, Yu H, Kim YS, *et al.* “Myostatin facilitates slow and inhibits fast myosin heavy chain expression during myogenic differentiation”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012: vol. 426, no. 1, pp. 83–88.
- Wang T, Liu J, McDonald C *et al.* “GDF15 is a heart-derived hormone that regulates body growth”. *EMBO Mol Med*, 2017: Aug;9(8):1150-1164.
- Wang XH, Hu Z, Klein JD, *et al.* “Decreased miR-29 suppresses myogenesis in CKD”. *J Am Soc Nephrol*, 2011: 22:2068–2076.
- Wang Y, Wang Q, Wei X, *et al.* “Global scientific trends on exosome research during 2007-2016: a bibliometric analysis”. *Oncotarget*, 2017: 8, 48460–48470.

- Wang Y, Zhang X, Li H, *et al.* “The role of miRNA-29 family in cancer”. *Eur J Cell Biol*, 2013: Mar;92(3):123-8.
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, *et al.* “The microRNA spectrum in 12 body fluids”. *Clin Chem*, 2010: 56:1733–41.
- Welle S, Tawil R and Thornton CA. “Sex-related differences in gene expression in human skeletal muscle”. *Plos One*, 2008: Jan 2;3(1): e1385.
- Willms E, Cabanas C, Mager I, *et al.* “Extracellular vesicle heterogeneity: subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression”. *Front Immunol*, 2018: 9:738.
- Winbanks CE, Wang B, Beyer C, *et al.* “TGF-beta regulates miR-206 and miR-29 to control myogenic differentiation through regulation of HDAC4”. *J Biol Chem*, 2011: 286:13805–13814.
- Wollert KC, Kempf T, and Wallentin L. “Growth differentiation factor 15 as a biomarker in cardiovascular disease”. *Clin. Chem*, 2017: 63, 140–151.
- Wu Y, Zhang J, Hong Y *et al.* “Effects of Kanglaite Injection on Serum miRNA-21 in Patients with Advanced Lung Cancer”. *Clinical Trial Med Sci Monit*, 2018: May 8;24:2901-2906.
- Xiong Y, Walker K, Min X, *et al.* “Long-acting MIC-1/GDF15 molecules to treat obesity: Evidence from mice to monkeys”. *Sci Transl Med*, 2017: Oct 18;9(412): ean8732.
- Xu J, Cao Z, Liu W, *et al.* “Plasma miRNAs Effectively Distinguish Patients With Pancreatic Cancer From Controls: A Multicenter Study”. *Annals of surgery*, 2016 :263:1173–9.
- Xu J, Li R, Workeneh B, *et al.* “Transcription factor FoxO1, the dominant mediator of muscle wasting in chronic kidney disease, is inhibited by microRNA-486”. *Kidney International*, 2012: vol. 82, no. 4, pp. 401–411.
- Yamada A, Horimatsu T, Okugawa Y *et al.* “Serum miR-21, miR-29a, and miR-125b Are Promising Biomarkers for the Early Detection of Colorectal Neoplasia”. *Clin Cancer Res*. 2015 Sep 15;21(18):4234-42
- Yamamoto, M. *et al.* “Loss of MyoD and Myf5 in Skeletal Muscle Stem Cells Results in Altered Myogenic Programming and Failed Regeneration”. *Stem Cell Reports*. ElsevierCompany, 2018: 10(3), pp. 956– 969.
- Yeung F, Chung E, Guess MG, *et al.* “Myh7b/miR-499 gene expression is transcriptionally regulated by MRFs and Eos”. *Nucleic Acids Res*, 2012: 40: 7303–7318.
- Zhang Y, Huang F, Wang J, *et al.* “MiR-15b mediates liver cancer cells proliferation through targeting BCL-2”. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015: 8: 15677-15683.
- Zhang R, Lan C, Pei H, *et al.* “Expression of circulating miR-486 and miR-150 in patients with acute myocardial infarction”. *BMC Cardiovasc Disord*, 2015: 15:51.
- Zhang, Y. Liu D, Chen X, *et al.* “Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration”. *Mol Cell*, 2010: 39, 133–144.
- Zhou Q, Li M, Wang X, *et al.* “Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes”. *Int J Biol Sci*, 2012: 8:118–23.

Zimmers TA, Gutierrez JC, and Koniaris LG. “Loss of GDF- 15 abolishes sulindac chemoprevention in the ApcMin/ mouse model of C intestinal cancer”. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010: 136, 571–576.

RINGRAZIAMENTI:

Grazie a Gian Domenico, che mi ha accompagnato durante questi anni e continua a farlo, permettendomi di arrivare alla conclusione di questo percorso con amore, felicità e serenità. Grazie a mamma e Giorgia che sono sempre disposte ad ascoltare i miei sfoghi e mi incoraggiano nelle scelte che faccio. Grazie anche a Walter, per il sostegno.

Grazie in particolar modo al Prof. Muscaritoli, per gli insegnamenti elargiti in questi anni e per il tempo che mi ha dedicato, permettendomi di arrivare a questo traguardo con sicurezza e determinazione. Grazie al Prof. Molfino, per la sua costante presenza e la disponibilità dimostrata. Vorrei ringraziare entrambi i Professori per avermi dato la possibilità di continuare a svolgere questo bellissimo lavoro ed imparare da loro. Grazie a Marida, per i consigli. Grazie soprattutto alla Prof.ssa Elisabetta Ferraro che mi ha insegnato tanto, sia tecnicamente che umanamente e che è sempre disposta ad infondermi coraggio nei momenti in cui mi sento insicura. Grazie alla Prof.ssa Costelli, per i preziosi consigli e la disponibilità dimostrata; a Lorena per la compagnia e la collaborazione nel periodo in cui sono stata a Torino.

Grazie a Francesco e Fabrizio, ma soprattutto a Ludovica per avermi aiutato nell'arruolamento dei pazienti. Grazie Ludo per l'affetto dimostrato! Grazie a Raffaella per la complicità instaurata. Grazie a Giovanni per avermi aiutato nella comprensione dei parametri clinici e per le classificazioni dei pazienti. Grazie soprattutto a Cesarina, che è sempre disposta ad aiutarmi e che in questi anni mi ha supportato (e sopportato!!), specialmente durante i periodi in cui sono stata più ansiosa. Grazie a Sabrina ed Angela, che rendono la pausa pranzo più allegra. Grazie a Silvia ed Elinda per il sostegno dimostratomi in questi anni.

Grazie a Claudia per aver reso il corso di statistica più divertente del previsto! Grazie a Stefano ed Ersilia, che sono stati (e spero continueranno ad esserlo) una parte fondamentale del mio percorso di crescita professionale. Grazie anche ad Alessio e Francesca, per la disponibilità dimostrata.

Infine, un grazie speciale al mio papà, che è la ragione per cui ho intrapreso questa strada e che (ne sono sicura) "muove i fili" illuminando il sentiero giusto da scegliere. Grazie per gli insegnamenti che mi hai fornito, per la testardaggine, la caparbità e la determinazione che tu e mamma mi avete insegnato.