



Ita. J. Sports Reh. Po.

Italian Journal of
Sports Rehabilitation and Posturology

2128

Ruolo dei miRNA nel mantenimento dell'omeostasi dell'apparato muscolo scheletrico

Domenico Catalano¹, Luigi Febbrari², Rosario D'Onofrio³.

¹ *Molecular Biologist & Bioinformatic Researcher C.N.R.- ITB - Bari -*

² *Director of Department Fitness Training in Football Albanian Federation -*

³ *Rehab & Posturologist Fitness Coach - Sapienza University of Rome -*



Abstract

Solo 2 % del genoma umano è occupato da geni codificanti per proteine, mentre la restante parte contiene regioni non codificanti. Fu a causa di questa apparente mancanza di funzione che in seguito alla pubblicazione della sequenza del genoma che il DNA non codificante fu etichettato, dagli addetti ai lavori, come “Junk DNA” (letteralmente DNA spazzatura). I primi dubbi a tale riguardo, sorsero quando si osservò che le cellule trascrivevano attivamente larghe porzioni di DNA non codificante. Il motivo per cui la cellula impiegasse così ingenti risorse energetiche per una attività priva di apparente funzione biologica, fece supporre che il junk DNA avesse un ruolo nel mantenimento dell'omeostasi cellulare, ruolo dimostrato in numerosi studi successivi.

L'RNA cellulare totale presente, sottratto della frazione di RNA messaggeri codificanti per proteine, è per l'80-90% rappresentato dall'RNA ribosomiale e RNA transfer, due molecole essenziali per supportare la sintesi proteica cellulare, quel che resta è una miscelazione di molecole di RNA non omogenea (per grandezza e funzione) attualmente indicate come RNA non codificanti (RNA non coding).

I micro RNA (miRNA) sono una particolare classe di RNA non codificanti di piccole dimensioni, presenti in tutti gli organismi, ad eccezione dei batteri, che agiscono come regolatori epigenetici post-trascrizionali, esercitando una funzione di controllo di vie metaboliche attivate in condizioni fisiopatologiche. Da diversi studi è emerso che alcuni miRNA sono tessuto specifici, altri sono trasportati nei diversi distretti dell'organismo attraverso i fluidi corporei veicolati da sistemi di vescicole (esosomi).

Una particolare famiglia di miRNA specifici per il muscolo chiamati myomiR intervengono nei processi di sviluppo e differenziamento, nella regolazione del metabolismo muscolare e nei processi di riduzione e cicatrizzazione delle lesioni. Oggigiorno si calcola che sono circa 40 miRNA che intervengono nell'armonizzare le risposte metaboliche poste in atto in seguito agli stimoli determinati dall'attività fisica e dall'infortunio.

Key word : miRNA, myomiR, musculoskeletal system , injury, osteoarthritis



Citation. Catalano D., Febbrari L., D'Onofrio R., *Ruolo dei miRNA nel mantenimento dell'omeostasi dell'apparato muscolo scheletrico ; Ita. J. Sports Reh. Po ; 2022; 9 (21); 3;1 ; 2128 – 2138; . ISSN 2385-1988 [online] ;IBSN 007-111-19-55; CGI J OAJI 0,101]. Published Online. Open Access (OA) publishing.*

Authorship Credit: “Criteria authorship scientific article” has been used “Equal Contribution” (EC).

Corresponding author : Catalano Domenico : C.N.R.- ITB - via Amendola 122/D BARI (ITALY) Office (39)080.5929687 **e-mail :** domenico.catalano@ba.itb.cnr.it

Introduzione

Il processo che conduce alla formazione della molecola biologicamente attiva, il miRNA maturo, inizia nel nucleo cellulare con la trascrizione e produzione di un RNA messaggero chiamato pri-miRNA che sempre nel nucleo subisce un primo processo di maturazione con formazione della molecola precursore del miRNA (pre-miRNA).

Il pre-miRNA è una molecola con una precisa struttura secondaria, evolutivamente conservata nelle diverse specie che una volta trasportata nel citoplasma è riconosciuta da specifiche endonucleasi cellulari e maturata a miRNA maturo.

I miRNA sono molecole a singolo filamento, lunghe 18-24 nucleotidi, che agiscono come regolatori negativi post-trascrizionali dell'espressione genica legandosi a specifici siti presenti sugli RNA messaggeri target. Il legame del miRNA al messaggero determina o il blocco del processo di traduzione o la degradazione del messaggero target, realizzata dalle endonucleasi cellulari. I due meccanismi sono esclusivi e si realizzano in relazione alle condizioni cellulari e delle caratteristiche del legame fra miRNA e il suo target, in ogni modo l'effetto è la riduzione del prodotto proteico⁴ nella cellula.

I miRNA pur rappresentando una piccolissima frazione del genoma svolgono un ruolo determinante nel mantenimento dell'omeostasi cellulare, questo lo si intuisce dal fatto che geni per miRNA sono stati individuati in tutti gli organismi ad eccezione dei batteri e che linee cellulari in cui vengono inattivati, inevitabilmente soccombono⁵. Il genoma umano contiene circa 2000 geni per miRNA e si stima che circa un terzo dei geni umani venga regolato da miRNA, frazione che potrebbe salire al 60%, come è emerso dai risultati ottenuti da recenti analisi bioinformatiche.

La regolazione spazio temporale dei miRNA nei diversi tessuti e il loro coinvolgimento in numerosi stati fisiopatologici², li candida a molecole target per futuri studi sulle lesioni a carico dell'apparato muscolo scheletrico^{6,7,8,9,10,11,12} indirizzati a individuare nuove molecole terapeutiche e/o sviluppo di biomarcatori precoci.

miRNA e l'apparato muscolo scheletrico

Nell'uomo sappiamo che circa 40, dei duemila geni conosciuti, sono coinvolti nella regolazione dei metabolismi che caratterizzano le strutture muscolo scheletriche, fin dai primi studi emerse che molti miRNA si comportavano come molecole tessuto specifiche e che i livelli espressi dalle cellule dipendevano dalle condizioni fisiopatologiche^{13,14} in cui si misuravano.

MiR-1, miR-133a e miR-206 specifici per il muscolo striato quando furono individuati vennero chiamati myomiR, gruppo allargato successivamente a miR-208a, miR-208b, miR-499 e recentemente anche a miR-486. I myomiR finora identificati sono presenti in tutti tessuti muscolari, ad eccezione di miR-208a e miR-206 specifici per cuore e muscolo scheletrico, in particolare in quello a contrazione lenta (es soleo).

È interessante notare che, indipendentemente dal tipo di fibra in cui li si va a cercare, i livelli di miR-1 e miR-133 risultano comparabili, al contrario miR-206, miR-208b e miR-499 sono maggiormente presenti nei muscoli a contrazione lenta, al momento nessun myomiR sembra essere specifico per le fibre a contrazione rapida di tipo II¹⁵.

Studiando il ruolo funzionale dei myomiR si è scoperto che la sovra espressione in vitro di miR-1, in linee cellulari con caratteristiche embrionali indifferenziate (cellule Hela) , causa lo spostamento dal profilo embrionale ad uno di tipo miogenico.

Questo risultato suggerisce che i myomiR abbiano un ruolo nel promuovere l'identità delle cellule muscolari durante lo sviluppo e probabilmente anche nei processi rigenerativi posti in essere dopo l'infortunio muscolare.

Ricerche rivolte a comprendere il comportamento dei myomiR in risposta agli stimoli derivanti dall'esercizio fisico hanno evidenziato che in individui non allenati, la singola seduta di attività fisica determina un l'incremento dei myomiR , fenomeno non osservabile in individui allenati e atleti professionisti.

Studi sul processo rigenerativo, in modello animale, in cui viene prodotto un danno muscolare con iniezione cardiottossina¹⁶, si osserva che i myomiR favoriscono il differenziamento delle cellule satelliti, le cellule embrionali del muscolo, causando una minor espressione (down-regolazione) del fattore di trascrizione Pax7, gene essenziale nella crescita cellulare e nel differenziamento delle cellule muscolari.

Al momento non è stato ancora dimostrato se un simile meccanismo si attivi nella riparazione del danno muscolare indotto dall'esercizio fisico, è comunque ragionevole ipotizzare che i myomiR intervengano nella regolazione della risposta allo stress muscolare generato dall'attività fisica. MiR-1 è fra tutti i myomiR, il più sensibile ai cambiamenti indotti dall'attività muscolare e indipendentemente dalla modalità con cui essa avvenga, l'incremento della stessa genera sempre una diminuzione dei livelli di miR-1 nelle cellule.

Risultati di esperimenti in cui si riproduce l'assenza di gravità (es scarico prolungato del muscolo, permanenza nello spazio o sospensione dell'arto), rivelano una diminuzione proporzionale alla durata dello stimolo dell'espressione dei myomiR, per esempio l'assenza di gravità protratta per 12-28 giorni causa una diminuzione fino al 60% dell'espressione dei myomiR nelle cellule muscolari.

Alcune indicazioni fanno supporre che i myomiR agiscano attraverso una rete coordinata di interazioni^{17,18} con i geni coinvolti nella costruzione del muscolo. In cellule cardiache si è osservato che variazioni dell'espressione genica della miosina-6, sono sempre seguite da identiche variazioni di miR-208, che si sa essere implicato nella regolazione dell'espressione dei geni codificanti per le miofibrille a contrazione lenta.

Il rapporto presente nelle cellule cardiache fra la beta e alfa miosina determinano la velocità contrattile del cuore e questo può caratterizzare alcuni stati patologici. L'inattivazione di miR-208a, in risposta a uno stimolo ipertrofico o ipertiroidismo induce la sovra-espressione del gene Myh7 codificante per la catena pesante della β -miosina.

La miosina è il principale regolatore della contrattilità e della forza muscolare, studi di genomica hanno dimostrato che gli introni dei geni codificanti per le diverse miosine, codificano alcuni myomiR. E' stato visto che alcuni degli introni del gene per la catena pesante della β -miosina (Myh7) codificano per miR-208b e miR-499, regolatori di Sox6, Pur e Sp3, importanti fattori di trascrizione, capaci di sopprimere l'espressione dello stesso gene Myh7, mettendo in atto un meccanismo di raffinata regolazione retroattiva.

A conferma di quanto appena detto vi è l'osservazione che l'espressione del gene Sox6 determina una diminuzione delle fibre a contrazione lenta, al contrario miR-208b e miR-499 promuovono la formazione delle stesse fibre, tant'è che la sovra espressione di miR-499 nel muscolo (soleo) causa la completa conversione delle fibre muscolari in fibre di tipo I, cambiamento associato anche ad una superiore capacità prestativa nella corsa di resistenza.

Nel muscolo l'inattivazione di miR-208b e miR-499 produce una perdita significativa di fibre a contrazione lenta, riduzione dell'espressione del gene Myh7 e sovra espressione del gene Sox6. Da queste osservazioni risulta evidente che il livello di espressione dei geni per le diverse miosine determini anche quello dei myomiR, fatto che dimostra l'esistenza di network genico fra i miRNA e geni coinvolti nello sviluppo muscolare e che regioni non codificanti come gli introni^{17,18} sono coinvolti nella omeostasi cellulare.

Uno degli aspetti caratteristici del muscolo scheletrico è la capacità di avviare una robusta risposta rigenerativa in seguito alle lesioni. Durante il processo riparativo le cellule satelliti aumentano l'attività mitotica moltiplicandosi e avviandosi verso un processo di differenziamento. I livelli nelle cellule muscolari di miR-27 e Pax3 mostrano un opposto andamento e l'inibizione di miR-27 ritarda la rigenerazione del muscolo, mentre un miglioramento si osserva in seguito alla iniezione in sede alla lesione di myomiR quali miR-1, miR-133 e miR-206. I myomiR iniettati, generano da un lato la sovra espressione del fattore di differenziazione miogenico (MYOD1), di miogenina (MYOG) e del gene Pax7 e dall'altro diminuiscono la produzione di miostatina (MSTN). Il MYOD1 è un fattore di trascrizione che nelle cellule muscolari agisce determinando l'arresto del ciclo cellulare, prerequisito fondamentale per si compia il differenziamento miogenico.

Risultati sperimentali confermano la regolazione dell'espressione del gene Pax7 da parte di miR-1 e miR-206 durante la proliferazione delle cellule satellite, processo fondamentale alla rigenerazione muscolare. In uno studio correlato si è dimostrato che l'inattivazione di miR-206 ha esacerbato la rigenerazione provocando una difettosa differenziazione delle cellule satelliti, probabilmente causata dall'incapacità di ridurre l'espressione di Pax7. MiR-206 durante la rigenerazione agisce sul gene Hmgb3 (High Mobility Group Box 3), codificante per una proteina importante nel mantenimento della popolazione di cellule staminali all'interno dei tessuti^{17,18}. Muscoli con livelli ridotti di miR-26 e miR-675-3p/-5p hanno mostrato una risposta rigenerativa ritardata; gli stessi miRNA risultano essenziali per una corretta rigenerazione muscolare che si attua attraverso l'inibizione della via di trasduzione del segnale attivata da fattore di crescita trasformante beta 1 (TGF- β 1 transforming Growth Factor Beta 1). Infine l'osservazione che in seguito ad una lesione muscolare l'espressione di miR-26a è rapidamente inibita per poi aumentare lentamente dopo alcuni giorni, promuove miR-26a a candidato ideale per essere un marcatore molecolare da monitorare durante il recupero^{19,20} nell'infortunio muscolare.

I tendini sono strutture del tessuto connettivo che trasmettono la forza sviluppata dai muscoli alle ossa. Le strutture tendinee sono composte da una densa matrice extracellulare (ECM) costituita da collagene di tipo I, collagene di tipo III, elastina e vari proteoglicani. Il fibroblasto è il tipo cellulare predominante nei tendini ed è responsabile del mantenimento, della riparazione e modifica dell'ECM tendineo, mentre le cellule embrionali progenitrici dei tendini (TSCP tendon stem/progenitor cells) giocano un ruolo critico nella fisiologia e nella riparazione delle lesioni tendinee. Il normale carico sopportato dai tendini stimola un aumento della densità cellulare con proliferazione dei fibroblasti e aumento del contenuto di ECM. L'incapacità dei tendini di adattarsi ad un normale carico fisiologico, può indurre in soggetti attivi lo sviluppo di tendinopatie anche dolorose tali da limitare l'attività fisica²¹.

È stato stimato che circa il 30% dei soggetti che manifestano dolore all'apparato muscoloscheletrico soffrono di una forma di tendinopatia, mentre fra il 30 e il 50% degli infortuni che colpiscono gli atleti interessa le strutture tendinee.

Il polimero naturale chitosano ha un importante ruolo nella prevenzione e guarigione delle lesioni che coinvolgono il tendine di Achille, studi in animali modello dimostrano che il chitosano stimola la produzione di miR-29b.

Nelle tendinopatie il miR-29b è fra i più studiati in quanto coinvolto nel processo di guarigione dei tendini sostenuto dall'inibizione della via metabolica attivata dal sistema TGF- β 1/SMAD3^{22,23}.

Studi in biopsie umane hanno rivelato che la riduzione dell'espressione di miR-29a genera tendinopatie, questo associato ai risultati ottenuti da altri studi indipendenti ci indicano che la famiglia dei miR-29 è coinvolta nella produzione di collagene e matrice extracellulare²⁷. Le lesioni e/o micro lesioni ripetute sono causa di stress per le cellule tendinee, queste inducono il rilascio di interleuchina-33 (IL-33) che promuove la fosforilazione e quindi l'attivazione del fattore nucleare Kappa-beta1 (NF κ B). In sede di lesione l'attivazione NF κ B abbassa i livelli di miR-29a, con conseguente aumento della produzione di collagene di tipo III e del recettore dell'interleuchina-33 (IL33R), che provoca un aumento della sensibilità all'azione della citochina (IL-33), innescando un meccanismo di retroazione positiva. L'aumentata produzione di collagene di tipo III, riduce la resistenza alla trazione del tendine predisponendolo a successive lesioni. La ridotta espressione di miR-29a osservata nelle biopsie umane favorisce l'insorgere di tendinopatia, fatto che ben si correla con l'attività anti-fibrotica²⁸ mostrata da miR-29b nel diminuire i livelli di TGF- β 1/Smad3, e nel migliorare la guarigione e l'estensibilità del tendine riparato. Infine come vedremo meglio in seguito famiglia genica miR-29 sembra aver un ruolo nello sviluppo della osteoartrite post traumatica²⁹.

In molti stati patologici che interessano l'apparato muscoloscheletrico IL-33 risulta aumentato nella fase iniziale della malattia, mentre in fase di risoluzione si osservano livelli significativamente più bassi. IL-33 quindi si comporta come regolatore nei processi di rimodellamento e guarigione dei tessuti, la rete metabolica posta in atto da IL-33 e miR-29 fa sì

che la citochina possa essere considerata un marcatore precoce nella tendinopatia e i livelli di espressione di IL-33 osservati nel tessuto infortunato siano una istantanea dello stato fisiopatologico³⁰.

Oltre a miR-29, sono circa quindici i geni per miRNA che partecipano alla omeostasi delle strutture tendinee, per alcuni come miR-124 si sa che è in grado di diminuire la produzione di collagene perché agisce diminuendo i livelli cellulari del fattore trascrizione *EGR1* (Early growth response-1)^{24,25} coinvolto nel riparo delle strutture tendinee e che modula la produzione di collagene di tipo I e II²⁶. Nelle tendinopatia, l'induzione di miR-206 assieme a TGF- β 1 sembra migliorare la cura nelle lesioni tendinee.

La capacità riparativa dei tendini si riduce con l'avanzare dell'età, a questo proposito nell'uomo le cellule TSCP estratte da donatori anziani evidenziano una sovra-regolazione della beta-galattosidasi un biomcatore associato alla senescenza (SA- β -gal)^{31,32} e del gene per l'inibitore della ciclina chinasi dipendente (*CDKN2A* Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2) che sembra agire rallentando la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 a G2.

Negli anziani si osserva una diminuzione del collagene di tipo I e dell'espressione di alcuni marcatori tendinei come i geni codificanti decorina (decorin *DCN*) e il biglicano (*BGN* biglycan), entrambi proteoglicani correlati a fenomeni rigenerativi e nell'assemblaggio del collagene e fibrille in diversi tessuti, infine sempre negli anziani risulta diminuita la tenomodulina (*TNMD* *tenomodulin*) quest'ultima codificante per una glicoproteina specifica della cartilagine.

L'azione di *miR-217* sul suo target *EGR1*, un fattore di trascrizione nucleare (Early Growth Response), sembra regolare la trascrizione di numerosi geni coinvolti nella proliferazione cellulare e differenziamento con effetti negativi nella guarigione delle lesioni.

CDKN2A influenza l'espressione di diversi miRNA coinvolti nella rigenerazione e senescenza delle strutture tendinee³¹ e *miR-217* risulta progressivamente espresso nelle cellule endoteliali durante la senescenza fatto che sembra compromettere l'angiogenesi. Il processo è ripristinabile sperimentalmente in cellule endoteliali invecchiate con l'inibizione di *miR-217*, ottenendo un miglioramento sia del fenotipo di senescenza che un ripristino dell'attività angiogenica.

In conclusione Il livello di miR-217 è significativamente aumentato nei TSPC invecchiati assieme a *CDKN2A*, che è un biomcatore per la senescenza agendo incrementando l'espressione di miR-217. Infine il gene *EGR1*, che abbiamo già visto essere importante nel promuovere la differenziazione tenogena, è target di miR-217 nelle strutture tendinee e l'aumento di *CDKN2A* nei TSPC avvia un processo che dirige ad un parallelo innalzamento dei livelli di miR-217 responsabile quindi della diminuzione dei livelli di *EGR1* come effettivamente osservato nei TSPC di soggetti anziani.

L'espressione indotta artificialmente di *EGR1* nei TSPC migliora la capacità di differenziazione tenogena in soggetti anziani, anche in presenza di elevati livelli di *CDKN2A* e identico miglioramento è osservabile inibendo artificialmente miR-217. Tutto questo ci suggerisce che *CDKN2A* è in grado di frenare la differenziazione tenogena dei TSPC attraverso l'incremento di miR-217 e quindi la diminuzione del suo target *EGR1*^{33,34,35,36}.

La cartilagine è un tessuto elastico composto da cellule specializzate i condrociti, responsabili della secrezione di una grande quantità di matrice extracellulare ECM, formata da molecole di collagene di tipo II alfa 1 (*COL2A1*) e aggrecane (*ACAN*) La cartilagine può essere classificata in tre tipi: cartilagine elastica, cartilagine ialina e fibro-cartilagine, che differiscono fra loro in base al contenuto di collagene e proteoglicano.

La funzione della cartilagine è proteggere l'osso, diminuendo gli effetti prodotti da forze di carico, d'impatto nelle giunture e di diminuire gli attriti permettono lo scorrimento delle superficie articolari. In condrociti di animali modello in cui si è proceduto alla inattivazione specifica del sistema ribonucleoproteico DICER, sistema coinvolto nella maturazione di molecole di miRNA³⁷, si produce uno sviluppo difettoso delle strutture scheletriche e cartilaginee a dimostrazione di quanto i miRNA siano importanti anche nel tessuto cartilagineo.

Risultati delle analisi del trascrittoma, in cellule di condrociti hanno evidenziato che mir-140 può regolare SOX9 (Transcription Factor SOX-9) un fattore di trascrizione tessuto specifico, la cui carenza genera severe complicazioni nello sviluppo delle cartilagine e dello scheletro. Analogamente a quanto visto per il muscolo, con alcuni myomiR codificati dagli introni dei geni della miosina¹⁸, anche l'introne 6 del gene WWp2 (Atrophin-1-Interacting Protein) interessato nella condrogenesi, codifica miR-140.

I Geni KLF4, PTHLH e WNT5A sono tutti target di miR-140 e risultano coinvolti nella condrogenesi, quindi appare chiaro che miR-140 agisca come un fine regolatore di complesse reti metaboliche nel tessuto cartilagineo.

L'osteoartrite (OA) è considerata la forma più comune di artrite cronica e spesso porta a dolore e disabilità affliggendo circa il 10% degli uomini e il 20% delle donne di età superiore ai 60 anni nel mondo industrializzato.

2134

La leggera attività sportiva favorisce condizioni di salute ottimali ma negli sport agonistici la possibile correlazione fra pratica sportiva e sviluppo dell'osteoartrite precoce (OA) è motivo di preoccupazione per comunità medico sportiva. Ex atleti praticanti attività sportive ad alto impatto (calcio, rugby etc) mostrano una maggiore incidenza di OA a ginocchia e caviglie rispetto alla popolazione, ed è ancora discutibile se la causa debba essere ricondotta al maggior numero di infortuni o essere attribuita al sovraccarico cui sono sottoposte le articolazioni degli atleti durante la loro vita agonistica. Il gene FUT1³⁸ insieme ai miR-140-5p, miR-149 potrebbero essere responsabili della regolazione dei percorsi infiammatori che sono alla base dell'osteoartrite. E' dimostrato che la sovra espressione di miR-140-5p ostacola l'infiammazione e la degenerazione del disco intervertebrale umano indotto dai lipopolisaccaridi, riducendo l'espressione del recettore TLR-4. Il recettore TLR-4 è coinvolto nella risposta immunitaria innata che innesca un catena di eventi che porta alla produzione di citochine che sappiamo essere una delle cause responsabili della OA³⁹.

miR-140 è stato visto regolare l'espressione del recettore toll-like4 (TLR-4), mentre miR-146 partecipa al controllo della segnalazione di TLR-4 attraverso l'attività dei geni IRAK-1 e TRAF-6. Nell'infortunio al ginocchio con o senza compromissione della cartilagine si ha un incremento della concentrazione delle citochine infiammatorie IL-1b e TNF- α , questo produce uno sbilanciamento a favore del catabolismo e un'aumentata produzione degli enzimi aggrecanase e collagenase con conseguente diminuzione del collagene e dell'aggrecano (CSPCP *Cartilage-Specific Proteoglycan Core Protein*).

Lo sbilanciamento verso processi catabolici è indotto da una aberrante regolazione da parte di miR-125b e miR-140 che sono stati visti regolare gli enzimi proteolitici aggrecanase-I e II⁴⁰. Studi di espressione genica differenziale su tessuti della cartilagine articolare mostrano che miR-27a è significativamente meno espresso nei pazienti con OA al pari dei condrociti in cultura stimolati con IL-1 β . L'induzione di miR-27a indotta artificialmente in cellule di condrociti attenua il degrado della cartilagine prodotto dall' IL-1 β abbassando la risposta infiammatoria tramite la via TLR4 / NF- κ B⁴¹. Inoltre è stato visto che mir-127b regola un'altra metallo proteinasi tipica della matrice (MMP-13) e insieme a miR125b e miR-140 mostrano livelli di espressione bassi nella condizione di osteoartrite post traumatica (PTOA), patologia che colpisce atleti e adulti in salute che svolgono una buona attività fisica⁴².

Conclusioni

I risultati ottenuti dai recenti studi molecolari superano il modello del genoma con un mero archivio di istruzioni, e ci restituiscono l'idea di un sistema adattabile capace di rispondere rapidamente agli stimoli. Sappiamo che i miRNA sono fini regolatori di reti metaboliche complesse e che nei muscoli i myomiR agiscono durante i processi di sviluppo e nella rigenerazione del muscolo infortunato. Il monitoraggio dei myomiR in atleti in risposta agli allenamenti o alla fatica muscolare troverebbero utili applicazioni pratiche in attività sportive. Negli infortuni muscolari MiR-27 assieme al gene Pax3 potrebbero rappresentare nel breve indici prognostici e il monitoraggio durante il recupero da infortunio risulterebbe utile per capire

il grado di guarigione. L'aumentata capacità rigenerativa osservata nei muscoli mostrata in presenza di elevati livelli di miR-1, mir-133 e mir-206, li candida a target per lo sviluppo di nuovi farmaci che possano funzionare mimandone il ruolo metabolico o che agiscano favorendo una maggiore produzione di myomiR endogeni in sede alla lesione con l'obiettivo di diminuire i tempi di recupero in caso di lesione. Nelle tendinopatie la famiglia di mir29 insieme l'inibizione della via metabolica TGF- β 1/SMAD rappresentano un importante asse per lo sviluppo di specifici farmaci mentre di miR-127 e IL-33 sono importanti per rilevanti aspetti legati all'invecchiamento.

Sebbene ci sia stato un sostanziale sforzo per migliorare l'OA, con cure farmacologiche mirate o in casi più estremi ricorrendo alla chirurgia a tutt'oggi gli approcci per contrastare ed evitare l'OA restano insufficienti. Pertanto è sentita la necessità di nuovi di approcci di ricerca che svelino i meccanismi molecolari alla base dell'OA, che si rivelerebbero importanti per ottimizzare le strategie terapeutiche esistenti o sviluppare nuove molecole efficaci per la cura dell'OA. A questo proposito l'asse dei micro RNA miR-140-5p e miR-149 insieme al gene FUT1 sono i candidati per l'individuazione di un biomarcatore predittivo e/o potenziale bersaglio terapeutico nel trattamento dell'OA. Diversi studi hanno dimostrato che i miRNA hanno un ruolo anche nella rigenerazione della cartilagine³⁴, per esempio molecole come miR-140, veicolate in sistemi exosomal che operano come sistema di rilascio dell'RNA, possono migliorare la rigenerazione delle cartilagini⁴³. Sistemi terapeutici basati sull'utilizzo di esosomi come sistemi di rilascio di miRNA (o altre molecole d'interesse) potrebbero essere utilizzati in via sperimentale per la rigenerazione delle cartilagini⁴³.

Possiamo immaginare che nel medio breve periodo, i miRNA possano essere usati come "marker prognostici precoci", al pari di quanto si fa oggi con la biochimica clinica dosando nei liquidi biologici proteine, ormoni e metaboliti, in quanto indicativi dello stato fisiopatologico di un soggetto.

Infine sarebbe auspicabile l'incremento di sperimentazioni mirate agli atleti durante le diverse fasi di una stagione agonistica allo scopo di produrre solide basi di conoscenza per futuri studi applicativi.



Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Editor's disclaimer

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain

Reference

- 1) Alexander F, Palazzo, Eliza S, Lee . *Front Genet.* 2015; Non-coding RNA: what is functional and what is junk?
- 2) Subramanian S, Steer CJ. *Special Issue: MicroRNA Regulation in Health and Disease. Genes (Basel).* 2019 Jun 15;10(6).
- 3) Gurtan AM, Sharp PA. *The role of miRNAs in regulating gene expression networks. J Mol Biol.* 2013 Oct 9;425(19):3582-600.
- 4) *Role of miRNAs in regulating gene expression networks. J Mol Biol.* 2013 Oct 9;425(19):3582-600.
- 5) Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ. *Dicer is essential for mouse development. Nat Genet.* 2003;35:215–217.
- 6) Laterza OF, Lim L, Garrett-Engle PW, Vlasakova K, Muniappa N, Tanaka WK, Johnson JM, Sina JF, Fare TL, Sistare FD, Glaab WE. *Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. Clin Chem.* 2009 Nov;55(11):1977-83. doi: 10.1373/clinchem.2009.131797. Epub 2009 Sep 10. P
- 7) Plachel F, Heuberer P, Gehwolf R, Frank J, Tempfer H, Lehner C, Weissenbacher N, Wagner A, Weigl M, Moroder P, Hackl M, Traweger A. *MicroRNA Profiling Reveals Distinct Signatures in Degenerative Rotator Cuff Pathologies. J Orthop Res.* 2020 Jan;38(1):202-211.
- 8) Mooren FC, Viereck J, Krüger K, Thum T. *Circulating microRNAs as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014 Feb 15;306(4):H557-63.
- 9) Dakin SG. *MicroRNA Replacement: A New Era of Molecular Therapy for Tendon Disorders? Mol Ther.* 2017 Oct 4;25(10):2243-2244.
- 10) Giordano L, Porta GD, Peretti GM, Maffulli N. *Therapeutic potential of microRNA in tendon injuries. Br Med Bull.* 2020 May 15;133(1):79-94.
- 11) Xiao M, Iglinski-Benjamin KC, Sharpe O, Robinson WH, Abrams GD. *Exogenous micro-RNA and antagomir modulate osteogenic gene expression in tenocytes. Exp Cell Res.* 2019 May 15;378(2):119-123.
- 12) Usman MA, Nakasa T, Shoji T, Kato T, Kawanishi Y, Hamanishi M, Kamei N, Ochi M. *The effect of administration of double stranded MicroRNA-210 on acceleration of Achilles tendon healing in a rat model. J Orthop Sci.* 2015 May;20(3):538-46.
- 13) Tyler J, Kirby, Chaillou Thomas, McCarthy John J. *The role of microRNAs in skeletal muscle health and disease. Front Biosci (Landmark Ed).* ; 20: 37–77.
- 14) Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. *Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. Curr Biol.* 2002;12:735–739.
- 15) McCarthy Jhon J., *The MyomiR Network in Skeletal Muscle Plasticity. Exerc Sport Sci Rev.* 2011 July
- 16) Nakasa T, Ishikawa M, Shi M, Shibuya H, Adachi N, Ochi M. *Acceleration of muscle regeneration by local injection of muscle-specific micro-RNAs in rat skeletal muscle injury model. J. Cell Mol. Med.* 14:2495–2505.
- 17) van Rooij E, Liu N, Olson EN. *MicroRNAs flex their muscles. Trends Genet.* 2008; 24:159–166.
- 18) van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, et al. *A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. Dev. Cell.* 2009; 17:662–673
- 19) Siracusa J, Koulmann N, Goriot ME, Bourdon S, Sourdrille A, Banzet S. *Circulating levels of non-muscle-specific miRNAs in response to acute muscle damage in rat. Data Brief.* 2018 Mar 7;18:190-197.
- 20) Alexis R, Demonbreun1 and Elizabeth M. McNally. *Muscle cell communication in development and repair. Curr Opin Pharmacol.* 2017 Jun; 34: 7–14.
- 21) Kannus P. *Structure of the tendon connective tissue. Scand J Med Sci Sports* 10: 312–320, 2000
- 22) Mendias CL, Gumucio JP, Bakhurin KI, Lynch EB, Brooks SV. *Physiological loading of tendons induces scleraxis expression in epitenon fibroblasts. J Orthop Res* 30: 606–612, 2012
- 23) Chen Q, Lu H, Yang H. 2014. *Chitosan inhibits fibroblasts growth in Achilles tendon via TGF-b1/Smad3 pathway by miR-29b. Int J Clin Exp Pathol* 7:8462–8470.
- 24) Mendias CL, Gumucio JP, Bakhurin KI, Lynch EB, Brooks SV. *Physiological loading of tendons induces scleraxis expression in epitenon fibroblasts. J Orthop Res* 30: 606–612, 2012
- 25) Wang B, Guo J, Feng L, Suen CW, Fu WM, Zhang JF, Li G. *MiR124 suppresses collagen formation of human tendon derived stem cells through targeting egr1. Exp Cell Res* 347:360-366.



- 26) Guerquin MJ, Charvet B, Nourissat G, et al. Transcription factor EGR1 directs tendon differentiation and promotes tendon repair. *J Clin Invest.* 2013;123(8):3564–3576.
- 27) Rees JD, Wilson AM, Wolman RL. Current concepts in the management of tendon disorders. *Rheumatology* 45: 508-521, 2006
- 28) Maurer B, Stanczyk J, Jüngel A, Akhmetshina A, Trenkmann M, Brock M, Kowal-Bielecka O, Gay RE, Michel BA, Distler JH, Gay S, Distler O. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2010 Jun; 62(6):1733-43.
- 29) Le LT, Swingler TE, Crowe N, Vincent TL, Barter MJ, Donell ST, Delany AM, Dalmay T, Young DA, Clark IM. The microRNA-29 family in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *J Mol Med (Berl).* 2016 May;94(5):583-96. doi: 10.1007/s00109-015-1374-z. Epub 2015 Dec 19. PMID: 26687115; PMCID: PMC4856728
- 30) Millar NL, Gilchrist DS, Akbar M, Reilly JH, Kerr SC, Campbell AL, Murrell GAC, Liew FY, Kurowska-Stolarska M, McInnes IB. MicroRNA29a regulates IL-33-mediated tissue remodelling in tendon disease. *Nat Commun.* 2015 Apr 10;6:6774.
- 31) Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G. Cellular senescence in ageing, age-related disease and longevity. *Curr Vasc Pharmacol.* 2014;12(5):698-706.
- 32) Tsai WC, Chang HN, Yu TY, Chien CH, Fu LF, Liang FC, Pang JH. Decreased proliferation of aging tenocytes is associated with down-regulation of cellular senescence-inhibited gene and up-regulation of p27. *J Orthop Res.* 2011
- 33) Abonnenc M, Nabeebaccus AA, Mayr U, Barallobre-Barreiro J, Dong X, Cuello F, Sur S, Drozdov I, Langley SR, Lu R, Stathopoulou K, Didangelos A, Yin X, Zimmermann WH, Shah AM, Zampetaki A, Mayr M. Extracellular matrix secretion by cardiac fibroblasts: role of microRNA-29b and microRNA-30c. *Circ Res.* 2013 Oct 25; 113(10):1138-47.
- 34) Li J, Cen B, Chen S, He Y. MicroRNA-29b inhibits TGF- β 1-induced fibrosis via regulation of the TGF- β 1/Smad pathway in primary human endometrial stromal cells. *Mol Med Rep.* 2016 May;13(5):4229-37.
- 35) Mendias CL, Gumucio JP, Lynch EB. 2012. Mechanical loading and TGF- β change the expression of multiple miRNAs in tendon fibroblasts. *J Appl Physiol* 113:56–62.
- 36) Han W, Wang B, Liu J, Chen L. The p16/miR-217/EGR1 pathway modulates age-related tenogenic differentiation in tendon stem/progenitor cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2017 Nov 1;49(11):1015-1021.
- 37) Koralewska N, Ciechanowska K, Pokornowska M, Figlerowicz M, Kurzyńska-Kokorniak A. Ludzka rybonukleaza. [Human ribonuclease Dicer – structure and functions]. *Postepy Biochem.* 2019 Oct1;65(3):173-182. Polish. doi: 10.18388/pb.2019_267. PMID: 31643164.
- 38) Kenyon, J.D.; Sergeeva, O.; Somoza, R.A.; Li, M.; Caplan, A.I.; Khalil, A.M.; Lee, Z. Analysis of 5p and 3p strands of miR-145 and miR-140 during mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation. *Tissue Eng. Part A* 2019, 25, 80–90.
- 39) Kalaitzoglou E, Griffin TM, Humphrey MB. Innate Immune Responses and Osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2017 Aug;19(8):45
- 40) Genemaras AA, Reiner T, Huang CY, Kaplan L. Early intervention with Interleukin-1 Receptor Antagonist Protein modulates catabolic microRNA and mRNA expression in cartilage after impact injury. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015 Nov;23(11):2036-44. doi: 10.1016/j.joca.2015.05.010. PMID: 26521750.
- 41) Qiu WJ, Xu MZ, Zhu XD, Ji YH. MicroRNA-27a alleviates IL-1 β -induced inflammatory response and articular cartilage degradation via TLR4/NF- κ B signaling pathway in articular chondrocytes. *Int Immunopharmacol.* 2019 Nov;76:105839. doi: 10.1016/j.intimp.2019.105839. Epub 2019 Sep 11. PMID: 31520995.
- 42) Zhao Z, Dai XS, Wang ZY, Bao ZQ, Guan JZ. MicroRNA-26a reduces synovial inflammation and cartilage injury in osteoarthritis of knee joints through impairing the NF- κ B signaling pathway. *Biosci Rep.* 2019 Apr 9;39(4):BSR20182025. doi: 10.1042/BSR20182025. PMID: 30872407; PMCID: PMC6454017.
- 43) Won Lee G, Thangavelu M, Joung Choi M, Yeong Shin E, Sol Kim H, Seon Baek J, Woon Jeong Y, Eun Song J, Carlomagno C, Miguel Oliveira J, Luis Reis R, Khang G. Exosome mediated transfer of miRNA-140 promotes enhanced chondrogenic differentiation of bone marrow stem cells for enhanced cartilage repair and regeneration. *J Cell Biochem.* 2020 Jul;121(7):3642-3652. Epub 2020 Feb 24. PMID: 32091634.



