UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

Studio di biomarcatori circolanti nel metabolismo osseo

Study of circulating biomarkers in bone metabolism

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Fabiola Olivieri

Tesi di laurea di:

Matteo Sgrò

Correlatore:

Dott.ssa Angelica Giuliani

Anno Accademico 2025-2026

Sommario

1 INTRODUZIONE 4
1.1 Osteoporosi: Definizione e classificazione 4
1.1.1 Prevalenza e rilevanza epidemiologica ***6***
1.2 Struttura e funzione del Tessuto Osseo 6
1.2.1 Fisiopatologia ***9***
1.2.2 Squilibrio del metabolismo osseo nell'invecchiamento ***10***
1.2.3 Indicatori di rischio ***10***
1.3 Criteri diagnostici attuali 12
1.3.1 Densitometria ossea DXA e T-score ***12***
1.3.2 Limiti nella BMD/DXA nella predizione del rischio ***13***
1.3.3 BTM: marcatori tradizionali di turnover osseo ***14***
1.4 Nuovi Biomarcatori Circolanti: microRNA 15
1.4.1 Processo di maturazione e regolazione dei microRNA ***16***
1.4.2 Funzione dei microRNA ***17***
1.4.3 miRNA come indicatori di Osteoporosi ***18***
2 SCOPO DELLA TESI 19
3 MATERIALI E METODI 21
3.1 Campione dello studio 21
3.2 Gestione dei campioni biologici 22
3.3 Estrazione dei microRNA 23
3.4 Sintesi del cDNA 24
3.5 Real-Time PCR (qPCR) 27
3.6 Elaborazione dei dati 30
3.6.1 Analisi statistica ***31***
4 RISULTATI 33
4.1 Caratteristiche basali della popolazione in studio 33
4.2 Associazione tra miRNA e biomarcatori circolanti 34
4.3 Relazione tra densitometria e morfometria vertebrale 36

4.4 Caratterizzazione dei fenotipi densitometrico-morfometrici 37
4.5 Associazione tra il miR-483-5p e deformità vertebrali nelle donne con ostoepenia 40
5 DISCUSSIONE 42
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA 47

1 INTRODUZIONE

1.1 Osteoporosi: Definizione e classificazione

L'osteoporosi viene definita della "Società italiana dell'Osteoporosi, del metabolismo Minerale e delle Malattie dello scheletro" come una malattia dell'apparato scheletrico caratterizzata da una ridotta massa ossea e da un deterioramento della microarchitettura del tessuto osseo, con conseguente aumento della fragilità ossea e della predisposizione alle fratture (M. Rossini, 2016) (figura 1).

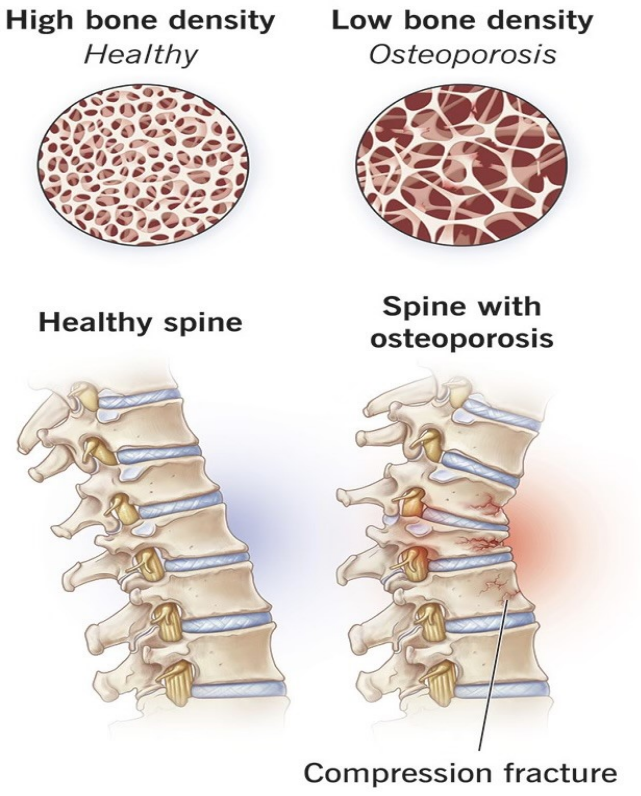


***Figura 1**: Confronto tra osso sano ed osteoporotico: la riduzione della densità ossea indebolisce la struttura vertebrale, aumentando il rischio di fratture da compressione.*

Questa condizione viene classificata principalmente, in base all'eziologia, in due grandi categorie: Osteoporosi Primaria e Osteoporosi Secondaria.

- Osteoporosi Primaria: è la forma più comune che si presenta nei pazienti e non è causata da altre patologie coesistenti, ma dal naturale invecchiamento o dal calo ormonale fisiologico. Si può ulteriormente suddividere in tre tipologie:

    - Post-menopausale (Tipo I): è caratterizzata da una carenza di estrogeni di tipo fisiologico o chirurgico e colpisce prevalentemente le donne tra i 50 e i 75 anni, interessa l'osso trabecolare (spugnoso) portando a una perdita ossea accelerata. Le sedi tipiche di frattura si verificano nel polso e nelle vertebre.

    - Senile (Tipo II): colpisce sia uomini che donne, generalmente dopo i 70 anni, a causa del progressivo invecchiamento e riduzione della formazione ossea come la carenza di Vitamina D, il ridotto assorbimento di calcio o la riduzione di attività fisica. Interessa l'osso trabecolare e quello corticale con sedi tipiche di frattura nel collo del femore (anca), nelle vertebre, nell'omero e nel bacino.

    - Idiopatica o giovanile: quadro clinico molto raro e a causa sconosciuta e colpisce i bambini, gli adolescenti o giovani adulti di entrambi i sessi con livelli ormonali e vitaminici nella norma.

- Osteoporosi Secondaria: malattia che insorge come conseguenza diretta di altre patologie, a seguito di terapie farmacologiche prolungate o stili di vita scorretti. Tra le cause abbiamo malattie gastrointestinali, malattie reumatiche, malattie endocrine (come ipertiroidismo, sindrome di Cushing o diabete mellito di tipo 1 e 2) e farmaci tra i quali glucocorticoidi, terapie oncologiche e inibitori di pompa protonica.

1.1.1 Prevalenza e rilevanza epidemiologica

L'osteoporosi è un grave problema di salute pubblica, legata all'invecchiamento demografico. Circa il 40% delle persone subisce una frattura del femore, della vertebra o del polso nel corso della vita, soprattutto dopo i 65 anni.

In Italia si contano 5 milioni di individui affetti, di cui l'80% sono donne in post-menopausa. Secondo l'ISTAT relativi all'anno 2020, l'8,1% della popolazione italiana risulta affetto da osteoporosi, inoltre la prevalenza cresce nettamente con l'età arrivando al 32,2% oltre i 74 anni.

Le fratture da fragilità comportano anche gravi conseguenze, sia in termini di mortalità che in termini di disabilità motoria, ed elevati costi socio-economici: "La mortalità da frattura del femore è del 5% nel periodo immediatamente successivo all'evento e del 15-25% a un anno. Nel 20% dei casi si ha la perdita definitiva della capacità di camminare autonomamente e solo il 30-40% dei soggetti torna alle condizioni precedenti la frattura" (Ministero della Salute, 2023).

Oltre all'impatto clinico la patologia compromette gravemente la vita quotidiana dei pazienti, in termini di dolore cronico, perdita di indipendenza e riduzione della qualità della vita.

1.2 Struttura e funzione del Tessuto Osseo

Per comprendere a pieno come può insorge l'osteoporosi è fondamentale conoscere come sono fatte e come funzionano le ossa che costituiscono il nostro scheletro, che tutti noi sappiamo essere l'armatura invisibile che ci sostiene ogni giorno.

Il tessuto osseo è composto da tre elementi:

- Componente organica, detta anche matrice ossea, composta perlopiù da collagene e che conferisce all'intera struttura coesione, elasticità e resistenza.
- Componente cellulare composta a sua volta da tre tipi cellulari (Figura2)
  - Osteoclasti: deputati alla degradazione e al riassorbimento dell'osso vecchio
  - Osteoblasti: responsabili della formazione e deposizione del nuovo osso
  - Osteociti: regolatori del rimodellamento osseo
- Componente minerale, che è composta essenzialmente da cristalli di sale come Calcio, Fosforo e Magnesio, i quali conferiscono rigidità e robustezza.

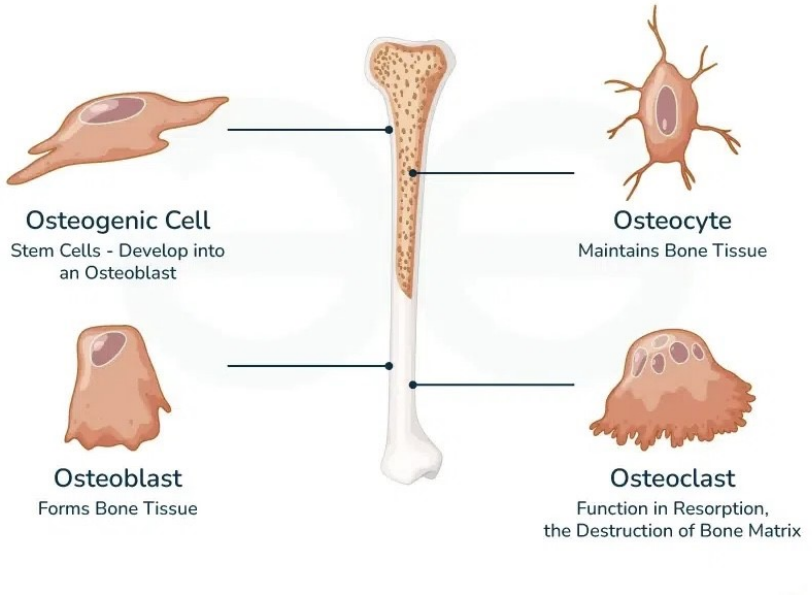


***Figura 2**: Rappresentazione dei principali citotipi coinvolti nel rimodellamento e nell'omeostasi del tessuto osseo.*

Queste componenti si dispongono in modo da andare a formare due tipologie di osso: l'osso compatto e l'osso spugnoso (Figura 3).

- Osso compatto (o corticale), ovvero la parte più esterna all'osso che, se osservato al microscopio, appare composto da lamelle ossee concentriche tutte aderenti, senza spazi vuoti.
- Osso spugnoso (o trabecolare), si trova nella parte più interna dell'osso ed è caratterizzata da una struttura alveolare con molteplici cavità, a loro volta delimitate da una rete di lamelle. Questa composizione conferisce all'osso leggerezza senza ridurre la sua capacità portante.

La percentuale di distribuzione di queste due tipologie varia a seconda del distretto. Le ossa corticali costituiscono l'80% del totale e le si possono ritrovare nelle ossa lunghe come l'omero e il femore, mentre le ossa trabecolari corrispondono al restante 20% e sono più abbondanti nelle ossa piatte come quelle del cranio e nelle ossa corte come le vertebre (J A Buckwalter, 1987).

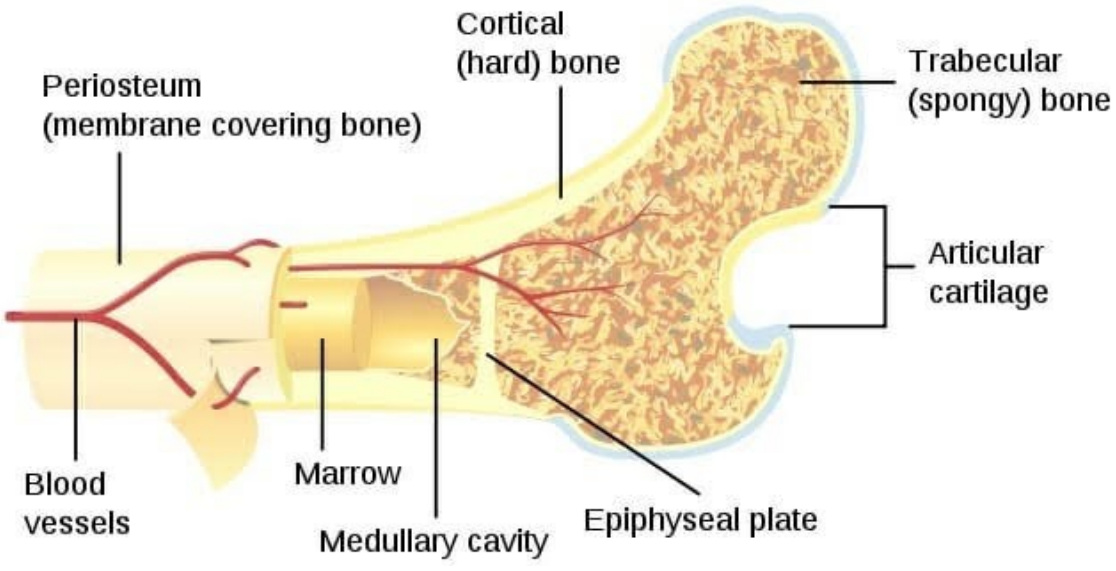


***Figura 3**: Anatomia macroscopica del tessuto osso: componenti e vascolarizzazione.*

1.2.1 Fisiopatologia

Il rimodellamento osseo è un processo che prevede la rimozione e la formazione di osso neoformato ed è operato dalla componente cellulare del tessuto osseo (Raggatt LJ, 2010). Questo processo prevede un ciclo operativo che, nell'adulto sano, è in costante equilibrio, ed è suddiviso in 5 fasi (figura 4):

1. Attivazione: un segnale di innesco, come un danno meccanismo o uno stimolo ormale, dà il via al processo.
2. Riassorbimento: gli osteoclasti aderiscono alla matrice e secernono sostanze, come le proteasi, per degradare la componente minerale e proteica dell'osso.
3. Inversione: gli osteoclasti, terminata la loro funzione, vanno incontro ad apoptosi e vengono sostituiti da cellule di transizione che, oltre a rimuovere detriti di collagene e residui, inviano segnali molecolare per arrestare il riassorbimento e richiamare gli osteoblasti.
4. Formazione: gli osteoblasti secernono Collagene di tipo I, ovvero la nuova matrice proteica non mineralizzata, definita Osteoide.
5. Terminazione: l'osteoide termine il suo processo di mineralizzazione grazie all'idrossiapatite.

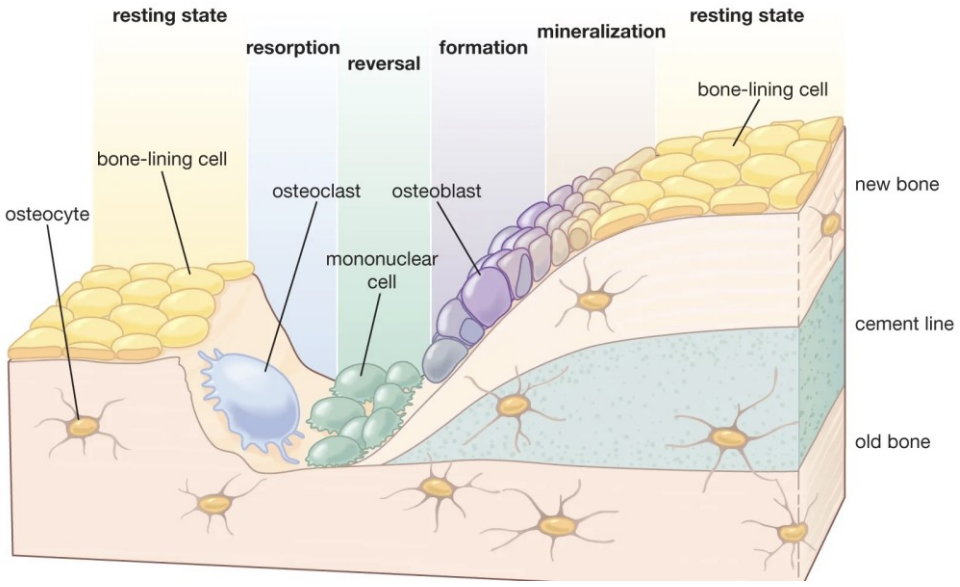


Figura 4: Dinamica cellulare nel ciclo di rimodellamento osseo.

1.2.2 Squilibrio del metabolismo osseo nell'invecchiamento

Tale dinamica, definita appunto "rimodellamento osseo" risulta determinante per due aspetti fondamentali ovvero il mantenimento dell'integrità strutturale dello scheletro e l'omeostasi minerale. L'alterazione di questo meccanismo è alla base di numerose patologie ossee, come ad esempio l'osteoporosi. All'interno della matrice ossea troviamo gli osteociti, la cui particolare struttura e posizione fa ritenere che agiscano da vere e proprie centraline di controllo del rimodellamento, capaci di rilevare stimoli meccanici e ormonali (Nakashima, 2015).

Durante l'invecchiamento si verificano molti cambiamenti funzionali nel metabolismo osseo, i quali influenzano tutte le cellule che fanno parte di questo processo, compresa anche la fase di mineralizzazione della matrice extracellulare. I fenomeni a cui si va incontro sono: (i) diminuzione della massa ossea, (ii) comparsa di cambiamenti microarchitetturali locali, (iii) riduzione della componente mineralizzata e della capacità portante e (iv) risposta anomala alla presenza di molecole umorali (Cardoneanu, 2023).

1.2.3 Indicatori di rischio

La probabilità di avere l'osteoporosi varia molto da soggetto a soggetto a causa di alcuni fattori di rischio che possono essere suddivisi in:

- Fattori non modificabili:
    - Età: molto più frequente nelle persone anziane che in quelle giovani, infatti è considerata una malattia tipica dell'invecchiamento
    - Sesso femminile: le donne sono soggette molto di più rispetto agli uomini a sviluppare osteoporosi per diversi motivi tra cui: scheletro leggero e sottile, calo fisiologico ormonale e vita media più duratura
    - Menopausa: dopo la menopausa si verifica un calo di estrogeni che porta a una perdita di massa ossea

- Familiarità: la genetica gioca un ruolo fondamentale
- Razza: frequenza maggiore di osteoporosi nelle popolazioni caucasiche

- Fattori modificabili:

  - Apporto insufficiente di calcio e vitamina D: ogni giorno l'organismo perde, tramite le urine, una certa quota di calcio e se non viene reintegrato con l'alimentazione questo viene sequestrato dall'osso per mantenere normali i livelli plasmatici dei minerali, provocando così una riduzione della densità ossea. La vitamina D, invece, è molto importante perché aiuta l'organismo ad utilizzare il calcio, infatti una carenza di vitamina D comporta un inadeguato assorbimento del calcio, che come abbiamo già detto è un componente fondamentale dell'osso.
  - Dieta povera di frutta e verdura: non assumere questi alimenti comporta una carenza di magnesio, potassio e vitamina K, che hanno un ruolo importante per la salute dell'osso.
  - Eccesso di proteine, sodio e caffeina: possono danneggiare l'osso aumentando l'escrezione di calcio nelle urine.
  - Consumo eccessivo di alcolici: può ridurre la formazione di osso nuovo aumentando inoltre la probabilità di cadute e di fratture.
  - Fumo: può ostacolare l'assorbimento del calcio e alcune molecole contenute nel fumo possono avere un effetto tossico sulle cellule del tessuto osseo.
  - Malnutrizione grave: soggetti con BMI < 19 hanno più probabilità a sviluppare osteoporosi rispetto a soggetti più robusti.
  - Vita sedentaria: uno scheletro di una persona inattiva o sedentaria reagisce alla riduzione delle forze applicate dai muscoli sull'osso riducendo la sua mineralizzazione e resistenza (SIOMMMS, 2026).

1.3 Criteri diagnostici attuali

La diagnosi e la gestione clinica dell'osteoporosi si basano su un approccio che unisce parametri densitometrici, valutazione clinica del rischio e disposizione prescrittive. Il Gold standard strumentale è la densitometria ossea a raggi X a doppio fotone, o DXA, una tecnica rapida, non invasiva e caratterizzata da una bassa esposizione alle radiazioni ionizzanti, che consente di determinare la densità minerale ossea (BMD), espressa in g/cm² (Kanis, 2002). Poiché la sola densitometria non coglie appieno il rischio di frattura bisogna integrare degli algoritmi predittivi come il FRAX®, il quale permette di stimare la probabilità di frattura a 10 anni, combinando la BMD con i principali fattori di rischio clinici. Inoltre nel contesto italiano, la prescrizione terapeutica è regolamentata dai criteri dell'AIFA (nota 79) (Farmaco, AIFA - Agenzia Italiana del Farmaco) definendo la rimborsabilità dei farmaci in base alla presenza di pregresse fratture da fragilità e a livello di rischio del paziente (M. Rossini, 2016).

1.3.1 Densitometria ossea DXA e T-score

La DXA viene utilizzata sia nell'ambito dello screening dei soggetti a rischio sia nella valutazione diagnostica e nel monitoraggio della patologia. I siti anatomici raccomandati sono:

- Colonna vertebrale (L1-L4): indicata principalmente nelle donne in peri- e post-menopausa precoce e negli adulti giovani
- Femore prossimale (collo del femore o in toto): sito elettivo per predire la frattura del femore, essenziale nei soggetti anziani
- Radio distale (1/3 distale): alternativa raccomandata in presenza di artrosi femorale o vertebrale

I valori di BMD vengono poi convertiti in un indice statistico standardizzato, chiamato T-score, a sua volta ricavato tramite differenza tra la misurazione di BMD del paziente e quella di un soggetto sano di 30 anni (Heenam Goel, 2024).

Il T-score così ottenuto va successivamente confrontato con le soglie diagnostiche definite dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) distinguendo quattro categorie principali:

- Normale: T-score maggiore di -1
- Osteopenia: T-score compreso tra -1 e -2,5
- Osteoporosi: T-score inferiore a -2,5
- Osteporosi severa: T-score inferiore a -2,5 + presenza di almeno una frattura da fragilità

1.3.2 Limiti nella BMD/DXA nella predizione del rischio

Nonostante la DXA costituisca un ottimo strumento per diagnosticare l'osteoporosi, essa presenta dei limiti metodologici e clinici che impongono cautela nell'interpretazione del solo dato densitometrico (Marshall D, 1996) (Beaudoin C, 2019).

In primo luogo, fornisce una misurazione d'area e non una stima volumetrica della densità minerale, con la conseguenza che l'esame risulta influenzato dalle dimensioni dell'osso.

Inoltre se a livello della colonna vertebrale sono presenti fenomeni degenerativi, come calcificazioni o crolli vertebrali si può andare incontro a errori di interpretazione. Un secondo limite riguarda l'incapacità di valutare la componente strutturale della matrice, di conseguenza un valore nell'intervallo di osteopenia o nella norma non garantisce un'immunità strutturale, infatti molte fratture da fragilità si verificano in soggetti con T-score superiore a -2,5, a dimostrazione che il rischio di frattura dipende da molteplici fattori indipendenti dalla sola densità minerale (M. Rossini, 2016) .

Alla luce di questi limiti, la valutazione della densità minerale ossea può essere integrata con l'analisi delle deformità vertebrali, che rappresentano un importante indice di fragilità scheletrica. Queste, infatti, possono essere presenti anche in assenza di sintomi e in pazienti non classificabili come osteoporotiche.

La morfometria vertebrale è l'esame di scelta per questo tipo di analisi, permettendo la valutazione dell'altezza e della forma dei corpi vertebrali, identificando eventuali riduzioni compatibili con deformità da compressione (LeBoff, 2022). E' importante tenere in considerazione che questo tipo di analisi non viene effettuata sistematicamente in tutte le pazienti sottoposte a DXA, ma solo in casi di particolari circostanze cliniche.
Uno dei metodi più utilizzati per la classificazione delle deformità vertebrali è il metodo semiquantitativo di Genant, che valuta la riduzione dell'altezza e alterazioni della morfologia del corpo vertebrale (Harry K. Genant, 1993).

1.3.3 BTM: marcatori tradizionali di turnover osseo

I marcatori di turnover osseo (BTM) sono biomarcatori proteici rilasciati da osteoblasti e osteoclasti durante la fase di rimodellamento osseo. La loro analisi permette di ottenere utili indicazioni prognostiche sul rischio di frattura, tuttavia la loro interpretazione richiede molta attenzione, poiché possono essere influenzati da numerose comorbidità e da numerosi fattori pre-analitici.
Dato che si tratta di parametri che rispondo rapidamente alle variazioni della fisiologia ossea, i BTM si rivelano molto efficaci per monitorare la risposta del paziente e l'adesione ai trattamenti contro l'osteoporosi (Greenblatt MB, 2017) (Chih-Hsing Wu, 2020).

Ad oggi i BTM che si analizzano sono:

- Telopeptidi N-terminali e C-terminali del Collagene di tipo I
- Piridinolina e Deossi-piridinolina
- Propeptidi N-terminali e C-terminali del Collagene di tipo I
- Fosfatasi alcalina specifica per l'osso
- Osteocalcina

Nonostante i limiti attuali di variabilità analitica, la loro capacità di rilevare le variazioni ossee prima della densitometria rende i BTM la risorsa molto promettente per guidare le terapie future.

1.4 Nuovi Biomarcatori Circolanti: microRNA

I microRNA (o miRNA) sono una classe di piccole molecole di RNA non codificante, lunghe generalmente tra i 18 e i 25 nucleotidi (figura 5), che svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione genica all'interno delle cellule. A differenza dell'RNA messaggero (mRNA), i miRNA non contengono le istruzioni per produrre proteine, ma fungono da vere e proprie "guide" o regolatori.

Il primo miRNA fu scoperto nel 1993 e venne identificato nel nematode Caenorhabditis elegans, prendendo il nome di Lin-4. Venne dimostrato che questo miRNA, composto da 22 nucleotidi, poteva regolare lo sviluppo larvale legandosi alla regione 3' UTR dell'mRNA del gene Lin-4, bloccandone l'espressione (GAD, 2024).

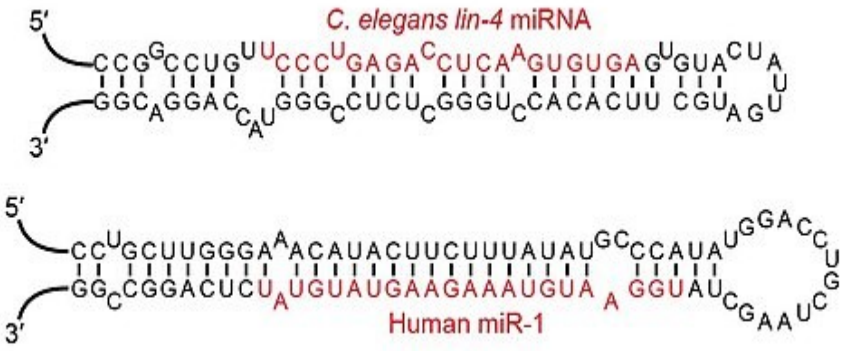


Figura 5: *Confronto tra le strutture a stem-loop del miRNA lin-4 di Caenorhabditis elegans e miRNA miR-1 umano.*

1.4.1 Processo di maturazione e regolazione dei microRNA

I miRNA vengono codificati a livello del DNA nucleare attraverso due modalità:

1. Intragenica: ovvero all'interno di introni ed esoni di geni ospiti.
2. Intergenica: ciò trascritti da regioni indipendenti regolati da propri promotori.

Il processo di maturazione avviene attraverso una via definita come via canonica che ha inizio all'interno del nucleo. L'RNA polimerasi trascrive il DNA in lunghi trascritti primari, chiamati pri-miRNA, i quali vengono riconosciuti dal complesso formato da DGCR8 e dalla ribonucleasi Drosha venendo scissi in un precursore più corto a forma di forcina, il pre-miRNA. A questo punta la proteina Esportina 5 trasporta il pre-miRNA nel citoplasma, il quale entra in contatto con un enzima, chiamato Dicer, che rimuove l'anello della forcina, generando così un breve duplex a doppio filamento formato dalle estremità 5p e 3p.
Ora l'intero duplex può essere incorporato nella proteina Argonaute 2 (AGO2) e successivamente "srotolato" in due filamenti, uno definito "filamento guida" e uno "filamento passeggero/complementare".
Il filamento passeggero viene tagliato ed eliminato dai processi di degradazione cellulare e il filamento guida, che rimane attaccato ad AGO2, è pronto ad entrare in azione per silenziare i suoi geni bersaglio (de Mello AS, 2024) (figura 6).

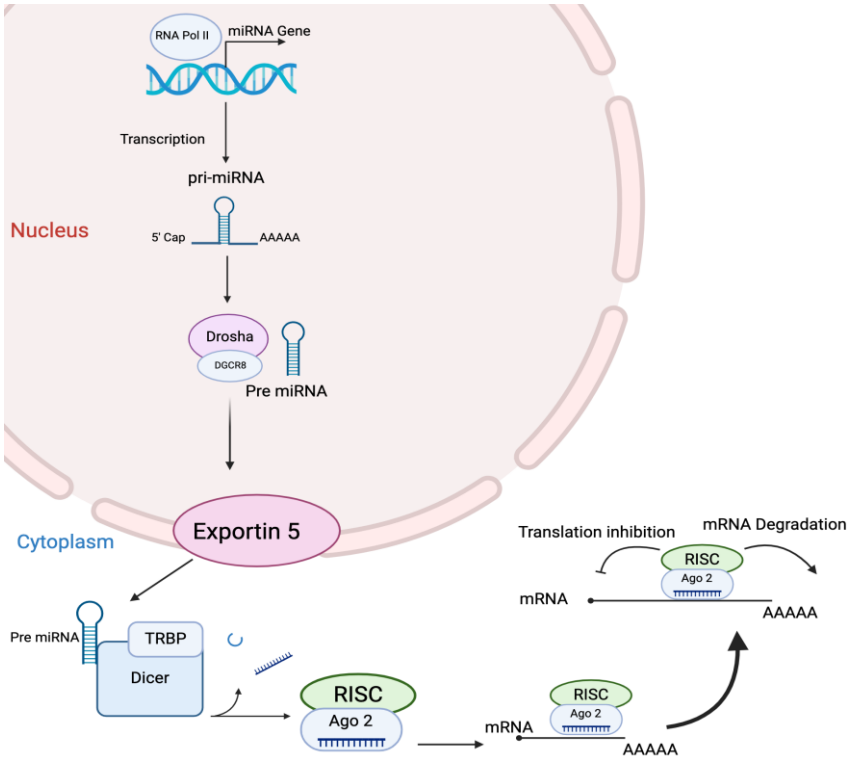


***Figura 6**: Processo di maturazione e regolazione dei miRNA*

1.4.2 Funzione dei microRNA

I miRNA hanno il compito di regolare negativamente l'espressione genica, legandosi a specifici RNA messaggeri bloccando la traduzione e impedendo così la traduzione della proteina corrispondente (de Mello AS, 2024). Questo processo di silenziamento dell'mRNA può avvenire attraverso tre meccanismi:

1. Inibizione della traduzione: il complesso RISC impedisce l'attacco della subunità del ribosoma all'mRNA, bloccando subito la sintesi proteica
2. Taglio diretto dell'mRNA: in questo caso AGO2 agisce come endonucleasi scindendo la molecola di mRNA nel punto di appaiamento con il miRNA

3. Degradazione enzimatica: vengono reclutate proteine di supporto per promuovere la deadenilazione e il decapping, esponendo il trascritto alla degradazione 5'-3' da parte della esoribonucleasi 1.

1.4.3 miRNA come indicatori di Osteoporosi

Grazie alla loro stabilità biologica, alla facilità di rilevamento e alla tecnica di prelievo per nulla invasiva, lo studio dei miRNA come target è in grande crescita, soprattutto nell'ambito terapeutico, nella diagnostica e nella prognosi di diverse patologie, tra cui neoplasie, malattie infettive e vascolari. Inoltre, data la loro attività epigenetica, possono modulare in maniera cruciale processi biologici come il rimodellamento osseo, andando a influenzare la differenziazione e funzione degli osteoblasti. Se ne deduce che è possibile associare la sovra/sotto espressione di specifici miRNA all'insorgenza dell'osteoporosi, rendendoli degli ottimi biomarcatori per questa condizione (You Q, 2026).

Tra i candidati di maggior interesse come biomarcatori figurano:

- miRNA-98-5p: è un miRNA fondamentale per l'omeostasi dei tessuti. Agisce regolando la crescita e differenziazione cellulare mantenendo l'equilibrio tra proliferazione e quiescenza, controlla inoltre la sopravvivenza e l'apoptosi modulando i geni associati alla morte cellulare programmata. Infine può essere racchiuso nelle vescicole extracellulari facilitando la comunicazione tra cellule vicine o distanti (Hazari V, 2024) (Zheng F Z. F., 2022).

- miRNA-483-5p: è stato dimostrato che svolge un ruolo chiave nella regolazione di svariate attività biologiche. Sebbene gli studi condotti finora siano ancora limitati, l'interesse su come miR-483-5p regoli la differenziazione osteogenica delle cellule staminali mesenchimali del midollo osseo è in costante crescita. (Peng H, 2022).

2 SCOPO DELLA TESI

L'osteoporosi è una patologia scheletrica sistemica, caratterizzata da una riduzione della massa ossea e da alterazioni della microarchitettura, che determinano un aumento della fragilità ossea e del rischio di frattura. La diagnosi di osteoporosi si basa principalmente sulla densitometria ossea, che consente di misurare la densità minerale ossea (BMD). Tuttavia, la sola valutazione densitometrica non permette di identificare completamente la fragilità scheletrica, poiché le fratture possono verificarsi anche in assenza di sintomi evidenti e anche in soggetti la cui BMD non li classifica come soggetti osteoporotici. Per questo motivo, negli ultimi anni c'è un interesse sempre maggiore verso l'identificazione di biomarcatori circolanti che possano fornire informazioni aggiuntive rispetto ai parametri densitometrici tradizionali.

Tra questi, i miRNA rappresentano potenziali biomarcatori di processi biologici associati al metabolismo osseo. In questo contesto, si inserisce il progetto FiORdiLOTO, uno studio osservazionale prospettico condotto in donne in post-menopausa, con l'obiettivo di approfondire lo studio di fattori associati alla fragilità ossea e alla diagnosi di osteoporosi. Lo scopo di questa tesi è quello di valutare il possibile ruolo di due miRNA circolanti, il miR-98-5p e il miR-483-5p, come biomarcatori associati al metabolismo osseo, attraverso l'analisi dei dati di un sottogruppo di 160 partecipanti arruolate nella coorte FiORdiLOTO, per le quali erano già disponibili le determinazioni di alcuni biomarcatori innovativi tra cui CXCL9, Adiponectina, Leptina e FGF-23.

In particolare, gli obiettivi dello studio sono:

- valutare le associazioni tra i livelli di espressione di miR-98-5p e miR-483-5p, i biomarcatori circolanti del metabolismo osseo e i principali parametri biochimici di laboratorio;
- analizzare la relazione tra i livelli di espressione dei due miRNA e i parametri densitometrici (BMD e T-score), considerando sia i valori basali sia la loro evoluzione nel tempo;

- studiare l'associazione tra i livelli di espressione dei miRNA e la presenza di deformità vertebrali, valutando il loro possibile contributo nell'identificazione della fragilità scheletrica, con particolare attenzione alle donne con osteopenia.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Campione dello studio

Per la finalità di questa tesi, l'analisi si è concentrata su una casistica di 364 donne in post-menopausa con età superiore ai 50 anni, inserite all'interno di un protocollo osservazionale prospettico.

Le partecipanti hanno seguito un percorso di monitoraggio clinico e densitometrico a lungo termine, caratterizzato da controlli programmati a 1 anno (T1), 2 anni (T2) e a 5 anni (T3) (figura 7), grazie alla collaborazione di due presidi ospedalieri dell'IRCCS INRCA, ciascuno dedicato a specifiche indagini strumentali.

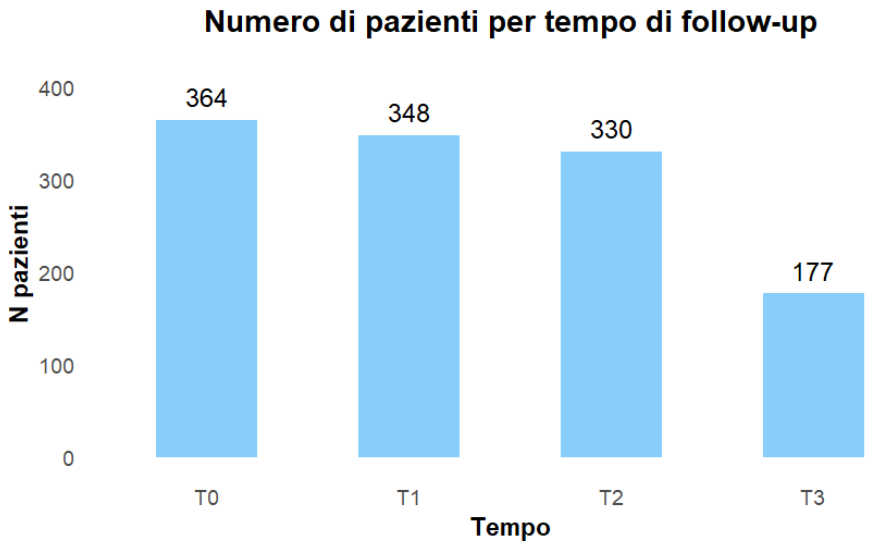


***Figura** 7: Distribuzione numerica delle pazienti aderenti allo studio nelle diverse fasi di follow-up: T0 (baseline), T1 (12 mesi), T2 (24 mesi), T3 (5 anni).*

Presso la struttura di Fermo sono state effettuate seguenti valutazioni: densità ossea minerale (tramite DXA), esami ematochimici ed inquadramento di eventuali lesioni/fratture (tramite morfometria vertebrale).

La struttura di Ancona invece si è occupata degli approfondimenti di risonanza magnetica, con lo scopo di definire il quadro morfologico e funzionale dei metameri vertebrali e dei dischi intervertebrali.

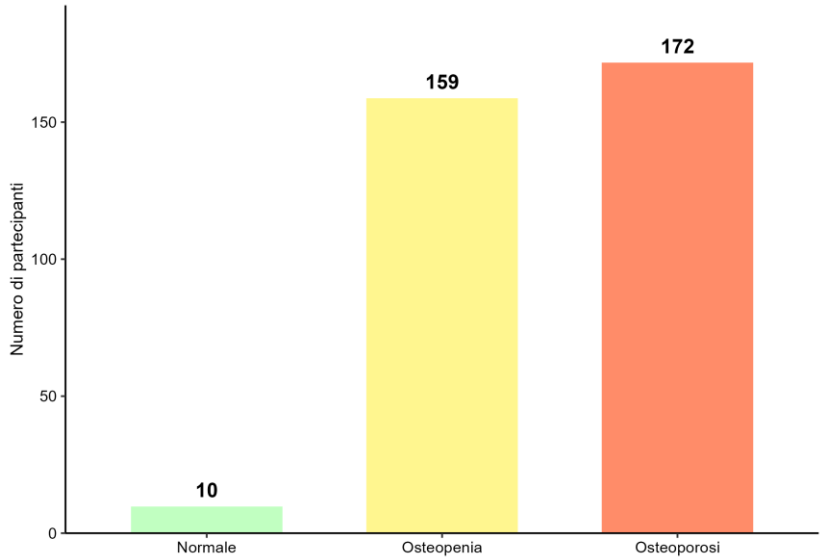


***Figura 8**: Distribuzione della popolazione di studio in base allo stato di salute ossea: soggetti sani (Normali, n=10), soggetti con osteopenia (n=159) e soggetti con osteoporosi (n=172).*

Il piano di ricerca di questa tesi si è concentrato su una sotto-popolazione selezionata per il dosaggio miRNA di interesse, analizzando nello specifico 160 pazienti al tempo T0.

3.2 Gestione dei campioni biologici

Nell'ambito del progetto di ricerca, ai soggetti selezionati è stato effettuato un prelievo di sangue periferico in provette sterili con gel separatore (Venoject, Terumo Europe, NV). A seguire ogni campione è stato identificato con una etichetta riportante il codice del paziente, la data, il luogo del prelievo e la matrice biologica, per poi essere conservato a -80°C.

Prima di procedere con la prima fase analita, i campioni vengono sottoposti a un "pre-trattamento", che permette di sedimentare eventuali detriti o interferenti che possono influenzare negativamente le analisi successive, ed è composto da brevi e semplici passaggi:

- Scongelamento: i campione vengono posti in ghiaccio, in modo da permettere uno scongelamento graduale

- Centrifugazione: i campioni vengono centrifugati, tramite l'utilizzo di una centrifuga refrigerata, a 4.000 g per 10 minuti a 4°C.

Il sopranatante è stato poi trasferito in provette autoclavate, presentando attenzione a non aspirare i residui che si sono formati precedentemente.

3.3 Estrazione dei microRNA

L'obiettivo principale di questo passaggio è quello di isolare l'RNA totale presente nei campioni di siero. Per farlo, è necessario scegliere un metodo che permette di purificare l'RNA da diverse matrici biologiche, in modo rapido e con un'elevata resa del materiale genetico, senza dover ricorrere a solventi tossici. Per questo motivo è stato scelto il kit commerciale "Total RNA Purification Kit" della ditta Norgen Biotech (cod. cat. 375000).

Lavorando sul siero, questa procedura permette di recuperare in modo efficiente tutto l'RNA libero circolante, compresa la frazione dei microRNA, che è quella su cui si concentrano le analisi successive. Dal punto di vista pratico, il kit utilizza una colonna cromatografica contenente una resina, da loro brevettata, in grado di legare selettivamente gli acidi ribonucleici in base alla concentrazione ionica. Questo permette di trattenere l'RNA nella matrice della colonnina e di eliminare le proteine o altri contaminanti attraverso una serie di lavaggi.

La procedura vede i seguenti passaggi:

1. *Lisi cellulare*

In una provetta RNAse-free vengono inseriti 100 µl di siero pretrattato e 300 µl di Buffer RL, agitando la miscela per 10 secondi. Successivamente si aggiunge 3 µl di cel-miRNA-39 come controllo interno. Infine, vengono addizionati 400 µl di etanolo al 95% ponendo nuovamente al vortex per 10 sec, fino a ottenere una soluzione omogenea e limpida.

2. *Legame con la colonna*

La Collection Tube viene assemblata con la Spin Column e il lisato viene caricato in due passaggi successivi da 400 µl. Dopo ogni caricamento la colonnina viene centrifugata a 14.000 rpm per 1 minuto, eliminando ogni volta il liquido filtrato.

3. *Lavaggi*

La colonnina viene lavata per tre volte aggiungendo, ad ogni lavaggio, 400 µl di etanolo al 95% e centrifugata a 14.000 rpm per 1 minuto, scartando il filtrato tra i vari lavaggi. Infine, per eliminare qualsiasi residuo di etanolo dalla resina viene eseguita una centrifugazione a vuoto per 2 minuti a 14.000 rpm.

4. *Eluizione e conservazione*

Come passaggio finale, la colonnina viene inserita in una Elution Tube da 1,7 ml, precedentemente identificata con codice, matrice e data di estrazione. A questo punto vengono dispensati, direttamente sulla resina, 50 µl di Elution Solution A, ponendo attenzione a non depositarli sulle pareti della colonna, quindi si centrifuga prima a 2.000 rpm per 2 minuti e subito dopo a 14.000 rpm per 1 minuto. L'eluato contenente l'RNA purificato viene recuperato, posto subito in ghiaccio e conservato a -80°C.

3.4 Sintesi del cDNA

Per poter analizzare i livelli di espressione dei microRNA nei campioni in esame, è necessario sottoporre l'RNA appena estratto a un processo di retrotrascrizione (Reverse Transcription, RT). Questo reazione permettere di sintetizzare, a partire da stampi di RNA a singolo filamento, molecole di DNA complementare (cDNA), fondamentali per le analisi successive.

Per innescare la reazione si utilizzano degli oligonucleotidi, definiti stem-loop primer, caratterizzati da una struttura a forcina contenente una sequenza target specifica per ciascun miRNA di interesse.

Tale conformazione permette di amplificare selettivamente solo i miRNA maturi, escludendo i rispettivi precursori (pri-miRNA e pre-miRNA), i quali presentano una struttura secondaria più complessa che non viene riconosciuta dal primer.

Allestimento Master mix

L'allestimento della reazione di RT prevede la preparazione di una miscela di reazione (master mix) composta dai seguenti reagenti:

- H_20 pura e autoclavata: utilizzata per garantire la sterilità
- dNTPs 100nM (diluiti 1:10)
- Buffer di reazione 10X: mantiene il pH e l'ambiente ionico ottimali per l'attività enzimatica
- RNAsi inibitor: diluito 1:10 in ogni seduta di lavoro per evitare il decadimento dell'efficienza che può verificarsi da ripetuti cicli di congelamento e scongelamento
- Trascrittasi Inversa Multiscribe^{TM} (Reverse Trascriptase): un'enzima ricombinato dal virus della leucemia murina di Moloney, ottimizzato per saggi basati sulla tecnologia TaqMan
- Primer specifici

Tutti questi reagenti vengono conservati a -20°C fino al momento del loro utilizzo e durante la fase di preparazione delle master mix, sia i campioni che i reagenti vengono mantenuti in ghiaccio per evitare l'azione delle RNAsi.

Dopo opportuna sanificazione del piano di lavoro e della strumentazione (comprese le micropipette) si allestiscono le master mix per un numero di provette superiore a quello effettivo dei campioni al fine di evitare potenziali errori di pipettaggio. Inoltre, per prevenire contaminazioni incrociate a ogni passaggio di dispensazione si utilizzano puntali sterili con filtro.

Si ottiene così una provetta (per ogni miRNA oggetto dello studio) composta da 6,66 µl di master mix e 3,34 µl di campione di RNA, per un totale di 10 µl.

Retrotrascrizione RT

Dopo una breve centrifugazione le provette vengono inserite all'interno del termociclatore SimpliAmp Thermal Cycler, il quale permette di ottenere il cDNA attravreso cicli controllati di riscaldamento e raffreddamento, mantenendo temperature e tempi prestabiliti.

Il programma prevede le seguenti fasi (figura 9):

1. 16°C per 30 minuti: fase di anneling specifico dei stem-loop primer
2. 42°C per 30 minuti: sintesi del cDNA grazie alla trascrittasi inversa
3. 85°C per 5 minuti: inattivazione enzimatica
4. 4°C per ∞: conservazione del cDNA



Figura 9: *Strumentazione e profilo termico di reazione impiegati nella fase di retrotrascrizione. (foto dell'autore).*

Dopo il loro recupero le provette vengono immediatamente poste in ghiaccio in previsione dell'analisi successiva, ovvero la Real-Time PCR (qPCR).

3.5 Real-Time PCR (qPCR)

Per poter quantificare il cDNA ottenuto dai microRNA target, bisogna effettuare una Real-Time PCR sfruttando la chimica delle sonde TaqMan. Tali sonde sono oligonucleotidi specifici legati a un fluoroforo (in posizione terminale 5') e a un quencher (in posizione terminale 3'). Quando la sonda è integra e legata al target, il quencher blocca la fluorescenza emessa dal fluororo, impedendo la rivelazione del segnale. Durante la fase di annealing/estensione, l'attività esonucleasica 5'-3' della DNA polimerasi degrada la sonda, separando fisicamente il quencher dal fuoroforo. L'emissione della fluorescenza che ne consegue viene rilevata in tempo reale dal sistema, risultando direttamente proporzionale alla quantità di amplicone precedentemente sintetizzato.

Allestimento Master mix

Anche in questo caso si procede ad allestire una master mix specifica per ogni microRNA oggetto dello studio. Poiché ogni campione è stato analizzato in duplicato, il volume finale delle miscele viene calcolato in eccesso anche per compensare eventuali errori di dispensazione.

I componenti della master mix sono:

Reagenti	Volume in µl
H_2O autoclavata: stoccata a 4°C	1,84
TaqMan Universal Master Mix: stoccata a 4°C	5
Sonda TaqMan specifica: stoccata a -20°C	0,5

(I volumi riportati in tabella sono da considerare per un campione)

Dopo omogeneizzazione e breve centrifugazione, 7,34 µl di ciascuna miscela vengono dispensati in strip (figura 10) da 4 pozzetti da 0,1 ml. A ciascun pozzetto vengono poi aggiunti 2,66 µl di cDNA retrotrascritto, raggiungendo un volume finale di reazione pari a 10 µl.
Le strip vengono infine sigillate con gli appositi tappi, ponendo molto attenzione per evitare la fuoriuscita durante il protocollo di amplificazione.



***Figura 10**: Preparazione del rotore per PCR in tempo reale su Rotor-Gene Q. (foto dell'autore).*

Protocollo di Amplificazione

Le strip vengono collocate all'interno del termociclatore Rotor-Gene (della ditta Qiagen) ponendo attenzione al bilanciamento del rotore.
Affinché la reazione avvenga secondo le dinamiche illustrate all'inizio del paragrafo, la programmazione del termociclatore si articola in:

1. 95°C per 10 minuti: Denaturazione/attivazione iniziale
2. 95°C per 15 secondi: Denaturazione
3. 60°C per 1 minuto: Annealing/Estesione

I passaggi 2 e 3 vengono ripetuti per un totale di 40 cicli di amplificazione, per una durata complessiva della corsa di circa 80-90 minuti.

Analisi quantitativa

La fluorescenza emessa da ciascun campione viene rilevata dal sistema e convertita in dati in modo tale da costruire un grafico, caratterizzato da un andamento tipicamente sigmoidale. Durante i primi cicli, la variazione di fluorescenza risulta confondibile con il rumore di fondo (baseline). Solo con il proseguire della reazione è possibile apprezzare l'aumento di intensità della fluorescenza che, grazie all'accumulo esponenziale dell'amplicone, cresce in modo significativo fino a raggiungere uno stadio stazionario (plateau), fase in cui l'esaurimento dei reagenti e il decadimento dell'attività enzimatica comportano l'estinguersi della reazione.
Il parametro fondamentale per la quantificazione è il Ciclio soglia (C_t, Threshold Cycle), ovvero il numero di cicli necessari affinchè il segnale di fluorescenza superi una linea di soglia (Threshold) stabilita. Nel presente studio la Threshold è stata fissata a 0,01. Valore che rappresenta la fase strettamente esponenziale della reazione, in cui l'efficienza della PCR raggiunge il valore teorico massimo (ovvero quando il prodotto raddoppia ad ogni ciclio).
Il valore di C_t risulta inversamente proporzionale alla concentrazione iniziale della sequenza target nel campione, di conseguenza valori inferiori di C_t indicano un'alevata abbondanza del microRNA di interesse, mentre valori più elevati riflettono una minor quantità.

Il passaggio finale è la quantificazione vera e propria e può essere calcolata attraverso due diversi approcci metodologici, ovvero:

- Quantificazione Assoluta: viene impiegata una curva standard generata dall'analisi parallela di diluizioni seriali a concentrazione nota. Vengono poi interpolati i valori di C_t dei campioni incogniti sulla retta di taratura, per poter risalire alla concentrazione molare o al numero di copie di cDNA.
- Quantificazione Relativa: viene determinata la variazione di espressione del microRNA target mediante confronto diretto con un controllo di normalizzazione.

In questo studio è stato scelto di utilizzare la quantificazione relativa, usando come controllo esogeno e sintetico il microRNA cel-miR-39 derivato da Caenorhabditis elegans, addizionato ai campioni durante il processo di estrazione dell'RNA.

La normalizzazione viene ottenuta calcolando il ΔC_t, ovvero la differenza tra il ciclo soglia del target e quello del controllo esogeno:

$$\Delta C_t = C_t\,(\text{target}) - C_t\,(\text{cel-miR-39})$$

Successivamente viene calcolata l'espressione del microRNA target utilizzando la funzione esponenziale $2^{-\Delta Ct}$, la quale restituisce un valore adimensionale rappresentativo dell'abbondanza relativa del trascritto nei campioni in esame.

3.6 Elaborazione dei dati

Le partecipanti sono state divise in tre categorie diagnostiche sulla base del T-score ottenuto mediante DXA, secondo i criteri dell'OMS: normalità (T-score ≥ 1), osteopenia (-2,5 T-score -1), osteoporosi (T-score <-2.5).

La classificazione delle deformità vertebrali sono state eseguite a partire dal metodo semiquantitativo di Genant (Harry K. Genant, 1993). In particolare, partendo dalla misurazione delle altezze vertebrali anteriore (Ha), centrale (Hm) e posteriore (Hp), è stata calcolata per ciascuna vertebra la massima percentuale di altezza vertebrale. In base a questo, le vertebre sono state classificate in quattro gradi di severità:

- Grado 0, nessuna deformità (riduzione <20%);
- Grado 1, deformità lieve (riduzione 20-25%);
- Grado 2, deformità moderata (riduzione 25-40%);
- Grado 3, deformità severa (riduzione >40%).

Per ciascuna partecipante è stato infine considerato il grado massimo di deformità osservato tra tutte le vertebre valutabili al baseline (T0). La presenza di almeno una vertebra con grado 1 è stata considerata indicativa di deformità vertebrale.

3.6.1 Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando RStudio. Le variabili numeriche sono state descritte come media ± deviazione standard o mediana e intervallo interquartile, mentre quelle categoriche come frequenze e percentuali. I livelli di espressione dei miRNA sono stati trasformati in scala logaritmica in base 2 ($\log_2$). Le associazioni tra miRNA e biomarcatori circolanti sono state valutate mediante correlazione di Spearman e regressione lineare, tenendo conto di età, BMI e funzionalità renale (eGFR). I biomarcatori sono stati trasformati mediante logaritmo naturale e i risultati sono stati corretti per confronti multipli con il metodo FDR. È stata inoltre valutata l'associazione tra i miRNA e i parametri densitometrici lombari (BMD e T-score), sia al tempo iniziale sia a 12 e 24 mesi, mediante regressione lineare. Nelle analisi longitudinali è stato considerato anche il valore densitometrico iniziale.

Le deformità vertebrali sono state classificate secondo le soglie di Genant, considerando per ciascuna paziente il grado massimo rilevato (Harry K. Genant, 1993). La presenza di almeno una deformità di grado ≥1 è stata utilizzata per distinguere le pazienti con e senza deformità vertebrali. I confronti tra i gruppi sono stati effettuati mediante il test di Mann-Whitney. Nelle donne con osteopenia, l'associazione tra miR-483-5p e presenza di deformità vertebrali è stata valutata mediante regressione logistica, calcolando l'odds ratio (OR) e l'intervallo di confidenza al 95% (IC95%). Sono stati confrontati un modello comprendente età e BMD lombare e un secondo modello con l'aggiunta di miR-483-5p, utilizzando il likelihood ratio test (LRT). La capacità di distinguere le pazienti con e senza deformità è stata valutata mediante curve ROC e area sotto la curva (AUC), confrontate con il test di DeLong. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

4 RISULTATI

4.1 Caratteristiche basali della popolazione in studio

La tabella 1 mostra le caratteristiche cliniche, densitometriche e i principali parametri di laboratorio delle pazienti selezionate per questo studio (n=160). L'età media delle partecipanti è di 60,3 ± 6,9 anni, con un BMI medio di 22,8 ± 2,9 (kg/m²), con dei parametri densitometrici medi di 0,887 ± 0,096 (g/cm²) per quanto riguarda la BMD e -2,44 ± 0,80 per il T-score, indicando nel complesso una riduzione della densità minerale ossea nella popolazione analizzata.

I principali parametri ematochimici e del metabolismo osseo mostrano valori nella norma. In particolare, la calcemia e la fosforemia medie sono rispettivamente pari a 9,42 ± 0,35 mg/dL e 3,61 ± 0,46 mg/dL, mentre la concentrazione media di 25-OH vitamina D di 28,52 ± 12,46 ng/mL.

Variabile	**Valore**
Caratteristiche cliniche	
Età (anni)	60,3 ± 6,9
BMI (kg/m²)	22,8 ± 2,9
Parametri densitometrici	
BMD L1-L4 (g/cm²)	0,887 ± 0,096
T-score L1-L4	-2,44 ± 0,80
Metabolismo osseo	
Calcio (mg/dL)	9,42 ± 0,35
Fosforo (mg/dL)	3,61 ± 0,46
ALP (U/L)	82,0 [64,0-155,0]
BAP (µg/L)	14,2 [10,2-18,7]
PTH (pg/mL)	61,0 [49,0-80,0]
25-OH Vitamina D (ng/mL)	28,52 ± 12,46
Parametri generali/infiammatori	
WBC (10^3/µL)	6,06 ± 1,42
PCR (mg/dL)	0,085 [0,040-0,162]
eGFR (mL/min/1,73 m²)	91,0 [79,0-91,0]

Variabile	Valore
Biomarcatori circolanti	
CXCL9 (pg/mL)	427,5 [339,0-557,8]
FGF23 (pg/mL)	46,8 [34,8-61,6]
Leptina (pg/mL)	$1{,}51 \times 10^4$ [$9{,}79 \times 10^3$-$2{,}15 \times 10^4$]
Adiponectina (pg/mL)	$7{,}24 \times 10^6$ [$4{,}29 \times 10^6$-$1{,}13 \times 10^7$]
Adiponectina/Leptina	437,2 [167,0-946,2]
MiRNA	
miR-98-5p ($\log_2$)	-17,15 [-30,96- -15,33]
miR-483-5p ($\log_2$)	-15,88 [-28,44- -13,70]

***Tabella 1**: Parametri biochimici e densitometrici delle pazienti incluse nell'analisi. I dati sono espressi come media ± deviazione standard o mediana [intervallo interquartile], in funzione della distribuzione delle variabili.*

I valori mediani di fosfatasi alcalina ossea (BAP) e paratormone (PTH) sono rispettivamente pari a 14,2 µg/L e 61,0 pg/mL. Per quanto riguarda i parametri generali e infiammatori, la conta leucocitaria media è di $6{,}06 \pm 1{,}42 \times 10^3$/µL, mentre la PCR presenta un valore mediano di 0,085 mg/dL. Tra i biomarcatori circolanti analizzati, CXCL9 e FGF23 presentano concentrazioni mediane rispettivamente pari a 427,5 e 46,8 pg/mL. Le concentrazioni mediane di leptina e adiponectina sono pari rispettivamente a $1{,}51 \times 10^4$ e $7{,}24 \times 10^6$ pg/mL, con un rapporto adiponectina/leptina mediano di 437,2. Infine, i livelli di espressione relativa di miR-98-5p e miR-483-5p, espressi in scala logaritmica in base 2, presentano valori mediani rispettivamente pari a −17,15 [−30,96; −15,33] e −15,88 [−28,44; −13,70].

4.2 Associazione tra miRNA e biomarcatori circolanti

Le correlazioni tra i livelli basali di miR-98-5p e miR-483-5p e i biomarcatori circolanti sono riportate nella Figura 11. I due miRNA mostrano un profilo di

associazione sostanzialmente concordante. In particolare, entrambi risultano inversamente correlati con l'adiponectina (miR-483-5p: $\rho = -0,35$, $p<0,001$; miR-98-5p: $\rho = -0,35$, $p<0,001$) e con il rapporto adiponectina/leptina (miR-483-5p: $\rho = -0,26$, $p=0,002$; miR-98-5p: $\rho = -0,23$, $p=0,008$). Una correlazione inversa significativa emerge inoltre con la fosfatasi alcalina ossea (BAP), sia per miR-483-5p ($\rho = -0,21$; $p=0,005$) sia per miR-98-5p ($\rho = -0,28$; $p<0,001$). Al contrario, FGF23 mostra una correlazione positiva con entrambi i miRNA (miR-483-5p: $\rho = 0,27$; $p=0,001$; miR-98-5p: $\rho = 0,22$; $p=0,009$), mentre non sono state osservate associazioni statisticamente significative con PTH, vitamina D, leptina, CXCL9 e OPN.

Dopo aggiustamento per età, BMI ed eGFR, entrambi i miRNA mantengono associazioni significative con adiponectina, rapporto adiponectina/leptina, FGF23 e fosfatasi alcalina ossea, anche dopo correzione FDR (p-FDR<0.001). Al contrario non emergono associazioni significative tra i livelli basali dei miR-483-5p-5p e miR-98-5p con la BMD, né nelle analisi trasversali (p<0.236) né longitudinali (p<0.788).

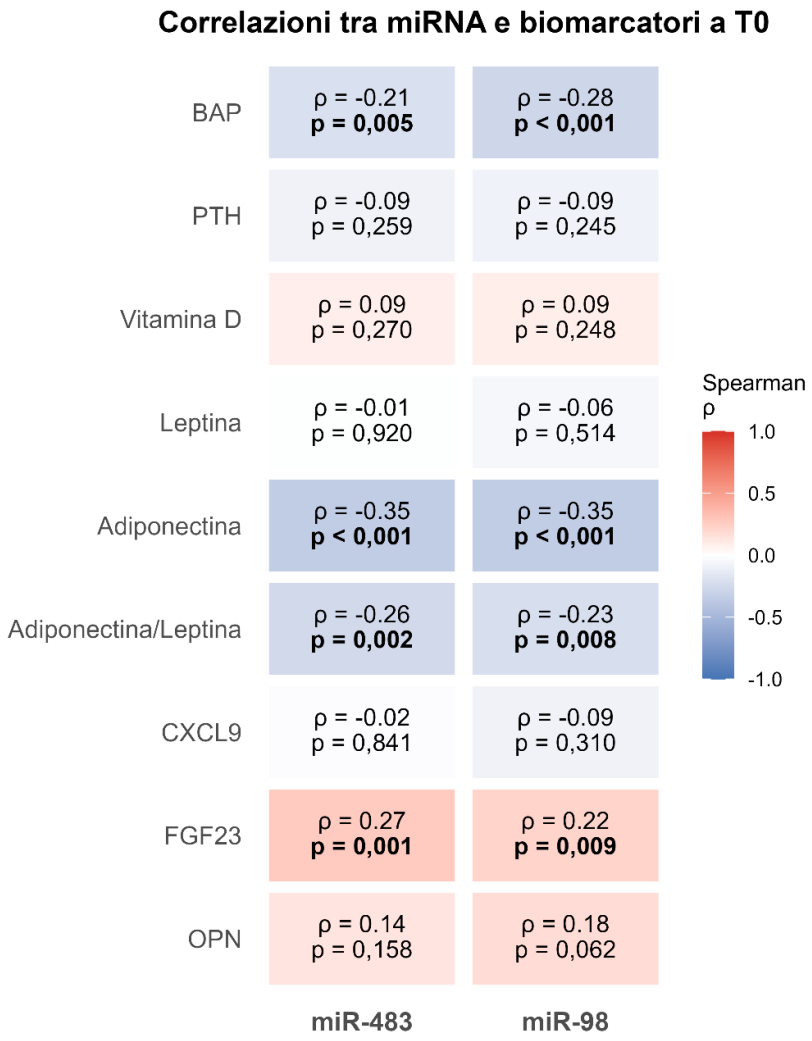


Figura 11: *Correlazioni di Spearman tra i livelli circolanti di miR-98-5p e miR-483-5p e i biomarcatori analizzati a T0. I valori riportati nelle celle rappresentano il coefficiente di correlazione di Spearman (ρ) e il relativo p-value. Le tonalità blu indicano correlazioni inverse e le tonalità rosse correlazioni positive.*

4.3 Relazione tra densitometria e morfometria vertebrale

Nella figura 12 è riportata la distribuzione del grado massimo di Genant per classificazione densitometrica. La maggior parte delle donne, sia con osteoporosi sia con osteopenia non presenta deformità vertebrali.

Tuttavia, deformità con grado Genant ≥ 1 sono presenti nel 23,8% delle pazienti osteoporotiche e nel 21,1% di quelle osteopeniche.

Le deformità di grado moderato o severo (Genant ≥ 2) sono più frequenti nelle pazienti osteoporotiche (14,8%) rispetto a quelle osteopeniche (9,8%). Nelle pazienti con densitometria normale non sono state osservate deformità vertebrale, nonostante questo gruppo sia numericamente limitato (n=7).

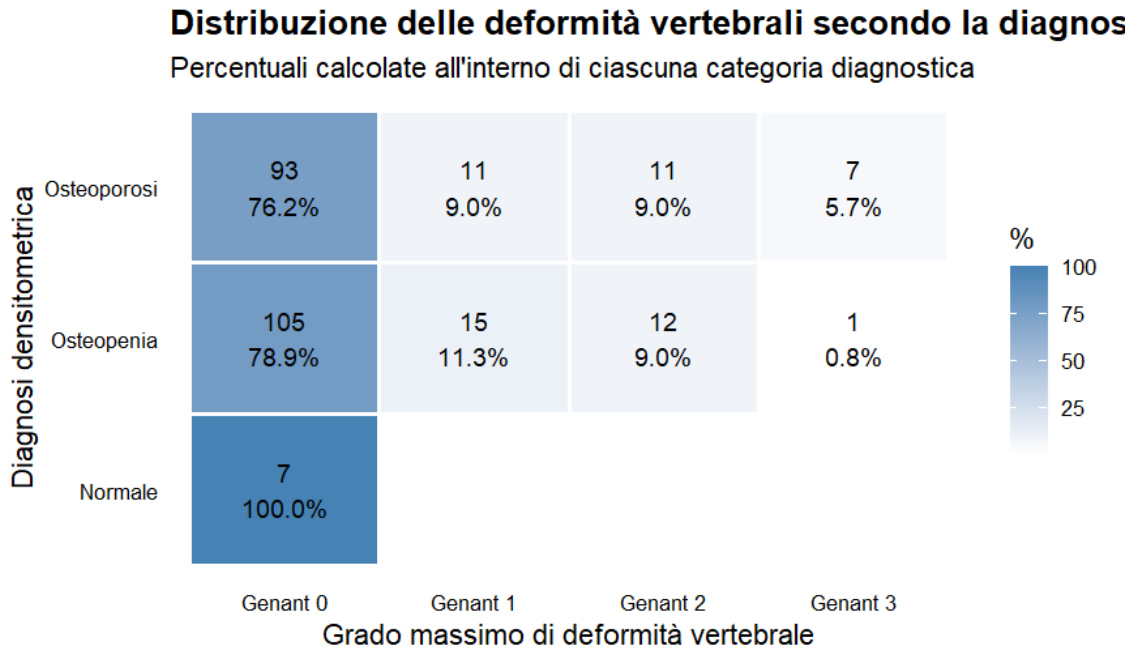


***Figura 12**: Distribuzione del grado massimo di deformità vertebrale secondo la diagnosi densitometrica. La heatmap mostra la distribuzione delle partecipanti con osteoporosi, osteopenia o densitometria normale in relazione al grado massimo di deformità vertebrale secondo Genant (grado 0: assenza di deformità; grado 1: lieve; grado 2: moderata; grado 3: severa). I valori nelle celle indicano il numero di soggetti e la relativa percentuale all'interno di ciascuna categoria densitometrica.*

4.4 Caratterizzazione dei fenotipi densitometrico-morfometrici

Sulla base della classificazione densitometrica e della presenza di deformità vertebrali sono stati identificati quattro principali fenotipi: osteopenia con deformità (n=28), osteopenia senza deformità (n=105), osteoporosi con deformità (n=29) e osteoporosi senza deformità (n=93). Le principali caratteristiche cliniche, densitometriche e biochimiche dei quattro gruppi sono riportate nella Tabella 2.

Variabile	Osteopenia + deformità (n=28)	Osteopenia senza deformità (n=105)	Osteoporosi + deformità (n=29)	Osteoporosi senza deformità (n=93)
Età (anni)	64,5 [57,5-65,6]	58,5 [55,2-61,9]	65,3 [59,2-73,9]	59,1 [55,5-64,6]
BMI (kg/m²)	23,6 [21,5-26,4]	23,4 [21,7-25,3]	21,8 [20,3-22,8]	22,0 [20,4-24,3]
BMD lombare (g/cm²)	0,952 [0,920-0,988]	0,956 [0,923-0,993]	0,812 [0,754-0,845]	0,819 [0,779-0,847]
T-score lombare	-1,90 [-2,12-1,60]	-1,90 [-2,10-1,60]	-3,10 [-3,60-2,80]	-3,00 [-3,30-2,80]
Egfr	86,5 [78,0-91,0]	91,0 [80,0-91,0]	88,0 [72,0-91,0]	91,0 [79,0-91,0]
WBC	5,87 [5,19-7,09]	5,97 [5,34-6,84]	5,64 [4,73-7,51]	5,79 [5,04-6,67]
PCR	0,13 [0,06-0,26]	0,09 [0,05-0,19]	0,06 [0,04-0,18]	0,08 [0,04-0,15]
PTH	68,5 [53,0-88,2]	59,0 [47,0-76,0]	69,5 [55,8-84,0]	61,0 [45,0-82,0]
BAP	13,5 [11,4-16,1]	14,3 [10,6-19,0]	14,8 [10,5-18,3]	14,1 [11,4-18,6]
CXCL9	427,0 [377,5-477,5]	389,5 [301,5-517,8]	497,0 [370,5-1022,0]	446,0 [337,5-614,0]
FGF23	59,3 [43,8-73,0]	53,6 [41,6-66,9]	62,4 [43,7-80,4]	45,4 [33,8-62,3]
Leptina ($\times 10^6$)	0,02 [0,01-0,02]	0,02 [0,01-0,03]	0,01 [0,01-0,02]	0,01 [0,01-0,03]
Adiponectina ($\times 10^6$)	6,25 [4,65-7,27]	6,28 [1,67-9,48]	8,28 [5,10-11,24]	6,65 [3,55-11,74]
Adiponectina/Leptina	252,99 [106,88-571,51]	253,59 [60,67-661,67]	530,98 [340,42-846,98]	400,45 [159,69-1017,36]
miR-98-5p ($\log_2$)	-16,13 [-17,34-14,87]	-17,00 [-31,49-15,15]	-17,49 [-29,79-16,37]	-17,06 [-30,62-15,07]
miR-483-5p ($\log_2$)	-13,99 [-15,36-12,41]	-14,74 [-28,50-13,64]	-15,86 [-28,34-14,22]	-16,15 [-29,29-13,84]

***Tabella 2**. Caratteristiche dei quattro fenotipi clinici. Valori espressi come mediana [IQR].*

Nel confronto complessivo tra donne con osteopenia e osteoporosi, le pazienti con osteoporosi presentano, come atteso sulla base della classificazione densitometrica, valori inferiori di BMD e T-score (entrambi $p < 0,001$) e un BMI più basso ($p < 0,001$). Tra i biomarcatori analizzati, il rapporto adiponectina/leptina risulta significativamente differente tra i due gruppi ($p = 0,022$), mentre non emergono differenze significative per i miR-98-5p e miR-483-5p.

Considerando esclusivamente le donne con deformità vertebrali, quelle con osteopenia presentano un BMI più elevato rispetto alle donne con osteoporosi ($p=0,011$), oltre alle attese differenze di BMD e T-score ($p<0,001$, Tabella 3). In questo confronto emergono inoltre differenze nei livelli di leptina ($p=0,046$) e del miR-483-5p ($p=0,029$), mentre la differenza per miR-98-5p non raggiunge la significatività statistica ($p=0,074$, Tabella 3).

Infine, all'interno del gruppo con osteopenia, le donne con deformità vertebrali sono più anziane rispetto a quelle senza deformità ($p=0,007$), mentre BMD e T-score lombari sono sostanzialmente sovrapponibili ($p=0,791$ e $p=0,805$, rispettivamente, Tabella 3). Tra i biomarcatori analizzati, l'unica differenza statisticamente significativa riguarda il miR-483-5p, i cui livelli sono più elevati nelle donne osteopeniche con deformità ($p=0,037$). Non emergono differenze significative per il miR-98-5p né per gli altri biomarcatori considerati.

Sulla base di tale risultato, è stata quindi approfondita l'associazione tra miR-483-5p e presenza di deformità vertebrali nel sottogruppo delle donne con osteopenia mediante analisi multivariabile.

Variabile	Osteopenia vs osteoporosi	Osteopenia + def. vs osteoporosi + def.	Osteopenia: con vs senza deformità
Età	0,054	0,241	**0,007**
BMI	**<0,001**	**0,011**	0,668
BMD	**<0,001**	**<0,001**	0,791
T-score	**<0,001**	**<0,001**	0,805
eGFR	0,614	0,873	0,406
WBC	0,202	0,655	0,843
PCR	0,090	0,218	0,447
PTH	0,476	1,000	0,068
BAP	0,517	0,416	0,647
CXCL9	0,053	0,260	0,486
FGF23	0,273	0,519	0,483
Leptina	0,072	**0,046**	0,430
Adiponectina	0,140	0,295	0,986
Adiponectina/Leptina	**0,022**	0,118	0,977
miR-98-5p	0,696	0,074	0,116
miR-483-5p	0,141	**0,029**	**0,037**

Tabella 3: *Confronti tra fenotipi denistometrico-morfometrici. Sono riportati i valori di p-value ottenuti, di cui quelli significativi sono evidenziati in grassetto.*

4.5 Associazione tra il miR-483-5p e deformità vertebrali nelle donne con ostoepenia

Al fine di valutare se i livelli circolanti di miR-483-5p fossero associati alla presenza di deformità vertebrali indipendentemente dall'età e dalla densità minerale ossea, è stata condotta un'analisi di regressione logistica nel sottogruppo delle donne con osteopenia. La variabile dipendente era rappresentata dalla presenza, al baseline, di almeno una deformità vertebrale di grado Genant ≥1, mentre le variabili indipendenti comprendevano età, BMD lombare ed espressione di miR-483-5p.

Sono stati confrontati due modelli: un modello di riferimento (M0), comprendente età e BMD lombare, e un modello esteso (M1), comprendente anche miR-483-5p.

Il modello di riferimento comprendente età e BMD (M0) mostra un'AUC pari a 0,764 (IC95% 0,613–0,914).

L'aggiunta di miR-483-5p (M1) determina un incremento dell'AUC a 0,828 (IC95% 0,711–0,944) e un miglioramento significativo del modello (LRT χ^2 = 6,61; p = 0,010).

Nel modello multivariabile, livelli più elevati di miR-483-5p risultano associati alla presenza di deformità vertebrali indipendentemente da età e BMD lombare (OR 1,13, per incremento di 1 unità $\log_2$; IC95% 1,03–1,29; p = 0,025). Sebbene l'aggiunta del miRNA sia accompagnata da un incremento dell'AUC da 0,764 a 0,828, il confronto diretto tra le due curve ROC mediante test di DeLong non raggiunge la significatività statistica (p = 0,070).

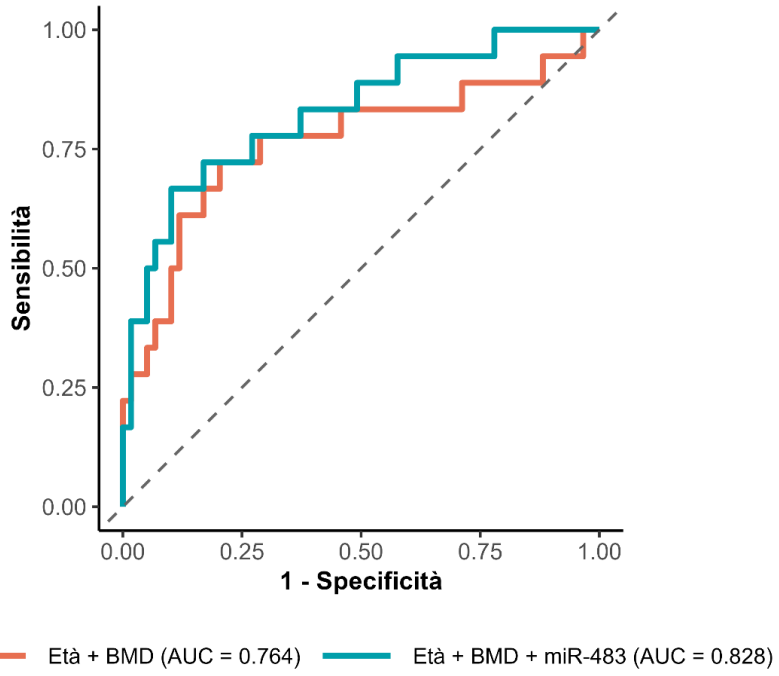


Figura 13: *Curve ROC dei modelli per la presenza di deformità vertebrali nelle donne con osteopenia. Confronto tra il modello di riferimento comprendente età e BMD lombare (M0) e il modello con aggiunta di miR-483-5p (M1). Le rispettive AUC sono riportate in figura.*

5 DISCUSSIONE

L'osteoporosi è una patologia scheletrica complessa, caratterizzata da una progressiva compromissione della massa e della microarchitettura ossea, che determina un aumento della fragilità scheletrica e del rischio di frattura. Alla base della malattia intervengono numerosi meccanismi biologici, tra cui alterazioni del rimodellamento osseo, fattori metabolici, ormonali e processi associati all'invecchiamento. La comprensione di questi meccanismi rappresenta un aspetto importante non soltanto per approfondire la fisiopatologia dell'osteoporosi, ma anche per individuare nuovi indicatori della salute ossea. La densitometria ossea mediante DXA rappresenta il principale strumento per la diagnosi dell'osteoporosi e la valutazione della densità minerale ossea (BMD). Tuttavia, la fragilità scheletrica è una condizione multifattoriale, nella quale intervengono anche caratteristiche dell'osso non direttamente misurabili attraverso la densitometria. Come evidenziato da numerosi studi, infatti, una quota rilevante delle fratture da fragilità si verifica anche in soggetti con valori di BMD non classificabili come osteoporotici (Marshall D, 1996). Per questo motivo, la valutazione della salute ossea si avvale dell'integrazione tra parametri densitometrici, caratteristiche cliniche e altri fattori di rischio.

Negli ultimi anni è cresciuto l’interesse per l'identificazione di biomarcatori circolanti che possano contribuire a una migliore comprensione dei processi biologici coinvolti nella fragilità scheletrica. La possibilità di misurare tali biomarcatori su campioni di sangue periferico rappresenta un vantaggio, trattandosi di un approccio minimamente invasivo e potenzialmente ripetibile nel tempo. Tra i candidati emergenti, i miRNA rivestono particolare interesse per il loro ruolo nella regolazione dell'espressione genica e per il loro coinvolgimento in numerosi processi cellulari, tra cui differenziamento, senescenza e rimodellamento osseo. Nonostante le prospettive promettenti, il loro possibile impiego clinico necessita ancora di ulteriori studi e di un'adeguata validazione.

In questo contesto si inserisce il presente studio, che ha approfondito il possibile ruolo dei miR-98-5p e miR-483-5p in un sottogruppo di 160 donne in post-menopausa appartenenti alla coorte FiORdiLOTO.

La popolazione analizzata presenta caratteristiche eterogenee, con differenti livelli di densità minerale ossea e differenti profili biochimici, che permettono di esplorare le associazioni dei miRNA in diverse condizioni di salute ossea.

Un primo risultato dello studio riguarda le associazioni tra i livelli di espressione dei due miRNA e alcuni biomarcatori circolanti coinvolti nel metabolismo osseo. In particolare, sia il miR-98-5p sia il miR-483-5p mostrano correlazioni inverse con adiponectina, rapporto adiponectina/leptina e fosfatasi alcalina ossea (BAP), mentre risultano positivamente correlati con FGF23. Tali associazioni si mantengono significative anche dopo aggiustamento per età, BMI e funzionalità renale. Questi risultati sono interessanti, poiché l'adiponectina e la leptina sono adipochine coinvolte nella regolazione del metabolismo energetico, dell'infiammazione e del rimodellamento osseo (Mangion D, 2023). In particolare, l'adiponectina ha prevalentemente effetti antinfiammatori e insulino-sensibilizzanti, mentre la leptina regola l'appetito ed è associata a processi pro-infiammatori. Il rapporto adiponectina/leptina (A/L) è stato proposto come indicatore della funzionalità del tessuto adiposo e del rischio cardiometabolico, con valori più bassi associati a un profilo metabolico meno favorevole (Frühbeck, 2018). In questo studio, i risultati ottenuti mostrano una correlazione inversa con adiponectina e rapporto A/L, suggerendo che livelli più elevati di miR-98-5p e miR-483-5p possano associarsi a un profilo metabolico potenzialmente meno favorevole. Questo risultato potrebbe indicare un coinvolgimento dei due miRNA nei meccanismi metabolici e infiammatori che collegano tessuto adiposo e metabolismo osseo. Va comunque considerato che, poiché non emergono associazioni significative con la sola leptina, la correlazione con il rapporto A/L potrebbe essere principalmente influenzata dall'adiponectina.

La correlazione inversa osservata con la BAP risulta altrettanto interessante. La fosfatasi alcalina ossea è infatti un enzima prodotto dagli osteoblasti e rappresenta un marcatore biochimico della formazione ossea. L'associazione con entrambi i miRNA potrebbe suggerire un collegamento con i processi di attività osteoblastica e rimodellamento scheletrico (Vasikaran SD & (C-BM), 2023). Analogamente, la correlazione positiva con FGF-23, potrebbe suggerire un possibile coinvolgimento dei miRNA nella regolazione del metabolismo minerale. Infatti, FGF-23 è un ormone prodotto principalmente dagli osteociti, coinvolto nella regolazione dell'omeostasi del fosfato e della vitamina D a livello renale, quindi indirettamente nei processi di mineralizzazione ossea (Jurina, 2024).

Nel complesso, la concordanza delle associazioni osservate per miR-98-5p e miR-483-5p, insieme alla correlazione positiva tra i loro livelli di espressione, rappresenta un elemento interessante, suggerendo la presenza di possibili processi biologici comuni. Tuttavia, sulla base di questi risultati, non è possibile stabilire se condividano geni bersaglio o pathway molecolari. Saranno per questo necessari ulteriori studi di tipo bioinformatico e successivamente studi di validazione.

Nonostante le associazioni osservate con diversi biomarcatori circolanti, non sono emerse relazioni statisticamente significative tra i livelli basali dei due miRNA e i parametri densitometrici (BMD e T-score) né nelle analisi trasversali né in quelle longitudinali. Questi risultati non forniscono evidenze di un'associazione tra i livelli circolanti dei due miRNA e la densità minerale ossea o le sue variazioni longitudinali nella popolazione analizzata.

A questo proposito, un risultato particolarmente rilevante emerge dall'analisi della classificazione densitometrica e della morfometria vertebrale. Nel presente studio, deformità vertebrali di grado Genant ≥1 sono state osservate nel 23,8% delle donne con osteoporosi e nel 21,1% di quelle con osteopenia.

La presenza di deformità in percentuali molto simili nei due gruppi evidenzia come la classificazione densitometrica non distingua, da sola, le pazienti con

deformità vertebrali, in linea con gli studi presenti in letteratura (M. Rossini, 2016). Questi risultati dimostrano la necessità di integrare la valutazione densitometrica con quella morfometrica per ottenere una caratterizzazione più completa della fragilità scheletrica.

L'analisi dei differenti fenotipi densitometrico-morfometrici ha permesso di approfondire ulteriormente questo aspetto. In particolare, confrontando le donne osteopeniche con e senza deformità vertebrali, non sono emerse differenze significative nei valori di BMD e T-score lombari, risultato comprensibile, considerando che entrambi i gruppi appartengono alla stessa categoria densitometrica. Le donne con deformità, invece, presentano un'età maggiore, coerentemente con il ruolo dell'invecchiamento come fattore di rischio per la fragilità scheletrica. Tra i biomarcatori analizzati, il miR-483-5p mostra livelli significativamente più elevati nelle donne osteopeniche con deformità vertebrali ($p = 0,037$), mentre per il miR-98-5p non emerge una differenza statisticamente significativa ($p = 0,116$).

Sebbene soltanto miR-483-5p abbia mostrato un'associazione significativa con la presenza di deformità vertebrali nelle donne con osteopenia, entrambi i miRNA sono stati precedentemente studiati in relazione ai processi di rimodellamento osseo. In particolare, studi sperimentali hanno suggerito un coinvolgimento di miR-98-5p nella regolazione della differenziazione osteoblastica (Zheng F W. F., 2019) e di miR-483-5p nella differenziazione osteoclastica (Keqian Li, 2020). Queste evidenze, considerate insieme alle associazioni osservate con alcuni biomarcatori circolanti, forniscono un razionale biologico per ulteriori approfondimenti sul possibile ruolo dei due miRNA nei processi associati alla fragilità scheletrica.

Il risultato relativo a miR-483-5p ha motivato un approfondimento mediante regressione logistica multivariabile nel sottogruppo delle donne con osteopenia.

Dopo aggiustamento per età e BMD lombare, livelli più elevati di miR-483-5p risultano associati a una maggiore probabilità di presentare deformità vertebrali (OR 1,13; IC95% 1,03–1,29; $p = 0,025$). Inoltre, l'aggiunta del miR-483-5p al

modello comprendente età e BMD ha determinato un incremento dell'AUC da 0,764 a 0,828, accompagnato da un miglioramento statisticamente significativo dell'adattamento complessivo del modello (likelihood ratio test, p = 0,010). Questi risultati suggeriscono che il miR-483-5p possa fornire informazioni aggiuntive rispetto alle variabili cliniche e densitometriche convenzionali, soprattutto in donne con osteopenia, nelle quali la BMD non permette di distinguere le partecipanti con e senza deformità vertebrali.

È necessario, tuttavia, interpretare questi risultati considerando alcuni limiti dello studio. In particolare, il numero di partecipanti disponibili per le analisi multivariate nel sottogruppo osteopenico è relativamente contenuto. Inoltre, la valutazione delle deformità vertebrali è stata condotta al baseline (T0), pertanto non è possibile stabilire se miR-483-5p sia in grado di predire la comparsa di nuove deformità nel tempo. Un ulteriore limite riguarda la definizione dell'outcome, basata sulla presenza di deformità vertebrali morfometriche di grado Genant ≥1, che non corrispondono necessariamente a fratture vertebrali da fragilità clinicamente accertate. Nel complesso, i risultati della presente tesi suggeriscono che il miR-483-5p rappresenti un biomarcatore di notevole interesse e meritevole di ulteriori approfondimenti, soprattutto per la sua associazione con la presenza di deformità vertebrali nelle donne con osteopenia. L'ampliamento delle determinazioni e delle analisi nella coorte FiORdiLOTO e la disponibilità dei dati longitudinali potranno aiutare a chiarirne il potenziale ruolo nella caratterizzazione della fragilità scheletrica.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Beaudoin C, M. L.-M. (2019). Performance of predictive tools to identify individuals at risk of non-traumatic fracture: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Osteoporos Int, 30*(4), 721-740. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30877348/

- Cardoneanu, A. R. (2023). Bone Cells Metabolic Changes Induced by Ageing. In J. K. Harris, *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part IV, Clinical Science* (Vol. 103). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-031-26576-1_2

- Chih-Hsing Wu, W.-C. H.-L.-T.-F.-F.-H.-L.-S.-C.-F.-T. (2020). Pharmacologic intervention for prevention of fractures in osteopenic and osteoporotic postmenopausal women: Systemic review and meta-analysis,. *Bone reports, 13*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33195764/

- de Mello AS, F. B.-M. (2024). MicroRNA Biogenesis, Gene Regulation Mechanisms, and Availability in Foods. *Noncoding RNA, 10*(5), 52. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39452838/

- Farmaco, AIFA - Agenzia Italiana del Farmaco. (s.d.). *Nota 79.* Tratto il giorno 2026 da AIFA (aifa.gov.it): https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1728074/nota-79.pdf

- Frühbeck, G. C.-A. (2018). Adiponectin-leptin ratio: A promising index to estimate adipose tissue dysfunction. Relation with obesity-associated cardiometabolic risk. *Adipocyte, 7*(1), 57-62. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29205099/

- GAD, M. (2024). MicroRNAs: circulating biomarkers for the early detection of imperceptible cancers via biosensor and machine-learning advances. *Oncogene, 43*(28), 2135-2142. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38839942/

- Greenblatt MB, T. J. (2017). Bone Turnover Markers in the Diagnosis and Monitoring of Metabolic Bone Disease. *Clin Chem, 63*(2), 464-474. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27940448/

- Haiheng Peng, Y. Y. (2022). MicroRNA-483-5p inhibits osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells by targeting the RPL31-mediated RAS/MEK/ERK signaling pathway. *Cell Signalling*, 93:110298. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35248705/

- Harry K. Genant, C. Y. (1993). Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *Journal of Bone and Mineral Research, 8*, 1137–1148. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8237484/

- Hazari V, S. S. (2024). MicroRNA-98: the multifaceted regulator in human cancer progression and therapy. *Cancer cell int, 24*(1). https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38872210/

- Heenam Goel, N. B. (2024). Clinical Use of Trabecular Bone Score: The 2023 ISCD Official Positions. *Journal of Clinical Densitometry, 27*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38228014/

- J A Buckwalter, R. R. (1987). Bone structure and function. *Instr Course Lect*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3325555/

- JA, K. (2002). Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet, 359*(9321), 1929-1936. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12057569/

- Jurina, A. K. (2024). Fibroblast growth factor 23 and its role in bone diseases. *Growth Factors, 42*(1), 1-12. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37906060/

- Keqian Li, S. C. (2020). MiRNA-483–5p is involved in the pathogenesis of osteoporosis by promoting osteoclast differentiation, Molecular and Cellular Probes . https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.101479

- LeBoff, M. G. (2022). The clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int, 33*, 2049-2102. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35478046/

- M. Rossini, S. A. (2016). *Guidelines for the diagnosis, prevention and management of osteoporosis.* Tratto il giorno 2026 da SIOMMMS:

file:///C:/Users/User/Downloads/mikimos,+REUMATISMO_ING_1_2016_art_02%20(1).pdf

- Mangion D, P. N. (2023). The relationship between adipokine levels and bone mass-A systematic review. *Endocrinol Diabetes Metab*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36759562/

- Marshall D, J. O. (1996). Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8634613/

- Ministero della Salute. (2023). *Osteoporosi*. Tratto il giorno 2026 da Ministero della Salute: https://www.salute.gov.it/new/it/tema/salute-della-donna/osteoporosi/

- Raggatt LJ, P. N. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem, 285*(33), 25103-25108. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20501658/

- SIOMMMS. (2026). *Quali sono i principali fattori di rischio di osteoporosi?* Tratto da SIOMMMS: https://www.siommms.it/area-pazienti/quali-sono-i-principali-fattori-di-rischio-di-osteoporosi/

- Nakashima T. (2015). Bone and Calcium Research Update 2015. Regulation of bone remodeling by osteocytes. *Clin Calcium, 25*(1), 21-28. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25530519/

- Vasikaran SD, M. M., & (C-BM), I.-I. J. (2023). Practical Considerations for the Clinical Application of Bone Turnover Markers in Osteoporosis. *Calcif Tissues Int, 112*(2), 148-157. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34846540/

- You Q, N. Y. (2026). From Osteogenesis to Diagnosis: The Role of microRNAs as Biomarkers for Osteoporosis. *Int J Mol Sci, 27*(3). https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41683602/

- Zheng F, W. F. (2019). MicroRNA-98-5p prevents bone regeneration by targeting high mobility group AT-Hook 2. *Exp Ther Med, 18*(4), 2660-2666. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6755429/

- Zheng F, Z. F. (2022). Inhibition of miR-98-5p promotes high glucose-induced suppression of preosteoblast proliferation and differentiation via the activation of the PI3K/AKT/GSK3β signaling pathway by targeting BMP2. *Mol Med Rep, 26*(3). https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35904181/