

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

LE EXERCHINE, UN POTENZIALE AIUTO PER LA SALUTE

RELATORE:

Chiar.ma Prof.ssa Maria Teresa Conconi

LAUREANDA:

Laura Osti

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Le exercchine,
un potenziale aiuto per la salute

Sommario

CAPITOLO 1	1
Introduzione	1
CAPITOLO 2	3
2.1 Definizione delle exerchine	3
2.2 Relazioni delle exerchine tessuto-specifiche	8
2.2.1 Sistema cardiovascolare	8
2.2.2 Tessuto adiposo	9
2.2.3 Muscolo scheletrico	12
2.2.4 Fegato e Intestino	13
2.2.5 Sistema endocrino	13
2.2.6 Sistema immunitario.....	16
2.2.7 Sistema nervoso.....	19
2.2.8 Osso.....	21
2.3 <i>Crosstalk</i>	21
2.3.1 Muscolo-cervello	21
2.3.2 Fegato-cervello	22
2.4 Potenzialità	22
2.5 Lacune.....	24
CAPITOLO 3	25
3.1 I miRna.....	25
3.2 Vescicole extracellulari	26
3.3 miR-1192	27
3.4 miR-342-5p	28
3.5 Apelina.....	29

3.6 GDF-15	30
3.7 Ossitocina.....	31
CAPITOLO 4.....	33
4.1 Comunicazione intercellulare	33
4.2 Tipi di vescicole extracellulari	33
4.3 Studi sull'esercizio nel rilascio degli esosomi	38
4.4 Variabilità inter-studio	45
4.5 Analisi delle <i>ELVs</i>	45
CAPITOLO 5.....	51
Conclusioni.....	51
CAPITOLO 6.....	53
Bibliografia	53

CAPITOLO 1

Introduzione

Dagli studi in letteratura si evince che l'esercizio fisico migliora lo stato di salute e da alcuni anni è stato osservato che ciò è attribuibile alla presenza delle exerkine. Questi fattori dell'esercizio sono stati identificati prima nel muscolo scheletrico e successivamente anche in altri organi. In questo lavoro di tesi, mi sono posta l'obiettivo di approfondire le potenzialità delle exerkine ed il loro complesso rilascio condizionato dall'esercizio fisico. Le exerkine sono delle molecole che consentono di conservare lo stato di salute, riducendo la progressione delle malattie e conferendo benessere nelle persone, rendendole più resilienti e potrebbero anche avere un risvolto terapeutico nelle persone inabili all'esercizio fisico (Chow et al., 2022). Gli effetti delle exerkine sull'organismo vengono sviluppati nel secondo capitolo, mentre nel terzo sono descritte, in modo più approfondito, alcune specifiche exerkine che appartengono a classi differenti di biomolecole, quali miRNA, proteine oppure ormoni (Magliulo et al., 2022). La modalità di allenamento è importante, perché vengono rilasciate determinate exerkine, per esempio durante o dopo l'esercizio. Inoltre, negli studi è stata riscontrata una difficoltà nell'isolare le varie tipologie delle vescicole contenenti le exerkine (Nederveen et al., 2021). Questo tema verrà affrontato nel quarto capitolo, tenendo anche in considerazione la raccolta del campione e la sua gestione.

CAPITOLO 2

Le informazioni presenti in questo capitolo provengono dalla *Review* di Chow et al. (2022).

2.1 Definizione delle exerchine

Oltre 100 anni fa è stata identificata la secrezione di acido lattico dal muscolo scheletrico e nel 1961 sono state effettuate delle supposizioni sull'esistenza di un fattore umorale non insulinico in grado di regolare l'effetto dell'esercizio sul muscolo scheletrico e l'utilizzo del glucosio epatico. Dalla scoperta, nel 2000, che la contrazione muscolare rilascia interleuchina 6 (IL-6), il numero delle molecole segnale associate all'esercizio che è stato identificato si è moltiplicato e nel 2016 è stato coniato il termine "exerchina".

Le exerchine sono definite come delle molecole segnale rilasciate in risposta all'esercizio acuto o cronico. Una moltitudine di organi, cellule e tessuti rilasciano questi fattori, inclusi il muscolo scheletrico (miochine), il cuore (cardiochine), il fegato (epatochine), il tessuto adiposo bianco (adipochine), il tessuto adiposo bruno (batochine) e i neuroni (neurochine). Le exerchine esercitano i loro effetti attraverso vie endocrine, paracrine (riguardano cellule adiacenti) e/o autocrine (sulle cellule di origine). Nella Tabella 1, sono indicati alcuni esempi di exerchine e gli effetti paracrini e autocrini che esse esercitano sui vari organi. Le exerchine includono un ampio *range* di molecole segnale, incluse le citochine, gli acidi nucleici (microRNA, mRNA e DNA mitocondriale), i lipidi e i metaboliti.

La risposta acuta delle exerchine è influenzata dal tipo di esercizio, dalla sua durata, dalla forma fisica, dallo stato di nutrimento o digiuno e dalla tempistica di raccolta del campione dopo l'esercizio. Ci sono vari tipi di esercizio: quello acuto, caratterizzato da un singolo episodio di esercizio aerobico o di resistenza, e quello cronico. Anche se i termini "esercizio" e "attività fisica" sono usati comunemente in modo intercambiabile, l'esercizio è stato ritenuto come un'attività fisica intenzionale, quali l'allenamento aerobico, di resistenza o ad alta intensità. Al

contrario, l'attività fisica comprende l'esercizio e anche l'attività occupazionale e/o domestica.

Una delle esercine più studiate è IL-6, una miochina, i cui livelli variano a seconda dell'intensità dell'esercizio fisico. È stato osservato che un'intensità più alta dell'esercizio corrisponde a livelli plasmatici più alti di IL-6; tuttavia, nell'uomo, l'allenamento con l'esercizio cronico riduce le concentrazioni plasmatiche di IL-6. Questo effetto potrebbe essere parzialmente mitigato da un'aumentata espressione nel muscolo scheletrico di mRNA del recettore di IL-6.

La risposta acuta alle esercine non è necessariamente parallela a quella cronica. L'esposizione all'esercizio acuto è stata associata con risposte focalizzate sul mantenimento dell'omeostasi metabolica, con l'infiammazione acuta bilanciata da mediatori antinfiammatori e un accomodamento nell'utilizzo del carburante. Invece, l'esposizione all'esercizio cronico è stata associata a una risposta focalizzata sugli adattamenti metabolici a lungo termine e a una diminuita infiammazione.

Una percezione comune fra la comunità scientifica è la considerazione delle esercine come citochine che esercitano i loro effetti in un modo endocrino, riguardante tessuti distanti dal tessuto di origine. Le esercine non sono solo citochine; ormoni, neurotrasmettitori o metaboliti associati con l'esercizio, quali catecolamine, lattato o acidi grassi liberi (*FFAs*), possono anche agire come esercine con potenziale segnale endocrino (Figura 1).

Tabella 1. Esempi degli effetti paracrini e autocrini delle exerchine

Exerkine ^a	Source tissue	Affected tissue
Autocrine effects^b		
12,13-diHOME	–	BAT ^{91,169}
Apelin	–	Muscle ^{94,96}
Adiponectin	–	WAT ¹⁵³
BDNF	–	Brain ¹⁷⁰ , muscle ¹⁷¹
FGF21	–	WAT ^{56,172}
HSP72	–	Muscle ^{107,173}
IL-6	–	Muscle ^{15,54,120}
IL-7	–	Muscle ¹⁰²
IL-15	–	Muscle ¹⁷⁴
Lactate	–	Muscle ¹⁷⁵
LIF	–	Muscle ¹⁰³
Musclin (also known as osteocrin)	–	Muscle ^{43,176} , bone ^{62,177} , brain ¹⁷⁸
Myostatin	–	Muscle ⁴⁴
Nitric oxide	–	Endothelium ¹⁷⁹
Reactive oxygen species	–	Muscle ¹⁸⁰
SPARC	–	Muscle ^{63,181}
SDC4	–	Muscle ¹⁰⁴
TGFβ1	–	Muscle ¹⁸²
Paracrine effects		
Adiponectin	Adipose tissue	Muscle ⁵⁸
Angiopietin 1	Vascular smooth muscle	Vasculature ⁴⁷
BAIBA	Muscle	WAT ⁵⁵ , bone ⁵⁹
BDNF	Muscle	Nerves ⁵³
Fractalkine	Muscle	Leukocytes ⁶⁰
FGF21	WAT	BAT ⁵⁶
IL-6	Muscle	WAT ^{15,121}
IL-7	Muscle	Bone ⁶⁰
IL-8	Muscle	Vasculature ⁴⁸
IL-13	Tissue-resident ILC2	Muscle ¹³⁶
IL-15	Muscle	WAT ⁵⁷
LIF	Nerves, immune cells	Muscle ^{183,184}
Musclin	Bone	Cartilage ⁶²
Myostatin	Muscle	Bone ⁶¹
SPARC	Muscle	Extracellular matrix ⁶³
SDC4	Endothelium	Muscle ¹⁸⁵
TGFβ1	Muscle	Extracellular matrix ⁶⁴
TGFβ2	Adipose tissue	Muscle, BAT ⁴²
VEGF	Muscle	Endothelium ^{45,66}

12,13-diHOME, 12,13-dihydroxy-9Z-octadecenoic acid; BAIBA, β-aminoisobutyric acid; BAT, brown adipose tissue; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; FGF21, fibroblast growth factor 21; HSP72, heat shock protein 72; ILC2, type 2 innate lymphoid cells; LIF, leukaemia inhibitory factor; SDC4, syndecan 4; SPARC, secreted protein acidic and rich in cysteine; TGFβ1, transforming growth factor-β1; TGFβ2, transforming growth factor-β2; VEGF, vascular endothelial growth factor; WAT, white adipose tissue. ^aAlthough exerkine effects are commonly thought to be distant (endocrine) from the originating tissue, exerkines also exert local effects within the originating tissue (autocrine) and neighbouring tissues (paracrine). More details and relevant references are provided in Supplementary Table 1. ^bFor exerkines with autocrine effects, the source tissue is indicated as '–', as the source tissue and affected tissue are the same.

Tabella 1 (da Chow et al., 2022).

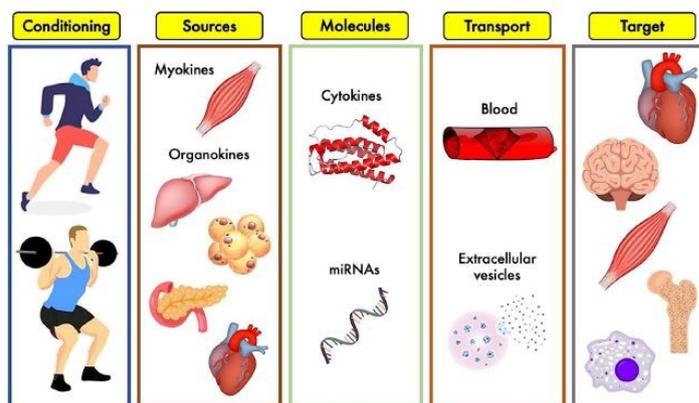


Figura 1. Panoramica del sistema exerchine: differenti tipi di esercizio fisico stimolano i tessuti a rilasciare una pletera di citochine e altre molecole che, circolando nel flusso sanguigno o nelle vescicole extracellulari, raggiungono i bersagli biologici per produrre effetti specifici (da Magliulo et al., 2022).

L'evidenza supporta l'importanza dell'attività fisica e dell'esercizio nella prevenzione e trattamento delle malattie croniche, come malattie cardiovascolari, obesità, diabete mellito di tipo 2, declino cognitivo e molti cancro, aumentando l'efficienza del sistema immunitario, il tempo in cui si resta in salute, la longevità e la resilienza (Figura 2).

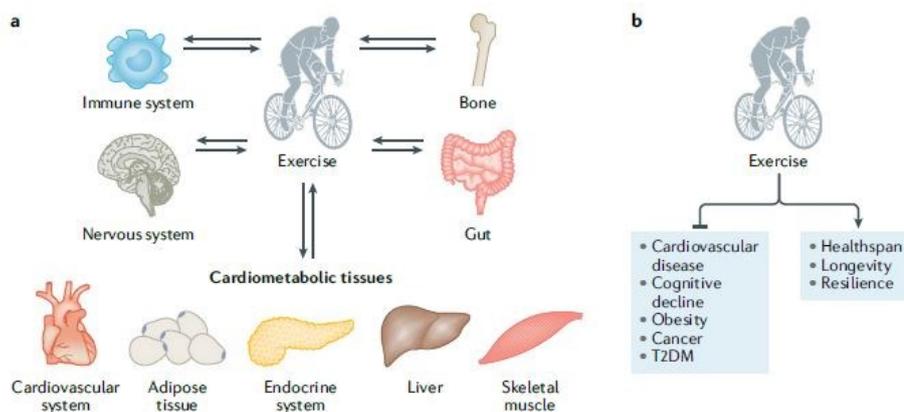


Figura 2. Gli effetti sistemici dell'esercizio. a) Organi e tessuti che possono servire come fonte di exerchine e che sono direttamente influenzate dall'esercizio. b) Risultati dell'esercizio in profondi benefici sulla salute, includendo la riduzione della presenza o della gravità di certe malattie, l'aumento del periodo della vita in cui si rimane in salute, la longevità e la resilienza. T2DM, Diabete mellito di tipo 2 (da Chow et al., 2022).

Nel campo delle exerchine, l'interesse è anche rivolto al ruolo delle vescicole extracellulari come importanti trasportatori di segnali molecolari e guide di *crossstalk* inter-organo relative all'esercizio. Le vescicole extracellulari trasportano un assortimento di materiali inclusi proteine, acidi nucleici e lipidi. Il contenuto delle vescicole extracellulari riflette la composizione delle cellule dalle quali sono rilasciate. Le vescicole extracellulari si comportano come un'exerchina nell'uomo: l'esercizio acuto aumenta i livelli plasmatici di vari microRNA dopo l'esercizio, e l'esercizio cronico aumenta vari microRNA nello stato di riposo, supportando la possibilità che i microRNA esercitino i loro effetti endocrini attraverso il trasporto basato su vescicole extracellulari.

2.2 Relazioni delle exercine tessuto-specifiche

Muscolo e tessuti altamente attivi da un punto di vista metabolico possono anche secernere exercine, che esercitano effetti locali (paracrini). Per esempio, il muscolo secerne il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), angiopoietina 1 e IL-8 per regolare l'angiogenesi tissutale, modulare il flusso sanguigno e aumentare la disponibilità di nutrienti per supportare la crescita tissutale. Gli effetti paracrini relativi all'esercizio sono anche stati osservati nel sistema nervoso, tessuto adiposo, osseo, cartilagineo, matrice extracellulare e sistema immunitario.

2.2.1 Sistema cardiovascolare

L'attività fisica riduce il rischio delle malattie cardiometaboliche e la mortalità (Figura 3). La contrazione del muscolo scheletrico produce molte molecole che possono potenziare il sistema cardiovascolare. Studi nell'uomo e in modelli animali hanno dimostrato che le exercine angiopoietina 1, fractalchina, fattore di crescita dei fibroblasti 21 (FGF21), IL-6, IL-8, *musclin*, mionectina e VEGF sono generalmente aumentate con l'esercizio acuto. Tuttavia, la risposta alle exercine all'allenamento cronico può essere abbastanza variabile e discrepante dagli effetti acuti.

L'attivazione dell'angiogenesi associata con certe exercine potrebbe mitigare l'ischemia. In particolare, l'esercizio dovrebbe migliorare la funzione endoteliale. Poiché l'endotelio vascolare si posiziona all'interfaccia tra sangue e tessuto, la sua distribuzione su una vasta area e il posizionamento strategico supporta il ruolo potenziale come iniziatore e destinatario degli effetti relativi alle exercine. Per esempio, l'interazione tra l'endotelio e certe exercine, quali ossido nitrico e VEGF, è stata vista influenzare il tono vascolare, l'infiammazione, la rigenerazione e la trombosi, e ha un importante ruolo nel cardiovascolare e nella resilienza.

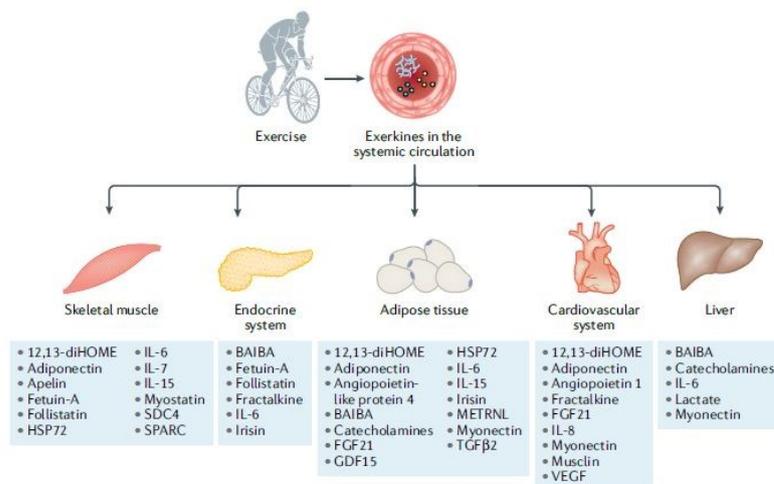


Figura 3. Esempi di exerchine che modulano il sistema cardiometabolico

Le exerchine rilasciate dopo l'esercizio nella circolazione sistemica, incluse proteine (linee blu), metaboliti (cerchi gialli) e vescicole extracellulari (cerchi verdi), che modulano il sistema cardiometabolico. Gli effetti sono in un ampio range e sistemici. Nel sistema cardiovascolare, le exerchine aumentano la vascolarizzazione e l'angiogenesi, e migliorano anche la pressione sanguigna, la funzione endoteliale e complessivamente la forma fisica risultando in una cardioprotezione. Nel tessuto adiposo, le exerchine aumentano la captazione degli acidi grassi, la lipolisi, la termogenesi e il metabolismo del glucosio. Nel fegato, le exerchine attivano il metabolismo del glucosio e la captazione degli acidi grassi. Nel muscolo scheletrico, le exerchine aumentano la formazione, il mantenimento e il riparo del muscolo, la captazione del glucosio, l'ossidazione lipidica, la biogenesi mitocondriale e la formazione di capillari. Nel pancreas, le exerchine aumentano la vitalità cellulare e influenzano la secrezione di insulina. 12,13-diHOME, acido 12,13-diidrossi-9Z-ottadecenoico; BAIBA, acido β-aminoisobutirrico; FGF21, fattore di crescita dei fibroblasti 21; GDF15, fattore di crescita e differenziazione 15; HSP72, heat shock protein 72; METRNL, meteorin-like; SDC4 sindecano 4; SPARC, proteina acida secreta e ricca in cisteina. TGFβ2, fattore β2 di crescita trasformante; VEGF, fattore di crescita endoteliale vascolare (da Chow et al., 2022).

2.2.2 Tessuto adiposo

L'esercizio facilita la lipolisi del tessuto adiposo bianco (WAT) e fornisce acidi grassi liberi per l'utilizzo come carburante. Anche se questa lipolisi è stata attribuita al rilascio di adrenalina, l'esercizio acuto nell'uomo rilascia anche molecole aggiuntive, come il fattore 15 di crescita e differenziazione (GDF15) e IL-6, che influenza anche la lipolisi.

Un effetto potenziale dell'esercizio sul tessuto adiposo bianco è l'imbrunimento, in cui in questo tessuto aumenta il contenuto mitocondriale, il tasso metabolico e la produzione di calore. L'imbrunimento del tessuto adiposo bianco dovrebbe avere un'importanza metabolica, poiché individui con tessuto adiposo bruno avevano un decremento della prevalenza della malattia cardiometabolica, in particolare se erano in sovrappeso od obesi. In un modello di topo, la fibronectina di tipo terzo veniva scissa nella cellula muscolare e secreta come irisina, la quale induceva l'imbrunimento del tessuto adiposo bianco per aumentare la spesa energetica e di conseguenza ridurre l'obesità.

Uno studio ha constatato che i topi transgenici, i quali sovraesprimevano nel muscolo il *peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1-α* (PGC1α), avevano livelli circolanti più alti di irisina e aumentato imbrunimento del tessuto adiposo bianco rispetto ai topi di controllo. Con l'esercizio aumenta nel muscolo l'espressione del PGC1α nei modelli sia animali sia umani. C'è stato un iniziale entusiasmo riguardo l'irisina come un'exerchina, ma quando le evidenze sull'irisina e sull'imbrunimento del tessuto adiposo bianco indotto dall'esercizio sono state rivalutate nell'uomo, l'iniziale eccitazione è stata, di conseguenza, temperata.

Anche se l'esercizio acuto nell'uomo generalmente aumenta i livelli plasmatici di irisina, l'effetto dell'allenamento con un esercizio cronico rimane altamente variabile. Una metanalisi di diversi studi randomizzati controllati mostrava persino livelli più bassi di irisina dopo l'allenamento rispetto a prima dell'allenamento. Atleti allenati hanno una più bassa attività del tessuto adiposo bruno e nessuna differenza nei marcatori dell'imbrunimento nel tessuto adiposo bianco comparati con soggetti magri sedentari; questa osservazione è stata supportata da uno studio nell'uomo sull'allenamento con esercizio cronico, il quale non ha trovato nessun imbrunimento del tessuto adiposo bianco (accertato da biopsia). Perciò, se l'esercizio possa imbrunire il tessuto adiposo bianco negli uomini, specialmente attraverso una via mediata dall'irisina, rimane controverso.

Il tessuto adiposo può anche secernere exerchine. Un primo esempio è l'acido 12,13-diidroxi-9-Z-ottadecenoico (12,13-diHOME), il quale è secreto dal tessuto adiposo bruno e aumenta la capacità ossidativa del muscolo scheletrico. Nell'uomo, livelli circolanti di 12,13-diHOME sono inversamente associati con la massa del tessuto adiposo, i livelli ematici a digiuno di insulina e i livelli nel sangue dei triacilgliceroli. Uno studio del 2021 mostrava che il trapianto di tessuto adiposo bruno nei topi aumentava i livelli plasmatici di 12,13-diHOME e migliorava l'emodinamica cardiaca. Queste scoperte suggeriscono che un incremento sostenuto nei livelli plasmatici di 12,13-diHOME preserva la funzione cardiaca, il rimodellamento e aumenta l'emodinamica cardiaca attraverso un effetto diretto sul cardiomiocita. Queste scoperte sono state rinforzate dall'osservazione nell'uomo, dove la presenza della malattia cardiovascolare è stata associata con una diminuzione plasmatica dei livelli di 12,13-diHOME.

Il muscolo scheletrico può influenzare la risposta del tessuto adiposo all'esercizio tramite la secrezione del lattato. Un esempio di exerchina è il fattore trasformante di crescita $\beta 2$ (TGF $\beta 2$). In un modello di topo, l'esposizione specifica al lattato *in vitro* e *in vivo* ha aumentato negli adipociti l'espressione di TGF $\beta 2$. Inoltre, lo stesso studio ha evidenziato in un modello di topo di esercizio cronico che l'aumento negli adipociti dei livelli dell'espressione e della secrezione di TGF $\beta 2$ è associato con miglioramenti nel metabolismo del glucosio, nell'ossidazione lipidica e a una possibile riduzione dell'infiammazione nel tessuto adiposo. Scoperte parallele sono state anche osservate negli umani impegnati nell'esercizio cronico, anche se a un livello minore rispetto alle osservazioni nel modello animale.

2.2.3 Muscolo scheletrico

Il muscolo scheletrico rappresenta approssimativamente un terzo della massa corporea e ha un importante ruolo nell'esercizio. Le esercine hanno dimostrato la capacità di migliorare la funzione e la crescita del muscolo scheletrico. Le esercine coinvolte nella crescita e nello sviluppo del muscolo sono IL-7, IL-15, follistatina, fattore inibitorio della leucemia, sindecano 4 e miostatina. Un altro esempio di miochina che modula la funzione muscolare è l'apelina.

In modelli umani e animali, l'esercizio aumenta nel muscolo i livelli di mRNA e di apelina e forse i livelli sierici di apelina. In un modello animale, il muscolo scheletrico serviva come una fonte di secrezione dell'apelina, la quale migliorava la funzione del muscolo scheletrico in condizioni di invecchiamento, supportando il potenziale dell'apelina come terapeutico per combattere la sarcopenia correlata all'età. In particolare, nei topi anziani, l'esposizione aumentata all'apelina (tramite un'iniezione quotidiana o una sovraespressione nel muscolo scheletrico) stimolava la biogenesi mitocondriale nel muscolo, la sintesi delle proteine muscolari e l'attivazione delle cellule staminali del muscolo per stimolare la rigenerazione muscolare. Il 12,13-diHOME è una batochina, con effetti muscolari. In modelli umani e di topo, l'esercizio facilita nel tessuto adiposo bruno la secrezione del 12,13-di HOME, che attiva l'*uptake* nel muscolo scheletrico degli acidi grassi liberi e l'ossidazione. Anche le epatochine follistatina e fetuina-A modulano la funzione muscolare. Per esempio, in modelli umani e di topo, l'esercizio acuto e l'esercizio cronico aumentano la follistatina secreta dal fegato, che antagonizza gli effetti della miostatina. La diminuita funzione della miostatina attiva la crescita del muscolo scheletrico e migliora il controllo glicemico di tutto il corpo.

Invece, la fetuina-A peggiora la resistenza periferica all'insulina. Nell'uomo, l'esercizio acuto non altera i livelli plasmatici di fetuina-A; invece, con l'esercizio cronico dovrebbero diminuire i livelli plasmatici di questa esercina.

2.2.4 Fegato e Intestino

Il fegato è riconosciuto come una fonte per molte proteine circolanti e sono state identificate circa 2500 proteine epatiche secrete. Non sorprende che il fegato sia la fonte di molte citochine responsive all'esercizio acuto. Queste citochine modulano il metabolismo del glucosio e/o lipidico (per esempio, *angiopoietin-like protein 4* nei modelli umani e animali), l'imbrunimento del tessuto adiposo bianco (FGF21 nel modello di topo), la lipolisi (FGF21 nel modello umano e animale) e il mantenimento dell'omeostasi cellulare (*heat shock protein 72* nell'uomo). L'esercizio riduce la steatosi epatica indipendentemente dalla perdita di peso.

L'esercizio altera anche il microbioma intestinale e i meccanismi includono le alterazioni dell'espressione genica dei linfociti intraepiteliali per un profilo infiammatorio più favorevole, la modulazione del flusso sanguigno nell'intestino o il cambiamento dell'escrezione degli acidi biliari. L'esercizio cronico nei modelli umani e animali altera la composizione e la capacità funzionale del microbiota intestinale, indipendentemente dalla dieta; questi cambiamenti dipendenti dall'esercizio nel microbiota dovrebbero essere indipendenti dal peso ma dipendenti dall'intensità dell'esercizio, dalla modalità e dal mantenimento. Nell'uomo, l'esercizio cronico ha alterato il microbioma intestinale per aumentare la disponibilità degli acidi grassi a corta catena, in particolare il butirato.

2.2.5 Sistema endocrino

L'esercizio ha indotto benefici nel miglioramento della disglucemia e sono presenti delle citochine che modulano l'omeostasi del glucosio. La fractalchina è una chemochina che regola favorevolmente la secrezione dell'insulina stimolata dal glucosio aumentando la funzione delle cellule β . Dei dati limitati sull'uomo mostrano che un periodo di esercizio acuto aumenta nel plasma i livelli dell'espressione muscolare della fractalchina. Con l'esercizio cronico, nell'uomo si riducono anche i livelli circolanti di fetuina-A e, come indicato nella Tabella 2,

l'azione biologica principale della fetuina è quella di aumentare la resistenza all'insulina. Nell'uomo, i livelli circolanti dell'acido β -aminoisobutirrico (BAIBA) aumentavano con l'allenamento cronico ed erano inversamente correlati con l'insulino-resistenza.

Nell'uomo i livelli circolanti di follistatina aumentano sia con l'esercizio acuto sia con quello cronico. Sono stati osservati dei miglioramenti nel HbA_{1c}, dopo la chirurgia bariatrica, con livelli ridotti di follistatina. Inoltre, l'inattivazione della follistatina epatica, in un modello di topo, migliorava la sensibilità del tessuto adiposo bianco e riduceva la produzione epatica di glucosio.

La miochina IL-6 è anche associata ad alterazioni favorevoli nell'omeostasi del glucosio. Nell'uomo, l'infusione di IL-6 ritarda lo svuotamento gastrico e abbassa i livelli del glucosio postprandiale. Nei roditori, l'aumento di IL-6 tramite l'esercizio o un'iniezione di IL-6, incrementa la produzione del *glucagon-like peptide 1* per innalzare la secrezione di insulina stimolata dal glucosio. Questi benefici di IL-6 nell'accrescere la secrezione di insulina sono stati osservati in modelli multipli di roditori di *T2DM*. Negli studi sull'uomo, relativi all'infusione di IL-6, ci sono dei dati conflittuali se IL-6 stimoli la lipolisi e l'ossidazione lipidica. Infatti, uno studio nell'uomo aveva evidenziato che IL-6 stimolava la lipolisi e l'ossidazione lipidica, invece l'altro studio sosteneva che negli umani in salute non c'era alterazione della lipolisi o dell'ossidazione lipidica.

Tabella 2. Esempi di esercizie che modulano il sistema cardiometabolico

Name	Species or model ^a	Main tissue of origin	Main target tissue	Effect ^b	Main biological action	Response to acute exercise bout ^c	Response to chronic training ^c	Refs
12,13-diHOME	H, A, C	BAT	BAT, skeletal muscle, heart	A, E	Increases fatty acid uptake	↑	↑	91,93, 169
Adiponectin	H, A, C	WAT	Many tissues, including liver, muscle, heart	A, P, E	Enhances glucose and lipid utilization	↑	↑,↔	58,153, 186
Angiopietin I	H, A, C	Skeletal muscle	Vasculature	P	Enhances angiogenesis	↑,↔	↑,↓	47,68, 69
Angiopietin-like protein 4	H, A	Liver,	WAT	E	Decreases lipoprotein lipase activity and enhance WAT lipolysis to increase plasma FFAs and triglycerides	↑	↑,↔	39,68, 79
Apelin	H, A, C	WAT, skeletal muscle	Skeletal muscle,	A, E	Enhances skeletal muscle mass and mitochondria	↑	↑,↔	94-96
BAIBA	H, A, C	Skeletal muscle	WAT, Liver, β-cells	E, P	Enhances 'browning' of white adipocytes and β-oxidation in liver; attenuates insulin secretion from β-cells	↑	↑	55,113, 187
Catecholamines	H	Adrenal	Skeletal muscle, WAT	E	Stimulates glycogenolysis; stimulates lipolysis of WAT	↑	↔	40
Fetuin-A	H	Liver	Skeletal muscle, pancreas	E	Impedes β-cell function; increases insulin resistance	↓,↔	↓	39,72, 97,101, 115
Fractalkine (also known as CX3CL1)	H, A, C	Skeletal muscle	Leukocytes, endothelium, myocytes, β-cells	P, E	Increases inflammatory, angiogenic, and chemotactic factors; regulates β-cell secretion	↑	↔	66,70, 71,114
FGF21	H, A	Many tissues, especially liver; also WAT	Many tissues, including heart and WAT	E, A, P	Augments fuel utilization (glucose, lipid); protects from apoptosis	↑	↔	56,72, 73,106, 172,188
Follistatin	H, A	Many tissues, especially liver	Skeletal muscle	E	Decreases serum levels of myostatin to enhance skeletal muscle growth; might affect glucose homeostasis	↑	↑	39,97, 98,100, 116,189
GDF15	H, A	Many sites	Many sites	E	Marker of stress response, promotes WAT lipolysis	↑	↑	80,190
HSP72	H, A	Many tissues, especially liver	Many sites	A, E	Maintains cellular homeostasis; protects cells from stress	↑	↑	107,173
IL-6	H, A, C	Primarily skeletal muscle	Many sites	A, P, E	Multiple effects: including enhancing WAT lipolysis; lipid oxidation; glucose homeostasis; anti-inflammatory response; skeletal muscle growth	↑	↓	15,16, 30,7883, 119-121
IL-7	H, A, C	Skeletal muscle	Skeletal muscle, bone	A, P	Regulates skeletal muscle development	↑	↔	102,191
IL-8	H, A, C	Skeletal muscle	Endothelium	P	Regulates tissue angiogenesis and blood flow	↑,↔	↔	48,50, 74
IL-15	H, A, C	Many tissues, especially immune cells	Many tissues, especially immune cells	A, P, E	Regulates immune cell functioning and might reduce WAT mass; improves glucose homeostasis; promotes skeletal muscle growth	↑,↔	↔	57,99, 174
Irisin (also known as FNDC5)	H, A	Skeletal muscle	WAT, bone, β-cells, brain	E	Benefits primarily in animal models: increases fatty acid uptake; beiging of WAT; improves insulin secretion	↑	↓,↔	84,117, 167
Lactate	H	Skeletal muscle	Many tissues, including central nervous	A, E	Provides substrate for hepatic gluconeogenesis	↑	↔	41,175

Tabella 2 (da Chow et al., 2022)

Name	Species or model ^a	Main tissue of origin	Main target tissue	Effect ^b	Main biological action	Response to acute exercise bout ^c	Response to chronic training ^c	Refs
METRNL	H, A, C	Many tissues, including WAT and skeletal muscle	Immune cells	E	Increases energy expenditure; improves glucose tolerance	↑	↑	134,192, 193
Myonectin (CTRP15)	H, A	Skeletal muscle	Liver, WAT, heart	E	Promotes fatty acid uptake; might be cardioprotective	↑,↔	↔	27,75, 82,194
Musclin (also known as osteocrin)	H, A, C	Skeletal muscle, bone, brain	Skeletal muscle, heart, vasculature, cartilage, brain	A, P, E	Regulates mitochondrial biogenesis and might exacerbate insulin resistance	↑	↓	27,43, 176,195
Myostatin (also known as GDF8)	H, A, C	Many tissues, especially skeletal muscle and WAT	Many tissues, especially skeletal muscle and bone	A, P, E	Blunts skeletal muscle growth and glucose uptake	↑,↔	↔	44,73, 99,189
SPARC	H, A, C	Many tissues	Many tissues	A, P, E	Regulates cell function and tissue remodelling	↑,↔	↔	63,181
SDC4	H	Many tissues	Immune system	A, P, E	Involved in cell-extracellular matrix crosstalk, inflammation and skeletal muscle growth	↑	↑	104,185, 196,197
TGFβ1	H, A, C	Many tissues	Many tissues especially immune cells	A, P, E	Chemotactic factor for immune cells; affects skeletal muscle growth	↑	↑	64,65, 182,198, 199
TGFβ2	H, A, C	Adipose tissue	Many tissues, especially muscle and immune cells	P, E	Promotes glucose and fatty acid metabolism; reduces inflammation	↑	↑	42
VEGF	H, A, C	Many tissues, especially skeletal muscle	Vascular endothelium	P, E	Promotes angiogenesis and exercise-induced neurogenesis	↑,↔	↑	27,45, 46

12,13-diHOME, 12,13-dihydroxy-9Z-octadecenoic acid; BAIBA, β-aminoisobutyric acid; BAT, brown adipose tissue; CTRP15, complement C1q tumour necrosis factor-related protein 15; CX3CL1, chemokine (C-X3-C motif) ligand 1; FFAs, free fatty acids; FGF21, fibroblast growth factor 21; FNDC5, fibronectin type III domain containing 5; GDF8, growth and differentiation factor 8; GDF15, growth and differentiation factor 15; HSP72, heat shock protein 72; METRNL, meteorin-like; SDC4, syndecan 4; SPARC, secreted protein acidic and cysteine rich; TGFβ1, transforming growth factor-β1; TGFβ2, transforming growth factor-β2; VEGF, vascular endothelial growth factor; WAT, white adipose tissue. ^aRelevant species or models are human (H), animal (A) or cell (C). ^bEffects are autocrine (A), paracrine (P) or endocrine (E). ^cArrows indicate: ↑, plasma levels increase; ↓, plasma levels decrease; ↔, plasma levels remain the same.

Tabella 2 (da Chow et al., 2022)

2.2.6 Sistema immunitario

Nell'uomo, un periodo acuto di esercizio dovrebbe essere inizialmente pro-infiammatorio, ma successivamente questo effetto è compensato da una risposta antiinfiammatoria. L'aumento acuto indotto dall'esercizio dei livelli circolanti di IL-6 aumenta i livelli plasmatici delle citochine antinfiammatorie, quali IL-1RA (*IL-1 receptor antagonist*) e IL-10. IL-1RA inibisce la trasduzione del segnale di IL-1β, mentre IL-10 inibisce la produzione delle citochine pro-infiammatorie, come TNF (*tumour necrosis factor*). Un periodo di esercizio acuto induce effetti antiinfiammatori che dovrebbero essere mediati in parte da IL-6, possibilmente in congiunzione con altri fattori antiinfiammatori conosciuti, quali adrenalina e

cortisolo. Anche se IL-6 è aumentata transitoriamente dopo un esercizio acuto, la linea basale (o “a riposo”) dei livelli circolanti di IL-6 sono più bassi nei soggetti allenati rispetto a quanto si osserva in quelli non allenati (Figura 4).

Una frontiera emergente nella biologia dell’esercizio comprende gli effetti immunitari indotti dalle esercchine nell’aumento della resilienza al cancro o come coadiuvanti nella terapia del cancro. L’esercizio acuto crea un ambiente unico di esercchine che dura diverse ore dopo la cessazione dell’esercizio, il quale fornisce una finestra temporale per la stimolazione della funzione immunitaria. Per questa ragione, l’esercizio potrebbe potenzialmente servire come un trattamento coadiuvante per la terapia contro il cancro. Nei modelli di topo portatori di un tumore (attraverso 5 modelli tumorali), i topi che avevano intrapreso volontariamente la corsa sulla ruota avevano una riduzione di più del 60% dell’incidenza e della crescita tumorale comparata con i topi sedentari. Analisi ulteriori di questi modelli di topo mostravano che l’adrenalina e IL-6 inducevano la mobilitazione e la redistribuzione delle cellule natural killer e l’infiltrazione nel tumore per inibirne la crescita. In modelli umani e animali l’esercizio è stato associato alla secrezione aumentata della proteina acida secreta e ricca in cisteina (SPARC), una proteina che regola la funzione cellulare e il rimodellamento tessutale, inibendo la proliferazione e promuovendo l’apoptosi di una linea cellulare murina di cancro al colon.

Esiste un *crosstalk* tra il muscolo scheletrico e il sistema immunitario. Attualmente, si considera il muscolo scheletrico come un organo immunoregolatorio che influenza specialmente il traffico dei linfociti e dei neutrofili e l’infiammazione. Durante l’esercizio acuto, le cellule immunitarie sono mobilitate tramite la secrezione muscolare delle esercchine, come la fractalchina, per attivare la rigenerazione (nell’uomo) o *meteorin-like* (METRNL) per incrementare la termogenesi del tessuto adiposo beige (modello animale).

IL-13 è un’importante citochina delle cellule T helper 2 (T_H2) che media la polarizzazione antinfiammatoria dei macrofagi residenti nel tessuto adiposo

bianco. IL-13 è anche un'exercina, che aumenta nella circolazione dopo l'allenamento nell'uomo e nei topi. Topi privi di IL-13 mostrano una capacità di corsa ridotta e non mostrano certi effetti benefici dell'allenamento, quali il miglioramento della tolleranza al glucosio e la capacità di resistenza nel correre. Al contrario di IL-6, IL-13 è prodotta dalle cellule linfoidi innate di tipo 2 (*ILC2s*) nel muscolo scheletrico. I topi privi di IL-13 mostrano un difetto nell'utilizzo nel muscolo degli acidi grassi dopo l'esercizio acuto e non dimostrano un aumento della biogenesi mitocondriale muscolare dopo l'esercizio cronico. *ILC2* e le citochine delle cellule T_H2 controllano anche il reclutamento degli adipociti beige nei roditori. Gli stimoli nel muscolo scheletrico o nel tessuto adiposo bianco che attivano le *ILC2s* durante l'esercizio restano da essere identificati.

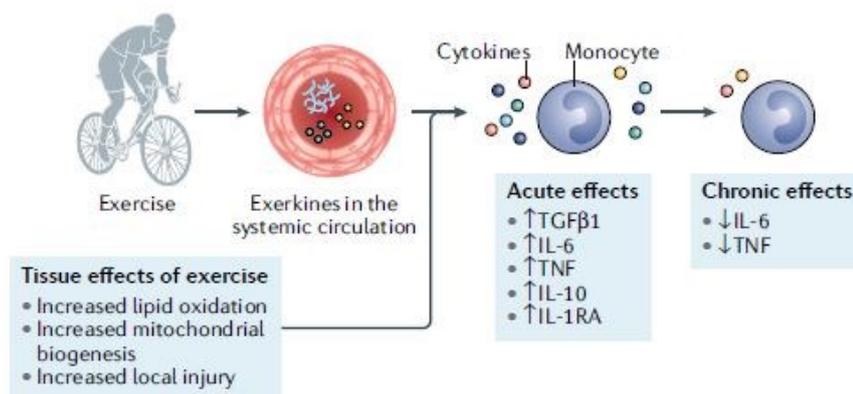


Figura 4. Effetti dell'esercizio sul sistema immunitario

L'esercizio induce ossidazione lipidica, biogenesi mitocondriale e danno locale, che stimola il rilascio di exercine nella circolazione e influenza il sistema immunitario. Le exercine sono proteine (linee blu), metaboliti (cerchi gialli) e vescicole extracellulari (cerchi verdi), che hanno una moltitudine di effetti sul sistema immunitario (genericamente rappresentato da un monocita). In acuto, l'esercizio aumenta le citochine quali i livelli circolanti del TGFβ1 e IL-6 relativi allo stato di riposo. Questo cambiamento risulta in un'inflammatione acuta, caratterizzata da un aumento del TNF e IL-6. Una volta che gli effetti indotti dall'esercizio acuto sono diminuiti, un aumento delle citochine antinfiammatorie (IL-10 e IL-1RA) si verifica in risposta alla risposta infiammatoria acuta. L'allenamento cronico è associato a una riduzione nell'inflammatione sistemica e tissutale, caratterizzata da minori livelli circolanti di TNF e IL-6 nello stato di riposo, relativo a individui sedentari. La riduzione della resistenza all'insulina e della crescita tumorale è stata attribuita agli effetti dell'allenamento cronico sulla diminuzione dell'inflammatione sistemica e/o tissutale (da Chow et al., 2022).

2.2.7 Sistema nervoso

L'esercizio è una promettente strategia non farmacologica per mantenere e migliorare la funzione cerebrale (Figura 5). Gli effetti dell'esercizio sul cervello sono più evidenti nell'ippocampo, una parte del cervello coinvolta nell'apprendimento e nella memoria.

Negli adulti anziani (età 55-80 anni), la partecipazione a un programma di camminata aerobica aveva aumentato il volume ippocampale e migliorava la memoria. Negli studi sull'uomo, l'evidenza suggerisce che l'attività fisica può prevenire o ritardare l'inizio delle condizioni neurodegenerative. Nell'uomo, l'esercizio acuto aumenta i livelli plasmatici del fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF), mentre l'allenamento cronico ha mostrato di non alterare, aumentare, o persino diminuire i livelli plasmatici di BDNF. Nei roditori, l'esercizio cronico sovra regola il BDNF nell'ippocampo, che è essenziale per la neurogenesi ippocampale degli adulti e la plasticità neurale. L'esercizio cronico nei roditori aumenta anche la plasticità sinaptica ippocampale, la neurogenesi negli adulti, i livelli di neurotrofine, e anche la funzione della memoria. Inoltre, nei roditori che correvano volontariamente sulla ruota aumentava il numero dei nuovi neuroni ippocampali, si potenziava la maturazione morfologica, come la ramificazione dendritica e la densità delle spine, e si alteravano le connessioni dei nuovi neuroni.

Nei 20 anni passati, i ricercatori hanno iniziato a testare l'ipotesi che i metaboliti, peptidi e proteine rilasciate dal fegato, adipociti, cellule del sangue (in particolare piastrine) e muscolo potrebbero influenzare il sistema nervoso centrale. Fin dal 2020, diversi studi hanno trasferito il plasma degli animali allenati all'interno degli animali sedentari, con miglioramenti nella funzione cognitiva, supportando la presenza di un fattore trasferibile nel miglioramento della funzione cognitiva. I fattori rilasciati dal tessuto non neuronale e veicolati al cervello tramite la vascolarizzazione potrebbero avere ruoli importanti nella plasticità sinaptica, funzione mnemonica e regolazione dell'umore. L'adiponectina è una proteina secreta dagli adipociti che sembra avere effetti neuroprotettivi, in aggiunta ai suoi

effetti insulino-sensibilizzanti, antinfiammatori e anti-aterogenici. Nei topi è stato dimostrato che l'adiponectina passa attraverso la barriera emato-encefalica ed è stata associata con l'aumentata neurogenesi e la riduzione di comportamenti analoghi alla depressione. Tuttavia, possono esistere delle discrepanze tra i livelli plasmatici di adiponectina e i livelli del fluido cerebrospinale.

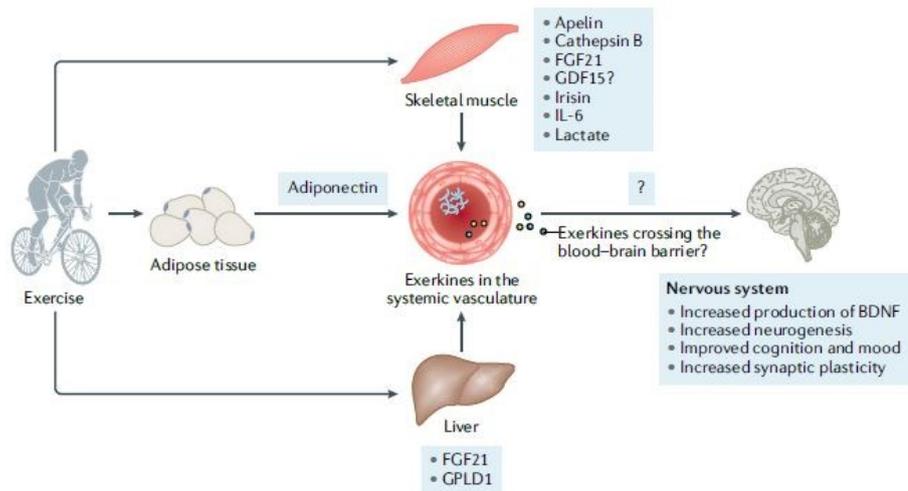


Figura 5. Effetti dell'esercizio sul sistema nervoso.

L'esercizio stimola la produzione di exerkine dai tessuti, quali: muscolo scheletrico, tessuto adiposo o epatico per modulare il sistema nervoso. Queste exerkine vengono rilasciate dentro la circolazione e includono proteine (linea blu), metaboliti (cerchi gialli) e vescicole extracellulari (cerchi verdi), che hanno una moltitudine di effetti presunti sul sistema nervoso. Questi effetti includono l'aumento della produzione del BDNF, l'attivazione della neurogenesi (anche negli adulti), la cognizione, l'umore e la plasticità sinaptica. L'entità con cui le exerkine passano la barriera emato-encefalica per esercitare i loro effetti rimane sconosciuta, indicata con il punto di domanda. C'è un'incertezza sul GDF15, poiché il GDF15 esogeno inibisce l'appetito e riduce l'attività, mentre l'induzione fisiologica del GDF15 tramite l'esercizio non fa questo. FGF21, fattore di crescita dei fibroblasti 21; GDF15, fattore di crescita e differenziazione 15; GPLD1, glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D1 (da Chow et al., 2022).

2.2.8 Osso

L'esercizio, specialmente quello di resistenza, aumenta la densità minerale ossea. I fattori derivati dall'osso associati all'esercizio che riguardano la formazione ossea includono TGF β 1 e sclerostina. La sclerostina inibisce la formazione ossea e i suoi livelli nel sangue sono più bassi nei soggetti umani altamente attivi rispetto a quelli sedentari. Esiste un *crosstalk* tra osso e muscolo probabilmente mediato da fattori secretori. Le miochine che hanno effetti sull'osso includono: apelina, miostatina, irisina, IL-6, IL-7 e BAIBA.

2.3 Crosstalk

2.3.1 Muscolo-cervello

Le miochine sembrano avere un ruolo importante nella neurogenesi ippocampale (modello animale) e nei livelli delle neurotrofine (modello animale), nel potenziamento della cognizione e dell'umore (modello animale e umano). È stato visto che nei topi, aumentando l'espressione intrinseca di irisina nei neuroni o incrementando i livelli plasmatici di questa exerchina, si innalza l'espressione ippocampale del gene *Bdnf*. La somministrazione dell'irisina in un modello di topo con malattia di Alzheimer migliora la plasticità sinaptica e la funzione mnemonica. Nei modelli animali e umani, i livelli plasmatici di catepsina B, una proteasi lisosomiale prodotta dal muscolo, sono stati associati positivamente con la memoria dipendente dall'ippocampo. Degli studi nell'uomo hanno dimostrato che l'esercizio cronico incrementa i livelli nel plasma della catepsina B, mentre in quello acuto ciò non si verifica. Invece, con l'esercizio acuto aumentano i livelli plasmatici di BDNF, ma questo non avviene con l'esercizio cronico.

2.3.2 Fegato-cervello

Il fegato secerne fattori che sono importanti per la funzione cerebrale. La Kinurenina è un metabolita dell'aminoacido L-triptofano ed è sintetizzata primariamente nel fegato. Nei topi e nell'uomo, l'allenamento aerobico cronico aumenta l'espressione nel muscolo della kinurenina aminotransferasi, la quale facilita la conversione della kinurenina nell'acido kinurenico, un metabolita che è incapace di attraversare la barriera emato-encefalica. Questo cambiamento nel metabolismo della kinurenina è in grado di proteggere il cervello dalla depressione indotta dallo stress.

Scambiando il plasma dei topi anziani che si sono esercitati, con i topi anziani sedentari si attiva la neurogenesi ippocampale adulta e la funzione della memoria. Subito dopo, un'ulteriore indagine ha condotto all'identificazione di una nuova epatochina, la *glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D1* (GPLD1), la quale aumenta dopo l'esercizio e si correla con una funzione cognitiva migliorata nei topi anziani. Queste scoperte sono supportate nell'uomo, poiché le concentrazioni di GPLD1 nel sangue erano più elevate negli adulti anziani attivi e in salute rispetto alla controparte sedentaria. Studi sui meccanismi sottostanti indicano che GPLD1 non attraversa la barriera ematoencefalica. Sono necessari studi aggiuntivi sull'esercizio per apprezzare meglio l'asse esercizio-fegato-cervello.

2.4 Potenzialità

Non tutti gli individui sono in grado di beneficiare dell'esercizio a causa di limitazioni fisiche, quali la paraplegia o le limitazioni imposte, come la quarantena durante la pandemia COVID-19. A mano a mano che il ruolo delle exerchine e dei loro effetti biologici è sempre più chiarito, le exerchine potrebbero potenzialmente essere sfruttate per imitare i benefici dell'esercizio negli individui,

che sono limitati nella loro capacità di esercizio, o a controbilanciare una non risposta metabolica. Anche se questo “esercizio in pillola” sia al momento una speranza, rimane un obiettivo allettante per le direzioni future della ricerca.

Molte exerchine, le loro fonti, i bersagli e i meccanismi, rimangono da essere scoperte e, in aggiunta alle scoperte molecolari, è necessario stabilire il dosaggio e il tipo di esercizio necessario a ottenere esiti positivi sulla salute. La conoscenza degli effetti e dei miglioramenti relativi all’esercizio è essenziale per la comprensione della resilienza e questa conoscenza fornirà nuove opportunità di ricerca per lo sviluppo di interventi innovativi e mirati che mantengano o attivino la resilienza e perciò promuovano l’invecchiamento in salute, e anche interventi che prevengano e trattino le comorbidità e le malattie croniche.

La tecnologia indossabile potrebbe fornire preziose informazioni riguardo ai livelli di attività fisica e la capacità di esercizio durante e dopo la malattia COVID-19 e il suo recupero, arricchendo la descrizione delle complicazioni post-acute dell’infezione SARS-COV-2. Attualmente, dispositivi non invasivi e mininvasivi consentono il monitoraggio del battito cardiaco, attività elettrica del cuore (ECG), temperatura corporea, attività fisica e comportamento sedentario, saturazione periferica dell’ossigeno del sangue e concentrazione ematica di glucosio. Questi dispositivi permettono il monitoraggio in tempo reale degli effetti dell’esercizio in condizioni naturali e controllate. Inoltre, queste misurazioni combinate con quelle molecolari (livelli di exerchine) hanno il potenziale di migliorare molto la comprensione degli adattamenti all’esercizio.

Esiste la necessità di spostarsi dal punto di vista “muscolo scheletrico centrico” e focalizzarsi di più sul ruolo delle exerchine nella comunicazione inter-organo, nella rigenerazione tissutale, nell’immunoregolazione, nell’adattamento metabolico, nella salute psicologica e, in generale, nella salute nel corso della vita.

2.5 Lacune

Anche riguardo ai dispositivi indossabili, numerose sfide rimangono nell'interpretazione dei dati e delle analisi. Inoltre, se un dispositivo non rileva un'attività fisica, una spiegazione potrebbe essere la carenza del movimento o la rimozione del dispositivo.

Rimangono quesiti controversi che mitigano l'entusiasmo sulle *exerchine* e che includono: la mancanza di consistenza tra la risposta all'esercizio acuto e cronico, le discrepanze tra i modelli di esercizio umani e animali e i problemi nell'interpretazione dei cambiamenti dovuti alla variabilità negli esiti e nel campionamento.

Inoltre, per le analisi delle vescicole extracellulari, è cruciale una considerazione attenta degli *step* pre-analitici, quali una corretta raccolta e isolamento. Anche la contaminazione al tempo della raccolta necessita di essere considerata, in quanto le vescicole extracellulari possono comparire *ex vivo* dall'attivazione piastrinica.

CAPITOLO 3

Le informazioni presenti in questo capitolo provengono dalla *Review* di Magliulo et al. (2022).

Nel capitolo 3 verranno descritte le principali evidenze sulle “nuove exerchine”, scoperte negli ultimi tre anni, indicate nella Figura 6, e che stanno aprendo la strada per nuovi approfondimenti sulla fisiologia e potenziali strategie mediche.

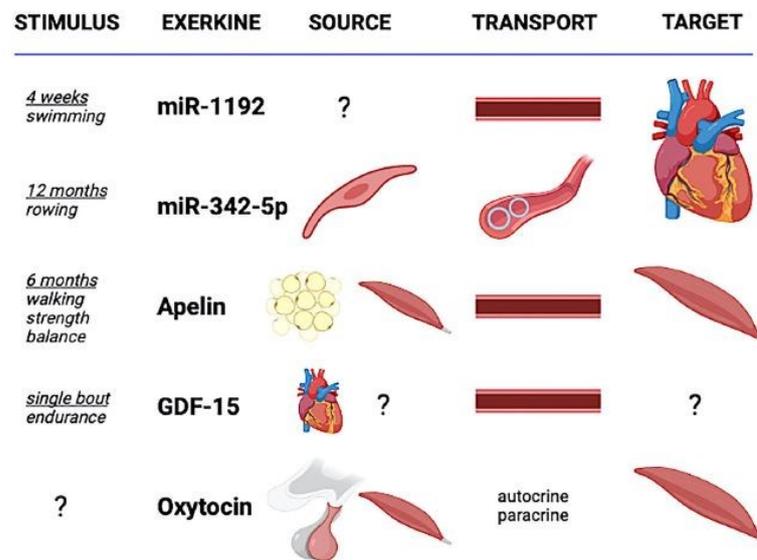


Figura 6. Descrizione grafica delle cinque nuove exerchine. La fonte del rilascio di miR-1192 è ancora sotto dibattito; miR-342-5p viene rilasciato dalle cellule endoteliali vascolari e immesso nelle vescicole circolanti; l'apelina viene rilasciata dalle cellule adipose e muscolari; l'ossitocina viene rilasciata dalla neuroipofisi e dalle cellule muscolari, e sembra agire attraverso processi autocrini e paracrini; GDF-15 viene rilasciato dal cuore e forse da altre fonti, ma non dai muscoli. miR-1192, apelina e GDF-15 vengono trasportati dal flusso sanguigno. Il bersaglio principale di miR-1192 e miR-342-5p è il cuore, quello di apelina e ossitocina è il muscolo, mentre il bersaglio di GDF-15 non è chiarito (da Magliulo et al., 2022).

3.1 I miRna

Sono stati raccolti molti dati, negli ultimi 30 anni, su una “classe relativamente nuova” di RNA chiamata microRNA (*miRNAs*). I miRNA sono piccoli RNA non codificanti che sono emersi come agenti potenti che controllano l'espressione di un gruppo di geni e portano alla regolazione post-trascrizionale. Questi miRNA

sono rilasciati da diversi tipi di cellule, direttamente nel flusso dei fluidi corporei o inclusi in vescicole quali le nanovesicole, agendo come importanti comunicatori intercellulari.

Diversi studi hanno riportato l'associazione dei cambiamenti nei livelli di miRNA circolanti in molte malattie (apparendo come dei biomarcatori clinici promettenti), ma anche come conseguenze di adattamento fisiologico agli stimoli, per esempio durante l'esercizio. I miRNA sono differenzialmente espressi dopo l'attività fisica sia nell'uomo sia negli animali. I miRNA circolanti sono coinvolti nell'angiogenesi, nella rigenerazione neuronale e nel metabolismo. Una grande quantità di miRNA modula gli adattamenti cardiovascolari correlati all'esercizio, mentre altri regolano l'ipertrofia muscolare e la rigenerazione.

3.2 Vescicole extracellulari

Le esercine possono essere secrete direttamente nella circolazione o possono essere trasportate da vescicole extracellulari (EVs) come gli esosomi. È stato ipotizzato che molte esercine dovrebbero essere contenute in vescicole extracellulari. È stato osservato che le EVs giocano un importante ruolo nella mediazione della comunicazione tra cellula e cellula e nella connessione tra gli organi tramite trasmissione di una varietà di molecole segnale, quali proteine, mRNA, citochine, metaboliti, molti dei quali sono modulati differenzialmente durante l'esercizio. Il carico delle vescicole extracellulari cambia in relazione alle attività fisiche, dipendendo anche dal tipo di esercizio (per esempio, aerobico contro anaerobico).

Negli ultimi 30 anni, gli studi hanno provato a spiegare il ruolo delle vescicole extracellulari nella comunicazione mediata dall'esercizio con un particolare focus sul muscolo scheletrico: è stato dimostrato che il rilascio delle vescicole extracellulari è mediato dalla concentrazione di calcio nelle cellule. Durante l'esercizio, a causa del rilascio massiccio di calcio dal reticolo sarcoplasmatico,

dopo la stimolazione da parte del motoneurone sulle fibre del muscolo scheletrico, la maggior parte delle vescicole extracellulari viene rilasciata dalle cellule muscolari.

3.3 miR-1192

miR-1192 può essere considerato una nuova exercina per la protezione cardiaca. Viene rilasciato dai muscoli e dal miocardio nella circolazione e modula l'effetto cardioprotettivo nei topi allenati.

Nella Tabella 3 sono riportati i principali studi sulle cinque exercine considerate in questo capitolo. Per quanto riguarda miR-1192, viene preso in considerazione il lavoro di Wang et al. in cui è stato scoperto che l'allenamento di 4 settimane di nuoto esercitava nei topi un effetto protettivo contro l'infarto miocardico. Dalle analisi del plasma, sono stati trovati dieci miRNA differenzialmente espressi. Tra loro, miR-1192 era aumentato dopo l'esercizio ed esercitava un effetto protettivo significativo contro l'ipossia nei cardiomiociti neonatali coltivati attraverso la modulazione della Caspasi 3. Per valutare la capacità protettiva effettiva di miRNA-1192, nello stesso lavoro, è stato valutato anche l'effetto dell'iniezione di agomiR-1192, che esercitava un'azione cardioprotettiva simile, mentre l'inibizione di quel miRNA aboliva l'effetto cardioprotettivo dell'esercizio nell'infarto miocardico.

Gli studi precedenti avevano mostrato l'effetto cardioprotettivo di altri miRNA correlati all'esercizio.

Tabella 3. Recenti sviluppi nelle scoperte sulle exerchine (da Magliulo et al., 2022).

Study	Exerkine	Condition	Source	Transport	Effect	Target
Wang et al. [30]	miR-1192	4-week of swim training, in mice	Muscles and myocardium?	Circulation	Cardioprotective	Caspase3
Hou et al. [33]	miR-342-5p	Rowing training for over 1-year, in 19–22-years old students	Vascular endothelial cells	Exosomes	Cardioprotective	Caspase9 and Jnk2
Vinel et al. [44]	Apelin	Daily 30-min bout of endurance exercise, 6 days/week, 28 days, in rats	Muscles	Intracellular, circulation	Mitochondriogenesis, autophagy, and anti-inflammatory pathways in myofibers, muscle regenerative capacity	APJ receptor
Kleinert et al. [47]	GDF-15	60-min endurance exercise bout, in 27-years old men	Not the muscles	Circulation	Multiple organ stimulation	GFRAL receptor
Berio et al. [54]	Oxytocin	Muscle cell line C2C12	Myoblasts and myotubes	Autocrine and paracrine?	Hormonal regulation, skeletal muscle metabolism?	OXT receptor

miR micro-RNA, *GDF* growth differentiation factor, *Jnk2* c-Jun N-terminal kinase 2, *APJ* orphan G protein-coupled apelin receptor, *GFRAL* glial-derived neurotrophic factor receptor α -like, *OXT* oxytocin

3.4 miR-342-5p

miR-342-5p è localizzato dentro gli esosomi delle cellule endoteliali vascolari ed è un miRNA cardioprotettivo negli umani giovani allenati.

Nel 2019, Hou et al. studiarono gli effetti cardioprotettivi a lungo termine dell'esercizio contro il danno miocardico da ischemia/riperfusion. In particolare, avevano scoperto che l'attività fisica aumentava il rilascio degli esosomi nel plasma, sia negli animali sia nell'uomo. Analizzando il carico degli esosomi, avevano trovato 12 *mRNAs* differenzialmente espressi, tra i quali miR-342-5p che non era solo aumentato significativamente, ma esercitava anche profondi effetti cardioprotettivi sia *in vitro* che *in vivo*. Tuttavia, il ruolo di miR-342-5p sembra controverso. Da un lato, miR-342-5p nel siero è stato suggerito come un biomarcatore per eventi cardiovascolari avversi. Infatti, miR-342-5p può promuovere la proliferazione cellulare, la migrazione e l'invasione delle cellule muscolari lisce vascolari tramite la via di segnalazione Akt. D'altra parte, miR-342-5p modula l'effetto cardioprotettivo tramite inibizione nel cardiomiocita del

segnale apoptotico mediato da Caspasi 9 e *c-Jun N-terminal kinase 2* (Jnk2) e attiva il segnale di sopravvivenza (p-Akt) nel cuore ischemico.

3.5 Apelina

L'apelina viene rilasciata dai muscoli all'interno della circolazione ed è coinvolta in vie anti-infiammatorie e nella capacità rigenerativa muscolare nei ratti.

L'apelina è un peptide di 13-36 aminoacidi che è stato identificato nel 1998. È un ligando endogeno per il recettore dell'apelina (*orphan G protein-coupled APJ receptor*), espresso in vari organi, quali: muscolo scheletrico, cuore, polmone, rene, fegato, sistema adiposo, tratto gastrointestinale, cervello, ghiandole surrenali, endotelio e plasma umano.

In dipendenza dal bersaglio, l'apelina può esercitare funzioni distinte, come il controllo della pressione sanguigna, la stimolazione della contrattilità cardiaca, la regolazione dell'introito di cibo e acqua, la differenziazione degli adipociti e la formazione dell'osso. Nei muscoli scheletrici, il recettore per l'apelina presente sulle cellule staminali muscolari promuove *in vitro* e *in vivo* la proliferazione e la differenziazione prendendo parte alla rigenerazione muscolare. L'apelina influenza le cellule muscolari durante l'invecchiamento, sia nell'uomo sia nei roditori: agisce sul metabolismo muscolare attivando la biogenesi mitocondriale dipendente da AMPK, promuove l'autofagia e diminuisce l'infiammazione. L'espressione muscolare di apelina diminuisce con l'età, suggerendo che potrebbe avere un ruolo nella sarcopenia (perdita della massa e funzione muscolare con l'età). Tuttavia, il ruolo fisiologico del sistema apelinergico può essere spostato in un processo patologico sotto alterate condizioni micro-ambientali. È stato segnalato il ruolo dell'apelina nel metabolismo energetico, come un giocatore aggiuntivo ad altre adipochine, e i cambiamenti correlati alle malattie metaboliche, e anche alla patofisiologia cardiovascolare. Inoltre, l'apelina è espressa nel tessuto tumorale. Come un'adipochina, l'apelina potrebbe

promuovere lo sviluppo della rete vascolare nella nicchia degli adipociti, sovraregolata dall'ipossia. Inizialmente studiata solo come un'adipochina, l'apelina è rilasciata da altri tessuti, come il muscolo.

Nel 2018, Vinel e colleghi avevano identificato per la prima volta la relazione tra l'apelina e l'esercizio fisico (protocolli di intensità moderata). *In vivo*, la produzione di apelina dalle miofibre è stimolata dalla contrazione muscolare associata all'esercizio e per questa ragione potrebbe essere usata come un biomarcatore per la definizione di strategie di esercizio di successo atte a ridurre l'invecchiamento negli anziani. L'infiammazione può sopprimere le vie benefiche associate con l'apelina muscolare e il suo recettore. Recentemente è stato dimostrato che l'apelina modula il sistema adiposo bruno fetale e la salute metabolica nella prole dei topi, in risposta all'esercizio materno. Perciò, l'apelina dovrebbe rappresentare un fattore aggiuntivo nel *crosstalk* tra muscolo scheletrico e adipociti bruni-beige, insieme ad altri fattori come l'irisina. L'uso degli agonisti e antagonisti è stato perciò discusso, principalmente riguardo le malattie metaboliche e il cancro. L'apelina, e i peptidi derivati da essa, sono stati anche suggeriti come interessanti biomarcatori di patologie cardiovascolari.

3.6 GDF-15

GDF-15 viene rilasciato dentro la circolazione da una fonte ancora sconosciuta, e i suoi effetti possono essere osservati su numerosi organi, negli uomini giovani dopo un singolo periodo di esercizio.

Nel 2018, Kleinert et al. avevano fornito la prova per supportare il fattore 15 di crescita e differenziazione (GDF-15) come un'exerchina. Avevano testato maschi giovani in salute con un singolo periodo di esercizio di resistenza, riportando un incremento nei livelli plasmatici di GDF-15 durante l'esercizio e nella fase di recupero. Dimostravano anche che il muscolo scheletrico non era la fonte della produzione. In questo contesto, esiste l'evidenza per GDF-15 come una

cardiochina. Infatti, GDF agisce attraverso il *GDNF family receptor alpha-like* (GFRAL).

Nel 2020, Conte e colleghi trovavano una correlazione positiva tra il livello plasmatico del GDF-15 e l'età e una correlazione inversa con lo stile di vita attivo. Questi autori dimostravano un aumento notevole nel plasma di GDF-15 dopo un periodo di esercizio di resistenza. Considerando che GDF-15 è responsivo allo stress mitocondriale, gli autori ipotizzavano il ruolo di questa exerchina come un marcatore di danno, per esempio, al rene. GDF-15 è una citochina reattiva allo stress, con un profilo articolato di funzioni benefiche e dannose. L'associazione causale di GDF-15 con alcune malattie cardiovascolari (per esempio, malattia dell'arteria coronaria e infarto miocardico), la mancanza di relazione con altre (per esempio, *stroke* ischemico e insufficienza cardiaca), ha recentemente indicato un ruolo promettente del GDF-15 come un potenziale biomarcatore o bersaglio terapeutico. L'evidenza del GDF-15 come un mediatore benefico del miglioramento metabolico, dopo un protocollo di esercizio aerobico di 12 settimane negli adulti anziani, dovrebbe sostenere il ruolo come un possibile bersaglio terapeutico. Esiste l'evidenza riguardo GDF-15 nella mediazione della lipolisi del tessuto adiposo innescata dalla contrazione del muscolo scheletrico, suggerendo il ruolo di questa exerchina nella bioenergetica.

3.7 Ossitocina

L'ossitocina viene rilasciata dai mioblasti e miotubi, con funzioni autocrine e paracrine sui miotubi.

Nel 2017, partendo dall'evidenza della presenza dei recettori dell'ossitocina nei muscoli scheletrici e basando le loro assunzioni sui loro dati, Berio e colleghi avevano suggerito che l'ossitocina potrebbe lavorare in modo autocrino e paracrino, per regolare il metabolismo muscolare. Questa evidenza è stata aggiunta all'incremento indotto dall'esercizio della vasopressina circolante e

supporta il ruolo del muscolo scheletrico nel secernere ormoni neuroipofisari. L'ossitocina è stata segnalata come una molecola cardioprotettiva, agendo nel ridurre l'infiammazione, promuovendo l'angiogenesi, e migliorando la funzione metabolica dei cardiomiociti.

Alizadeh e colleghi hanno dimostrato che l'ossitocina agisce come un mediatore degli effetti antitumorali dell'esercizio in un modello di topo con carcinoma mammario. A questo riguardo, l'espressione alterata dell'ossitocina e del suo recettore è stata nello specifico collegata a vari cancri, portando a un plausibile ruolo del sistema ossitocina nella regolazione neurale della carcinogenesi, aprendo la strada per l'ossitocina come un possibile nuovo biomarcatore e/o la chiave per lo sviluppo di strategie preventive e terapeutiche. L'ossitocina è anche un importante fattore età-specifico per la rigenerazione e l'omeostasi del tessuto muscolare, e potrebbe perciò essere studiata come un bersaglio terapeutico per rimandare l'insorgenza della sarcopenia.

CAPITOLO 4

Le informazioni presenti in questo capitolo provengono dalla *Review* di Nederveen et al. (2021).

4.1 Comunicazione intercellulare

La comunicazione intercellulare è una funzione fisiologica cruciale negli organismi pluricellulari ed è un processo dinamico che consente al corpo di svolgere le funzioni necessarie oltre a mantenere l'omeostasi. In questo elaborato di tesi è già stato trattato l'argomento relativo alle vescicole extracellulari, tuttavia nel capitolo 4, questo tema verrà approfondito ulteriormente.

Le vescicole extracellulari (EVs), strutture vescicolari racchiuse dalla membrana lipidica, trasportano vari carichi, quali lipidi, acidi nucleici e proteine. È stato ipotizzato che questi carichi vengano trasportati alle cellule destinatarie, sia locali che distanti, dove possono esercitare un'influenza sulla funzione della cellula destinataria, rispettivamente in modo juxtacrino ed endocrino. Al contrario, le giunzioni comunicanti e le sinapsi consentono la propagazione dei segnali tramite comunicazione diretta cellula-cellula, che si verifica a causa della loro stretta prossimità fisica.

4.2 Tipi di vescicole extracellulari

Attualmente, ci sono tre classificazioni delle vescicole extracellulari: corpi apoptotici, microvescicole ed esosomi. Questi sottotipi di vescicole extracellulari si differenziano sia per dimensione sia per la natura della loro biogenesi. Data la carenza di specifici marcatori per ognuna delle sottopopolazioni sopracitate, la *International Society of Extracellular Vesicles* (ISEV) ha suggerito il termine generico "EVs" per le vescicole rilasciate dalla cellula, con alcune classificazioni basate sulla dimensione.

CORPI APOPTOTICI

I corpi apoptotici sono i più grandi delle vescicole extracellulari (circa 500-4000 nm) e si formano come una conseguenza della morte cellulare programmata. Una cellula che subisce apoptosi progredisce attraverso un numero di stadi, che culminano nella distruzione del contenuto cellulare racchiuso in distinte vescicole circondate da membrana, definite corpi apoptotici, che sono spesso caratterizzati dalla presenza di organelli e/o contenuto nucleare nel loro lume.

MICROVESCICOLE

Le microvescicole (MV), conosciute anche come ectosomi, microparticelle o vescicole di ricambio, vengono classificate dalla loro dimensione di circa 100-1000 nm e si formano direttamente germogliando verso l'esterno della membrana plasmatica. Le microvescicole si differenziano dai corpi apoptotici per la dimensione, ma anche per la loro formazione, contenuto e antigeni specifici di membrana, in quanto originano dalla membrana plasmatica. Data la sovrapposizione nella dimensione, la gemmazione diretta verso l'esterno e la scissione della membrana plasmatica specifica della formazione delle microvescicole è stata tradizionalmente il fattore primario che distingue microvescicole ed esosomi, sebbene evidenze suggeriscano che le *ELVs (exosome-like vesicles)* possano anche essere rilasciate tramite gemmazione.

ESOSOMI

Gli esosomi sono i più piccoli delle vescicole, misurano circa 40-120 nm e sono sottoposti a un processo complesso che comporta la gemmazione degli endosomi verso l'interno. Gli studi di Harding et al. (1983) e Pan and Johnstone (1983), hanno osservato il rilascio di piccole vescicole extracellulari nello spazio extracellulare durante la maturazione dei reticolociti. Il processo della biogenesi dell'esosoma

deriva dalla via endocitica, un processo che risulta nell' internalizzazione dei materiali cellulari e/o ligandi extracellulari, dirigendoli ai lisosomi o alle membrane della superficie cellulare (Figura 7). Il processo della formazione dell'esosoma è importante nel contesto della loro identificazione, poiché le proteine coinvolte sono spesso usate come marcatori per la definizione degli esosomi. Infatti, a causa del loro arricchimento e coinvolgimento durante la formazione degli esosomi, le tetraspanine (per esempio, CD9, CD81 e CD63), in aggiunta al gene di suscettibilità tumorale 101 (TSG101) sono state usate come dei marcatori positivi per gli esosomi. Tuttavia, non c'è un singolo marcatore di superficie che li definisce in modo specifico. In realtà, più di 100 proteine sono state elencate come biomarcatori potenziali degli esosomi e includono: flotillina, proteine di formazione del corpo multivescicolare (per esempio, Alix), di adesione delle vescicole (tetraspanine), di traffico di membrana (proteine Rab) e chaperoni (*heat shock proteins*).

Appena maturano i corpi multivescicolari, le Rab GTPasi (per esempio, Rab11, Rab27 e Rab35) regolano il traffico vescicolare dei corpi multivescicolari verso la membrana plasmatica e si assiste, infine, alla secrezione degli esosomi. In seguito alla secrezione da parte della cellula donatrice, gli esosomi si fondono con la membrana plasmatica e/o vengono captati dalla cellula di origine o dalle cellule destinarie, dove il loro carico viene rilasciato.

Gli esosomi sono stati isolati *in vivo* in numerosi fluidi corporei, quali siero, plasma, saliva, urina, latte, fluido cerebrospinale, seminale e fluido amniotico. Infatti, appare che quasi tutte le popolazioni cellulari secernano vescicole extracellulari, che sono distinte per cellula di origine. A causa della residenza degli esosomi in una varietà di fluidi corporei, è stato proposto che siano coinvolti in certi processi fisiologici e patologici. Diverse funzioni degli esosomi sono state riportate includendo la regolazione della risposta immunitaria, la presentazione degli antigeni, l'angiogenesi, il trasporto delle proteine e RNA (mRNA e microRNA), il

trasferimento delle particelle infettive (prioni o virus), e la comunicazione cellula-cellula.

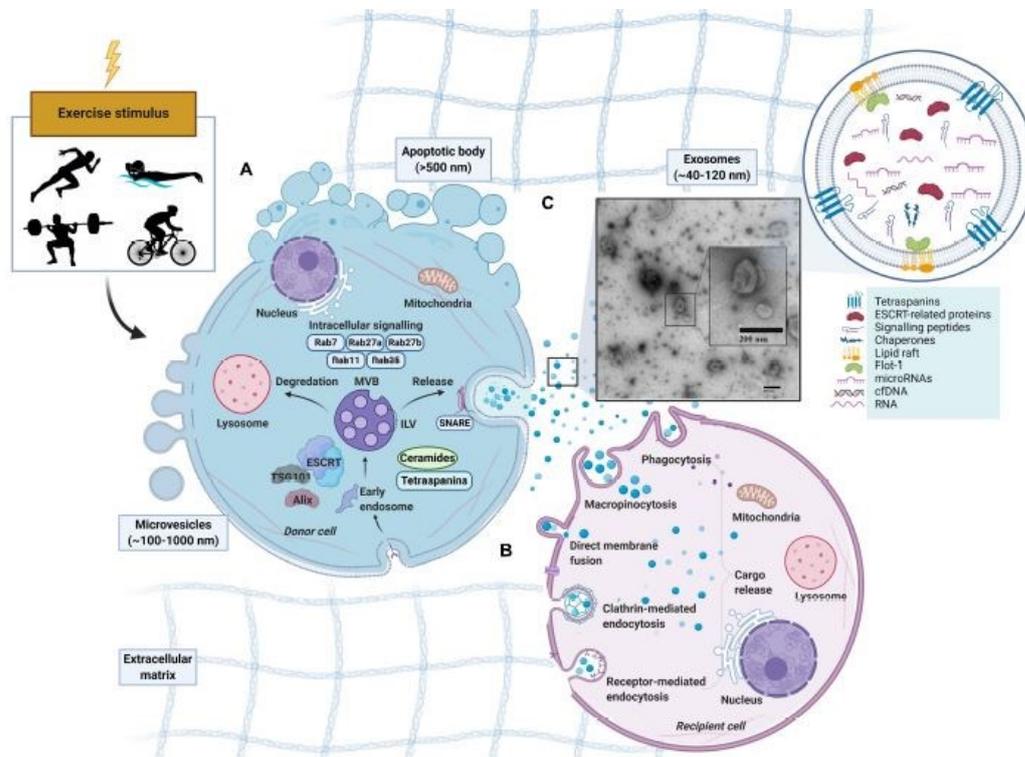


Figura 7. Rappresentazione schematica delle vescicole extracellulari rilasciate dalle cellule in risposta all'esercizio. Corpi apoptotici (circa >500 nm), microvescicole (circa 100-1000 nm) ed esosomi (circa 40-120 nm). **(A)** Formazione dell'esosoma. Gli endosomi precoci si formano dalla gemmazione verso l'interno della membrana plasmatica (PM) prima di maturare in endosomi tardivi che contengono vescicole multiple intraluminali (ILVs). Con la presenza delle ILVs, l'endosoma tardivo può anche essere caratterizzato come un corpo multivescicolare (MVB). I corpi multivescicolari esistono in differenti sottopopolazioni possono o fondere con un lisosoma per la degradazione, o fondere con la membrana plasmatica per rilasciare vescicole intraluminali dentro lo spazio extracellulare come esosomi. I corpi multivescicolari si sviluppano in un modo dipendente o indipendente da un Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) con coinvolgimento delle tetraspanine o ceramidi. Rab GTPasi (RABs) e SNAREs possono anche regolare lo smistamento del carico e il trasporto degli esosomi. **(B)** Uptake dell'esosoma nella cellula destinataria. In seguito al rilascio, gli esosomi possono essere internalizzati dalle cellule destinarie tramite legame diretto alla membrana plasmatica o inghiottiti. L'uptake degli esosomi e delle vescicole extracellulari può avvenire in vari modi, quali endocitosi (fagocitosi, micropinocitosi, endocitosi mediata da recettori e da clatrina/caveolina) o fondendosi direttamente con la membrana plasmatica della cellula destinataria. Dopo il legame, il carico dall'esosoma della cellula donatrice viene rilasciato. **(C)** Vescicole analoghe all'esosoma (ELV) isolate tramite SEC dal plasma umano libero dalle piastrine, visualizzate dal microscopio elettronico (da Nederveen et al., 2021).

Le origini miogeniche di alcune sottopopolazioni di vescicole extracellulari sono state provate *in vitro*, i risultati suggeriscono che mioblasti e miotubi siano entrambi capaci di rilasciare vescicole extracellulari in coltura. Gli studi di Forterre et al. (2014a) suggeriscono che le vescicole extracellulari rilasciate dai miotubi possano essere captate dai mioblasti, sovraregolando successivamente la differenziazione miogenica. Il lavoro dello stesso gruppo ha stabilito che le vescicole extracellulari rilasciate dai mioblasti e miotubi *in vitro* contenevano proteine e microRNA (miRNA) che erano specifici delle particelle e non delle cellule stesse. Il processo del carico selettivo delle vescicole extracellulari è stato esaminato in un modello di atrofia muscolare *in vitro*. Durante l'atrofia del miotubo, c'era una diminuzione marcata di miR-23a nei miotubi concomitante con un incremento nell'espressione miR-23a nelle vescicole extracellulari isolate, conducendo alla fine a un'espressione alterata dei geni bersaglio. Il contenuto di miRNA nelle ELV è differente da quello di miRNA intracellulare contenuto nei miotubi, suggerendo ulteriormente che l'inserimento del contenuto delle ELV è probabilmente un processo regolato. Questi dati suggeriscono che il muscolo scheletrico possa produrre vescicole extracellulari bioattive.

Il rilascio di miRNA muscolari specifici "*myomir*" avviene contemporaneamente a un incremento delle vescicole extracellulari in seguito a un periodo di esercizio acuto. Inoltre, i miRNA trovati nel plasma circolante sono alterati con modalità e/o intensità differenti di esercizio includendo vari periodi di esercizio di resistenza. Uomini anziani ben allenati avevano un'espressione di miRNA alterata in risposta a un periodo acuto di esercizio come comparato con la loro controparte sedentaria. Questi risultati supportano che l'esercizio promuova un'espressione di miRNA alterata ed è importante notare che le *ELVs* contengano un profilo specifico di miRNA come comparato con tutte le cellule libere nel plasma. Perciò l'isolamento completo delle *ELVs* da altre vescicole extracellulari diventa fondamentale.

PMVs (microvescicole derivate dalle piastrine)

Le microvescicole derivate dalle piastrine sono la più abbondante popolazione di microvescicole circolanti. Il lavoro di Wilhelm et al. (2016) esaminava le *PMVs* durante 1 ora di un periodo di esercizio a forte intensità (circa 65% VO_{2max}), dimostrando che le *PMVs* erano aumentate durante e nella prima fase del recupero post-esercizio. In contrasto, l'esercizio a intensità moderata (circa 45% VO_{2max}) non provocava gli stessi cambiamenti nelle *PMVs*, suggerendo che il rilascio delle *PMV* in risposta all'esercizio sia dipendente dall'intensità. Sembra che l'incremento nelle *PMVs* sia relativamente di breve durata, con concentrazioni delle *PMVs* originate dal sangue che si stabilizzano entro circa 30 minuti di esercizio aerobico. Sebbene i livelli delle *PMVs* rimangano elevati per circa 1-2 ore del recupero post-esercizio, la quantità di *PMV* circolanti ritorna ai valori della linea base relativamente rapidamente.

EMVs (microvescicole derivate dall'endotelio)

Il lavoro di Wahl et al. (2014) esaminava la comparsa di sottoinsiemi delle *EMVs*, in risposta a modalità differenti di "esercizio a forte intensità" in individui altamente allenati. Tre differenti protocolli di resistenza sono stati effettuati da ciclisti altamente allenati. Nella risposta a tutti i protocolli di esercizio, c'era una diminuzione nelle *EMVs* circolanti e gli autori proponevano una *clearance* aumentata dovuta allo stato di allenamento degli individui.

4.3 Studi sull'esercizio nel rilascio degli esosomi

Sono stati effettuati degli studi sugli animali e nell'uomo, alcuni sono contraddittori, ma danno un'idea che probabilmente all'interno delle vescicole extracellulari siano presenti le *exerchine*.

Brahmer et al. (2019) hanno dimostrato che le *SEC-ELVs* (*size-exclusion chromatography – exosome-like vesicles*) indotte dall'esercizio costituiscono una popolazione eterogenea, originante principalmente dai linfociti (CD4⁺ e CD8⁺), monociti (CD14⁺), cellule endoteliali (CD105⁺ e CD146⁺), e piastrine (CD41⁺, CD42⁺ e CD62⁺) e, sorprendentemente con un minor contributo dal muscolo scheletrico (per esempio, *α-sarcoglycan*⁺ EVs; SCGA⁺). Questi risultati suggeriscono che l'esercizio stimoli il rilascio delle ELV a carichi di lavoro sotto-massimali (ovvero, prima dell'aumento del lattato sistemico e del picco delle catecolamine) e che il rilascio può essere potenziato dall'aumento della durata e/o dell'intensità dell'esercizio. Questo tasso abbastanza rapido della comparsa potrebbe suggerire che le *ELVs* sono indotte dai primi segnali dell'esercizio, quali *shear-stress*, meccano-trasduzione, accoppiamento eccitazione-contrazione o altri eventi mediati dal Ca²⁺, mentre altri segnali più tardivi come il rilascio ormonale (per esempio, cortisolo), stress metabolico e/o specie reattive dell'ossigeno possono potenziare la risposta delle vescicole extracellulari.

Il rilascio delle ELV è stato dimostrato essere mediato dal Ca²⁺ e il silenziamento genico della sinaptotagmina-7 (un sensore del Ca²⁺) riduce la secrezione delle ELV. In seguito a un potenziale d'azione muscolare via motoneurone, il Ca²⁺ viene rilasciato dal reticolo sarcoplasmatico nell'ambiente locale legando la Troponina C. Il flusso relativamente ampio del Ca²⁺ nel muscolo scheletrico durante contrazioni ripetute (ovvero, esercizio) può portare a un rilascio accelerato delle *ELVs* più veloce rispetto ad altri tessuti, ma questo resta da essere chiarito. Invece, il gruppo delle *ELVs* circolanti osservato in seguito all'esercizio potrebbe essere dovuto a vari tipi cellulari (Figura 8).

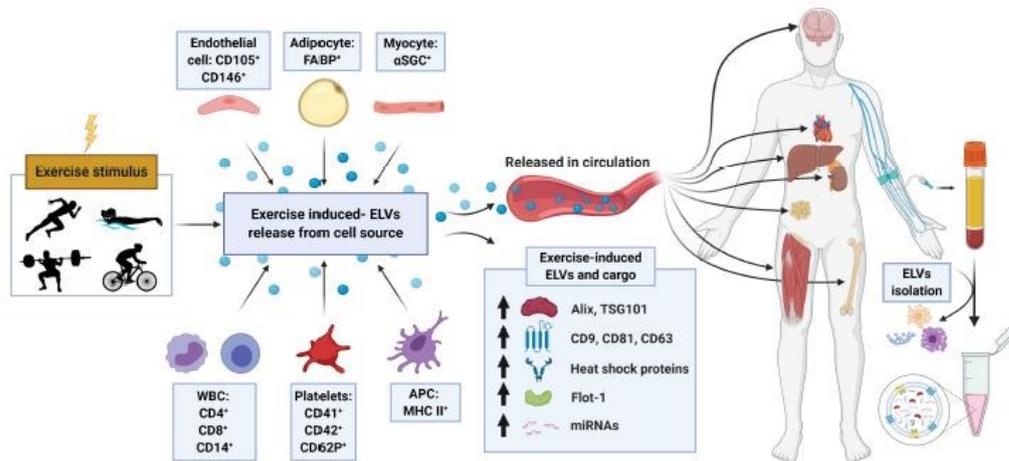


Figura 8. Rappresentazione schematica dell'origine proposta, del rilascio, della composizione, e del carico delle vescicole analoghe all'esosoma (ELVs) in seguito a uno stimolo di esercizio. In seguito o all'allenamento cronico o a un singolo periodo di esercizio, le ELVs possono essere rilasciate dal muscolo o da altre popolazioni cellulari ed entrare nella circolazione sistemica. Le alterazioni indotte dall'esercizio nella concentrazione plasmatica, sono stati osservati i marcatori degli esosomi (per esempio, ALIX, TSG101, tetraspanine, fotillina, e heat shock protein) e il carico (per esempio, miRNA, abbondanza di "myomiR"). APC, antigen presenting cell; α -SGC, α -sarcoglycan; FABP, fatty-acid-binding proteins; WBC, white blood cells; includendo monociti e linfociti (da Nederveen et al., 2021).

ESERCIZIO ACUTO

Un lavoro ha tentato di esaminare l'influenza dello stato di salute sulla comparsa delle ELV in risposta all'esercizio. Rigamonti et al. (2019) hanno esaminato il rilascio delle ELV indotto dall'esercizio in partecipanti obesi e normopeso. La capacità aerobica massima era stata determinata tramite un test di camminata incrementale sul tapis roulant fino all'abbandono volontario. In seguito alla determinazione del VO_{2max} , i partecipanti venivano sottoposti a un carico di lavoro costante corrispondente a circa il 60% del VO_{2max} per 30 minuti o all'abbandono volontario. Le ELVs plasmatiche sono state isolate usando la centrifugazione differenziale (DC), la filtrazione e l'ultracentrifugazione (UC) e NTA (analisi di tracciamento delle nanoparticelle) è stato usato per determinare la dimensione, la distribuzione e la concentrazione delle ELV. Il numero delle ELVs immediatamente in seguito all'esercizio era significativamente più basso se comparato ai livelli di riposo (ritornando alla linea di base a 3 ore post-esercizio).

Questo gruppo ha anche osservato che *SkM-derived SCGA⁺ EVs* (*skeletal-muscle specific EVs*) sono elevate in risposta all'esercizio, in contrasto ad altre sottopopolazioni, quali *CD61⁺ EVs*. Questo è il primo studio a osservare che le *ELVs* potrebbero diminuire in seguito all'esercizio acuto. Questo studio rinforza anche il concetto che la velocità di comparsa (*Ra*) e scomparsa (*Rd*) delle *ELVs* è breve dato che le perturbazioni nel contenuto delle *ELV* non erano più osservabili a 3 e 24 ore post-esercizio. Inoltre, gli autori hanno riportato che ci potrebbe essere una differenza basata sul sesso nel rilascio delle *ELV*, con *ELVs* più basse nelle femmine rispetto alla loro controparte maschile, indipendentemente dal peso corporeo. L'influenza degli ormoni sessuali potrebbe perciò giocare un ruolo nella biogenesi delle vescicole.

Nella Tabella 4 sono riportati ulteriori studi sull'esercizio acuto.

Tabella 4. Effetti dell'esercizio acuto sulle ELVs circolanti (da Nederveen et al., 2021).

Publication	Exercise protocol	Bio-fluid	Time of collection	Isolation method	Verification method	Verification marker	Author-used terminology	Exercise effect on ELVs
Acute exercise stimulus								
Fruhbeis et al., 2015	Cycling ergometer incremental test to exhaustion (50W · min ⁻³) in recreationally active men Treadmill running incremental to exhaustion (2 km/h · min ⁻³) at 1.5% inclination	PLA	(i) Pre-Ex (ii) Post-Ex (iii) 90 m Post-Ex	DC 0.2 µm filter UC	NTA No EM	WB: Flot1 Hsp/Hsc70 TSG101 Integrin αIIb	Exosome-like small EVs	↑ ~2.7-fold NTA particle count Post-Ex; ↑ Flot1, Hsp/Hsc70 Post-Ex ↔ TSG101, Integrin αIIb ↑ ~1.5-fold NTA particle count Post-Ex; ↑ Flot1 Post-Ex ↔ Hsp/Hsc70, Integrin αIIb TSG101 not detectable by WB
Rigamonti et al., 2019	Submaximal test at moderate constant workload (60% VO _{2max}) for 30 min or until exhaustion in healthy or obese men and women	PLA	(i) Pre-Ex (ii) Post-Ex (iii) 3 h Post-Ex (iv) 24 h Post-Ex	DC 0.1 µm filter UC	NTA No EM	None	Exosomes	↓ Post-Ex NTA particle count
Whitham et al., 2018	Cycling (1 h; 30 min at 55%, 20 min at 70%, and 10 min at 80% of VO _{2max} until exhaustion) in healthy men	PLA	(i) Pre-Ex (ii) Post-Ex (iii) 4 h Post-Ex	DC	NTA C-EM	Proteomic Analysis: TSG101 ALIX CD63 CD9	Exosome-like small EVs	↑ ~2-fold NTA particle count Post-Ex; ↑ ~322 proteins at Post-Ex ↔ NTA particle count 4 h Post-Ex ↑ 3 proteins 4 h Post-Ex
Lovett et al., 2018	PMJ (10 × 10 maximal jumps) followed by DHR (5 × 4 min DHR at 10 km/h at 10% decline) in untrained males	PLA	(i) Pre-Ex (ii) 2 h Post-Ex (iii) 24 h Post-Ex	DC SEC	NTA TEM	None	EVs in exosome size range	↔ No change 2 h and 24 h Post-Ex
Brahmer et al., 2019	Cycling ergometer incremental test to exhaustion (40 W · min ⁻³) in trained men	PLA	(i) Pre-Ex (ii) During Ex (RQ 0.9) (iii) Post-Ex	DC SEC Immuno-bead isolation	NTA EM	WB: CD9 CD63 CD81 TSG101 ApoA1 EV Array, MACSPlex	Multiple EV subtypes	↔ No change in NTA particle counts ↑ CD63, CD9, CD81
Publication								
Oliveira et al., 2018	Treadmill 40 min at low intensity (14–16 m/min, ~20% below MLSS) in untrained Wistar rats. Treadmill 40 min at moderate intensity (20–22 m·min ⁻¹ , on MLSS) Treadmill 40 min at high intensity (24–26 m·min ⁻¹ , 20% above MLSS)	SER	(i) Non-Ex Group (ii) Post-Ex Group	DC Exoquick Precipitation	RPS TEM I-EM	WB: CD63 ApoA-IV Calnexin	Exosome-like small EVs	↑ ~2 to 3-fold Post-Ex RPS particle count; ↑ CD63 Post-Ex ↔ ApoA-IV
Barone, 2016	Rota-Rod for 60 min at a speed of 5.8 m·min ⁻¹	PLA	(i) Non-Ex Group (ii) Post-Ex (iii) 15 m Post-Ex	DC 0.22 µm filter UC	TEM	WB: ALIX Hsp70 Hsp60	Exosomes	No detectable ALIX, Hsp60, Hsp70 in Non-Ex ↑ ALIX, Hsp60, Hsp70 Post-Ex ↑ ALIX, Hsp60, Hsp70 15m Post-Ex
Helmig et al., 2015	Treadmill running incremental to exhaustion (2 km/h · min ⁻³) at 1.5% inclination	PLA	(i) Pre-Ex (ii) Post-Ex (iii) 10 m Post-Ex (iv) 30 m Post-Ex (v) 90 m Post-Ex	DC 0.2 µm filter UC	None	WB: Flot1 Hsc/Hsp70	EVs and exosomes	↑ Flot1, Hsp70 Post-Ex to 90 m Post-Ex

C-EM, cryo-electron microscopy; DC, differential centrifugation; DHR, downhill running; EM, electron microscopy; EV, extracellular Vesicles; I-EM, immuno-electron microscopy; MLSS, maximal lactate steady state; NTA, nanoparticle tracking analysis; PLA, plasma; PMJ, plyometric jumping; RPS, resistive pulse sensing; RQ, respiratory quotient; SEC, size exclusion chromatography; SER, serum; TEM, transmission electron microscopy; UC, ultracentrifugation; WB, Western Blot.

ALLENAMENTO CRONICO

Nella Tabella 5 sono riportati alcuni studi che hanno esaminato le *exosome-like EV* nella risposta all'allenamento cronico.

Tabella 5. Effetti dell'allenamento all'esercizio cronico su EXLEV (da Nederveen et al., 2021).

Publication	Exercise protocol	Bio-fluid	Collection Period	Isolation method	Confirmation method	Verification marker	Author-used terminology	Exercise effect on EXLEVs
Chronic exercise training								
Ma et al., 2018	4-week treadmill training at LO (5 m·min ⁻¹) or MOD (10 m·min ⁻¹) intensity for 60 min/d, 5 d/wk in C57BL/6J mice.	PLA	(i) 24 h following final exercise training bout	DC UC	NTA	WB: CD63 TSG101	Endothelial progenitor derived exosomes	↑ ~2-fold, ↑ ~4-fold post-training NTA particle count compared to non-exercised animals in LO and MOD, respectively ↔ TSG101 and CD63
Bei et al., 2017	3-week swimming training in mice (~90 min × 2/d)	SER	(i) Not stated	DC Exoquick Precipitation	NTA TEM	WB: CD63	Exosome-like small EVs	↑ ~1.85-fold to NTA particle count; ↑ CD63 following chronic swim training
Bertoldi et al., 2018	2-week moderate treadmill training (~60% VO _{2max}) in Wistar rats, 20 m/d	SER	(i) 1 h Post-Ex (ii) 18 h following final exercise training bout	miRCURY Exosome Isolation kit	NTA AChE-AA	ELISA: CD63	Exosomes	↔ in CD63 1 h Post-Ex ↑ 10% CD63 levels in response to chronic training, 18 h following last exercise bout
Chaturvedi et al., 2015	8-week treadmill training in db/+ mice (7 m·min ⁻¹) and db/db mice (10 m·min ⁻¹) for 300 m/d, 5 d/wk	SER HRT	(i) Not stated	DC 0.2 μm filter UC	EM AChE-AA	WB: TSG101 CD81 Flot-1	Exosomes	↑ in FC-derived CD81, Flot1 content ↑ IHC colocalization of CD81, Flot1 in HRT ↑ CD81, Flot-1, ↔TSG101 in SER ↑ AChE activity
Hou et al., 2019	4-week swimming training (10 m progressed to 90# m/day ~7 days/wk) in Sprague-Dawley rats 1-year team-based rowing in athletes (1-2 h/d, 6 d/wk)	PLA	(i) 24 h following final exercise training bout	DC Exoquick Precipitation UC	EM NTA	WB: TSG101 CD81	Exosomes	↔ NTA particle count ↔ TSG101, CD81 ↔ NTA particle count

AChE-AA, acetylcholinesterase activity assay; DC, differential centrifugation; EM, electron microscopy; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FC, flow cytometry; HRT, heart; IHC, immunohistochemistry; NTA, nanoparticle tracking analysis; PES, polyethersulfone filter; PLA; plasma; SER, serum; UC, ultracentrifugation; WB, Western Blot.

Bei et al. (2017) hanno trovato che in seguito a 3 settimane di nuoto forzato nei topi C57BL/6, le ELV circolanti erano aumentate di circa 1,85 volte come determinato tramite NTA. Nel protocollo di allenamento, il tempo di nuoto forzato veniva aumentato fino a 90 minuti 2 volte al giorno, comparando il siero del gruppo allenato con quello del gruppo di controllo sedentario. In seguito a 3 settimane di allenamento di nuoto, non c'era cambiamento nella dimensione delle ELVs, mentre il numero era aumentato significativamente con un effetto cardioprotettivo contro il danno acuto da ischemia/riperfusion *in vivo*.

Un lavoro nei topi *db/db*, un modello di diabete di tipo 2, suggerisce che c'è un aumento nel numero delle particelle ELV nella circolazione in seguito all'allenamento cronico, fatto che potrebbe fornire alcuni effetti protettivi contro

la patologia. Il lavoro di Ma et al. (2018) ha rinforzato la nozione che l'allenamento con esercizio cronico aumenta il contenuto delle ELV derivate dalle cellule progenitrici endoteliali (EPC), mentre allo stesso tempo provoca qualche adattamento al carico delle ELV. Per un periodo di allenamento di 4 settimane, i topi C57BL/6J erano stati distribuiti in un gruppo sedentario o esposti a uno stimolo di "esercizio a bassa intensità" oppure a uno stimolo di "esercizio a moderata intensità" per 60 min/giorno con velocità al tapis roulant di 5 m/min e 10 m/min, rispettivamente. Le ELVs derivate da EPC nel plasma eparinizzato sono state isolate 24 ore dopo l'ultimo periodo di esercizio, tramite UC e poi caratterizzate. Non c'è stato alcun cambiamento nella dimensione delle ELV. Tuttavia, questo studio ha evidenziato che mentre l'allenamento a bassa intensità provocava un aumento di circa 2 volte delle ELVs derivate da EPC, l'allenamento a moderata intensità aumentava il rilascio di circa 4 volte. Inoltre, le ELVs derivate da EPC dai topi allenati a intensità moderata erano in grado di proteggere le cellule endoteliali dall'apoptosi indotta dall'ipossia e dalla disfunzione angiogenica *in vitro* a una maggiore entità di quelle derivate dai soggetti sedentari o allenati a bassa intensità. Questo potrebbe supportare che l'aumento indotto dall'allenamento nel numero delle ELV basali potrebbe essere intensità-dipendente.

Guescini et al. (2015) avevano esaminato la relazione tra VO_{2max} e l'espressione basale dei miRNA correlati al muscolo. Lo studio ha evidenziato che il VO_{2max} era correlato in modo significativo ai presunti "myomiRs" miR-1, miR-206, miR-499, e miR-133b. In aggiunta, questo studio ha esaminato anche un sottoinsieme di partecipanti che avevano un più alto VO_{2max} relativo rispetto alla coorte totale presa in esame. Le analisi di questo sottoinsieme hanno rivelato che solo l'espressione di miR-181a-5p era significativamente elevata a seguito di un periodo di esercizio di resistenza (45 min a circa 65% del VO_{2max}); d'altra parte, l'abbondanza di tutti gli altri miRNA era statisticamente invariata 1 ora dopo la cessazione dell'esercizio. Lo stato di allenamento e/o lo stato di salute sembrano influenzare l'abbondanza di miRNA nelle ELVs. Nair et al. (2020) hanno comparato

individui allenati in salute con la loro controparte sedentaria e hanno osservato che l'esercizio regolare aumenta l'espressione a riposo di miR-486-5p, miR-215-5p, miR-941, mentre sotto-regola miR-151b nelle *ELVs*.

L'esercizio cronico modula l'espressione di miRNA nel plasma arricchito di ELV e/o nel siero in condizioni basali ed è stato evidenziato da studi effettuati in modelli di topo e ratto utilizzando differenti modalità di allenamento.

4.4 Variabilità inter-studio

Per assicurare la validità interna dello studio devono essere fatte delle considerazioni sull'età, genere, stato di malattia e/o danno muscolo-scheletrico, uso di medicinali, stato nutrizionale (a digiuno o nutrito) e stato di allenamento. Altre variabili con effetti biologici apparenti negli umani che fanno esercizio sono: l'introito nutrizionale (digiuno per circa 8-10 ore; no caffeina, alcool o fumo), il tempo intercorso dall'ultima sessione di esercizio (no attività fisica >24 ore), il tempo e le condizioni del test (per esempio, umidità e temperatura), il periodo di riscaldamento e la progettazione del programma dell'esercizio (modo, intensità e durata). Altre variabili aggiuntive che potrebbero influenzare la risposta delle vescicole extracellulari all'esercizio sono: il sonno e lo stato di idratazione, che sono conosciuti entrambi nell'influenzare, in generale, la performance nell'uomo.

4.5 Analisi delle *ELVs*

TEMPISTICA E TECNICHE DEL PRELIEVO DEL SANGUE

La velocità di rilascio delle vescicole extracellulari (tasso di comparsa; EV R_a) contro *uptake/clearance* (tasso di scomparsa; EV R_d), potrebbe probabilmente essere indicativo delle differenze nello stato di allenamento (per esempio, forma

aerobica e capacità ossidativa). L'evidenza suggerirebbe che la comparsa nella circolazione delle *ELVs* sia relativamente rapida (ovvero, prima di un aumento apprezzabile nell'intensità dell'esercizio), e perciò la tempistica del campionamento di sangue dovrebbe essere considerata. Il contenuto delle *ELV* appare essere elevato immediatamente dopo un periodo di esercizio relativamente breve ma intenso, probabilmente ritornando a livelli basali a circa 1 ora post-esercizio. La tempistica dei prelievi di sangue dovrebbe essere presa in considerazione, poiché $EV R_d$ potrebbe eccedere $EV R_a$ in seguito a uno sforzo continuo di 45-90 minuti di intensità moderata. Matsumoto et al. (2020), usando specifiche proteine marcate delle *ELVs* derivate da SEC e analisi farmacocinetiche, hanno rilevato un rapido tasso di scomparsa delle *ELVs* somministrate per via endovenosa, con un'emivita di circa 7 min. Questi risultati possono riflettere la natura relativamente transitoria dalla comparsa nella circolazione delle *ELV* indotte dell'esercizio e sottolineare l'importanza del tempo di raccolta.

Per accertare l'effetto dell'attività contrattile sulle vescicole extracellulari e sui fattori dell'esercizio in assenza di fattori pre-analitici confondenti, è importante standardizzare la tecnica di campionamento del sangue, la frazione sanguigna di interesse, e i passi iniziali della preparazione del sangue. Viene preferito l'uso di una dimensione appropriata dell'ago/catetere che minimizzi l'agitazione e/o il rischio di rottura delle varie popolazioni cellulari del sangue (per esempio, piastrine, globuli bianchi e globuli rossi), se possibile sono preferiti aghi da 21- o 22-g. L'uso prolungato del laccio emostatico dovrebbe essere evitato e i primi 2-3 ml di sangue scartati o se possibile usati per altre analisi.

GESTIONE DEL CAMPIONE

Una volta che il sangue viene prelevato, il campione dovrebbe essere mantenuto verticalmente, maneggiato delicatamente e poi processato il prima possibile. Il tempo totale tra il campionamento del sangue e le analisi o lo stoccaggio a -80°C dovrebbe essere minimizzato e standardizzato, poiché alcuni contaminanti della

frazione sanguigna, come le piastrine potrebbero rilasciare vescicole extracellulari durante la frammentazione derivante dal ciclo di congelamento-scongelo. È preferibile l'uso del plasma rispetto al siero, poiché vescicole extracellulari o esosomi potrebbero essere rilasciati durante il processo della formazione del coagulo. L'uso del plasma libero dalle piastrine (PFP) è vantaggioso per evitare la presenza di vescicole extracellulari derivate dalle piastrine.

Anche la scelta dell'anticoagulante potrebbe influenzare il rilascio delle vescicole extracellulari/fattori dell'esercizio e potenzialmente limitare i passi successivi delle analisi. Sono stati utilizzati diversi anticoagulanti per le vescicole extracellulari, inclusi acido etilendiaminotetracetico (EDTA), sodio fluoruro, eparina e sodio citrato. Per l'isolamento delle vescicole extracellulari, il sodio citrato potrebbe essere la scelta preferita più di altri anticoagulanti, anche se un'ulteriore ricerca è necessaria in quest'area, in particolare modo per le *ELVs*.

Il sangue periferico contiene uno spettro di vescicole extracellulari con profili e carichi molecolari che ne riflettono tipo, funzione, capacità secretoria, e abbondanza complessiva della loro origine cellulare. Perciò, uno degli aspetti più impegnativi della ricerca sull' "esosoma" è che una vasta maggioranza di isolati contenga qualche grado di contaminazione e una popolazione diversa di vescicole, includendo varie proteine del sangue (albumina, chilomicroni e altre lipoproteine), microvescicole e *ELVs*. Alcuni contaminanti potrebbero sovrapporsi nella dimensione/diametro alle *ELVs* e potrebbero anche rispondere agli stimoli dell'esercizio, fatto che complica la definizione della risposta all'esercizio delle *ELVs*. L'isolamento di specifiche sottopopolazioni delle vescicole presuppone diverse sfide metodologiche, in particolare correlate alla purificazione e identificazione delle *ELVs*, che hanno condotto a rigide linee guida procedurali. In risposta all'interesse crescente nel campo, nel 2014 ISEV ha proposto una serie di linee guida che delineano i requisiti minimi per la determinazione appropriata degli esosomi. Queste linee guida hanno aiutato a progettare ed effettuare alcune delle più recenti ricerche sugli esosomi in risposta all'esercizio. Da allora, le linee

guida MISEV2014 (sebbene ancora valide) sono state modificate nelle linee guida ISEV2018 nel tentativo di delineare cosa dovrebbe essere obbligatorio per i ricercatori che lavorano nel campo delle vescicole extracellulari.

Le linee guida ISEV2018 riconoscono che non c'è un metodo "ottimale" per l'isolamento/arricchimento delle ELV. A oggi, i metodi più comunemente usati di isolamento e/o arricchimento in letteratura sono microfiltrazione, centrifugazione differenziale/ultracentrifugazione (DC/UC) e kit basati su polietilenglicole. DC/UC applica una serie di stadi di centrifugazione con un aumento della velocità di rotazione, la quale è usata per rimuovere progressivamente sottofrazioni più grandi di vescicole extracellulari. Questi metodi richiedono attrezzatura costosa (DC/UC) e/o producono contaminazioni significative (DC/UC e PEG). Anche se la microfiltrazione potrebbe aiutare a rimuovere vescicole più grandi, quali corpi apoptotici e microvescicole, previa centrifugazione ad alta velocità e PEGilazione, nei campioni umani rimane ancora una contaminazione significativa. Al contrario il gradiente di densità DC/UC, la cromatografia ad esclusione molecolare (SEC) e la cattura per immunoaffinità sono meno comunemente usate negli studi sull'esercizio, ma hanno il vantaggio di produrre isolati più puri.

Infatti, mentre l'uso della SEC porta a preparazioni relativamente pure delle ELV, le vescicole che si sovrappongono nella dimensione saranno isolate insieme, rendendo impegnativo separare le *ELVs* dai chilomicroni e dalle lipoproteine a bassissima densità (VLDL). Inoltre, la purezza delle frazioni arricchite con ELV, la separazione dei marcatori delle ELV dai contaminanti solubili e l'efficienza dell'isolamento delle ELV potrebbe variare dipendendo dalla colonna SEC usata. Alla fine, dato il processo restrittivo, SEC potrebbe anche portare a una resa bassa di vescicole, anche se con una maggiore purezza rispetto ad altri metodi.

Gli isolati vengono congelati rapidamente in azoto liquido e stoccati a -80°C. Un lavoro suggerirebbe che le vescicole extracellulari derivate dal plasma e le *ELVs* siano stabili nei cicli di congelamento – scongelamento in alcune condizioni. Infatti, fino a tre cicli di congelamento – scongelamento di PFP non si avevano

effetti sulla conta delle microvescicole. Mentre la dimensione delle ELV è diminuita quando erano stoccate a 4 e 37°C, congelamenti multipli a -20°C e scongelamenti non influenzano la dimensione delle ELV come accertato da NTA e dal microscopio elettronico a scansione, suggerendo alla fine una preservazione strutturale. Resta da essere chiarito se questa protezione si estenda al contenuto delle ELVs. Un lavoro ha dimostrato che le attività biologiche delle ELVs o la degradazione di RNA contenuto nelle ELV potrebbero verificarsi per lo stoccaggio a -80°C a lungo termine.

Infine, la separazione delle entità non vescicolari dalle ELVs non è completamente (ovvero, 100%) raggiunta dai comuni protocolli di isolamento, particolarmente dai metodi basati sulla centrifugazione. Indipendentemente dalla metodologia di isolamento, è imperativo seguire le linee guida ISEV per la caratterizzazione delle vescicole extracellulari, in un tentativo di minimizzare le variazioni tra gli studi e migliorare l'interpretabilità dei risultati.

LIMITI NEL STUDIARE GLI ESOSOMI

La metodologia della raccolta del sangue deve essere considerata attentamente e, la tempistica di raccolta appare essere fondamentale per le analisi accurate della cinetica delle microvescicole e delle ELV indotte dall'esercizio. Inoltre, restano molte sfide relative all'isolamento delle ELVs, all'identificazione del tessuto d'origine e alla risposta all'esercizio.

Le sfide sono principalmente presenti nei problemi metodologici relativi alla purificazione del campione e alla sua resa, includendo la preparazione del sangue, l'isolamento/purificazione delle ELV, e la verifica/caratterizzazione del campione, che hanno suggerito lo sviluppo di una serie di criteri metodologici definiti dall'*International Society of Extracellular Vesicles* (ISEV). In aggiunta, le variazioni inter-studio derivano anche dalle differenze nelle caratteristiche dei partecipanti,

dal tipo di esercizio, dalle condizioni del test e dalla tempistica del campionamento del sangue.

CAPITOLO 5

Conclusioni

L'esercizio abituale conferisce benefici notevoli alla salute, decelera l'invecchiamento biologico e prolunga il corso della vita. Gli studi, le *reviews* e le metanalisi dimostrano gli effetti benefici dell'attività fisica e dell'esercizio in tutti i sistemi di organo nell'uomo, fornendo quindi una protezione contro varie patologie (Nederveen et al., 2021).

L'inattività fisica è associata con l'aumento della mortalità e a un notevole peso economico. Promuovere l'attività fisica rimane un intervento critico per ridurre l'incidenza e la prevalenza delle comuni malattie metaboliche. Negli USA, le linee guida ufficiali per l'attività fisica sono state pubblicate nel 1995, ed era raccomandato che tutti gli adulti statunitensi dovessero accumulare almeno 30 minuti di attività fisica a intensità moderata per la maggior parte, preferibilmente tutti, i giorni della settimana. Successivamente, nel 2020, l'Organizzazione Mondiale della Sanità aveva dichiarato che tutti gli adulti dovrebbero puntare a un'attività fisica a intensità moderata per 150-300 minuti a settimana o 75-150 minuti di attività fisica a intensità vigorosa a settimana o a una combinazione equivalente di intensità moderata e vigorosa a settimana. Le *exerchine* sono una direzione altamente promettente per iniziative della futura ricerca, con alto potenziale come biomarcatori per predire gli esiti, facilitare programmi personalizzati di esercizio per migliorare la salute, ridurre la malattia e promuovere la resilienza nel corso della vita (Chow et al., 2022).

Studi recenti stanno valutando un possibile uso farmacologico dei bersagli delle miochine, come l'attività fisica, per contrastare la progressione e le conseguenze di malattie, quali la cachessia da cancro, il diabete, l'insufficienza cardiaca e la malattia polmonare ostruttiva cronica. I medici saranno in grado di "cucire" specifici "abiti" per ciascun individuo basandosi sulle *exerchine*. Le fonti, i bersagli, i meccanismi di trasporto, i ruoli biologici, i campioni di popolazione, la frequenza,

l'intensità, il tempo e il tipo di esercizio dovrebbero essere considerati per la caratterizzazione delle esercine nuove ed esistenti. I mediatori ossidativi, infiammatori e neurotrofici variano in funzione del tipo di esercizio e perciò è necessaria la definizione del FITT (frequenza, intensità, tempo e tipo) dell'esercizio. Le esercine e gli esosomi potrebbero fornire nuove conoscenze sui meccanismi alla base delle vie patofisiologiche e fisiologiche correlate ai benefici relativi all'esercizio e, potrebbero essere considerate per definire nuove "armi" basate sulle evidenze in favore della salute pubblica (Magliulo et al., 2022).

CAPITOLO 6

Bibliografia

Chow, L.S., Gerszten, R.E., Taylor, J.M. et al. Exerkines in health, resilience and disease. *Nat Rev Endocrinol* 18, 273–289 (2022).

<https://doi.org/10.1038/s41574-022-00641-2>

Magliulo, L., Bondi, D., Pini, N. et al. The wonder exerkines—novel insights: a critical state-of-the-art review. *Mol Cell Biochem* 477, 105–113 (2022).

<https://doi.org/10.1007/s11010-021-04264-5>

Nederveen JP, Warnier G, Di Carlo A, Nilsson MI and Tarnopolsky MA (2021) Extracellular Vesicles and Exosomes: Insights From Exercise Science. *Front. Physiol.* 11:604274. doi: 10.3389/fphys.2020.604274