



1506  
UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI URBINO  
CARLO BO

DISB  
DIPARTIMENTO DI  
SCIENZE BIOMOLECOLARI

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI URBINO Carlo Bo**  
**Dipartimento di Scienze Biomolecolari**

***Dottorato di Ricerca in Metodologie molecolari e  
morfo-funzionali applicate all'esercizio fisico  
Ciclo XXVIII***

---

***LE VESCICOLE EXTRACELLULARI COME NUOVI  
MEDIATORI DI SEGNALI MUSCOLARI***

*Settore scientifico Disciplinare (SSD): BIO-10*

***Relatore:***

***Chiar.mo Prof. Michele Guescini***

***Dottorando:***

***Dott.ssa Serena Maggio***

---

ANNO ACCADEMICO 2014-2015

*Myokines are peptides produced and secreted by skeletal muscle, with autocrine, paracrine and endocrine actions that are involved in the regulation of muscle repair or regeneration.*

*Moreover, myokines are overexpressed during physical exercise and appear to contribute to the benefits of exercise to metabolic homeostasis, suggesting that muscle is able to send specific messages in response to various stimuli.*

*It has recently been established that extracellular vesicles (EVs) can mediate intercellular cross-talk under normal and pathological conditions through the transfer of specific miRNAs, which can be taken up by targeting cells changing their biological behavior.*

*In addition, it has been found that myoblasts and myotubes release EVs in the extracellular environment during myogenic differentiation.*

*The aim of this study was to investigate the type of EVs released by C2C12 cells in the early phases of myogenic differentiation process.*

*Furthermore, we tested if the application of an in vitro exercise stimulus, such as electric pulse stimulation (EPS) to myotubes, can modify EV secretion. Finally, we evaluated whether muscle tissue releases EVs in the bloodstream and if physical exercise modulates the levels of MyomiRNAs into EVs.*

*Our data represent new evidence that during the early phase of the myogenic differentiation process, myocytes release two types of extracellular vesicles: microvesicles with a mean diameter of 200 nm containing electron-dense material, and exosome-like vesicles showing a diameter of about 50-100 nm containing electron-transparent material. Moreover, we identify two sub-populations of exosome-like vesicles: one characterized by lower density values and high levels of RNA, and the other showing heavier floating values and abundant DNA. The results obtained also highlight that the relative ratio of these different vesicles changes during the myogenic differentiation process. It is noteworthy that treatments of recipient cells with purified vesicles highlighted that EVs are biologically active entities able to affect the activity of target cells such as myocytes and macrophages.*

*Concerning the effects of exercise on the release of EVs, our data show that myotubes subjected to EPS increase EV secretion compared to control cells. Using Nanoparticles Tracking Analysis (NTA), we demonstrated that contracting cells release EVs that have a diameter falling in the range of exosomes. These*

*data suggest that muscle fibers could release EVs in response to contracting activity in addition to myokines.*

*Interestingly, we demonstrated that muscle tissue releases EV also in vivo; in fact the presence of EVs with exosomal characteristics in the bloodstream was highlighted, these EVs were positive for alpha-sarcoglycan (SGCA) and enriched for miR-206 confirming their muscle origin.*

*Finally, a significant positive correlation was found between the aerobic fitness, measured as  $VO_{2max}$ , and muscle-specific miRNA (MyomiRNA) expression in EVs; moreover, miR-133b and -181a-5p contained in EVs were significantly up-regulated after acute aerobic exercise.*

*Future studies may be designed to deeply explore the content of muscle extracellular vesicles in physiological (e.g. exercise) or pathological (e.g. inactivity, atrophy, diabetes, etc.) conditions. Such efforts could provide insight into the role of EVs not only as useful biomarkers, but also as regulators of the body's homeostasis.*

*Taken together, this evidence suggest that muscle can release EVs in the extracellular environment which mediate cell-to-cell communication potentially involved in muscle repair, regeneration and remodeling and/or in muscle cross-talk with other organs.*

Il muscolo scheletrico produce e secerne fattori solubili, chiamati miochine in grado di svolgere un'azione a livello autocrino, paracrino, ed endocrino contribuendo alla riparazione o rigenerazione muscolare.

Molte di queste proteine vengono secrete durante l'esercizio fisico e sembrano in parte responsabili dei benefici dell'attività fisica sulla salute. Quindi, queste evidenze sperimentali hanno dimostrato che il muscolo possiede anche un'importante attività endocrina. Recentemente, è stato proposto che anche le vescicole extracellulari (EV) possano mediare il cross-talk intercellulare sia in condizioni normali che patologiche attraverso il trasferimento di miRNA specifici. Studi precedenti hanno riportato che mioblasti e miotubi rilasciano EV nell'ambiente extracellulare durante il processo di differenziamento miogenico.

Nella prima parte di questa tesi è stato indagato se le cellule C2C12 rilasciano tipologie diverse di EV durante le prime fasi del processo di differenziamento miogenico e se queste possiedono funzioni biologiche.

Nella seconda parte, sono stati studiati gli effetti dell'esercizio fisico sul rilascio di EV da parte del muscolo. In particolare, è stato valutato se l'applicazione di impulsi elettrici (EPS) in miotubi cresciuti *in vitro* induce la secrezione di EV e infine se il tessuto muscolare rilascia EV nel circolo ematico in seguito ad attività fisica.

I dati ottenuti dimostrano che durante le prime fasi del processo di differenziamento miogenico, i miociti rilasciano due tipi di vescicole extracellulari: le microvescicole con un diametro medio di 200 nm, contenenti materiale elettron-denso, e vescicole con caratteristiche esosomiali, caratterizzate da un diametro di circa 50-100 nm contenenti materiale elettron-trasparente. Queste due popolazioni di vescicole presentano anche un diverso contenuto di acidi nucleici, in particolare, quelle caratterizzate da una minor densità hanno elevati livelli di RNA, mentre le vescicole più pesanti mostrano livelli di DNA più abbondanti. Inoltre è stato evidenziato che il rapporto relativo tra queste sub-popolazioni di vescicole cambia nel corso del processo di differenziamento miogenico. Quando utilizzate nel trattamento di cellule target, le EV hanno evidenziato la capacità di influenzare l'attività delle cellule bersaglio, come miociti e macrofagi, in termini di regolazione genica.

Per quel che riguarda l'effetto della contrazione muscolare sul rilascio di vescicole, è stato dimostrato che la stimolazione mediante EPS induce la secrezione di EV, principalmente esosomi, da parte dei miotubi coltivati *in vitro*. Inoltre, è stato

ipotizzato che il muscolo possa rilasciare EV anche *in vivo*. I dati riportati mostrano infatti la presenza, nel plasma, di EV positive all'alfa-sarcoglicano (SGCA) e arricchite in miR-206, caratteristiche che ne suggeriscono l'origine muscolare.

Infine, è stata trovata una correlazione positiva tra la capacità aerobica, misurata come  $VO_{2max}$  e i livelli dei miRNA muscolo-specifici (MyomiRNAs) contenuti nelle EV, e una induzione di miR-133b e miR-181a-5p vescicolari dopo esercizio aerobico acuto.

Nel loro insieme, i dati riportati in questa tesi suggeriscono che il muscolo rilascia, nell'ambiente extracellulare, EV potenzialmente coinvolte nella riparazione, rigenerazione, e rimodellamento muscolare e nel cross-talk con altri organi.

Ulteriori studi saranno necessari al fine di definire il contenuto e le funzioni delle EV muscolari, sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Tali informazioni permetteranno di comprendere il ruolo delle EV rilasciate dal muscolo nella regolazione dell'omeostasi energetica e potrebbero portare allo sviluppo di nuovi biomarcatori.

# INDICE

<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
<b>IL MUSCOLO COME ORGANO ENDOCRINO.....</b>	<b>2</b>
LE MIOCHINE.....	3
MIOCHINE E DIFFERENZIAMENTO CELLULARE .....	7
<b>I miRNA.....</b>	<b>11</b>
UN PO' DI STORIA .....	11
BIOGENESI DEI MIRNA .....	13
I MIRNA CIRCOLANTI.....	16
LA TEORIA DELLA COMUNICAZIONE CELLULA-CELLULA ATTRAVERSO I MIRNA EXTRACELLULARI .....	19
IL MECCANISMO DI SORTING DEI MIRNA ALL'INTERNO DEGLI ESOSOMI .....	20
I MIRNA COME BIOMARCATORI.....	23
I MYOMIRNA.....	24
LA REGOLAZIONE DEI MIRNA NEL MUSCOLO .....	25
<b>LE VESICOLE EXTRACELLULARI .....</b>	<b>32</b>
BREVE STORIA DELLE EV.....	33
CLASSIFICAZIONE DELLE EV .....	34
ATTUALI LIMITAZIONI NELLA CLASSIFICAZIONE .....	36
ISOLAMENTO .....	36
DIMENSIONI .....	37
DENSITÀ .....	38
MORFOLOGIA .....	38
COMPOSIZIONE PROTEICA E ORIGINE SUB-CELLULARE.....	39
LE MICROVESICOLE .....	41
I CORPI APOPTOTICI .....	42
GLI ESOSOMI.....	43
PATHWAY DI FORMAZIONE E RILASCIO .....	43
COMPOSIZIONE.....	47
UPTAKE .....	50
EV DI DERIVAZIONE MUSCOLARE .....	52
<b>SCOPO DELLA TESI METODI .....</b>	<b>54</b>
<b>MATERIALI E METODI .....</b>	<b>56</b>
COLTURE CELLULARI .....	57
PURIFICAZIONE DI EV DA TERRENO DI COLTURA.....	57
SEPARAZIONE MEDIANTE GRADIENTE DI DENSITÀ.....	58

TRATTAMENTO DELLE CELLULE CON EV .....	58
WESTERN BLOTTING.....	59
ELECTRICAL PULSE STIMULATION (EPS).....	59
NANOPARTICLES TRACKING ANALYSIS (NTA) .....	61
APPROVAZIONE ETICA PER LO STUDIO <i>IN VIVO</i> .....	61
CARATTERISTICHE DEI SOGGETTI RECLUTATI.....	62
MISURAZIONI.....	63
PROTOCOLLO DI ESERCIZIO ACUTO .....	64
PRELIEVI DI SANGUE .....	64
PURIFICAZIONE DI EV DA PLASMA.....	65
ISOLAMENTO DEGLI ESOSOMI MEDIANTE IMMUNO-CAPTURING .....	65
QUANTIFICAZIONE DEI MIRNA.....	66
ANALISI STATISTICA .....	66
<b>RISULTATI.....</b>	<b>68</b>
LE CELLULE C2C12 RILASCIANO EV DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO MIOGENICO .....	69
MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA IN CELLULE TRATTATE CON EV .....	74
CARATTERIZZAZIONE DELLE VESICOLE T0 E T2 MEDIANTE GRADIENTE DI DENSITÀ .....	78
ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA IN MIOCITI TRATTATI CON EV T0/T2 RILASCIATE DA CELLULE C2C12 DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO MIOGENICO.....	81
TRATTAMENTO DELLE CELLULE RAW264.7 CON EV LIBERATE DA MIOCITI IN ATTIVO DIFFERENZIAMENTO.....	83
LE CELLULE MUSCOLARI RILASCIANO EV IN SEGUITO AD ELETTROSTIMOLAZIONE .....	85
ANALISI DELLE EV LIBERATE NELL'AMBIENTE EXTRACELLULARE IN RISPOSTA AD EPS .....	86
IDENTIFICAZIONE DI EV CON CARATTERISTICHE MUSCOLARI NEL PLASMA DI SOGGETTI UMANI .....	90
ANALISI DELLE EV ISOLATE DA PLASMA MEDIANTE CITOFLUORIMETRIA .....	92
IMMUNO-CAPTURING DELLE EV PLASMATICHE DI DERIVAZIONE MUSCOLARE .....	94
CORRELAZIONE TRA L'ESPRESSIONE DEI MIRNA CONTENUTI NELLE EV PLASMATICHE E LA CAPACITÀ AEROBICA .....	96
MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEI MIRNA CONTENUTI NELLE EV IN RISPOSTA AD ESERCIZIO AEROBICO ACUTO .....	96
<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>100</b>
<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>106</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>108</b>

# **INTRODUZIONE**

## IL MUSCOLO COME ORGANO ENDOCRINO

Il muscolo scheletrico è caratterizzato principalmente dalla sua funzione meccanica, che è essenziale per mantenere la postura, permettere il movimento e la respirazione, processi che dipendono dalla contrazione delle fibre muscolari. Tuttavia, il muscolo scheletrico non rappresenta solo una componente del nostro sistema motorio. Recenti evidenze hanno infatti identificato il muscolo scheletrico come un *organo secretorio* [1, 2] in grado di produrre e rilasciare in circolo, diverse proteine, chiamate *miocchine*, sia in condizioni basali che in risposta alla contrazione, che posso influenzare il metabolismo e la funzione del tessuto muscolare stesso ma anche quella di altri organi o tessuti, come il fegato, il cervello, il tessuto adiposo, il sistema cardiovascolare (Figura 1).

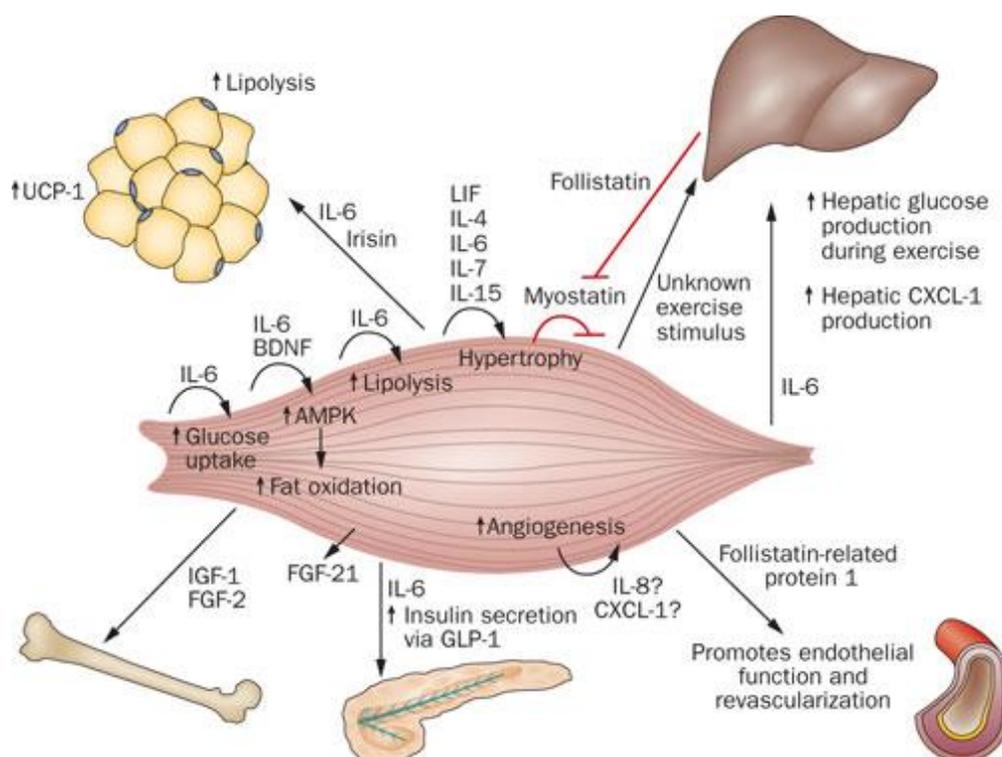


Figura 1. Il muscolo come organo endocrino. Il tessuto muscolare rilascia miocchine che influenzano l'attività muscolo stesso e quella di altri organi. [1]

Il muscolo scheletrico, a seguito di una richiesta da parte dell'organismo, è in grado di adattarsi aumentando la dimensione delle fibre muscolari e non è

sorprendente che molti dei fattori secreti in seguito alla contrazione muscolare, agiscono nella regolazione dell'ipertrofia e della riparazione del muscolo. In questo senso, le miochine permettono al muscolo di regolare i meccanismi di crescita e rigenerazione, come conseguenza dell'adattamento all'esercizio.

Le miochine possono così regolare la miogenesi del muscolo scheletrico in molti modi, compreso il processo che coinvolge l'attivazione e la migrazione di cellule satellite(CS), la successiva proliferazione e differenziamento in mioblasti e la loro fusione con le fibre muscolari.

Finora, è stato studiato l'effetto biologico solo di alcune tra tutte le miochine identificate. È tuttavia chiaro che tali sostanze potranno servire in futuro come potenziali bersagli terapeutici per il trattamento di malattie che influenzano la crescita e la rigenerazione muscolare e possono fornire una spiegazione del fatto che un regolare esercizio fisico ritarda il processo di invecchiamento. Si prevede che si possano migliorare i sintomi di malattie degenerative muscolari o della sarcopenia associate all'invecchiamento. In realtà, potrebbe essere concepibile che l'inattività fisica può comportare un'alterazione o una compromissione della produzione di miochine e/o una resistenza ai loro effetti, spiegando così come la mancanza di attività fisica aumenta il rischio di sviluppare diverse patologie come il cancro, le malattie cardiovascolari, il diabete di tipo 2 e l'osteoporosi.

## **LE MIOCHINE**

Le *citochine* sono una grande famiglia di polipeptidi o proteine che comprendono interleuchine, interferoni, chemochine, membri del gruppo del fattore di necrosi tumorale e fattori di crescita.

Le citochine svolgono un ruolo di regolazione e integrazione agendo come messaggeri intercellulari universali. Una volta secrete, possono mediare la comunicazione intercellulare a livello locale o sistemico. In alternativa, possono mediare il contatto intercellulare legandosi alle membrane cellulari [3] Queste caratteristiche distinguono le citochine da altri messaggeri intercellulari, come ad esempio le molecole di adesione, che richiedono il contatto diretto cellula-cellula, e gli ormoni, che sono prodotti da organi endocrini specializzati e circolano in tutto

l'organismo per esercitare le loro azioni. La maggior parte delle citochine sono mediatori inducibili che vengono trasportati attraverso la circolazione sistemica e sono sintetizzati rapidamente da più tipi di cellule in risposta a vari stimoli. Inoltre la stessa cellula può esprimere e secernere diverse citochine simultaneamente, in risposta ad un singolo stimolo.

Le citochine sono considerate molecole pleiotropiche perché influenzano diversi tipi di cellule, e suscitano effetti diversi, a seconda della cellula bersaglio. Esse esercitano la loro azione pleiotropica in due fasi: innanzitutto, si legano a recettori specifici espressi sulla cellula di origine e/o su altri tipi di cellule; in secondo luogo, mediano la trasduzione del segnale attraverso vari messaggeri intracellulari e fattori di trascrizione. Gli effetti biologici delle citochine dipendono dalla presenza e dalla concentrazione di altre citochine con azione sinergica, additiva o di contro regolazione

La funzione principale delle citochine è quella di regolare la funzione immunitaria. Tuttavia, gli effetti di vasta portata sulla proliferazione cellulare, sul differenziamento, sulla migrazione, sulla sopravvivenza e sull'apoptosi permettono loro di avere un ruolo importantissimo anche nel controllo omeostatico di vari tessuti, organi e sistemi. Ad esempio, insieme con gli ormoni e i neuropeptidi, le citochine mediano le interazioni tra il sistema nervoso, endocrino e immunitario. Alcune citochine controllano anche la temperatura corporea, la fatica, l'appetito e il metabolismo.

Un legame tra citochine e muscolo scheletrico è stato stabilito in primo luogo quasi 50 anni fa, quando i ricercatori hanno identificato che un pirogeno endogeno era presente nel muscolo scheletrico [4].

Successivamente, Cannon e Kluger [5] stabilirono che l'esercizio fisico di resistenza induceva il rilascio sistematico di un composto pirogeno. Questi risultati hanno stimolato un notevole interesse per il significato biologico e la regolazione della produzione di citochine nei muscoli, sia durante l'esercizio che come risultato di condizioni fisiologiche e patologiche come l'invecchiamento, la cachessia e altre malattie infiammatorie croniche.

Inizialmente, la ricerca fu focalizzata sul ruolo delle citochine nel mediare la risposta infiammatoria indotta da danno muscolare. Le prove negli ultimi dieci anni dimostrano che le citochine hanno un ruolo molto più ampio durante l'esercizio.

Oggi è ampiamente accettato che durante l'esercizio fisico, citochine e altri peptidi vengono secreti dai muscoli in contrazione con il potenziale di agire localmente sul tessuto muscolare stesso e in maniera endocrina prendendo di mira organi più lontani. Nel 2003, Pedersen et al. hanno suggerito che le citochine o altri peptidi che vengono prodotti, espresse e rilasciati dalle fibre muscolari e che esercitano effetti endocrini debbano essere classificate come “*miochine*” [6].

Studi emergenti suggeriscono che queste citochine di derivazione muscolare svolgono un ruolo importante nella mediazione sia dei cambiamenti metabolici associati all'esercizio acuto, sia di quelli che seguono un periodo di allenamento [7].

L'aumento della risposta all'insulina, l'uptake del glucosio e l'ossidazione degli acidi grassi nel muscolo scheletrico sono alcuni degli effetti benefici di un regolare esercizio fisico che sono, almeno in parte, mediati dalle miochine.

Allo stesso modo, le miochine rilasciate in risposta alla contrazione muscolare sembrano avere effetti a livello sistemico e risultano coinvolte in diversi meccanismi di regolazione del metabolismo immediato e a lungo termine in organi distanti come ad esempio il tessuto adiposo [8].

Le miochine sono quindi fondamentali per la comprensione del *cross-talk* tra il muscolo scheletrico e altri organi durante e dopo l'esercizio.

L'identificazione del muscolo scheletrico come organo secretorio ha creato un nuovo paradigma: i muscoli producono e rilasciano miochine, che funzionano in modo simil-ormonale ed esercitano effetti endocrini specifici sugli organi distanti. Altre proteine prodotte dai muscoli scheletrici che non vengono rilasciate nella circolazione, potrebbero lavorare attraverso meccanismi autocrini o paracrini, esercitando i loro effetti sulle vie di segnalazione all'interno del muscolo stesso (Figura 2).

La prima miochina ad essere stata identificata è interleuchina-6 (IL-6) [9], oggi riconosciuta come il prototipo delle miochine, in grado di esercitare effetti sia localmente sul muscolo che a livello endocrino [10].

Oggi l'elenco delle miochine verificate si è notevolmente allungato e comprende IL-6, interleuchina-8 (IL-8), interleuchina-7 (IL-7), interleuchina-15 (IL-15), il fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF), il fattore inibitorio della leucemia (LIF), miostatina, ecc.[8]

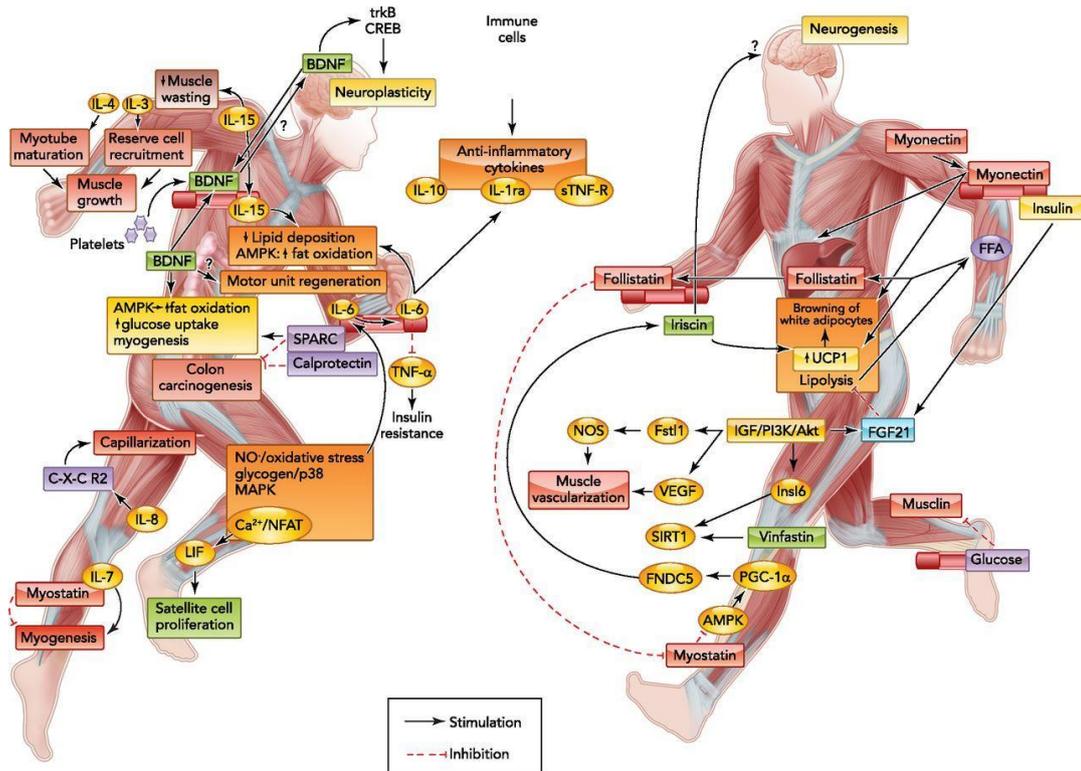


Figura 2. Riassunto delle maggiori miocchine, dei loro effetti e dei pathway di segnalazione coinvolti [11]

Per esempio miostatina, LIF, IL-6 e IL-7 sono coinvolte nell'ipertrofia muscolare e nella miogenesi, BDNF e IL-6 sono coinvolti nell'ossidazione dei grassi mediata da AMPK. IL-6 sembra anche avere effetti sistemici su fegato, tessuto adiposo e sistema immunitario e media il cross-talk tra le cellule-L intestinali e le isole pancreatiche. Tra le miocchine vengono inclusi i fattori osteogenici come il fattore di crescita insulino-simile-1 (IGF-1), il fattore di crescita dei fibroblasti-2 (FGF-2), follistatin-like-1 (FSTL-1), che migliorano la funzione endoteliale del sistema vascolare; e irisina che guida lo sviluppo del tessuto adiposo bruno.

Molte di queste proteine che vengono prodotte dal muscolo scheletrico vengono indotte dalla contrazione; di conseguenza, l'inattività fisica, probabilmente porta ad una risposta alterata nella produzione di questi fattori, che potrebbe fornire un potenziale meccanismo per l'associazione tra comportamento sedentario e molte malattie croniche.

Inoltre, recenti studi di proteomica hanno previsto che la lista delle miochine può includere più di 600 candidati appartenenti a famiglie di proteine nettamente diverse [12].

Per esempio gli studi negli ultimi anni suggeriscono l'esistenza di fattori non ancora identificati, secreti dalle cellule muscolari, che possono influenzare la crescita delle cellule del cancro e la funzione del pancreas.

## ***MIOCHINE E DIFFERENZIAMENTO CELLULARE***

Il muscolo scheletrico adulto mostra una straordinaria capacità di adattamento a vari stimoli sia fisiologici, come la crescita o l'esercizio fisico, ma anche a condizioni di danno tissutale. Questi adattamenti sono possibili grazie alla presenza delle *cellule satellite (CS)*.

La prima descrizione ultrastrutturale delle cellule satellite è avvenuta nel 1961, quando Mauro et al. hanno identificato la presenza di cellule morfologicamente caratterizzate da un alto rapporto nucleo/citoplasma, un piccolo nucleo e pochi organelli che erano "intimamente associate alla fibra muscolare, incuneate tra la membrana plasmatica della fibra muscolare e la membrana basale" [13]. Nello stesso lavoro, nonostante l'assenza di prove funzionali dirette, venne proposto che le CS potevano essere rilevanti nella risoluzione del difficile problema della rigenerazione del muscolo scheletrico.

Nei decenni successivi, l'ipotesi di Mauro si rivelò più che fondata, tanto che una serie di studi ha dimostrato che le CS rappresentano i protagonisti chiave della crescita post-natale del muscolo scheletrico, e della sua omeostasi e riparazione [14].

Le funzioni principali delle CS riguardano la riparazione delle fibre muscolari danneggiate e il mantenimento di un adeguato pool di cellule staminali. Infatti, le CS che si dividono sono in grado sia di fornire nuovi nuclei alle fibre muscolari in crescita o sottoposte a un processo di rigenerazione ma anche di ristabilire il pool di CS che si trovano adiacenti alle fibre muscolari [15].

Più nel dettaglio, le CS quiescenti costituiscono una popolazione eterogenea: la maggior parte delle CS sono impegnate nella linea miogenica (Pax7+, Myf5+), mentre una piccola sottopopolazione (Pax7 +, Myf5-) vengono identificate come cellule staminali satellite, la cui divisione asimmetrica produce sia cellule staminali Pax7+, Myf5- che cellule committed Pax7+, Myf5+. Le CS sono anche in grado di mantenere o espandere il loro numero attraverso la divisione simmetrica [16].

L'osservazione che la proliferazione delle CS contribuisce sia alla crescita che alla riparazione della fibra muscolare e al mantenimento del pool di CS ha fornito la base per considerare le CS come le cellule staminali del muscolo [17]. L'equilibrio tra divisione asimmetrica e simmetrica è quindi rilevante per il mantenimento di una popolazione di cellule staminali omeostatica.

Questo equilibrio è influenzato dal pathway che include WNT-7a e il suo recettore Frizzled-7 (Fzd-7) [18]. Tali segnali dettano la polarità (parallela o perpendicolare) dell'orientamento della divisione mitotica rispetto al sarcolemma della fibra (e della lamina basale). L'attività di WNT-7a induce le cellule staminali a dividersi parallelamente al sarcolemma, favorendo la divisione simmetrica, che produce due cellule staminali Pax7+, Myf5-. Al contrario, in assenza di WNT-7a, il fuso mitotico è orientato perpendicolarmente al sarcolemma favorendo la divisione asimmetrica in due cellule figlie; la cellula figlia che contatta la lamina basale mantiene le caratteristiche delle cellule staminali (Pax7+, Myf5-), mentre le altre cellule figlie, a contatto con il sarcolemma della fibra, diventano CS committed Pax7+, Myf5 +.

Molti stimoli, come quelli presenti in un muscolo danneggiato o malato, inducono l'attivazione delle CS, che contribuiscono alla formazione di nuove fibre. È importante sottolineare che l'attivazione delle CS non è limitata alla zona danneggiata; piuttosto, la proliferazione e la migrazione delle CS verso il sito di rigenerazione sono state osservate per tutta la lunghezza del muscolo danneggiato. La rigenerazione muscolare è assolutamente dipendente dalle cellule Pax7+ [19], infatti in assenza di CS Pax7+, la rigenerazione non avviene; invece, si verifica un'invasione del tessuto da parte di le cellule fibro-adipogeniche. In linea con l'idea che i processi di rigenerazione muscolare CS-dipendente sono simili a quelli di miogenesi embrionale, l'attivazione delle CS prevede l'up-regolazione di fattori di trascrizione miogenici helix-loop-helix e di differenziamento delle CS. In particolare, a livello molecolare, l'attivazione delle CS è caratterizzata

dalla rapida espressione di MyoD e del fattore miogenico-5 (Myf5), che viene attivato da Pax7 (e dal suo suo paralogo Pax3) [20].

Dopo la fase di proliferazione, l'espressione dei fattori di regolazione miogenica (MRF) come miogenina (MyoG) e MRF-4 vengono up-regolati, con conseguente differenziamento delle CS. Questo evento è concomitante con l'attivazione della proteina p21 e conseguente arresto e uscita dal ciclo cellulare. Il completamento del programma di differenziamento prevede l'attivazione di proteine muscolo-specifiche, quali la catena pesante della miosina (MHC), e la fusione delle CS tra loro o con le fibre danneggiate al fine di portarne a termine la riparazione.[21]

L'esaurimento di delle CS è un evento comune sia in condizioni fisiologiche come l'invecchiamento che nelle malattie degenerative croniche muscolari, Così, la regolazione del rinnovamento delle CS è fondamentale per la promozione della rigenerazione muscolare in malattie muscolari, come distrofie muscolari. (Figura 3)

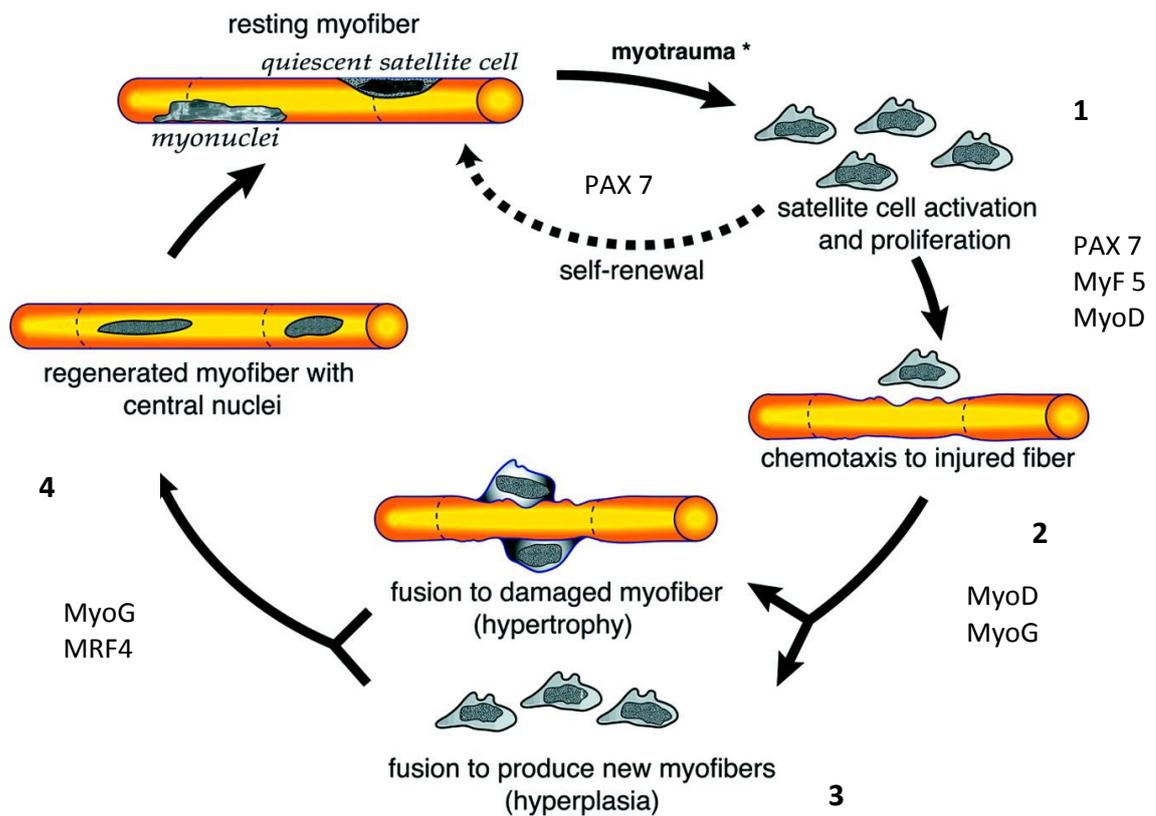


Figura 3. Schematizzazione della risposta delle cellule satelliti ad una lesione, [21]

Lo studio del secretoma della miogenesi scheletrica suggerisce che miocchine come IL-6 e follistatina hanno un ruolo di primo piano nel regolare i processi di comunicazione e di coordinamento durante il differenziamento delle cellule. E' stato dimostrato che IL-6 ha un ruolo pro-miogenico sulle cellule C2C12 in differenziamento, promuovendo prima il loro differenziamento e la successiva fusione [22, 23].

Considerando che IL-6 appartiene alla famiglia dei fattori trofici, la sua espressione è importante per l'omeostasi muscolare, e quindi possiamo dire che riflette lo stato di salute del muscolo.

Nel corso degli anni, è divenuto noto che nei miotubi in coltura la sostituzione del terreno di coltura con uno senza siero innesca il processo di differenziamento. Per cui la down-regolazione di fattori extracellulari come il fattore di crescita trasformante (TGF- $\beta$ ), il quale inibisce il differenziamento miogenico, risulta essere alquanto favorevole.

A tal proposito, è stato dimostrato che la follistatina viene espressa nei mioblasti C2C12 in differenziamento [24].

Considerato che la follistatina agisce proprio su TGF- $\beta$ , la sua espressione nei mioblasti in differenziamento non fa altro che accelerare il differenziamento miogenico, e quindi risulta essenziale per la formazione e la crescita della fibra muscolare.

Quindi questo suggerisce che le miocchine possono regolare la pluripotenza delle cellule progenitrici mesenchimali, il loro impegno e il passaggio nella fase di differenziamento. Come precedentemente detto, i mioblasti sono sensibili all'ambiente extracellulare. Pertanto, l'espressione di miocchine come IL-6 e follistatina è importante per lo sviluppo, la crescita e il mantenimento dell'omeostasi del muscolo scheletrico.

## ***I miRNA***

Oggi è ampiamente accettato che il muscolo è in grado di comunicare con gli altri organi attraverso il rilascio di fattori umorali che hanno la capacità di esercitare effetti endocrini/paracrini, che oggi vengono riconosciuti come miochine. Il muscolo scheletrico è il tessuto più importante del corpo umano in termini di peso totale; costituisce circa il 40% del peso corporeo in uomini e donne magre. Pertanto, la scoperta che il muscolo è un organo capace di produrre e secernere miochine ha aperto un nuovo campo di ricerca sul muscolo scheletrico . Infatti, recenti studi hanno riportato che, in aggiunta alle miochine, il muscolo è in grado di rilasciare microRNA (miRNA) nel sangue che hanno un ruolo importante nel cross-talk tra il tessuto muscolare e gli altri organi.

### ***UN PO' DI STORIA***

I miRNA sono una classe di piccoli RNA endogeni (lunghi circa 19-24 nucleotidi) evolutivamente conservati che funzionano come regolatori post-trascrizionali dell'espressione genica.

Essi agiscono principalmente legandosi a sequenze bersaglio complementari di RNA messaggero (mRNA) interferendo con il meccanismo traduzionale, impedendo o alterando la produzione della proteina. Studi di follow-up hanno rivelato che, oltre alla repressione della traduzione, i miRNA, legandosi al loro mRNA, target sono in grado di attivare il reclutamento e l'associazione di fattori che provocano la destabilizzazione e la successiva degradazione del mRNA, con conseguente diminuzione dei livelli suoi di espressione. [25].

Il primo miRNA è stato scoperto più di 30 anni fa, nel nematode *Caenorhabditis elegans* grazie all'identificazione del regolatore dello sviluppo LIN-4. In questi organismi, la down-regolazione della proteina LIN-14 è essenziale per la progressione dal primo stadio larvale (L1) al successivo (L2). Questa down-regolazione dipende dalla trascrizione di un secondo gene chiamato LIN-4 [26].

Originariamente ritenuto un gene codificante in modo convenzionale per una proteina, i laboratori di Ruvkun e Ambros hanno invece scoperto che il trascritto

LIN-4 non veniva tradotto in una proteina biologicamente attiva, invece, formava un piccolo trascritto lungo 21 nucleotidi.

Inoltre essi hanno dimostrato che LIN-4 RNA aveva complementarità con diversi siti del 3' UTR di LIN-14 mRNA: il legame tra queste regioni complementari provocava una diminuzione dell'espressione della proteina LIN-14 senza causare alcun cambiamento significativo dei suoi livelli di mRNA.

Questi studi hanno portato avanti un modello in cui l'appaiamento delle basi che si verifica tra il piccolo RNA LIN-4 e i siti complementari nel 3' UTR di LIN-14 mRNA, causava l'inibizione della traduzione di LIN-14 e di conseguenza la successiva progressione da L1 a L2 durante lo sviluppo dello *C. elegans*.

Inizialmente si pensava che questa nuova modalità di regolazione dell'espressione genica fosse un fenomeno esclusivo del *C. elegans*, tanto che nel 2000, due diversi gruppi scoprirono che, sempre nel *C. elegans*, un piccolo RNA, LET-7, era essenziale per lo sviluppo da uno stadio larvale più tardivo a quello adulto [27, 28]. La cosa veramente importante fu che successivamente furono scoperti omologhi di questo gene in molti altri organismi, tra cui l'uomo[29].

Il periodo che seguì fu segnato da una miriade di nuove informazioni durante il quale molteplici laboratori clonarono numerosi piccoli RNA dagli esseri umani, mosche e vermi. Questi RNA non codificanti, di circa 19-24 nucleotidi di lunghezza, derivano da un precursore più lungo con una struttura stem-loop o fold-back [30].

Inoltre molti risultarono essere evolutivamente conservati tra le specie ed avere specificità per il tipo di cellula che li originava.

Il riconoscimento e la conferma dell'esistenza di questi piccoli RNA, oggi chiamati miRNA, ha portato a un'intensa ricerca volta ad individuare nuovi membri di questa famiglia portando alla scoperta di molteplici miRNA in diverse specie di piante e animali.

Attualmente i miRNA identificati nel genoma umano ammontano a 2588 [29], ma purtroppo il significato biologico di molti di loro rimane sconosciuto e richiede ulteriori ricerche.

## ***BIOGENESI DEI MIRNA***

I geni che codificano per i miRNA possono variare molto nella loro posizione nel genoma.

Studi precedenti hanno evidenziato la presenza di due classi distinte di miRNA: quelli creati dalla sovrapposizione degli introni di trascritti codificanti per proteine e altri che sono codificati da esoni, sottolineando la complessità associata alla maturazione dei miRNA [31].

Si stima che circa il 50% dei miRNA sono espressi da trascritti non codificanti per proteine. Il resto si trova normalmente negli introni di geni codificanti e sono generalmente co-trascritti con i loro geni ospiti e poi processati separatamente [32].

Una panoramica generale dei passaggi coinvolti nella biogenesi dei miRNA è illustrata nella figura 4. I trascritti che codificano i miRNA vengono inizialmente trascritti dalla RNA polimerasi II come miRNA primari (pri-miRNA) aventi una struttura stem-loop e lunghi diverse centinaia di nucleotidi, con un cappuccio di guanosina in posizione 5' e una coda poliadenilata in posizione 3'.

Il miRNA primario viene poi trasformato in un miRNA precursore (pre-miRNA) di 70-120 nucleotidi da un complesso multiproteico chiamato microprocessore (Figura 4A). Questo complesso contiene una RNasi nucleare III chiamata Drosha [33] che dimerizza con una double-stranded RNA (dsRNA) binding protein chiamata DGCR8 o Pasha, per formare il complesso microprocessore funzionale (Figura 4A) [34-36].

Il nuovo pre-miRNA viene poi esportato nel citoplasma grazie all'azione di exportin-5 (Exp-5), (Figura 4B) [37, 38].

Nel citoplasma, i pre-miRNA sono finalmente trasformati in miRNA maturi composti da 18-23 nucleotidi dall'enzima Dicer-1, con l'aiuto di dsRNA binding proteins, protein kinase RNA activator e transactivation response RNA binding protein (Figura 4C e 4D) [37, 39].

I due filamenti del miRNA vengono quindi separati, in seguito a vari fattori quali l'asimmetria termodinamica del duplex e la stabilità di appaiamento delle basi all'estremità 5'.

Un filamento, definito filamento guida, insieme alle proteine leganti l'RNA citate precedentemente, la proteina TNRC6A, e le proteine catalitiche Argonaute (Ago),

formano un complesso proteico micro-ribonucleare (miRNP) chiamato RISC (Figura 4E) [40].

Il filamento miRNA con l'appaiamento di basi più instabile all'estremità 5' normalmente funge da filamento guida, mentre l'altro filamento noto come filamento passeggero o miR\* è di solito degradato o, in rari casi, si associa con le proteine Ago, diventando anch'esso un miRNA funzionale [41].

Il filamento guida dirige il complesso verso l'mRNA target in base alla sua complementarità provocandone la repressione traduzionale (Figura 4F).

Prove crescenti suggeriscono che le proteine Ago-2 insieme al miRNA incorporato vengono incanalate in strutture chiamate corpi di processamento (GW/P-bodie), che vengono considerate la sede dove effettivamente avviene la repressione della trascrizione o la degradazione del mRNA (Figura 4G) [42].

Tuttavia, recenti evidenze dimostrano che la biogenesi dei miRNA può avvenire anche in maniera microprocessore-indipendente. Gli esempi includono forcine pre-miRNA-like denominate "mirtroni", alcuni piccoli RNA nucleolari (snoRNAs), e i brevi RNA endogeni ramificati (shRNAs) [43].

Diversi meccanismi sono stati proposti sul *modus operandi* dei miRNA che si traducono nella repressione post-trascrizionale di mRNA target. Questa repressione può essere il risultato di una ridotta efficienza traduzionale o di una diminuzione reale dei livelli di mRNA. Il grado di complementarità tra il miRNA e le regioni target del mRNA è essenziale in questa scelta in quanto è sufficiente che ci sia complementarità tra i due trascritti per avere degradazione del mRNA mentre meno complementarità porta all'inibizione della traduzione

Tuttavia, ci sono eccezioni a questa regola, infatti esistono alcuni casi in cui la complementarità quasi perfetta porta alla soppressione della traduzione ma non al cleavage [44]. E' stato proposto anche un meccanismo d'azione alternativo secondo cui il legame con il miRNA provoca la veloce deadenilazione del mRNA, diminuendo in tal modo la stabilità del mRNA e quindi accelerandone la degradazione [45]. Altri studi hanno anche dimostrato che i miRNA possono funzionare come "esche" e interferire con il funzionamento delle proteine regolatrici legandosi ai mRNA senza che sia necessaria una regione seed (ossia la regione del mRNA che dovrebbe avere maggiore complementarità con il miRNA) [46]. L'idea che il 3' UTR è l'unico obiettivo di interazione dei miRNA sta cambiando anche grazie ad alcuni studi recenti che hanno dimostrato che i siti di

legame per i miRNA possono essere presenti sia al 5' UTR che all'interno della sequenza codificante del mRNA [47]. Addirittura un recente studio ha anche dimostrato che i miRNA possono funzionare come attivatori di mRNA che intervengono nel mantenimento della quiescenza durante il ciclo cellulare, alludendo alla possibilità che, in rari casi, possono svolgere un ruolo doppio come attivatori e repressori [48].

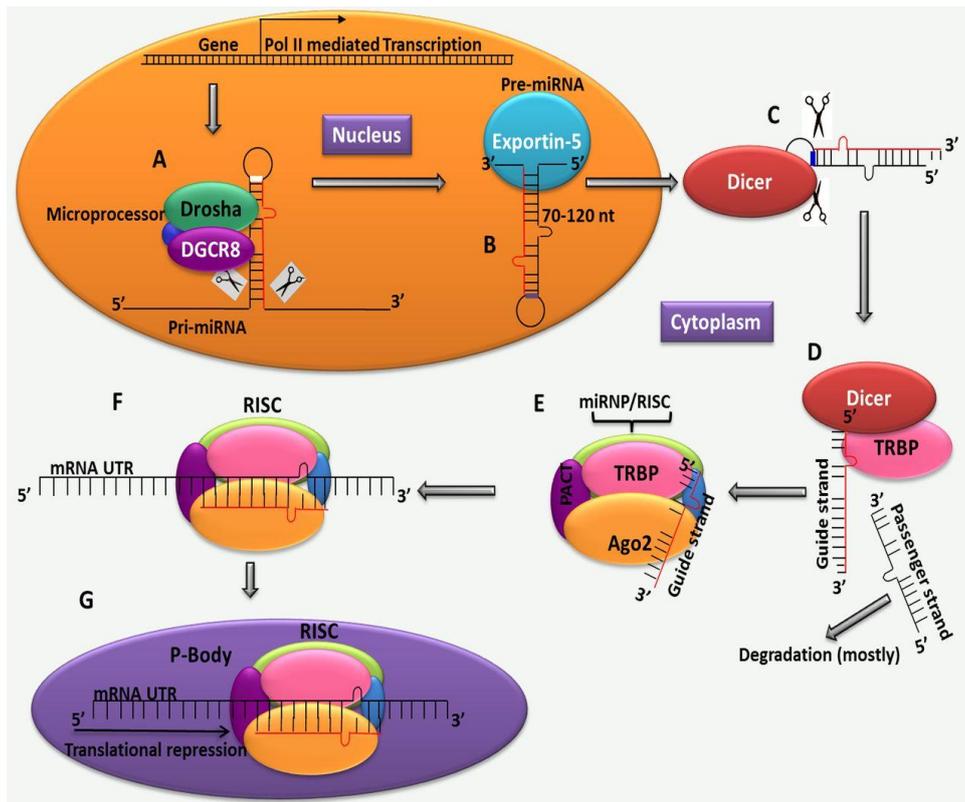


Figura 4. Biogenesi dei microRNA: i miRNA sono inizialmente codificati come trascritti di lunghezza variabile denominati pri-miRNA dalla RNA polimerasi II nel nucleo. (A) I pri-miRNA vengono tagliati dal microprocessore, un grande complesso che include Drosha e DGCR8, in pre-miRNA della lunghezza di 70-120nucleotidi (A). I pre-miRNA vengono poi esportati in citoplasma da exportin-5 (B), dove vengono ulteriormente tagliati da Dicer in miRNA maturi di 18-23 nt (C). Una proteina cellulare chiamata TRBP (D), facilita l'ingresso del complesso Dicer-miRNA nel complesso (RISC) che contiene Argonaute-2 (Ago-2), TNRC6A, e altre RNA binding protein (E). Dopo l'incorporazione del miRNA in RISC, il filamento guida si lega all'mRNA target per degradarlo o per inibirne la traduzione (F). Prove crescenti suggeriscono che i complessi Ago-2 miRNA- vengono incanalati in strutture chiamati GW/P bodie, dove avviene la repressione traduzionale(G).[25]

Previsioni basate su analisi bioinformatiche indicano che, nei mammiferi, i miRNA possono regolare fino al 30% di tutti i geni codificanti per proteine [49]. Evidenze emergenti suggeriscono anche che i miRNA non solo svolgono un ruolo

importante nella regolazione dell'espressione genica, ma rappresentano anche importantissimi fattori capaci di regolare finemente i processi biologici cellulari. In questo contesto, è sorprendente notare che queste piccole molecole di RNA, con ruoli così importanti nella regolazione dei processi cellulari sono riusciti a eludere la comunità scientifica per la maggior parte del XX secolo.

## ***I miRNA CIRCOLANTI***

Mentre la maggior parte dei miRNA si trovano a livello intracellulare, un numero significativo di miRNA è stato osservato al di fuori delle cellule, tra cui vari fluidi corporei .

Mitchell et al. [50] hanno dimostrato la presenza di miRNA endogeni circolanti nel plasma umano. Gli autori incubarono campioni di plasma a temperatura ambiente per 24 ore, e valutarono l'espressione di miR-15b, miR-16, e miR-24 mediante PCR quantitativa (qPCR). A differenza dei mRNA, i miRNA circolanti esprimevano una notevole stabilità e resistenza alla degradazione da parte delle RNasi endogene. Al contrario, miRNA sintetici aggiunti al plasma umano venivano degradati in pochi minuti, mentre in seguito all'inattivazione dell'attività delle RNasi, sfuggivano alla degradazione. Ciò suggerì che i miRNA "nudi" sono suscettibili ad una rapida degradazione nel plasma, quindi probabilmente i miRNA circolanti che si trovano in circolo sono protetti e resistono all'attività delle RNasi.

Questi miRNA sono stabili e mostrano profili di espressione distinti tra i diversi tipi di fluidi. Data l'instabilità della maggior parte delle molecole di RNA nell'ambiente extracellulare, la presenza e l'apparente stabilità dei miRNA nell'ambiente extracellulare è sorprendente poiché il siero ma anche gli altri fluidi corporei sono noti per contenere ribonucleasi, il che suggerisce che i miRNA secreti sono probabilmente protetti in qualche modo dall'azione di digestione delle RNasi.

I miRNA potrebbero essere protetti dalla degradazione mediante l' "impacchettamento" in vescicole lipidiche o l'associazione con complessi di RNA-binding protein [51, 52] (Figura5). Nonostante si accumulino sempre più prove della presenza di miRNA nei fluidi corporei, l'origine e in particolare la funzione di questi miRNA circolanti extracellulari rimane poco compresa. Una delle idee più

interessanti è che i miRNA extracellulari vengono utilizzati come mediatori della comunicazione cellula-cellula [53]. In questo caso alcuni miRNA sono presumibilmente indirizzati all'esportazione verso una cellula, dove possono essere riconosciuti, internalizzati ed utilizzati .

Utilizzando linee cellulari in coltura, alcuni studi hanno studiato in dettaglio il fenomeno di esportazione dei miRNA. I dati riportavano la presenza sia di miRNA intracellulari che extracellulari, suggerendo l'esistenza di uno specifico sistema di esportazione dei miRNA. Risultati simili sono stati dimostrati da Pigati et al. in cellule epiteliali mammarie, dove la maggior parte di miR-451 e miR-1246 prodotto dalle cellule epiteliali mammarie maligne, ma non da cellule epiteliali mammarie non maligne, veniva rilasciato nel mezzo di coltura [54].

Recentemente, Kosaka et al. hanno dimostrato che il rilascio di miRNA è controllato da sfingomielinasi 2 (nSMase2) attraverso un meccanismo secretorio ceramide-dipendente [55]. Questi risultati suggeriscono l'esistenza di un sistema di esportazione dei miRNA e che proteine trasportatrici possono trasportare selettivamente i miRNA e proteggerli nell'ambiente extracellulare.

Recenti studi hanno inoltre identificato sia mRNA che miRNA in due tipi di vescicole lipidiche derivati da cellule; microvescicole e esosomi. Le microvescicole sono vescicole relativamente grandi (~100nm-1um) rilasciate dalla cellula attraverso il blebbing della membrana. Gli esosomi, invece, sono vescicole più piccole (~30-100nm) rilasciate quando i corpi multivescicolari endosomiali si fondono con la membrana plasmatica. I miRNA sono stati identificati sia negli esosomi che nelle microvescicole derivate da diversi tipi cellulari e fluidi corporei, tra cui mastociti umani e murini [52], cellule di glioblastoma [56], plasma [57], saliva [58] e urine [59]. E 'stato recentemente riportato che miR-150, secreto nelle microvescicole derivate da cellule del sangue umano o a cellule in coltura THP-1, può essere internalizzato dalle cellule endoteliali HMEC-1 e può regolare l'espressione di c-Myb, un noto target di miR-150 [60]. Inoltre, Pegtel et al. hanno dimostrato che i miRNA rilasciati all' intero degli esosomi secreti da cellule infettate dal virus di Epstein-Barr (EBV), possono essere internalizzati dalle cellule mononucleate del sangue e possono sopprimere alcuni geni target di EBV [61].

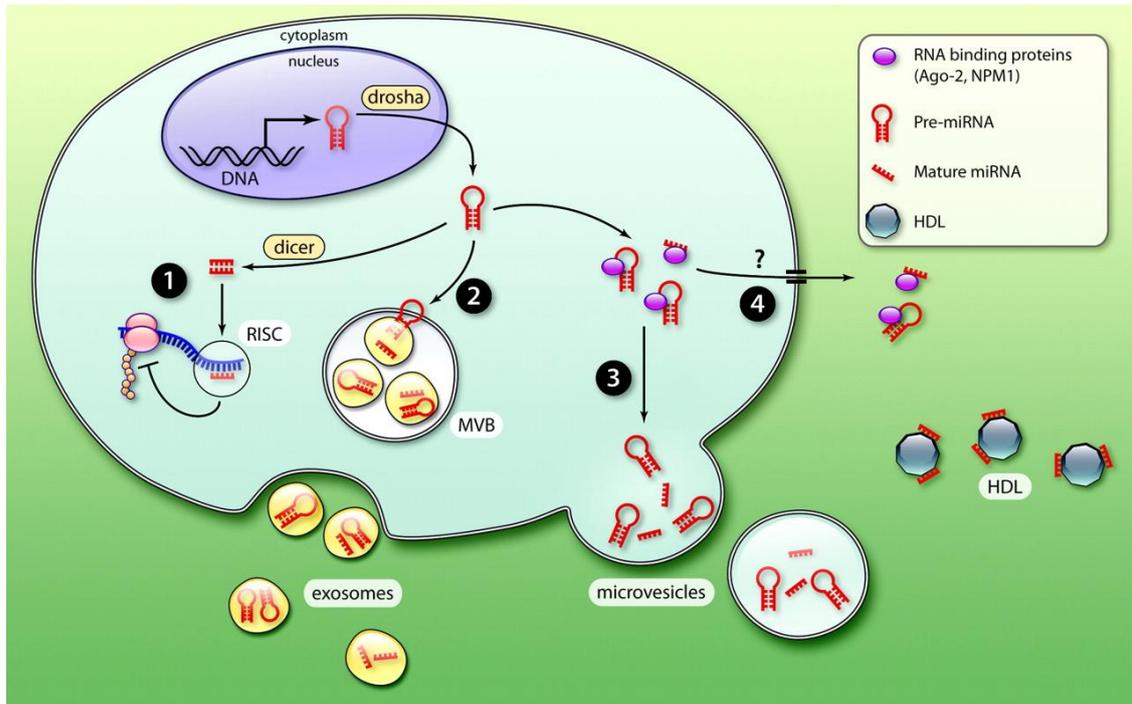


Figura 5. Meccanismi cellulari di rilascio e sistemi di trasporto extracellulare dei miRNA. Nel citoplasma, i pre-miRNA possono essere incorporati in piccole vescicole chiamate esosomi, (2). O nelle microvescicole, (3). I miRNA si trovano anche in circolo non associati alle vescicole, bensì a lipoproteine ad alta densità o legati a RNA-binding proteins, come Ago-2. Non è noto come questi complessi proteina-miRNA vengano rilasciati dalla cellula. Questi miRNA possono essere rilasciati passivamente, come sottoprodotto della morte cellulare, o attivamente, in modo specifico proteina (4) [62]

Un recente studio ha inoltre proposto che le lipoproteine ad alta densità (HDL) oltre al ruolo classico come veicoli di consegna per il colesterolo cellulare in eccesso possano fungere anche come trasportatori di miRNA endogeni. Allo stesso modo delle vescicole, le HDL si legano ai miRNA, facilitandone il trasporto nel sangue e la consegna alle cellule riceventi [63].

È interessante notare che l'analisi dell'RNA totale estratto da HDL e da esosomi provenienti dal plasma di individui sani ha rivelato che il profilo di miRNA è diverso tra queste due strutture.

Sono stati identificati anche complessi Ago-2/miRNA in terreni di coltura cellulare. Questi complessi che risultano essere stabili sono stati caratterizzati mediante cromatografia ad esclusione molecolare per escludere la contaminazione con le vescicole circolanti: mentre una parte dei miRNA veniva co-purificata in associazione con Ago-2, alcuni miRNA, come miR-16 e miR-92a, ma non let-7a, si trovavano associati prevalentemente alle vescicole. Sulla base di questo è stato

proposto un meccanismo specifico per il tipo di cellula di rilascio dei miRNA associati ad Ago-2 o alle vescicole, che però richiede ulteriori delucidazioni[64]. Inoltre, sembrerebbe che Ago-2 non è l'unica proteina capace di legare i miRNA rilasciati nel terreno di coltura cellulare, ma un totale di 12 RNA-binding protein, tra cui nucleofomina (NPM1), sono state identificate mediante spettrometria di massa nel terreno di fibroblasti umani dopo 2 ore dalla privazione del siero [65]. Questi risultati sostengono fortemente che almeno alcuni miRNA esportati vengono utilizzati per la comunicazione cellula-cellula, anche se è necessario molto più studio per determinare come i miRNA vengano specificamente indirizzati alla secrezione, come poi vengano riconosciuti per essere internalizzati dalla cellula ricevente, e quali informazioni possono essere trasmesse tramite questo processo.

## ***LA TEORIA DELLA COMUNICAZIONE CELLULA-CELLULA ATTRAVERSO I MIRNA EXTRACELLULARI***

La presenza dei miRNA nell'ambiente extracellulare ha suscitato l'ipotesi che le cellule rilasciano selettivamente miRNA che mediano la segnalazione cellula-cellula attraverso pathway paracrini o endocrini. Tuttavia, i miRNA circolanti legati alle proteine Ago sembrerebbero essere apparentemente resti non specifici derivanti dall'attività fisiologica delle cellule che vanno incontro a morte [66]. che rimangono stabili per un lungo periodo dopo che le cellule parentali muoiono. Inoltre, non vi sono indicazioni né del rilascio attivo dei complessi Ago-miRNA da parte delle cellule né del loro uptake da parte delle cellule riceventi nei mammiferi. L'opinione che molti miRNA extracellulari vengono rilasciati non selettivamente dopo la morte delle cellule è in accordo anche con il fatto che, in seguito ad aumento della tossicità in alcuni tessuti, i livelli di miRNA tessuto-specifici nel sangue aumentano [67]. Al contrario, ci sono prove crescenti che le cellule "impacchettano" in modo selettivo alcuni miRNA nelle vescicole che poi secernono attivamente. Tuttavia sono ancora da scoprire gli esatti meccanismi di sorting dei miRNA all'interno delle vescicole e di come queste vengano secrete. Inoltre, è stato dimostrato che i miRNA extracellulari "incapsulati" all'interno degli esosomi

possono essere trasferiti alle cellule riceventi, alterandone l'espressione genica e mediandone gli effetti funzionali [52, 56, 61]. Infine, è stato ipotizzato che il targeting cellulare possa essere mediato o dalle proteine di superficie esosomali o dai recettori sulle cellule riceventi. I meccanismi putativi dell'uptake delle vescicole possono essere rappresentati sia dalla fusione tra le membrane che dall'endocitosi diretta [68, 69].

## ***IL MECCANISMO DI SORTING DEI MIRNA ALL'INTERNO DEGLI ESOSOMI***

Una vasta gamma di molecole sono contenute negli esosomi, tra cui proteine, lipidi, DNA, mRNA e miRNA. Tra queste molecole, i miRNA hanno attirato più attenzione, a causa del loro ruolo di regolazione dell'espressione genica. Goldie et al. hanno dimostrato che, la proporzione di miRNA è più elevata negli esosomi che nelle loro cellule parentali [70].

Alcuni recenti studi hanno dimostrato che i miRNA non sono impacchettati in modo casuale all'interno degli esosomi. Guduric-Fuchs et al. hanno analizzato i livelli di espressione dei miRNA in varie linee cellulari e negli esosomi secreti scoprendo che alcuni miRNA (ad esempio, miR-150, miR-142-3p, e miR-451) entravano preferenzialmente negli esosomi [71].

Analogamente, Ohshima et al. hanno confrontato i livelli di espressione dei miRNA appartenenti alla famiglia di let-7 negli esosomi derivati dalle cellule di tumore gastrico AZ-P7A con quelli provenienti da altre linee di cellule tumorali, tra cui la linea di cellule di cancro al polmone SBC-3/DMS-35/NCI-H69, allo stomaco AZ-521, e colon rettale SW480 / SW620, scoprendo che i miRNA della famiglia let-7 sono abbondanti negli esosomi derivati da cellule AZ-P7A, ma risultano meno abbondanti negli esosomi derivati da altre cellule tumorali [72].

Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che i livelli di espressione dei miRNA esosomali sono alterati in diverse condizioni fisiologiche. Il livello di miR-21 è inferiore in esosomi dal siero di donatori sani rispetto ai pazienti con glioblastoma [56]. I livelli di let-7f, miR-20b e miR-30e-3p sono più bassi in vescicole plasmatiche di pazienti con tumore al polmone rispetto ai controlli normali [73].

I livelli di otto miRNA esosomali, tra cui miR-21 e miR141, sono stati trovati disregolati in tumori benigni e tumori ovarici [74].

Tutti questi studi dimostrano che le cellule d'origine possiedono un meccanismo di selezione che guida specifici miRNA intracellulari ad entrare negli esosomi.

Sulla base di ricerche in corso, ci sono quattro potenziali percorsi per il sorting dei miRNA negli esosomi, anche se i meccanismi alla base rimangono in gran parte poco chiari. Questi includono:

1) *pathway che dipendono dalla sfingomielinasi neurale 2 (nSMase2)*. nSMase2 è stata la prima molecola ad essere indentificata per essere correlata alla secrezione dei miRNA attraverso gli esosomi. Kosaka et al. hanno scoperto che l'over-espressione di nSMase2 aumentava il numero di miRNA esosomali, e viceversa l'inibizione dell'espressione di nSMase2 ne riduceva il numero [75].

2) *pathway dipendenti da hnRNPs (heterogeneous nuclear Ribonucleoproteins)*. Villarroya-Beltri et al. ha scoperto che hnRNPA2B1 sumoilata è in grado di riconoscere il motivo GGAG in posizione 3' sulla sequenza del miRNA e causare di conseguenza l'impacchettamento di miRNA specifici negli esosomi.

Allo stesso modo, altre due proteine della famiglia hnRNP, hnRNPA1 e hnRNPC, sono in grado di legare i miRNA esosomali, suggerendo che potrebbero essere candidate nel sorting dei miRNA. [76].

3) *pathway dipendenti dalla sequenza al 3'-terminale del miRNA*. Koppers-Lalic et al. hanno scoperto che miRNA con l'estremità 3' uridilata erano principalmente presentati negli esosomi derivati da cellule B o nelle urine, mentre miRNA con l'estremità 3' adenilata restavano principalmente all'interno delle cellule B [77]. Le suddette due modalità di selezione indicano che la porzione terminale in posizione 3' del miRNA potrebbe contenere una sequenza critica nella scelta dei miRNA che verranno dirottati dentro gli esosomi.

4) *pathway dipendenti miRISC*. È ben noto che i miRNA maturi possono interagire con le proteine formando un complesso chiamato miRISC.

I componenti principali di miRISC includono il miRNA, l'mRNA che viene inibito dal miRNA GW182, e Ago-2. La proteina Ago-2 nell'uomo, che preferisce legarsi a U o A al 5' -terminale del miRNA, svolge un ruolo importante nel mediare il legame tra mRNA e miRNA e di conseguenza la repressione traduzionale o la degradazione della molecola di mRNA [78].

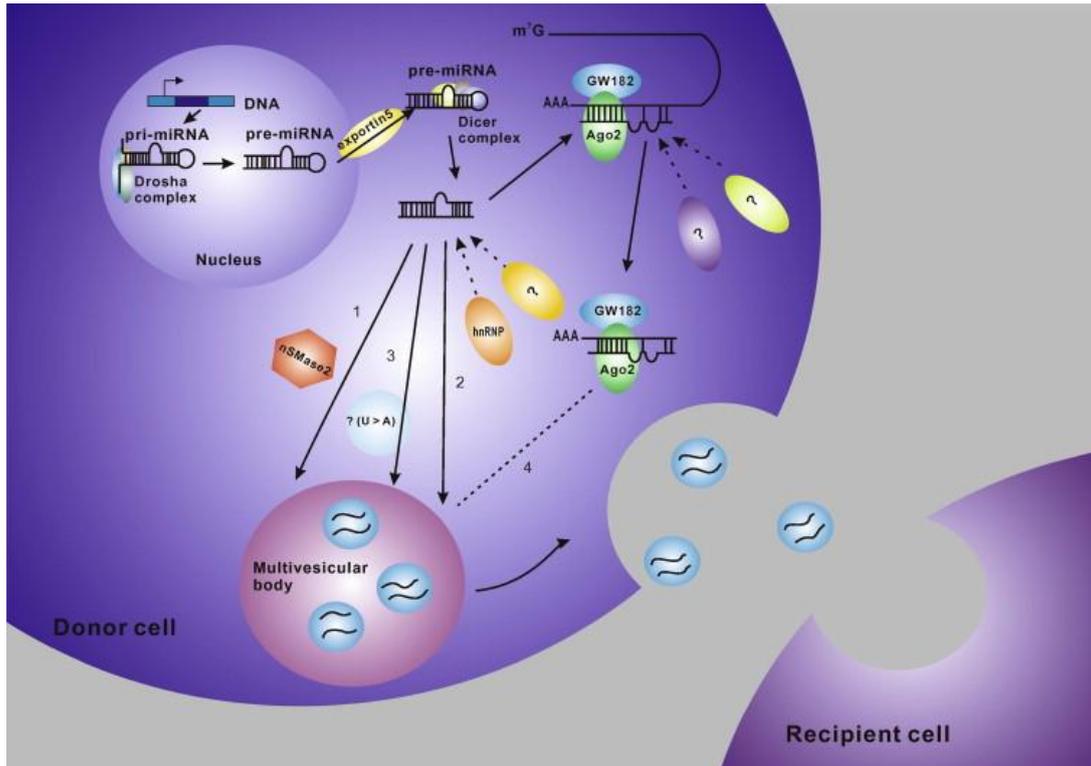


Figura 6. I MiRNA maturi vengono indirizzati agli esosomi con quattro potenziali modalità:

(1) pathway nSMase2-dipendente;

(2) La proteina hnRNP sumoilata riconosce il motivo GGAG al 3' del miRNA e guida miRNA specifici negli esosomi.

(3) i miRNA che sono preferenzialmente ordinati in esosomi hanno più (U) in posizione 3'.

(4). miRISCs è co-localizzato nei siti di biogenesi degli esosomi [79]

Recenti studi hanno riconosciuto una possibile correlazione tra Ago-2 e il sorting dei miRNA negli esosomi: Guduric-Fuchs et al. hanno scoperto che l'eliminazione diretta di Ago-22 diminuisce la quantità di miRNA, che preferenzialmente vengono secreti attraverso le vescicole, negli esosomi di cellule HEK 293 T [71].

Anche altre prove sostengono una relazione tra miRISC e il sorting dei miRNA negli esosomi. In primo luogo, i componenti principali di miRISC sono stati co-localizzati con i corpi multivescicolari (MVB) [51].

In secondo luogo, il blocco del turnover dei MVB nei lisosomi potrebbe portare all'accumulo di miRISC, mentre che il blocco della formazione dei MVB determina la perdita di miRISC [80]. Infine, i cambiamenti nei livelli dei target che vengono repressi dai miRNA, che si verificano in risposta all'attivazione cellulare possono causare l'indirizzamento dei miRNA negli esosomi, coinvolgendo parzialmente i siti di attività dei miRNA (miRISC) e della biogenesi degli esosomi (MVB) [81]

In sintesi, specifiche sequenze presenti in alcuni miRNA possono guidare il loro impacchettamento negli esosomi, allo stesso modo alcuni enzimi o proteine possono controllare il sorting dei miRNA negli esosomi, in maniera sequenza-indipendente (Figura 6).

## ***I MI RNA COME BIOMARCATORI***

Dopo la scoperta del primo miRNA in *C. elegans* nel 1993, ci sono voluti 7 anni per scoprire anche il secondo miRNA, in *C. elegans*. Fino a quel momento, questi piccoli RNA erano considerati molecole specifiche per degli organismi inferiori. L'importanza dei miRNA come molecole regolatrici avvenne quando si scoprì che let-7 era conservato in tutti gli animali. L'identificazione di dozzine di miRNA in tutte le specie ha suggerito che costituiscono effettivamente un enorme gruppo di regolatori molecolari fino a quel momento sconosciuti. Così cominciando ad indagare su quale fosse la loro funzione, cominciò presto ad essere riportato che i miRNA sono altamente correlati alle patologie nell'uomo.

Sono stati portati avanti numerosi studi che analizzavano il coinvolgimento dei miRNA nelle malattie umane mediante lo sviluppo di una piattaforma microarray, che ha reso possibile la profilazione globale di miRNA.

Sorprendentemente, che classificazione dei fenotipi tumorali aveva più successo quando veniva utilizzato il profilo di espressione dei miRNA, piuttosto che quello dei mRNA.

Sebbene l'analisi del profilo dei miRNA nei tessuti umani ha dimostrato di avere grande potenziale come marcatore di malattia, un metodo meno invasivo è sicuramente necessario per rendere questa analisi più pratica. A questo proposito, l'identificazione di miRNA nei fluidi corporei attirò molta attenzione.

Un'importante scoperta fu che i profili dei miRNA nei fluidi corporei di persone malate erano notevolmente diversi dai profili in soggetti sani. Inoltre, i miRNA nei liquidi corporei rimanevano stabili in diverse condizioni estreme, come la bollitura, un pH molto basso o alto, il congelamento-scongelo ripetuto, e la conservazione a temperatura ambiente per un lungo tempo.

Questi studi hanno sollevato la possibilità che i miRNA nei fluidi corporei potrebbero essere utilizzati per diagnosticare malattie. Dopo queste scoperte, sono state condotte centinaia di ricerche per identificare miRNA extracellulari che potrebbero essere utilizzati come marcatori diagnostici o prognostici per malattie specifiche, anche perchè è molto più facile studiare il profilo del livello globale di miRNA, piuttosto che quello di proteine o metaboliti, grazie all'alta sensibilità e velocità delle tecniche di profilatura. Inoltre, esistono migliaia di miRNA con pattern di espressione tissutale e legati a specifiche patologie che possono fornire una grande quantità di informazioni in un tempo relativamente breve .

## ***I MYOMIRNA***

La scoperta che il miRNA let-7 viene espresso in una vasta gamma di animali è stata la prima prova a suggerire che miRNA potevano rappresentare un fenomeno biologico ampio e non solo un nuovo meccanismo di regolazione limitato al *C. elegans* [29]. Un anno dopo la scoperta di let-7, sono stati pubblicati numerosi lavori che non solo individuavano nuovi miRNA anche nell'uomo, ma accennavano anche alla possibilità che alcuni miRNA possono essere espressi in maniera tessuto-specifica. Ad esempio, è stato scoperto che la forma matura di miR-1 è espressa nel cuore umano, ma non nel cervello, rene, fegato, polmone [81, 82].

Il concetto che alcuni miRNA potrebbero essere tessuto-specifici è stato ulteriormente supportato dalla scoperta che miR-1, -122a e -124a sono espressi, rispettivamente, solo nel muscolo, fegato e cervello [83].

Poco dopo, Sempere e colleghi hanno confermato e ampliato di questi risultati, individuando 30 miRNA che si arricchiscono o sono specificamente espressi in un particolare tessuto.

Lo studio di Sempere et al [84] ha fornito la prima descrizione di quelli che vengono chiamati "*MyomiR*" , miR-1, -133a e -206, dimostrando che la loro espressione è fortemente arricchita sia nel cuore che nel muscolo scheletrico [84]. Studi successivi hanno confermato questa specificità del muscolo e in particolare

hanno dimostrato che l'espressione di miR-206 è limitata ai muscoli scheletrici [85-87](Figura 7).

Recentemente, i miRNA tessuto-specifici sono stati formalmente definiti come miRNA maturi che vengono espressi con un livello almeno 20 volte più alto in un tessuto specifico rispetto all'espressione in tutti gli altri tessuti; invece il concetto di miRNA tessuto-arricchiti subentra quando ha livelli di espressione sono meno di 20 volte maggiori nel tessuto arricchito rispetto ad altri tessuti [88].

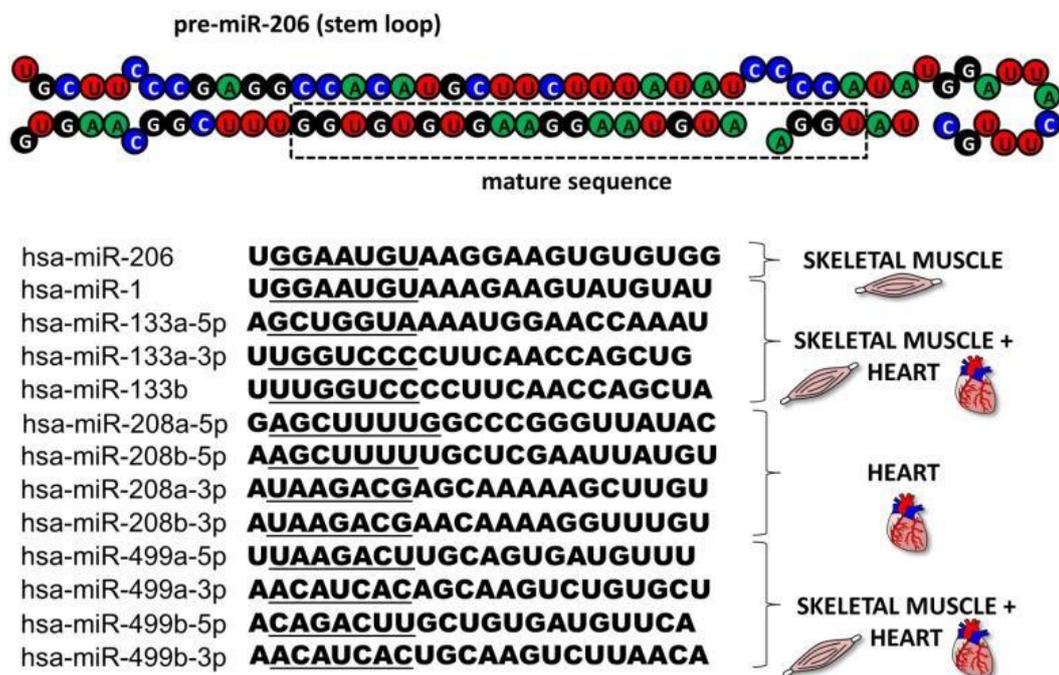


Figura 7. Struttura del pre-miR-206 a doppio filamento e la sequenza del miRNA maturo. Inoltre è indicata la sequenza dei MyomiRNA umani e la loro specificità nei tessuti [89]

## LA REGOLAZIONE DEI MIRNA NEL MUSCOLO

Il mantenimento del metabolismo del muscolo scheletrico, delle dimensioni e della funzione contrattile è un prerequisito essenziale per la salute dell'intero organismo. Il muscolo scheletrico è molto sensibile ai segnali extracellulari e intracellulari indotti dalla contrazione, che rappresentano l'input per numerosi adattamenti fisiologici, tra cui un maggiore metabolismo del substrato, la biogenesi mitocondriale, l'angiogenesi, la crescita muscolare e la rigenerazione. Al contrario,

la mancanza di esercizio fisico, come si è visto in numerose malattie neuromuscolari, muscolo-scheletriche o croniche, come pure nell'immobilizzazione degli arti in seguito a traumi, stile di vita sedentario o con l'invecchiamento, ha un impatto negativo sul metabolismo del muscolo scheletrico. Queste risposte negative hanno un ruolo nella genesi e nella progressione di malattie secondarie, come il diabete e le malattie cardiovascolari, aumentano la gravità di malattie croniche influenzando la regolazione trascrizionale e traduzionale di geni che codificano proteine che controllano il metabolismo muscolare, la crescita, la rigenerazione e la contrazione [90, 91]. Il controllo di questi processi di trascrizione e traduzione è regolato dall'attivazione dei fattori di trascrizione, dalla modificazione degli istoni, e dalla metilazione del DNA.

Tuttavia, la scoperta dei microRNA, ha rivelato un altro livello di complessità nella regolazione trascrizionale e traduzionale [30]. La nostra comprensione di come l'esercizio fisico e la malattia regolano l'espressione e l'attività dei miRNA e di quali siano i loro target (mRNA) implicati nel mantenimento della condizione di salute o nella genesi delle patologie nel muscolo scheletrico è ancora molto limitata. Esplorare questo campo farà progredire la nostra conoscenza dei meccanismi alla base della salute e della malattia del muscolo scheletrico e ci permetterà di rivelare nuovi potenziali bersagli terapeutici che possono essere utilizzati come strumento per migliorare la salute per le persone che soffrono di disturbi muscolari.

La regolazione trascrizionale dei miRNA arricchiti nel muscolo è sotto il controllo dei fattori di regolazione miogenici come MyoD, miogenina, Myf5 e MRF-4, che controllano la rigenerazione del muscolo scheletrico. Questi miRNA possono essere organizzati in gruppi policistronici e trascritti insieme o in parallelo con geni codificanti proteine. I miRNA espressi nel muscolo scheletrico sono modulati in più processi biologici coinvolti nella crescita muscolare scheletrico, sviluppo e manutenzione, tra cui l'atrofia e l'ipertrofia [92].

A prova di quanto detto molti studi hanno utilizzato modelli di atrofia e ipertrofia muscolare per caratterizzare il ruolo e la regolazione dei miRNA potenzialmente coinvolti nel mantenimento della massa muscolare scheletrica.

Per esempio McCarthy e Esser hanno dimostrato che in seguito a 7 giorni di induzione dell'ipertrofia mediante sovraccarico funzionale nel muscolo plantare del topo, l'espressione di miR-1 e miR-133a risultava diminuita del 50% rispetto ai

muscoli controllo [92]. MiR-1 e miR-133a sono stati proposti per contribuire all'ipertrofia muscolare per mezzo della rimozione del loro effetto di inibizione trascrizionale su fattori di crescita, uno dei quali IGF-1. A sostegno di questa ipotesi è stata dimostrata *in vitro* che IGF-1 down-regola miR-1 tramite il pathway Akt/FOXO3A [93]. E che FOXO3A aumenta i livelli di miR-1 con conseguente riduzione dei livelli della proteina IGF-1.

E' noto che lo scarico del muscolo scheletrico mediante immobilizzazione, sospensione degli arti posteriori (HS) o esposizione a microgravità diminuisce la massa muscolare [94]. E' stato dimostrato che l'immobilizzazione muscolare nei ratti, indotta dalla lacerazione del tibiale anteriore, è associata ad una diminuzione dei livelli di miR-1, miR-133a e miR-206 1 giorno dopo l'intervento [95]. MiR-107, miR-221, miR-499 e miR-208b sono stati tutti down regolati dopo 7 giorni di HS [96]. Undici giorni l'esposizione a microgravità diminuisce l'espressione di miR-206 [94]. Tale diminuzione è stata accompagnata da una up-regolazione di FoxO-1, atrogin-1 e miostatina mRNA; tutti regolatori dell'atrofia muscolare [97, 98]. MiR-206 promuove il differenziamento dei mioblasti C2C12 [99] e la rigenerazione del muscolo scheletrico a seguito di infortunio nel topo [100]. Se miR-206 abbia un ruolo diretto o indiretto nel reprimere i geni dell'atrofia è sconosciuta. Tuttavia, atrogin-1 degrada MyoD, che a sua volta regola positivamente miR-206 [101], tuttavia, l'esistenza di un loop atrogin-1/MyoD/miR-206 non è stata studiata.

L'esercizio svolge un ruolo importante nel mantenimento della salute muscolare durante tutto il ciclo di vita, e in particolare l'esercizio contro resistenza rappresenta uno stimolo anabolizzante che aumenta la sintesi proteica e la crescita muscolare. Pochi studi hanno esaminato i cambiamenti dei livelli di miRNA nel muscolo scheletrico in seguito ad un esercizio contro resistenza negli esseri umani. Per esempio Drummond et al. hanno riportato che miR-1 viene ridotto nelle 3-6 ore a seguito di una singola seduta di esercizio contro resistenza, mentre non sono state osservate variazioni dei livelli di miR-133a e miR-206 [102]. Davidsen et al hanno invece riportato che a seguito di un programma di allenamento contro resistenza di 12 settimane finalizzato a indurre l'ipertrofia muscolare, era possibile osservare una differenza nella regolazione dei miRNA nel muscolo scheletrico di soggetti definiti "high responders" vs "low responders" rispetto alla loro risposta al programma di allenamento; [103]. Il protocollo di allenamento ha determinato un aumento nel muscolo scheletrico dell'espressione

miR-451 e una diminuzione di miR-26a, miR-29a e miR-378 solo nel gruppo "low responder" .

Se miR-451, miR-26a, miR-29a e miR-378 contribuiscano a creare una resistenza all'ipertrofia in giovani soggetti sani è una questione che necessita di ulteriori validazioni sperimentali.

L'esercizio di endurance è un altro modulatore dei livelli di miRNA nel muscolo scheletrico.

Nielsen et al. hanno riportato che dopo 12 settimane di allenamento aerobico, l'espressione dei MyomiR-1, miR-133a, miR-133b e miR-206 veniva significativamente down-regolata. Questi miRNA tornavano ai valori basali 2 settimane dopo la cessazione della training . Per quanto riguarda invece una singola seduta di esercizio aerobico, i livelli di miR-1 e di miR-133a risultavano up-regolati [104].

Al contrario, Russell et al hanno riportato che 10 giorni di allenamento di resistenza aumentavano i livelli di miR-1, in concomitanza con un aumento di miR-29b e una diminuzione miR-31

Inoltre, hanno osservato che nelle 3 ore a seguito di una singola seduta di esercizio aerobico, i livelli di miR-1, -133a, -133-b e miR-181 aumentavano. Al contrario miR-9, -23a, -23b e -31 diminuivano [105].

Nello stesso lavoro è anche stato dimostrato che *in vitro* miR-31 interagisce direttamente con HDAC4 un componente del pathway MAPK, nonché con NRF1 coinvolto nella biogenesi mitocondriale e nel metabolismo.

Questi studi dimostrano che l'espressione dei MyomiR è sensibile sia all'esercizio contro resistenza che aerobico, in acuto e in cronico , nonché a stati di inattività. Tuttavia resta ancora da stabilire quali siano i target precisi e i processi molecolari di regolazione di questi miRNA.

Come detto precedentemente una caratteristica fondamentale dei miRNA è la loro resistenza alla ribonucleasi e quindi la loro presenza e stabilità nel sangue anche se il loro ruolo nel circolo non è ancora chiaro.

L'esistenza e la stabilità dei miRNA nel circolo ematico ha portato alla ricerca di biomarcatori per varie malattie come il cancro, il diabete di tipo 2, malattie epatiche e malattie coronariche [50, 54].L'espressione aberrante di miRNA specifici nella circolazione può essere il riflesso di una condizione patologica in un tessuto specifico. Ne consegue che i miRNA circolanti possono essere utili come

biomarcatori di malattia del muscolo scheletrico o degli adattamenti muscolari all'esercizio.

Author	Subjects	Model	Extraction kit	Sample	MiRs							
Baggish et al., 2011	Endurance athletes	Endurance acute exercise bout and training	MicroRNA Extraction Kit, Benevbio, Mission Viejo, CA, USA	Plasma	miR-146a	miR-21	miR-20a	miR-222	miR-221	miR-210	miR-133a	miR-328
Uhlemann et al., 2012	Not specified	Endurance acute maximal exercise bout	Qiagen miRNAeasy, Hilden, Germany	Plasma	miR-126	miR-133						
Uhlemann et al., 2012	Trained	Endurance acute submaximal exercise bout	Qiagen miRNAeasy, Hilden, Germany	Plasma	miR-126	miR-133						
Uhlemann et al., 2012	Trained	Endurance marathon race	Qiagen miRNAeasy, Hilden, Germany	Plasma	miR-126	miR-133						
Uhlemann et al., 2012	Trained	Resistance acute exercise bout	Qiagen miRNAeasy, Hilden, Germany	Plasma	miR-126	miR-133						
Aoi et al., 2013	Untrained	Endurance acute exercise bout and training	TRIzol LS, Invitrogen, Carlsbad, CA	Serum	miR-486							
Bye et al., 2013		Low v High fitness	miRNeasy	Serum	miR-210	miR-222	miR-21					
Sawada et al., 2013	Recreationally active	Resistance acute exercise bout	QIAzol-chloroform-column extraction	Serum	miR-149* (1 h post)	miR-146a (3 days post)	miR-221 (3 days post)	miR-133a				
Roberts et al., 2013		Mdx mouse	TRIzol LS, Paisley, UK and Qiagen miRNeasy® Mini Kit, Crawley, UK	Serum	miR-1	miR-133a	miR-206	miR-22	miR-30a	miR-193b	miR-378	
Roberts et al., 2013		C57B1/10 mice with intramuscular cardiotoxin injection	TRIzol LS, Paisley, UK	Serum	miR-1	miR-133a	miR-206					

Tabella1. miRNA circolanti in risposta all'esercizio, all'allenamento e al livello di fitness aerobico. In rosso quelli down-regolati, in verde quelli up-regolati e in arancione quelli che non hanno subito cambiamenti significativi.

Cambiamenti nei profili plasmatici dei miRNA sono stati osservati a seguito di un esercizio acuto e cronico [106-110]. La Tabella 1 riassume i miRNA circolanti regolati dall'esercizio fisico, e dal livello di fitness.

Uhlemann et al hanno riportato che i livelli di miR-133a in circolo aumentano subito dopo una maratona e una singola seduta di esercizio contro resistenza [107], ma non dopo una sessione di esercizio su tapis roulant o cyclette in soggetti allenati [106, 107]

Al contrario, Aoi et al riportano che i livelli di miR-133a erano troppo bassi sia a riposo che e dopo l'attività fisica in bicicletta per essere misurati in modo affidabile [108].

Nel lavoro Sawada non viene riscontrato nessun cambiamento significativo dei livelli di miRNA dopo una sessione di esercizio di forza.[110]

Baggish et al dimostrano invece che i livelli di miR-21 and miR-222 risultavano aumentati in seguito ad una seduta di esercizio aerobico e dopo 90 giorni di training [106].

Tuttavia, questi due miRNA risultavano altamente espressi in individui con un basso valore di  $VO_{2max}$  rispetto a individui con un alto valore  $VO_{2max}$  [109]

Queste discrepanze possono essere spiegate dalle differenze nei protocolli di esercizio utilizzate, dai vari protocolli di estrazione di RNA che introducono differenze nei livelli di espressione dei miRNA misurati.

Inoltre, essendo l'emolisi è una delle principali fonti di miRNA plasmatici [111] devono essere prese le giuste precauzioni durante il prelievo di sangue e la separazione del plasma per evitare la contaminazione miRNA da parte globuli rossi. L'espressione di miRNA plasma derivati da cellule ematopoietiche è strettamente correlata con il numero di cellule ematopoietiche [111]. Pertanto, i cambiamenti dei livelli circolanti di miRNA all'interno soggetti possono riflettere i cambiamenti indotti dall'esercizio fisico sul numero di cellule del sangue piuttosto che adattamenti specifici del muscolo.

Queste osservazioni suggeriscono che i miRNA del muscolo scheletrico svolgono un ruolo importante nell'adattamento muscolare. L'identificazione di miRNA circolanti e la loro regolazione in seguito all'esercizio o in condizioni patologiche suggerisce che essi possono essere utilizzati come biomarcatori utili a comprendere la condizione del muscolo e i meccanismi che stanno alla base dei suoi adattamenti. Queste osservazioni implicano anche che miRNA potrebbero essere suscettibili all'intervento terapeutico. Tuttavia, al momento conoscenze riguardo sono ancora troppo limitate e ulteriore ricerca è necessario per

determinare se e quali miRNA circolanti possono servire come biomarcatori delle malattie e degli adattamenti.

## ***LE VESCICOLE EXTRACELLULARI***

Negli ultimi dieci anni, le vescicole extracellulari (EV) sono state riconosciute come potenti mezzi per la comunicazione intercellulare, sia nei procarioti che negli eucarioti. Ciò è dovuto alla loro capacità di trasferire proteine, lipidi e acidi nucleici, influenzando così diverse funzioni fisiologiche e patologiche sia delle cellule target che progenitrici.

La ricerca si è particolarmente incentrata sul ruolo delle EV nei diversi processi patologici, per esempio, nel cancro o nelle malattie autoimmuni, e purtroppo il mantenimento dell'omeostasi e la regolazione delle funzioni fisiologiche mediate dalle EV sono state meno studiate.

LE EV sono vescicole membranose rilasciate in una maniera evolutivamente conservata da parte delle cellule di organismi procarioti, eucarioti e piante. L'importanza delle EV sta nella loro capacità di trasferire le informazioni ad altre cellule influenzando così la funzione della cellula ricevente.

I segnali mediati dalle EV possono essere trasmessi attraverso tutte le diverse categorie di biomolecole come proteine, lipidi, acidi nucleici e zuccheri e questo "pacchetto" offre quindi sia la protezione delle informazioni che la possibilità di consegnare simultaneamente più messaggi diversi anche a cellule lontane dalla cellula che ha originato le EV.

Durante il corso dell'evoluzione, sia i procarioti che gli eucarioti hanno sviluppato fini strategie di comunicazione cellula-cellula. Queste strategie, per esempio, hanno aiutato i batteri a coordinare le loro attività di gruppo sociale attraverso il monitoraggio dell'ambiente e influenzando il comportamento di altri batteri, un processo noto come quorum sensing [112].

Queste strategie, tra le quali rientra a pieno titolo il rilascio di EV, permettono anche agli organismi multicellulari di funzionare come un sistema, per esempio, nelle interazioni del patogeno con l'ospite.

Classicamente in biologia cellulare, le cellule eucariotiche comunicano tra loro attraverso l'interazione diretta (segnalazione juxtacrina) e/o secernendo fattori solubili quali ormoni, fattori di crescita e citochine e sappiamo oggi rilasciando EV. Questi fattori possono agire sulla cellula stessa (segnalazione autocrina) o avere un impatto sia su cellule vicine (segnalazione paracrina) che lontane (segnalazione endocrina).

## **BREVE STORIA DELLE EV**

Le prime osservazioni delle EV e della loro rilevanza sono avvenute un po' contemporaneamente in vari contesti fisiologici, senza la consapevolezza che questa forma di comunicazione è una struttura biologica delle cellule universalmente condivisa. In particolare, inizialmente le EV sono state osservate nel 1946 da Chargaff e West [113] nel plasma, come particelle procoagulanti di derivazione piastrinica, e identificate come "polvere piastrinica" da Wolf nel 1967 [114]. Le prime osservazioni includevano anche vescicole identificate durante la calcificazione ossea da Anderson nel 1969 [115]. Negli anni che vanno dal 1970 al 1980, altri studi hanno identificato EV rilasciate nel plasma dalle cellule dei microvilli dell'adenoma rettale [116], o particelle virus-like rilasciate nel terreno di colture di cellule umane o nel siero bovino [117, 118] e vescicole, in seguito chiamate prostasomi, [119], nel liquido seminale [120]. Intorno allo stesso periodo sono state effettuate le prime osservazioni dei frammenti di membrana originati da tumore [121], che fu scoperto agire come pro-coagulanti [122]. Nel 1983, studi riguardo l'ultrastruttura hanno dimostrato che le vescicole venivano rilasciate dai corpi multivescicolari (MVB) dopo la loro fusione con la membrana cellulare durante il differenziamento dei globuli rossi [123]. Più di un decennio dopo, Raposo e al. hanno dimostrato che queste vescicole, poi chiamate esosomi, isolate dai linfociti B trasformati dal virus Epstein-Barr, erano particelle presentanti l'antigene ed erano in grado di indurre una risposta nelle cellule T [124].

*Nel 2006-2007, la scoperta che le EV contengono RNA, e in particolare microRNA, rinnova e accresce l'interesse per queste particelle identificandole come mediatori della comunicazione cellula-cellula [52].*

In seguito a questi studi pionieristici, Le EV sono state isolate dalla maggior parte dei tipi di cellule e fluidi biologici quali saliva, urina, liquido di lavaggio bronco alveolare, liquido amniotico, latte materno, plasma, siero e liquido seminale [125-130].

## ***CLASSIFICAZIONE DELLE EV***

Un passo importante nei recenti sviluppi del settore delle EV è stato fatto nel 2011 dai membri della Società Internazionale di Vescicole Extracellulari (ISEV) con l'obiettivo di unificare la nomenclatura e la metodologia per isolare le EV.

I dati accumulati hanno indicato che il contenuto, le dimensioni e la composizione della membrana delle EV sono molto eterogenee e dinamiche e dipendono dallo stato della cellula di origine e dalle condizioni dell'ambiente .

Ad oggi, sono stati definiti moltissimi sottogruppi di EV, come i corpi apoptotici, le microparticelle ,le microvescicole, le shedding vesicles, gli ectosomi , gli esosomi , le vescicole exosome-like. [131]

Nonostante siano state proposte caratteristiche specifiche per ogni sottopopolazione di EV, al momento non c'è ancora un'identificazione specifica dei marcatori di ogni sottogruppo che sia ampiamente accettata al fine di distinguere queste popolazioni. A questo si aggiunge anche la mancanza di metodi standardizzati di isolamento e caratterizzazione. Inoltre, le procedure di isolamento in genere non riescono a purificare specifici tipi di vescicole ma, invece, producono miscele complesse di vari tipi di EV. Tuttavia, il sub-frazionamento dei sottogruppi di EV può essere realizzabile mediante l'utilizzo della cromatografia ,o con l'impiego di anticorpi contro marcatori di superficie per le EV noti o presunti.

A causa delle difficoltà nei metodi di isolamento, della multidisciplinarietà del campo di ricerca, e dei diversi modi di classificazione, attualmente non vi è consenso circa la nomenclatura da utilizzare per identificare le varie popolazioni di vescicole. Ad esempio, le vescicole vengono spesso chiamate con un riferimento alla cellula o al tessuto di origine ad esempio, dexosomi (esosomi derivati da cellule dendritiche) [132], prostasomi (vescicole derivate dalla prostata) ([119], vescicole della matrice (se provengono da osso, cartilagine e placche aterosclerotiche) [133]o vescicole sinaptiche (vescicole rilasciate dai neuroni) [134].Tuttavia, tali nomi non forniscono un indizio per la classificazione in relazione al tipo di vescicole coinvolte.

In recensioni recenti, le vescicole sono state classificate in sei principali tipi; due tipi sono stati distinti all'unanimità cioè, esosomi e microvescicole (chiamate anche shedding vesicles o microparticelle), a queste si aggiunge la classe delle vescicole

apoptotiche (chiamate anche corpi apoptotici) che comunque vengono sempre più considerate come una classe separata. [135-137]. Inoltre, vengono distinti gli ectosomi, le particelle di membrana e le vescicole exosome-like, in base alle caratteristiche chimico-fisiche del vescicole, tra cui le dimensioni, la densità, l'aspetto in microscopia, la sedimentazione, la composizione lipidica, i principali marcatori proteici, e l'origine subcellulare [68]. Sebbene questa classificazione sia la migliore e la più ampia finora, è difficile da usare nella pratica quotidiana. Per esempio, secondo questo schema una vescicola con un diametro di 50 nm può essere classificato sia come esosoma, che come ectosoma, o come vescicola exosome-like, quindi come menzionato dagli autori stessi si possono ottenere preparazioni di vescicole che sono eterogenee, arricchite di un tipo piuttosto che un altro.

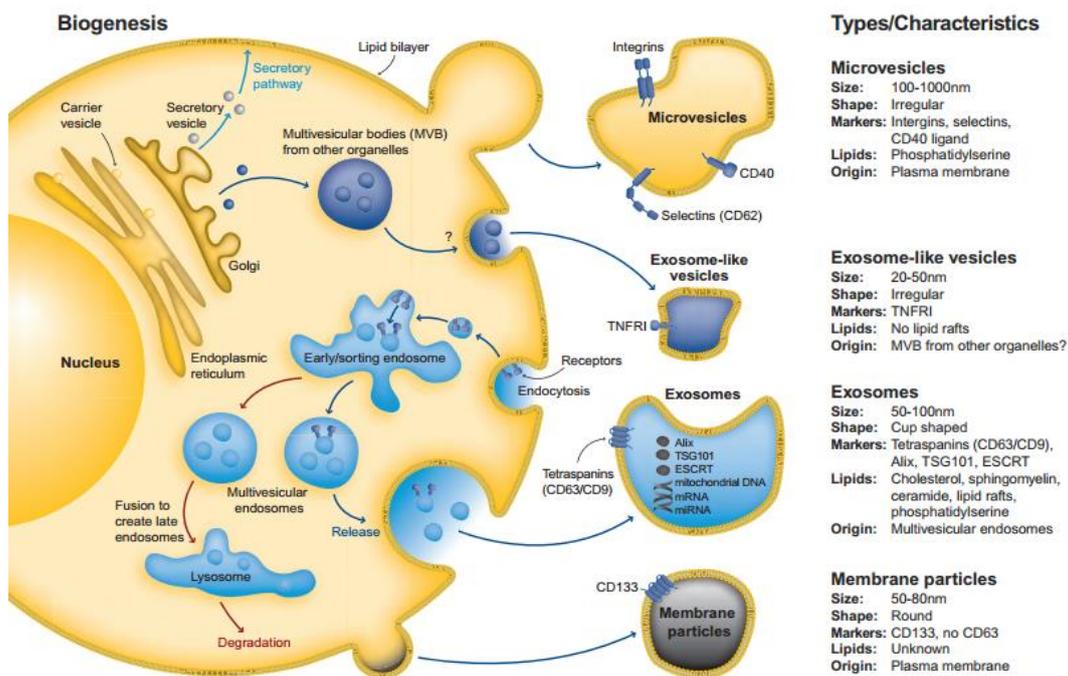


Figura 8. Rappresentazione dei principali tipi di vescicole extracellulari, delle loro caratteristiche e dei meccanismi di biogenesi

In modo più semplicistico, ma sicuramente meno complesso vengono in genere considerate tre sottopopolazioni principali: 1) gli esosomi, 2) le microvescicole (microparticelle), e 3) i corpi apoptotici, I principali tipi di vescicole sono riassunti nella Figura 8

## **ATTUALI LIMITAZIONI NELLA CLASSIFICAZIONE**

Tra i criteri più importanti per la classificazione delle EV vengono considerate le dimensioni, la densità, la morfologia, la composizione lipidica e proteica e l'origine subcellulare che sono riassunti nella Tabella 2.

Si prevede anche che nel prossimo futuro, anche l'indice di rifrazione, e la composizione chimica diventeranno criteri rilevanti in questo tipo di classificazione.

	<i>Diametro</i>	<i>Densità</i>	<i>Morfologia (TEM)</i>	<i>Cellula di origine</i>	<i>Origine</i>	<i>Composizione</i>
	nm	g/ml				
<b>ESOSOMI</b>	50-100	1.13-1.19	Cup-shaped	La maggior parte dei tipi di cellule	Membrana plasmatica. endosoma	Composizione biochimica nota, ma molti lipidi e proteine non sono specifici degli esosomi
<b>MICROVESCICOLE</b>	20-1000	sconosciuta	Cup-shaped	La maggior parte dei tipi di cellule	Membrana plasmatica	Poco conosciuta
<b>PARTICELLE DI MEMBRANA</b>	80-600	1.032-1.068	Cup-shaped	Cellule epiteliali	Membrana plasmatica	CD133
<b>CORPI APOPTOTICI</b>	1000-5000	1.16-1.28	Eterogenea	Tutti i tipi di cellule	Membrana plasmatica, reticolo endoplasmatico	Istoni, DNA

*Tabella2. Panoramica delle principali caratteristiche dei differenti tipi di vescicole derivate dalle cellule eucariotiche.*

**ISOLAMENTO.** A causa della complessità biologica dei fluidi corporei, l'isolamento di vescicole si è dimostrato estremamente difficile. Ad esempio, l'isolamento di vescicole da sangue potrebbe essere influenzato dal tempo tra il prelievo e il processamento del campione, dall'anticoagulante utilizzato, dal processo di separazione applicato, dalla presenza di fibrinogeno e albumina. A causa delle piccole dimensioni, le vescicole risultano inferiori al campo di rilevamento di metodi di rilevazione convenzionali. Di conseguenza, il recupero e la contaminazione del processo di separazione non possono essere quantificati attendibilmente, e non ancora sono stati standardizzati protocolli di isolamento. Le difficoltà del rilevamento e l'isolamento delle vescicole spiegano in parte le differenze nei criteri di classificazione ed espone chiaramente uno dei principali problemi da risolvere da parte del campo di ricerca.

Nella maggior parte degli studi, le vescicole vengono purificate utilizzando protocolli di centrifugazione differenziale. In questi processi, la forza centrifuga è utilizzata per sedimentare le particelle, come le vescicole in soluzione.

In genere, vengono applicate accelerazioni centrifughe di circa 200-1500g per rimuovere le cellule e i detriti cellulari, da 10.000 a 20.000g per far precipitare vescicole più grandi di 100 nm, e da 100.000 a 200.000g per pellettare vescicole inferiori a 100 nm. Inoltre le dimensioni e la densità delle vescicole ottenute e l'efficienza dell'isolamento dipenderanno dalla forma e dal volume delle vescicole, dal volume, dalla viscosità e dalla temperatura del fluido in cui sono presenti le vescicole, dal tempo di centrifugazione, e dal tipo di rotore utilizzato (angolo fisso o swing-out).

Il protocollo di ultracentrifugazione solleva anche altri problemi che devono essere presi in considerazione. La rimozione di tutte le cellule da fluidi biologici può essere difficile, per esempio nel caso del sangue, in cui piccole piastrine e corpi apoptotici si sovrappongono in termini di dimensioni, con le vescicole più grandi. Quando la forza centrifuga applicata per rimuovere le cellule è troppo alta, le cellule possono frammentarsi o diventare attive; il lavaggio dei pellet di EV spesso comporta la perdita di vescicole, e conseguentemente una resa variabile.

Inoltre, un'elevata accelerazione centrifuga di 100.000 a 200.000g può causare la fusione delle vescicole e contaminazione dei pellet con proteine, ostacolando così gli studi di proteomica oppure la co-precipitazione insieme alle vescicole di proteine solubili o miRNA liberi [138-140]. Inoltre, le proprietà funzionali delle vescicole possono cambiare durante l'isolamento. Ad esempio, la centrifugazione può aumentare l'esposizione della fosfatidilserina (PS), rafforzando in tal modo la capacità delle vescicole di promuovere la coagulazione [141].

**DIMENSIONI.** Poiché le vescicole vengono considerate di forma sferica nel loro stato naturale, la dimensione delle vescicole proposta è di solito il diametro. La relazione tra il range del diametro e la concentrazione è la distribuzione delle dimensioni, preferibilmente espressa come numero di vescicole per unità di volume della sospensione. Tuttavia, poiché per determinare la dimensione delle vescicole viene maggiormente utilizzato il TEM, il volume originale della sospensione da cui provengono le vescicole non può essere valutato, e viene utilizzata una distribuzione dimensionale differenziale per

indicare il numero di vescicole per unica unità granulometria. Poiché il TEM viene eseguito nel vuoto, fissazione e disidratazione sono step essenziali della preparazione che possono influire sulle dimensioni e la morfologia delle vescicole [142]. Recentemente sono stati proposti anche nuovi metodi al fine di determinare la dimensione e la concentrazione delle vescicole direttamente in sospensione, tra cui la microscopia a forza atomica e la nano tracking analysis (NTA). Tipicamente, la distribuzione dimensionale delle vescicole ha la forma di una normale gaussiana, ma fino a che punto questo riflette la popolazione naturale di vescicole è sconosciuto, perché i risultati sono fortemente influenzati da variabili (pre)analitiche quali la procedura di isolamento e il limite di rilevamento della tecnica di rivelazione applicata.

**DENSITÀ.** La determinazione della densità delle vescicole è generalmente basata sulla centrifugazione in gradiente di saccarosio.

Perché vescicole sono molto eterogenee in tutti gli aspetti coinvolti nella centrifugazione, e perché le differenze osservate nella densità tra i tipi di vescicole sono molto piccole, discriminare i tipi di vescicole dalla densità è difficile. Quindi questa tecnica viene più che altro utilizzata a supporto delle altre al fine di separare ulteriormente il pellet di EV ottenuto mediante ultracentrifugazione.

**MORFOLOGIA.** La morfologia di vescicole derivate dalle cellule può essere valutata con metodi di rilevamento con risoluzione subnanometrica, come il TEM e la microscopia a forza atomica. Per esempio, la morfologia degli esosomi è stata tradizionalmente definita "cup-shaped", dopo fissazione, adesione, colorazione negativa, e visualizzazione mediante TEM. Tuttavia, fino a che punto questa caratteristica sia un artefatto dovuto alla preparazione del campione o in realtà è una caratteristica unica degli esosomi non riscontrabile negli altri tipi di vescicole è sconosciuta. La morfologia "cup shaped" potrebbe essere una caratteristica utile per distinguere vescicole derivate dalle cellule da altri tipi di particelle con uguali dimensioni.

Con la microscopia a forza atomica, la morfologia delle vescicole aderite ad una superficie può essere studiata direttamente in soluzione. Tuttavia, a causa dell'adesione delle vescicole alla superficie, la loro struttura cambia da sferica a

emisferica o piatta, a seconda della composizione della membrana, e ciò può causare artefatti nell'interpretazione delle dimensioni e della morfologia .

**COMPOSIZIONE PROTEICA ED ORIGINE SUB-CELLULARE** Gli studi sulle EV riguardo la loro origine cellulare e intracellulare rispetto all'origine direttamente dalla membrana plasmatica sono spesso basati sulla misurazione della composizione lipidica e proteica (ad esempio, mediante Western blotting e spettroscopia di massa).

1. Proteine transmembrana o che si legano ai lipidi extracellulari	2. Proteine citosoliche	3. Proteine intracellulari	4. Proteine extracellulari
Sostiene la presenza di membrane nell'isolato	Con capacità di legarsi alla membrana o al recettore	Associate ai compartimenti diversi dalla membrana plasmatica o endosomi	Leganti specificatamente o non specificatamente alle membrane, co-isolate con le EVs
Presenti o particolarmente arricchite nelle EVs/ esosomi	Presenti o particolarmente arricchite nelle EVs/esosomi	Assenti o sottorappresentate nelle EVs/esosomi, ma presenti in altri tipi di EVs	Associazione variabile con le EVs
Esempi: Tetraspanine (CD9, CD63, CD81) Integrine (ITG**) o molecole di adesione (CAM*) Recettori dei fattori di crescita Proteine G eterotrimeriche (GNA**) Phosphatidylserine-binding MFGE8/lactadherin	Esempi: Endosomi o binding proteins di membrana (TSG101, annexins=ANXA*, Rabs=RAB*) Trasduzione del segnale o proteine scaffold (syntenin)	Esempi: Reticolo Endoplasmatico (Grp94=HSP90B1, calnexin=CANX) Golgi (GM130) Mitocondrio (citocromo C=CYC1) Nucleo (istoni=HIST*H*) Complesso argonaute/RISC (AGO*)	Esempi: Acetylcholinesterase (ACHE) Albumina Sierica Matrice extracellulare (Fibronectin=FN1, collagene=COL*A*) Proteine secrete solubili (citochine, fattori di crescita, metalloproteinasi della matrice =MMP*)

Tabella3. *Differenti categorie di proteine e la loro presenza attesa nelle EV isolate*[143]

Nonostante le proteine possano essere tipiche di diverse EV, non possono essere considerate dei veri e propri marcatori specifici dei vari tipi di EV, più che altro rappresentano solo un elemento distintivo delle EV che possono essere particolarmente ricche di proteine o meno. Tuttavia le proporzioni di proteine presenti variano notevolmente nei diversi tipi di EV.

In tal senso, l'ISEV ha fornito quelli che sono dei requisiti minimi sperimentali per la definizione delle EV [143], requisiti che si basano sulle proteine attese o sulle

proteine non attese (Tabella 3), che rispettivamente possono essere presenti o assenti in un determinato tipo di EV o meno (Tabella 4).

Tipo di vescicola	Origine	Dimensione	Marcatore	Contenuto
Esosoma	Via endolisosomiale; formazione intraluminale di corpi multivescicolari e fusione di questi ultimi con la membrana cellulare.	40-120 nm	Tetraspanine (come TSPAN29 and TSPAN30), componenti ESCRT, PDCD6IP, TSG101, flotillin, MFGE8	mRNA, miRNA, e altri RNA non codificanti; proteine citoplasmatiche e proteine di membrana inclusi i recettori e molecole dei complessi di maggiore istocompatibilità
Microvescicola	Superficie cellulare; estroflessione della membrana cellulare	50-1,000 nm	Integrine selectine, CD40 ligand	mRNA, miRNA, RNA non codificanti, proteine citoplasmatiche e proteine di membrana inclusi i recettori
Corpi Apoptotici	Superficie cellulare; estroflessione della membrana di una cellula apoptotica	500-2,000 nm	Vasta quantità di fosfatidilserina	Frazioni nucleari e organelli cellulari

*Tabella 4. La tabella illustra i marcatori presenti nei diversi tipi di vescicole. Tuttavia alcuni di queste proteine non sono strettamente specifici ma sono arricchiti in una categoria di EV rispetto ad altre.[143]*

Ovviamente, questo approccio non fornisce informazioni sulla presenza di contaminanti, come altri tipi di vescicole o proteine co-purificate insieme alle vescicole.

Ad oggi, né la dimensione, né la morfologia, né la composizione biologica costituiscono dei validi criteri che permettono di distinguere un tipo di vescicola dall'altro.

Dal momento che non sono stati identificati degli specifici marcatori delle EV, è fortemente auspicabile isolarle, definirle e caratterizzarle combinando più protocolli, in quanto, come già detto, le proteine non sono dei marcatori specifici delle EV. Ad esempio, le tetraspanine CD9, CD63 e CD81, considerate in precedenza come specifici marcatori degli esosomi, sono state anche trovate nei corpi apoptotici e nelle microvescicole. Oggi, per esempio per la caratterizzazione degli esosomi, si va a ricercare la presenza di componenti endosomiali che rilevino l'origine endosomiale degli esosomi, come Alix, Tsg101 [137].

Di gran lunga il metodo più usato per stabilire l'origine cellulare e il fenotipo delle singole vescicole è la citometria a flusso, che si basa sul rilevamento della dispersione della luce e della fluorescenza delle vescicole marcate. Tuttavia, le vescicole più piccole rilevabili con questa tecnica hanno una dimensione che varia tra 300 e 700 nm su citofluorimetri di vecchia generazione. I citofluorimetri più moderni riescono a rilevare vescicole fino a un diametro di 150 nm [144] Poiché la maggior parte vescicole ha un diametro inferiore a 100 nm, non è sorprendente che secondo recenti stime solo il 2% di tutte le vescicole presenti in fluidi biologici (ad esempio, plasma e urina) vengono effettivamente rilevate [142, 144].

In sintesi, anche se non vi è alcun dubbio sul fatto che esistono diversi tipi di vescicole derivati dalle cellule, le difficoltà riguardo alla loro rilevazione e isolamento ostacolano lo sviluppo di criteri per distinguerle e classificarle. Di conseguenza, la classificazione delle vescicole è chiaramente “work in progress”.

## ***LE MICROVESCICOLE***

Le microvescicole (MV), note anche come microparticelle, sono delle vescicole rilasciate dalla membrana plasmatica in condizioni di stress cellulare e, come gli esosomi, sono state trovate in diversi liquidi biologici. La differenza principale tra le MV e gli esosomi è la dimensione. In realtà, le MV hanno un diametro compreso tra 100 nm e 1,0  $\mu\text{m}$  [135] e si formano come risultato della gemmazione della membrana plasmatica. Questa via di formazione delle MV suppone che, una volta formate, le MV possono portare via con se proteine di membrana della cellula di origine.

Le caratteristiche biologiche e i meccanismi sono sostanzialmente simili agli esosomi, dalle proteine ed il contenuto di RNA alla capacità di captare e trasferire il carico alle cellule bersaglio (Tabella 4).

Sebbene le MV siano strutturalmente simili agli esosomi, esistono delle differenze circa la dimensione, le cellule di origine e la composizione lipidica. Come si può vedere nella *Tabella 4*, c'è un range di dimensione all'interno del quale le MV e gli esosomi possono sovrapporsi, e questo è uno dei problemi che emergono durante la caratterizzazione delle EV, di cui si è già discusso in precedenza. Inoltre, poiché

le MV si formano come estroflessione della membrana plasmatica, la loro composizione lipidica è molto simile a quella della cellula da cui originano, ma la distribuzione dei lipidi nel bilayer di membrana è differente. In particolare, gli amminofosfolipidi, la fosfatidilserina e l'etanolamina non sono intrappolate asimmetricamente nell'elica interna della membrana, ma sono distribuite omogeneamente nel bilayer [145, 146].

## ***I CORPI APOPTOTICI***

I corpi apoptotici sono vescicole rilasciate dalle cellule in fase di apoptosi. La differenza principale tra i corpi apoptotici e le altre EV è la dimensione. Infatti, i corpi apoptotici hanno un diametro compreso tra 500 nm e 2000 nm (Tabella 2) ed una densità compresa tra 1,16 e 1,28 g/ml, che coincide in parte con la densità degli esosomi, mentre da un punto di vista isto-morfologico sono molto più eterogenee rispetto alle altre EV.

I corpi apoptotici utilizzano due diverse vie di formazione, che danno vita a due tipi immunologicamente distinti di corpi apoptotici: [147]:

-corpi apoptotici contenenti DNA ed istoni, che originano dalla membrana plasmatica

-corpi apoptotici senza DNA, che originano dal reticolo endoplasmatico.

Come noto la formazione della protuberanza a livello della membrana è un processo tipico nell'apoptosi. Questo processo sembra precedere il rilascio dei corpi apoptotici e delle MV. In realtà, la formazione della protuberanza necessita della fosforilazione della catena leggera della miosina e dell'attività della Rho-chinasi, che diventa proficuamente attiva in seguito alla scissione della caspasi 3, la quale gioca un ruolo chiave nell'apoptosi.

Una clearance inappropriata dei corpi apoptotici è considerata la causa principale delle malattie autoimmuni sistemiche.

## **GLI ESOSOMI**

Gli esosomi sono vescicole presenti in molti o forse addirittura in tutti i liquidi biologici, tra cui urina, sangue, ascite, e nel liquido cerebrospinale, frazioni di fluidi corporei come siero e plasma, e nei terreni delle colture cellulari.

Il diametro riferito degli esosomi è compreso tra 30 e 100 nm e la densità è tra 1,11 e 1,19 g / ml.(vedi Tabella 2)

Gli esosomi vengono generalmente isolati mediante ultracentrifugazione (100,000-200,000g).

La loro morfologia è definita tipicamente “cup-shaped” . Per quanto riguarda la loro composizione biochimica, gli esosomi sono circondati da una membrana di fosfolipidi che contiene livelli relativamente alti di colesterolo, sfingomieline, e ceramidi e contenente particolari microdomini di membrana resistenti ai detergenti detti “lipid rafts” [137, 148].

Gli esosomi sono caratterizzati dalla presenza di proteine coinvolte nel trasporto nella fusione della membrana, come Rab, GTPasi, annexina e flotillina, componenti del complesso ESCRT come Alix, Tsg101 , heat shock protein (HSP), integrine e tetraspanine, tra cui CD63, CD81, CD82 e [69, 149] [136, 150] Anche se tutte le proprietà anzidette sugli esosomi sono ampiamente condivise dalla comunità scientifica, nessuna di queste è unica e identifica in modo univoco gli esosomi.

**PATHWAY DI FORMAZIONE E RILASCIO.** Il pathway di formazione degli esosomi è di gran lunga il più studiato e comporta la formazione di vescicole intraluminari (ILV) all'interno dei MVB . A loro volta, i MVB possono seguire due destini: o fondersi con i lisosomi per la degradazione del loro contenuto o con la membrana plasmatica liberando le IL sottoforma di esosomi nell'ambiente extracellulare.

Esistono diversi pathway intracellulari di sorting che indirizzano le proteine verso le IL predestinate o alla degradazione o alla secrezione, implicando quindi l'esistenza di diversi tipi di MVB.

La biogenesi degli esosomi inizia con la formazione di vescicole endocitiche da regioni specializzate della membrana plasmatica. Questo processo può essere clatrina-dipendente, come ad esempio per il recettore della transferrina, oppure clatrina-indipendente come per le proteine ancorate a GPI.

Queste vescicole neoformate si staccano dalla membrana plasmatica della cellula, vengono veicolate verso l'endosoma precoce e si fondono con quest'ultimo. L'endosoma precoce forma un compartimento che agisce da stazione principale di smistamento nella via endocitica. Nell'ambiente leggermente acido dell'endosoma precoce, molti recettori di membrana internalizzati cambiano la loro conformazione e rilasciano il ligando. Questi ligandi endocitati che si dissociano sono in genere smistati verso i lisosomi per essere degradati. Al contrario i recettori e qualunque ligando che rimane attaccato ad essi possono avere due destini: ritornare sulla membrana plasmatica, oppure essere veicolato verso l'endosoma tardivo. Gli endosomi tardivi sono vescicole di forma sferica e presentano un ambiente più acido (pH 5,5) rispetto all'endosoma precoce. Negli endosomi tardivi le proteine possono a loro volta prendere due strade: seguire la via lisosomale dove avviene il processo di degradazione, oppure vengono inglobate all'interno di vescicole più piccole denominate vescicole intraluminali che gemmano da vescicole di dimensioni maggiori, identificate come corpi multivescicolari.

Successivamente i corpi multivescicolari vengono veicolati verso la membrana plasmatica e fondendosi con essa rilasciano il loro contenuto nell'ambiente extracellulare. Le vescicole, una volta rilasciate, prendono il nome di esosomi [151]( Figura 9)

Ad oggi i meccanismi che sono alla base della formazione degli MVB non sono chiarissimi, anche se recenti evidenze scientifiche sembrano dare qualche informazione in più sui potenziali meccanismi d'azione. Sono stati proposti diversi modelli che cercano di spiegare come le membrane endosomali dei MVB si invaginano e si staccano per formare le ILV. Questi differenti modelli sono basati su contraddittorie osservazioni di esperimenti effettuati *in vitro* e *in vivo*.

Ad esempio studi sui lieviti hanno dimostrato che le Escrptine (ESCRT) hanno un ruolo chiave nella formazione delle ILV, anche se negli organismi eucarioti superiori sembra che questo meccanismo sia coadiuvato da un meccanismo ESCRT-indipendente [152, 153] Un lavoro pubblicato nel 2001 mette in evidenza che in cellule dendritiche (DC) proteine appartenenti al complesso ESCRT, in particolar modo Tsg101 e Alix, sono fondamentali per la formazione delle ILV [154]. Ulteriori studi hanno evidenziato che la proteina Hrs (membro del complesso ESCRT-0) promuove la secrezione degli esosomi provenienti da cellule dendritiche.

Il meccanismo alternativo alle ESCRT sembra essere svolto da alcuni lipidi di membrana come l'acido lisobifosfatidico (LBPA) e la ceramide [13].

Per esempio è stato dimostrato che le proteine Alix e Vps4B non sono coinvolte nella secrezione degli esosomi in cellule oligodendrocitarie. Questi dati sono supportati da altri studi dove si dimostra che l'inibizione di Vps4B aumenta la secrezione degli esosomi in cellule HeLa [155]. Un lavoro del 2008 svolto dal gruppo di Trajkovic et al. ha dimostrato che gli esosomi purificati da cellule di topo della linea oligodendrocitaria, si formano utilizzando una via ESCRT-indipendente e in particolare che la biogenesi degli esosomi coinvolge lipidi di membrana come la ceramide [156]. Un'ulteriore evidenza dell'esistenza di due diversi pathway proviene da studi che dimostrano che l'acido lisobifosfatidico induce la formazione di ILV predestinate alla degradazione ma non influenza la formazione di esosomi.[157] Ciò è confermato da studi in cui il colesterolo, marcato con perfringolisina, produce e rivela MVB positivi o meno per la perfringolisina nelle cellule B, e ha come risultato che solo i MVB contenenti colesterolo si fondono con la membrana plasmatica con conseguente rilascio di esosomi. Inoltre recenti studi evidenziano la presenza negli esosomi della proteina CD63, una proteina appartenente alla famiglia delle tetraspanine, e sembra anch'essa coinvolta in questo processo [155]. Si pensa che siano i domini citosolici proteici o lipidici arricchiti in tetraspanine CD9 o CD63 a svolgere un ruolo importante nel sorting delle proteine transmembrana verso le ILV [155].

Accanto al "pathway classico" di biogenesi degli esosomi, sembrerebbe esserci una seconda e più immediata via di formazione degli esosomi (Figura 9). Le cellule T e linee cellulari eritroleucemiche rilasciano esosomi direttamente dalla loro membrana plasmatica [158]. Queste vescicole non sono indistinguibili dagli esosomi formati dal classico percorso endosomiale perché sono arricchite con i classici marcatori esosomiali come CD63 e CD81 ed hanno diametro e densità simile.

La misura in cui tali esosomi vengono rilasciati anche da altre cellule o *in vivo* (ad esempio, nei fluidi biologici) è sconosciuta.

Risulta quindi evidente che su questo argomento la comunità scientifica non presenta un parere univoco. Riassumendo il complesso ESCRT non sembra essere il solo meccanismo coinvolto nella biogenesi degli esosomi; inoltre sembra che tale processo sia fortemente influenzato dal tipo cellulare e dalle condizioni

delle cellule in esame (cellule stimulate/non stimulate, differenziate/non differenziate). Future evidenze scientifiche potranno sicuramente dare ulteriori contributi per chiarire meglio questo meccanismo.

Dopo che le ILV si sono formate all'interno dei MVB, il rilascio nell'ambiente extracellulare richiede una serie di passaggi quali il trasporto, l'attracco alla membrana e in ultimo la fusione con quest'ultima. La maggior parte di questi meccanismi non sono del tutto noti, anche se numerosi studi recentemente pubblicati hanno cercato di chiarirli. La maggior parte di questi ha utilizzato la linea cellulare K562, cellule immortalizzate *in vitro* derivanti da pazienti affetti da leucemia mieloide, che sono in grado di produrre esosomi simili ai reticolociti e sono facilmente trasfettabili, quindi ottimo modello per gli studi sul meccanismo di secrezione. Utilizzando questo modello sperimentale è stato dimostrato che Rab11 è importante per l'attracco e la fusione dei MVB alla membrane in maniera  $Ca^{2+}$  dipendente. Rab11 appartiene alla famiglia delle Rab GTPase; il silenziamento di questo gene porta ad una diminuzione della secrezione degli esosomi [159].

Anche Rab35 sembra essere coinvolta in questo meccanismo, infatti è stato dimostrato che Rab35 è importante per il rilascio di esosomi dalle cellule oligodendrocitiche (Hsu, C., et al., 2010). Altre due proteine coinvolte in questo processo sembrano essere Rab27A e Rab27B. In questo importante studio svolto su cellule Hela, linea cellulare *in vitro* tumorale delle cervice uterina, è stato evidenziato che Rab27A e Rab27b insieme ai corrispettivi effettori Slp4 e Slac2b svolgono un ruolo chiave per la secrezione degli esosomi, attraverso l'indirizzamento e la successiva fusione dei corpi multivescicolari alla membrana plasmatica [160].

Un altro studio ha dimostrato un coinvolgimento diretto nella secrezione via esosomi del fattore di trascrizione p53, infatti gli autori hanno evidenziato che attivando p53 tramite radiazioni UV, si ha un aumento della proteina effettrice Tsap6, con conseguente aumento del rilascio di esosomi [161].

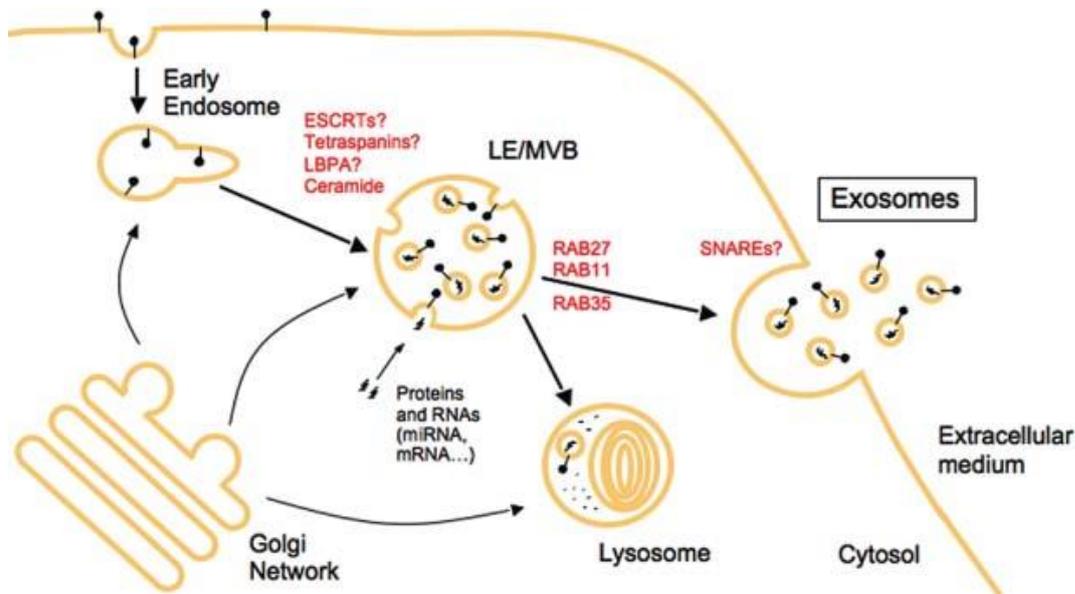


Figura 9. Rappresentazione schematica del meccanismo di biogenesi e secrezione degli esosomi. Gli esosomi originano all'interno dei corpi multivescicolari (MVB), dal distacco di vescicole denominate ILV. La formazione delle ILV può essere mediata da vari fattori quali, il complesso proteico ESCRT, le tetraspanine e da alcuni lipidi come LBPA e ceramide. Il traffico intravesicolare che regola il trasporto dei MVB verso la membrana plasmatica può essere mediato da numerose proteine appartenenti alla famiglia Rab, quali RAB27, RAB11 e RAB35. La fusione dei MVB con la membrana plasmatica sembra essere mediata dalle proteine SNAREs.

Questi dati sono supportati da altre evidenze scientifiche che confermano un coinvolgimento diretto della proteina Tsap6 nel rilascio degli esosomi [162]. La ricercatrice francese Clotilde They ha ipotizzato che durante la fase di fusione dei MVB alla membrana plasmatica ci potrebbe essere un potenziale coinvolgimento di numerose proteine Snare, poiché già coinvolte nei processi di fusione delle vescicole lisosomiali. Tuttavia ad oggi non è stato ancora dimostrato scientificamente un loro diretto coinvolgimento nel rilascio degli esosomi. (Figura 9)

**COMPOSIZIONE.** Secondo la versione corrente del Content Database exosome, Exocarta (versione 4, <http://www.exocarta.org>), sono stati identificati 4563 proteine, 194lipidi, 1639 mRNA e 764microRNAs all'intero esosomi derivati

da tipi di cellule diverse e da più organismi, ulteriore dimostrazione della loro complessità (Figura 10.)

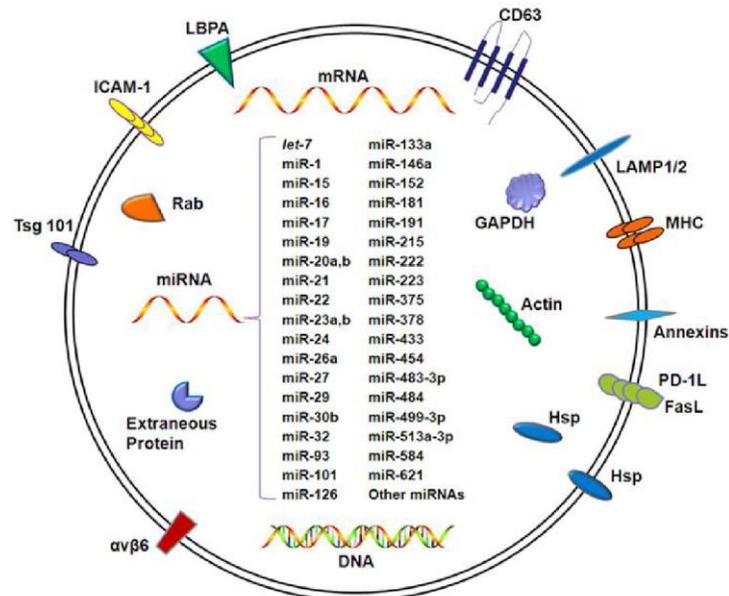


Figura 10. Struttura e contenuto tipico degli esosomi

**-CONTENUTO PROTEICO.** Gli esosomi non contengono uno spettro casuale di proteine, bensì un insieme specifico di proteine derivanti dalla membrana plasmatica, dal pathway di endocitosi e dal citosol. La composizione proteica ha fornito la conferma che gli esosomi sono attivamente secreti da cellule vive [155]. Inoltre, Gli esosomi rilasciati da diversi tipi di cellule trasportano proteine che derivano dalla cellula che li ha originati .

Le proteine citosoliche presenti negli esosomi includono le proteine Ras che promuovono il docking degli esosomi e la fusione con la membrana plasmatica e le annexine (I, II, V e VI) che possono regolare le dinamiche citoscheletriche e gli eventi di fusione con la membrana [163]. Sono state identificate diverse molecole di adesione come intercellular adhesin molecule-1, CD146, CD9, milk-fat globule, EGF-factor VIII (MFG-E8), CD18, CD11a, CD11b, CD11c, CD166 and LFA-3 / CD58 [164]. Tuttavia alcune delle proteine coinvolte nel processo dell' apoptosi sono presenti anche negli esosomi [155]. Gli esosomi contengono anche le heat-

shock proteins Hsp70 e Hsp90 che possono facilitare il loading del peptide sul complesso di maggiore istocompatibilità (MHC) I. Inoltre gli esosomi sono arricchiti in tetraspanine che includono CD9, CD63, CD81 e CD82, che rappresentano uno dei tratti caratteristici degli esosomi .[155]. Altre proteine identificate includono le GTPases ( EEF1A1, eEF2), e le proteine del citoscheletro (actina, sinenina e moesina) .

Gli esosomi trasportano anche alcune proteine cellula-specifiche, come per esempio MHCII e CD86, che sono presenti solo negli esosomi isolati da cellule APC. Allo stesso modo, MFG-E8/lactaderin è presente solo in esosomi provenienti da cellule DC immature .[164] Tra le proteine caratteristiche degli esosomi ci sono quelle che partecipano alla formazione e al trafficking delle vescicole. Un esempio per esempio è Alix e Tsg101 .Inoltre sulla base della loro origine endosomale, gli esosomi tipicamente non contengono proteine del reticolo endoplasmatico, mitocondriali o nucleari.

*-CONTENUTO LIPIDICO.* Allo stesso modo delle proteine, è stato trovato che il contenuto lipidico negli esosomi ha le caratteristiche della cellula di origine [164].Gli esosomi, per lo più, contengono lipidi come, colesterolo, digliceridi, sfingolipidi (inclusa sfingomieline e ceramide), fosfolipidi, glicerofosfolipidi come la fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), foosfatidiletanolamide (PE), foosfatidilinositolo (PI) e poliglicero fosfolipide . La quantità di alcuni lipidi esosomiali aumenta quando comparata con i lipidi delle cellule parentali, in particolare per quanto riguarda la sfingomieline, PS, PC PI e il colesterolo.

Questi lipidi possono essere presenti in quantità fino a quattro volte superiori spiegando così la maggiore rigidità della membrana degli esosomi. E' stato anche riportato che gli esosomi possono contenere lipidi bioattivi, quali le prostaglandine e leucotrieni ed enzimi del metabolismo lipidico che possono generare questi lipidi [165]

*-CONTENUTO DI ACIDI NUCLEICI.* Gli esosomi trasportano una varietà di materiale genetico come RNA, mRNA e miRNA, funzionalmente attivo [55, 155]. In particolare gli esosomi contengono miRNA specifici in grado di regolare l'espressione genica a livello post trascrizionale.

Nel 2011, vari studi hanno dimostrato che i miRNA extracellulari si trovano in modo predominante fuori dagli esosomi o dalle microvescicole e per la maggior parte sono associati alle proteine Argonaute (Ago). Le proteine Ago possono

legarsi direttamente al miRNA maturo , ed è proprio in combinazione con le proteine Ago che un miRNA a singolo filamento è in grado di influenzare centinaia di mRNA differenti .Tuttavia negli ultimi anni si è ipotizzato che i miRNA extracellulari derivano prevalentemente da cellule che vanno in contro a morte rappresentando un prodotto di questo processo e che rimangono nello spazio extracellulare perchè Argonaute-2 è altamente stabile [166], mentre ci sono prove crescenti che le cellule “impacchettano” in modo selettivo alcuni miRNA negli esosomi che poi secernono attivamente. Tuttavia sono ancora da scoprire gli esatti meccanismi di sorting dei miRNA all'interno delle vescicole e di come queste vengano secrete. Inoltre, è stato dimostrato che i miRNA extracellulari “incapsulati” all'interno degli esosomi possono essere trasferiti alle cellule riceventi, alterandone l'espressione genica e mediandone gli effetti funzionali ([52, 55];

L'analisi dei miRNA esosomiali ha dato prova del loro coinvolgimento nel differenziamento delle cellule staminali (let-7), nell'organogenesi (miR-1), nell'emopoiesi (miR-18), nella genesi del tumore (miR-17, miR - 18, miR-19a, miR-20, miR-19b-1, miR-93-1) e delle metastasi [30].

Gli esosomi si trovano in tutti i fluidi corporei, così come i miRNA al loro interno, questa caratteristica fa degli esosomi un mezzo veramente attrattivo per una diagnostica non invasiva [167].

**UPTAKE .** Accanto alle classiche modalità di interazione tra cellule regolate attraverso molecole di superficie (ad esempio, EGFR) e proteine solubili secrete (ad esempio, IL-12) che attivano le cellule bersaglio interagendo con i recettori della superficie cellulare di destinazione, recentemente, la comunicazione intercellulare mediata dagli esosomi ha riscosso molto consenso.

I possibili meccanismi mediante i quali gli esosomi comunicano con la cellula bersaglio sono mostrati in figura. 11.

Come mostrato in Figura 11A, le proteine sulla membrana degli esosomi possono interagire con le cellule bersaglio in modo juxtacrina, attivando così la cellula ricevente. Analogamente, proteine di membrana esosomali possono essere tagliate dalle proteasi e i frammenti risultanti potrebbero agire come ligandi per i recettori di superficie cellulare nella cellula bersaglio (Figura 11B).

Un altro meccanismo di interazione tra gli esosomi e la cellula target prevede che gli esosomi possano fondersi con la cellula bersaglio con conseguente trasferimento del loro contenuto (Figura 11C) alla cellula ricevente.

Inoltre, questa fusione potrebbe modificare alcune delle e caratteristiche della membrana della cellula bersaglio in termini di concentrazioni di lipidi e il trasferimento di proteine di membrana esosomiali sulla superficie delle cellule bersaglio .

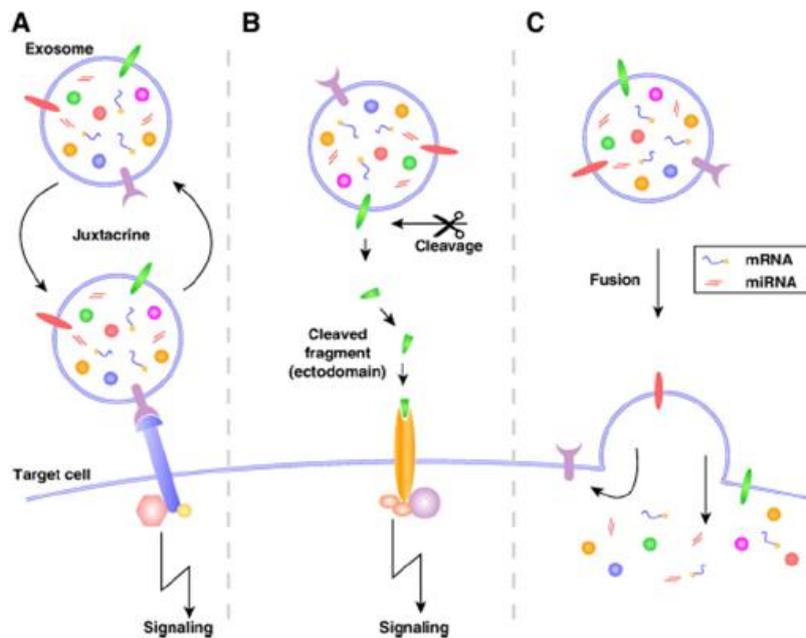


Figura 11. Possibili meccanismi della comunicazione intercellulare mediante gli esosomi. (A) LA membrana degli esosomi può interagire con i recettori presenti sulla cellula target e attivarla. (B) le proteine di membrana degli esosomi possono essere tagliate da proteasi e fungere da ligandi per i recettori delle cellule target. (C) gli esosomi possono fondersi con la cellula ricevente

## ***EV DI DERIVAZIONE MUSCOLARE***

Come detto precedentemente, tutte le cellule di mammifero secernono EV, in particolar modo esosomi e MV.

Tuttavia, fino a poco tempo fa, la secrezione di EV da parte del tessuto muscolare era poco conosciuta, se non addirittura del tutto sconosciuta.

Un precedente lavoro svolto nel nostro laboratorio ha dimostrato che i mioblasti C2C12 rilasciano micro-vescicole contenenti mtDNA e proteine coinvolte nella trasduzione del segnale [168]. Inoltre, piuttosto recentemente, è stata fornita la prima evidenza circa il rilascio *in vivo* di EV da parte del tessuto muscolare umano, le quali veicolano miRNA nel sangue in condizioni fisiologiche [169].

Fino a poco tempo, le miocchine presenti nel secretoma delle cellule muscolari hanno fornito una base concettuale per la comunicazione tra cellule muscolari. In realtà, è stato dimostrato che i miRNA esosomiali secreti dai miotubi sono in grado di down-regolare Sirt1 nei mioblasti [170]. Sirt1 è una proteina che regola il differenziamento e l'espressione genica del muscolo, quindi ciò significa che i miRNA esosomiali derivati dai miotubi potrebbero contribuire all'impegno dei mioblasti nel processo di differenziamento. Inoltre, ciò suggerisce che il trasferimento di miRNA esosomiali sono un potente mezzo attraverso il quale l'espressione genica viene modificata al fine di per regolare l'omeostasi metabolica del muscolo scheletrico.

È stato osservato che nel topo gli esosomi partecipano all'alterazione dell'omeostasi muscolare durante l'insulino-resistenza indotta. In particolar modo l'incremento di palmitato nelle cellule C2C12 porta ad un incremento del rilascio di esosomi. Inoltre gli esosomi derivanti da cellule muscolari incubate con acido palmitico inducono la proliferazione dei mioblasti e modificano l'espressione di geni coinvolti nel ciclo cellulare e nel differenziamento muscolare. Curiosamente, è stato osservato che gli esosomi derivati da cellule trattate con palmitato risultano ricche di palmitato, il che significa che gli esosomi di derivazione muscolare possono trasferire alle cellule muscolari l'effetto dannoso dell'acido palmitico trasferendo lipidi e quindi possono *in vivo* partecipare alle alterazioni dell'omeostasi muscolare nelle diete ricche di grassi [171]. È stato inoltre osservato che i topi trattati con palmitato riportavano ridotti livelli di mRNA di Myod1 e MyoG, due marcatori del differenziamento muscolare, e ciò conferma

che l'olio di palma o in generale una dieta ricca di grassi ha un impatto dannoso sull'omeostasi muscolare.

## ***SCOPO DELLA TESI***

Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare che tipo di EV vengono rilasciate dalle cellule C2C12 durante le prime fasi del processo di differenziamento miogenico.

Inoltre, è stato ipotizzato che l'applicazione di uno stimolo *in vitro* che simula l'esercizio fisico, come la stimolazione con impulsi elettrici (EPS) su miotubi, possa modificare la secrezione di EV. In aggiunta a questo è stato studiato se il muscolo rilascia EV anche *in vivo* e se l'esercizio fisico può modulare i livelli di MyomiRNA contenuti nelle EV.

## ***MATERIALI E METODI***

## ***COLTURE CELLULARI***

Le cellule C2C12, mioblasti murini immortalizzati, sono stati coltivati in atmosfera satura di CO<sub>2</sub> (5%) ed umidità a 37°C in terreno di crescita (GM) composto da DMEM supplementato con antibiotici, 1,4mM di glutammina e 10% di FBS (heated inactivated fetal bovine serum).

Per le analisi sul differenziamento, i mioblasti, raggiunta la confluenza, sono stati trasferiti in terreno DMEM contenente FBS 2%. Nei successivi 5/6 giorni di crescita, le cellule C2C12 differenziavano formando miotubi multinucleati. L' FBS prima di essere aggiunto al terreno DMEM è stato centrifugato overnight a 4°C a 110,000 g usando il rotore SW28 in una ultracentrifuga Beckman per evitare contaminazioni di EV provenienti dal siero di utilizzo. Dopo la centrifugata il sopranatante ottenuto è stato recuperato e filtrato con un filtro da 0,22 µm e successivamente aggiunto al DMEM.

Immediatamente prima dell'applicazione del protocollo di elettrostimolazione, i miotubi in coltura sono stati lavati con PBS, ed è stato sostituito il terreno di coltura con DMEM contenente FBS al 2% fresco.

Le cellule Raw 264.7 (linea cellulare di macrofagi murini immortalizzati) sono state coltivate in atmosfera satura di CO<sub>2</sub> (5%) ed umidità a 37°C in terreno di crescita composto da DMEM supplementato con antibiotici, 1,4mM di glutammina e 10% di FBS (heated inactivated fetal bovine serum).

## ***PURIFICAZIONE DI EV DA TERRENO DI COLTURA***

La purificazione delle EV da terreno è stata effettuata seguendo le linee guida riportate in Turchinovich et al. [172] .

Il terreno di coltura è stato centrifugato per 15 minuti a 1000g per eliminare la contaminazione delle cellule.

I surnatanti sono stati ulteriormente centrifugati per 30 minuti a 10.000g e successivamente per 30 minuti a 18.000g. I surnatanti ottenuti sono stati filtrati attraverso un filtro di 0,22µm e poi ultracentrifugati a 100,000g per 70 minuti al fine di pellettare le EV. Le EV precipitate sono state lavate in 13 ml di PBS, ri-pellettate e risospese in PBS.

## **SEPARAZIONE MEDIANTE GRADIENTE DI DENSITÀ**

Il protocollo di ultracentrifugazione potrebbe portare alla co-precipitazione, insieme alle vescicole, di miRNA liberi e proteine solubili, per ovviare a questo problema le EV ottenute dalle ultracentrifugazioni sono state ulteriormente separate utilizzando un gradiente di densità discontinuo a base di iodixanolo, in cui le particelle sedimentano in funzione della loro densità andandosi a posizionare dove la loro densità è uguale a quella del mezzo.

Sono state preparate soluzioni al 40% (w/v), 20% (w/v), 10% (w/v) e 5% (w/v) di iodixanolo diluendo OptiPrep (60% (w/v) aqueous iodixanol (Axis-Shield) con saccaroso 0,25M/Tris 10mM, pH 7,5 ed è stato costruito un gradiente come riportato in Tauro et al. [173] sul quale è stato sovrapposto il pellet di EV purificato da terreno di coltura o da plasma (risospeso in 500 ml di sucrose 0,25M/Tris 10 mM, pH 7,5) e il tutto centrifugato a 100,000g , overnight a 4°C.

Al termine della centrifugazione sono state ottenute dodici frazioni da 1 ml, la cui densità è stata determinata mediante assorbimento, a 244nm, delle frazioni diluite 1: 10.000.

Successivamente ogni frazione è stata diluita con 13 ml di PBS e quindi ricentrifugata a 100,000g per 1 ora a 4°C Il pellet ottenuto è stato risospeso in PBS.

## **TRATTAMENTO DELLE CELLULE CON EV**

Le EV purificate dal terreno di coltura di cellule MyoB, MyoT0, MyoT2 e MyoT4, e le vescicole MyoT0/T2 recuperate dalle frazioni ottenute in seguito alla separazione mediante gradiente di densità, sono state risospese in 100µl di terreno di coltura DMEM 10%. Le EV sono state successivamente filtrate con filtro 0,2µm e poste in interazione con cellule mioblasto per 24 ore.

Le vescicole MyoT0/T2 recuperate dalle frazioni del gradiente sono state utilizzate anche per il trattamento sulle cellule Raw 264.

Al termine del periodo d'incubazione le cellule sono state lavate con PBS e successivamente staccate dalla piastra con Trypsina. Le cellule recuperate sono

state risospese in Trizol, ed utilizzate per le successive analisi dell'espressione genica.

## ***WESTERN BLOTTING***

Dal pellet di EV sono state estratte le proteine mediante la separazione con fenolo della fase acquosa contenente RNA e della fase organica contenente le proteine. Il pellet di proteine ottenute è stato risospeso in tampone ISOT (urea 8M, 4% CHAPS, DTE65 mM, Tris base 40mM) sonicato, centrifugato a 18.000g, e infine dosato mediante il saggio Bradford.

I campioni, dopo aver aggiunto Laemmli sample Buffer 4X (rapporto 1:4), sono stati caricati su un gel SDS-PAGE al 12% per l'elettroforesi e successivamente blottati su una Membrana PVDF (GE Healthcare).

Gli anticorpi primari utilizzati sono stati incubati overnight a 4°C, e successivamente è stato aggiunto l'anticorpo secondario coniugato HRP (Pierce). Gli immunocomplessi sono stati visualizzati utilizzando il Supersignal Dura reagent (Pierce), e le lastre auto-radiografiche ottenute sono state quantificate utilizzando il software ImageJ.

## ***ELECTRICAL PULSE STIMULATION (EPS)***

È stato utilizzato uno stimolatore elettrico composto da 2 elettrodi in carbonio, collegati attraverso dei cavi elettrici ad uno stimolatore Grass SD9 (Grass Instruments, Quincy, MA, USA) in grado di generare impulsi variabili.

Siccome il generatore produceva impulsi monopolari di forma quadrata, per evitare l'elettrolisi, è stato utilizzato un condensatore (220  $\mu$ F) che, collegato in serie al circuito, è in grado produrre un segnale con polarità alternata, generando un impulso bipolare, con una forma quasi-quadrata nel segnale positivo (Figura 12).

Al fine di poter valutare quali fossero i parametri migliori di stimolazione utilizzabili nel nostro modello, i miotubi della linea cellulare C2C12 sono stati sottoposti a differenti protocolli di stimolazione elettrica:

- 80V con un impulso della durata di 30ms, frequenza di 1Hz, per 2 h;
- 100V con un impulso della durata di 30ms, frequenza di 1Hz, per 2 h;
- 100V con un impulso della durata di 40ms, frequenza di 1Hz, per 2 h.

L'elettrostimolazione è avvenuta in un incubatore con atmosfera satura di CO<sub>2</sub> (5%) ed umidità a 37°C per 2 ore, dopo di che il terreno di coltura è stato prelevato ed utilizzato per l'estrazione delle EV.

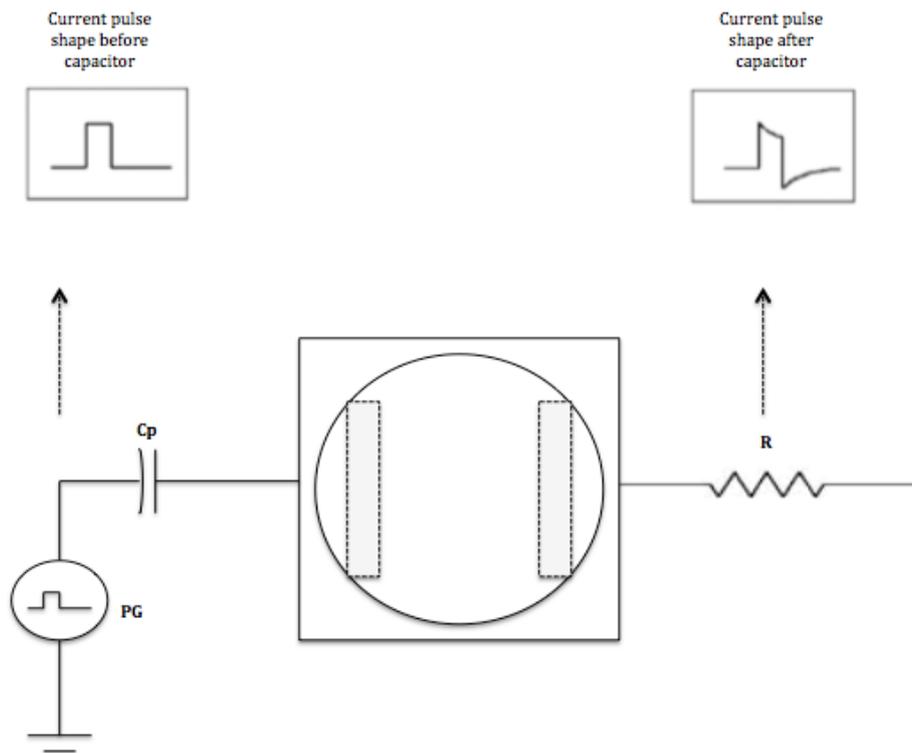


Figura 12. Schema semplificato dello stimolatore elettrico utilizzato per la contrazione delle colture cellulari C2C12. PG rappresenta il generatore di impulsi; Cp il condensatore di disaccoppiamento che trasforma l'onda quadrata in un'onda bipolare; R è la resistenza

## ***NANOPARTICLES TRACKING ANALYSIS (NTA)***

Il Malvern NanoSight LM10 utilizza la tecnologia dell'analisi del monitoraggio delle nanoparticelle.

Questa tecnologia unica utilizza le proprietà sia del light scattering e sia del moto browniano, per ottenere la distribuzione dimensionale e la misura della concentrazione di particelle in sospensione liquida. Un fascio laser passa attraverso la camera del campione, e le particelle in sospensione che si trovano sul percorso di questa luce possono facilmente essere visualizzate tramite un microscopio 20x su cui è montata una telecamera. La telecamera funziona a 30 frame al secondo (fps), catturando un file video delle particelle che circolano muovendosi con moto browniano. Il software controlla tutte le particelle individualmente e utilizzando l'equazione di Stokes-Einstein calcola i loro diametri idrodinamici. ([www.malvern.com](http://www.malvern.com))

Le vescicole presenti nel pellet ottenuto dopo la centrifugazione del terreno di coltura prelevato dopo l'elettrostimolazione sono state analizzate mediante il monitoraggio delle nanoparticelle, utilizzando il sistema NanoSight LM10 (NanoSight Ltd, Amesbury, Regno Unito), configurato con un laser 405nm e una fotocamera sCMOS ad alta sensibilità (OrcaFlash2.8, Hamamatsu C11440, NanoSight Ltd). I video prodotti sono stati analizzati utilizzando il software NTA (versione 2.3, build 0025). La temperatura dell'ambiente è stata registrata manualmente e non ha superato i 25°C.

Ogni campione è stato diluito in PBS filtrate 0.2µm. Per ogni campione, sono stati registrati più video di 60 secondi al termine dei quali è stato generato un istogramma con le medie degli istogrammi di ogni singolo video.

## ***APPROVAZIONE ETICA PER LO STUDIO IN VIVO***

Il protocollo sperimentale è stato eseguito secondo la Dichiarazione di Helsinki del 1975, nel testo riveduto nel 2008 riguardo ai principi etici per la ricerca medica che coinvolge soggetti umani. Il progetto è stato approvato dal comitato

scientifico dell'Università degli Studi di Urbino Carlo Bo (Approvazione Numero 28507). Il consenso informato scritto è stato ottenuto da tutti i partecipanti.

## **CARATTERISTICHE DEI SOGGETTI RECLUTATI**

Hanno partecipato allo studio 22 studenti maschi iscritti all'Università di Urbino "Carlo Bo" che sono stati scelti sulla base delle risposte che hanno fornito alle domande di un semplice test-intervista, atto a ipotizzare il loro livello di fitness con lo scopo di reclutare soggetti con diversi livelli di forma fisica, in modo che coprissero l'intero range di fitness aerobica.

L'intervista serve a valutare la frequenza, l'intensità e la durata di allenamento settimanale dei soggetti, permettendoci così di effettuare uno screening iniziale basato sul presunto livello di fitness dei soggetti, che è stato poi confermato attraverso dei fitness-test diretti (vedi sotto).

Tra i criteri di esclusione sono stati tenuti in considerazione: la partecipazione a qualsiasi programma regolare di allenamento di resistenza per almeno 1 mese prima della sperimentazione; il trattamento recente o cronico ( $\leq 2$  settimane) con farmaci che agiscono sul muscolo scheletrico; recenti ( $\leq 3$  mesi) lesioni muscolari traumatiche; trascorsi di malattie cardiovascolari.

Dei 22 soggetti reclutati solo 18 hanno completato lo studio (vedi Tabella 5 per le caratteristiche dei partecipanti), inoltre 7 di loro sono stati assegnati a un sottogruppo che è stato sottoposto sia al fitness-test che a una sessione di esercizio acuto (vedi sotto).

	Age	Height	Body mass	BMI	FM	HR <sub>max</sub>	VO <sub>2max</sub>	Reference
	(year)	(m)	(Kg)	(Kg/m <sup>2</sup> )	(%)	(b min <sup>-1</sup> )	(ml*Kg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	centile*
mean	26	1.76	70.1	22.7	13.9	184.4	58.1	n.a.
S (±)	4.8	0.06	9.0	2.9	5.6	2.4	13.1	n.a.
range	min	20	57	18.2	4.9	183	37.7	<25
	max	36	89	28.4	24.3	190	75.1	>99

Tabella 5. Caratteristiche dei 18 soggetti partecipanti. \*valore percentuale relativo all'età (ACSM)

## **MISURAZIONI**

**ANTROPOMETRIA.** Per ogni soggetto sono stati misurati peso (a piedi nudi con un'approssimazione di 0.5 kg) e altezza (a piedi nudi e con il capo posto secondo il piano di Francoforte con un'approssimazione di 0.01m); in base ai valori ottenuti è stato effettuato il calcolo del Body Mass Index (BMI) ( $\text{kg} / \text{m}^2$ ).

Inoltre, al fine di poter calcolare la massa grassa, i soggetti sono stati sottoposti alle misurazioni plicometriche (plica sottoscapolare destra, bicipitale, tricipitale, e sovra-iliaca, con approssimazione di 0,001 m) effettuate in triplicato utilizzando una pinza skinfold Harpenden (Baty internazionale).

**FITNESS TEST.** Al fine di poter confermare il livello di fitness dei soggetti che era stato stimato con il test-intervista, i partecipanti sono stati sottoposti a un fitness-test che consisteva in una prima parte durante la quale veniva effettuata una corsa incrementale eseguita su tapis roulant (Technogym) e una seconda parte rappresentata uno stage incrementale ad esaurimento.

La prima parte del test era a sua volta suddivisa in step da 3 minuti durante i quali la velocità del treadmill aumentava di 1 km/h ogni step, mentre la pendenza rimaneva costante a 1%. In base al livello di forma fisica dei partecipanti la velocità di marcia durante questa fase variava da 8 km/h a 13 km/h e gli step completati sono stati da un minimo di 5 a un massimo di 9. Il tapis roulant è stato fermato quando i soggetti erano in grado di completare solamente un altro step.

Successivamente a questa fase i partecipanti eseguivano 5 minuti di defaticamento seguito da 10 minuti di riposo.

Nella seconda parte del protocollo, è stata calcolata la velocità di marcia (mantenuta costante) sottraendo 2 km/ h dalla velocità massima raggiunta durante la prima fase del test, mentre l'inclinazione del tapis roulant veniva aumentata dell'1% dopo ogni 1 minuto fino a quando il soggetto non era più in grado di continuare, nonostante forti incitazioni verbali.

Durante tutto il test è stata monitorata la frequenza cardiaca (FC) mediante cardiofrequenzimetro (Polar Electro) e sono stati campionati gli scambi gassosi polmonari respiro per respiro mediante un metabolimetro ( $V_{\text{max}}$ , Carefusion). Prima di iniziare ciascuna prova, gli analizzatori di gas del metabolimetro sono stati calibrati sulla base dell'aria dell'ambiente e di un campione di gas noto (16%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), mentre il misuratore di flusso a turbina è stato calibrato con una

siringa a volume noto (3 litri); è stato valutato che i soggetti avevano raggiunto il loro massimo consumo di ossigeno ( $VO_{2max}$ ) quando si raggiungeva un plateau del  $VO_2$  nonostante un incremento dell'intensità dell'esercizio; quando il respiratory exchange ratio superava 1.1; oppure quando la frequenza cardiaca arrivava al 90% della frequenza massima stimata sulla base dell'età.

Il  $VO_{2max}$  è stato definito come il valore più alto, espresso in media di 20 secondi, durante l'ultimo minuto dello stage di verifica.

### ***PROTOCOLLO DI ESERCIZIO ACUTO***

Tra i partecipanti al progetto, i 7 con il valore di  $VO_{2max}$  maggiore sono stati scelti per far parte di un sottogruppo che veniva sottoposto a una sessione di esercizio aerobico acuto.

La sessione di esercizio era composta da 15 minuti di riscaldamento che prevedeva una corsa su tapis roulant (inclinazione costante all'1%), con un progressivo aumento della velocità (fino a 2 km/h in meno rispetto a quella ipotizzata per l'esercizio) seguita da 5 minuti di recupero.

Successivamente venivano effettuati 40 minuti di corsa a intensità vigorosa mantenendo l'inclinazione del tappeto all'1%. L'intensità di esercizio è stata fissata a circa l'80% del  $VO_{2max}$  ed è stata monitorata mediante HR. Il target HR è stato calcolato dai dati campionati nella prima fase del fitness test, come media degli ultimi 30 secondi del terzo minuto dello step che aveva il consumo di ossigeno all'80% del  $VO_{2max}$ . Di conseguenza la velocità del tapis roulant è stata adeguata ogni volta che la differenza tra la HR raggiunta durante l'esercizio e quella target era superiore a  $\pm 5$  battiti al min<sup>-1</sup>.

### ***PRELIEVI DI SANGUE***

I prelievi di sangue sono stati effettuati dalla vena antecubitale, un'ora prima del fitness-test in stato di digiuno e riposo, e raccolti in provette contenenti EDTA

per campioni di plasma (12 ml) (Becton Dickinson). Nel caso dei soggetti assegnati al sottogruppo che svolgeva esercizio fisico, il prelievo di sangue è stato ripetuto anche un'ora dopo la fine dell'esercizio aerobico.

Immediatamente dopo il prelievo, il sangue intero è stato centrifugato (1000g, 4°C, 10 minuti) per separare la frazione plasmatica. Successivamente, 5ml di plasma sono stati utilizzati per la purificazione delle EV, la restante parte è stata aliquotata e congelata a -80°C.

### ***PURIFICAZIONE DI EV DA PLASMA***

La purificazione delle EV è stata effettuata seguendo le linee guida riportate in Turchinovich et al[172]. Più nel dettaglio, il plasma è stato centrifugato per 15 minuti a 1000g per eliminare la contaminazione cellulare, successivamente i surnatanti sono stati diluiti con 5ml di PBS e ulteriormente centrifugati per 30 minuti a 10.000g e per 30 minuti a 18.000g. I surnatanti ottenuti sono stati filtrati attraverso un filtro di 0,22 µm e poi ultracentrifugati a 100.000g per 70 minuti al fine di pellettare le EV. Le EV precipitate sono state lavate in 13 ml di PBS, ripellettate e risospese in PBS.

### ***ISOLAMENTO DEGLI ESOSOMI MEDIANTE IMMUNO-CAPTURING***

Il pellet di EV ottenuto dal plasma in seguito al protocollo di ultracentrifugazioni seriali è stato risospeso in PBS+BSA 0,1% ed è stato pre-incubato con Exosome-Dynabeads streptavidina per 2 ore a 4°C in rotazione per ridurre i legami aspecifici. Successivamente le beads sono state eliminate utilizzando un magnete mentre l'eluato è stato incubato nuovamente con biglie magnetiche coniugate con anti-alfa-sarcoglicano, overnight a 4°C in rotazione. Le EV legate alle biglie sono state lisate direttamente con Qiazol (Qiagen) per la successiva purificazione di miRNA e proteine.

## **QUANTIFICAZIONE DEI MIRNA**

L'RNA totale estratto dal pellet di EV è stato purificato utilizzando il kit miRNeasy Mini (Qiagen), e trattato con l'enzima DNase I (Ambion) per digerire eventuale DNA contaminante.

Per l'identificazione di mir-206 nel pellet di EV è stato prima sintetizzato il cDNA utilizzando TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies).

Per amplificare il cDNA è stato utilizzato un sistema Applied Biosystems StepOne Plus Real-Time PCR che si serve di una sonda Taqman fluorescente e un set di primer.

Per la quantificazione dei miRNA contenuti nelle EV in risposta all'esercizio fisico è stato utilizzato il kit miScript per la trascrizione inversa (Qiagen). Le PCR quantitative sono state eseguite partendo da 2 microlitri di cDNA con un sistema StepOne Plus Real-Time PCR (Applied Biosystems) utilizzando il miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) e miScript Primer assay (Qiagen) specifici per i miRNA umani mir-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-181-5p, mir-499 e miR-146a.

Inoltre, è stata effettuata l'analisi di espressione di miRNA plasmatici stabili, miR-16, miR-191, miR-24 e di uno spike-in esogeno, mir-39 che sono stati utilizzati come normalizzatori. Le condizioni di PCR-real time utilizzate sono state le seguenti: 95°C per 10 minuti seguiti da 45 cicli composti da tre passaggi a 95°C per 15 secondi, 55°C per 15 secondi e 70°C per 30 secondi per miScript Primer Assays (Qiagen) e 95°C per 10 minuti seguiti da 45 cicli composta da due passaggi a 95°C per 10 e 60°C per 1 minuto per il sistema Taqman (Applied Biosystems). I cq sono stati determinati con il metodo CY0 eseguito secondo il metodo  $\Delta Cq$ .

## **ANALISI STATISTICA**

Ciascuna condizione sperimentale è stata testata in duplicato e ciascun esperimento è stato effettuato almeno tre volte.

Per l'analisi statistica sono stati utilizzati il test T di Student e l'ANOVA test seguita dal test di Bonferroni. Per ciascuna variabile è stata verificata la normalità

della distribuzione Kolmogorov-Smirnov. La significatività statistica è stata fissata  $p < 0,05$ .

## ***RISULTATI***

## **LE CELLULE C2C12 RILASCIANO EV DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO MIOGENICO**

Nell'ultimo decennio, le proteine secrete dal muscolo scheletrico sono state identificate come importanti attori nella comunicazione intercellulare. L'analisi del secretoma associato alla miogenesi del muscolo scheletrico suggerisce che le miochine svolgono un ruolo importante nel regolare i processi di comunicazione e di coordinamento nel differenziamento delle cellule muscolari stesse [22, 23].

Il differenziamento miogenico è un processo complesso che identifica nelle cellule satellite, le cellule staminali del muscolo scheletrico per eccellenza, gli attori principali. Queste cellule si trovano in un ambiente specializzato chiamato *nicchia* (*niche*), la cui anatomia cambia dinamicamente durante lo sviluppo e la rigenerazione del tessuto muscolare, influenzandone il comportamento.

La plasticità di questa nicchia è attribuibile al continuo scambio di segnali tra cellule satellite e cellule muscolari, ma anche tra cellule satellite e una moltitudine di tipi di cellule funzionalmente diverse, in particolare cellule del sistema immunitario, fibroblasti, mesangioblasti che sono ormai considerate costituenti importanti della nicchia delle cellule satellite.

Pertanto, l'espressione di miochine è necessaria allo sviluppo, la crescita e il mantenimento dell'omeostasi del muscolo scheletrico e dell'intero organismo.

Studi preliminari hanno dimostrato che le cellule muscolari C2C12 rilasciano, nell'ambiente extra-cellulare, segnali complessi rappresentati da EV [168].

Il primo obiettivo è stato verificare se modelli cellulari di differenziamento miogenico, come le cellule C2C12, rilasciano EV durante il processo di differenziamento miogenico, se il contenuto e quindi i segnali portati da queste vescicole sono modulati con il procedere della miogenesi e se questi mediatori sono coinvolti nella regolazione del differenziamento.

Al fine di verificare se le C2C12 rilasciano EV durante il processo di differenziamento miogenico, i terreni di coltura dei mioblasti (MyoB) (cellule non differenziate), e miotubi al tempo di differenziamento T0 (MyoT0, cellule in cui è stato indotto il differenziamento mediante privazione di siero), T2, T4 e T6 (MyoT2, MyoT4, MyoT6 rispettivamente dopo 2, 4 e 6 giorni dall'induzione del differenziamento), sono stati recuperati e centrifugati utilizzando un protocollo di ultracentrifugazioni seriali al termine del quale è possibile ottenere un pellet di EV.

L'analisi Western Blot ha mostrato che i pellet ottenuti in seguito alla centrifugazione dei terreni, sono risultati positivi ai più noti e utilizzati marcatori esosomiali (Alix, Tsg101, Rab-5, Lamp-2, Flottillin-1) [137] (Figura 13), confermando quindi l'ipotesi secondo cui le cellule C2C12 rilasciano EV durante le fasi del differenziamento e suggerendo che queste EV presentano caratteristiche esosomiali. Inoltre, le vescicole isolate sono risultate negative alla marcatura mediante anticorpo contro Calnexina, una proteina tipica del reticolo endoplasmatico, indicando che tra le vescicole isolate non sono presenti contaminazioni di detriti cellulari (Figura 13).

E' interessante notare che il contenuto di proteine e RNA totale (mostrato nel grafico della figura 14) delle vescicole recuperate dai terreni di coltura, varia durante il differenziamento, e in particolar modo risulta arricchito nelle EV rilasciate al T2, evidenziando un maggior rilascio di vescicole durante i primi giorni di differenziamento e suggerendo inoltre che queste vescicole potrebbero non essere tutte uguali e trasportare diverse informazioni.

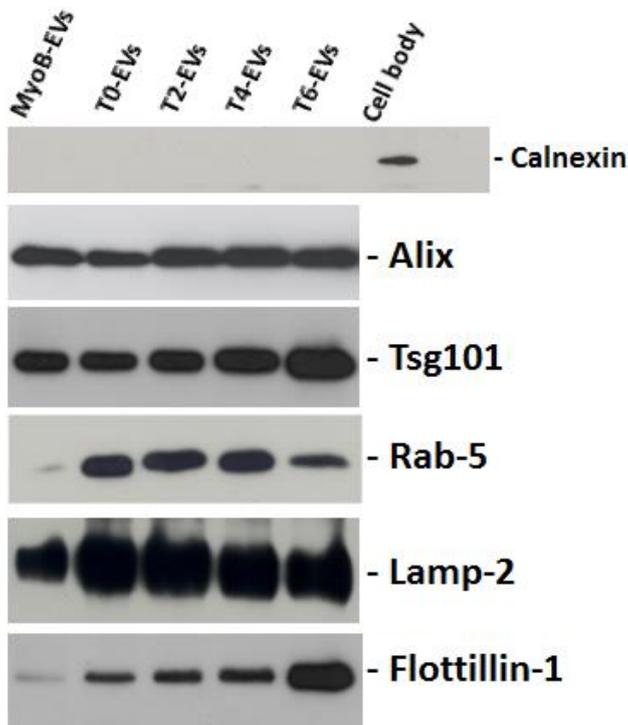


Figura 13. Analisi western Blot delle EV rilasciate dalle C2C12 a vari tempo di differenziamento. La figura rappresenta la positività delle vescicole a tutti i tempi di differenziamento ai marcatori esosomiali, e la negatività alla Calnexina utilizzata come controllo negativo.

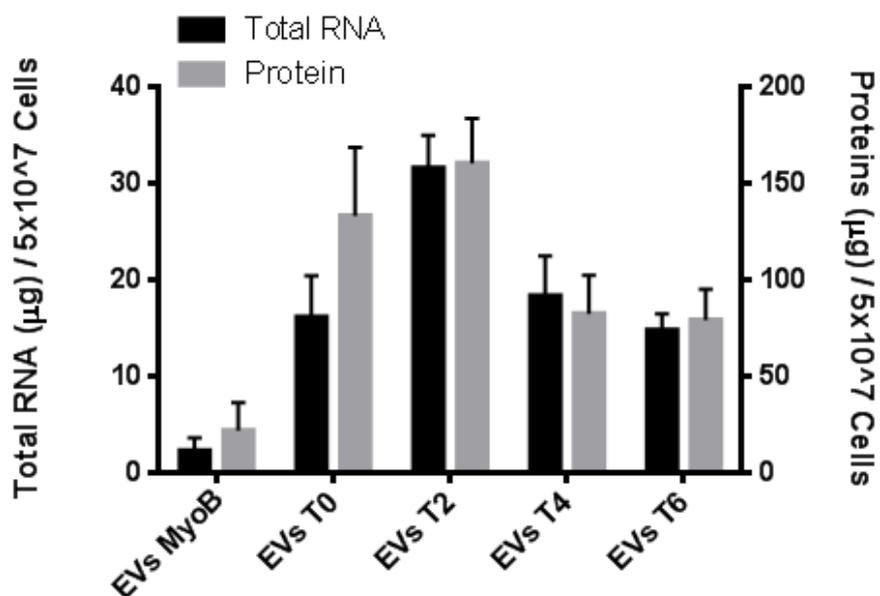


Figura 14. Contenuto di proteine e RNA totale nei pellet di EV a vari tempi di differenziamento.

Al fine di approfondire ulteriormente questo aspetto è stata, in primo luogo, effettuata l'analisi morfologica delle EV. Come è possibile vedere nella figura ottenuta mediante TEM, figura 15A e 15B, le EV rilasciate da mioblasti indifferenziati risultano essere piccole (con un diametro compreso tra 30 e 100 nm) e presentano un contenuto elettrone-trasparente. Inoltre è possibile notare che dopo due giorni dall'induzione del differenziamento vengono rilasciate vescicole più grandi, con un diametro compreso tra 100 e 400 nm, contenenti materiale elettrone-denso (Figura 15B e 15D, le vescicole indicate con l'asterisco (\*) indicano la presenza di materiale elettrone-denso) che coesistono con vescicole più piccole elettrone-trasparenti (Figura 15D).

Le vescicole isolate dopo 4-6 giorni dall'induzione del differenziamento risultano invece, essere molto simili a quelle rilasciate dai mioblasti, quindi più piccole rispetto alle vescicole rilasciate dai miociti al tempo T2, ma mostrano sia un contenuto elettrone-trasparente che elettrone-denso.

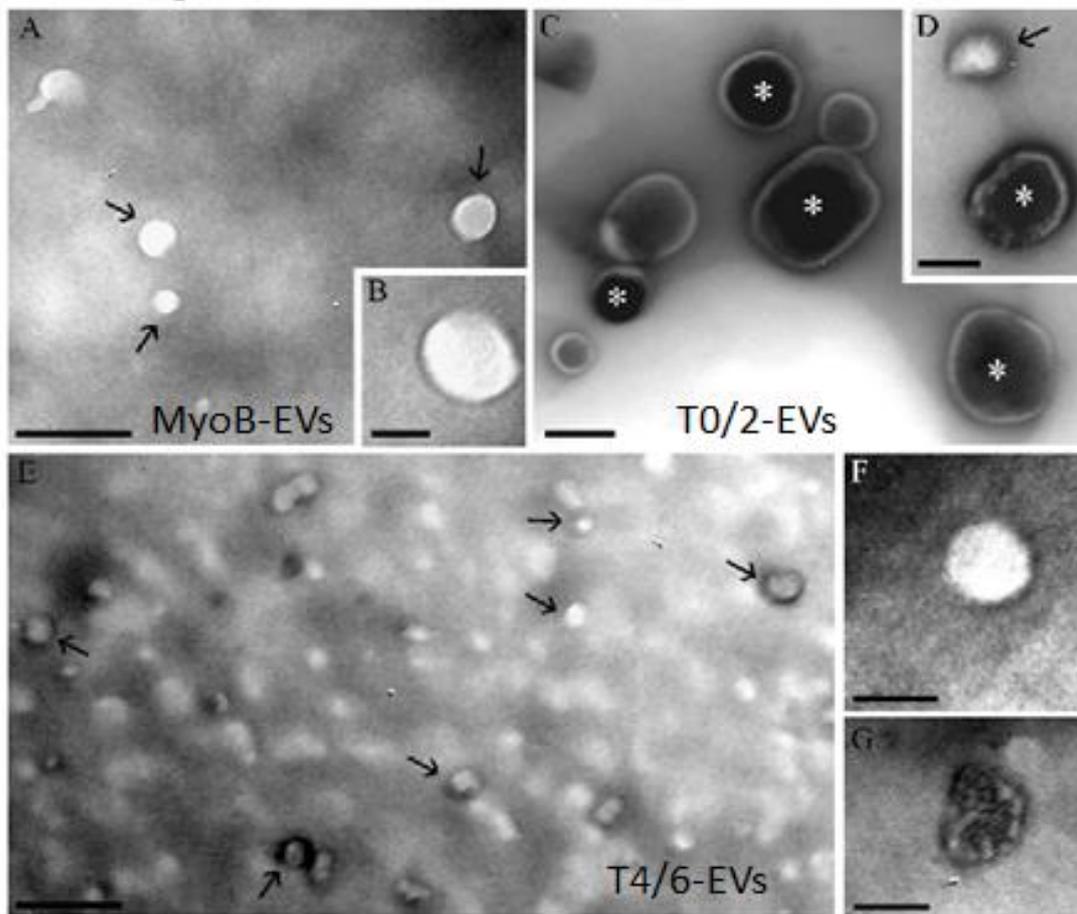


Figura 15. Analisi al TEM delle EV rilasciate a vari tempi di differenziamento. LA figura mostra le EV isolate dal terreno di cellule mioblasto (A, B), al T2 di differenziamento (C, D) e dopo 4/6 giorni dall'induzione del differenziamento (E, F, G).  
 A, C bar 200 nm; Fig. D, E bar 100 nm; Fig. B, F, G bar 50 nm

Questi dati sono supportati anche dall'analisi del contenuto di RNA presente all'interno delle EV. Come si può vedere dai grafici in figura 16, il livello d'espressione dei miRNA specifici del muscolo, mir-1, mir-133a, e mir-206, aumenta man mano che le cellule procedono nel differenziamento, mentre il contenuto del long non-coding RNA Yam-1 e delle sequenze di DNA relative a B1-sine diminuisce al tempo T2 e T4, mentre risulta più abbondante quando le cellule non sono ancora differenziate.

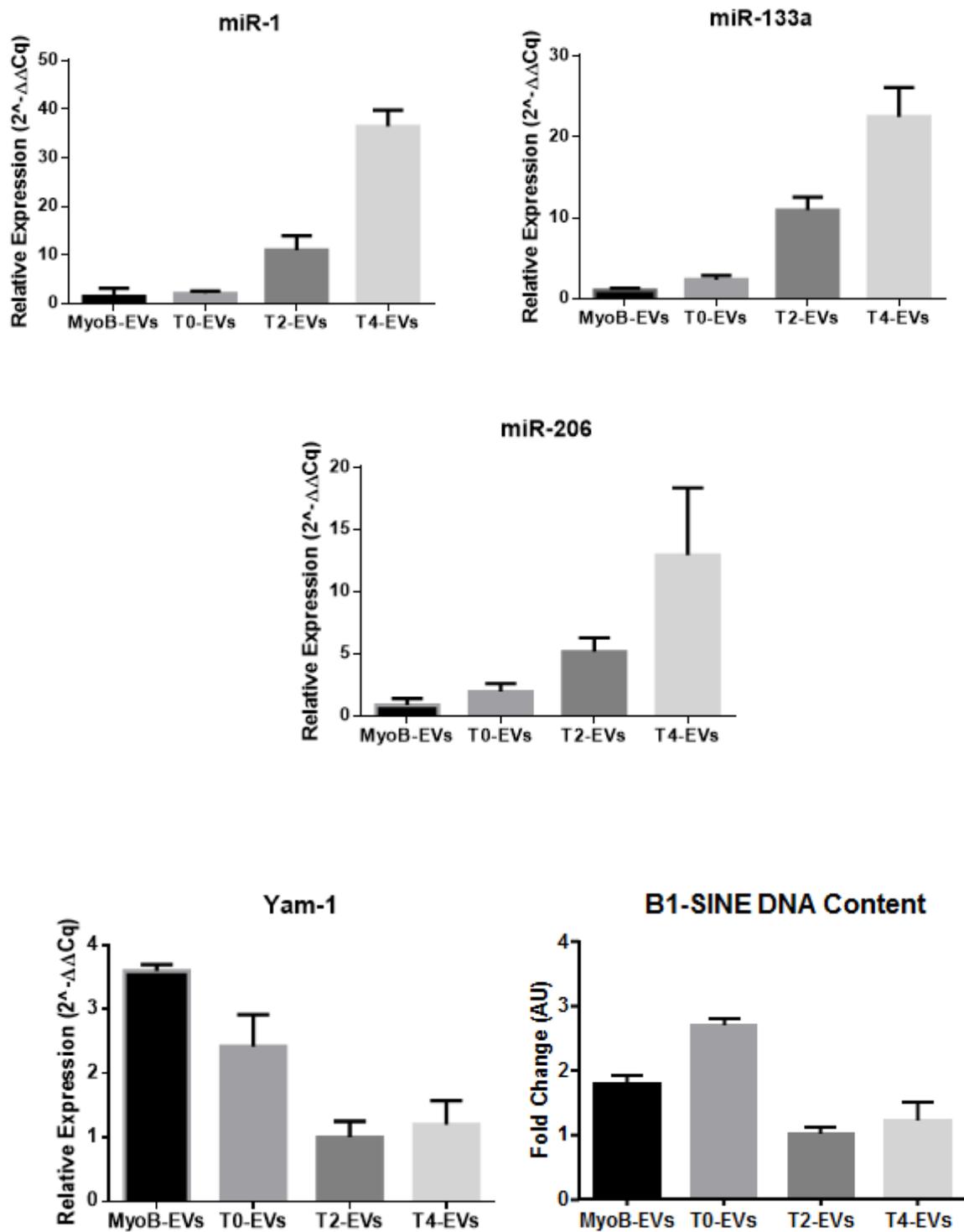


Figura 16. Analisi del contenuto di RNA nelle EV. La figura mostra i livelli dei miRNA muscolari e dei long-no-coding RNA contenuti nelle EV rilasciate dalle cellule al tempo MyoB, MyoT0, MyoT2 e MyoT4

I risultati fin qui riportati dimostrano che il rilascio delle EV viene modulato in risposta allo stimolo del differenziamento miogenico, sia in termini di dimensioni che di contenuto, suggerendo che i segnali contenuti in queste vescicole non sono casuali ma specificamente selezionati e regolati con il procedere della miogenesi, lasciando ipotizzare che possano influenzare in modo diverso il comportamento delle cellule target.

### **MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA IN CELLULE TRATTATE CON EV**

Per valutare se e quale messaggio queste vescicole portano a possibili cellule target, i mioblasti al tempo T0, sono stati trattati con le EV provenienti da cellule mioblasto, MyoT0, MyoT2 e MyoT4 (Figura 17).

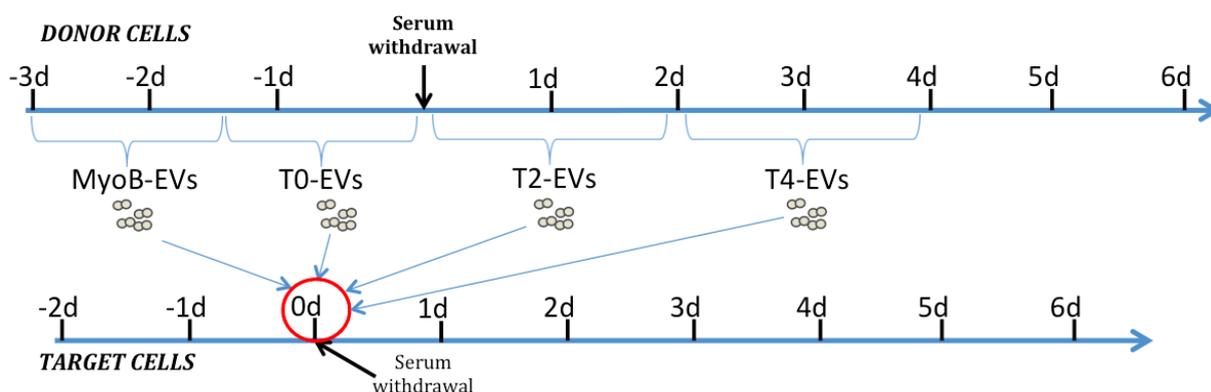


Figura 17. Schematizzazione dei trattamenti effettuati sulle cellule al T0. Le EV provenienti dai terreni di cellule MyoB, MyoT0, MyoT2, MyoT4 sono state isolate mediante ultracentrifugazioni seriali e messe in interazione per 24 ore con le cellule al T0 di differenziamento.

Per verificare se il trattamento avesse sortito degli effetti, ventiquattro ore dopo l'incubazione delle cellule con le EV, è stata analizzata l'espressione genica delle cellule trattate. In particolar modo sono stati analizzati i livelli di MyoG, Mef2c e MyH2, geni noti per essere indotti durante il differenziamento miogenico [174, 175].

Dal grafico (Figura 18) è possibile notare che i geni analizzati risultano down-regolati, rispetto alla condizione controllo non trattato, quando i miociti vengono a contatto con le vescicole rilasciate da miociti che avevano già iniziato il processo

del differenziamento (T0 e T2), suggerendo che i segnali contenuti al loro interno possano in qualche modo modulare e coordinare la miogenesi.

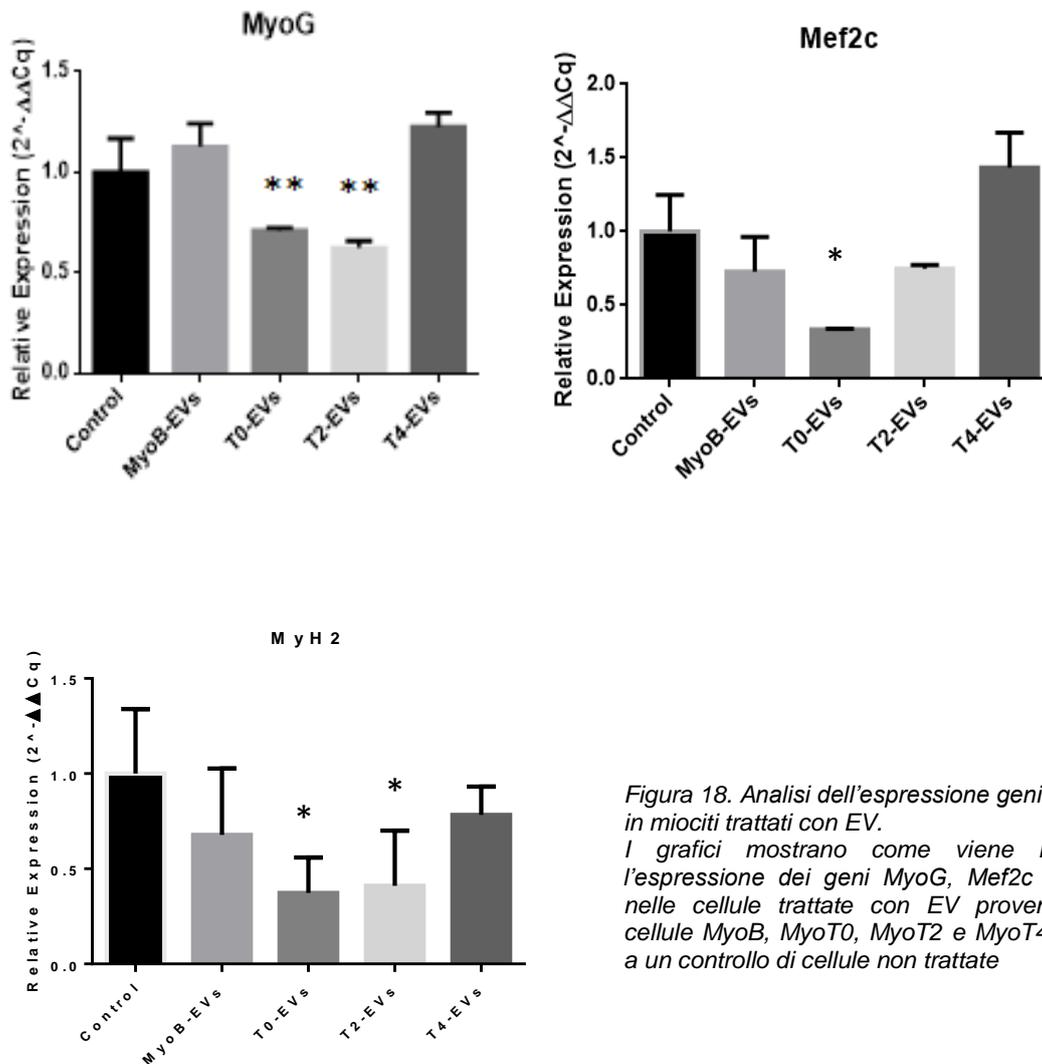
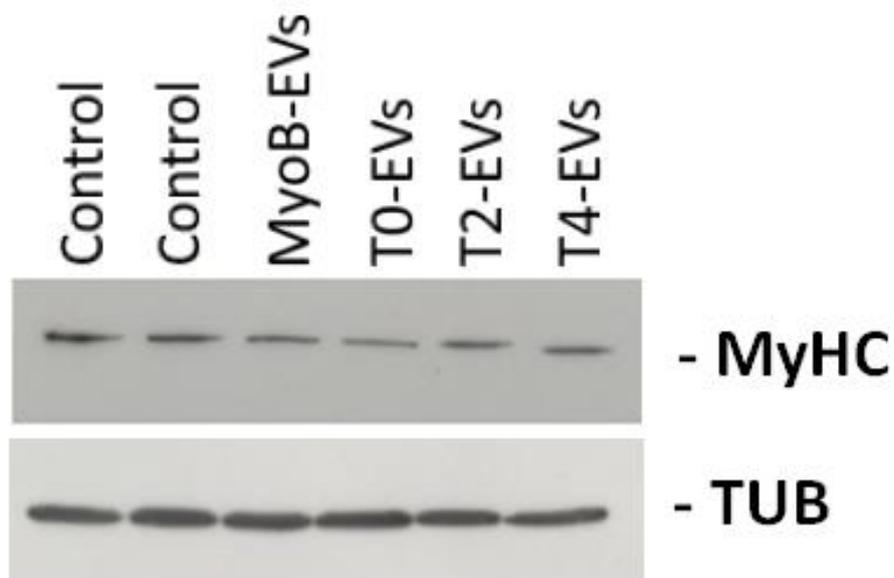


Figura 18. Analisi dell'espressione genica in miociti trattati con EV. I grafici mostrano come viene modulata l'espressione dei geni MyoG, Mef2c e MyH2 nelle cellule trattate con EV provenienti da cellule MyoB, MyoT0, MyoT2 e MyoT4 rispetto a un controllo di cellule non trattate

A questi dati si aggiunge l'analisi Western Blot che evidenzia una diminuzione della MyHC (catena pesante della miosina, che aumenta con la formazione dei miotubi muscolari) nelle cellule che hanno ricevuto il trattamento, supportando l'ipotesi che nelle vescicole rilasciate durante i primi giorni di differenziamento siano contenuti segnali che reprimono l'espressione di alcuni geni chiave del processo di differenziamento. A dimostrazione del fatto che la

diminuzione dei livelli di MyHC sia una conseguenza del trattamento e non sia dovuta a una differenza nel quantitativo di proteine caricate su gel, la marcatura con un anticorpo contro la tubulina, proteina del citoscheletro, rimane costante in tutti i campioni (Figura 19).

E' interessante notare che alla repressione dei geni chiave del differenziamento MyoG, Mef2c e MyH2, corrisponde una significativa up-regolazione di Axin-2, id-1 e id-2 dopo il trattamento con le EV rilasciate dai MyoT0 e MyoT2, in particolare questi ultimi promuovono la proliferazione cellulare (Figura 20) [176].



*Figura 19. Il contenuto proteico di MyHC nelle cellule che hanno subito il trattamento con EV risulta minore rispetto al controllo. La tubulina rimane costante in tutti i campioni dimostrando che per ogni condizione è stato caricato su gel lo stesso quantitativo di proteine.*

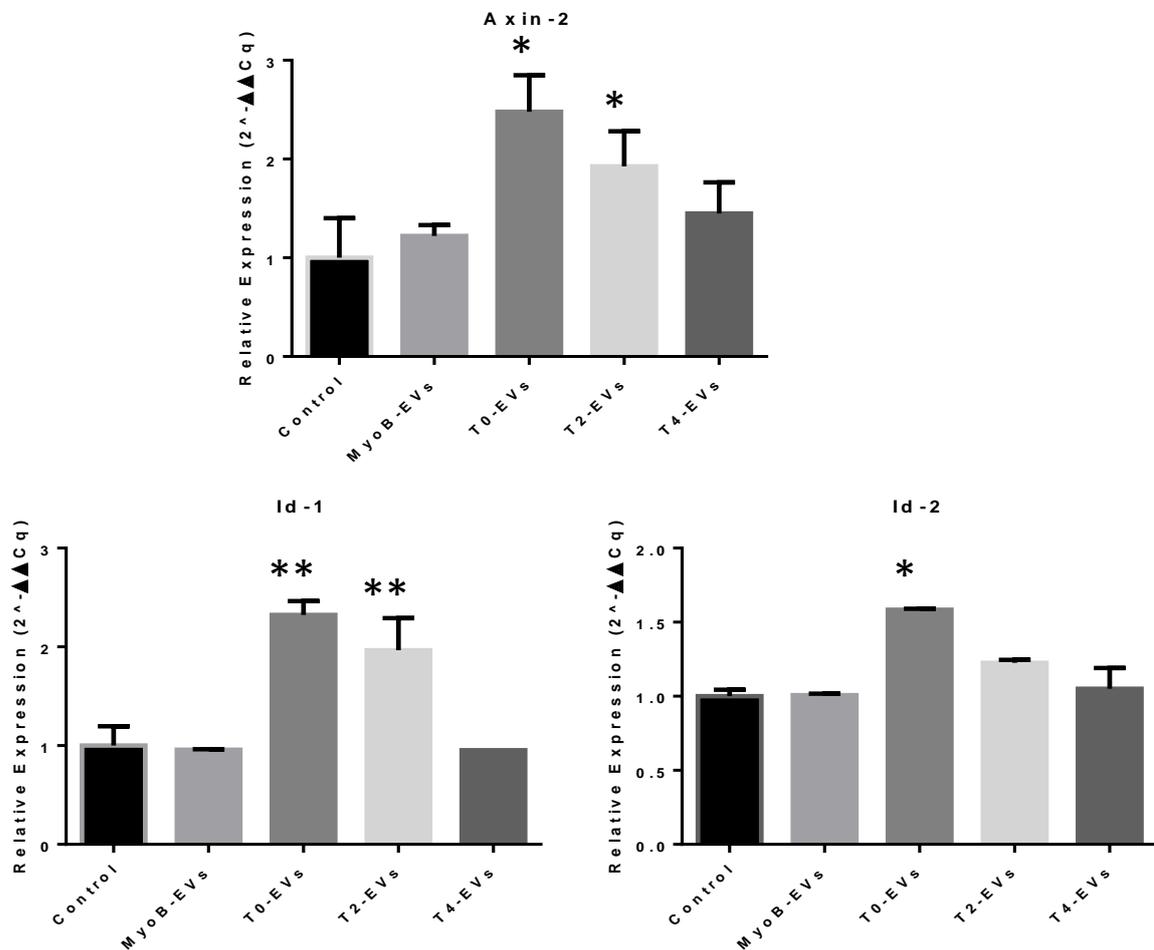


Figura 20. Analisi dell'espressione genica delle cellule trattate con EV. I grafici mostrano la modulazione, l'espressione dei geni Axin-1, id-1e id-2 nelle cellule tratatte con EV provenienti da cellule MyoB, MyoT0, MyoT2 e MyoT4 rispetto a un controllo di cellule non trattate.

Nell'insieme questi risultati dimostrano che le EV rilasciate durante il processo di differenziamento sono entità biologicamente attive che trasportano segnali in grado di modulare il differenziamento delle cellule riceventi. In particolare le vescicole rilasciate al T0 e T2 producono effetti simili nelle cellule riceventi che si manifestano con la repressione di alcuni geni chiave dell'inizio del processo di differenziamento.

### CARATTERIZZAZIONE DELLE VESCICOLE T0 E T2 MEDIANTE GRADIENTE DI DENSITÀ

Al fine di caratterizzare ulteriormente le EV rilasciate dalle C2C12 durante le prime fasi del differenziamento, il pellet di vescicole ottenuto mediante ultracentrifugazione seriale è stato ulteriormente separato mediante gradiente di densità discontinuo. Sulla base del fatto che i pellet delle vescicole rilasciate al T0 e al T2 mostravano composizione simile e sortivano effetti simili nelle cellule riceventi, sono stati riuniti per riuscire a raggiungere le quantità di EV necessarie per la separazione in gradiente.

L'analisi Western Blot ha evidenziato che nel pellet di EV rilasciate da mioblasti e MyoT4 è presente un'unica popolazione di vescicole, identificate mediante la positività ai marcatori esosomiali Tsg101 e Alix, con densità 1.08 corrispondente alla frazione numero 7 del gradiente. E' interessante che nel terreno delle cellule MyoT0/T2 sono presenti EV che stratificano nelle frazioni 6, 7, 8, 9, con densità compresa tra 1.075 e 1.11, lasciando supporre che in questa fase del differenziamento le cellule muscolari rilasciano sottopopolazioni diverse di vescicole (Figura 21).

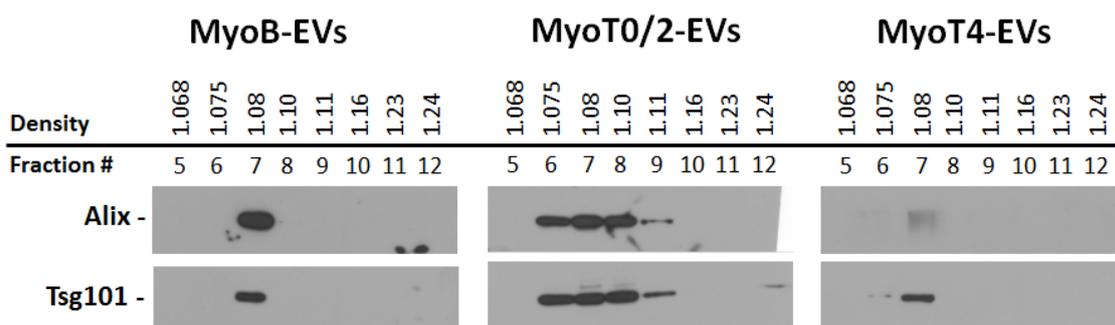


Figura 21. Analisi Western Blot delle frazioni ottenute dopo centrifugazione in gradiente di densità. Le EV rilasciate ai tempi di differenziamento MyoB, MyoT0/T2 e MyoT4 sono state prima isolate mediante ultracentrifugazione e poi ulteriormente separate in gradiente di densità. Le frazioni risultanti sono state marcate con anticorpi contro i noti marcatori esosomiali Alix e Tsg101.

|

La presenza di sottopopolazioni di EV nelle prime fasi del differenziamento e non, ad esempio, nelle fasi tardive è in linea con i dati ottenuti in seguito al trattamento delle C2C12 con EV e potrebbe spiegare la diversa modulazione dell'espressione

genica che si osserva in seguito al trattamento con EV rilasciate a tempi successivi.

Per avere ulteriore conferma di questi risultati, le diverse frazioni del gradiente di densità, in cui sono state separate le EV dei MyoT0/T2, sono state analizzate mediante l'utilizzo del TEM (Figura 22A e B) e del microscopio a forza atomica (Figura 23), che hanno confermato che la frazione numero 6 del gradiente di densità contiene delle vescicole più piccole in diametro rispetto alla frazione numero 8.

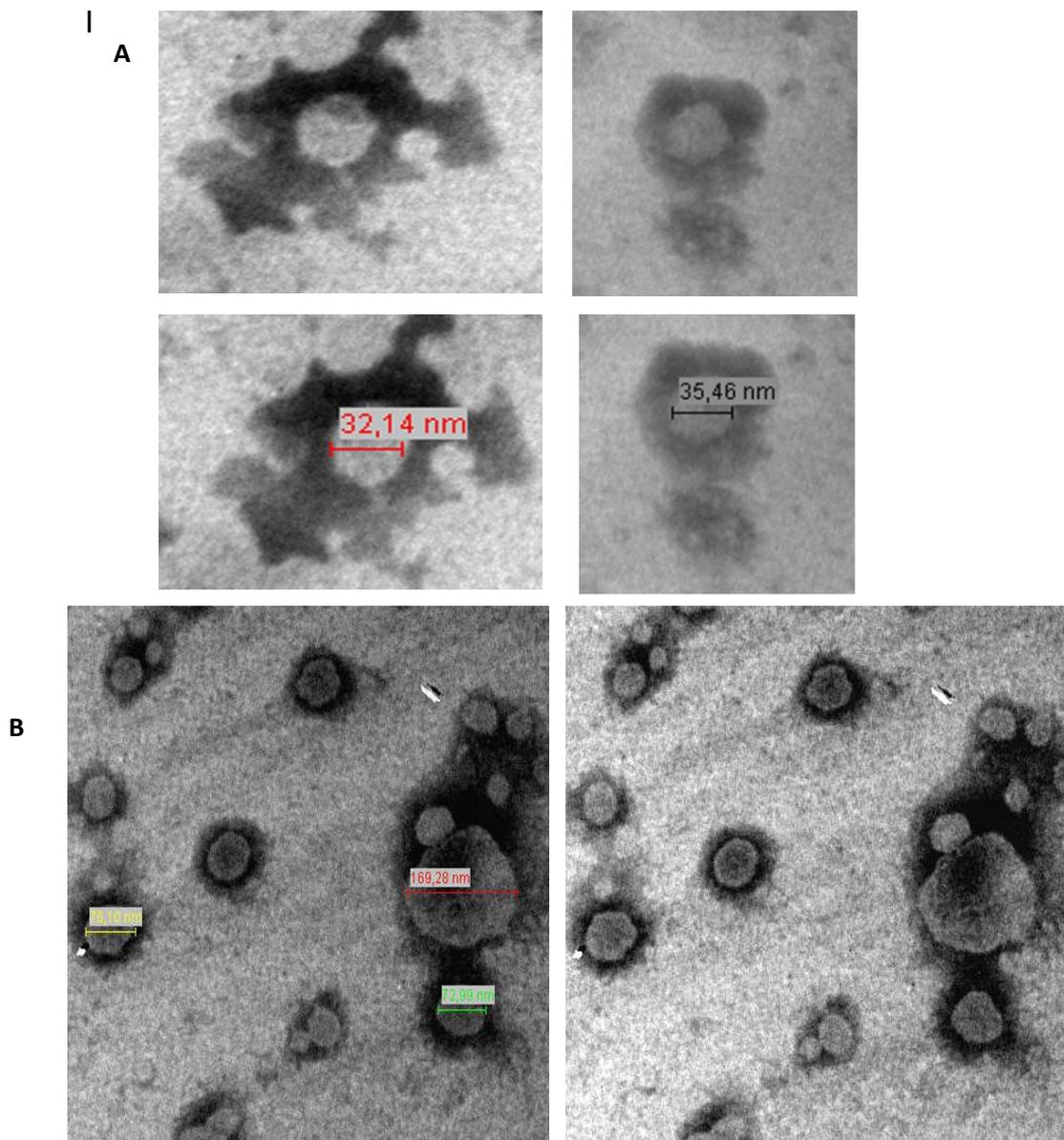


Figura 22. Analisi al TEM delle EV rilasciate dai MyoB T0/T2..(A) EV contenute nella frazione 6 del gradiente di densità. (B) EV contenute nella frazione 8 del gradiente.

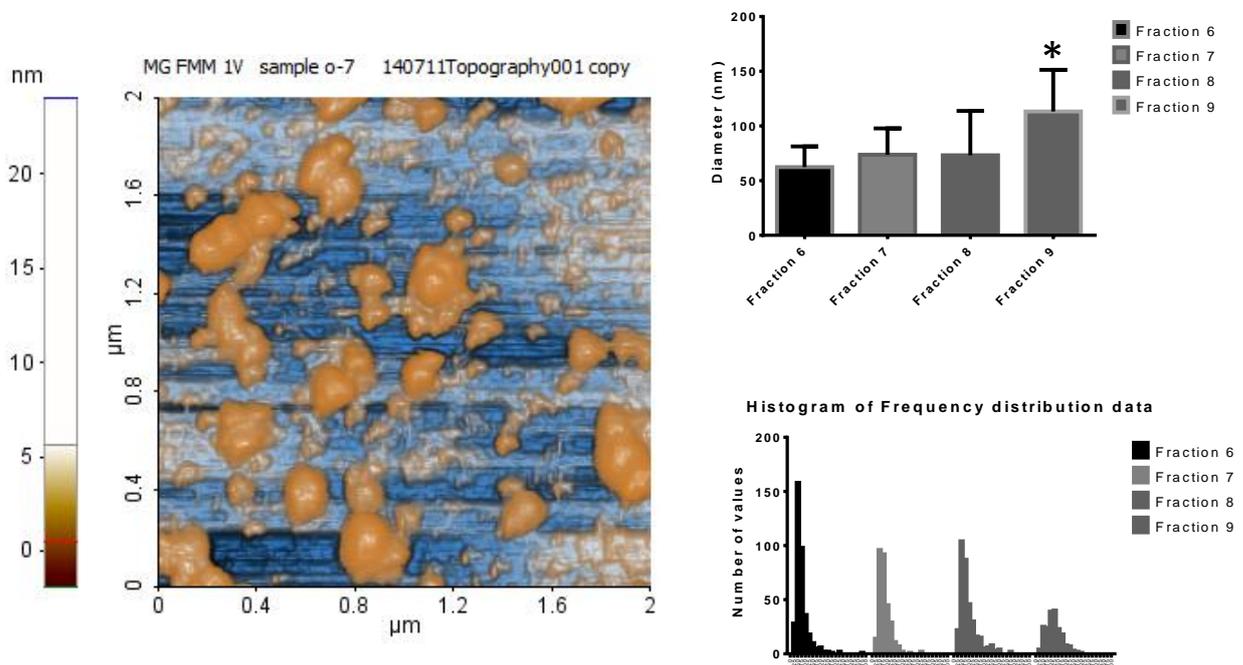


Figura 23. Analisi mediante microscopio a forza atomica delle EV rilasciate dai MyoT0/T2.

In aggiunta a questi dati è stato analizzato anche il contenuto delle sottopopolazioni di EV rilasciate da MyoT0/T2 in termini di contenuto di acidi nucleici mediante real-time PCR.

La figura 24 mostra che le vescicole con densità 1.08 g/dl, che sedimentano nella frazione 7, risultano essere quelle più ricche di RNA, mentre le vescicole con densità maggiore (frazioni 9 e 10) sono particolarmente arricchite di DNA, con un picco nella frazione 9, dove galleggiano le vescicole di densità 1.11 g/ml.

Nell'insieme questi dati suggeriscono che le C2C12, a due giorni dall'induzione del differenziamento, rilasciano nel mezzo di coltura diverse sottopopolazioni di vescicole che differiscono in termini di dimensione e di contenuto e che potrebbero spiegare perché i cambiamenti più significativi dell'espressione genica nelle C2C12 MyoT0 avvengono proprio in seguito al trattamento con le EV del T0/T2.

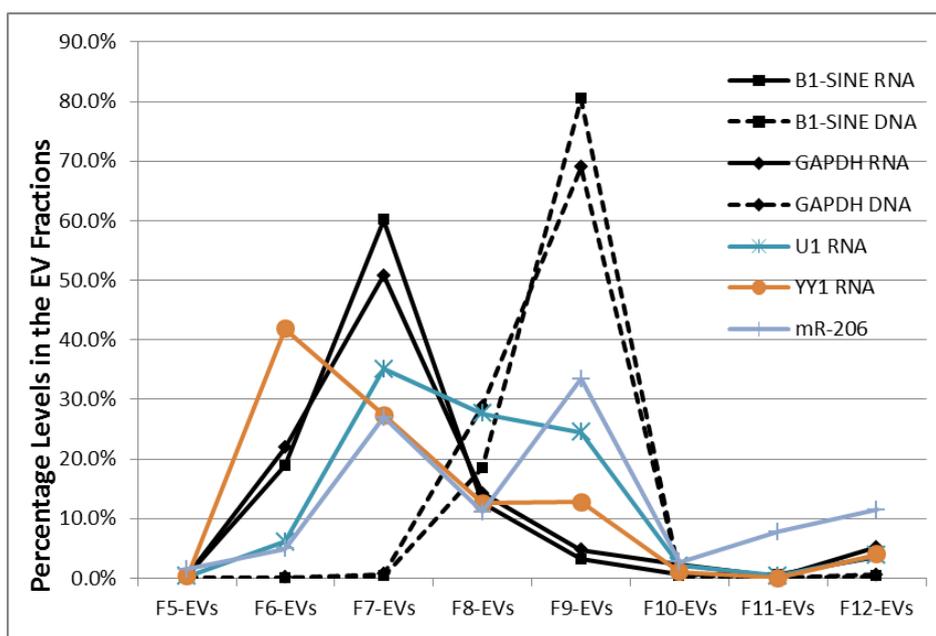


Figura 24. Analisi del contenuto di RNA. Le diverse frazioni ottenute in seguito alla centrifugazione delle EV al T0/T2 in gradiente di densità sono state analizzate mediante real-time PCR al fine di valutare i livelli di acidi nucleici al loro interno

### **ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA IN MIOCITI TRATTATI CON EV T0/T2 RILASCIATE DA CELLULE C2C12 DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO MIOGENICO**

Per capire in che termini le diverse popolazioni di vescicole rilasciate influenzano il comportamento della cellula bersaglio, le frazioni del gradiente utilizzato per separare le diverse popolazioni di EV rilasciate da MyoT0/T2 sono state utilizzate per trattare le C2C12 che stanno per iniziare il processo di differenziamento. Questa è una fase critica in cui le cellule integrano i segnali dell'ambiente ed elaborano una "decisione".

Come è possibile vedere dal grafico riportato in figura 25, le EV presenti nelle frazioni 8 e 9 inducono la repressione dei geni Mef2c, MyoG e MyH2.

Questi risultati sono supportati anche dall'analisi western Blot in cui gli estratti proteici sono stati marcati con un anticorpo contro la MYHC. Dalla figura 26 è possibile osservare una diminuzione del contenuto della MYHC nelle cellule

trattate con le frazioni 8 e 9, suggerendo quindi che sono le vescicole più pesanti ad avere un effetto significativo di down-regolazione sulle cellule target.

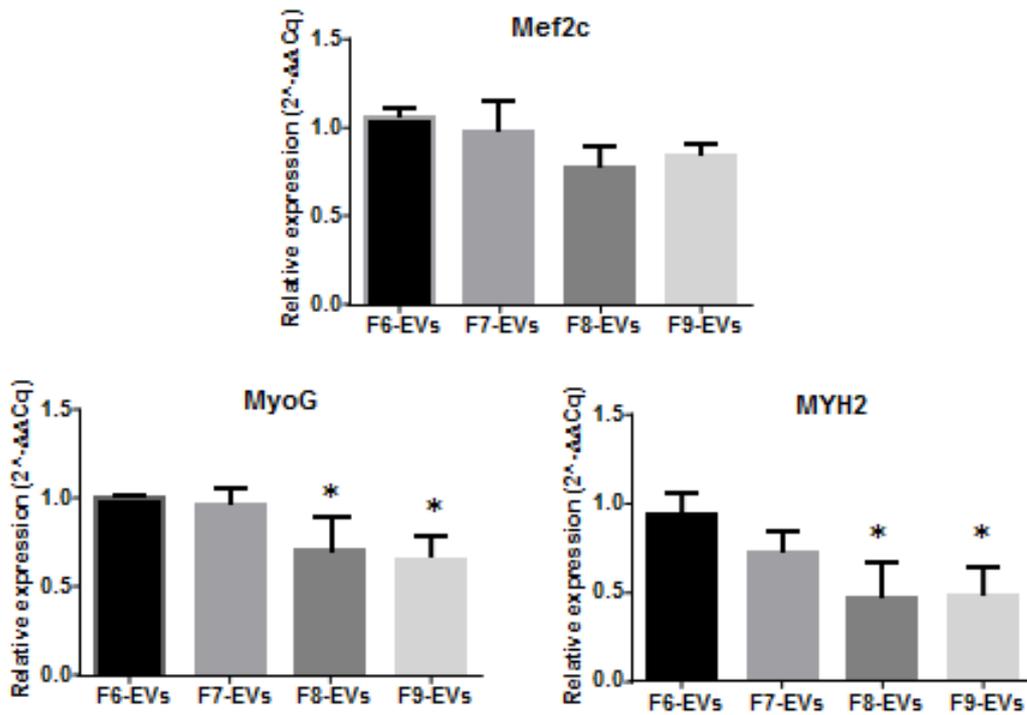


Figura 25. Analisi dell'espressione genica nelle cellule trattate con le frazioni del gradiente di densità. E' stata analizzata mediante real-time PCR l'espressione di MyoG, MyH2 e MEF2c.

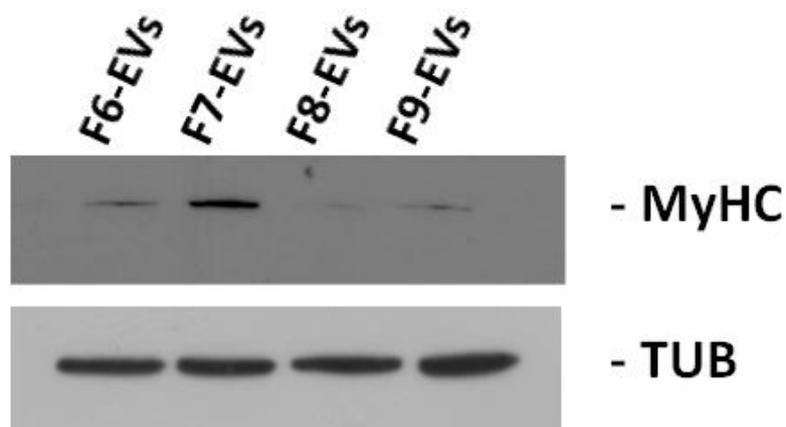


Figura 26. Analisi Western Blot del contenuto proteico di MYHC nelle cellule in seguito a trattamento con le frazioni del gradiente di densità. La marcatura con tubulina rappresenta il controllo positivo.

### TRATTAMENTO DELLE CELLULE RAW264.7 CON EV LIBERATE DA MIOCITI IN ATTIVO DIFFERENZIAMENTO MIOGENICO

Dopo aver dimostrato che le EV rilasciate dalle C2C12 durante il differenziamento miogenico rappresentano dei mediatori coinvolti nella regolazione della miogenesi, abbiamo indagato se questi segnali hanno anche un ruolo nel complesso scambio di informazioni tra le cellule muscolari e gli altri tipi di cellule presenti nella *niche* del muscolo.

A tal fine le cellule Raw 264.7, modello molto studiato di macrofagi murini immortalizzati, sono state trattate con le frazioni di EV rilasciate dai MyoT0/T2 separate mediante gradiente di densità.

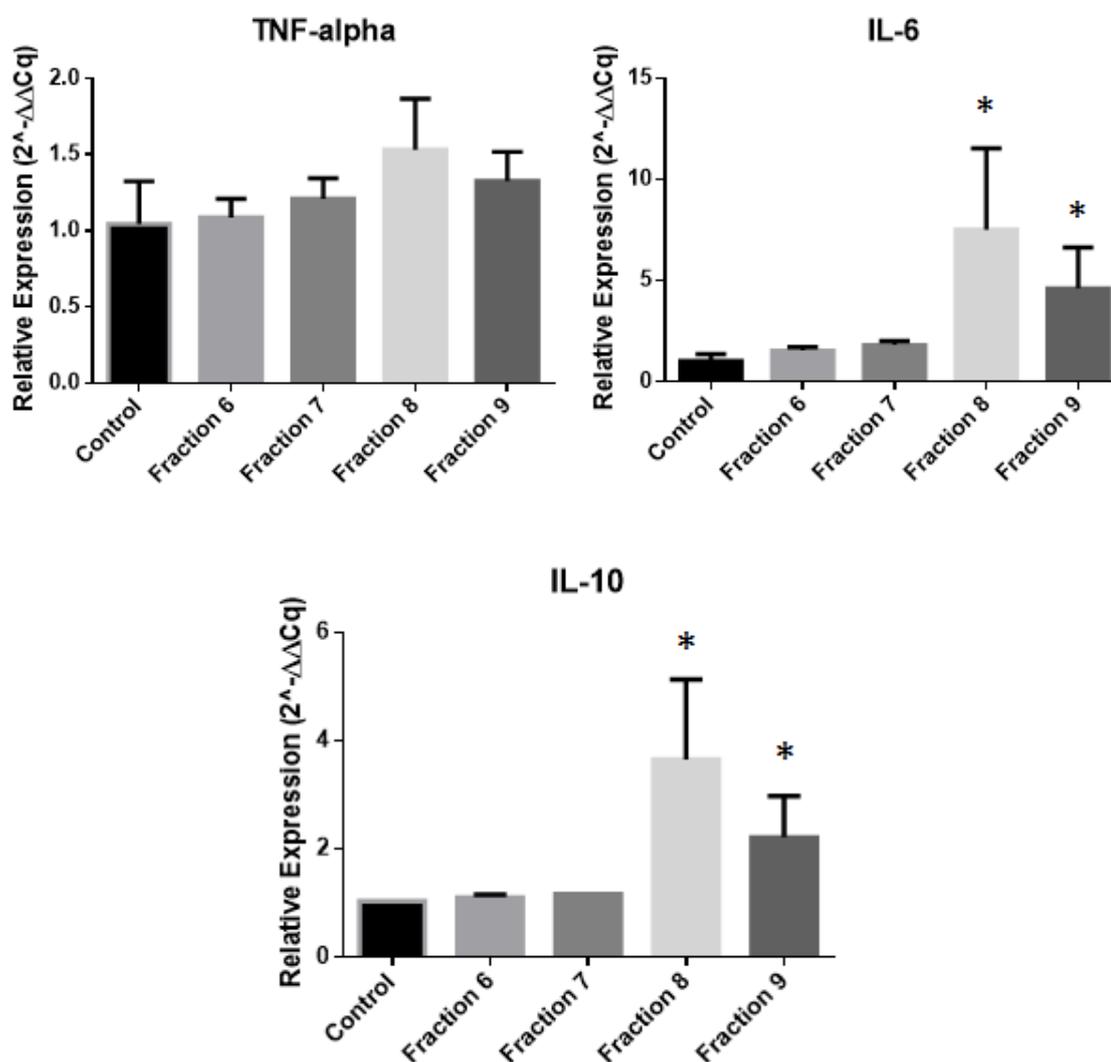


Figura 27. Livelli di espressione delle citochine infiammatorie nelle cellule Raw246 dopo il trattamento con EV

Queste cellule, ormai considerate importanti componenti della niche del tessuto muscolare, sono state scelte perché rilasciano citochine e fattori di crescita che attivano le cellule satellite inducendole a dividersi e proliferare generando cellule figlie che andranno poi incontro al differenziamento miogenico.

Quindi, le cellule Raw 264.7 sono state trattate con le frazioni di EV rilasciate da MyoT0/T2 ottenute dopo la separazione in gradiente di densità e successivamente ne sono stati valutati i livelli di espressione per alcune delle più note citochine rilasciate.

Come è possibile vedere dai grafici riportati in figura 27 il trattamento con le frazioni 8 e 9 induce una significativa up-regolazione di IL-6 e IL-10 e solo una leggera tendenza ad aumentare di TNF- $\alpha$ , suggerendo che le EV potrebbero essere coinvolte non solo nella comunicazione tra cellule muscolari, ma anche nel cross-talk tra le cellule muscolari in differenziamento e i macrofagi.

## ***LE CELLULE MUSCOLARI RILASCIANO EV IN SEGUITO AD ELETTROSTIMOLAZIONE***

Il muscolo scheletrico rappresenta circa il 40% del peso corporeo totale ed è caratterizzato da una notevole plasticità morfo-funzionale che gli consente di adattarsi in maniera efficiente a differenti stimoli tra i quali l'esercizio fisico risulta essere uno dei più significativi. Oggi è ampiamente accettato che quando il muscolo si contrae comunica con gli altri organi attraverso il rilascio di fattori solubili, denominati miochine.

Dopo aver dimostrato che il muscolo rilascia EV in maniera costitutiva e in seguito al processo di differenziamento miogenico, e che dette vescicole sono entità biologicamente attive che contribuiscono a regolare e coordinare le cellule muscolari stesse e probabilmente altre cellule presenti nella nicchia delle cellule satellite, l'obiettivo successivo è stato studiare se il rilascio di EV è influenzato dalla contrazione muscolare.

Per fare ciò, i miotubi di cellule C2C12 sono stati sottoposti a diversi protocolli di stimolazione con impulsi elettrici (EPS) che mimavano la depolarizzazione di membrana che si ha durante la contrazione muscolare,.

Come prima cosa, è stato verificato che il protocollo di elettrostimolazione utilizzato induceva gli adattamenti attesi nelle cellule muscolari. Quindi, è stata analizzata l'espressione del gene PGC-1 $\alpha$ , un coattivatore trascrizionale, considerato il gene "master regulator" principalmente responsabile della regolazione dell'adattamento del muscolo all'esercizio di resistenza, controllando tra i vari geni anche l'espressione di IL-6 .

Come è possibile apprezzare dalla figura 28, le cellule C2C12 mostrano una up-regolazione dell'espressione genica di PGC-1 $\alpha$  e IL-6 in risposta ad elettrostimolazione, in particolare quando vengono sottoposte ad una stimolazione caratterizzata da una differenza di potenziale di 100V.

Questi dati rappresentano una indicazione chiara del fatto che il sistema di contrazione proposto sortisce, sulle cellule muscolari, effetti paragonabili a quelli dell'esercizio fisico poiché riproduce alcuni adattamenti classici all'esercizio fisico.

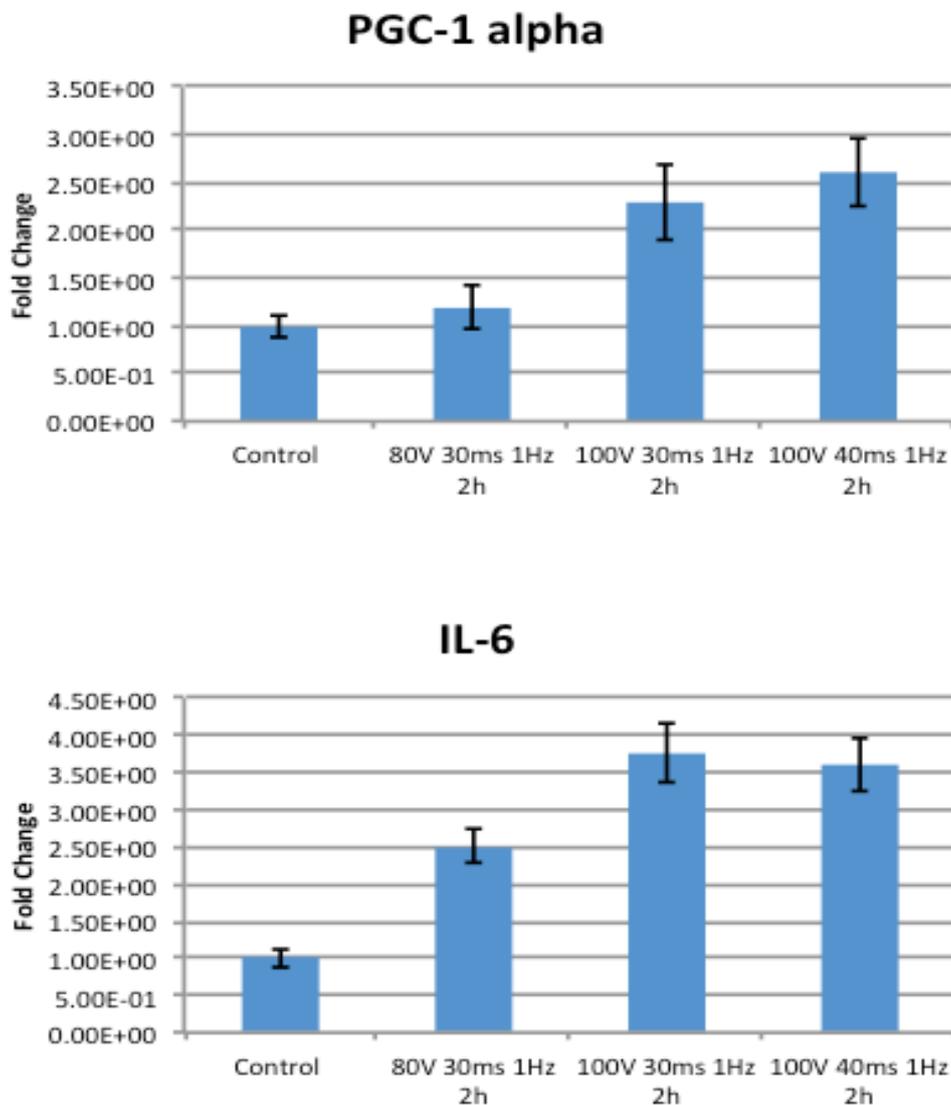


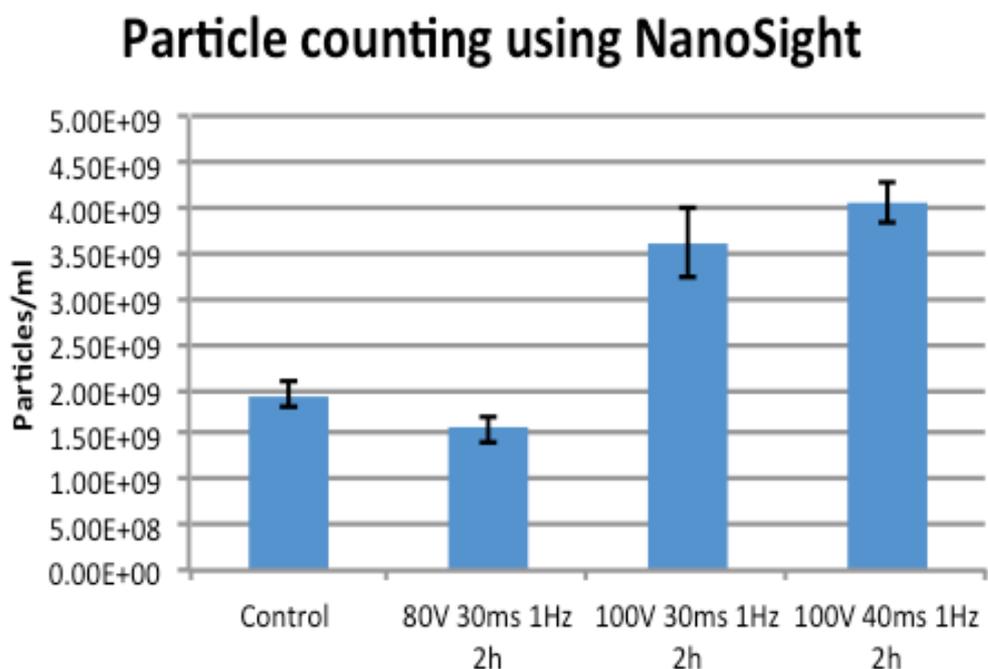
Figura 28. Livelli di espressione di IL 6 e PGC-1-alfa nelle cellule muscolari dopo elettrostimolazione. Le cellule muscolari sono state sottoposte a 3 diversi protocolli di stimolazione e in seguito sono stati valutati i livelli di espressione di questi due geni per avere prova che la stimolazione somministrata sortisse un effetto sulle cellule.

#### **ANALISI DELLE EV LIBERATE NELL'AMBIENTE EXTRACELLULARE IN RISPOSTA AD EPS**

Dopo aver dimostrato che il sistema di elettrostimolazione proposto può essere un valido modello per studiare gli adattamenti dell'esercizio *in vitro*, siamo passati a studiare le EV rilasciate dai miotubi in seguito alla stimolazione con EPS.

Le EV ottenute in seguito ad EPS sono state analizzate utilizzando la Nanoparticle Tracking Analysis, mediante NanoSight, che ci ha permesso di valutare la dimensione e il numero delle EV rilasciate in risposta alla contrazione.

Dal monitoraggio delle nanoparticelle è stato possibile osservare un aumento del rilascio di EV in seguito ad EPS quando l'onda di depolarizzazione raggiungeva 100V (Figura 29). L'associazione tra depolarizzazione di membrana e rilascio delle EV è in linea con i dati riportati in bibliografia ed è possibile ipotizzare che il calcio intracellulare possa fungere da mediatore secondario. Il meccanismo può essere delineato come segue, la depolarizzazione di membrana determina un incremento delle concentrazioni di calcio citosolico che stimola la fusione dei MVB alla membrana rilasciando EV nello spazio extracellulare.



*Figura 29* Conta del numero di EV rilasciate in seguito a contrazione. Il grafico mostra il rilascio di EV in seguito ai 3 protocolli di stimolazione evidenziando un aumento del rilascio quando le cellule sono sottoposte a protocolli di 100V

## Nanoparticle Tracking Analysis

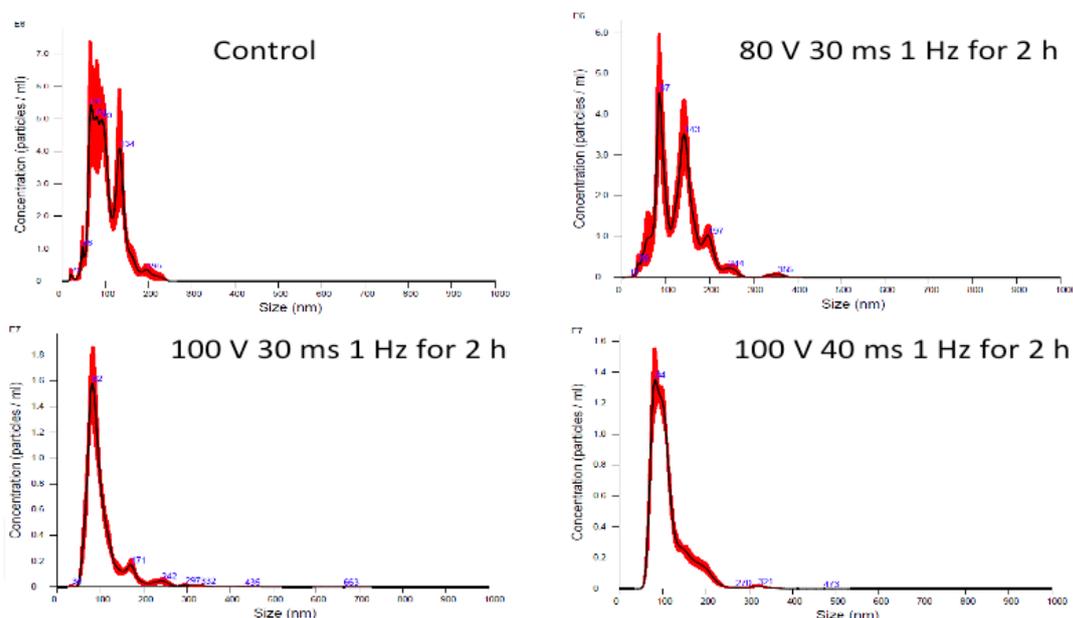


Figura 30- Analisi delle EV mediante NTA. I grafici evidenziano la dimensione delle EV rilasciate dopo il protocollo di stimolazione elettrica.

Si può notare come in seguito ai protocolli a 100 V venga rilasciata una popolazione rappresentata dall'unico picco dello spettro con dimensioni di circa 100nm. I grafici relativi al controllo e al protocollo a 80 V invece risultano essere poli-dispersi con più picchi a grandezze differenti maggiori di 100nm.

Successivamente è stata analizzata la distribuzione delle dimensioni delle vescicole rilasciate in termini di diametro idrodinamico.

La figura 30 mostra che in risposta ad EPS aumenta il numero delle EV secrete e diminuisce la dimensione delle vescicole.

In particolare si può notare che le cellule controllo e quelle sottoposte a stimolazione elettrica con il protocollo di 80V per 30ms a 1 Hz, rilasciano vescicole di dimensioni comprese tra 80 nm e 150 nm.

Mentre le cellule sottoposte a stimolazione elettrica di 100 V con un impulso della durata di 30-40 ms, con frequenza di 1Hz, rilasciano una popolazione di EV mono-dispersa con un diametro che si aggira intorno a 80-100nm, suggerendo un arricchimento in esosomi nella popolazione di EV rilasciate.

Questi dati dimostrano che probabilmente il protocollo di contrazione a 80V non era sufficiente a indurre un adattamento della cellula muscolare, questo è dimostrato dal fatto che non sono state evidenziate variazioni significative né nell'espressione dei marcatori dell'esercizio né nel rilascio di EV, e che probabilmente la condizione ottimale di contrazione si raggiunge con un impulso elettrico di 100 V.

L'aumento del rilascio di EV dopo EPS suggerisce che il muscolo in contrazione rilascia EV, principalmente esosomi, nell'ambiente extracellulare che potrebbero andare ad aggiungersi alla pletora di segnali muscolari extracellulari liberati in risposta all'attività contrattile.

## **IDENTIFICAZIONE DI EV CON CARATTERISTICHE MUSCOLARI NEL PLASMA DI SOGGETTI UMANI**

Studi recenti hanno riportato che oltre alle miochine il muscolo rilascia microRNA nel torrente ematico in risposta all'esercizio fisico.

Come già detto i microRNA in circolo possono trovarsi liberi in associazione a RNA-binding-proteins o racchiusi all'interno di vescicole extracellulari. Recenti evidenze lasciano ipotizzare che solo quest'ultimi vengono rilasciati mediante un sistema di esportazione attiva per essere consegnati e internalizzati dalle cellule bersaglio, mentre nessuna prova evidente ha dimostrato che i miRNA liberi possono essere captati dalla cellula bersaglio e modulare la sua attività.

Per questo motivo, a differenza degli studi precedenti, che hanno analizzato i microRNA circolanti totali senza distinguere tra miRNA liberi e miRNA in EV, abbiamo concentrato la nostra attenzione su miRNA contenuti nelle EV.

Inoltre, i risultati sin qui presentati hanno riguardato il rilascio di EV da parte di modelli cellulari di muscolo, come le cellule C2C12, sia in condizioni basali sia in seguito elettrostimolazione e hanno permesso di verificare la secrezione di EV, quindi il passo successivo è stato studiare se questo è un fenomeno limitato a cellule in coltura o avviene anche *in vivo*. Al fine di dare risposta a questa domanda è stato valutato se il tessuto muscolare rilascia EV nel circolo ematico. Le EV sono state isolate dal plasma di donatori sani mediante ultracentrifugazioni seriali seguite dalla separazione delle vescicole ottenute mediante un gradiente di densità al fine di evitare la co-precipitazione di proteine solubili molto abbondanti nel plasma. La figura 31 mostra l'analisi Western Blot delle frazioni ottenute in seguito alla separazione mediante gradiente di densità discontinuo.

Come mostrato nella figura 31A, le EV derivate dal plasma, identificate attraverso la quantificazione del marcatore esosomiale Tsg101, sono arricchite nella frazione la cui densità di galleggiamento è 1,11g/ml, tipica della frazione esosomiale [137]. La stessa frazione è risultata positiva anche per la presenza di una proteina specifica del tessuto muscolare, l'alfa-sarcoglicano (SGCA) (Figura 31B).

Questi dati suggeriscono quindi la presenza nel plasma di EV di probabile origine del tessuto muscolare. Inoltre, le vescicole identificate presentano principalmente caratteristiche degli esosomi.

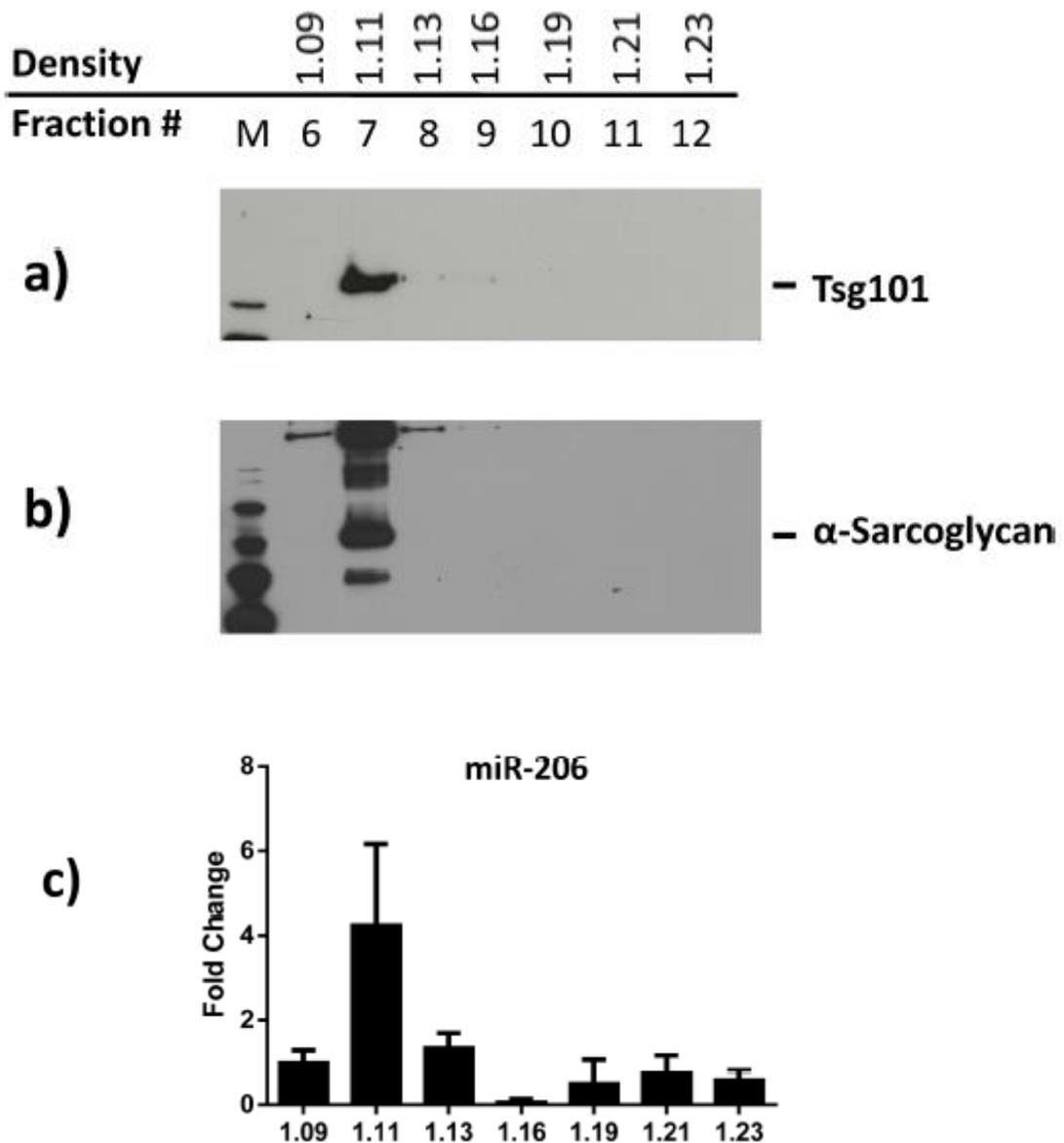


Figura 31. Le EV purificate mediante ultracentrifugazione sono state separate mediante gradiente di densità. Le EV nelle frazioni del gradiente sono state identificate mediante Western Blot con anticorpi contro Tsg101 (a), mentre quelle rilasciate dal muscolo mediante l'anti-SGCA (b). Per ciascuna frazione sono stati quantificati i livelli di MiR-206 (c).

Le frazioni ottenute mediante gradiente di densità sono state ulteriormente analizzate per la presenza di miR-206, un miRNA specifico del tessuto muscolare. La Figura 31C mostra chiaramente che, oltre a Tsg101 e SGCA, anche miR-206 è abbondante nella frazione di densità 1,11 g/ml.

Questi dati suggeriscono che miR-206 potrebbe essere secreto, almeno in parte, in una sottopopolazione di EV, probabilmente esosomi; inoltre la sua presenza fornisce un'ulteriore prova che queste EV provengono dal tessuto muscolare.

#### ***ANALISI DELLE EV ISOLATE DA PLASMA MEDIANTE CITOFLUORIMETRIA***

La presenza EV di derivazione muscolare in circolo è stata ulteriormente approfondita mediante analisi di citometria a flusso.

Le EV, isolate come precedentemente discusso, sono state analizzate per la loro espressione di CD81, un consolidato marcatore di superficie esosomiale per il marcatore muscolare SGCA.

I dati di citometria, riportati in figura 32A mostrano la presenza di EV con un diametro  $<1\mu\text{m}$  e positive quando marcate con anti-SGCA (zona verde). Queste EV, SGCA+, sono meglio evidenziate in figura 32D (FL1 = SGCA-FITC).

Analizzando ulteriormente le EV presenti nell'area P3, è possibile stimare che le EV muscolari isolate dal plasma rappresentato circa il 5% del totale delle EV in circolo (Figura 32A); nel pannello B, è mostrato solo il gate P3 dove sono stati esclusi dall'analisi aggregati e detriti presenti nella preparazione di EV. Il pannello della figura 32C corrisponde al controllo negativo, mentre il diagramma nel pannello D mostra un significativo spostamento del segnale di fluorescenza dopo l'aggiunta di anticorpi anti-SGCA, che evidenziano la presenza di una sottopopolazione di EV circolanti SGCA+.

E' stata indagata la presenza di CD81, in relazione alla positività per SGCA al fine di caratterizzare ulteriormente le EV muscolari. La figura 33 mostra che il 60-65% delle EV muscolari è anche positivo per anti-CD81. Nel dettaglio la figura 33A mostra la positività a CD81 in relazione alla dimensione delle particelle, mentre la figura 33B evidenzia la co-espressione di CD81 e SGCA.

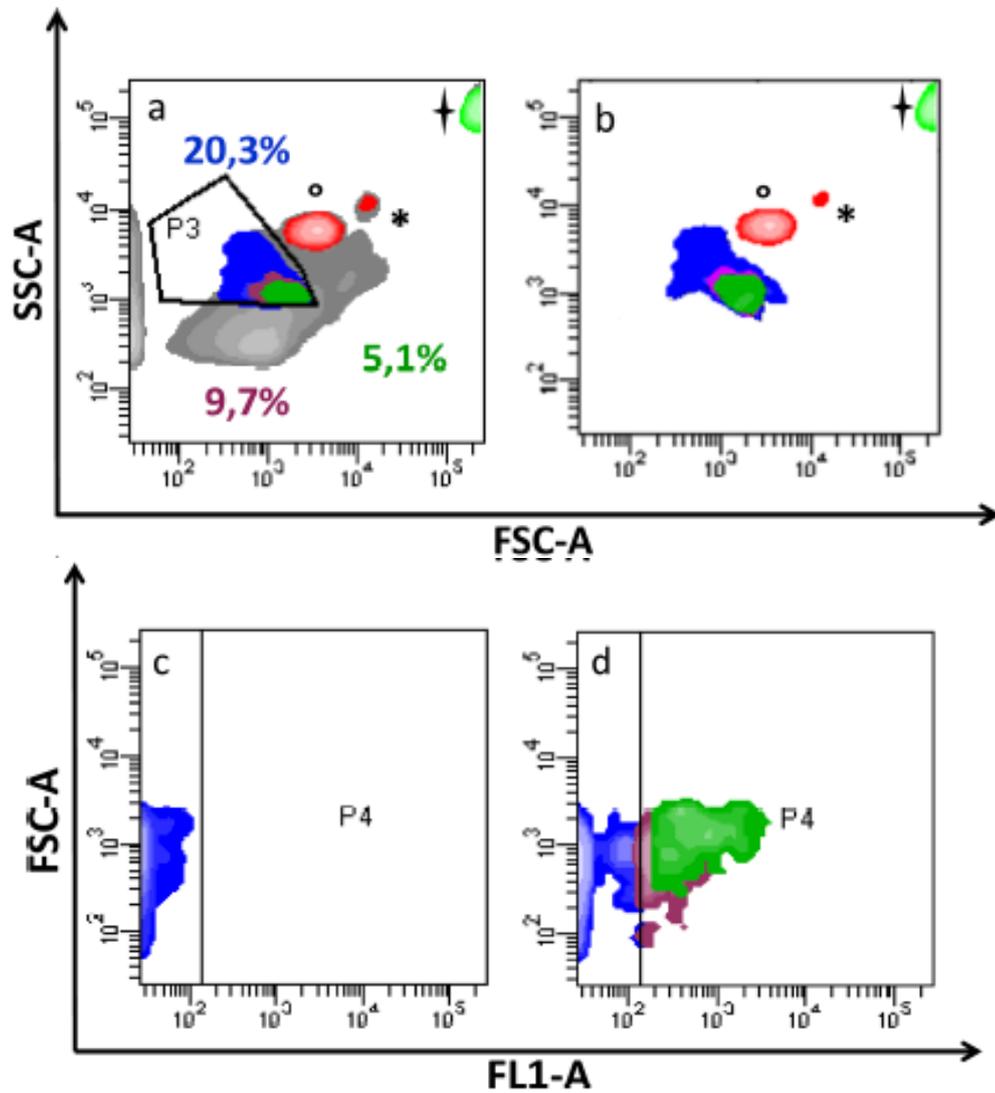


Figura 32. Le EV del plasma sono state valutate mediante citofluorimetria. Si possono notare EV con un diametro  $<1\mu\text{m}$  positive per l'anti -SGCA (a- zona verde); il gate P3, senza detriti e aggregati è riportato nel pannello b. Il pannello c rappresenta il controllo negativo, il pannello d mostra la fluorescenza quando viene aggiunto l'anti-sarcoglicano

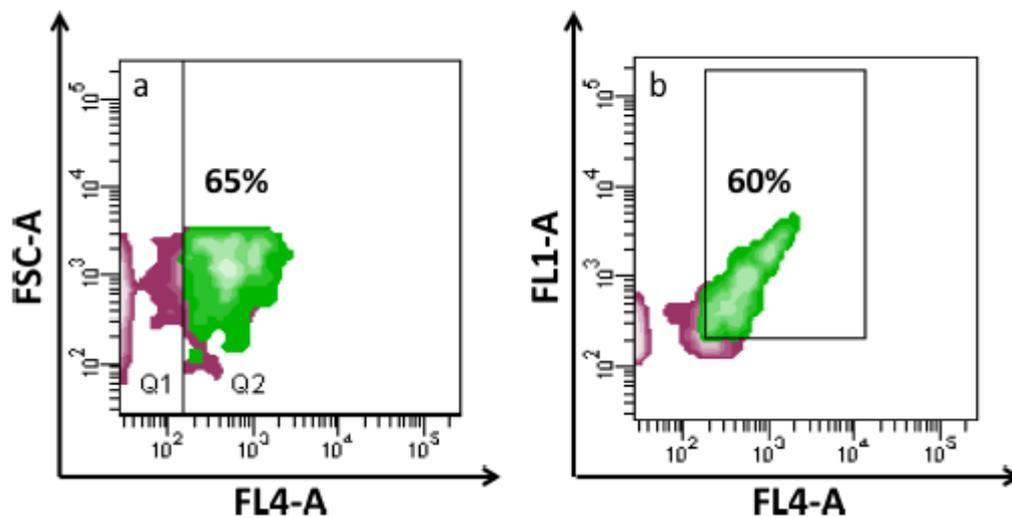


Figura 33 Analisi citofluorimetrica delle EV selezionate in base alla dimensione  
 Nel pannello A sono rappresentate le vescicole con un diametro  $<1\mu\text{m}$  marcate con CD81, mentre nel pannello B la coespressione di CD81 e SGCA

#### IMMUNO-CAPTURING DELLE EV PLASMATICHE DI DERIVAZIONE MUSCOLARE

Infine, gli anticorpi anti-SGCA sono stati coniugati a biglie magnetiche per isolare le EV rilasciate dal muscolo nel plasma e per verificare direttamente se le EV circolanti SGCA+ contenevano il miR-206.

Per far ciò il pellet di EV circolanti purificate dal plasma come precedentemente descritto, è stato risospeso in PBS + BSA 0,1% e incubato overnight con biglie magnetiche coniugate all'anti-SGCA.

L'analisi Western Blot ha confermato la presenza di Tsg101 sia nel pellet di EV totali che nelle EV "immuno-catturate" (Figura 34A)

Inoltre, come supposto, la quantificazione dei microRNA ha evidenziato un aumento del rapporto miR-206/miR16 nella popolazione di EV SGCA+ rispetto alle EV totali o non catturate (Figura 34B), sostenendo ulteriormente l'ipotesi che le EV SGCA+ potrebbero provenire dal tessuto muscolare.

E' interessante notare che anche il confronto tra i livelli di miR-16, contenuti nelle EV "immuno-catturate", con i livelli di miR-16 presenti nelle EV non catturate, ha

rivelato che le vescicole muscolari rappresentano circa il 2-5% del totale (Figura 34C), questo dato è in accordo con i dati di citofluorimetria.

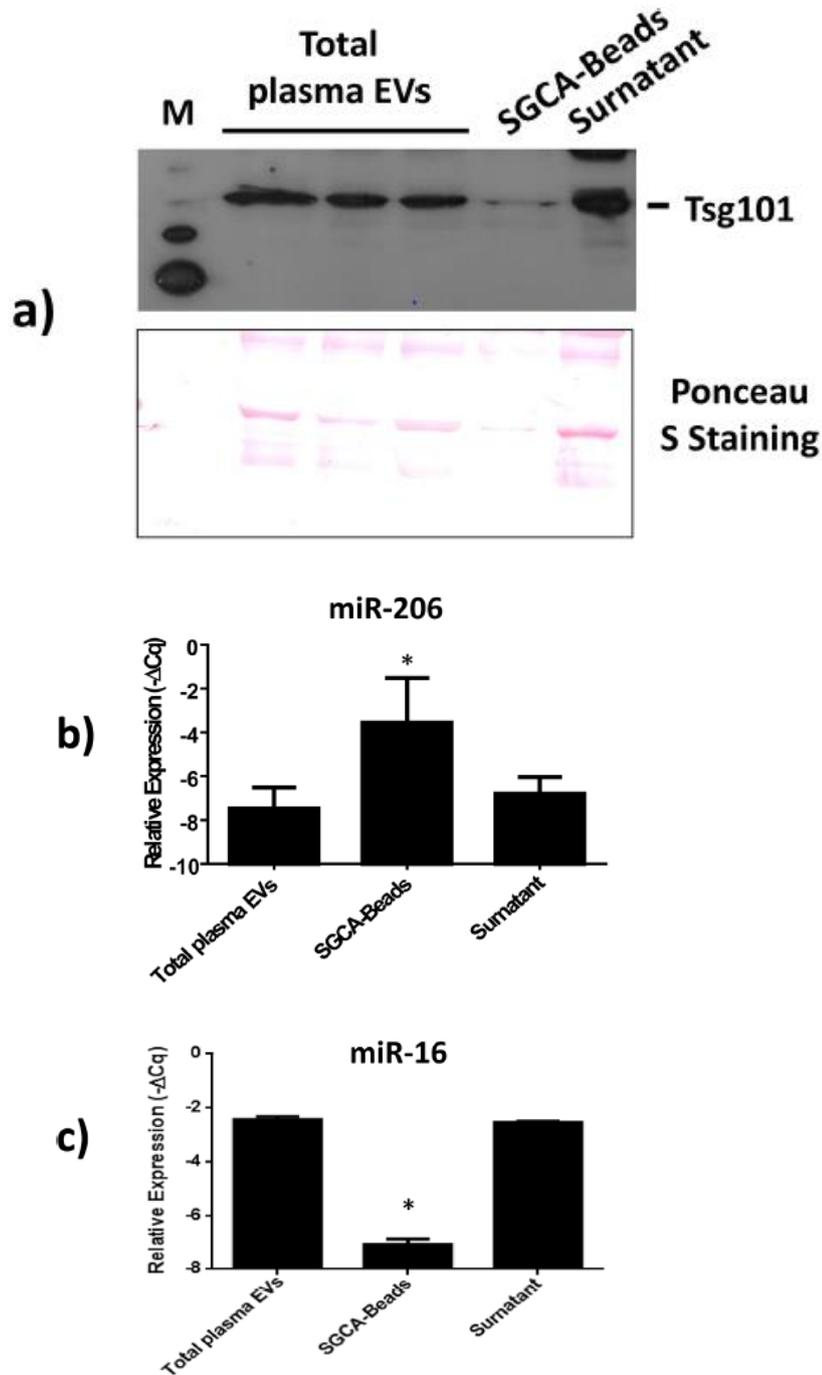


Figura 34. . Isolamento delle EVS SGCA+ dal plasma mediante immuno-capturing. L'analisi Western Blot conferma la presenza di Tsg101 nelle EV isolate; la colorazione Rosso Ponceau rappresenta il controllo del caricamento su gel(A). Quantificazione di miR-206 e del rapporto tra di miR-206 e miR-16 (B)-(C)

### ***CORRELAZIONE TRA L'ESPRESSIONE DEI MIRNA CONTENUTI NELLE EV PLASMATICHE E LA CAPACITÀ AEROBICA***

Per verificare se i miRNA presenti all'interno delle EV circolanti possano essere utilizzati per acquisire informazioni riguardo gli adattamenti muscolari, è stata studiata la modulazione dei livelli di espressione dei miRNA contenuti nelle EV secrete nel circolo ematico in relazione ai livelli di fitness aerobico. I seguenti miRNA: miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206 e miR-499, specificatamente espressi nel muscolo, e i ben caratterizzati miR-146a e miR-181-5p sono stati analizzati nelle EV circolanti ottenute da 18 soggetti sani che erano stati scelti in modo da rappresentare un ampio intervallo di livelli di fitness aerobico (Tabella 5). Inoltre, il miRNA miR-16 e miR-24, che sono stabilmente espressi nel sangue [57] sono stati utilizzati rispettivamente per la normalizzazione endogena e come controllo negativo.

L'analisi effettuata ha evidenziato una correlazione positiva significativa tra la capacità aerobica (misurata come  $VO_{2max}$ ) e i livelli di espressione di miR-1, miR-133b, miR-206, miR-499 e miR-181 (Figura 35). Questi dati suggeriscono che i miRNA trasportati dalle EV plasmatiche potrebbero essere utilizzate come biomarcatori per il fitness aerobico e potrebbero fornire informazioni utili sull'omeostasi muscolare.

### ***MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEI MIRNA CONTENUTI NELLE EV IN RISPOSTA AD ESERCIZIO AEROBICO ACUTO***

Il rilascio di miRNA nel sangue potrebbe essere dovuta sia a processi di esportazione attiva che alla fuoriuscita passiva attraverso la membrana plasmatica in seguito a danno o morte cellulare.

In risposta alla contrazione muscolare, potrebbero verificarsi entrambi i tipi di rilascio dei miRNA contribuendo così a determinare i livelli di miRNA circolanti; tuttavia, è importante sottolineare che i miRNA liberi potrebbero avere ruoli biologici diversi rispetto ai miRNA trasportati dalle vescicole, perché non vi è alcuna chiara evidenza della loro internalizzazione nella cellula target mentre vi è una grande quantità di dati che dimostrano l'internalizzazione e la regolazione dell'attività della cellula ricevente da parte dei miRNA contenuti nelle EV .

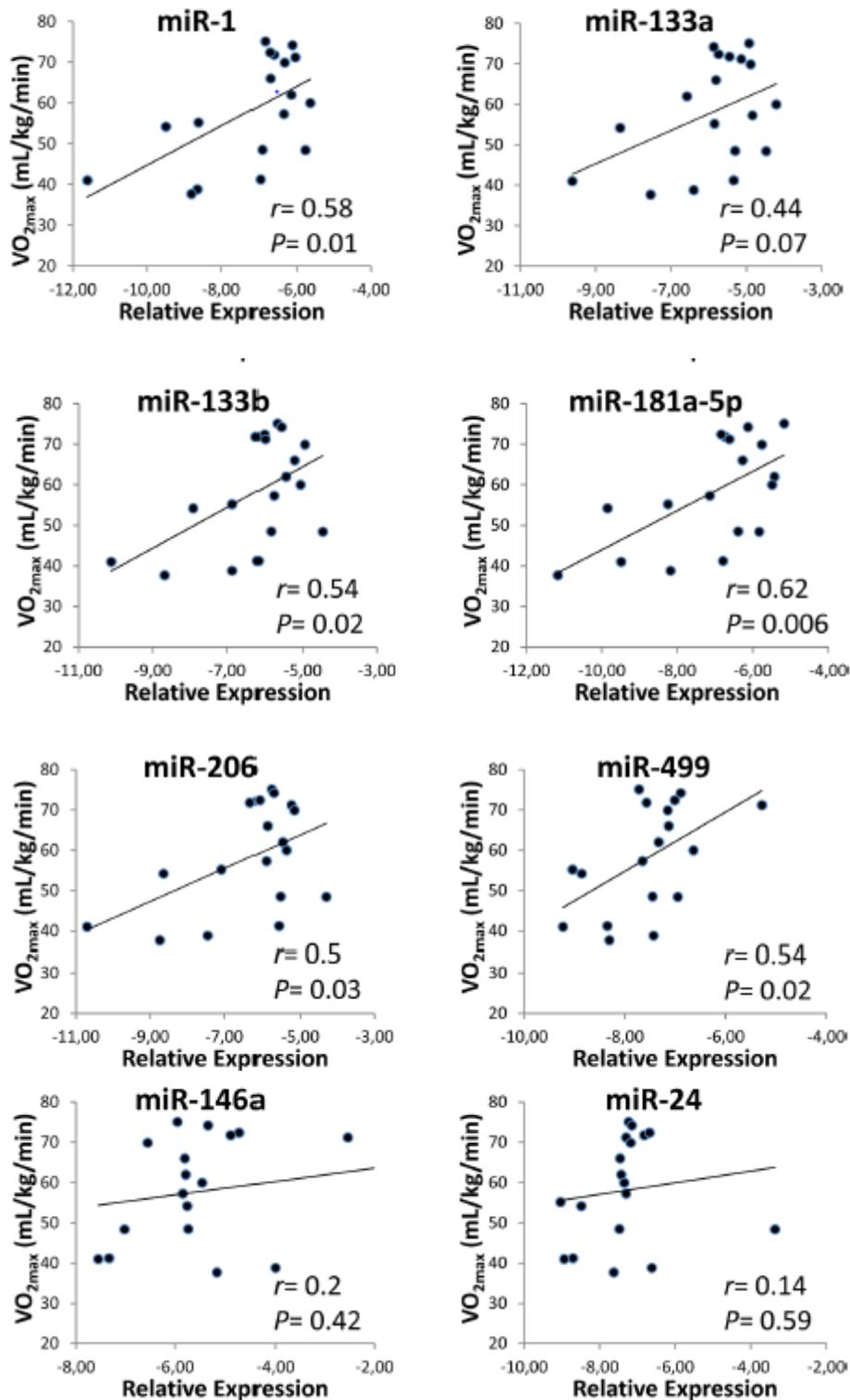


Figura 35. Correlazione tra livelli espressione di specifici miRNA nelle EV e la capacità aerobica. Si osserva una significativa correlazione significativa diretta ( $r$  = coefficiente di correlazione) tra i livelli di miR-1, miR-133b, miR-206, miR-499 e miR-181-5p e la  $VO_{2max}$ . l'espressione di miR-24 rappresenta il controllo negativo.

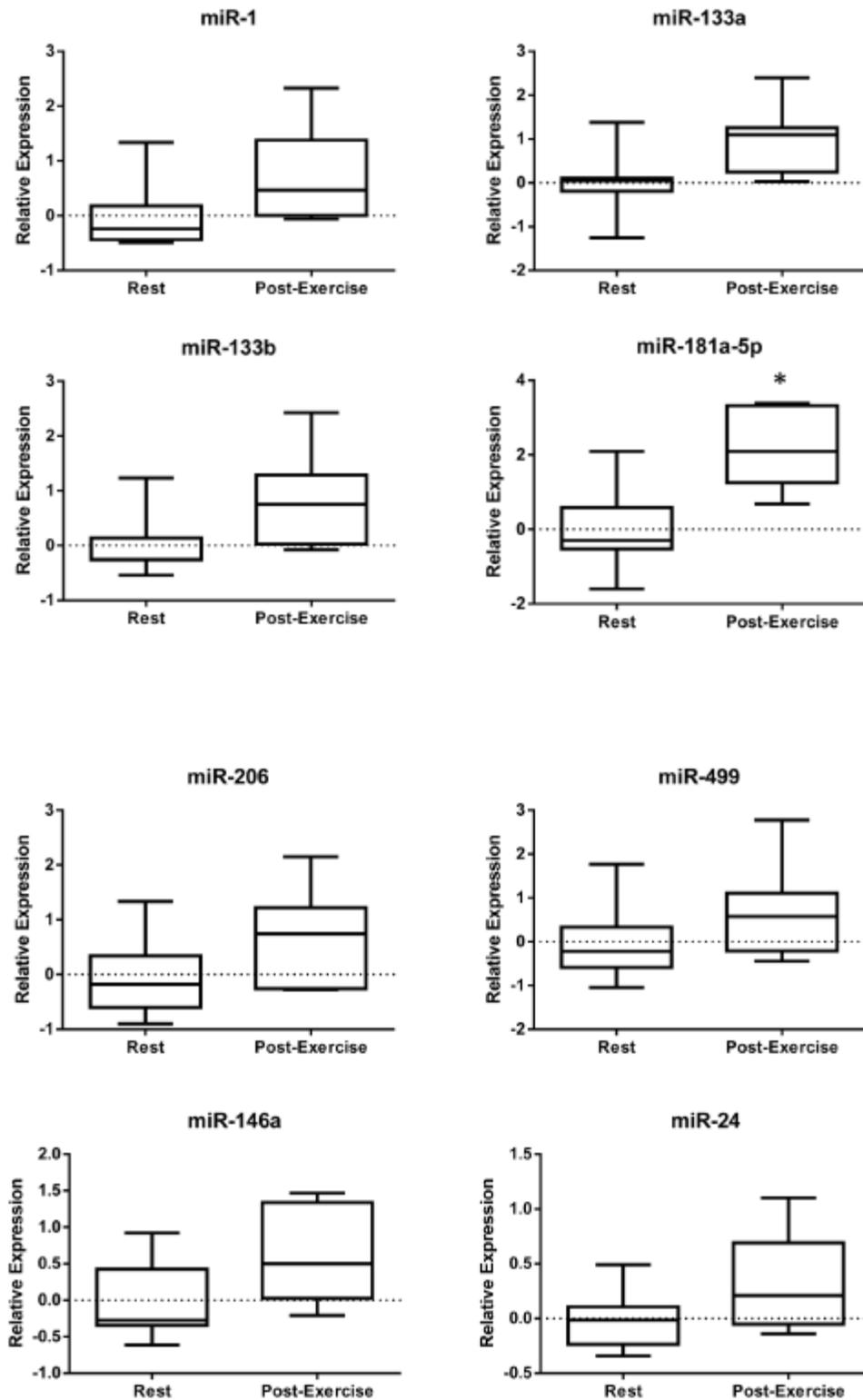


Figura 36. Modulazione dei livelli di miRNA nelle EV in risposta ad una seduta di esercizio aerobico. I grafici mostrano i livelli di espressione di miR-1, -133a, -133b, -146a, -181a-5p, -206, -499 a riposo (rest) e 1 ora dopo la sessione di esercizio(post-esercizio).

Partendo da questa premessa, sono stati studiati i livelli di alcuni miRNA chiave coinvolti nell'adattamento all'esercizio aerobico contenuti nelle EV circolanti. I campioni di sangue sono stati raccolti in condizioni di riposo prima dell'esercizio e un'ora dopo il termine della sessione di esercizio. Le EV circolanti sono state isolate mediante ultracentrifugazione e sono stati quantificati i livelli di espressione dei miRNA al loro interno.

Come riportato in figura 36, il miR-181a-5p incrementava significativamente dopo l'esercizio, mentre miR-133b ha mostrato solo una tendenza ad aumentare. Questi dati supportano l'ipotesi che i miRNA delle EV potrebbero fornirci informazioni sui meccanismi molecolari che guidano l'adattamento all'esercizio.

## ***DISCUSSIONE***

Ad oggi, le miochine, sono considerate come i principali segnali molecolari rilasciati dal muscolo e responsabili della comunicazione di questo tessuto con altri organi [177].

E' stato recentemente dimostrato che, oltre alle miochine, le cellule muscolari rilasciano EV nel terreno di coltura, in particolare esosomi, che potrebbero mediare la comunicazione intercellulare in condizioni normali e/o patologiche [168]. Dati recenti indicano che gli esosomi possono trasportare segnali molecolari alle cellule vicine e/o ai tessuti lontani [52, 56, 178, 179] mediante il trasferimento di RNA, proteine e lipidi [180]. Poiché è noto che il secretoma del muscolo scheletrico è regolato anche in relazione al differenziamento dei mioblasti [12], lo scopo del nostro studio è stato quello di dimostrare se le EV rilasciate dalle cellule muscolari, possono fungere da segnali endocrini coinvolti nella comunicazione tra cellule muscolari e altri tessuti durante il differenziamento miogenico.

I dati ottenuti ci hanno fornito tre importanti risultati: innanzitutto le C2C12 rilasciano EV durante tutte le fasi del differenziamento miogenico, in secondo luogo, il rilascio di EV cambia in risposta allo stimolo di differenziamento miogenico, sia in termini di dimensioni che di contenuto di proteine e RNA, suggerendo che le molecole contenute in queste vescicole non rappresentano frammenti casuali di cellule, ma segnali molecolari selezionati in maniera specifica e modulati durante la miogenesi, lasciando ipotizzare che possano influenzare in modo diverso il comportamento delle cellule bersaglio e infine, ma non meno importante, questi segnali complessi possono mediare anche la comunicazione tra le cellule muscolari e altri tipi cellulari coinvolti nella miogenesi, come per esempio i macrofagi [181].

In accordo con l'ipotesi che il muscolo può generare segnali endocrini durante il processo di miogenesi, i nostri dati mostrano che le EV rilasciate dai miociti durante le prime fasi di differenziamento trasportano segnali che sembrano rallentare l'inizio di tale processo, poiché diminuiscono i livelli d'espressione di MyoG, MyHC e Mef2c, e allo stesso tempo stimolano le cellule bersaglio a proliferare inducendo la sovra-espressione di Axin-2, id-1 e id-2.

E' interessante notare come i MyoT0/T2 rilasciano diverse tipologie di vescicole, tutte positive ai marcatori esosomiali classici, ma che possono essere distinte tra loro poiché presentano densità di galleggiamento diverse e differente contenuto di acidi nucleici. In maggior dettaglio, le vescicole più leggere presentano maggiori

quantità di RNA rispetto a quelle più pesanti che invece sono arricchite in DNA. Dai dati riportati, emerge che probabilmente sono le sottopopolazioni di vescicole più pesanti, ad influenzare in modo significativo il programma d'espressione genica dei miociti che si trovano nelle fasi iniziali del percorso di differenziamento miogenico.

Effetti delle vescicole sulla proliferazione cellulare sono stati precedentemente riportati anche in altri tipi di cellule. Per fare qualche esempio, gli esosomi rilasciati dalle cellule dendritiche promuovono la proliferazione delle cellule natural killer [182], quelli rilasciati da cellule del timo inibiscono la proliferazione delle cellule T [183], mentre gli esosomi secreti da linee cellulari tumorali aumentano la proliferazione delle cellule stesse che li hanno rilasciati [184].

I dati riportati in questa tesi estendono queste osservazioni suggerendo che i segnali trasportati dalle EV sono parte integrante del complesso network di segnali che regolano il processo di miogenesi contribuendo a coordinare l'attività delle cellule muscolari durante le fasi del differenziamento. In particolare, le evidenze riportate suggeriscono che le EV possano essere coinvolte nella regolazione del delicato equilibrio tra proliferazione e differenziamento del miocita nelle prime fasi della miogenesi.

Inoltre, anche se saranno necessari ulteriori studi, i dati relativi alla stimolazione delle cellule RAW 264.7 indicano che le EV partecipano anche al dialogo che avviene tra cellule muscolari e altri tipi di cellule presenti nella nicchia del muscolo, in particolare i macrofagi, probabilmente in combinazione con le miochine, agendo da mediatori di segnali muscolari.

Il muscolo scheletrico, oltre ad essere una componente importante del sistema locomotore, ha un impatto importante nella regolazione del bilancio tra produzione e consumo di energia, influenzando quindi l'omeostasi e il metabolismo dell'intero organismo.

La contrazione muscolare è un importante stimolo che induce il muscolo a rilasciare peptidi e proteine che prendono parte agli adattamenti dell'esercizio fisico.

Studi pionieristici hanno messo in evidenza che le miochine rilasciate dal muscolo in seguito alla contrazione intervengono proprio nella regolazione dei cambiamenti metabolici, influenzando il metabolismo glucidico e lipidico non solo nel muscolo

stesso ma anche in altri organi o tessuti quali il tessuto adiposo, il fegato, il cervello e il sistema cardiovascolare.

Benché negli ultimi anni siano stati fatti molti passi avanti nella caratterizzazione del secretoma muscolare, le conoscenze dei meccanismi di espressione e di rilascio delle miochine, soprattutto in risposta alle cascate di segnalazione attivate dalla contrazione, sono ancora limitate.

Negli ultimi anni, progressi significativi sono stati realizzati grazie allo sviluppo di modelli *in vitro* che permettono lo studio degli eventi molecolari connessi all'attività contrattile delle miofibre. Uno di questi è rappresentato dall'applicazione di impulsi elettrici (EPS) in miotubi di cellule C2C12; la stimolazione elettrica è in grado di riprodurre gli eventi che avvengono durante la contrazione del muscolo scheletrico *in vivo* come, per esempio, l'aumento della spesa energetica associata all'attivazione di AMPK, delle MAPK, dell'uptake di glucosio insulino-dipendente e indipendenti, di PGC1 $\alpha$  e ad una maggiore espressione delle proteine coinvolte nella fosforilazione ossidativa e nel rilascio delle miochine [185, 186]. Questo è reso possibile perché l'attività che il motoneurone svolge *in vivo* è sostituita da impulsi elettrici che provocano l'aumento dei transienti di Ca<sup>2+</sup> che inducono l'attività contrattile nelle C2C12 [187], indicando che l'EPS rappresenta un ottimo modello per studiare di esercizio *in vitro*.

Inoltre è riportato in letteratura che l'aumento del calcio intracellulare, elemento essenziale durante la contrazione muscolare, è coinvolto nel meccanismo di rilascio delle vescicole [159, 188].

Sulla base di queste evidenze, dopo aver dimostrato che le C2C12 rilasciano in modo costitutivo EV in grado di regolare il differenziamento miogenico, abbiamo studiato se il muscolo in contrazione può rilasciare segnali sotto forma di EV che andrebbero a sommarsi alle già note miochine. In particolare il monitoraggio delle EV mediante NTA ha evidenziato che le C2C12 aumentano il rilascio di EV in seguito al protocollo di elettrostimolazione applicato, e che queste vescicole, avendo un diametro di circa 100 nm, sono attribuibili alla sottopopolazione degli esosomi.

I risultati presentati finora riguardo il rilascio di EV da parte delle C2C12, sia in modo costitutivo sia in seguito ad elettrostimolazione, ci hanno portato a verificare se anche *in vivo* il muscolo rilascia EV nel sangue e se l'esercizio fisico può modularne il contenuto.

Recenti studi hanno dimostrato che oltre alle miochine il muscolo in contrazione rilascia miRNA nel siero e nel plasma [189]. Anche se è stata dimostrata un'associazione tra miRNA circolanti ed EV, [57] i meccanismi attraverso i quali il muscolo rilascia miRNA nel plasma devono essere ancora chiariti.

L'obiettivo della seconda parte di questo studio è stato quello di indagare se il tessuto muscolare rilascia EV che trasportano miRNA nel sangue in condizioni fisiologiche. Per raggiungere questo obiettivo, abbiamo utilizzato una combinazione di tre tecniche: analisi di citometria, separazione mediante gradiente di densità e immuno-capturing.

I risultati ottenuti hanno fornito due importanti risultati: in primo luogo, il tessuto muscolare rilascia EV nel torrente ematico e in secondo luogo, i MyomiR in circolo sono almeno in parte contenuti all'interno delle EV di derivazione muscolare.

In particolare, i nostri risultati dimostrano che le EV circolanti presentano alcune caratteristiche tipiche degli esosomi (costante di densità di galleggiamento e positività per CD81 e Tsg101) e, soprattutto, una piccola frazione delle EV positive all'alfa-sarcoglicano è arricchita anche per il contenuto di miR-206, suggerendo che probabilmente originano dalle cellule muscolari. Inoltre, le analisi di citometria e immuno-capturing suggeriscono che le EV muscolari rappresentano circa il 2-5% delle EV circolanti totali, in accordo con i dati in letteratura secondo i quali la maggior parte delle EV nel sangue deriva da cellule del sistema immunitario e dalle piastrine.

Inoltre recenti studi hanno riportato un'associazione tra esercizio fisico e la modulazione dei miRNA circolanti. Per esempio, uno studio pionieristico di Baggish et al. [106] ha evidenziato una correlazione positiva tra miR-146a e i livelli di  $VO_{2max}$ , e più recentemente Bye et al. [109] hanno riportato che miR-21, miR-210 e miR-222 presentano livelli più alti in soggetti con un  $VO_{2max}$  maggiore rispetto a un gruppo di controllo.

A differenza degli studi precedenti, la nostra ricerca si è concentrata sui miRNA contenuti dentro le EV. I dati di espressione ottenuti hanno mostrato una correlazione positiva tra capacità aerobica e MyomiR.

Inoltre è stato valutato il ruolo dell'attività fisica e di una sessione di esercizio acuto nella modulazione dei miRNA all'interno delle EV.

E' interessante notare che i livelli dei MyomiR nelle EV muscolari circolanti sembrano essere influenzati principalmente dalla capacità aerobica, ma anche da un singolo esercizio aerobico. In dettaglio, i nostri dati evidenziano un aumento significativo di miR-181 e miR-133b -5p, mentre è stata evidenziata solo una leggera tendenza ad aumentare per gli altri MyomiR all'interno delle EV circolanti. Questi dati sono in linea con studi recenti che hanno mostrato un aumento dei MyomiR circolanti in risposta ad esercizio aerobico acuto [104] [106].

Tuttavia, gli studi presenti in letteratura non hanno affrontato la questione di quale tipo di vettore trasporti i miRNA. Si tratta di un aspetto molto importante poiché esistono chiare evidenze che dimostrano che i miRNA vescicolari possono essere internalizzati da una cellula bersaglio e regolare l'espressione genica [190], mentre non è ancora chiaro se questo avvenga anche per i miRNA liberi.

Inoltre, è interessante notare che i nostri dati dimostrano che l'aumento di miR-133b e miR-181 in circolo a seguito dell'esercizio acuto deriva, almeno in parte, dai meccanismi di secrezione attiva, e non è solo legato alla perdita passiva attraverso la membrana plasmatica in seguito ai microtraumi causati dall'esercizio. Nel loro insieme queste evidenze suggeriscono che un muscolo attivo può rilasciare EV contenenti miRNA che mediano la comunicazione cellula-cellula e che potrebbero essere coinvolti nella riparazione, nella rigenerazione e nel rimodellamento del muscolo.

## ***CONCLUSIONI***

La dimostrazione che il muscolo rilascia EV nell'ambiente extracellulare e nel flusso sanguigno, apre un nuovo campo di ricerca sull'attività secretoria di questo organo.

In effetti, un numero sempre maggiore di dati ha dimostrato che le EV possono agire come mediatori della comunicazione intercellulare fungendo da trasportatori di molecole quali recettori, proteine transmembrana, proteine chinasi, mRNA, miRNA, DNA e lipidi [71, 140, 191]. Alla luce di queste evidenze, le attuali conoscenze sui fattori rilasciati dal muscolo dovrebbero essere ampliate aggiungendo al lungo elenco delle miochine una nuova classe di segnali, le EV.

Infine, oltre ad avere un ruolo nella comunicazione intercellulare, studi recenti hanno dimostrato che le EV potrebbero fornire informazioni per quanto riguarda il tessuto di origine ed essere quindi utilizzate come biomarcatori utili per numerose applicazioni diagnostiche limitando la necessità di biopsie.

Studi futuri potrebbero essere progettati per investigare il contenuto delle EV muscolari sia in condizioni fisiologiche che patologiche (ad esempio l'inattività, l'atrofia, diabete, ecc.).

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ*. Nat Rev Endocrinol, 2012. **8**(8): p. 457-65.
2. Pedersen, B.K., *Muscle as a secretory organ*. Compr Physiol, 2013. **3**(3): p. 1337-62.
3. Peake, J.M., et al., *Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects*. Exerc Immunol Rev, 2015. **21**: p. 8-25.
4. Snell, E.S. and E. Atkins, *The Presence of Endogenous Pyrogen in Normal Rabbit Tissues*. J Exp Med, 1965. **121**: p. 1019-38.
5. Cannon, J.G. and M.J. Kluger, *Endogenous pyrogen activity in human plasma after exercise*. Science, 1983. **220**(4597): p. 617-9.
6. Pedersen, B.K., et al., *Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate?* J Muscle Res Cell Motil, 2003. **24**(2-3): p. 113-9.
7. Pedersen, B.K., et al., *Role of myokines in exercise and metabolism*. J Appl Physiol (1985), 2007. **103**(3): p. 1093-8.
8. Brandt, C. and B.K. Pedersen, *The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 520258.
9. Steensberg, A., et al., *Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6*. J Physiol, 2000. **529 Pt 1**: p. 237-42.
10. Pedersen, B.K., *Muscles and their myokines*. J Exp Biol, 2011. **214**(Pt 2): p. 337-46.
11. Fiuza-Luces, C., et al., *Exercise is the real polypill*. Physiology (Bethesda), 2013. **28**(5): p. 330-58.
12. Henningsen, J., et al., *Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(11): p. 2482-96.
13. Mauro, A., *Satellite cell of skeletal muscle fibers*. J Biophys Biochem Cytol, 1961. **9**: p. 493-5.
14. Pannerec, A., et al., *Defining skeletal muscle resident progenitors and their cell fate potentials*. Development, 2013. **140**(14): p. 2879-91.
15. Reznik, M., *Thymidine-3H uptake by satellite cells of regenerating skeletal muscle*. J Cell Biol, 1969. **40**(2): p. 568-71.
16. Kuang, S., et al., *Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle*. Cell, 2007. **129**(5): p. 999-1010.
17. Lipton, B.H. and E. Schultz, *Developmental fate of skeletal muscle satellite cells*. Science, 1979. **205**(4412): p. 1292-4.
18. Le Grand, F., et al., *Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(6): p. 535-47.
19. Lepper, C., T.A. Partridge, and C.M. Fan, *An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration*. Development, 2011. **138**(17): p. 3639-46.
20. Bajard, L., et al., *A novel genetic hierarchy functions during hypaxial myogenesis: Pax3 directly activates Myf5 in muscle progenitor cells in the limb*. Genes Dev, 2006. **20**(17): p. 2450-64.
21. Hawke, T.J. and D.J. Garry, *Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology*. J Appl Physiol (1985), 2001. **91**(2): p. 534-51.

22. Baeza-Raja, B. and P. Munoz-Canoves, *p38 MAPK-induced nuclear factor-kappaB activity is required for skeletal muscle differentiation: role of interleukin-6*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(4): p. 2013-26.
23. Hoene, M., et al., *Interleukin-6 promotes myogenic differentiation of mouse skeletal muscle cells: role of the STAT3 pathway*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013. **304**(2): p. C128-36.
24. Kanno, Y., et al., *Selective androgen receptor modulator, YK11, regulates myogenic differentiation of C2C12 myoblasts by follistatin expression*. *Biol Pharm Bull*, 2013. **36**(9): p. 1460-5.
25. Bhaskaran, M. and M. Mohan, *MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease*. *Vet Pathol*, 2014. **51**(4): p. 759-74.
26. Horvitz, H.R. and J.E. Sulston, *Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans**. *Genetics*, 1980. **96**(2): p. 435-54.
27. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans**. *Nature*, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
28. Slack, F.J., et al., *The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor*. *Mol Cell*, 2000. **5**(4): p. 659-69.
29. Pasquinelli, A.E., et al., *Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA*. *Nature*, 2000. **408**(6808): p. 86-9.
30. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 281-97.
31. Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. *Genome Res*, 2004. **14**(10A): p. 1902-10.
32. Saini, H.K., S. Griffiths-Jones, and A.J. Enright, *Genomic analysis of human microRNA transcripts*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(45): p. 17719-24.
33. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. *Nature*, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
34. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. *Nature*, 2004. **432**(7014): p. 231-5.
35. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. *Nature*, 2004. **432**(7014): p. 235-40.
36. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing*. *Genes Dev*, 2004. **18**(24): p. 3016-27.
37. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. *Genes Dev*, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
38. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. *Science*, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
39. Lee, Y., et al., *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. *EMBO J*, 2002. **21**(17): p. 4663-70.
40. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. *Cell*, 2003. **115**(2): p. 199-208.
41. Czech, B., et al., *Hierarchical rules for Argonaute loading in *Drosophila**. *Mol Cell*, 2009. **36**(3): p. 445-56.

42. Castilla-Llorente, V., et al., *Mammalian GW220/TNGW1 is essential for the formation of GW/P bodies containing miRISC*. J Cell Biol, 2012. **198**(4): p. 529-44.
43. Babiarz, J.E., et al., *Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs*. Genes Dev, 2008. **22**(20): p. 2773-85.
44. Aukerman, M.J. and H. Sakai, *Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes*. Plant Cell, 2003. **15**(11): p. 2730-41.
45. Wu, L., J. Fan, and J.G. Belasco, *MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 4034-9.
46. Eiring, A.M., et al., *miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts*. Cell, 2010. **140**(5): p. 652-65.
47. Triboulet, R., et al., *Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication*. Science, 2007. **315**(5818): p. 1579-82.
48. Vasudevan, S., Y. Tong, and J.A. Steitz, *Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1931-4.
49. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.
50. Mitchell, P.S., et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10513-8.
51. Gibbins, D.J., et al., *Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(9): p. 1143-9.
52. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 654-9.
53. Camussi, G., et al., *Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication*. Kidney Int, 2010. **78**(9): p. 838-48.
54. Pigati, L., et al., *Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13515.
55. Kosaka, N., et al., *Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(23): p. 17442-52.
56. Skog, J., et al., *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(12): p. 1470-6.
57. Hunter, M.P., et al., *Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles*. PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3694.
58. Michael, A., et al., *Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers*. Oral Dis, 2010. **16**(1): p. 34-8.
59. Dimov, I., L. Jankovic Velickovic, and V. Stefanovic, *Urinary exosomes*. ScientificWorldJournal, 2009. **9**: p. 1107-18.
60. Zhang, Y., et al., *Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration*. Mol Cell, 2010. **39**(1): p. 133-44.
61. Pegtel, D.M., et al., *Functional delivery of viral miRNAs via exosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(14): p. 6328-33.

62. Creemers, E.E., A.J. Tijssen, and Y.M. Pinto, *Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?* *Circ Res*, 2012. **110**(3): p. 483-95.
63. Vickers, K.C., et al., *MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins.* *Nat Cell Biol*, 2011. **13**(4): p. 423-33.
64. Arroyo, J.D., et al., *Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(12): p. 5003-8.
65. Wang, K., et al., *Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells.* *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(20): p. 7248-59.
66. Turchinovich, A. and B. Burwinkel, *Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma.* *RNA Biol*, 2012. **9**(8): p. 1066-75.
67. Zhang, Y., et al., *Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases.* *Clin Chem*, 2010. **56**(12): p. 1830-8.
68. They, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena, *Exosomes: composition, biogenesis and function.* *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(8): p. 569-79.
69. Simons, M. and G. Raposo, *Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication.* *Curr Opin Cell Biol*, 2009. **21**(4): p. 575-81.
70. Goldie, B.J., et al., *Activity-associated miRNA are packaged in Map1b-enriched exosomes released from depolarized neurons.* *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**(14): p. 9195-208.
71. Guduric-Fuchs, J., et al., *Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types.* *BMC Genomics*, 2012. **13**: p. 357.
72. Ohshima, K., et al., *Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line.* *PLoS One*, 2010. **5**(10): p. e13247.
73. Silva, J., et al., *Vesicle-related microRNAs in plasma of nonsmall cell lung cancer patients and correlation with survival.* *Eur Respir J*, 2011. **37**(3): p. 617-23.
74. Taylor, D.D. and C. Gercel-Taylor, *MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer.* *Gynecol Oncol*, 2008. **110**(1): p. 13-21.
75. Kosaka, N., et al., *Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis.* *J Biol Chem*, 2013. **288**(15): p. 10849-59.
76. Villarroya-Beltri, C., et al., *Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs.* *Nat Commun*, 2013. **4**: p. 2980.
77. Koppers-Lalic, D., et al., *Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes.* *Cell Rep*, 2014. **8**(6): p. 1649-58.
78. Frank, F., N. Sonenberg, and B. Nagar, *Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2.* *Nature*, 2010. **465**(7299): p. 818-22.
79. Zhang, J., et al., *Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function.* *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2015. **13**(1): p. 17-24.

80. Lee, Y.S., et al., *Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(9): p. 1150-6.
81. Lee, R.C. and V. Ambros, *An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 862-4.
82. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
83. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of tissue-specific microRNAs from mouse*. Curr Biol, 2002. **12**(9): p. 735-9.
84. Sempere, L.F., et al., *Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation*. Genome Biol, 2004. **5**(3): p. R13.
85. Beuvink, I., et al., *A novel microarray approach reveals new tissue-specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(7): p. e52.
86. Shingara, J., et al., *An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling*. RNA, 2005. **11**(9): p. 1461-70.
87. Liang, Y., et al., *Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 166.
88. Lee, E.J., et al., *Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors*. RNA, 2008. **14**(1): p. 35-42.
89. Novak, J., et al., *MicroRNA-206: a promising theranostic marker*. Theranostics, 2014. **4**(2): p. 119-33.
90. Russell, A.P., et al., *Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle*. Diabetes, 2003. **52**(12): p. 2874-81.
91. Russell, A.P., et al., *Regulation of metabolic transcriptional co-activators and transcription factors with acute exercise*. FASEB J, 2005. **19**(8): p. 986-8.
92. McCarthy, J.J. and K.A. Esser, *MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy*. J Appl Physiol (1985), 2007. **102**(1): p. 306-13.
93. Elia, L., et al., *Reciprocal regulation of microRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions*. Circulation, 2009. **120**(23): p. 2377-85.
94. Allen, D.L., et al., *Effects of spaceflight on murine skeletal muscle gene expression*. J Appl Physiol (1985), 2009. **106**(2): p. 582-95.
95. Nakasa, T., et al., *Acceleration of muscle regeneration by local injection of muscle-specific microRNAs in rat skeletal muscle injury model*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(10): p. 2495-505.
96. McCarthy, J.J., et al., *Evidence of MyomiR network regulation of beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy*. Physiol Genomics, 2009. **39**(3): p. 219-26.
97. Bodine, S.C., et al., *Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1704-8.
98. Kim, E., et al., *Increased expression of vascular cell adhesion molecule 1 in muscle biopsy samples from juvenile dermatomyositis patients with short*

- duration of untreated disease is regulated by miR-126. Arthritis Rheum, 2012. 64(11): p. 3809-17.*
99. Kim, H.K., et al., *Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation.* J Cell Biol, 2006. **174**(5): p. 677-87.
  100. Liu, N., et al., *microRNA-206 promotes skeletal muscle regeneration and delays progression of Duchenne muscular dystrophy in mice.* J Clin Invest, 2012. **122**(6): p. 2054-65.
  101. Chen, J.F., et al., *The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation.* Nat Genet, 2006. **38**(2): p. 228-33.
  102. Drummond, M.J., et al., *Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(6): p. E1333-40.
  103. Davidsen, P.K., et al., *High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA expression.* J Appl Physiol (1985), 2011. **110**(2): p. 309-17.
  104. Nielsen, S., et al., *Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle.* J Physiol, 2010. **588**(Pt 20): p. 4029-37.
  105. Russell, A.P., et al., *Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short-term endurance training.* J Physiol, 2013. **591**(Pt 18): p. 4637-53.
  106. Baggish, A.L., et al., *Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training.* J Physiol, 2011. **589**(Pt 16): p. 3983-94.
  107. Uhlemann, M., et al., *Impact of different exercise training modalities on the coronary collateral circulation and plaque composition in patients with significant coronary artery disease (EXCITE trial): study protocol for a randomized controlled trial.* Trials, 2012. **13**: p. 167.
  108. Aoi, W., et al., *Muscle-enriched microRNA miR-486 decreases in circulation in response to exercise in young men.* Front Physiol, 2013. **4**: p. 80.
  109. Bye, A., et al., *Circulating microRNAs and aerobic fitness--the HUNT-Study.* PLoS One, 2013. **8**(2): p. e57496.
  110. Sawada, S., et al., *Profiling of circulating microRNAs after a bout of acute resistance exercise in humans.* PLoS One, 2013. **8**(7): p. e70823.
  111. Pritchard, C.C., et al., *Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies.* Cancer Prev Res (Phila), 2012. **5**(3): p. 492-7.
  112. Waters, C.M. and B.L. Bassler, *Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 319-46.
  113. Chargaff, E. and R. West, *The biological significance of the thromboplastic protein of blood.* J Biol Chem, 1946. **166**(1): p. 189-97.
  114. Wolf, P., *The nature and significance of platelet products in human plasma.* Br J Haematol, 1967. **13**(3): p. 269-88.
  115. Anderson, H.C., *Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage.* J Cell Biol, 1969. **41**(1): p. 59-72.
  116. De Broe, M., R. Wieme, and F. Roels, *Letter: Membrane fragments with koinozymic properties released from villous adenoma of the rectum.* Lancet, 1975. **2**(7946): p. 1214-5.

117. Benz, E.W., Jr. and H.L. Moses, *Small, virus-like particles detected in bovine sera by electron microscopy*. J Natl Cancer Inst, 1974. **52**(6): p. 1931-4.
118. Dalton, A.J., *Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus "virus-like" particles*. J Natl Cancer Inst, 1975. **54**(5): p. 1137-48.
119. Stegmayr, B. and G. Ronquist, *Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes*. Urol Res, 1982. **10**(5): p. 253-7.
120. Ronquist, G., et al., *An Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-stimulated adenosine triphosphatase in human prostatic fluid: part I*. Andrologia, 1978. **10**(4): p. 261-72.
121. Taylor, D.D., H.D. Homesley, and G.J. Doellgast, *Binding of specific peroxidase-labeled antibody to placental-type phosphatase on tumor-derived membrane fragments*. Cancer Res, 1980. **40**(11): p. 4064-9.
122. Dvorak, H.F., et al., *Tumor shedding and coagulation*. Science, 1981. **212**(4497): p. 923-4.
123. Pan, B.T. and R.M. Johnstone, *Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor*. Cell, 1983. **33**(3): p. 967-78.
124. Raposo, G., et al., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1161-72.
125. Pisitkun, T., R.F. Shen, and M.A. Knepper, *Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(36): p. 13368-73.
126. Lasser, C., M. Eldh, and J. Lotvall, *Isolation and characterization of RNA-containing exosomes*. J Vis Exp, 2012(59): p. e3037.
127. Keller, S., et al., *Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics*. J Transl Med, 2011. **9**: p. 86.
128. Caby, M.P., et al., *Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma*. Int Immunol, 2005. **17**(7): p. 879-87.
129. Poliakov, A., et al., *Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen*. Prostate, 2009. **69**(2): p. 159-67.
130. Lasser, C., et al., *RNA-containing exosomes in human nasal secretions*. Am J Rhinol Allergy, 2011. **25**(2): p. 89-93.
131. Yanez-Mo, M., et al., *Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions*. J Extracell Vesicles, 2015. **4**: p. 27066.
132. Le Pecq, J.B., *Dexosomes as a therapeutic cancer vaccine: from bench to bedside*. Blood Cells Mol Dis, 2005. **35**(2): p. 129-35.
133. Tanimura, A., D.H. McGregor, and H.C. Anderson, *Matrix vesicles in atherosclerotic calcification*. Proc Soc Exp Biol Med, 1983. **172**(2): p. 173-7.
134. Fischer von Mollard, G., et al., *rab3 is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(5): p. 1988-92.
135. They, C., M. Ostrowski, and E. Segura, *Membrane vesicles as conveyors of immune responses*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(8): p. 581-93.
136. Beyer, C. and D.S. Pisetsky, *The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases*. Nat Rev Rheumatol, 2010. **6**(1): p. 21-9.
137. Mathivanan, S., H. Ji, and R.J. Simpson, *Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication*. J Proteomics, 2010. **73**(10): p. 1907-20.

138. Bard, M.P., et al., *Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **31**(1): p. 114-21.
139. Rood, I.M., et al., *Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome*. Kidney Int, 2010. **78**(8): p. 810-6.
140. Gyorgy, B., et al., *Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(16): p. 2667-88.
141. Berckmans, R.J., et al., *Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(11): p. 2857-66.
142. van der Pol, E., et al., *Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(12): p. 2596-607.
143. Lotvall, J., et al., *Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**: p. 26913.
144. Chandler, W.L., W. Yeung, and J.F. Tait, *A new microparticle size calibration standard for use in measuring smaller microparticles using a new flow cytometer*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(6): p. 1216-24.
145. Scott, S., S.A. Pendlebury, and C. Green, *Lipid organization in erythrocyte membrane microvesicles*. Biochem J, 1984. **224**(1): p. 285-90.
146. Hugel, B., et al., *Membrane microparticles: two sides of the coin*. Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 22-7.
147. Bilyy, R.O., et al., *Macrophages discriminate glycosylation patterns of apoptotic cell-derived microparticles*. J Biol Chem, 2012. **287**(1): p. 496-503.
148. Simpson, R.J., et al., *Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential*. Expert Rev Proteomics, 2009. **6**(3): p. 267-83.
149. Cocucci, E., G. Racchetti, and J. Meldolesi, *Shedding microvesicles: artefacts no more*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(2): p. 43-51.
150. Record, M., et al., *Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors*. Biochem Pharmacol, 2011. **81**(10): p. 1171-82.
151. Keller, S., et al., *Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function*. Immunol Lett, 2006. **107**(2): p. 102-8.
152. Nickerson, D.P., et al., *Regulators of Vps4 ATPase activity at endosomes differentially influence the size and rate of formation of intraluminal vesicles*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(6): p. 1023-32.
153. Stuffers, S., et al., *Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs*. Traffic, 2009. **10**(7): p. 925-37.
154. They, C., et al., *Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7309-18.
155. Bobrie, A., et al., *Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses*. Traffic, 2011. **12**(12): p. 1659-68.
156. Trajkovic, K., et al., *Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes*. Science, 2008. **319**(5867): p. 1244-7.
157. Matsuo, H., et al., *Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization*. Science, 2004. **303**(5657): p. 531-4.

158. Lenassi, M., et al., *HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells*. *Traffic*, 2010. **11**(1): p. 110-22.
159. Savina, A., et al., *Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner*. *Traffic*, 2005. **6**(2): p. 131-43.
160. Ostrowski, M., et al., *Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway*. *Nat Cell Biol*, 2010. **12**(1): p. 19-30; sup pp 1-13.
161. Yu, X., S.L. Harris, and A.J. Levine, *The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein*. *Cancer Res*, 2006. **66**(9): p. 4795-801.
162. Lespagnol, A., et al., *Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice*. *Cell Death Differ*, 2008. **15**(11): p. 1723-33.
163. Futter, C.E. and I.J. White, *Annexins and endocytosis*. *Traffic*, 2007. **8**(8): p. 951-8.
164. Schorey, J.S. and S. Bhatnagar, *Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology*. *Traffic*, 2008. **9**(6): p. 871-81.
165. Record, M., et al., *Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologicals*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1841**(1): p. 108-20.
166. Turchinovich, A., et al., *Circulating miRNAs: cell-cell communication function?* *Front Genet*, 2013. **4**: p. 119.
167. Henderson, M.C. and D.O. Azorsa, *High-throughput RNAi screening for the identification of novel targets*. *Methods Mol Biol*, 2013. **986**: p. 89-95.
168. Guescini, M., et al., *C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction*. *Experimental Cell Research*, 2010. **316**(12): p. 1977-1984.
169. Guescini, M., et al., *Muscle Releases Alpha-Sarcoglycan Positive Extracellular Vesicles Carrying miRNAs in the Bloodstream*. *Plos One*, 2015. **10**(5).
170. Forterre, A., et al., *Myotube-derived exosomal miRNAs downregulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation*. *Cell Cycle*, 2014. **13**(1): p. 78-89.
171. Aswad, H., et al., *Exosomes participate in the alteration of muscle homeostasis during lipid-induced insulin resistance in mice*. *Diabetologia*, 2014. **57**(10): p. 2155-64.
172. Turchinovich, A., L. Weiz, and B. Burwinkel, *Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function*. *Trends Biochem Sci*, 2012. **37**(11): p. 460-5.
173. Tauro, B.J., et al., *Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes*. *Methods*, 2012. **56**(2): p. 293-304.
174. Lassar, A.B., S.X. Skapek, and B. Novitch, *Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal*. *Curr Opin Cell Biol*, 1994. **6**(6): p. 788-94.
175. Puri, P.L. and V. Sartorelli, *Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications*. *J Cell Physiol*, 2000. **185**(2): p. 155-73.

176. Figeac, N. and P.S. Zammit, *Coordinated action of Axin1 and Axin2 suppresses beta-catenin to regulate muscle stem cell function*. Cell Signal, 2015. **27**(8): p. 1652-65.
177. Bouzakri, K., et al., *Bimodal effect on pancreatic beta-cells of secretory products from normal or insulin-resistant human skeletal muscle*. Diabetes, 2011. **60**(4): p. 1111-21.
178. Deng, Z.B., et al., *Adipose tissue exosome-like vesicles mediate activation of macrophage-induced insulin resistance*. Diabetes, 2009. **58**(11): p. 2498-505.
179. Aliotta, J.M., et al., *Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription*. Exp Hematol, 2010. **38**(3): p. 233-45.
180. Subra, C., et al., *Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins*. J Lipid Res, 2010. **51**(8): p. 2105-20.
181. Bentzinger, C.F., et al., *Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche*. EMBO Rep, 2013. **14**(12): p. 1062-72.
182. Viaud, S., et al., *Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: a role for NKG2D ligands and IL-15Ralpha*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4942.
183. Wang, G.J., et al., *Thymus exosomes-like particles induce regulatory T cells*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5242-8.
184. Qu, J.L., et al., *Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation*. Dig Liver Dis, 2009. **41**(12): p. 875-80.
185. Lambernd, S., et al., *Contractile activity of human skeletal muscle cells prevents insulin resistance by inhibiting pro-inflammatory signalling pathways*. Diabetologia, 2012. **55**(4): p. 1128-39.
186. Nikolic, N., et al., *Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an in vitro model of exercise*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33203.
187. Fujita, H., T. Nedachi, and M. Kanzaki, *Accelerated de novo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes*. Exp Cell Res, 2007. **313**(9): p. 1853-65.
188. Piccin, A., W.G. Murphy, and O.P. Smith, *Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications*. Blood Rev, 2007. **21**(3): p. 157-71.
189. Reid, G., M.B. Kirschner, and N. van Zandwijk, *Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers*. Crit Rev Oncol Hematol, 2011. **80**(2): p. 193-208.
190. Rayner, K.J. and E.J. Hennessy, *Extracellular communication via microRNA: lipid particles have a new message*. J Lipid Res, 2013. **54**(5): p. 1174-81.
191. Li, C.C., et al., *Glioma microvesicles carry selectively packaged coding and non-coding RNAs which alter gene expression in recipient cells*. RNA Biol, 2013. **10**(8): p. 1333-44.

## **RINGRAZIAMENTI**

Non è mai facile trovare le parole giuste, in così poche righe, per ringraziare tutte le persone che hanno contribuito alla nascita e allo sviluppo di questo lavoro. Desidero innanzitutto ringraziare il Dott. Michele Guescini, relatore di questa tesi, per la grande disponibilità e cortesia dimostratami e per tutti i preziosi consigli che mi ha fornito nel corso del lavoro di ricerca ha portato alla stesura di questo elaborato.

Come non ringraziare tutte le persone della sezione di Scienze Motorie e della Salute, grazie a loro è stato possibile lavorare in un ambiente stimolante e amichevole.

Un ringraziamento particolare va alla mia Famiglia, quello che sono oggi è in gran parte merito loro. Sono stati sempre al mio fianco, sostenendomi e incoraggiandomi nei momenti di sconforto, e condividendo la mia felicità nei momenti più belli.

Per ultimi, ma non per importanza, ringrazio gli Amici che conosco da una vita, che con il loro aiuto, tacito o esplicito, ci sono sempre stati e quelli che, seppur conosco da meno tempo, sono diventati una parte importante della mia vita.

Il ringraziamento più importante è per te che mi proteggi sempre.