

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI ALDO MORO

Dipartimento di Medicina di Precisione e Rigenerativa e Area Jonica
(DiMePre-j)

DOTTORATO DI RICERCA IN TRAPIANTI DI TESSUTI ED ORGANI E
TERAPIE CELLULARI
CICLO: XXXVII

Settore Scientifico Disciplinare: BIOS-13/A

TITOLO DELLA TESI

***Studio in vivo del sistema FNDC5/irisina nel tessuto muscolare
scheletrico e cardiaco***

Dottorando:
Dott.ssa Clelia Suriano

Coordinatore:
Ch.mo Prof. Antonio Crovace

Supervisore (Tutor):
Ch.ma Prof.ssa Maria Grano

Co-tutor:
Ch.ma Prof.ssa Silvia Concetta Colucci

ESAME FINALE 2024-2025

INDICE

INTRODUZIONE	3
1. Il muscolo scheletrico	3
1.1 Morfologia, organizzazione e funzioni del tessuto muscolare scheletrico	3
1.2 Miogenesi del muscolo scheletrico	4
1.3 Tipi di miofibre e loro proprietà	6
1.4 L'atrofia muscolare e il modello murino oggetto di studio	9
2. Il muscolo cardiaco	11
1.1 Morfologia, organizzazione e funzioni del tessuto muscolare cardiaco	11
1.2 La fibrosi cardiaca e il modello murino oggetto di studio	12
3. Irisina	13
1.1 Overview del sistema FNDC5/Irisina	13
1.2 Irisina: ormone esercizio mimetico e messaggero tra vari tessuti	15
1.3 Modalità di somministrazione di irisina nel modello murino	17
1.4 Irisina e il muscolo scheletrico.....	18
1.5 Irisina e il muscolo cardiaco	19
SCOPO DELLA TESI	22
MATERIALI E METODI	25
1. Modelli murini	25
1.1 Modello murino di microgravità simulata	25
1.2 Modello murino in condizioni di ipergravità.....	26
1.3 Modello murino di fibrosi cardiaca	28
2. Analisi Istologica	30
3. Real Time-PCR	31
4. Saggio ELISA	32
5. Analisi Statistica	33
RISULTATI	34
1. Studio in vivo degli effetti di microgravita' simulata sul muscolo scheletrico	34
1.1 L'assenza di carico meccanico influisce sulla morfologia muscolare, aumenta i marcatori dell'atrofia muscolare e riduce l'espressione della catena pesante della miosina veloce.....	34

1.2 L'espressione genica di FNDC5 nei muscoli Vasto laterale e Gastrocnemio e i livelli sierici di irisina sono downregolati dopo 4 settimane di assenza di carico meccanico	41
1.2 Effetti in vivo dell'irisina sul muscolo scheletrico durante la condizione di assenza di carico meccanico	44
2. Studio in vivo degli effetti di ipergravita' sul muscolo scheletrico	46
2.1 La condizione di ipergravità aumenta l'espressione di FNDC5, delle miosine e dei fattori che regolano il processo di proliferazione e miogenesi nel Vasto laterale	46
2.2 L'ipergravità influisce sulla morfologia muscolare inibendo il fenotipo atrofico.....	50
2.3 La condizione di ipergravità aumenta l'espressione di FNDC5 e delle miosine nel Gastrocnemio	51
3. Studio in vivo degli effetti di irisina nel prevenire la fibrosi del muscolo cardiaco.....	53
3.1 Effetto del pretrattamento con irisina sul tempo di recupero dei topi dopo somministrazione acuta di isoproterenolo	53
3.2 Il pretrattamento con irisina previene la disregolazione delle molecole coinvolte nell'insufficienza cardiaca indotta da isoproterenolo.....	54
3.3 Il pretrattamento con irisina previene l'ipertrofia e la fibrosi cardiaca indotte da somministrazione acuta di isoproterenolo.....	56
3.4 Il pretrattamento con irisina previene la disregolazione mitocondriale causata dall'ipertrofia cardiaca	59
DISCUSSIONE	61
1. Studio in vivo degli effetti di microgravita' simulata sul muscolo scheletrico	61
2. Studio in vivo degli effetti di ipergravita' sul muscolo scheletrico	64
3. Studio in vivo degli effetti di irisina nel prevenire la fibrosi del muscolo cardiaco	67
CONCLUSIONI.....	71
BIBLIOGRAFIA	73

INTRODUZIONE

1. Il muscolo scheletrico

1.1 Morfologia, organizzazione e funzioni del tessuto muscolare scheletrico

Il tessuto muscolare scheletrico è il più abbondante tra i tessuti muscolari, infatti costituisce il 40% del peso corporeo dell'adulto. I muscoli scheletrici da esso costituiti, presentano una vasta gamma di conformazioni morfologiche e di modalità d'azione, tuttavia sono caratterizzati dalla stessa struttura di base, cioè sono composti da cellule allungate, polinucleate, chiamate fibre muscolari. La fibra muscolare, considerata l'unità cellulare del tessuto muscolare scheletrico, si forma a seguito della fusione di singole cellule, mioblasti, nel corso di un processo di differenziamento chiamato **miogenesi**. Nel muscolo scheletrico i fasci di fibre, all'interno dei quali si distinguono le singole fibre muscolari, si dispongono parallelamente e sono associati tra loro per mezzo del tessuto connettivo che ne costituisce un'impalcatura a struttura gerarchica (**Fig. 1**).

La singola fibra muscolare è caratterizzata da striature trasversali che formano bande caratteristiche, più chiare o più scure, visibili al microscopio ottico. La striatura trasversale dell'intera fibra è presente già a livello delle singole miofibrille che la compongono, le quali si dispongono in un registro ordinato. La striatura delle singole miofibrille è a sua volta determinata dalla caratteristica disposizione ordinata dei miofilamenti spessi (costituiti da proteine di miosina) e sottili (costituiti da proteine di actina). I nuclei dell'intera fibra muscolare sono estremamente allungati e periferici.

Le funzioni del muscolo non si limitano unicamente alla locomozione, al mantenimento della postura e alla respirazione, ma il muscolo scheletrico riveste un ruolo fondamentale anche nel mantenimento della temperatura corporea e nella produzione di sostanze che svolgono una funzione "comunicativa" con altri organi e tessuti. Proprio per la sua capacità di produrre e secernere sostanze che agiscono su altri tessuti e organi, è stato introdotto il termine **miochine**, che si riferisce a tutte quelle molecole prodotte dal tessuto

muscolare e che svolgono azione autocrina, paracrina ed endocrina. Queste miochine rappresentano un link molecolare tra la funzione del tessuto muscolare e l'omeostasi dell'intero organismo.

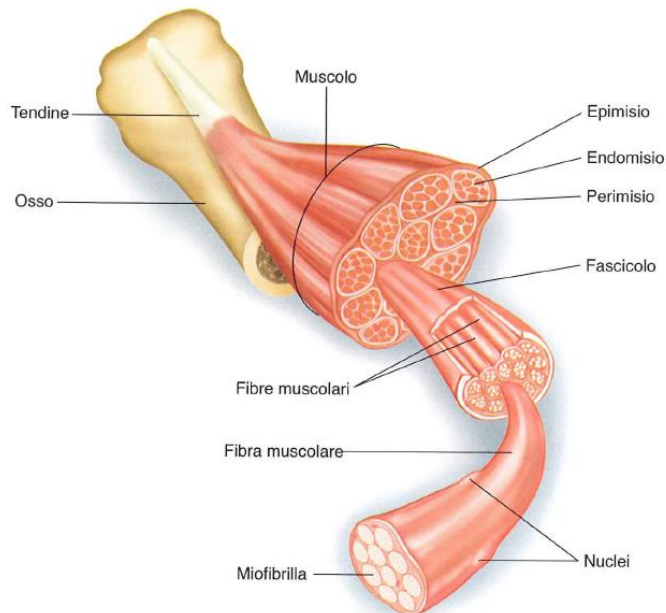


Fig. 1 Organizzazione strutturale del muscolo scheletrico. Le fibre muscolari sono raggruppate in fascicoli, circondati da connettivo lasso, chiamato perimisio. All'interno dei fascicoli ciascuna fibra è sostenuta da un'impalcatura di connettivo, ossia l'endomisio, in cui decorrono vasi e nervi. I fascicoli esternamente sono avvolti da una guaina di connettivo denso, l'epimisio, che si congiunge al tessuto connettivo dei tendini che assolvono alla fondamentale funzione di connettere strutturalmente il muscolo all'osso.

1.2 Miogenesi del muscolo scheletrico

Per processo di miogenesi scheletrica si intende lo sviluppo delle cellule muscolari scheletriche durante le fasi dell'embriogenesi. Il processo di miogenesi scheletrica consta di tre fasi: la determinazione dei precursori delle cellule muscolari in mioblasti, la proliferazione di questi e il successivo differenziamento in cellule muscolari mature.

I **mioblasti** sono particolari cellule indirizzate a differenziarsi in fibre muscolari. Durante la prima fase del processo, i mioblasti si sviluppano a partire da

ammassi di cellule mesodermiche, i somiti, situati ai lati del tubo neurale dell'embrione. La presenza di specifici segnali, provenienti dai tessuti circostanti, ha un ruolo chiave nella determinazione della porzione di somiti da cui si origineranno i mioblasti. Infatti, le specifiche molecole segnale che inducono la determinazione dei mioblasti vengono espresse temporaneamente e inducono l'espressione di particolari fattori trascrizionali che innescano il programma miogenico.

A seguito della fase iniziale proliferativa, i mioblasti, cellule mononucleate, si allineano, smettono di dividersi e si fondono tra di loro termino-terminalmente a formare cellule sinciziali polinucleate chiamate miotubi. I **miotubi** sono strutture particolari in grado di secernere proteine caratteristiche delle **fibre muscolari**. Saranno, poi, proprio i miotubi a differenziarsi in cellule muscolari mature con capacità contrattili (**Fig. 2**).

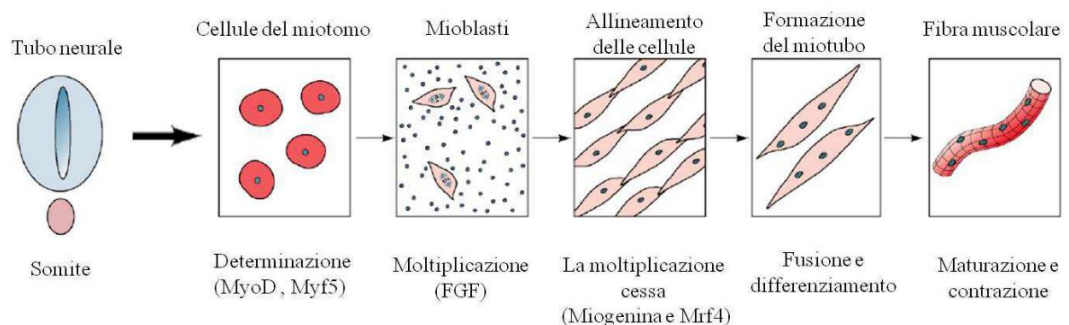


Fig. 2 Schema di differenziamento di cellule mesenchimali in fibre muscolari scheletriche. Nei mammiferi la miogenesi ha inizio durante la prima settimana di sviluppo embrionale. L'intero apparato locomotore prende origine dal miotomo, ovvero la parte del somite che dà origine al tessuto muscolare striato. Le cellule del miotomo separandosi dalla parte dorso-mediale del somite, si allungano e si differenziano prima in mioblasti, successivamente questi si fondono a formare il miotubo (o miofibra), cellula polinucleata cilindrica. Quando il citoplasma delle miofibre si riempie delle miofibrille, ovvero dei filamenti di miosina e actina (proteine contrattili), i nuclei vengono spinti alla periferia del citoplasma e la cellula diventa una fibra, nonché una cellula muscolare "matura".

Sono state determinate quattro proteine alla base della regolazione della miogenesi, appartenenti alla famiglia dei fattori di trascrizione caratterizzati dalla presenza, nella loro struttura, di un particolare dominio basico elica-ansa-elica (bHLH). Queste quattro proteine, indicate complessivamente come Myogenic Regulatory Factors (MRFs), sono **MyoD**, **Myf5**, la **miogenina** e **MRF4**. Le MRFs presentano caratteristiche comuni, ma hanno un diverso profilo di espressione temporale che è indicativo delle differenti funzioni. Myf5 e MyoD, sono espresse nelle fasi precoci e sono necessarie per la determinazione delle cellule mesodermiche in mioblasti. I mioblasti, successivamente, escono dal ciclo cellulare e si differenziano in miociti. I miociti esprimono, a questo punto, le MRFs tardive, quali la miogenina e MRF4, necessarie per il differenziamento in miotubi. Le MRFs controllano le varie fasi del differenziamento dei mioblasti e permettono l'attivazione e l'espressione di particolari geni muscolo specifici.

Durante la miogenesi, una parte dei mioblasti non va incontro a differenziamento e va a costituire una popolazione di cellule quiescenti nota come **cellule satelliti**. Solitamente, in condizioni fisiologiche, queste cellule sono mitoticamente quiescenti e con bassa attività di sintesi, ma sottoposte a particolari stimoli, come ad esempio quelli rilasciati in seguito ad un danno muscolare, le cellule satelliti sono indotte a rientrare nel ciclo cellulare e a proliferare. Alcune di queste cellule vanno incontro a differenziamento terminale, si fondono in miofibre e rimpiazzano la componente danneggiata.

1.3 Tipi di miofibre e loro proprietà

Il muscolo scheletrico è costituito da una combinazione eterogenea di fibre diverse tra loro dal punto di vista morfologico, biochimico e funzionale che le caratterizza. Queste differenze permettono di ottenere prestazioni diversificate in termini di forza, velocità e durata. Studi di elettrofisiologia hanno permesso di classificare le fibre muscolari in **fibre di tipo 1**, o anche note come **fibre**

lente (slow twitch), e in fibre muscolari **di tipo 2**, dette anche **fibre veloci** (fast twitch) (**Tab. 1**).

Le fibre di tipo 1 o *slow* presentano un profilo di contrazione lento e generano un profilo di tensione muscolare basso rispetto alle altre fibre, ma rispetto alle fibre di tipo 2 presentano una resistenza alla fatica molto più elevata.

Le fibre di tipo 2 o *fast* sono caratterizzate dall'aver contrazioni veloci, dallo sviluppo di tensione elevato, ma vanno più facilmente incontro ad affaticamento.

Le caratteristiche biomeccaniche delle fibre muscolari correlano con il tipo di isoforma della catena pesante della miosina sarcomerica (MHC). La miosina sarcomerica è una proteina costituita da sei subunità che interagiscono tra loro. Le sei subunità sono costituite da due catene pesanti, formate da una testa globulare ad attività ATPasica e da una coda a struttura ad α -elica, a cui sono associate quattro catene leggere (MLC). Le catene MLC così come le MHC sono essenziali e svolgono una funzione regolatoria. Sono codificate da una vasta famiglia di multigeni, pertanto sono presenti in diverse isoforme. Sulla base dell'espressione dell'isoforma della MHC è stato possibile classificarle ulteriormente.

Le fibre di **tipo 1** (lente) esprimono l'**isoforma I** della MHC. Queste fibre presentano al loro interno un elevato numero di mitocondri. Sono in grado di contrarsi per tempi molto lunghi senza mostrare affaticamento, grazie alla numerosa presenza di mitocondri in grado di produrre elevate quantità di ATP. Le fibre lente sono caratterizzate dall'aver un metabolismo aerobico, in cui l'ossigeno non proviene unicamente dal circolo sanguigno, ma anche da una particolare proteina globulare, la mioglobina, la quale è in grado di legare reversibilmente l'ossigeno proveniente dalla catena respiratoria mitocondriale. La presenza di questa particolare proteina, in queste fibre, conferisce la caratteristica colorazione rossa e per questo sono conosciute anche come fibre rosse.

Le fibre di **tipo 2** (veloci) esprimono l'**isoforma IIb** della MHC. All'interno del sarcoplasma di queste fibre le miofibrille sono fittamente stipate tra loro e presentano una grande quantità di glicogeno, inoltre queste fibre presentano

pochi mitocondri. Tali fibre si caratterizzano per lo sviluppo di forze notevoli e di conseguenza richiedono grandi quantità di ATP che non viene reperita limitatamente dall'attività dei mitocondri, ma proviene anche dalla glicolisi anaerobica. La glicolisi anaerobica non richiede ossigeno, ma converte il glicogeno accumulandolo in acido lattico. La produzione di acido lattico acidifica il pH cellulare andando ad interferire con i meccanismi di contrazione muscolare e questo determina il precoce affaticamento che caratterizza queste fibre.

Esistono fibre con caratteristiche intermedie tra i due tipi di fibre appena descritte. Questa tipologia di **fibre intermedie** comprende le fibre di **tipo IIa** e le fibre di **tipo IIx**. Le fibre di tipo IIa sono simili alle fibre di tipo 1 e quindi risultano essere ricche di mitocondri e capillari. Anche queste fibre sono definite fibre rosse, ma al contrario delle fibre lente, al loro interno, contengono gli enzimi glicolitici, pertanto sono definite fibre veloci anche se mostrano una maggiore resistenza all'affaticamento rispetto alle fibre di tipo 2. Le fibre di tipo IIx, chiamate anche fibre IIc, sono caratterizzate dall'aver un metabolismo di tipo glicolitico e possiedono una velocità di contrazione intermedia tra le fibre di tipo IIa e le IIb. Generalmente, nei roditori le fibre di tipo 1 e IIa sono considerate fibre a metabolismo ossidativo, mentre le IIx e le IIc sono considerate a metabolismo prevalentemente glicolitico. Nell'uomo sono presenti tipicamente le fibre di tipo 1, IIa e IIx, mentre l'isoforma IIb non è espressa [1].

Caratteristica	I (S)	Ila (FR)	Iib (FF)
Colore	Rosse	Rosse e bianche	Bianche
Dimensioni	Piccole	Intermedie	Grandi
ATPasi miosinica	Lenta	Rapida	Rapida
Velocità di contrazione	Lenta	Rapida	Molto rapida
Massima tensione tetanica	Bassa	Intermedia	Alta
Resistenza alla fatica	Alta	Intermedia	Bassa
Metabolismo	Ossidativo	Ossidativo + glicolitico	Glicolitico
Contenuto di mioglobina	Alto	Intermedio	Basso
Contenuto di glicogeno	Alto	Alto	Basso
Densità di capillari	Alta	Alta	Bassa
Densità di mitocondri	Alta	Alta	Bassa
Ca-ATPasi	Bassa	Alta	Alta

Tab. 1. Caratteristiche dei principali tipi di fibre muscolari

1.4 L'atrofia muscolare e il modello murino oggetto di studio

Il muscolo scheletrico svolge un ruolo fondamentale nella fisiologia umana, consentendo la locomozione e il movimento, ma oltre a questo ruolo meccanico, questo tessuto è importante regolatore del metabolismo in tutto il corpo. Studi condotti sull'uomo e su modelli animali hanno ampiamente dimostrato che la sedentarietà, l'immobilità nei pazienti allettati, l'invecchiamento e alcune malattie metaboliche possono causare cambiamenti nella massa muscolare [2]. Studi recenti hanno dimostrato che in condizioni fisiologiche normali, il muscolo produce **miochine** in risposta allo stimolo della contrazione e dell'esercizio fisico [3,4]. Al contrario, le condizioni di assenza di carico meccanico possono portare a un'alterazione della secrezione di queste molecole e ciò può contribuire alla **perdita di massa muscolare**.

Di conseguenza, l'atrofia muscolare, che si manifesta come una riduzione significativa della massa muscolare, comporta uno squilibrio nella sintesi e nella degradazione delle proteine indotto da molti fattori, come l'invecchiamento o il disuso, lo stress ossidativo e l'infiammazione. I meccanismi di trasduzione del segnale includono sia le vie che controllano la

degradazione delle proteine, come il sistema di degradazione delle proteine ubiquitina, l'autofagia, le caspasi e la calpaina; sia le vie che controllano la sintesi delle proteine, come mTOR [5].

L'atrofia muscolare quindi si verifica quando la degradazione delle proteine strutturali supera la sintesi proteica di queste stesse, e strutturalmente si manifesta con una riduzione del diametro delle fibre muscolari e un aumento degli spazi connettivali presenti tra le fibre. Infatti, due principali vie di degradazione delle proteine, la via proteosomica e la via autofagica-lisosomica, sono attivate durante l'atrofia muscolare e contribuiscono in modo variabile alla perdita di massa muscolare. Queste vie coinvolgono una serie di geni legati all'atrofia o atrofici, che sono controllati da specifici fattori di trascrizione, come FoxO3, che è regolato negativamente da Akt, e NF- κ B, che è attivato da citochine infiammatorie [6].

Uno dei **modelli murini** più utilizzati per studiare l'atrofia muscolare indotta dall'assenza di carico meccanico è il **modello di sospensione degli arti posteriori** (Unloading) [7]. I topi vengono sospesi per la coda in modo tale che le zampe posteriori non abbiano contatto con la base della gabbia, mimando una condizione di assenza di carico meccanico e conseguente perdita di massa muscolare. Al contrario le zampe anteriori devono toccare terra, dando all'animale la possibilità di muoversi, abbeverarsi e cibarsi. Il modello Unloading è un modello murino consolidato per la sua riproducibilità e per la significativa induzione di atrofia muscolare e conseguente perdita di massa ossea [8,9].

2. Il muscolo cardiaco

1.1 Morfologia, organizzazione e funzioni del tessuto muscolare cardiaco

La muscolatura cardiaca (o miocardio) è costituita da fibre muscolari cardiache conosciute come **cardiomiociti** caratterizzate dalla presenza di filamenti spessi e sottili simili a quelli del tessuto muscolare scheletrico per natura e organizzazione sarcomerica, pertanto anch'esse mostrano una striatura trasversale evidente al microscopio ottico. Tuttavia, il tessuto muscolare cardiaco, oltre ad esercitare un movimento di contrazione non-volontario, presenta alcune differenze strutturali rispetto al tessuto muscolare scheletrico.

Innanzitutto, le fibre miocardiche sono elementi cellulari distinti, mono- o binucleati, anziché sincizi polinucleati, congiunte tra loro alle estremità, che appaiono biforcute, mediante particolari connessioni conosciute come **dischi intercalari** (Fig. 3). Il nucleo dei cardiomiociti è di forma allungata e si localizza centralmente anziché in posizione periferica come avviene nelle fibre muscolari scheletriche. Il citoplasma delle cellule cardiache è caratterizzato dalla presenza di numerosi mitocondri, per garantire il metabolismo energetico necessario per l'attività spontanea di contrazione del cuore.

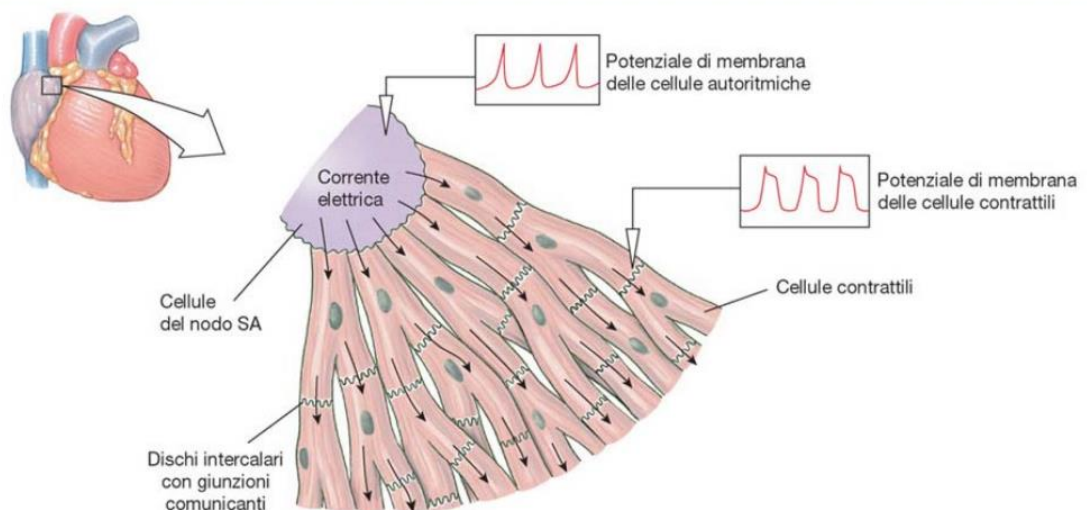


Fig. 3. Organizzazione strutturale del muscolo cardiaco. Il miocardio è costituito da cellule muscolari contigue e connesse tra loro attraverso i dischi intercalari che garantiscono non solo una struttura organizzata e coesa, ma

grazie alla presenza delle *gap junction*, permettono la trasmissione dell'impulso contrattile ed elettrochimico in maniera uniforme a tutte le cellule del tessuto cardiaco.

1.2 La fibrosi cardiaca e il modello murino oggetto di studio

L'insufficienza cardiaca rappresenta una delle principali cause di morbilità e mortalità in tutto il mondo, la cui incidenza è in costante aumento [10]. È caratterizzata da un insieme di sintomi dovuti ad anomalie cardiache che colpiscono principalmente i pazienti con malattie cardiovascolari. Ad un aumento eccessivo della pressione sanguigna, si innesca un'ipertrofia patologica, caratterizzata da un aumento dello spessore della parete ventricolare [11]. Durante il processo di ipertrofia cardiaca, i fibroblasti si attivano in **miofibroblasti** e iniziano a secernere collagene come meccanismo protettivo per sostituire i cardiomiociti necrotici. Tuttavia, l'accumulo eccessivo di collagene causa l'insorgenza di **fibrosi cardiaca**, per cui l'efficienza della contrazione diminuisce, la funzione contrattile del cuore si riduce così come la conseguente corretta perfusione degli altri organi [11]. Pertanto, la fibrosi cardiaca è un meccanismo di compensazione che si verifica a seguito di un danno tissutale acuto o cronico, e che consente di sostituire il tessuto danneggiato con tessuto cicatriziale, privo di funzione contrattile, aumentando di conseguenza la rigidità del cuore. Il **collagene di tipo I** può essere depositato in varie modalità: compatto (senza cardiomiociti), interstiziale (tra i cardiomiociti), diffuso e a chiazze (fibrosi cardiaca diffusa).

L'attività fisica regolare è stata riconosciuta come un'efficace terapia non farmacologica per il trattamento delle malattie cardiovascolari: allevia i fattori di rischio dell'insufficienza cardiaca e riduce la mortalità nei pazienti con malattie cardiovascolari [12,13]. In particolare, la riabilitazione cardiaca eseguita mediante esercizio fisico è risultata efficace nel migliorare la funzione ventricolare sinistra dopo un infarto del miocardio [14,15].

Uno dei **modelli murini** principalmente utilizzati per lo studio dei meccanismi dell'insufficienza cardiaca è il modello chirurgico TAC (costrizione aortica

trasversale), ampiamente utilizzato nella ricerca cardiovascolare per valutare potenziali risvolti terapeutici [16]. Sebbene questo modello sia molto valido per la ricerca cardiovascolare traslazionale, ha lo svantaggio di indurre effetti sistemici al di là del cuore, come una risposta infiammatoria sistemica, ed è caratterizzato da un alto tasso di mortalità. Al contrario, la **stimolazione chimica con β -agonisti** come l'isoproterenolo (ISO) è un altro metodo di routine utilizzato per indurre l'ipertrofia e la fibrosi cardiaca in modelli animali, ed offre diversi vantaggi. Si tratta infatti di una procedura meno ardua dal punto di vista tecnico rispetto a quella chirurgica, più rapida, e senza effetti infiammatori sistemici [17,18]. Studi precedenti hanno dimostrato che l'ISO somministrato ad alte dosi nei roditori induce la necrosi dei cardiomiociti, seguita dalla formazione della cicatrice fibrotica [17,19].

3. Irisina

1.1 Overview del sistema FNDC5/Irisina

Gli organi comunicano tra di loro attraverso la secrezione di molecole specifiche. Si ritiene che l'esercizio fisico possa migliorare le comunicazioni inter-organo migliorando le funzioni fisiologiche dei vari organi, tuttavia i meccanismi attraverso cui ciò avviene sono rimasti per lungo tempo sconosciuti. La scoperta delle **miochine**, nonché citochine rilasciate dal muscolo scheletrico, ha permesso di esplorare la funzione endocrina di questo tessuto. Parte di queste molecole, infatti, sono secrete dal tessuto muscolare durante l'attività fisica supportando il concetto dell'effetto benefico dell'**esercizio fisico** sulla salute umana [20–22].

Una delle miochine oggetto di studio dell'ultimo decennio è irisina, il cui precursore **FNDC5** (*Fibronectin type III domain-containing protein 5*) risulta essere abbondantemente espresso a livello delle fibre muscolari e solo a seguito di un clivaggio enzimatico viene rilasciata nel circolo sanguigno come

molecola solubile conosciuta come “**irisina**”, capace di raggiungere diversi organi e tessuti target (**Fig. 4**).

Nel 2002, due diversi gruppi di ricerca hanno dimostrato l'espressione del precursore dell'irisina FNDC5 come proteina *Peroxisomal protein* (PeP) e *Fibronectin type III repeat-containing protein 2* (FRCP2). Entrambi i gruppi di ricerca hanno identificato l'espressione del precursore dell'irisina nel cervello murino, tuttavia un gruppo ha trovato *PeP* nella matrice del perossisoma di vari tipi di cellule, mentre il secondo gruppo ha scoperto il gene che codifica *FRCP2* studiando diversi domini della fibronectina di tipo III [23]. Successivamente, l'esistenza delle due diverse molecole, PeP e FRCP2, ha dato origine al riconoscimento dello stesso prodotto ribattezzato FNDC5. L'espressione di questa glicoproteina di membrana è regolata dal coattivatore trascrizionale *peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1α* (PGC-1α), che, a sua volta, è indotto dall'attività fisica [24].

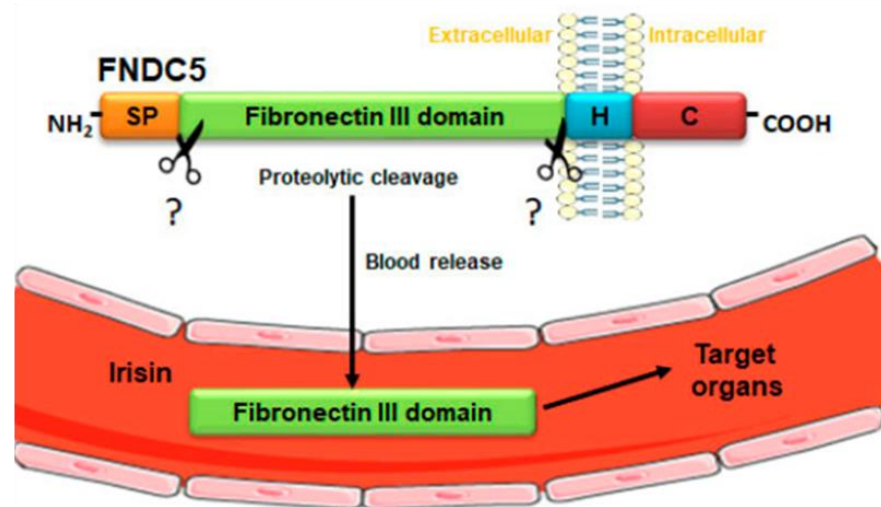


Fig. 4. Meccanismo di rilascio di irisina nel sangue. Struttura schematica del suo precursore, *fibronectin type III domain-containing protein 5* (FNDC5). Il clivaggio di FNDC5, da parte di un enzima ancora sconosciuto a livello del dominio extracellulare, dà luogo al rilascio di irisina nel sangue, un peptide costituito da una sequenza di 112 aminoacidi. Abbreviazioni: SP, peptide segnale; H, dominio idrofobico; C, dominio citoplasmatico. Il simbolo: ? indica l'enzima sconosciuto.

1.2 Irisina: ormone esercizio mimetico e messaggero tra vari tessuti

Nel 2012 la scoperta di Irisina, nella sua forma clivata e quindi circolante [24], ha aperto un ampio raggio di ricerche. Inizialmente questa molecola si è dimostrata coinvolta nel processo di “browning” nel **tessuto adiposo**, ovvero capace di indurre il processo di trans-differenziamento degli adipociti bianchi in bruni, la cui funzione principale è la regolazione della termogenesi [24]. Considerato che allo stato attuale il miglior trattamento non farmacologico per l'obesità è il cambiamento dello stile di vita del paziente con l'aggiunta di una regolare attività fisica [25], la scoperta di questa molecola ha attirato grande attenzione come possibile agente terapeutico per patologie come l'obesità, proprio per il suo ruolo attivo nel favorire la termogenesi e il metabolismo energetico [26].

È stato dimostrato che durante e a seguito dell'**attività fisica** il muscolo scheletrico rilascia in circolo miochine che possono andare ad influenzare il metabolismo e modificare la produzione e secrezione di citochine in vari organi e tessuti, andando a generare a livello sistemico risposte positive da parte dell'organismo.

Nel 2012 è stato dimostrato che nei topi transgenici per *PGC1 α* vi è una maggiore espressione di FNDC5 rispetto ai topi controllo. FNDC5 è una proteina transmembrana costituita da un peptide segnale, due domini di fibronectina e un dominio idrofobico localizzato nella membrana cellulare [23,27]. FNDC5, successivamente, va incontro ad un taglio proteolitico e viene secreta in forma solubile sotto forma di Irisina. La forma “solubile” di Irisina presente nel circolo sanguigno presenta un peso molecolare di 12 kDa [28], inoltre la sequenza amminoacidica della miochina risulta essere fortemente conservata nei vari mammiferi [29].

Studi *in vitro* hanno evidenziato che Irisina è in grado di stimolare il differenziamento in senso osteoblastico a partire da cellule stromali di midollo. Inoltre, è in grado di promuovere, in linee cellulari di mioblasti murini, cellule

C2C12, un metabolismo di tipo ossidativo [30,31]. Queste evidenze e altre evidenze derivanti da studi su modelli murini, hanno permesso di ipotizzare che Irisina abbia un ruolo di potenziale collegamento tra **muscolo** e **tessuto osseo** e che sia responsabile della correlazione positiva esistente tra attività fisica e qualità dell'osso. Nei calciatori caucasici del campionato italiano si è dimostrata una correlazione positiva tra i livelli sierici di Irisina e densità minerale ossea (BMD) totale. Inoltre, sempre in questa categoria di atleti, è stata dimostrata un'associazione lineare tra Irisina e la BMD di particolari siti ossei come l'omero, le vertebre lombari e il cranio [32].

Studi recenti hanno messo in luce un ulteriore ruolo chiave di Irisina all'interno dello spettro delle **malattie neurodegenerative** quali ad esempio l'Alzheimer e il morbo di Parkinson e nella regolazione delle funzioni cognitive [33,34]. Pertanto, l'esercizio fisico è di fondamentale importanza per un corretto sviluppo e mantenimento scheletrico, così come ha molti effetti benefici anche sulla salute del **cervello**, contribuendo alla riduzione del rischio di demenza, depressione, stress e al mantenimento delle funzioni cognitive. Pertanto, il fatto che l'esercizio fisico abbia un effetto anche sul cervello, supporta il concetto per cui molecole periferiche rilasciate dai muscoli, come irisina, consentono una comunicazione diretta anche tra funzione muscolare e cerebrale [20].

Nel 2012 è stata anche dimostrata una correlazione tra i valori di espressione di irisina e la funzionalità del **tessuto muscolare cardiaco**. Si è osservato che nei topi l'esercizio fisico aumenta l'espressione di *PGC-1 α* , che a sua volta aumenta l'espressione di FNDC5, e quindi del suo prodotto, irisina. Poiché l'intolleranza all'esercizio fisico è una caratteristica distintiva dell'insufficienza cardiaca, e poiché *PGC-1 α* e irisina promuovono i benefici dell'esercizio fisico negli animali, è stato ipotizzato che l'espressione di questi geni sia correlata alle prestazioni aerobiche nei pazienti con insufficienza cardiaca. È stato quindi condotto uno studio su pazienti che ha dimostrato come l'espressione di FNDC5 sia correlata alla capacità funzionale in una popolazione umana con insufficienza cardiaca: una minore espressione di FNDC5 potrebbe essere alla base di una ridotta prestazione aerobica nei pazienti con insufficienza cardiaca [35].

Nel tempo gli studi condotti hanno chiaramente accertato che la concentrazione di Irisina sierica aumenta in risposta all'esercizio fisico, tuttavia rimane ancora incerto l'effetto dell'influenza dell'intensità di tale esercizio (ad alta intensità o moderato e continuo) sulla secrezione della miochina. È stato osservato che a seguito di esercizi fisici di resistenza, rispetto ad attività aerobiche, si abbia un incremento maggiore dei livelli di Irisina, e che l'incremento dei livelli di Irisina circolanti diventi ancor più evidente a seguito di attività fisica ad alta intensità [36–38].

È stato dimostrato che, a seguito di un allenamento di 12 settimane con combinazione di esercizi aerobici e acuti, l'espressione di FNDC5 a livello muscolare aumenta, con una paradossale riduzione dei livelli circolanti di Irisina, la quale mostra, invece, un picco temporale solo immediatamente dopo l'esercizio acuto [39].

1.3 Modalità di somministrazione di irisina nel modello murino

L'utilizzo di modelli murini è stato fondamentale per lo studio e la comprensione degli effetti del sistema FNDC5/Irisina sul tessuto muscolare scheletrico e cardiaco. Il modello murino ha permesso di studiare gli effetti della **somministrazione intermittente** di Irisina sul muscolo scheletrico nel **modello murino di sarcopenia** e sul muscolo cardiaco nel **modello murino di fibrosi cardiaca**. Il protocollo utilizzato prevede il trattamento con irisina ricombinante (100µg/kg), somministrata in modo intermittente (una volta a settimana) per 4 settimane, tale da mimare una generica condizione di attività fisica.

Studi precedenti hanno permesso di dimostrare che questo tipo di trattamento migliora la massa ossea e potenzia le proprietà geometriche e biomeccaniche dell'osso [40]. Pertanto, studi successivi sull'effetto del trattamento di irisina nella prevenzione dell'atrofia muscolare e fibrosi cardiaca, sono stati condotti seguendo il medesimo protocollo di somministrazione, su specifici modelli murini.

1.4 Irisina e il muscolo scheletrico

Il muscolo scheletrico ad oggi è considerato un organo endocrino poiché in grado di secernere molteplici molecole, chiamate miochine, che esercitano effetti benefici su organi e tessuti più o meno distanti da esso [41]. Poiché numerose patologie mostrano un legame tra la perdita di tessuto muscolare (sarcopenia) e quella ossea (osteopenia), numerosi studi si sono concentrati sulla comunicazione che avviene tra questi due tessuti attraverso la secrezione di molecole come irisina.

In precedenti studi condotti dal gruppo di ricerca di cui faccio parte è stato dimostrato un miglioramento di diversi parametri ossei a seguito del trattamento con irisina effettuato su topi sani [40]. Successivamente, nel modello murino di osteosarcopenia indotta dal disuso (modello murino di hind-limb unload), è stato dimostrato che il trattamento con irisina ricombinante contrasta la riduzione della massa minerale ossea (BMD) sia trabecolare che corticale, e **previene l'atrofia muscolare** e la **disfunzione mitocondriale** nel Vasto laterale. Inoltre, il trattamento con irisina **preserva la dimensione delle fibre muscolari** e **l'espressione della miosina di tipo II (MHCII)**. L'analisi dell'espressione dei fattori mitocondriali Nuclear Respiratory Factor 1 (Nrf1) e del Mitochondrial Transcription Factor A (Tfam) suggerisce, inoltre, che la miochina previene il possibile innescarsi di disfunzioni mitocondriali nei topi hind-limb unload [42].

La sarcopenia è caratterizzata da atrofia muscolare con conseguente compromissione del tessuto muscolare. È una condizione patologica associata all'età, che pertanto si verifica a seguito dell'invecchiamento, o dovuta a condizioni di immobilità forzata e disuso. È caratterizzata dalla perdita progressiva della massa, della potenza e della funzione dei muscoli scheletrici, influenzando quindi l'attività fisica umana e la qualità della vita. È stato dimostrato che i livelli di espressione di irisina, così come il suo precursore FNDC5 risultano ridotti durante l'invecchiamento. Inoltre, attraverso l'analisi fenotipica di topi anziani knockout per FNDC5/Irisina è stato scoperto che l'assenza di tale gene è associata ad una condizione di atrofia muscolare aggravata, caratterizzata da una minore forza nella presa, un minor peso dei

muscoli Gastrocnemio e Quadricipite, e un minor numero di fibre. Successivamente i risultati sono stati confermati somministrando irisina ricombinante a topi anziani wild-type dimostrando un miglioramento di tutti i parametri fisiologici relativi al muscolo scheletrico (forza, peso muscoli, numero fibre) [43].

Nel 2022 il gruppo di ricerca di cui faccio parte ha condotto degli studi su una corte di pazienti affetti dalla Charcot-Marie-Tooth (CMT), polineuropatia ereditaria il cui fenotipo clinico comprende atrofia muscolare, dimostrando che i livelli sierici di irisina fossero più bassi nei pazienti CMT rispetto ai soggetti sani, corrispondenti per età e sesso. Quasi la totalità dei pazienti (19/20) mostrava una bassa qualità muscolare, valutata sulla base della forza muscolare. I livelli di irisina sono risultati inferiori nei pazienti con una forza muscolare compromessa rispetto ai soggetti sani con forza muscolare normale [44].

Pertanto, parte del mio progetto di dottorato ha riguardato lo studio, attraverso il modello murino hind-limb unload, della modulazione nel tempo di biomarcatori muscolari e dei livelli di irisina circolante e del suo precursore FNDC5, durante 4 settimane di assenza di carico meccanico. Nello specifico, poiché numerosi studi hanno già affrontato gli effetti sul muscolo Soleo [45], noto per subire atrofia da disuso nelle prime fasi di assenza di carico meccanico (1-3 giorni), nel presente studio ci siamo concentrati sull'effetto dell'assenza di carico meccanico sul Vasto laterale e Gastrocnemio, due muscoli meno studiati e affetti da atrofia muscolare indotta dal disuso in tempi più lunghi rispetto al Soleo.

1.5 Irisina e il muscolo cardiaco

Uno studio condotto sui ratti nel 2014 ha dimostrato che il sistema FNDC5/Irisina è fortemente espresso nel tessuto muscolare cardiaco [46].

L'espressione dell'mRNA di **FNDC5** e della proteina irisina è stata rilevata nei cardiomiociti [47] e si è osservato che il trattamento con irisina aumenta la **rigenerazione cardiaca** e la **neovascolarizzazione** [48], **migliora il volume diastolico**, la **frequenza cardiaca** e la **gittata cardiaca** [49]. Le evidenze attuali suggeriscono che la variazione dei livelli di secrezione di Irisina è correlata all'insorgenza di infarto miocardico (MI) e che pertanto il sistema FNDC5/Irisina potrebbe diventare un potenziale marcatore diagnostico.

L'infarto miocardico si verifica quando l'apporto di sangue alle arterie coronarie del cuore si riduce o cessa, con conseguente lesione del muscolo cardiaco [50,51]. Per sopperire alla necrosi dei cardiomiociti i fibroblasti si attivano in miofibroblasti e iniziano a secernere collagene generando una cicatrice fibrotica che rende il tessuto cardiaco più rigido e meno elastico.

Ulteriori studi hanno dimostrato che il trattamento con irisina ricombinante (r-irisina) riduceva l'apoptosi dei cardiomiociti e lo stress ossidativo aumentando l'attività della superossido dismutasi (SOD) e ripristinando la localizzazione mitocondriale della SOD2 nei cardiomiociti [52]. Liao e colleghi [53] hanno dimostrato che, in un modello di MI nei topi, la somministrazione di r-irisina per due settimane ha aumentato la funzione cardiaca, attenuato la dilatazione ventricolare e ridotto le dimensioni della lesione del miocardio e della fibrosi a quattro settimane dall'MI. Gli effetti terapeutici sono associati alla funzione proangiogenica e alla **soppressione dell'apoptosi dei cardiomiociti** attraverso l'attivazione delle vie della chinasi ERK (*Extracellular signal-regulated Kinase*) [53].

Dato l'importante ruolo dell'irisina nella regolazione del metabolismo, non sorprende che diversi studi abbiano trovato associazioni tra l'espressione di irisina e l'insorgenza dell'ipertrofia cardiaca che generalmente precede una condizione di insufficienza cardiaca [54–56]. Variazioni dei livelli di irisina possono implicare un adattamento metabolico compromesso durante il processo ipertrofico e sono associati alla morte dei cardiomiociti indotta dall'ipertrofia.

Studi svolti sia *in vivo* che *ex vivo* indicano che il sistema FNDC5/irisina è coinvolto nell'ipertrofia dei cardiomiociti indotta da obesità, influenzando

l'autofagia, l'infiammazione, la fibrosi e lo stress ossidativo [55–57]. Tali studi suggeriscono che diverse vie di segnalazione regolate da irisina sono coinvolte nel miglioramento dell'ipertrofia dei cardiomiociti. L'irisina **previene l'ipertrofia cardiaca** causata da un aumento di pressione/volume sanguigno principalmente attraverso **l'innescò dell'autofagia**, stimolando la via dell'adenosina monofosfato attivata dalla proteina chinasi (AMPK)-Unc-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1) [55]. Inoltre, la somministrazione di irisina potrebbe migliorare la disfunzione cardiaca causata dall'aumento di pressione/volume sanguigno e l'ipertrofia miocardica sopprimendo lo stress ossidativo attraverso la down-regolazione del segnale AKT [58]. Yu e colleghi hanno riportato che le espressioni cardiache e i livelli circolanti di irisina sono aumentati nei topi con ipertrofia e che il trattamento con irisina è in grado di inibire l'ipertrofia cardiaca patologica e la fibrosi attraverso le vie di segnalazione AMPK-mammalian target of rapamycin (mTOR) [56]. Inoltre, Zhao et al. hanno suggerito che i cardiomiociti secernono irisina in modo dipendente dalla famiglia ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) e la somministrazione di irisina ha migliorato l'ipertrofia e la fibrosi cardiaca causate dall'aumento di pressione/volume sanguigno e ha migliorato la funzione cardiaca attivando le vie di segnalazione AMPK-mTOR [58].

Inoltre, studi svolti *ex vivo* hanno dimostrato che il trattamento con irisina riduce significativamente l'aumento delle dimensioni dei cardiomiociti causato dall'angiotensina II [56]. Studi sui topi invece hanno dimostrato che la fibrosi interstiziale cardiaca indotta dall'angiotensina II era ridotta dal pretrattamento con irisina [59]. Come meccanismo d'azione proposto in questo studio, gli autori hanno dimostrato che il trattamento con irisina **inibisce la fibrosi cardiaca** bloccando la formazione di specie reattive dell'ossigeno mediata dall'angiotensina II, che a sua volta attiverebbe il fattore di crescita trasformante beta 1 (TGF β 1) e la segnalazione Smad2/3, con conseguente aumento della sintesi di collagene e trasformazione dei fibroblasti in miofibroblasti nel tessuto cardiaco [59]. Inoltre, il trattamento nei topi con irisina ricombinante per 4 settimane ha attenuato l'ipertrofia cardiaca causata dalla costrizione aortica trasversale (TAC) [56]. Un ulteriore studio ha dimostrato che il modello murino che sovraesprime il precursore dell'irisina FNDC5, dopo

essere stato sottoposto a intervento di TAC, ha mostrato una riduzione del rapporto peso cardiaco/lunghezza della tibia e dei livelli di marcatori ipertrofici, come il peptide natriuretico atriale (ANP), suggerendo che il sistema FNDC5/irisina può contribuire a preservare la funzione cardiaca [55]. A conferma di ciò, gli autori hanno anche dimostrato che i topi FNDC5 knock-out presentavano una grave insufficienza cardiaca dopo l'intervento di TAC, accompagnata da ipertrofia cardiaca eccentrica, fibrosi e disfunzione cardiaca [55].

Il **pretrattamento con irisina** nei topi, somministrato secondo un protocollo che imita l'attività fisica moderata, cioè a **intermittenza** (una volta alla settimana) per 4 settimane, ha dimostrato di riuscire a riprodurre anche nel tessuto cardiaco gli effetti positivi dell'**esercizio fisico** osservati su ossa, cervello e muscolo scheletrico in studi precedentemente condotti dal gruppo di ricerca di cui faccio parte [40,60–62].

In particolare, attraverso il mio progetto di dottorato abbiamo valutato se, attuando lo stesso protocollo di somministrazione intermittente, il pretrattamento con irisina potesse prevenire la fibrosi cardiaca causata dalla somministrazione di alte dosi di isoproterenolo (ISO) nei topi.

Inoltre, il modello murino utilizzato imita la condizione comune di stimolazione β -adrenergica acuta, come quella a cui è sottoposto l'uomo durante episodi di vita impegnativi, stati di shock o da fattori di stress quotidiani.

SCOPO DELLA TESI

L'attività di ricerca svolta durante questi tre anni, in qualità di dottoranda, ha riguardato lo studio del ruolo di irisina nella cura e prevenzione di patologie del tessuto muscolare scheletrico e cardiaco.

In particolare, l'attività sperimentale ha riguardato uno dei principali obiettivi della ricerca biomedica spaziale, nonché lo studio dell'impatto dell'assenza e dell'alterata accelerazione di gravità sul **muscolo scheletrico**, e del

potenziale ruolo di **irisina** nella cura e prevenzione di una delle patologie che ne derivano, quale l'atrofia muscolare.

L'esposizione a lungo termine alla microgravità a cui gli astronauti sono sottoposti durante una missione spaziale, o una condizione di ipomobilità sulla terra, dovuta ad esempio ad un lungo periodo di allettamento, inducono una grave atrofia muscolare. Al contrario, il carico meccanico indotto dall'esercizio fisico o da una condizione di ipergravità prodotta artificialmente consente di recuperare la massa muscolare. Pertanto, la ricerca nel campo biomedico spaziale si sta concentrando sull'identificazione di biomarcatori di danno tissutale causato dalla microgravità e sui possibili effetti protettivi dell'ipergravità.

Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare il coinvolgimento dell'irisina e del suo precursore FNDC5 in condizioni di **ipogravità** e **ipergravità**.

Successivamente parte dell'attività sperimentale si è concentrata sullo studio del ruolo di irisina nel **muscolo cardiaco**, in particolare nella prevenzione della **fibrosi cardiaca**, processo fisiopatologico che si verifica a seguito dell'infarto del miocardio. Lo scopo è stato quello di comprendere se il pretrattamento con irisina previene la fibrosi cardiaca indotta con un'iniezione acuta di isoproterenolo, un agonista β -adrenergico.

Nello specifico, gli esperimenti sono stati condotti su 3 differenti tipi di **modelli murini**, ognuno dei quali simulava la condizione oggetto di studio, così suddivisi:

- a) Nel **primo** studio: topi di 2 mesi di età, maschi e femmine (n=64; 34 maschi e 30 femmine) sospesi per la coda da 1 a 4 settimane al fine di studiare la condizione di **microgravità simulata nel tempo**. Un sottogruppo di topi (n=8) è stato trattato con irisina (100 μ g/kg) per via intraperitoneale, una volta a settimana per 4 settimane.

In questo studio abbiamo analizzato, nelle 4 settimane di assenza di carico meccanico a cui erano sottoposti gli arti posteriori, l'area delle fibre muscolari del Vasto laterale in sezione trasversale, la modulazione dell'espressione delle miosine e dei markers di atrofia muscolare nel

Vasto laterale e nel Gastrocnemio, in parallelo alla modulazione dei livelli sierici di irisina e del suo precursore FNDC5 nel muscolo scheletrico.

- b) Nel **secondo** studio: topi maschi di 3,5 mesi (topi 3g; n=11) sono stati sottoposti ad una condizione di **ipergravità** (3g) per 4 settimane, utilizzando una centrifuga di grande diametro dotata di appropriati sistemi ingegneristici in cui alloggiavano le gabbie dei topi. Un secondo gruppo di topi (topi Training Cage TC; n=12) è stato alloggiato in gabbie di controllo non sottoposte ad accelerazione di gravità. Un terzo gruppo di topi (topi Vivarium V; n=12) invece è stato lasciato nelle classiche gabbie per la stabulazione ed è stato utilizzato come controllo per le gabbie.

In questo studio abbiamo analizzato l'area delle fibre muscolari in sezione trasversale e l'espressione dei markers della miogenesi nel Vasto laterale, in parallelo alla modulazione delle miosine, di FNDC5 e ad una loro possibile correlazione nel Vasto laterale e nel Gastrocnemio.

- c) Nel **terzo** studio: topi maschi e femmine di 4 mesi sono stati sottoposti a somministrazione di isoproterenolo per indurre la **fibrosi cardiaca**, subito dopo un pretrattamento eseguito attraverso iniezione sottocutanea con irisina (100 µg/kg) (gruppo irisina-ISO; n=16) o vehicle (gruppo veh-ISO; n=12), una volta alla settimana per 4 settimane. Un terzo gruppo di topi è stato utilizzato come controllo ed ha ricevuto vehicle una volta alla settimana per 4 settimane senza ricevere l'iniezione di ISO alla fine delle 4 settimane (gruppo CTRL; n=12).

In questo studio abbiamo quantificato attraverso l'analisi istologica il deposito di collagene responsabile della formazione della cicatrice fibrotica nel tessuto cardiaco e in parallelo abbiamo studiato la modulazione dei markers di danno cardiaco, dei miofibroblasti e della biogenesi mitocondriale nel cuore.

MATERIALI E METODI

1. Modelli murini

1.1 Modello murino di microgravità simulata

I topi di 2 mesi C57BL/6J maschi e femmine (n=64; 34 maschi e 30 femmine) sono stati assegnati in modo casuale a due gruppi sperimentali: topi tenuti in condizioni di controllo (Rest) e topi sospesi per la coda (Unload). Ogni gruppo è stato ulteriormente suddiviso in 4 sottogruppi: Rest (n=6) e Unload (n=7) per 1 settimana; Rest (n=7) e Unload (n=8) per 2 settimane; Rest (n=8) e Unload (n=13) per 3 settimane; Rest (n=8) e Unload (n=7) per 4 settimane. Abbiamo inserito nel disegno sperimentale un ulteriore gruppo di topi Unload-Irisin (n=8), ovvero sospesi per la coda e trattati per 4 settimane con rec-Irisin (Adipogen) 100 µg/kg una volta alla settimana per 4 settimane.

Per i topi sottoposti a sospensione per la coda (Unload), sono state seguite le raccomandazioni previste dal protocollo di Wronski e Morey-Holton [63]. I topi sono stati alloggiati singolarmente in gabbia, sospesi a testa in giù con un angolo di inclinazione pari a 30°. La sospensione è stata effettuata in modo tale che le zampe posteriori dei topi non avessero contatto con la base della gabbia tale da generare un'assenza di carico meccanico. Al contrario, gli arti anteriori dei topi erano in contatto con la base della gabbia tale da garantire pieno accesso a cibo e acqua. Durante tutto l'esperimento sono state mantenute le condizioni standard di ciclo luce-buio (12/12 ore) ed è stato assicurato ai topi l'accesso ad acqua e dieta regolare ad libitum (Harlan Teklad 2019, SDS, Inghilterra). I topi Unload sono stati trattati o con vehicle (soluzione fisiologica sterilizzata per filtrazione 0,22 µ) (n=8) o con 100 µg/kg rec-Irisina (Adipogen International, San Diego, USA) (n=8) mediante iniezione intraperitoneale (i.p.) una volta alla settimana per 4 settimane. I topi del gruppo controllo (Rest) (n=8) sono stati disposti singolarmente nelle gabbie e sono stati sottoposti ad iniezione i.p. di vehicle una volta alla settimana per 4 settimane.

I topi sono stati pesati una volta alla settimana per seguire le eventuali fluttuazioni di peso corporeo. Al termine delle procedure sperimentali, i topi sono stati sottoposti ad eutanasia e sacrificati. I tessuti di interesse sono stati asportati chirurgicamente.

Al momento del sacrificio, utilizzando tecniche appropriate, il vasto laterale dell'arto posteriore destro di ogni topo è stato isolato dal restante quadricipite e fissato con paraformaldeide al 4% (vol/vol) per 24 ore e trattato per la successiva analisi istologica. Invece il vasto laterale e il gastrocnemio dell'arto posteriore sinistro di ogni topo sono stati prelevati e conservati a -80°C fino al momento dell'analisi di biologia molecolare.

Questi studi sugli animali sono conformi alla legge europea di attuazione della direttiva 2010/63/UE e tutti i protocolli sperimentali sono stati rivisti e approvati dal Dipartimento di Veterinaria del Ministero della Salute Italiano (Progetto 522-2016PR).

Le procedure sperimentali sono state eseguite seguendo tutti i criteri di biosicurezza standard e le procedure di sicurezza istituzionali. Gli operatori hanno eseguito le assegnazioni dei topi nei vari gruppi sperimentali in cieco. La dimensione del campione è stata determinata in base all'analisi della potenza statistica utilizzando il calcolatore G-power³, con una dimensione dell'effetto α di 0,25, un errore di tipo I = 0,05 e una potenza del test = 80% in base ai nostri studi precedenti.

1.2 Modello murino in condizioni di ipergravità

La condizione di ipergravità è stata realizzata attraverso un esperimento condotto presso l'Agenzia Spaziale Europea, in cui i topi sono stati mantenuti a un'accelerazione gravitazionale di 3g per 4 settimane, utilizzando una centrifuga di grande diametro (LDC) dotata per ognuno dei 4 bracci di un appropriato sistema a cassette denominato MDS (Mice Drawer System) in cui alloggiavano le gabbie degli animali.

I topi C57BL/6J di 3,5 mesi (n=24) sono stati alloggiati nelle gabbie per familiarizzare con i sistemi di approvvigionamento idrico e alimentare per 14

giorni. In totale l'esperimento prevedeva 12 topi da sottoporre ad un'accelerazione di gravità pari a 3g, tuttavia a causa di un problema con il sistema di distribuzione dell'acqua, solo 11 delle gabbie erano pienamente operative durante l'esperimento (topi 3G; n=11). Trascorso il periodo di adattamento l'MDS è stato collocato sulla centrifuga e in 2 ore si è raggiunta un'accelerazione gravitazionale pari a 3g.

Un secondo gruppo di topi (topi TC; n=12) è stato alloggiato in gabbie di controllo (MDS-CTRL) non sottoposte ad accelerazione di gravità, denominate gabbie di addestramento costruite con le stesse dimensioni e gli stessi materiali delle gabbie dei moduli MDS caricati sull'LDC ma tenute a gravità terrestre (gabbie training cage, TC). Un terzo gruppo di topi (topi V; n=12) invece è stato lasciato nelle classiche gabbie per la stabulazione ed è stato utilizzato come controllo per le gabbie (Vivarium).

Per questo esperimento sono stati utilizzati solo topi maschi C57BL/6J per evitare i bias dovuti alle fluttuazioni ormonali degli animali di sesso femminile. Alla fine dell'esperimento i topi avevano 5 mesi. L'alimentazione era basata sulla dieta standard con l'aggiunta di gomma Xanthan. I topi sono stati monitorati durante e dopo l'esposizione all'ipergravità attraverso l'Observation SubSystem (OSS) sia di giorno che di notte.

Questo esperimento fa parte del programma di condivisione dei tessuti (Tissue Sharing Program, TSP) che vede la partecipazione di vari gruppi di ricerca provenienti da diverse parti del mondo con le loro competenze specifiche. Il TSP è stato creato con l'obiettivo di ottenere il maggior numero di informazioni da ogni singolo topo condividendo tessuti, organi o campioni diversi tra i vari gruppi. A questo scopo, anche la sequenza di prelievo dei campioni è stata eseguita seguendo un ordine preciso, per proteggere gli organi più sensibili alla degradazione, come il cervello e i muscoli.

Dopo che il topo è stato rimosso dalla gabbia (o MDS) si è osservato per 5 minuti il suo comportamento. Successivamente è stato pesato e sono stati prelevati i campioni di urina e sangue. Infine, il topo è stato sottoposto a eutanasia. Dopo l'eutanasia, sono stati raccolti organi e tessuti dai singoli gruppi. Una volta giunto al nostro gruppo di ricerca, da ogni topo è stato

prelevato il gastrocnemio e il quadricipite, e da quest'ultimo è stato successivamente isolato il vasto laterale.

1.3 Modello murino di fibrosi cardiaca

I topi maschi e femmine C57BL/6J di 4 mesi (n=40), con peso corporeo di $25,83 \pm 3,89$ grammi, sono stati assegnati in modo casuale a tre gruppi: topi di controllo iniettati con vehicle (CTRL), topi iniettati con vehicle e poi sottoposti a trattamento ISO (veh-ISO) e topi trattati con irisina e poi sottoposti a iniezione ISO (irisina-ISO). La dimensione del campione è stata determinata in base all'analisi della potenza statistica utilizzando il calcolatore G-power³, con una dimensione dell'effetto α di 0,25, un errore di tipo I = 0,05 e una potenza del test = 80% in base ai nostri studi precedenti [40,60–62]. Per evitare i bias di allocazione, ad esempio il giorno in cui gli animali sono stati trattati o la loro posizione in gabbia, abbiamo utilizzato il metodo di randomizzazione a blocchi. Più precisamente, abbiamo diviso l'esperimento in due sotto esperimenti e i trattamenti sono stati randomizzati all'interno di ciascun blocco. I singoli animali sono stati assegnati casualmente ai blocchi sperimentali da un gruppo omogeneo per età e sesso, e i trattamenti e le analisi sono stati eseguiti da ricercatori in cieco. Il nostro studio ha esaminato animali maschi e femmine e sono stati riportati risultati simili per entrambi i sessi. I topi sono stati alloggiati in gabbie convenzionali in strutture a temperatura controllata con un ciclo di luce/buio di 12 ore e una dieta standard. Tutti i topi sono stati monitorati e pesati una volta alla settimana.

I topi sono stati trattati mediante iniezione sottocutanea (s.c.) una volta alla settimana per 4 settimane con soluzione fisiologica sterilizzata mediante filtrazione a $0,22 \mu$ [gruppo veh-ISO] (N=12) o con $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ di rec-irisina (AG-40B-0128-C010, Adipogen International, San Diego, CA, USA) [gruppo irisina-ISO] (N=16). Un terzo gruppo di topi è stato utilizzato come controllo ed ha ricevuto la soluzione fisiologica per iniezione sottocutanea (s.c.) una volta alla settimana per 4 settimane senza ricevere l'iniezione di ISO alla fine delle 4 settimane [gruppo CTRL] (N=12). Sulla base dei risultati di uno studio

precedente [19], il modello di fibrosi cardiaca è stato ottenuto mediante una singola iniezione intraperitoneale (i.p.) di isoproterenolo HCL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in soluzione salina di Dulbecco tamponata con fosfato (DPBS; Sigma-Aldrich) (160 mg/kg), 24 ore dopo l'ultima iniezione di irisina o di vehicle. I criteri per determinare il successo del modello murino sono stati valutati nel gruppo di topi veh-ISO rispetto a quello CTRL, misurando i livelli sierici di troponina I e il rapporto peso del cuore/lunghezza della tibia rispettivamente dopo 24 ore e 7 giorni dall'iniezione di ISO.

Per garantire il benessere dei topi, un ricercatore esperto in comportamento animale ha provveduto ad alleviare il dolore prima di eseguire la procedura sperimentale dell'iniezione di isoproterenolo. A tal fine, abbiamo incluso un pretrattamento con tramadolo cloridrato 0,05mg/kg, analgesico iniettato per via sottocutanea 30 minuti prima del trattamento con isoproterenolo [64]. I topi di controllo [CTRL] sono stati trattati con DPBS (Sigma-Aldrich) a volume equivalente. Per valutare il recupero dagli effetti acuti dell'isoproterenolo, non abbiamo ritenuto opportuno utilizzare la valutazione della Grimace Scale (MGS), poiché non sono stati rilevati né cambiamenti nella posizione dei baffi, né gonfiore del naso o delle guance, né restringimento delle orbite [65]. Abbiamo invece misurato il tempo di recupero dell'attività motoria [66] e la qualità del recupero utilizzando un punteggio di attività (buono, medio, scarso) relativo al movimento, al mangiare o al bere, come precedentemente descritto [19]. Per valutare l'attività motoria, l'Open Field Test (OFT) è stato eseguito da un ricercatore esperto. L'OFT è stato condotto in una gabbia trasparente in policarbonato con lettiera sul fondo, simile alle gabbie domestiche dei topi (37x21x18 cm). I topi sono stati collocati individualmente al centro della gabbia e sono stati messi in condizione di esplorare l'ambiente.

Come indicato nel disegno sperimentale (**Fig. 16A**), un sottogruppo di topi (n=17) è stato sacrificato 24 ore dopo la somministrazione di ISO per l'analisi dei biomarcatori sierici e di biologia molecolare. L'altro sottogruppo di topi (n=23) è stato sacrificato 7 giorni dopo l'iniezione di ISO; quindi, i cuori sono stati pesati e collezionati per le analisi molecolari e istologiche. Seguendo la procedura approvata dall'Autorità Sanitaria Italiana (12/2022-PR), tutti i topi sono stati sottoposti a eutanasia utilizzando anidride carbonica al 100%, infusa

nella gabbia gradualmente per 2 minuti attraverso un sistema automatico. Successivamente, il flusso di gas è stato interrotto e i topi sono rimasti nella gabbia piena di anidride carbonica per 3 minuti; successivamente i topi sono stati posti in posizione supina, è stata accertata l'assenza del battito cardiaco e di eventuali segni di rianimazione premendo le zampe [67].

2. Analisi Istologica

Il Vasto Laterale della zampa destra di ogni topo, isolato dal restante quadricipite, e i cuori escissi sono stati immediatamente fissati in una soluzione fredda di paraformaldeide al 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) per 24 ore, poi trasferiti in una soluzione di saccarosio al 15% in DPBS e successivamente conservati in etanolo 70%.

I cuori sono stati pesati appena escissi ed è stato rimosso l'apice da destinare all'analisi di biologia molecolare, prima che la restante parte fosse trattata per l'analisi istologica.

I campioni di Vasto Laterale e cuore sono stati deidratati in scale crescenti di etanolo ed inclusi in paraffina in posizione trasversale. Le sezioni istologiche sono state tagliate con uno spessore di 5 μ m utilizzando un microtomo standard (RM-2155 Leica, Heidelberg, Germania). La paraffina è stata rimossa mediante soluzione di Xilene e le sezioni sono state reidratate in scale decrescenti di etanolo. Tutti i reagenti e coloranti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Tutte le sezioni di Vasto Laterale sono state colorate con ematossilina eosina (H&E), visualizzate al microscopio ottico Nikon Eclipse 80I (Nikon) utilizzando gli obiettivi 20x. Le immagini sono state scattate a 3840x3072 pixel e analizzate utilizzando il software Image-J, delineando manualmente il perimetro delle singole fibre muscolari per ottenere il valore dell'area della sezione trasversale (detta anche CSA: cross-sectional area).

Le sezioni di cuore invece sono state colorate con il kit di tricromia di Masson (cat. N. HT15, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). La tricromia di Masson è

stata utilizzata per analizzare e classificare la fibrosi, utilizzando una scala di punteggio basata sulla gravità della fibrosi cardiaca: 0 (nessuna), 1 (lieve), 2 (moderata) e 3 (grave), come descritto in altri studi [19]. I punteggi sono stati ottenuti analizzando 10 campi per sezione, considerando 3 sezioni a livello medio del cuore per ciascun animale. L'attribuzione del punteggio è stata effettuata da parte di un ricercatore in cieco. Le immagini sono state acquisite con lo scanner Aperio (Leica Biosystem, Heidelberg, Germania) ed elaborate per la quantificazione dell'area di fibrosi con il software ImageScope (Leica Biosystem, Heidelberg, Germania).

3. Real Time-PCR

I campioni tissutali di vasto laterale, gastrocnemio e cuore sono stati omogeneizzati con Ultra-Turrax T8 (Ika, Staufen im Breis-gau, Germania). L'RNA totale ottenuto è stato estratto con colonne spin (Qiagen, Hilden, Germania). La trascrizione inversa è stata eseguita con iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad Laboratori, Hercules, CA, USA) nel termociclatore (My cycler; Bio-Rad Laboratori, Hercules, CA, USA). La Real Time PCR sul sistema CFX96 real-time (Bio-Rad Laboratori, Hercules, CA, USA) è stata eseguita con SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad Laboratori, Hercules, CA, USA) per 40 cicli (denaturazione 95 °C per 5 s; appaiamento/estensione 60 °C per 10 s) dopo una fase iniziale di 30 secondi per l'attivazione dell'enzima a 95 °C. I primer utilizzati sono stati progettati con Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Tutti i primer coprono una giunzione esone-esone. Per normalizzare i dati è stata utilizzata la media geometrica di due geni housekeeping (Gapdh, B2M). Per ciascun replicato biologico sono state eseguite tre repliche tecniche indipendenti e le misure quantitative sono state calcolate con il metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$ ed espresse come variazione relativa rispetto al controllo. Le sequenze dei primers utilizzati per l'analisi di espressione genica nei muscoli scheletrici e in quello cardiaco sono elencate nelle rispettive tabelle (**Tab.1 e 2**).

Nome gene (muscolo scheletrico)	Forward (5'–3') and Template	Reverse (5'–3') and Template
<i>Gapdh</i>	ACACCAGTAGACTCCACGACA	ACGGCAAATTC AACGGCACAG
<i>beta-2-Microglobulin</i>	TGCTATCCAGAAAACCCCTCA	TTTCAATGTGAGGCGGGTGG
<i>Atrogin-1</i>	TGAGCGACCTCAGCAGTTAC	GCGCTCCTTCGTACTTCCTT
<i>Murf-1</i>	ACCTTCCTCTCAAGTGCCAAG	TCCCAAAGTCAATGGCCCTC
<i>MyHCIIx</i>	AAGTTGCATCCCTAAAGGCAG	TGTTCTGAGCCTCGATTCCG
<i>MyHCIIa</i>	ATAAAAGAGTCCCGAACGAGGC	GCTGAACTCACAGACCCTTAC
<i>FNDC5</i>	GTGCTGACTATTGTTGTGGTCC	ATCATATCTTGCTGCGGAGGAG

Tab.1 Sequenze Primers Murini muscoli scheletrici. Nella tabella sono indicati i primer utilizzati per l'analisi di espressione genica del vasto laterale e del gastrocnemio, con indicato il nome del gene.

Nome gene (muscolo cardiaco)	Forward (5'–3') and Template	Reverse (5'–3') and Template
<i>Gapdh</i>	ACACCAGTAGACTCCACGACA	ACGGCAAATTC AACGGCACAG
<i>beta-2-Microglobulin</i>	TGCTATCCAGAAAACCCCTCA	TTTCAATGTGAGGCGGGTGG
<i>αSMA</i>	CAGCCATCTTTCATTGGGATG	TGGTACCCCTGACAGGAC
<i>ANP</i>	CTGATGGATTTCAAGAACCTGCT	TCTCAGAGGTGGGTTGACCT
<i>IL33</i>	TGCTACTACGCTACTATGAG	TGTGAAGGACGAAGAAGG
<i>Sirt1</i>	TCGGCTACCGAGGTCCATA	CGCTTTGGTGGTTCTGAAAGG
<i>PGC1α</i>	CCCTGCCATTGTTAAGACC	TGCTGCTGTTCCCTGTTTTTC
<i>Tfam</i>	TAGGCACCGTATTGCGTGAG	CAGACAAGACTGATAGACGAGGG

Tab. 2 Sequenze Primers Murini muscolo cardiaco. Nella tabella sono indicati i primer utilizzati per l'analisi di espressione genica del cuore, con indicato il nome del gene.

4. Saggio ELISA

Per quanto riguarda i topi coinvolti nell'esperimento di unloading i campioni di sangue sono stati raccolti al termine di ciascuna delle 4 settimane (end point).

Il sangue è stato raccolto in provette da siero e lasciato coagulare per 30 minuti a temperatura ambiente prima di essere centrifugato per 15 minuti a 1000g al fine di ottenere il siero. Dopo la centrifugazione, i campioni sono stati aliquotati e conservati a -80°C fino al momento dell'analisi.

Le concentrazioni di irisina nel siero sono state rilevate con un kit ELISA competitivo (Adipogen, Liestal, Svizzera) con un coefficiente di variazione intra-test $\leq 6,9\%$. Il kit ELISA consente il più ampio intervallo di misurazione (0,001-5 $\mu\text{g/ml}$) ed è il più sensibile (0,001 $\mu\text{g/ml}$). Il kit ELISA comprende un anticorpo policlonale che riconosce per competizione l'irisina nativa e l'irisina ricombinante coattata su una piastra da 96 pozzetti. Secondo le istruzioni del produttore, il kit ELISA competitivo Irisin (Adipogen) è specifico per la misurazione dell'irisina naturale e ricombinante in campioni umani, di topo, ratto e scimmia.

Nel caso dei topi sottoposti a induzione di fibrosi cardiaca invece sono state determinate le concentrazioni di cTnI nel siero utilizzando un kit ELISA per troponina cardiaca I (cTnI) di topo (cat. N. A79005, Antibodies, Cambridge, UK), come indicato dal produttore. I campioni di siero sono stati raccolti 24 ore dopo l'iniezione di ISO mediante prelievo intra-cardiaco e diluiti due volte nel diluente fornito. È stata generata una curva standard utilizzando diluizioni seriali degli standard di calibrazione forniti dal kit, per calcolare le concentrazioni di cTnI in pg/ml. Per ogni replica biologica abbiamo eseguito tre repliche tecniche indipendenti.

In entrambi i test Elisa le densità ottiche sono state misurate a 450 nm con uno apposito spettrofotometro (Eon, BioTek, Winooski, Vermont, USA) al termine del test.

5. Analisi Statistica

L'analisi della distribuzione dei campioni è stata eseguita con i test di normalità di D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk. I dati sono presentati come box-and-whisker plot e i parametri sono stati espressi come mediana e intervallo

interquartile (IQR) da max a min, con tutti i punti rappresentativi di ogni campione mostrati, utilizzando GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Per i valori che hanno superato il test di normalità, abbiamo eseguito un'analisi della varianza (ANOVA) a una via con test di confronto multiplo di Tukey, mentre per i valori a distribuzione non normale abbiamo eseguito il test di Kruskal-Wallis con confronto a due gruppi mediante test di confronto multiplo di Dunn.

RISULTATI

1. Studio in vivo degli effetti di microgravità simulata sul muscolo scheletrico

1.1 L'assenza di carico meccanico influisce sulla morfologia muscolare, aumenta i marcatori dell'atrofia muscolare e riduce l'espressione della catena pesante della miosina veloce.

La colorazione con ematossilina ed eosina (H&E), eseguita su sezioni trasversali del Vasto laterale dei topi Unload per 1, 2, 3 e 4 settimane, ha mostrato un aumento dell'estensione dell'area fibrotica in funzione del tempo e una riduzione del diametro delle fibre muscolari (**Fig. 5a**). Per indagare nel tempo l'effetto dell'assenza di carico meccanico sull'atrofia muscolare indotta dal disuso, abbiamo studiato nel Vasto laterale e nel Gastrocnemio i livelli di espressione di *Atrogin-1*, la proteina F-box specifica del muscolo, e di *Muscle ring finger 1* (Murf-1), l'ubiquitina ligasi che controlla la degradazione proteasoma-dipendente delle proteine muscolari, nei topi Unload per 1, 2, 3 e 4 settimane.

Per quanto riguarda *Atrogin-1* nel Vasto laterale, abbiamo osservato un aumento significativo dell'espressione genica pari a 2 volte (* $p=0,016$) a 1 settimana di unloading (**Fig. 5b**) seguito da un aumento di 11 volte (** $p=0,001$) a 2 settimane (**Fig. 5c**), mentre non è stata riscontrata alcuna differenza significativa alla 3^a e 4^a settimana rispetto ai controlli (**Fig. 5d,5e**). L'impatto dell'unloading sul Gastrocnemio invece è stato leggermente più tardivo, in

quanto abbiamo riscontrato un aumento significativo di 2 volte dell'espressione genica di *Atrogin-1* a 2 settimane (*p=0,027) (**Fig. 5g**), senza osservare alcuna modulazione significativa negli altri punti temporali rispetto ai controlli.

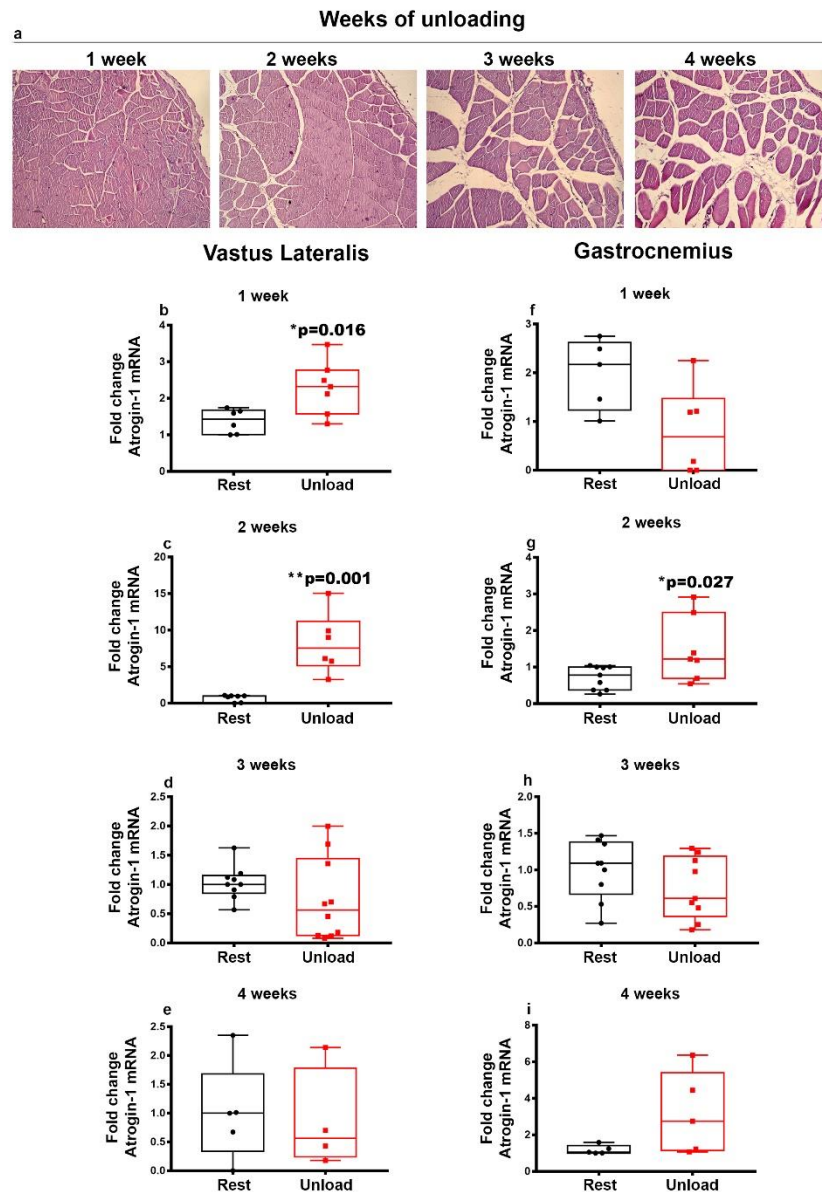


Fig. 5 L'effetto dell'unloading sulla morfologia muscolare e sull'espressione di *Atrogin-1* nel Vasto laterale e nel Gastrocnemio. Colorazione di ematossilina-eosina (H&E) su sezioni trasversali del Vasto laterale di topi Unload per 1, 2, 3 e 4 settimane, che mostrano l'aumento dell'area fibrotica e la riduzione del diametro delle fibre muscolari in funzione del tempo (**a**). La PCR quantitativa (qPCR) mostra la modulazione dei livelli di

espressione di *Atrogin-1* nel Vasto laterale (**b-e**) e nel Gastrocnemio (**f-i**) di topi di controllo (Rest) e di topi sospesi per la coda (Unload) ad 1-2-3 e 4 settimane. I risultati mostrano un aumento significativo dell'espressione di *Atrogin-1* a 1 e 2 settimane nel Vasto laterale (**b-c**) e a 2 settimane nel Gastrocnemio (**g**). Sono stati eseguiti i test di Shapiro-Wilk e di Mann-Whitney. I dati sono presentati sotto forma di box-and-whisker con mediana e intervalli interquartili, da max a min, con tutti i punti rappresentativi di ogni campione mostrati. *p < 0,05, **p < 0,01 vs Rest.

Abbiamo successivamente analizzato l'espressione genica di *Murf-1* che risulta aumentata nel Vasto laterale solo dopo 3 settimane di unloading (*p=0,045) (**Fig. 6c**) mentre nel Gastrocnemio solo dopo 2 settimane (*p=0,045) (**Fig. 6f**) rispetto ai controlli.

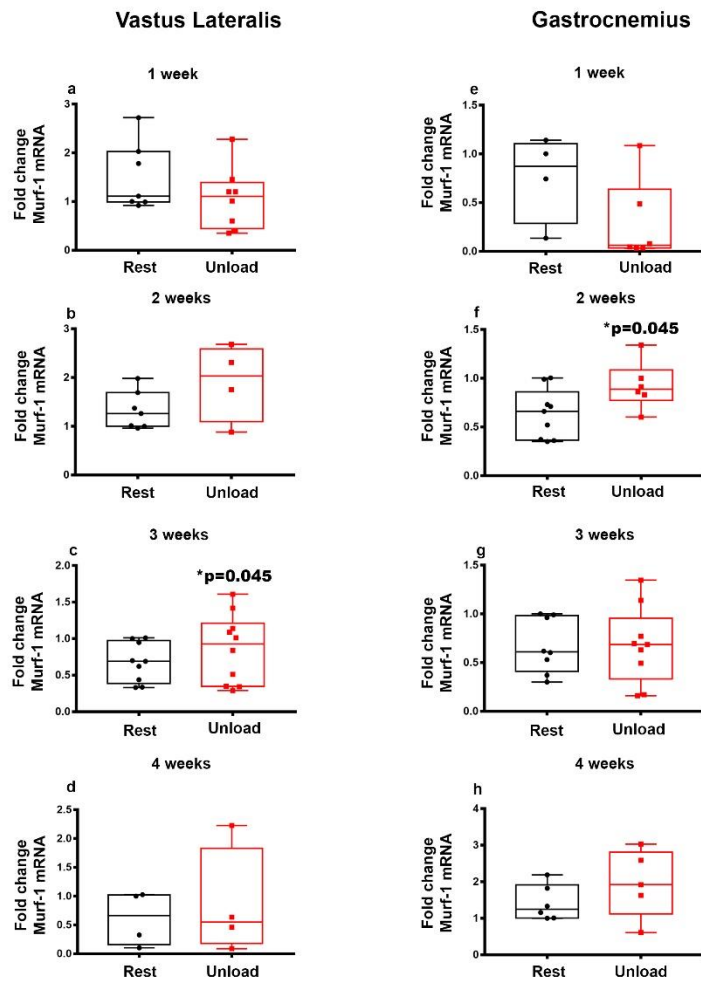


Fig. 6 L'effetto dell'unloading sull'espressione di *Murf-1* nel Vasto laterale e nel Gastrocnemio. La PCR quantitativa (qPCR) mostra i livelli di espressione di *Murf-1* nel Vasto laterale (a-d) e nel Gastrocnemio (e-h) di topi mantenuti in condizioni di controllo (Rest) e di topi sospesi per la coda (Unload) a 1-2-3 e 4 settimane. I risultati hanno mostrato un aumento significativo dell'espressione di *Murf-1* a 3 settimane nel Vasto laterale (c) e a 2 settimane nel Gastrocnemio (f). Sono stati eseguiti i test di Shapiro-Wilk e di Mann-Whitney. I dati sono presentati come box-and-whisker con mediana e intervalli interquartili, dal max al min, con tutti i punti rappresentativi dei campioni indicati. *p <0,05 vs Rest.

In seguito, abbiamo studiato i livelli di espressione genica delle isoforme della catena pesante della miosina II (*MyHCII*) negli stessi muscoli e nelle stesse settimane dei topi Unload come descritto in precedenza. Nel Vasto laterale, abbiamo osservato che l'espressione genica dell'isoforma *MyHCIIx* era progressivamente ridotta, a partire da una riduzione significativa a 1 settimana di unloading (-64%, * $p=0,016$) (**Fig. 7a**), più marcata a 3 settimane (-88%, *** $p=0,0002$) (**Fig. 7c**) e infine una tendenza alla diminuzione a 4 settimane rispetto ai topi di controllo. Allo stesso modo, nel Gastrocnemio, la condizione di assenza di carico meccanico ha ridotto notevolmente l'espressione dell'mRNA di *MyHCIIx* a 1 settimana (-86%, * $p=0,031$) (**Fig. 7e**), la quale è poi tornata ai livelli basali a 2 e 3 settimane di unloading ed infine diminuita nuovamente dopo 4 settimane (-83%, **** $p<0,0001$) (**Fig. 7h**) rispetto ai controlli. Sebbene in un nostro precedente studio avessimo osservato nel Vasto laterale una drastica riduzione della miosina di tipo I (*MyHCI*) dopo 4 settimane di assenza di carico meccanico [42], nel presente studio invece non abbiamo osservato cambiamenti della sua espressione, così come delle altre miosine esaminate (*MyHCII α* , *MyHCII β*) nel Vasto laterale.

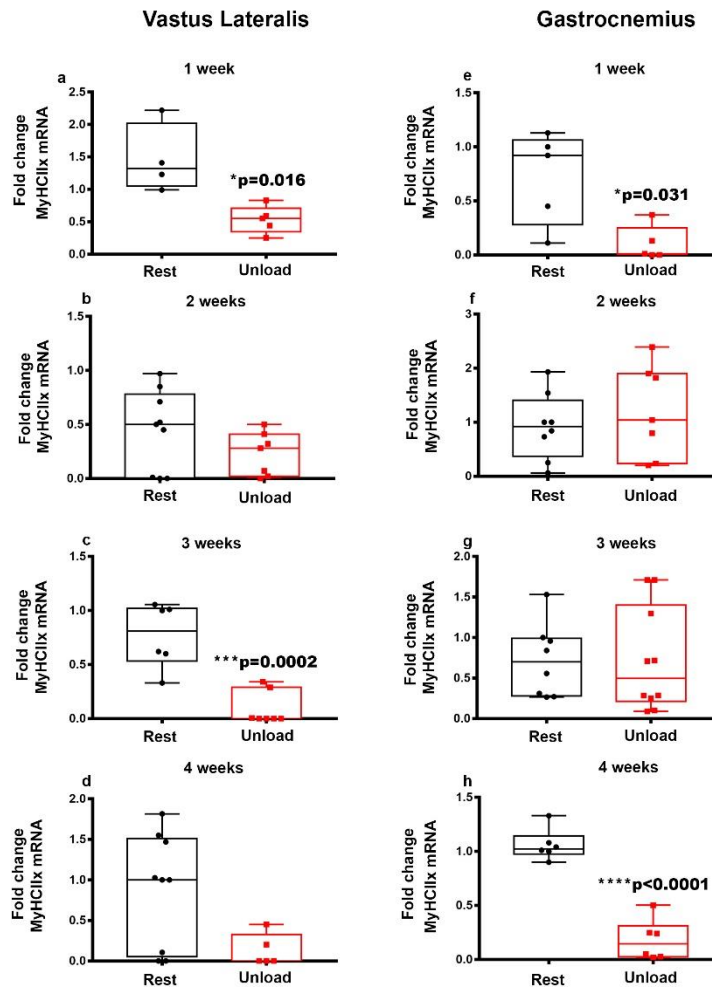


Fig. 7 L'effetto dell'unloading sull'espressione della miosina *MyHCIIx* nel Vasto laterale e nel Gastrocnemio. PCR quantitativa (qPCR) che mostra i livelli di espressione di *MyHCIIx* nel Vasto laterale (a-d) e del Gastrocnemio (e-h) di topi di controllo (Rest) e di topi sospesi per la coda (Unload) a 1-2-3 e 4 settimane. L'analisi ha mostrato una riduzione dell'espressione di *MyHCIIx* a 1 settimana di unloading in entrambi i muscoli: Vasto laterale (a) e Gastrocnemio (e). La diminuzione di *MyHCIIx* è stata osservata anche a 3 e 4 settimane di unloading, rispettivamente nel Vasto laterale (c) e nel Gastrocnemio (h). Sono stati eseguiti i test di Shapiro-Wilk e di Mann-Whitney. I dati sono presentati come box-and-whisker con mediana e intervalli

interquartili, dal max al min, con tutti i punti rappresentativi dei campioni mostrati. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs Rest.

Tuttavia, abbiamo riscontrato una riduzione significativa dei livelli di mRNA di *MyHCII α* nel Gastrocnemio dei topi Unload a 3 (-76%, ** $p=0,002$) (**Fig. 8c**) e 4 settimane (-86%, ** $p=0,002$) (**Fig. 8d**) di unloading rispetto alle condizioni di controllo.

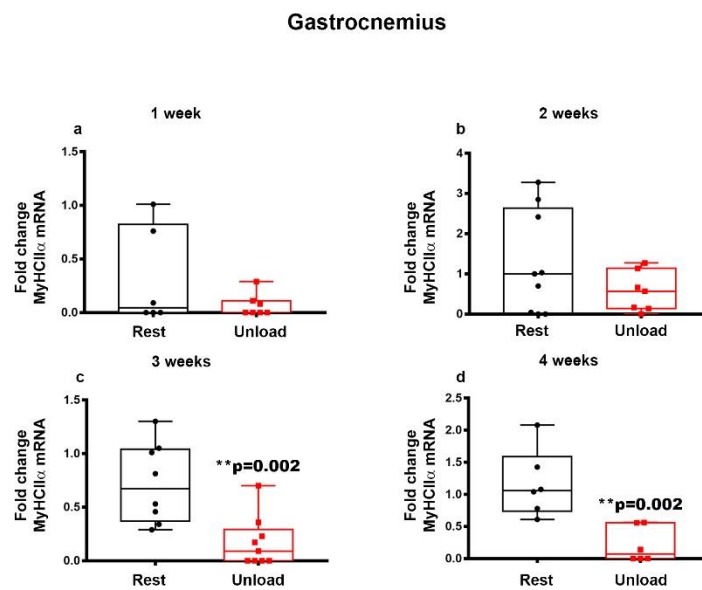


Fig. 8 L'Effetto dell'unloading sull'espressione della miosina *MyHCII α* nel Gastrocnemio. La PCR quantitativa (qPCR) mostra i livelli di espressione di *MyHCII α* nel Gastrocnemio (**a-d**) di topi controllo (Rest) e di topi sospesi per la coda (Unload) a 1-2-3 e 4 settimane di unloading. I dati hanno mostrato una diminuzione significativa di *MyHCII α* nel muscolo Gastrocnemio dopo 3 (**c**) e 4 (**d**) settimane di sospensione per la coda. Sono stati eseguiti i test di Shapiro-Wilk e di Mann-Whitney. I dati sono presentati come box-and-whisker con mediana e intervalli interquartili, dal max al min, con tutti i punti rappresentativi dei campioni mostrati. ** $p < 0,01$ vs Rest.

1.2 L'espressione genica di FNDC5 nei muscoli Vasto laterale e Gastrocnemio e i livelli sierici di irisina sono downregolati dopo 4 settimane di assenza di carico meccanico

Abbiamo precedentemente dimostrato che la somministrazione di irisina per 4 settimane in topi Unload ha preservato nel Vasto laterale il numero di fibre muscolari che co-esprimono FNDC5 e ATPsintasi, indicando così una possibile correlazione tra il sistema autocrino FNDC5/Irisina e il contenuto mitocondriale nel muscolo scheletrico [42]. Durante lo studio attuale invece abbiamo analizzato l'effetto dell'unloading sull'espressione genica di FNDC5 nel tempo, sia nel Vasto laterale che nel Gastrocnemio e, parallelamente, abbiamo analizzato i livelli sierici di irisina endogena durante le 4 settimane di assenza di carico meccanico.

L'espressione di FNDC5 è risultata significativamente ridotta a 4 settimane di unloading nel Vasto laterale, risultando 5 volte più bassa rispetto ai topi di controllo (* $p=0,022$) (**Fig. 9d**), mentre nel Gastrocnemio la riduzione dell'espressione genica di FNDC5 si è verificata a 3 settimane di assenza di carico meccanico rispetto ai topi di controllo (** $p=0,008$) (**Fig. 9g**).

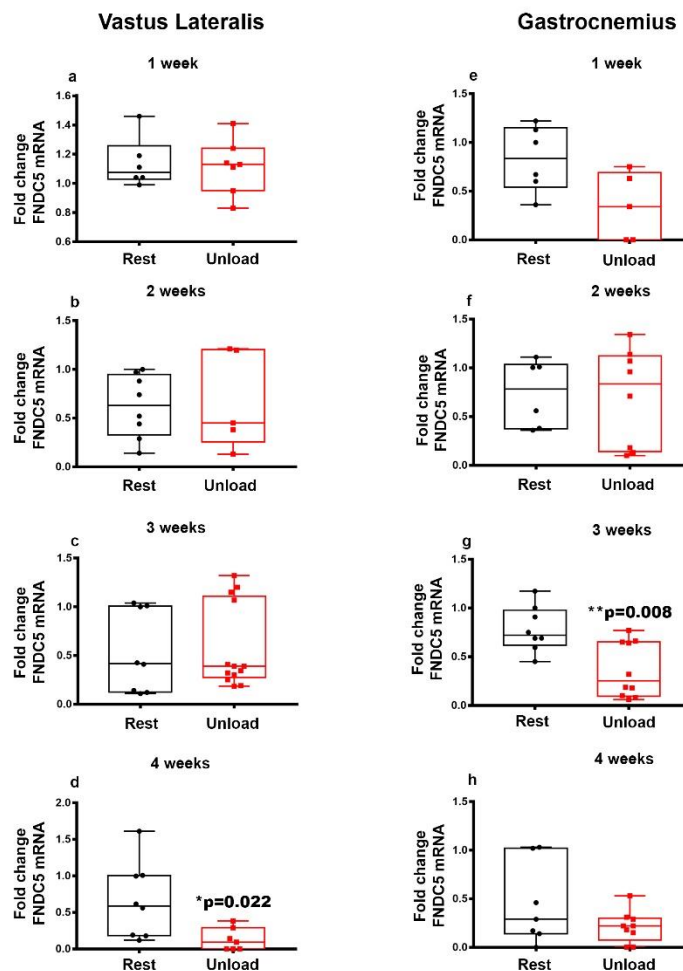


Fig. 9 L'effetto dell'unloading sull'espressione di *FNDC5* nel Vasto laterale e nel Gastrocnemio. La PCR quantitativa (qPCR) mostra i livelli di espressione di *FNDC5* nel Vasto laterale (a-d) e nel Gastrocnemio (e-h) di topi controllo (Rest) e di topi sospesi per la coda (Unload) a 1-2-3 e 4 settimane. L'analisi ha mostrato una down-regolazione dell'espressione di *FNDC5* a 4 settimane di unloading nel Vasto laterale (d). Nel Gastrocnemio, la down-regolazione di *FNDC5* è stata osservata a 3 settimane di unloading (g). Sono stati eseguiti i test di Shapiro-Wilk e di Mann-Whitney. I dati sono presentati come box-and-whisker con mediana e intervalli interquartili, dal max al min,

con tutti i punti rappresentativi dei campioni mostrati. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs Rest.

Non abbiamo osservato alcuna modulazione dei livelli sierici di irisina fino alla terza settimana (**Fig. 10a, 10b e 10c**), ma abbiamo rilevato una riduzione significativa (-35%, * $p=0,014$) alla quarta settimana di unloading rispetto ai topi controllo (**Fig. 10d**).

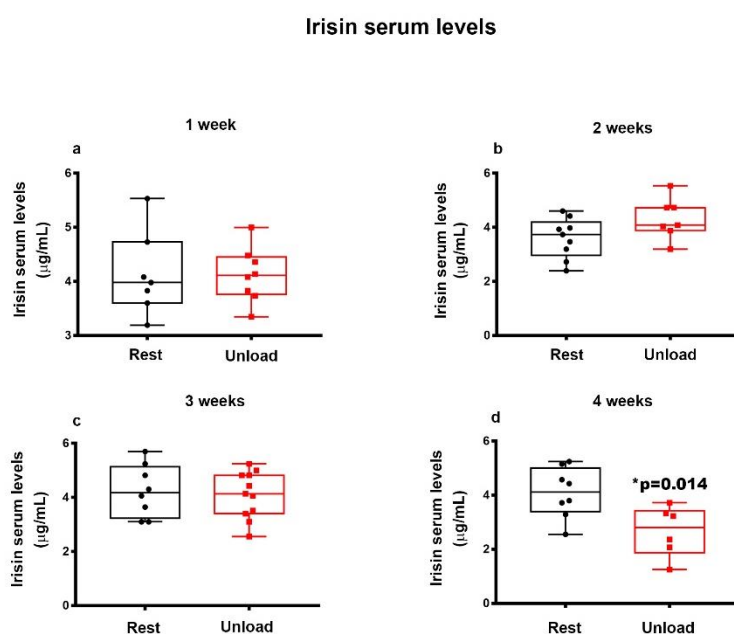


Fig. 10 L'effetto dell'unloading sui livelli sierici di irisina. I grafici in figura mostrano l'andamento dei livelli sierici di irisina nei topi controllo (Rest) e nei topi sospesi per la coda (Unload) a 1-2-3 e 4 settimane (**a-d**). I livelli sierici di irisina erano significativamente ridotti dopo 4 settimane di unloading rispetto ai topi posti in una condizione di controllo (**d**). Sono stati eseguiti i test di Shapiro-Wilk e di Mann-Whitney. I dati sono presentati come box-and-whisker con mediana e intervalli interquartili, dal max al min, con tutti i punti rappresentativi dei campioni mostrati. * $p < 0,05$ vs Rest.

1.2 Effetti in vivo dell'irisina sul muscolo scheletrico durante la condizione di assenza di carico meccanico

Nei nostri studi precedenti, abbiamo osservato che la condizione di unloading riduceva l'espressione delle miosine di tipo II nel Vasto laterale, in particolare dell'isoforma IIx, mentre il trattamento con irisina ripristinava l'espressione della miosina [42]. Pertanto, nel presente studio ci siamo concentrati sull'analisi degli effetti del trattamento con irisina ricombinante sul Gastrocnemio, studiando in particolare l'espressione delle isoforme della miosina indotte dall'assenza di carico meccanico. I risultati hanno mostrato una riduzione dell'espressione di *MyHCII α* nei topi Unload trattati con il vehicle rispetto ai topi di controllo (** $p=0,002$), mentre nei topi Unload trattati con irisina si osservava un aumento significativo dell'espressione di *MyHCII α* rispetto ai topi Unload trattati con vehicle ($\wedge p=0,014$). In particolare, questo aumento ha riportato i livelli di espressione di *MyHCII α* a quelli osservati nei topi controllo non sottoposti ad unloading (**Fig. 11a**). Come già osservato per il Vasto laterale nel nostro precedente lavoro, la condizione di assenza di carico meccanico ha indotto anche nel Gastrocnemio una riduzione dell'espressione di *MyHCIIx* (**** $p<0,0001$), mentre il trattamento con irisina ha portato ad un aumento significativo di *MyHCIIx* rispetto ai topi Unload trattati con vehicle ($\wedge p=0,020$) (**Fig. 11b**). Tuttavia, questo aumento non ha ripristinato completamente i valori al livello dei topi controllo (-43%; *** $p=0,0008$) (**Fig. 11b**).

Come descritto in precedenza, la condizione di assenza di carico meccanico ha causato una diminuzione dell'espressione di *FNDC5* sia nel Vasto laterale che nel Gastrocnemio. Tuttavia, l'effetto dell'irisina sull'espressione di *FNDC5* sia nel Vasto laterale (**Fig. 11c**) che nel Gastrocnemio (dati non mostrati) non era statisticamente significativo.

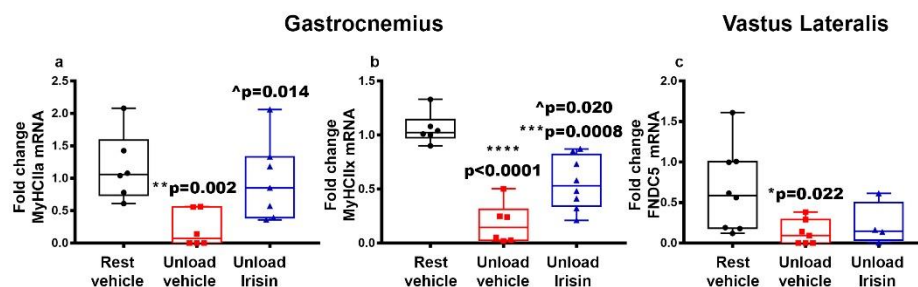


Fig. 11 L'effetto di irisina sul muscolo scheletrico di topi posti in condizione di assenza di carico meccanico. La PCR quantitativa (qPCR) mostra i livelli di espressione di *MyHCIIa* e *MyHCIIx* nel Gastrocnemio (a-b), e di *FNDC5* nel Vasto laterale (c) di topi controllo (Rest) e di topi sospesi per la coda (Unload) trattati con vehicle o irisina (100 µg/kg) una volta alla settimana per 4 settimane. I dati hanno mostrato una riduzione significativa dell'espressione di *MyHCIIa* e *MyHCIIx* nei topi in condizione di assenza di carico meccanico trattati con il vehicle rispetto ai topi controlli (Rest), mentre il trattamento con irisina ha riportato l'espressione di *MyHCIIa* ai valori di controllo (a). Sebbene non sia tornata ai livelli di controllo, il trattamento con irisina ha aumentato significativamente l'espressione della miosina *MyHCIIx* rispetto ai topi unloading trattati con veicolo (b). Nel Vasto laterale, il trattamento con irisina non è stato efficace nel prevenire il declino di *FNDC5* (c). Sono stati eseguiti i test di Shapiro-Wilk e di Mann-Whitney. I dati sono presentati come box-and-whisker con mediana e intervalli interquartili, dal max al min, con tutti i punti rappresentativi dei singoli campioni mostrati. *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001 vs Rest e ^p < 0.05, ^^p < 0.001 vs Unload vehicle.

2. Studio in vivo degli effetti di ipergravità sul muscolo scheletrico

Per esaminare gli effetti dell'ipergravità sul muscolo scheletrico, i topi sono stati sottoposti ad un'accelerazione gravitazionale pari a 3g per 4 settimane, utilizzando una centrifuga di grande diametro (LDC) dotata di un apposito sistema (MDS) contenente le singole gabbie degli animali. Abbiamo analizzato tre gruppi di topi: un gruppo Vivarium (V), i cui topi sono stati alloggiati individualmente nelle classiche gabbie di stabulazione (dimensioni standard della gabbia, 20-22°C temperatura della stanza, previsti lettiera e arricchimento all'interno delle gabbie); un secondo gruppo di topi (TC) è stato mantenuto in condizioni di gravità terrestre ma i topi sono stati alloggiati individualmente in gabbie uguali per dimensione, struttura e materiale alle gabbie dei topi caricati sulla centrifuga di grande diametro (con temperatura pari a 25°C, senza lettiera e arricchimento per riprodurre l'ambiente MDS); un terzo gruppo (3G) è stato sottoposto ad accelerazione di gravità 3g attraverso l'utilizzo dell'LDC. In particolare, i topi sono stati alloggiati individualmente nel modulo MDS sistema dotato di singole gabbie, poste ad una temperatura di 25°C, senza lettiera e arricchimento. L'assenza di lettiera e arricchimenti era necessaria per garantire la pulizia delle gabbie nel sottosistema MDS durante l'esperimento.

Per l'analisi dei risultati, abbiamo confrontato principalmente i topi del gruppo 3G con quelli del gruppo TC, entrambi alloggiati nel sistema MDS. Tuttavia, abbiamo anche effettuato un confronto dei risultati con il gruppo V, che rappresenta il modello di controllo in condizioni standard di stabulazione.

2.1 La condizione di ipergravità aumenta l'espressione di FNDC5, delle miosine e dei fattori che regolano il processo di proliferazione e miogenesi nel Vasto laterale

L'analisi dell'espressione genica mediante Real time PCR mostra che nel Vasto laterale, l'espressione dell'mRNA di *FNDC5*, il precursore dell'irisina, era 5 volte superiore nei topi 3G rispetto ai topi TC ($p=0,0098$) e V ($p=0,0024$) (**Fig.**

12a). La condizione di ipergravità ha anche aumentato l'espressione di *MyHC I* rispetto ai topi TC ($p=0,012$) e V ($p=0,0009$) (**Fig. 12b**), così come l'espressione di *MyHC IIx*, che è risultata significativamente più alta nei topi 3G rispetto ai topi TC ($p=0,0411$) e V ($p=0,0009$) (**Fig. 12c**).

Inoltre, abbiamo osservato che l'espressione di *Pax7*, il fattore di trascrizione che regola la proliferazione delle cellule staminali del muscolo, era significativamente ridotta nei topi TC rispetto al gruppo vivarium ($p=0,0113$), mentre nei topi 3G l'espressione di *Pax7* era più elevata rispetto ai topi TC ($p=0,0468$) (**Fig. 1d**).

Parallelamente, abbiamo riscontrato che l'espressione del fattore di trascrizione *MYF5*, uno dei marker delle fasi precoci della miogenesi, era significativamente più alta nei topi 3G rispetto ai topi V ($p=0,046$) e TC ($p=0,0006$) (**Fig. 12e**). È importante notare che, sebbene il dato non fosse significativo, è stata osservata una tendenza alla riduzione di *MYF5* nel gruppo TC rispetto ai topi controllo (vivarium). Pertanto questo dato, insieme alla down-regolazione di *Pax7*, suggerisce che le condizioni dei topi TC, probabilmente dovute alla permanenza in gabbie di dimensioni ridotte collocate nel sistema MDS, hanno avuto un impatto negativo sia sulla proliferazione che sulla differenziazione cellulare (o miogenesi) delle fibre muscolari del Vasto laterale, mentre questo effetto inibitorio risultava completamente assente nella condizione di ipergravità.

Infine, abbiamo riscontrato un'up-regolazione del fattore di trascrizione *Mrf4*, coinvolto nelle fasi tardive della miogenesi, sia nei topi TC ($p=0,0125$) che in quelli 3G ($p=0,0044$) rispetto ai topi vivarium, indicando che l'up-regolazione di questo fattore di trascrizione è indipendente dalla condizione di ipergravità.

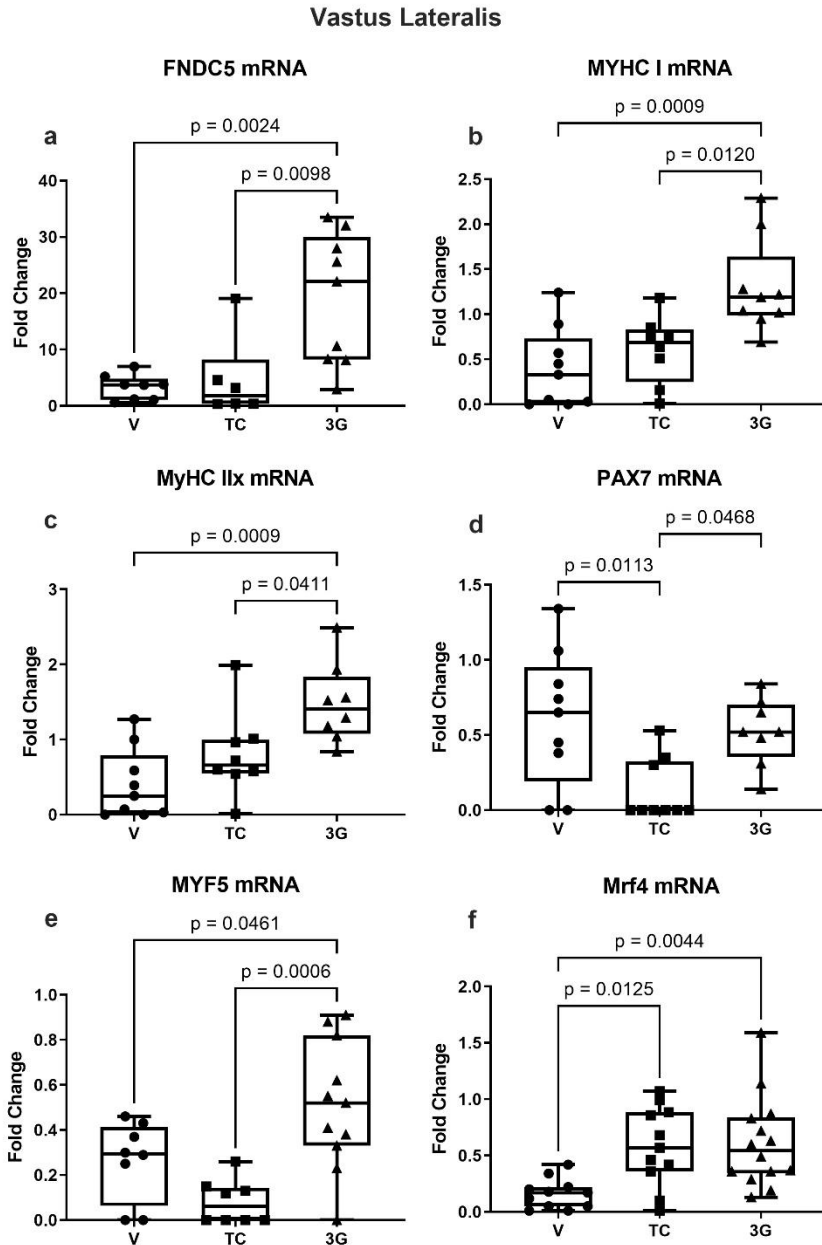


Fig. 12 L'effetto dell'ipergravità sull'espressione di *FNDC5*, delle miosine e dei biomarcatori della miogenesi nel Vasto laterale. La PCR quantitativa (qPCR) mostra i livelli di espressione di *FNDC5*, delle isoforme delle miosine *MyHCI* e *MyHC IIx*, e geni marker della miogenesi quali *Pax7*, *MYF5* e *Mrf4* nel Vasto laterale di topi sottoposti ad una condizione di ipergravità (3G) confrontati con topi controllo alloggiati nel sistema MDS (TC) e topi controllo in condizioni standard (V). I risultati hanno mostrato un aumento significativo dell'espressione di *FNDC5*, *MyHCI* e *MyHC IIx* nei topi 3G rispetto ai topi TC e V (a-c), e una riduzione di espressione dei markers delle fasi precoci della miogenesi nei topi TC rispetto al gruppo controllo V, i cui livelli sono ripristinati

dalla condizione 3G (**d,e**). L'espressione del marker delle fasi tardive della miogenesi *Mrf4* risulta up-regolata sia nei topi TC che in quelli 3G rispetto ai controlli V in cui si mantiene a livelli basali (**f**). Sono stati eseguiti i test di Shapiro-Wilk seguito dal test ANOVA ad una via con comparazione multipla di Tukey. I dati sono presentati come box-and-whisker con mediana e intervalli interquartili, dal max al min, con tutti i punti rappresentativi dei campioni mostrati.

Per determinare se l'aumento dell'espressione delle miosine in condizioni di 3G possa essere attribuito alla maggiore espressione di *FNDC5*, che probabilmente indica una maggiore produzione di irisina da parte del muscolo, abbiamo eseguito un'analisi di regressione lineare che ha evidenziato delle correlazioni positive tra l'espressione di *FNDC5* e *MyHC I* ($r=0,5913$; $p=0,007$) (**Fig. 13a**) e tra *FNDC5* e *MyHC IIx* ($r=0,4492$; $p=0,05$) (**Fig. 13b**).

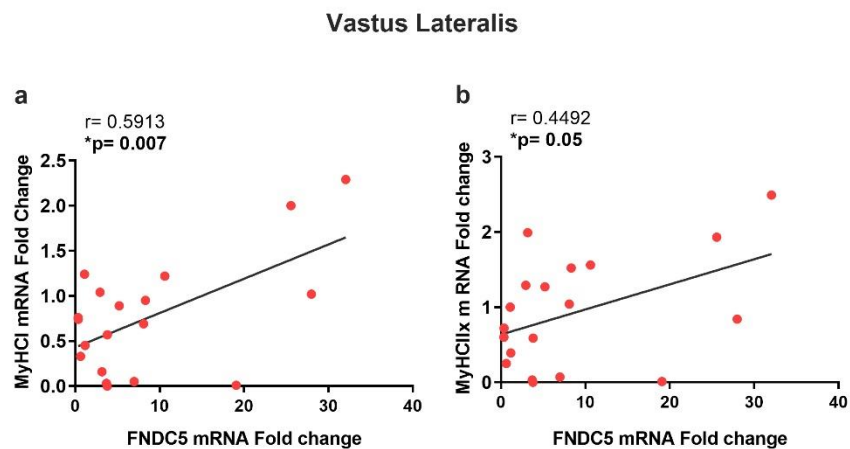
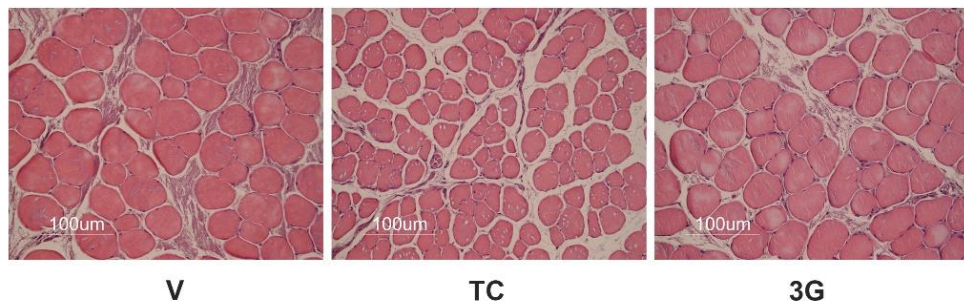


Fig.13 Correlazioni dei livelli di espressione genica tra *FNDC5* e le isoforme *MyHC I* e *MyHC IIx* della miosina. I risultati dell'analisi mostrano una correlazione positiva tra i livelli di espressione dell'mRNA di *FNDC5* sia con i livelli di espressione dell'mRNA della miosina *MyHC I* (**a**) che con i livelli di espressione dell'mRNA dell'isoforma *MYHCIIx* della miosina (**b**). Sono stati eseguiti i test di Shapiro-Wilk seguito dall'analisi di regressione lineare di Pearson, valori r e p come indicato. $*p<0,05$.

2.2 L'ipergravità influisce sulla morfologia muscolare inibendo il fenotipo atrofico

La colorazione con ematossilina ed eosina (H&E) eseguita su sezioni trasversali del Vasto laterale ha mostrato una ridotta dimensione delle fibre muscolari dei topi TC rispetto ai topi di controllo (V). Questo fenotipo atrofico dei topi TC è risultato completamente prevenuto dalla condizione di ipergravità (**Fig. 14a**). L'osservazione morfologica è stata confermata dalla misurazione della CSA (cross-sectional area), che ha evidenziato un valore di CSA significativamente più basso nei topi TC rispetto ai controlli vivarium ($p=0,0443$), mentre il valore di CSA nei topi 3G era più alto rispetto ai topi TC ($p=0,0243$) e non significativamente diverso da quello dei topi V (**Fig. 14b**).

a



b Crosssectional Area Vastus Lateralis

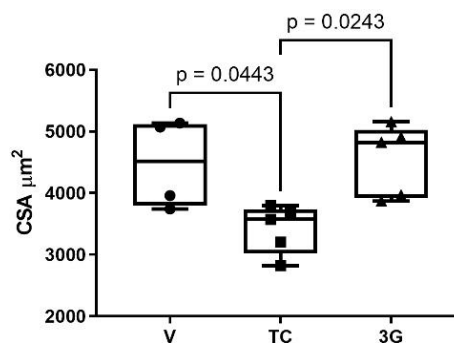


Fig. 14 L'effetto dell'ipergravità sulla morfologia muscolare del Vasto laterale. Colorazione di ematossilina-eosina (H&E) su sezioni trasversali del Vasto laterale di topi 3G confrontate con quelle dei topi TC e V. I risultati mostrano una riduzione significativa della CSA (Crosssectional Area) nei topi TC rispetto ai topi V ($p=0,0443$) e 3G ($p=0,0243$), condizione prevenuta totalmente nei topi 3G che mostrano infatti valori di CSA paragonabili ai topi controllo V. Sono stati eseguiti i test di Shapiro-Wilk seguito dal test ANOVA ad una via con comparazione multipla di Tukey. I dati sono presentati come box-and-whisker con mediana e intervalli interquartili, dal max al min, con tutti i punti rappresentativi dei campioni mostrati.

2.3 La condizione di ipergravità aumenta l'espressione di FNDC5 e delle miosine nel Gastrocnemio

Abbiamo anche analizzato l'espressione genica delle proteine muscolari nel Gastrocnemio. L'espressione dell'mRNA di *FNDC5* come osservato anche nel Vasto laterale, è risultata maggiore nei topi 3G rispetto ai topi vivarium ($p=0,0024$) anche nel Gastrocnemio (**Fig. 15a**). Inoltre la condizione di ipergravità ha anche aumentato l'espressione della miosina *MyHC I* rispetto ai topi controllo V ($p=0,0367$) (**Fig. 15b**), così come l'espressione di *MyHC IIx* che era più alta nei topi 3G rispetto ai topi V ($p=0,0032$), sebbene fosse anche più elevata nei topi TC ($p=0,003$) rispetto ai topi V ($p=0,0030$) (**Fig. 15c**).

Come per il Vasto laterale, anche per il Gastrocnemio abbiamo eseguito un'analisi di regressione lineare che ha dimostrato forti correlazioni positive tra l'espressione di *FNDC5* e *MyHC I* ($r=0,9102$; $p<0,0001$) (**Fig. 15d**) e tra *FNDC5* e *MyHC IIx* ($r=0,703$; $p=0,005$) (**Fig. 15e**).

Sono stati eseguiti i test di Shapiro-Wilk seguito dal test ANOVA ad una via con comparazione multipla di Tukey, e l'analisi di regressione lineare di Pearson, valori r e p come indicato. I dati sono presentati come box-and-whisker con mediana e intervalli interquartili, dal max al min, con tutti i punti rappresentativi dei campioni mostrati.

3. Studio in vivo degli effetti di irisina nel prevenire la fibrosi del muscolo cardiaco

3.1 Effetto del pretrattamento con irisina sul tempo di recupero dei topi dopo somministrazione acuta di isoproterenolo

Per verificare se il trattamento intermittente con irisina potesse prevenire l'ipertrofia cardiaca indotta dall'isoproterenolo, abbiamo pretrattato i topi con irisina 100 µg/kg/settimana [irisina-ISO] o con soluzione fisiologica [veh-ISO] per 4 settimane e poi abbiamo effettuato una singola iniezione intraperitoneale di ISO ad alta dose (160 mg/kg) (**Fig. 16A**). Per garantire il benessere degli animali, abbiamo monitorato il peso corporeo durante l'esperimento, che è risultato invariato tra i gruppi di animali (**Fig. 16B**).

L'effetto di ISO è stato evidente a partire da 5 minuti dopo l'iniezione, quando i topi si sono immobilizzati ed è aumentata la loro frequenza respiratoria. Abbiamo misurato il tempo di recupero dell'attività motoria (**Fig. 16C**) e la qualità del recupero utilizzando un punteggio di attività (buono, medio, scarso) relativo al movimento, al mangiare o al bere attraverso l'Open Field Test (OFT) (**Fig. 16D**). Non sono stati osservati cambiamenti significativi tra il gruppo di topi pretrattati con irisina per 4 settimane [irisina-ISO] e il gruppo pretrattato con soluzione salina [veh-ISO]. Tuttavia, i topi trattati con irisina hanno mostrato un recupero più rapido, anche se non significativo ($p=0,0857$) (**Fig. 16C**), suggerendo che il pretrattamento potrebbe aver migliorato la risposta agli effetti acuti dell'ISO. Inoltre, non abbiamo osservato differenze nel peso corporeo tra i due gruppi di topi dopo 24 ore dalla somministrazione di ISO (**Fig. 16E**).

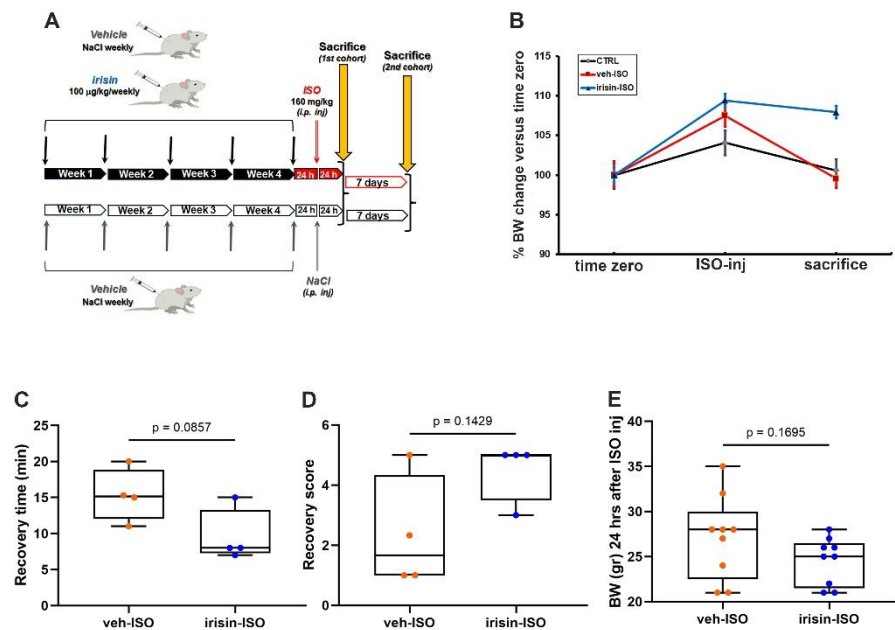


Fig. 16 Disegno sperimentale (A) e l'effetto dell'iniezione di ISO sul peso corporeo e sul comportamento animale. Variazioni percentuali del peso corporeo rispetto al tempo zero, valutate al momento dell'iniezione di ISO e del sacrificio, nei topi controllo [CTRL] e nei topi trattati con vehicle [veh-ISO] o irisina [irisin-ISO] per 4 settimane prima dell'iniezione di ISO (B). Misurazione del tempo di recupero dell'attività motoria (C) e della qualità del recupero motorio mediante l'Open Field Test (OFT) dopo l'iniezione di ISO in topi veh-ISO (n=4) e irisina-ISO (n=4) (D). Misura del peso corporeo 24 ore dopo l'iniezione di ISO in topi veh-ISO (n=9) e irisin-ISO (n=9) (E). Sono stati eseguiti il test di Shapiro-Wilk seguito dal test di Mann-Whitney (C-D) e unpaired Student's t-test (E). I dati sono presentati come box-and-whisker con mediana e intervalli interquartili, dal massimo al minimo, con tutti i punti rappresentativi dei campioni mostrati. *p* value come indicato.

3.2 Il pretrattamento con irisina previene la disregolazione delle molecole coinvolte nell'insufficienza cardiaca indotta da isoproterenolo

Ventiquattro ore dopo il trattamento con ISO, nei topi pretrattati con irisina non è stato osservato un aumento della troponina I sierica (cTnI), un biomarcatore della necrosi dei cardiomiociti, a differenza di quanto invece si osserva nei topi sottoposti a iniezione di ISO ma senza pretrattamento con irisina [veh-ISO] ($p=0,0117$) (**Fig. 17A**).

L'analisi dell'espressione genica sul tessuto cardiaco ha mostrato che i livelli di mRNA del Peptide Natriuretico Atriale (*ANP*), un marcatore molecolare dell'ipertrofia miocardica, erano 10 volte superiori nel gruppo veh-ISO rispetto al gruppo di controllo ($p=0,0197$), mentre nei topi pretrattati con irisina [irisina-ISO] la sua espressione era paragonabile ai controlli (**Fig. 17B**). Inoltre, l'espressione dell'Actina α del muscolo liscio (α SMA) era 15 volte superiore nei topi veh-ISO rispetto ai controlli ($p=0,0261$), al contrario non si osservava alcun aumento della sua espressione nei topi pretrattati con irisina (**Fig. 17C**). Infine, sebbene l'espressione dell'interleuchina antinfiammatoria 33 (*IL33*) non risultasse modulata, è stata osservata una tendenza all'aumento, molto vicina alla significatività, nei topi trattati con ISO rispetto ai controlli veh-ISO ($p=0,0605$) (**Fig. 17D**).

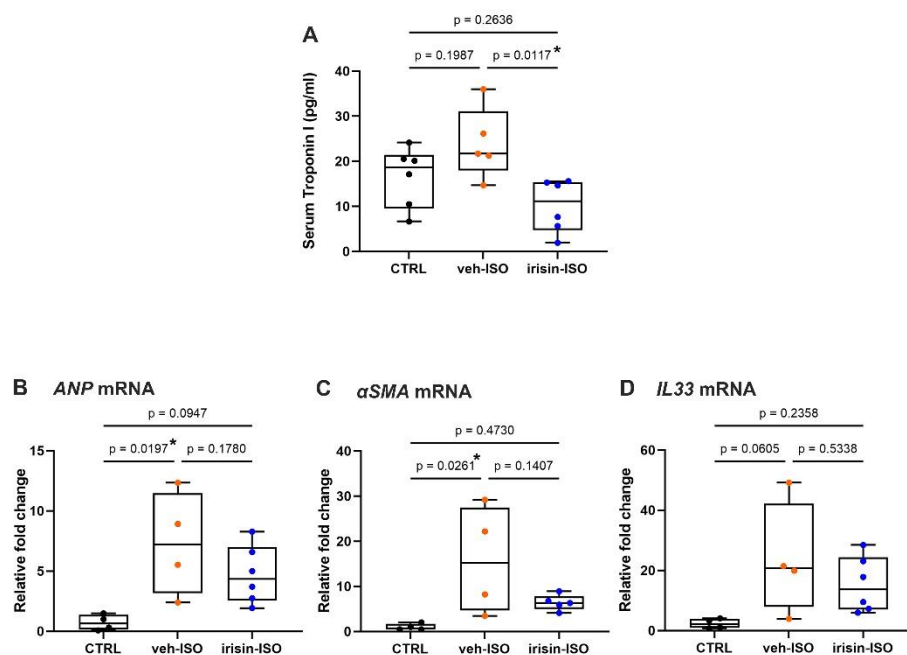


Fig. 17 L'effetto dopo 24 ore dall'iniezione di ISO e del pretrattamento con irisina sull'espressione dei markers cardiaci. Concentrazione della troponina sierica I (cTnI) determinata mediante saggio ELISA in topi CTRL (n=6), veh-ISO (n=5) e irisina-ISO (n=6) 24 ore dopo l'iniezione di ISO (**A**). Quantificazione dell'espressione genica di *ANP*, *α SMA* e *IL33* nel tessuto cardiaco di topi CTRL (n=4), veh-ISO (n=4) e irisin-ISO (n=6) 24 ore dopo l'iniezione di ISO (**B-C-D**). È stato eseguito il test di Shapiro-Wilk seguito dal test Anova a una via con test di confronto multiplo di Tukey. I dati sono presentati come box-and-whisker con mediana e intervalli interquartili, dal massimo al minimo, con tutti i punti rappresentativi dei campioni mostrati. * $p < 0.05$

3.3 Il pretrattamento con irisina previene l'ipertrofia e la fibrosi cardiaca indotte da somministrazione acuta di isoproterenolo

Per studiare se l'irisina fosse in grado di prevenire la fibrosi cardiaca indotta dall'ISO, abbiamo eseguito una colorazione con tricromia di Masson e abbiamo riscontrato un aumento della deposizione di collagene nei topi veh-ISO. Questo effetto non è stato osservato invece nel gruppo irisina-ISO, il cui tessuto cardiaco è risultato preservato in una condizione paragonabile al gruppo di controllo (**Fig. 18A**). La fibrosi cardiaca è stata quantificata mediante un punteggio basato sul grado di severità: 0 (nessuna), 1 (lieve), 2 (moderata) e 3 (grave). I punteggi ottenuti hanno mostrato che la fibrosi era significativamente maggiore nei topi trattati con ISO rispetto ai topi di controllo [CTRL] ($p=0,0131$) ed era al contrario completamente prevenuta nei topi irisina-ISO rispetto ai topi veh-ISO ($p=0,0261$) (**Fig. 18B**). Inoltre, per quantificare l'ipertrofia cardiaca abbiamo misurato il rapporto peso del cuore/lunghezza della tibia e abbiamo riscontrato che l'iniezione di ISO ha indotto un aumento del 30% nei topi veh-ISO rispetto ai topi CTRL ($p=0,0312$), effetto non riscontrato nei topi pretrattati con irisina [irisin-ISO] (**Fig. 18C**). Inoltre, abbiamo osservato che la somministrazione con ISO non ha generato un aumento nel rapporto peso della milza/lunghezza della tibia (**Fig. 18D**), suggerendo quindi l'assenza di un'inflammatione sistemica nei topi.

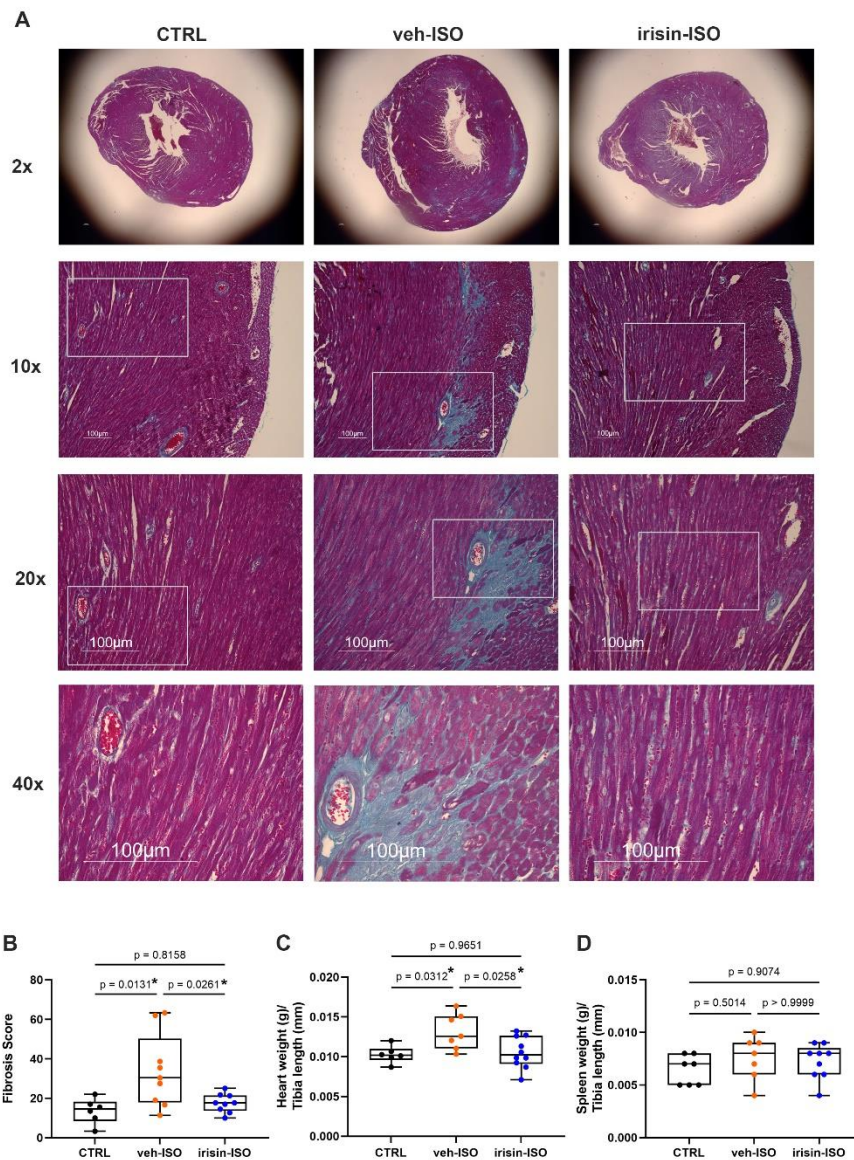


Fig. 18 L'effetto di ISO e del pretrattamento con irisina sul tessuto cardiaco, ipertrofia cardiaca e infiammazione sistemica. Analisi istologica mediante Tricromia di Masson su sezioni di tessuto cardiaco di topi CTRL, veh-ISO e irisina-ISO 7 giorni dopo l'iniezione di ISO, a diversi ingrandimenti come indicato in figura. I riquadri bianchi a 10x e 20x indicano le aree specifiche ingrandite a 20x e 40x, rispettivamente (**A**). Valutazione quantitativa della fibrosi cardiaca, mediante attribuzione di score, in topi CTRL (n=6), veh-ISO (n=9) e irisina-ISO (n=9) (**B**). Valutazione quantitativa del rapporto peso del

cuore/lunghezza della tibia in topi CTRL (n=6), veh-ISO (n=7) e irisina-ISO (n=10) (C). Valutazione quantitativa del rapporto peso della milza/lunghezza della tibia in topi CTRL (n=7), veh-ISO (n=7) e irisina-ISO (n=9) (D). È stato eseguito il test di Shapiro-Wilk seguito da Anova a una via con test di confronto multiplo di Tukey (B-C). È stato eseguito il test di Shapiro-Wilk seguito da Kruskal-Wallis con test di confronto multiplo di Dunn (D). I dati sono presentati come box-and-whisker con mediana e intervalli interquartili, dal massimo al minimo, con tutti i punti rappresentativi dei campioni indicati. * $p < 0.05$.

È interessante notare come 7 giorni dopo la somministrazione di ISO, mentre l'espressione di ANP ritornava ai livelli di controllo nel gruppo veh-ISO (Fig. 19A), l'espressione di α SMA risultava ancora elevata, anche se non in modo significativo, ma mantenuta ancora a livelli di controllo dal pretrattamento con irisina ($p = 0,0145$) (Fig. 19B).

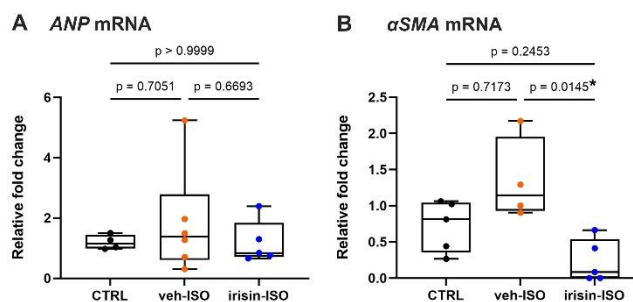


Fig. 19 L'effetto dopo 7 giorni dall'iniezione di ISO e del pretrattamento con irisina sull'espressione dei markers cardiaci. Quantificazione dell'espressione genica di ANP nel tessuto cardiaco dei topi CTRL (n=4), veh-ISO (n=6) e irisin-ISO (n=5) 7 giorni dopo l'iniezione di ISO (A). Quantificazione dell'espressione genica di α SMA nel tessuto cardiaco di topi CTRL (n=5), veh-ISO (n=4) e irisin-ISO (n=6) 7 giorni dopo l'iniezione di ISO (B). Sono stati eseguiti il test di Shapiro-Wilk seguito da Anova a una via, con test di confronto multiplo di Tukey (A) e Kruskal-Wallis con test di confronto multiplo di Dunn (B). I dati sono presentati come box-and-whisker con mediana e intervalli interquartili, dal massimo al minimo, con tutti i punti rappresentativi dei campioni indicati. * $p < 0.05$.

3.4 Il pretrattamento con irisina previene la disregolazione mitocondriale causata dall'ipertrofia cardiaca

Dopo un danno cardiaco la bioenergetica mitocondriale deve adattarsi al fenotipo ipertrofico; pertanto, è stato osservato che l'attività mitocondriale può aumentare all'inizio dell'ipertrofia cardiaca [68]. Nel presente studio abbiamo valutato quindi se i geni marker dei mitocondri fossero influenzati dal trattamento con ISO. I risultati hanno mostrato che alcuni geni mitocondriali, che studi precedenti hanno dimostrato essere influenzati da irisina nelle cellule e nei tessuti del muscolo scheletrico [42,69,70], sono risultati nettamente aumentati dopo 24 ore dall'iniezione di ISO nel tessuto cardiaco del gruppo veh-ISO rispetto al CTRL (**Fig. 20A-C**); in particolare la *Sirtuina 1* (*Sirt1*) ($p \leq 0,00104$), il coattivatore 1 α del recettore-gamma del proliferatore del perossisoma (*PGC1 α*) ($p \leq 0,05218$) e il fattore di trascrizione mitocondriale A (*Tfam*) ($p \leq 0,01064$). Tuttavia, nei topi pretrattati con irisina la loro espressione è rimasta simile ai livelli di controllo, suggerendo che l'irisina ha protetto completamente le cellule da una richiesta maggiore di energia che generalmente si verifica in seguito all'ipertrofia cardiaca. È interessante notare che l'up-regolazione dei geni mitocondriali nella fase iniziale dell'ipertrofia cardiaca è stata completamente annullata dopo 7 giorni, ovvero quando la malattia è progredita verso la formazione della cicatrice fibrotica. Infatti, l'espressione di *Sirt1* ($p \leq 0,0001$), *PGC1 α* ($p \leq 0,05212$) e *Tfam* ($p \leq 0,00109$) risultava significativamente ridotta nei topi veh-ISO dopo 7 giorni rispetto al gruppo veh-ISO dopo 24 ore (**Fig. 20A-C**). Si osserva come dopo 7 giorni dalla somministrazione di ISO, l'espressione di *PGC1 α* nei topi irisin-ISO avesse una tendenza all'aumento rispetto al gruppo veh-ISO (**Fig. 20B**), suggerendo una potenziale stimolazione dell'irisina sulla mitocondriogenesi indipendentemente dall'ipertrofia cardiaca.

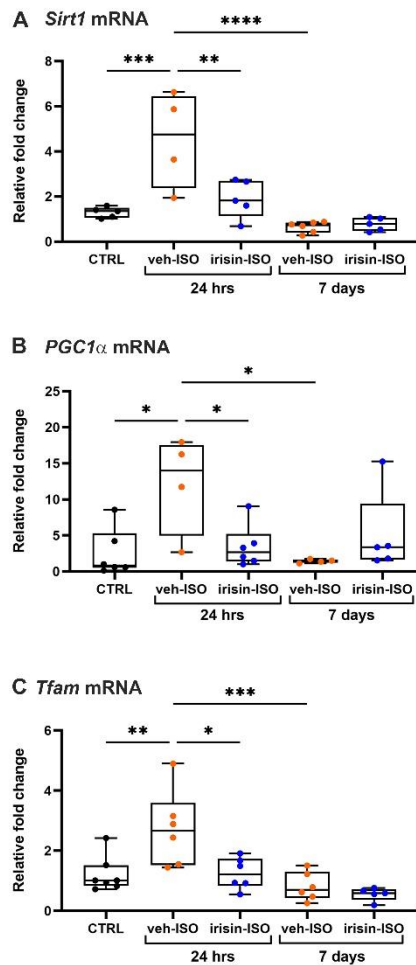


Fig. 20 L'effetto nel tempo dell'iniezione di ISO e del pretrattamento con irisina sui geni marker della biogenesi mitocondriale. Quantificazione dell'espressione di *Sirt1*, a diversi punti temporali, nel tessuto cardiaco di topi veh-ISO (n=4) e irisin-ISO (n=5) 24 ore dopo l'ISO e di topi veh-ISO (n=6) e irisin-ISO (n=5) 7 giorni dopo l'ISO, rispetto a CTRL (n=5) (A). Quantificazione dell'espressione di *PGC1α*, a diversi punti temporali, nel tessuto cardiaco di topi veh-ISO (n=4) e irisin-ISO (n=6) 24 ore dopo l'ISO e di topi veh-ISO (n=4) e irisin-ISO (n=5) 7 giorni dopo l'ISO, rispetto a CTRL (n=6) (B). Quantificazione dell'espressione di *Tfam*, a diversi punti temporali, nel tessuto cardiaco di topi veh-ISO (n=6) e irisin-ISO (n=6) 24 ore dopo l'ISO e in topi veh-ISO (n=6) e irisin-ISO (n=5) 7 giorni dopo l'ISO, rispetto a CTRL (n=7) (C). È stato eseguito il test di Shapiro-Wilk seguito dall' Anova a una via con test di

confronto multiplo di Tukey. I dati sono presentati come box-and-whisker con mediana e intervalli interquartili, dal massimo al minimo, con tutti i punti rappresentativi dei campioni mostrati. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

DISCUSSIONE

1. Studio in vivo degli effetti di microgravita' simulata sul muscolo scheletrico

Nel presente studio, analizzando l'effetto tempo-dipendente dell'assenza di carico meccanico sul sistema muscolare, dimostriamo che nei topi Unload i livelli di irisina sono fondamentali per prevenire l'atrofia muscolare indotta dal disuso. Il deperimento del muscolo scheletrico è ben documentato in diversi modelli animali di atrofia da disuso, ed è accertato che il declino della massa muscolare si verifica nelle prime due settimane di unloading, sebbene il livello di perdita di massa dipenda dal tipo di muscolo e dal grado di assenza di carico meccanico [71]. In linea con questo, il nostro gruppo di ricerca ha precedentemente dimostrato una perdita di massa muscolare e una riduzione dell'area della sezione trasversale delle fibre nel Vasto laterale dei topi Unload dopo 4 settimane di assenza di carico meccanico [42]. Poiché l'atrofia e lo squilibrio della sintesi proteica contribuiscono alla perdita di massa muscolare, in questo studio abbiamo analizzato l'effetto temporale dell'unloading sull'espressione genica dei marcatori di atrofia e delle miosine nel Vasto laterale e nel Gastrocnemio di topi Unload a partire da 1 fino a 4 settimane di unloading. Le fibre muscolari del Vasto laterale e del Gastrocnemio di questi topi diventano rapidamente atrofiche, in quanto, a partire dalla prima settimana di assenza di carico meccanico, abbiamo osservato l'up-regolazione dell'espressione genica di *Atrogin-1* e *Murf1* e la down-regolazione della catena pesante delle miosine di tipo intermedio (*MyHCII α*) e veloce (*MyHCII λ*). In particolare, nel Vasto laterale, abbiamo riscontrato un aumento dell'espressione di *Atrogin-1*, nella prima e nella seconda settimana di unloading, mentre l'espressione di *Murf-1* è aumentata dopo la terza settimana, indicando così una risposta più tardiva di questo gene all'assenza

del carico meccanico. Anche il Gastrocnemio è stato influenzato dall'assenza di carico meccanico come dimostrato dalla up-regolazione di *Atrogin-1* e *Murf-1* dopo la seconda settimana. L'attivazione del sistema ubiquitina-proteasoma, implicata nella proteolisi, nonché nella degradazione delle proteine miofibrillari in condizioni di disuso, richiede una up-regolazione di questi markers dell'atrofia muscolare [72]. In diversi studi, eseguiti sul muscolo Soleo di topi Unload, un muscolo antigravitario che risente in modo preferenziale dell'assenza di carico meccanico, è stato osservato un aumento precoce (dopo solo 3 giorni di unloading) e transitorio dell'mRNA di *Atrogin-1* e *Murf-1*, che tornava ai livelli basali dopo 1 settimana di assenza di carico meccanico [71,73,74]. Nel presente studio pertanto dimostriamo che, sebbene più tardivamente ma in modo più persistente nel tempo rispetto al Soleo, l'up-regolazione dei geni marker dell'atrofia si verifica anche nel Vasto laterale e nel Gastrocnemio, fornendo nuove indicazioni per la ricerca traslazionale sul modello murino Unload.

Uno degli eventi chiave che si verifica subito dopo l'attivazione del pathway ubiquitina-proteasoma è il cambiamento del fenotipo della miosina. Studi condotti su astronauti dopo 6 mesi a bordo della Stazione Spaziale Internazionale hanno dimostrato una transizione del tipo di fibra da lenta a veloce nei muscoli Gastrocnemio e Soleo [75]. Una riduzione dell'espressione dell'mRNA di *MyHC I* è stata osservata nel Soleo di ratto già 1 giorno dopo l'unloading [76,77]. Lomosova et al. hanno riscontrato che l'espressione dell'mRNA di *MyHC II α* nel Soleo di ratto è diminuita al terzo giorno di unloading, tornando ai livelli di controllo al settimo giorno, parallelamente a un aumento dell'espressione di *MyHC II α* e *MyHC II β* dal terzo al quattordicesimo giorno di unloading [78].

A differenza di quanto ampiamente dimostrato nel muscolo Soleo, nel Vasto laterale e nel Gastrocnemio non abbiamo osservato alcun cambiamento tempo-dipendente delle catene pesanti della miosina lenta durante l'unloading, mentre le miosine intermedie e veloci sono state modulate. Fondamentalmente, il muscolo Soleo ha una proporzione maggiore di fibre lente (70%) rispetto al Gastrocnemio e al Vasto Laterale, che contengono una percentuale di fibre lente pari a circa il 50% e il 32%, rispettivamente, e

pertanto questi ultimi muscoli sono più inclini alla modulazione delle miosine caratteristiche delle fibre muscolari di tipo intermedio e rapido [79]. In particolare, abbiamo riscontrato che la *MyHCII α* (intermedia) è diminuita solo nel Gastrocnemio nelle ultime due settimane di assenza di carico meccanico, mentre la *MyHCIIx* veloce è stata modulata in entrambi i muscoli analizzati. In particolare, nel Vasto laterale l'espressione di *MyHCIIx* ha avuto una modulazione “up and down” a partire dalla prima settimana di unloading, con una diminuzione dell'espressione genica della miosina alla prima e terza settimana, mentre è tornata al livello basale alla seconda e quarta settimana. Nel Gastrocnemio, l'effetto dell'assenza di carico meccanico ha mostrato una regolazione differente: la *MyHCIIx* è diminuita alla prima e alla quarta settimana, mentre è tornata al livello basale durante la seconda e la terza settimana. Pertanto, i nostri dati dimostrano che, durante l'unloading, il fenotipo della miosina è molto dinamico e dipende dal tipo di muscolo e dalla durata dell'assenza di carico a cui è sottoposto, rispondendo con fasi alterne di modulazione dell'espressione della miosina e fasi di riarrangiamento della miosina dopo l'atrofia iniziale. Per quanto riguarda il possibile ruolo dei geni dell'atrofia nella modulazione delle miosine durante le 4 settimane, abbiamo ipotizzato che il picco più alto di *Atrogin-1* nel Vasto laterale e di *Murf-1* nel Gastrocnemio possa essere responsabile della down-regolazione di *MyHCII α* e *MyHCIIx* durante l'assenza di carico meccanico.

In risposta alla contrazione muscolare, il muscolo scheletrico secreta numerose molecole solubili conosciute come miochine [3,4]. Inoltre, anche se non è ancora stato ampiamente dimostrato, è stato ipotizzato che una ridotta funzione muscolare possa influire negativamente sul rilascio di tali molecole [80]. Pertanto, considerando i nostri precedenti risultati che dimostrano l'effetto anabolico di irisina sul muscolo scheletrico [42], abbiamo studiato l'effetto dell'assenza di carico meccanico nel tempo sul precursore dell'irisina *FNDC5*, per indagare se l'effetto catabolico generato dall'unloading potesse influenzare la sua espressione. Nel Vasto laterale abbiamo osservato una riduzione significativa alla quarta settimana di unloading, mentre nel Gastrocnemio la riduzione di *FNDC5* è avvenuta alla terza settimana, dimostrando che l'effetto del tempo di unloading su questo gene è diverso nei due muscoli studiati. A

causa di queste alterazioni del precursore dell'irisina FNDC5, i livelli sierici di irisina sono diminuiti significativamente dopo 4 settimane di assenza di carico meccanico. Una possibile spiegazione per l'effetto tardivo della riduzione di FNDC5/irisina a 4 settimane nei topi Unload, a differenza del picco di Atrogin-1 che si verifica già a 1 settimana di unloading, potrebbe essere che il declino delle miochine non dipenda dall'atrofia in sé, ma da una riduzione della contrazione muscolare che colpisce i topi in una fase avanzata del periodo di unloading, così come si evince anche dalla riduzione dell'espressione delle proteine contrattili. Inoltre, poichè non abbiamo misurato i livelli sierici di cortisolo, il che potrebbe rappresentare una limitazione del nostro studio, non possiamo escludere che lo stress causato dalla sospensione per la coda e quindi dall'assenza di carico meccanico sugli arti posteriori, possa aver indotto l'espressione di glucocorticoidi [81], che a loro volta hanno diminuito l'espressione di FNDC5 nel muscolo [82].

Per verificare se gli effetti dell'assenza di carico meccanico sul muscolo fossero legati alla riduzione dei livelli circolanti di irisina, abbiamo trattato topi Unload con irisina esogena per quattro settimane. I nostri dati hanno mostrato che l'irisina ha indotto nel Gastrocnemio un recupero totale dell'espressione di *MyHCII α* , che invece risulta parziale per *MyHCII χ* . Questo risultato conferma quanto precedentemente osservato dal nostro gruppo nel Vasto laterale, dove l'irisina ha inibito la diminuzione dell'espressione di *MyHCII χ* causata dall'assenza di carico meccanico [42] e supporta l'effetto anti-atrofico dell'irisina nel muscolo scheletrico.

2. Studio in vivo degli effetti di ipergravità' sul muscolo scheletrico

L'analisi del muscolo scheletrico in condizioni microgravità è stato oggetto di numerosi studi, soprattutto su modelli murini di microgravità simulata. Al contrario, sono stati condotti pochi studi sul tessuto muscolare scheletrico in condizioni di ipergravità. Il gruppo di ricerca di cui faccio parte ha avuto l'opportunità di partecipare ad un esperimento singolare nel suo genere utilizzando il sistema di centrifuga a grande diametro dell'ESA (Agenzia

Spaziale Europea) per analizzare i cambiamenti indotti dall'ipergravità in questo tipo di tessuto. I nostri dati hanno dimostrato che l'ipergravità 3G per 4 settimane induce un aumento dell'espressione dell'mRNA del precursore dell'irisina, *FNDC5*, e delle isoforme della miosina, ovvero *MyHC I* e *MyHC IIx*, insieme a una up-regolazione di *Pax7* e *MYF5*, suggerendo che l'ipergravità stimola la differenziazione e l'attività delle fibre muscolari scheletriche.

Questi risultati sono in linea con i pochi studi effettuati in condizioni di ipergravità a $G > 1$ che hanno mostrato un effetto ipertrofico sul muscolo scheletrico. Tra questi studi, vanno menzionati quelli che hanno utilizzato dispositivi di centrifugazione, tra cui la centrifuga da tavolo di 1 metro di diametro collegata a un incubatore per colture di tessuti [83], il sistema di centrifugazione di grande diametro dell'ESA [84] utilizzato nel presente studio, nonché un dispositivo di centrifugazione a gondola con un braccio di 1,5 metri [85] e un dispositivo di centrifugazione a gondola con un braccio di 1,0 a cui sono collegate le gabbie per topi [83].

Nello studio di Ciofani et al. condotto *in vitro*, l'ipergravità di 5-20G ha stimolato la proliferazione e la differenziazione delle C2C12, una linea cellulare mioblastica, in modo dipendente dalla gravità [84]. In uno degli studi più recenti, condotto *in vivo* su topi, è stato dimostrato che l'ipergravità di 2G per 2 settimane induce l'ipertrofia muscolare attraverso l'up-regolazione dei geni markers della miogenesi e la down-regolazione delle ubiquitine ligasi muscolo-specifiche e dei geni marker di autofagia. La condizione di 2G ha anche influito positivamente sulla massa ossea di omero, femore e tibia aumentando l'espressione di geni osteogenici [86]. Oltre al tessuto muscolare-scheletrico, è stato riportato che l'ipergravità influisce anche sul rene aumentando il livello di ossido nitrico sintasi (iNOS), che attenua il danno da ipossia/riossigenazione nella corteccia renale [87].

L'uso di centrifughe capaci di generare un habitat con gravità maggiore rispetto alla gravità terrestre deriva principalmente dalla necessità di creare una possibile contromisura alla microgravità subita dagli astronauti durante le missioni spaziali. A tal fine, nell'ambito degli esperimenti di microgravità sulla Stazione Spaziale Internazionale (ISS), sono stati condotti studi su topi posti

in gabbie collocate su una centrifuga artificiale a 1G nello spazio [88]. Durante la missione sulla ISS, un gruppo di topi è stato alloggiato in condizioni di microgravità e un altro gruppo in condizioni di gravità artificiale di 1G. L'esperimento ha avuto successo poiché i topi in microgravità galleggiavano all'interno delle gabbie, mentre quelli in gravità artificiale 1G erano in grado di camminare sul pavimento della gabbia. Dopo 35 giorni di missione spaziale, i topi in microgravità hanno mostrato una diminuzione significativa della densità ossea del femore e del peso dei muscoli soleo e gastrocnemio, mentre i topi in condizione 1G hanno mantenuto la stessa densità ossea e lo stesso peso muscolare dei topi dell'esperimento di controllo a terra, in cui sono state replicate le condizioni di stabulazione dell'esperimento di volo [88].

A questo proposito, è importante sottolineare l'importanza di utilizzare gabbie che riproducano esattamente le condizioni di stabulazione sia per i topi di controllo sia per quelli tenuti in ipergravità. Nel nostro studio, il gruppo di controllo primario (TC) consisteva in topi alloggiati individualmente in gabbie della stessa dimensione e struttura dei topi collocati sulla centrifuga, ma in condizioni di gravità terrestre. Le gabbie del TC erano anche prive di lettiera e arricchimenti per replicare l'ambiente identico a quello delle gabbie poste sulla centrifuga.

I nostri risultati hanno mostrato una tendenza alla down-regolazione dell'espressione genica di *MYF5* e una riduzione significativa di *Pax7* nel gruppo TC rispetto ai topi alloggiati nelle classiche gabbie di stabulazione (Vivarium). Questo dato, insieme al fenotipo atrofico osservato nelle sezioni istologiche del Vasto Laterale dei topi TC, potrebbe suggerire che l'alloggiamento nella gabbia MDS abbia avuto un impatto negativo sul muscolo scheletrico. Un limite del nostro studio è non aver valutato l'espressione di markers di atrofia che avrebbero potuto corroborare questa ipotesi.

Nel complesso, quindi, i nostri dati dimostrano che la permanenza a 3G per 4 settimane non ha avuto un effetto ipertrofico sul muscolo scheletrico, ma piuttosto ha impedito completamente l'insorgenza dell'atrofia muscolare che può verificarsi in condizioni restrittive di alloggio che limitano anche la mobilità, come quelle a cui sono sottoposti gli astronauti nella ISS.

3. Studio in vivo degli effetti di irisina nel prevenire la fibrosi del muscolo cardiaco

Nel presente studio abbiamo dimostrato che il trattamento con irisina previene l'ipertrofia e la fibrosi cardiaca indotte dalla stimolazione acuta con ISO. Attraverso l'analisi istologica abbiamo dimostrato la presenza di fibrosi cardiaca nei cuori dei topi trattati con vehicle prima della somministrazione di ISO, che invece risulta essere assente nei topi trattati con irisina. (Fig. 21). l'effetto di irisina nell'inibire la fibrosi del tessuto cardiaco è evidenziato anche dalla sua capacità di mantenere l'espressione di *αSMA* a livelli di controllo dopo l'iniezione di ISO, sia nelle fasi precoci che in quelle tardive, e di preservare l'espressione genica dei marker mitocondriali dopo il danno cardiaco.

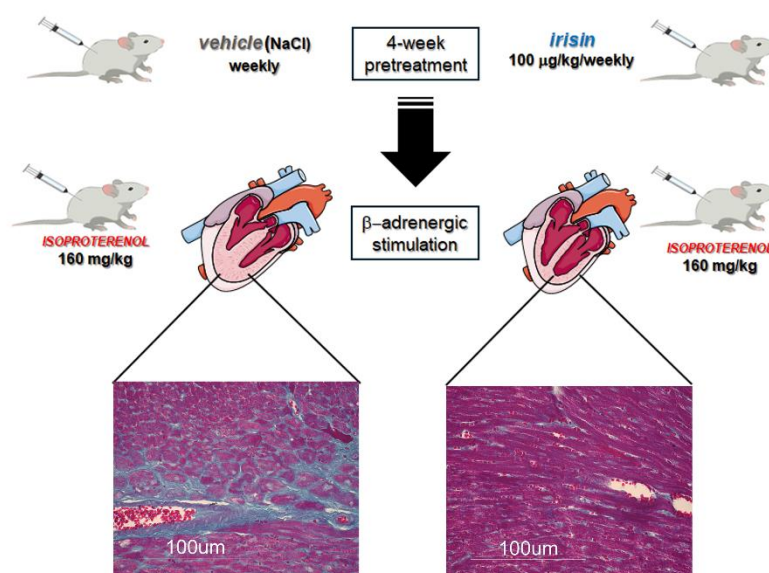


Fig. 21 Rappresentazione schematica dell'effetto dell'irisina nel prevenire la fibrosi cardiaca causata dalla stimolazione acuta con

isoproterenolo (la figura è stata disegnata in parte utilizzando immagini di Servier Medical Art, con licenza Creative Commons Attribuzione 4.0 Unported).

I nostri dati attuali dimostrano che l'irisina ha un forte impatto nella prevenzione del danno cardiaco in un modello murino di fibrosi miocardica indotta dalla somministrazione acuta di ISO. In accordo con ciò, un recente studio ha evidenziato un effetto protettivo significativo dell'irisina sulla fibrosi cardiaca in un modello murino di infarto miocardico sperimentale ottenuto mediante legatura dell'arteria coronaria [89]. Gli autori hanno dimostrato che i topi knockout FNDC5 presentano un aumento della produzione di collagene nel miocardio e una riduzione della funzione cardiaca, indicando che FNDC5/irisina svolge un ruolo chiave nel cuore [89]. Infatti, hanno anche dimostrato che l'esercizio di resistenza stimola la produzione endogena di irisina nel tessuto cardiaco, la quale a sua volta inibisce l'apoptosi dei cardiomiociti e allevia la fibrosi miocardica diminuendo l'espressione di α SMA, metalloproteasi e collagene di tipo I e collagene di tipo III [89].

La causa principale della fibrosi cardiaca è lo squilibrio nell'omeostasi del collagene miocardico, caratterizzato da un accumulo di proteine della matrice extracellulare nel tessuto cardiaco, responsabile dell'insorgenza di patologie cardiache [90]. Un evento chiave che si verifica dopo la morte dei cardiomiociti è la differenziazione dei fibroblasti cardiaci in cellule secretorie e contrattili, definite miofibroblasti, i quali si attivano durante la formazione della cicatrice fibrotica. Sebbene l'acquisizione del fenotipo miofibroblastico sia fisiologica in alcuni processi di guarigione, l'eccessiva attività dei miofibroblasti, con conseguente aumento della secrezione e dell'irrigidimento della matrice extracellulare, ostacola drasticamente la normale fisiologia di organi come il cuore, il cui funzionamento si basa sulla contrattilità [91]. I miofibroblasti attivati sono la principale fonte di proteine della matrice extracellulare che vengono depositate nel tessuto cardiaco durante il processo fibrotico [90]. La transdifferenziazione dal fenotipo fibroblastico a quello miofibroblastico è abitualmente dimostrata dall'espressione di α SMA. Pertanto, un'elevata

espressione di α SMA nel tessuto cardiaco è considerata un marcatore di fibrosi cardiaca [91].

Il nostro studio ha dimostrato che il pretrattamento con irisina ha impedito significativamente l'aumento di α SMA nel tessuto cardiaco a seguito dell'iniezione di ISO, che invece si è verificato nei topi trattati con il vehicle. Questi risultati dimostrano che l'irisina ha completamente inibito la differenziazione verso il fenotipo fibrotico, contribuendo probabilmente alla sopravvivenza dei cardiomiociti, come evidenziato dai valori di espressione della *Troponina I* e dell'*ANP*, entrambi mantenuti a livelli basali nel gruppo di topi pretrattato con irisina. È interessante notare che l'espressione di α SMA, rimasta elevata fino a 7 giorni dopo il trattamento con ISO, era ancora mantenuta a livelli di controllo nei topi trattati con irisina, evidenziando quindi come l'effetto di irisina persista anche in una fase successiva all'evento acuto. Al contrario, per quanto riguarda l'espressione di *ANP*, essa risultava tornata ai livelli basali dopo 7 giorni dalla somministrazione di ISO. Questa regolazione temporale dell'*ANP* non è inaspettata ed è in linea con studi precedenti che hanno dimostrato il suo aumento in caso di sovraccarico di volume di liquidi o di pressione [92,93] e in modelli cronici di ipertensione [94]. In particolare, è stato dimostrato che dopo l'infarto miocardico indotto da un'iniezione di ISO nei ratti, l'mRNA dell'*ANP* è aumentato gradualmente fino a raggiungere il suo picco entro 3 giorni dall'iniezione di ISO [92].

I cardiomiociti sono cellule altamente esigenti dal punto di vista metabolico e utilizzano i mitocondri come fonte primaria di energia [95]. In studi svolti sull'uomo, è stato riportato che i pazienti con insufficienza cardiaca presentano anomalie nella bioenergetica mitocondriale [96]. Studi in vitro svolti su cardiomiociti murini hanno dimostrato che i mitocondri possono generare specie reattive dell'ossigeno responsabili dell'effetto ipertrofico causato dagli agonisti β -adrenergici [97]. I nostri dati hanno mostrato che l'espressione di geni markers mitocondriali, precedentemente identificati come modulati da irisina [42,69,70], in particolare *Sirt1*, *PGC1 α* e *Tfam*, era marcatamente aumentata 24 ore dopo l'iniezione di ISO; tuttavia, questa up-regolazione non è stata osservata nei topi pretrattati con irisina. Questi dati ci inducono a ipotizzare che il pretrattamento con irisina possa aver protetto dalla

disregolazione della biogenesi mitocondriale causata dall'ipertrofia cardiaca. È stato precedentemente dimostrato che per compensare la formazione anomala di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte dei mitocondri [98], *PGC-1 α* si attiva attraverso la deacetilazione mediata da *SIRT1* e induce l'attivazione di enzimi antiossidanti, come la glutatione perossidasi 1 e la superossido dismutasi 2 [99]. Pertanto, è possibile ipotizzare che l'aumento del livello di espressione di *PGC-1 α* porti, a sua volta, all'upregolazione a valle del suo fattore di trascrizione, *Tfam*, marcatore chiave della mitocondriogenesi [100]. Tuttavia, il significato dell'aumento dell'espressione di *Tfam* nelle malattie cardiache resta ampiamente discusso. In effetti, uno studio ha dimostrato che la sovraespressione di *Tfam* protegge dall'insufficienza cardiaca fatale nell'infarto del miocardio. Sebbene l'aumentata espressione di *Tfam* sia indicativa di un aumento del numero di mitocondri, questo effetto non è in grado di compensare completamente il danno a cui il tessuto cardiaco è sottoposto in termini di ipertrofia e fibrosi [68]. Nel nostro studio abbiamo osservato un rapido aumento dell'espressione di *Sirt1*, *PGC1 α* e *Tfam* dopo la somministrazione di ISO, aumento che non si è verificato nei topi trattati con irisina. Ciò potrebbe suggerire che irisina abbia preservato la vitalità dei cardiomiociti e quindi anche la loro funzionalità mitocondriale. Tuttavia, un limite del nostro studio è non aver fornito un meccanismo molecolare attraverso il quale irisina potrebbe essere in grado di prevenire l'aumento della richiesta energetica, quindi la sintesi di nuovi mitocondri. Possiamo solo ipotizzare che ciò non sia necessario poiché le cellule cardiache sono sopravvissute all'insulto acuto indotto dall'ISO. Inoltre, un'altra limitazione del nostro studio è non aver quantificato la produzione delle specie reattive dell'ossigeno nel tessuto cardiaco dopo il trattamento con ISO. Questa indagine potrebbe chiarire se in vivo l'irisina blocca la produzione di specie reattive dell'ossigeno come precedentemente osservato nei cardiomiociti in vitro [59].

CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati ottenuti durante il percorso di dottorato hanno portato alla pubblicazione di due differenti lavori.

I primi studi svolti su modelli murini tenuti in assenza di carico meccanico degli arti posteriori, al fine di mimare una condizione di microgravità, hanno portato alla pubblicazione del lavoro *“Time-dependent unloading effects on muscle and bone and involvement of FNDC5/irisin axis”* sulla rivista npj Microgravity del gruppo Nature.

I dati dimostrano un effetto tempo-dipendente dell'assenza del carico meccanico (unloading) sull'espressione genica nel muscolo scheletrico, in particolar modo nel Vasto laterale e nel Gastrocnemio. Inoltre i nostri studi mostrano quali di queste modulazioni dell'espressione genica possono essere influenzate dal trattamento preventivo con irisina somministrata una volta a settimana per 4 settimane. In particolare abbiamo osservato che irisina previene la down-regolazione, causata dalla condizione di unloading, delle miosine di tipo intermedio (*MyHCIIa*) e veloce (*MyHCIIx*) nel Gastrocnemio.

Nel complesso, questi dati suggeriscono che il sistema FNDC5/Irisina è significativamente influenzato dal carico meccanico con effetti opposti nella ipogravità e ipergravità. Infatti nei topi posti in una condizione di ipergravità 3g abbiamo osservato un aumento dell'espressione di FNDC5, precursore di irisina, e delle miosine (*MyHCI* e *MyHCIIx*), sia nel Vasto laterale che nel Gastrocnemio. Inoltre abbiamo osservato che l'ipergravità influisce sulla morfologia muscolare inibendo il fenotipo atrofico e aumenta l'espressione dei fattori che regolano il processo di proliferazione e miogenesi nel Vasto laterale. Ulteriori studi istologici e di biologia molecolare circa i markers di atrofia muscolare e miogenesi dovranno essere condotti sul Gastrocnemio a supporto di dati preliminari di espressione genica delle proteine muscolari.

Saranno quindi necessari ulteriori studi per capire se l'irisina possa rappresentare una strategia clinica promettente per la prevenzione e il trattamento dei disturbi indotti da disuso che colpiscono i muscoli nei pazienti allettati o durante l'invecchiamento. Pertanto, una terapia a base di irisina

potrebbe rappresentare una potenziale contromisura per gli astronauti esposti a variazioni di gravità durante le loro missioni di volo nello spazio.

Infine, studi condotti su modelli murini di fibrosi cardiaca hanno portato alla pubblicazione del lavoro *“Irisin treatment prevents isoproterenol-induced cardiac fibrosis in mice”* sulla rivista *Discovery Medicine*.

Come dimostrato in studi precedenti riguardanti modelli murini di insufficienza cardiaca generata mediante costrizione dell'aorta, l'irisina potrebbe rappresentare una terapia per il danno cardiaco. Il valore aggiunto del nostro studio è dimostrare che il pretrattamento con irisina preserva la vitalità delle cellule cardiache e di conseguenza previene l'ipertrofia e la fibrosi cardiaca indotta dalla somministrazione di isoproterenolo. Questo modello murino offre, oltre al vantaggio di non causare infiammazione sistemica, il vantaggio di mimare una comune condizione di stress acuto che porta a necrosi cardiache, spesso silenziose e non diagnosticabili, che nel tempo possono portare all'evento fatale dell'infarto del miocardio. Tuttavia ulteriori studi *in vitro* ci permetteranno di chiarire i meccanismi molecolari attraverso cui la miochina è in grado di inibire la fibrosi cardiaca. Una possibile applicazione clinica dei nostri risultati potrebbe portare all'uso dell'irisina esercizio-mimetica, soprattutto per i pazienti con malattie cardiovascolari che non sono in grado di praticare attività fisica.

Irisina quindi sembrerebbe essere una molecola candidata al contrasto di patologie muscolari scheletriche e cardiache. I risultati dei nostri studi infatti evidenziano come il danno muscolare scheletrico e cardiaco possa essere prevenuto dal trattamento con irisina, suggerendo in futuro lo sviluppo di una strategia terapeutica basata su questa molecola.

BIBLIOGRAFIA

1. Schiaffino, S.; Reggiani, C. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiol Rev* **2011**, *91*, 1447–1531, doi:10.1152/physrev.00031.2010.
2. Bettis, T.; Kim, B.-J.; Hamrick, M.W. Impact of Muscle Atrophy on Bone Metabolism and Bone Strength: Implications for Muscle-Bone Crosstalk with Aging and Disuse. *Osteoporos Int* **2018**, *29*, 1713–1720, doi:10.1007/s00198-018-4570-1.
3. Pedersen, B.K. Muscles and Their Myokines. *J Exp Biol* **2011**, *214*, 337–346, doi:10.1242/jeb.048074.
4. Colaianni, G.; Storlino, G.; Sanesi, L.; Colucci, S.; Grano, M. Myokines and Osteokines in the Pathogenesis of Muscle and Bone Diseases. *Curr Osteoporos Rep* **2020**, *18*, 401–407, doi:10.1007/s11914-020-00600-8.
5. Yin, L.; Li, N.; Jia, W.; Wang, N.; Liang, M.; Yang, X.; Du, G. Skeletal Muscle Atrophy: From Mechanisms to Treatments. *Pharmacol Res* **2021**, *172*, 105807, doi:10.1016/j.phrs.2021.105807.
6. Schiaffino, S.; Dyar, K.A.; Ciciliot, S.; Blaauw, B.; Sandri, M. Mechanisms Regulating Skeletal Muscle Growth and Atrophy. *FEBS J* **2013**, *280*, 4294–4314, doi:10.1111/febs.12253.
7. Morey-Holton, E.R.; Globus, R.K. Hindlimb Unloading Rodent Model: Technical Aspects. *J Appl Physiol (1985)* **2002**, *92*, 1367–1377, doi:10.1152/japplphysiol.00969.2001.
8. Hanson, A.M.; Harrison, B.C.; Young, M.H.; Stodieck, L.S.; Ferguson, V.L. Longitudinal Characterization of Functional, Morphologic, and Biochemical Adaptations in Mouse Skeletal Muscle with Hindlimb Suspension. *Muscle Nerve* **2013**, *48*, 393–402, doi:10.1002/mus.23753.
9. Lloyd, S.A.; Lewis, G.S.; Zhang, Y.; Paul, E.M.; Donahue, H.J. Connexin 43 Deficiency Attenuates Loss of Trabecular Bone and Prevents Suppression of Cortical Bone Formation during Unloading. *J Bone Miner Res* **2012**, *27*, 2359–2372, doi:10.1002/jbmr.1687.
10. Savarese, G.; Becher, P.M.; Lund, L.H.; Seferovic, P.; Rosano, G.M.C.; Coats, A.J.S. Global Burden of Heart Failure: A Comprehensive and Updated Review of Epidemiology. *Cardiovasc Res* **2023**, *118*, 3272–3287, doi:10.1093/cvr/cvac013.
11. Metra, M.; Teerlink, J.R. Heart Failure. *Lancet* **2017**, *390*, 1981–1995, doi:10.1016/S0140-6736(17)31071-1.
12. Lear, S.A.; Hu, W.; Rangarajan, S.; Gasevic, D.; Leong, D.; Iqbal, R.; Casanova, A.; Swaminathan, S.; Anjana, R.M.; Kumar, R.; et al. The Effect of Physical Activity on Mortality and Cardiovascular Disease in 130 000 People from 17 High-Income, Middle-Income, and Low-Income Countries: The PURE Study. *Lancet* **2017**, *390*, 2643–2654, doi:10.1016/S0140-6736(17)31634-3.

13. Lin, H.; Sardana, M.; Zhang, Y.; Liu, C.; Trinquart, L.; Benjamin, E.J.; Manders, E.S.; Fusco, K.; Kornej, J.; Hammond, M.M.; et al. Association of Habitual Physical Activity With Cardiovascular Disease Risk. *Circ Res* **2020**, *127*, 1253–1260, doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.317578.
14. Maessen, M.F.; Eijsvogels, T.M.; Stevens, G.; van Dijk, A.P.; Hopman, M.T. Benefits of Lifelong Exercise Training on Left Ventricular Function after Myocardial Infarction. *Eur J Prev Cardiol* **2017**, *24*, 1856–1866, doi:10.1177/2047487317728765.
15. Alhumaid, W.; Small, S.D.; Kirkham, A.A.; Becher, H.; Pituskin, E.; Prado, C.M.; Thompson, R.B.; Haykowsky, M.J.; Paterson, D.I. A Contemporary Review of the Effects of Exercise Training on Cardiac Structure and Function and Cardiovascular Risk Profile: Insights From Imaging. *Front Cardiovasc Med* **2022**, *9*, 753652, doi:10.3389/fcvm.2022.753652.
16. Richards, D.A.; Aronovitz, M.J.; Calamaras, T.D.; Tam, K.; Martin, G.L.; Liu, P.; Bowditch, H.K.; Zhang, P.; Huggins, G.S.; Blanton, R.M. Distinct Phenotypes Induced by Three Degrees of Transverse Aortic Constriction in Mice. *Sci Rep* **2019**, *9*, 5844, doi:10.1038/s41598-019-42209-7.
17. Mitra, A.; Basak, T.; Datta, K.; Naskar, S.; Sengupta, S.; Sarkar, S. Role of α -Crystallin B as a Regulatory Switch in Modulating Cardiomyocyte Apoptosis by Mitochondria or Endoplasmic Reticulum during Cardiac Hypertrophy and Myocardial Infarction. *Cell Death Dis* **2013**, *4*, e582, doi:10.1038/cddis.2013.114.
18. Triposkiadis, F.; Karayannis, G.; Giamouzis, G.; Skoularigis, J.; Louridas, G.; Butler, J. The Sympathetic Nervous System in Heart Failure Physiology, Pathophysiology, and Clinical Implications. *J Am Coll Cardiol* **2009**, *54*, 1747–1762, doi:10.1016/j.jacc.2009.05.015.
19. Forte, E.; Panahi, M.; Baxan, N.; Ng, F.S.; Boyle, J.J.; Branca, J.; Bedard, O.; Hasham, M.G.; Benson, L.; Harding, S.E.; et al. Type 2 MI Induced by a Single High Dose of Isoproterenol in C57BL/6J Mice Triggers a Persistent Adaptive Immune Response against the Heart. *J Cell Mol Med* **2021**, *25*, 229–243, doi:10.1111/jcmm.15937.
20. Pedersen, B.K. Physical Activity and Muscle-Brain Crosstalk. *Nat Rev Endocrinol* **2019**, *15*, 383–392, doi:10.1038/s41574-019-0174-x.
21. Pedersen, B.K.; Febbraio, M.A. Muscles, Exercise and Obesity: Skeletal Muscle as a Secretory Organ. *Nat Rev Endocrinol* **2012**, *8*, 457–465, doi:10.1038/nrendo.2012.49.
22. Karsenty, G.; Olson, E.N. Bone and Muscle Endocrine Functions: Unexpected Paradigms of Inter-Organ Communication. *Cell* **2016**, *164*, 1248–1256, doi:10.1016/j.cell.2016.02.043.
23. Ferrer-Martínez, A.; Ruiz-Lozano, P.; Chien, K.R. Mouse PeP: A Novel Peroxisomal Protein Linked to Myoblast Differentiation and Development. *Dev Dyn* **2002**, *224*, 154–167, doi:10.1002/dvdy.10099.
24. Boström, P.; Wu, J.; Jedrychowski, M.P.; Korde, A.; Ye, L.; Lo, J.C.; Rasbach, K.A.; Boström, E.A.; Choi, J.H.; Long, J.Z.; et al. A PGC1- α -Dependent Myokine That Drives

- Brown-Fat-like Development of White Fat and Thermogenesis. *Nature* **2012**, *481*, 463–468, doi:10.1038/nature10777.
25. Strasser, B. Physical Activity in Obesity and Metabolic Syndrome. *Ann N Y Acad Sci* **2013**, *1281*, 141–159, doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06785.x.
26. Kopelman, P.G. Obesity as a Medical Problem. *Nature* **2000**, *404*, 635–643, doi:10.1038/35007508.
27. Teufel, A.; Malik, N.; Mukhopadhyay, M.; Westphal, H. Frcp1 and Frcp2, Two Novel Fibronectin Type III Repeat Containing Genes. *Gene* **2002**, *297*, 79–83, doi:10.1016/s0378-1119(02)00828-4.
28. LeBlanc, A.D.; Spector, E.R.; Evans, H.J.; Sibonga, J.D. Skeletal Responses to Space Flight and the Bed Rest Analog: A Review. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **2007**, *7*, 33–47.
29. Spiegelman, B.M. Banting Lecture 2012: Regulation of Adipogenesis: Toward New Therapeutics for Metabolic Disease. *Diabetes* **2013**, *62*, 1774–1782, doi:10.2337/db12-1665.
30. Colaianni, G.; Cuscito, C.; Mongelli, T.; Oranger, A.; Mori, G.; Brunetti, G.; Colucci, S.; Cinti, S.; Grano, M. Irisin Enhances Osteoblast Differentiation in Vitro. *Int J Endocrinol* **2014**, *2014*, 902186, doi:10.1155/2014/902186.
31. Vaughan, R.A.; Gannon, N.P.; Barberena, M.A.; Garcia-Smith, R.; Bisoffi, M.; Mermier, C.M.; Conn, C.A.; Trujillo, K.A. Characterization of the Metabolic Effects of Irisin on Skeletal Muscle in Vitro. *Diabetes Obes Metab* **2014**, *16*, 711–718, doi:10.1111/dom.12268.
32. Colaianni, G.; Notarnicola, A.; Sanesi, L.; Brunetti, G.; Lippo, L.; Celi, M.; Moretti, L.; Pesce, V.; Vicenti, G.; Moretti, B.; et al. Irisin Levels Correlate with Bone Mineral Density in Soccer Players. *J Biol Regul Homeost Agents* **2017**, *31*, 21–28.
33. Pignataro, P.; Dicarlo, M.; Zerlotin, R.; Zecca, C.; Dell'Abate, M.T.; Buccoliero, C.; Logroscino, G.; Colucci, S.; Grano, M. FNDC5/Irisin System in Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases: Update and Novel Perspective. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 1605, doi:10.3390/ijms22041605.
34. Islam, M.R.; Valaris, S.; Young, M.F.; Haley, E.B.; Luo, R.; Bond, S.F.; Mazuera, S.; Kitchen, R.R.; Caldarone, B.J.; Bettio, L.E.B.; et al. Exercise Hormone Irisin Is a Critical Regulator of Cognitive Function. *Nat Metab* **2021**, *3*, 1058–1070, doi:10.1038/s42255-021-00438-z.
35. Lecker, S.H.; Zavin, A.; Cao, P.; Arena, R.; Allsup, K.; Daniels, K.M.; Joseph, J.; Schulze, P.C.; Forman, D.E. Expression of the Irisin Precursor FNDC5 in Skeletal Muscle Correlates with Aerobic Exercise Performance in Patients with Heart Failure. *Circ Heart Fail* **2012**, *5*, 812–818, doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.969543.
36. Tsuchiya, Y.; Ando, D.; Takamatsu, K.; Goto, K. Resistance Exercise Induces a Greater Irisin Response than Endurance Exercise. *Metabolism* **2015**, *64*, 1042–1050, doi:10.1016/j.metabol.2015.05.010.

37. Löffler, D.; Müller, U.; Scheuermann, K.; Friebe, D.; Gesing, J.; Bieltz, J.; Erbs, S.; Landgraf, K.; Wagner, I.V.; Kiess, W.; et al. Serum Irisin Levels Are Regulated by Acute Strenuous Exercise. *J Clin Endocrinol Metab* **2015**, *100*, 1289–1299, doi:10.1210/jc.2014-2932.
38. Tsuchiya, Y.; Ando, D.; Goto, K.; Kiuchi, M.; Yamakita, M.; Koyama, K. High-Intensity Exercise Causes Greater Irisin Response Compared with Low-Intensity Exercise under Similar Energy Consumption. *Tohoku J Exp Med* **2014**, *233*, 135–140, doi:10.1620/tjem.233.135.
39. Norheim, F.; Langleite, T.M.; Hjorth, M.; Holen, T.; Kielland, A.; Stadheim, H.K.; Gulseth, H.L.; Birkeland, K.I.; Jensen, J.; Drevon, C.A. The Effects of Acute and Chronic Exercise on PGC-1 α , Irisin and Browning of Subcutaneous Adipose Tissue in Humans. *FEBS J* **2014**, *281*, 739–749, doi:10.1111/febs.12619.
40. Colaianni, G.; Cuscito, C.; Mongelli, T.; Pignataro, P.; Buccoliero, C.; Liu, P.; Lu, P.; Sartini, L.; Di Comite, M.; Mori, G.; et al. The Myokine Irisin Increases Cortical Bone Mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, 12157–12162, doi:10.1073/pnas.1516622112.
41. Iizuka, K.; Machida, T.; Hirafuji, M. Skeletal Muscle Is an Endocrine Organ. *J Pharmacol Sci* **2014**, *125*, 125–131, doi:10.1254/jphs.14r02cp.
42. Colaianni, G.; Mongelli, T.; Cuscito, C.; Pignataro, P.; Lippo, L.; Spiro, G.; Notarnicola, A.; Severi, I.; Passeri, G.; Mori, G.; et al. Irisin Prevents and Restores Bone Loss and Muscle Atrophy in Hind-Limb Suspended Mice. *Sci Rep* **2017**, *7*, 2811, doi:10.1038/s41598-017-02557-8.
43. Guo, M.; Yao, J.; Li, J.; Zhang, J.; Wang, D.; Zuo, H.; Zhang, Y.; Xu, B.; Zhong, Y.; Shen, F.; et al. Irisin Ameliorates Age-Associated Sarcopenia and Metabolic Dysfunction. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **2023**, *14*, 391–405, doi:10.1002/jcsm.13141.
44. Colaianni, G.; Oranger, A.; Dicarlo, M.; Lovero, R.; Storlino, G.; Pignataro, P.; Fontana, A.; Di Serio, F.; Ingravallo, A.; Caputo, G.; et al. Irisin Serum Levels and Skeletal Muscle Assessment in a Cohort of Charcot-Marie-Tooth Patients. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2022**, *13*, 886243, doi:10.3389/fendo.2022.886243.
45. Canfora, I.; Tarantino, N.; Pierno, S. Metabolic Pathways and Ion Channels Involved in Skeletal Muscle Atrophy: A Starting Point for Potential Therapeutic Strategies. *Cells* **2022**, *11*, 2566, doi:10.3390/cells11162566.
46. Aydin, S.; Kuloglu, T.; Aydin, S.; Eren, M.N.; Celik, A.; Yilmaz, M.; Kalayci, M.; Sahin, İ.; Gungor, O.; Gurel, A.; et al. Cardiac, Skeletal Muscle and Serum Irisin Responses to with or without Water Exercise in Young and Old Male Rats: Cardiac Muscle Produces More Irisin than Skeletal Muscle. *Peptides* **2014**, *52*, 68–73, doi:10.1016/j.peptides.2013.11.024.
47. Dun, S.L.; Lyu, R.-M.; Chen, Y.-H.; Chang, J.-K.; Luo, J.J.; Dun, N.J. Irisin-Immunoreactivity in Neural and Non-Neural Cells of the Rodent. *Neuroscience* **2013**, *240*, 155–162, doi:10.1016/j.neuroscience.2013.02.050.

48. Zhao, Y.T.; Wang, J.; Yano, N.; Zhang, L.X.; Wang, H.; Zhang, S.; Qin, G.; Dubielecka, P.M.; Zhuang, S.; Liu, P.Y.; et al. Irisin Promotes Cardiac Progenitor Cell-Induced Myocardial Repair and Functional Improvement in Infarcted Heart. *J Cell Physiol* **2019**, *234*, 1671–1681, doi:10.1002/jcp.27037.
49. Sundarrajan, L.; Yeung, C.; Hahn, L.; Weber, L.P.; Unniappan, S. Irisin Regulates Cardiac Physiology in Zebrafish. *PLoS One* **2017**, *12*, e0181461, doi:10.1371/journal.pone.0181461.
50. Thygesen, K.; Alpert, J.S.; Jaffe, A.S.; Simoons, M.L.; Chaitman, B.R.; White, H.D.; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction; Katus, H.A.; Lindahl, B.; Morrow, D.A.; et al. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *Circulation* **2012**, *126*, 2020–2035, doi:10.1161/CIR.0b013e31826e1058.
51. Anderson, J.L.; Morrow, D.A. Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med* **2017**, *376*, 2053–2064, doi:10.1056/NEJMra1606915.
52. Wang, Z.; Chen, K.; Han, Y.; Zhu, H.; Zhou, X.; Tan, T.; Zeng, J.; Zhang, J.; Liu, Y.; Li, Y.; et al. Irisin Protects Heart Against Ischemia-Reperfusion Injury Through a SOD2-Dependent Mitochondria Mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol* **2018**, *72*, 259–269, doi:10.1097/FJC.0000000000000608.
53. Liao, Q.; Qu, S.; Tang, L.-X.; Li, L.-P.; He, D.-F.; Zeng, C.-Y.; Wang, W.E. Irisin Exerts a Therapeutic Effect against Myocardial Infarction via Promoting Angiogenesis. *Acta Pharmacol Sin* **2019**, *40*, 1314–1321, doi:10.1038/s41401-019-0230-z.
54. Abd El-Mottaleb, N.A.; Galal, H.M.; El Maghraby, K.M.; Gadallah, A.I. Serum Irisin Level in Myocardial Infarction Patients with or without Heart Failure. *Can J Physiol Pharmacol* **2019**, *97*, 932–938, doi:10.1139/cjpp-2018-0736.
55. Li, R.-L.; Wu, S.-S.; Wu, Y.; Wang, X.-X.; Chen, H.-Y.; Xin, J.-J.; Li, H.; Lan, J.; Xue, K.-Y.; Li, X.; et al. Irisin Alleviates Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy by Inducing Protective Autophagy via mTOR-Independent Activation of the AMPK-ULK1 Pathway. *J Mol Cell Cardiol* **2018**, *121*, 242–255, doi:10.1016/j.yjmcc.2018.07.250.
56. Yu, Q.; Kou, W.; Xu, X.; Zhou, S.; Luan, P.; Xu, X.; Li, H.; Zhuang, J.; Wang, J.; Zhao, Y.; et al. FNDC5/Irisin Inhibits Pathological Cardiac Hypertrophy. *Clin Sci (Lond)* **2019**, *133*, 611–627, doi:10.1042/CS20190016.
57. Geng, Z.; Fan, W.-Y.; Zhou, B.; Ye, C.; Tong, Y.; Zhou, Y.-B.; Xiong, X.-Q. FNDC5 Attenuates Obesity-Induced Cardiac Hypertrophy by Inactivating JAK2/STAT3-Associated Inflammation and Oxidative Stress. *J Transl Med* **2019**, *17*, 107, doi:10.1186/s12967-019-1857-8.
58. Zhao, Y.; Xu, Y.; Peng, W. Abstract 298: Irisin Is an Endogenous Negative Regulator of Pathological Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research* **2018**, *123*, A298–A298, doi:10.1161/res.123.suppl_1.298.
59. Chen, R.-R.; Fan, X.-H.; Chen, G.; Zeng, G.-W.; Xue, Y.-G.; Liu, X.-T.; Wang, C.-Y. Irisin Attenuates Angiotensin II-Induced Cardiac Fibrosis via Nrf2 Mediated Inhibition of ROS/TGFβ1/Smad2/3 Signaling Axis. *Chem Biol Interact* **2019**, *302*, 11–21, doi:10.1016/j.cbi.2019.01.031.

60. Pignataro, P.; Dicarlo, M.; Zerlotin, R.; Storlino, G.; Oranger, A.; Sanesi, L.; Lovero, R.; Buccoliero, C.; Mori, G.; Colaianni, G.; et al. Antidepressant Effect of Intermittent Long-Term Systemic Administration of Irisin in Mice. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 7596, doi:10.3390/ijms23147596.
61. Bretland, K.A.; Lin, L.; Bretland, K.M.; Smith, M.A.; Fleming, S.M.; Dengler-Criss, C.M. Irisin Treatment Lowers Levels of Phosphorylated Tau in the Hippocampus of Pre-Symptomatic Female but Not Male Htau Mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* **2021**, *47*, 967–978, doi:10.1111/nan.12711.
62. Sanesi, L.; Storlino, G.; Dicarlo, M.; Oranger, A.; Zerlotin, R.; Pignataro, P.; Suriano, C.; Guida, G.; Grano, M.; Colaianni, G.; et al. Time-Dependent Unloading Effects on Muscle and Bone and Involvement of FNDC5/Irisin Axis. *NPJ Microgravity* **2023**, *9*, 4, doi:10.1038/s41526-023-00251-w.
63. Wronski, T.J.; Morey-Holton, E.R. Skeletal Response to Simulated Weightlessness: A Comparison of Suspension Techniques. *Aviat Space Environ Med* **1987**, *58*, 63–68.
64. Wolfe, A.M.; Kennedy, L.H.; Na, J.J.; Nemzek-Hamlin, J.A. Efficacy of Tramadol as a Sole Analgesic for Postoperative Pain in Male and Female Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **2015**, *54*, 411–419.
65. Langford, D.J.; Bailey, A.L.; Chanda, M.L.; Clarke, S.E.; Drummond, T.E.; Echols, S.; Glick, S.; Ingrao, J.; Klassen-Ross, T.; Lacroix-Fralish, M.L.; et al. Coding of Facial Expressions of Pain in the Laboratory Mouse. *Nat Methods* **2010**, *7*, 447–449, doi:10.1038/nmeth.1455.
66. York, J.M.; Blevins, N.A.; McNeil, L.K.; Freund, G.G. Mouse Short- and Long-Term Locomotor Activity Analyzed by Video Tracking Software. *J Vis Exp* **2013**, 50252, doi:10.3791/50252.
67. Hickman, D.L. Minimal Exposure Times for Irreversible Euthanasia with Carbon Dioxide in Mice and Rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **2022**, *61*, 283–286, doi:10.30802/AALAS-JAALAS-21-000113.
68. Rosca, M.G.; Tandler, B.; Hoppel, C.L. Mitochondria in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *J Mol Cell Cardiol* **2013**, *55*, 31–41, doi:10.1016/j.yjmcc.2012.09.002.
69. Tang, Y.-J.; Zhang, Z.; Yan, T.; Chen, K.; Xu, G.-F.; Xiong, S.-Q.; Wu, D.-Q.; Chen, J.; Jose, P.A.; Zeng, C.-Y.; et al. Irisin Attenuates Type 1 Diabetic Cardiomyopathy by Anti-Ferroptosis via SIRT1-Mediated Deacetylation of P53. *Cardiovasc Diabetol* **2024**, *23*, 116, doi:10.1186/s12933-024-02183-5.
70. Pignataro, P.; Dicarlo, M.; Suriano, C.; Sanesi, L.; Zerlotin, R.; Storlino, G.; Oranger, A.; Zecca, C.; Dell'Abate, M.T.; Mori, G.; et al. Once-Daily Subcutaneous Irisin Administration Mitigates Depression- and Anxiety-like Behavior in Young Mice. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, 6715, doi:10.3390/ijms24076715.
71. Bodine, S.C. Disuse-Induced Muscle Wasting. *Int J Biochem Cell Biol* **2013**, *45*, 2200–2208, doi:10.1016/j.biocel.2013.06.011.

72. Autophagy in Health and Disease. 3. Involvement of Autophagy in Muscle Atrophy - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20089936/> (accessed on 2 December 2024).
73. Haddad, F.; Adams, G.R.; Bodell, P.W.; Baldwin, K.M. Isometric Resistance Exercise Fails to Counteract Skeletal Muscle Atrophy Processes during the Initial Stages of Unloading. *J Appl Physiol (1985)* **2006**, *100*, 433–441, doi:10.1152/jappphysiol.01203.2005.
74. Cannavino, J.; Brocca, L.; Sandri, M.; Bottinelli, R.; Pellegrino, M.A. PGC1- α over-Expression Prevents Metabolic Alterations and Soleus Muscle Atrophy in Hindlimb Unloaded Mice. *J Physiol* **2014**, *592*, 4575–4589, doi:10.1113/jphysiol.2014.275545.
75. Trappe, S.; Costill, D.; Gallagher, P.; Creer, A.; Peters, J.R.; Evans, H.; Riley, D.A.; Fitts, R.H. Exercise in Space: Human Skeletal Muscle after 6 Months Aboard the International Space Station. *J Appl Physiol (1985)* **2009**, *106*, 1159–1168, doi:10.1152/jappphysiol.91578.2008.
76. Giger, J.M.; Bodell, P.W.; Zeng, M.; Baldwin, K.M.; Haddad, F. Rapid Muscle Atrophy Response to Unloading: Pretranslational Processes Involving MHC and Actin. *J Appl Physiol (1985)* **2009**, *107*, 1204–1212, doi:10.1152/jappphysiol.00344.2009.
77. Shenkman, B.S. From Slow to Fast: Hypogravity-Induced Remodeling of Muscle Fiber Myosin Phenotype. *Acta Naturae* **2016**, *8*, 47–59.
78. Lomonosova, Y.N.; Turtikova, O.V.; Shenkman, B.S. Reduced Expression of MyHC Slow Isoform in Rat Soleus during Unloading Is Accompanied by Alterations of Endogenous Inhibitors of Calcineurin/NFAT Signaling Pathway. *J Muscle Res Cell Motil* **2016**, *37*, 7–16, doi:10.1007/s10974-015-9428-y.
79. Edgerton, V.R.; Smith, J.L.; Simpson, D.R. Muscle Fibre Type Populations of Human Leg Muscles. *Histochem J* **1975**, *7*, 259–266, doi:10.1007/BF01003594.
80. Lau, P.; Vico, L.; Rittweger, J. Dissociation of Bone Resorption and Formation in Spaceflight and Simulated Microgravity: Potential Role of Myokines and Osteokines? *Biomedicines* **2022**, *10*, 342, doi:10.3390/biomedicines10020342.
81. Yang, J.; Li, J.; Cui, X.; Li, W.; Xue, Y.; Shang, P.; Zhang, H. Blocking Glucocorticoid Signaling in Osteoblasts and Osteocytes Prevents Mechanical Unloading-Induced Cortical Bone Loss. *Bone* **2020**, *130*, 115108, doi:10.1016/j.bone.2019.115108.
82. Tsourdi, E.; Hofbauer, L.; Rauner, M.; Lademann, F. Thyroid Hormones and Glucocorticoids Differentially Regulate the Expression of the Irisin-Encoding Gene *Fndc5* in Murine Muscle and Bone. *Bone Reports* **2022**, *16*, 101455, doi:10.1016/j.bonr.2022.101455.
83. Searby, N.D.; Steele, C.R.; Globus, R.K. Influence of Increased Mechanical Loading by Hypergravity on the Microtubule Cytoskeleton and Prostaglandin E2 Release in Primary Osteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* **2005**, *289*, C148-158, doi:10.1152/ajpcell.00524.2003.

84. Ciofani, G.; Ricotti, L.; Rigosa, J.; Menciassi, A.; Mattoli, V.; Monici, M. Hypergravity Effects on Myoblast Proliferation and Differentiation. *J Biosci Bioeng* **2012**, *113*, 258–261, doi:10.1016/j.jbiosc.2011.09.025.
85. Morita, H.; Obata, K.; Abe, C.; Shiba, D.; Shirakawa, M.; Kudo, T.; Takahashi, S. Feasibility of a Short-Arm Centrifuge for Mouse Hypergravity Experiments. *PLoS One* **2015**, *10*, e0133981, doi:10.1371/journal.pone.0133981.
86. Tominari, T.; Ichimaru, R.; Taniguchi, K.; Yumoto, A.; Shirakawa, M.; Matsumoto, C.; Watanabe, K.; Hirata, M.; Itoh, Y.; Shiba, D.; et al. Hypergravity and Microgravity Exhibited Reversal Effects on the Bone and Muscle Mass in Mice. *Sci Rep* **2019**, *9*, 6614, doi:10.1038/s41598-019-42829-z.
87. Yoon, G.; Oh, C.S.; Kim, H.-S. Hypergravity Upregulates Renal Inducible Nitric Oxide Synthase Expression and Nitric Oxide Production. *Oncotarget* **2016**, *7*, 30147–30154, doi:10.18632/oncotarget.9253.
88. Shiba, D.; Mizuno, H.; Yumoto, A.; Shimomura, M.; Kobayashi, H.; Morita, H.; Shimbo, M.; Hamada, M.; Kudo, T.; Shinohara, M.; et al. Development of New Experimental Platform 'MARS'-Multiple Artificial-Gravity Research System-to Elucidate the Impacts of Micro/Partial Gravity on Mice. *Sci Rep* **2017**, *7*, 10837, doi:10.1038/s41598-017-10998-4.
89. Li, H.; Qin, S.; Tang, J.; Wang, T.; Ren, W.; Di, L.; Bo, W.; Ma, Y.; Wu, F.; Xu, Z.; et al. Resistance Exercise Upregulates Irisin Expression and Suppresses Myocardial Fibrosis Following Myocardial Infarction via Activating AMPK-Sirt1 and Inactivating TGFβ1-Smad2/3. *Acta Physiol (Oxf)* **2024**, *240*, e14163, doi:10.1111/apha.14163.
90. Frangogiannis, N.G. Cardiac Fibrosis: Cell Biological Mechanisms, Molecular Pathways and Therapeutic Opportunities. *Mol Aspects Med* **2019**, *65*, 70–99, doi:10.1016/j.mam.2018.07.001.
91. Hinz, B. The Myofibroblast: Paradigm for a Mechanically Active Cell. *J Biomech* **2010**, *43*, 146–155, doi:10.1016/j.jbiomech.2009.09.020.
92. Shimoike, H.; Iwai, N.; Kinoshita, M. Differential Regulation of Natriuretic Peptide Genes in Infarcted Rat Hearts. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **1997**, *24*, 23–30, doi:10.1111/j.1440-1681.1997.tb01778.x.
93. Hori, Y.; Sano, N.; Kanai, K.; Hoshi, F.; Itoh, N.; Higuchi, S.-I. Acute Cardiac Volume Load-Related Changes in Plasma Atrial Natriuretic Peptide and N-Terminal pro-B-Type Natriuretic Peptide Concentrations in Healthy Dogs. *Vet J* **2010**, *185*, 317–321, doi:10.1016/j.tvjl.2009.06.008.
94. de Bold, A.J.; Bruneau, B.G.; Kuroski de Bold, M.L. Mechanical and Neuroendocrine Regulation of the Endocrine Heart. *Cardiovasc Res* **1996**, *31*, 7–18.
95. Porter, G.A.; Hom, J.; Hoffman, D.; Quintanilla, R.; de Mesy Bentley, K.; Sheu, S.-S. Bioenergetics, Mitochondria, and Cardiac Myocyte Differentiation. *Prog Pediatr Cardiol* **2011**, *31*, 75–81, doi:10.1016/j.ppedcard.2011.02.002.
96. Zhou, B.; Tian, R. Mitochondrial Dysfunction in Pathophysiology of Heart Failure. *J Clin Invest* **2018**, *128*, 3716–3726, doi:10.1172/JCI120849.

97. Andersson, D.C.; Fauconnier, J.; Yamada, T.; Lacampagne, A.; Zhang, S.-J.; Katz, A.; Westerblad, H. Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species Contributes to the β -Adrenergic Stimulation of Mouse Cardiomyocytes. *J Physiol* **2011**, *589*, 1791–1801, doi:10.1113/jphysiol.2010.202838.
98. Sánchez, B.; Muñoz-Pinto, M.F.; Cano, M. Irisin Enhances Longevity by Boosting SIRT1, AMPK, Autophagy and Telomerase. *Expert Rev Mol Med* **2022**, *25*, e4, doi:10.1017/erm.2022.41.
99. Gureev, A.P.; Shaforostova, E.A.; Popov, V.N. Regulation of Mitochondrial Biogenesis as a Way for Active Longevity: Interaction Between the Nrf2 and PGC-1 α Signaling Pathways. *Front Genet* **2019**, *10*, 435, doi:10.3389/fgene.2019.00435.
100. Viña, J.; Gomez-Cabrera, M.C.; Borrás, C.; Froio, T.; Sanchis-Gomar, F.; Martínez-Bello, V.E.; Pallardo, F.V. Mitochondrial Biogenesis in Exercise and in Ageing. *Adv Drug Deliv Rev* **2009**, *61*, 1369–1374, doi:10.1016/j.addr.2009.06.006.