



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI

Medicina

SCUOLA DI DOTTORATO DI

Scienze della Vita e della Salute

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali

CICLO /ANNO XXIX/2014

TITOLO DELLA TESI DI DOTTORATO

Effetti dell'esercizio fisico controllato sui danni da
ischemia/riperfusionne nei pazienti con arteriopatia obliterante degli
arti inferiori e claudicatio intermittens

S.S.D. MED/09

Coordinatore: Prof. Paolo Moghetti

Tutor: Prof. Luciano Cominacini

Dottorando: Dott.ssa Irene Alessandra Tinelli

INDICE

SOMMARIO.....	3
INTRODUZIONE.....	5
SCOPO DEL LAVORO.....	9
MATERIALI E METODI	10
RISULTATI	16
DISCUSSIONE	39
BIBLIOGRAFIA.....	43
RINGRAZIAMENTI.....	50

SOMMARIO

I pazienti con arteriopatia obliterante degli arti inferiori (PAD: Peripheral Artery Disease) e claudicatio intermittens (CI) durante la deambulazione vanno incontro a ripetuti episodi di ischemia seguita da una riperfusione quando arrestano la marcia. Questo fenomeno di ischemia-riperfusione (I-R) è paradossalmente dannoso poiché genera specie reattive dell'ossigeno (ROS) che danneggiano le fibre muscolari e favoriscono la citotossicità e l'apoptosi. È stato recentemente dimostrato che brevi episodi di I-R che precedono ("ischemic preconditioning", IP) una prolungata I-R sono in grado di ridurre i danni ischemici. In questo studio abbiamo prima valutato se l'esercizio fisico controllato, caratterizzato da ripetuti episodi di I-R, renda le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) dei pazienti PAD e CI più resistenti ai danni da I-R, inducendo una risposta adattativa mediata dall'attivazione di Unfolded Protein Response (UPR) e del fattore di trascrizione nuclear factor-erythroid 2-related factor2 (Nrf2). Tutti i pazienti arruolati sono stati sottoposti ad un periodo di training di 21 sessioni caratterizzate da 50 minuti di esercizio su tapis roulant. All'inizio e alla fine dei 21 giorni di training, i pazienti hanno eseguito un test massimale (Treadmill Test) su tapis roulant come indicatore di risposta acuta all'I-R. Il training di esercizio fisico ha migliorato l'intervallo di marcia assoluto e l'intervallo di marcia libero dal dolore ($p<0.01$) e ha ridotto la % di PBMC apoptotici ($p<0.01$) provenienti dai pazienti con PAD e CI. L'esercizio fisico ha inoltre determinato una riduzione significativa della concentrazione plasmatica di malondialdeide (MDA) ($p<0.01$) e della produzione di ROS ($p<0.01$) nei PBMC dei pazienti con un contemporaneo aumento di GSH ($p<0.01$) sia in condizioni basali che in risposta al test massimale. Questi cambiamenti sono stati associati ad un aumento significativo di mRNA della proteina chinasi RNA-like ER chinasi (PERK) ($p<0.01$), della proteina 1 α inositolo-dipendente (IRE1) ($p<0.01$) e dell'Nrf2 e allo stesso modo dei fattori di trascrizione nucleari corrispondenti e di Nrf2 ($p<0.01$). Sottoponendo le cellule THP-1 in coltura a diversi episodi di I-R c'è stato un progressivo aumento dell'attivazione di UPR e Nrf2 ($p<0.01$), mentre lo stress ossidativo e la citotossicità, dopo un aumento iniziale, si sono ridotti ($p<0.01$),

suggerendo che l'esercizio fisico controllato può indurre un adattamento fenotipico simile all'IP.

INTRODUZIONE

L'arteriopatia obliterante degli arti inferiori (PAD: Peripheral Artery Disease) rappresenta una delle più frequenti manifestazioni della malattia aterosclerotica con una prevalenza che aumenta con l'età: è presente, infatti, nel 4-12% dei soggetti tra i 55-70 anni e raggiunge il 20% nei soggetti oltre i 70 anni (1-2).

La claudicatio intermittens (CI) è il sintomo più frequente nei pazienti con PAD con un'incidenza di circa il 3% nei pazienti di età compresa tra 40 e 50 anni e del 6% nei pazienti tra i 60 e i 70 anni (3). La CI è definita come presenza di dolore crampiforme ai muscoli dell'arto inferiore (polpaccio, coscia o natica) che insorge salendo le scale o durante la deambulazione. Il dolore si manifesta ogniqualvolta si ripete il medesimo sforzo e scompare prontamente alla sua cessazione (4). La presenza di CI nei pazienti con PAD si associa ad un significativo aumento della mortalità per infarto miocardico e ictus rispetto a soggetti di pari età e sesso senza CI (5).

Durante la deambulazione i pazienti con CI vanno incontro a ripetuti episodi di ischemia, prevalentemente agli arti inferiori, che determinano una temporanea carenza di ossigeno, seguita da una riperfusione quando arrestano la marcia. L'obiettivo primario nell'ischemia è di ripristinare il flusso sanguigno nel più breve tempo possibile; tuttavia, benché la riperfusione sia essenziale per proteggere le cellule muscolari dall'ischemia prolungata nei pazienti con CI, il rapido ripristino del flusso può determinare un danno ossidativo ai tessuti, il cosiddetto danno da ischemia/riperfusione (I-R) (6). Evidenze dimostrano infatti che l'I-R produce specie reattive dell'ossigeno (ROS) che sono in grado di danneggiare le fibre muscolari, alterare la funzione mitocondriale e favorire l'apoptosi (7-8).

Il nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) è un regolatore fondamentale della resistenza cellulare allo stress ossidativo (9); è un membro della famiglia dei fattori di trascrizione a "cerniera di leucine" (bZIP), che regola l'espressione genica costitutiva e inducibile di numerosi enzimi antiossidanti e detossificanti di fase II (10) attraverso il legame con la regione promotrice dei geni di questi enzimi, detta "Antioxidant Response Elements" (ARE) (11). In condizioni basali

l'Nrf2 è sequestrato nel citoplasma, dove si trova legato attraverso il suo dominio Neh2 nella regione N-terminale, a Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1). L'esposizione cellulare ai ROS modifica un residuo di cisteina critico nella proteina Keap1, stimolando sia il rilascio di Nrf2 da Keap1 che la degradazione di quest'ultimo; Nrf2 può quindi traslocare nel nucleo dove viene dimerizzato per formare i complessi di trans-attivazione sugli elementi ARE, inducendo quindi la trascrizione di centinaia di enzimi antiossidanti e citoprotettivi (12). Tra questi, emeossigenasi-1 (HO-1), γ -7 glutamilcisteina sintetasi subunità catalitica (GCLC), NAD(P)H chinone ossidoreduttasi, superossido dismutasi e glutatione S-transferasi, sono di fondamentale importanza nel proteggere le cellule dallo stress ossidativo (13). Il GCLC è l'enzima chiave nella sintesi di glutatione (GSH), la più importante difesa antiossidante cellulare che gioca un ruolo fondamentale nel mantenere il bilancio ossido-riduttivo (redox) delle cellule (14-10). Recenti evidenze in modelli animali di I-R dimostrano che l'Nrf2 è in grado di proteggere le cellule miocardiche dai danni indotti dall'I-R (15).

Le alterazioni dello stato redox cellulare rappresentano una delle principali cause di alterazione della sintesi proteica e in particolare dei meccanismi di ripiegamento tridimensionale (folding) delle catene amminoacidiche all'interno del reticolo endoplasmatico (RE) (16). Il folding proteico è un processo fondamentale per la corretta funzionalità delle proteine e l'esistenza di accurati meccanismi di controllo permette alle sole proteine correttamente ripiegate e funzionali di uscire dal RE (17). L'accumulo di proteine mal ripiegate nel RE determina una condizione di stress cellulare, noto come stress del RE, che a sua volta attiva l'Unfolded Protein Response (UPR) nel tentativo di ripristinare l'omeostasi cellulare (17). L'intricata rete di segnali dell'UPR si realizza attraverso l'attivazione di tre principali trasduttori presenti sulla membrana del RE: activating transcription factor 6 (ATF6), inositol requiring 1 (IRE1) e proteinkinase RNA-like ER kinase (PERK) (18-19). L'attivazione di PERK riduce la sintesi proteica e, in particolare, codifica per l'attivazione del fattore di trascrizione 4 (ATF4) che induce l'espressione di geni coinvolti nel metabolismo degli aminoacidi, nella risposta antiossidante, nell'autofagia e nell'apoptosi (20). Dopo la sua attivazione IRE1 elabora l'mRNA che codifica per la proteina X-box-

binding 1 (XBP1) generando un fattore di trascrizione che migra nel nucleo e promuove l'espressione genica di chaperones e proteine del RE coinvolte nel processo di degradazione delle proteine mal ripiegate note come ER-Associated Protein Degradation (ERAD) (21). In condizioni di stress del reticolo, ATF6 viene processato nel Golgi dove subisce una proteolisi intramembrana rilasciando un frammento N-terminale citoplasmatico di 50 kDa che funziona come un fattore di trascrizione (22-23). ATF6 partecipa all'espressione di chaperones, disolfuro isomerasi, geni ERAD e modula l'attività del fattore di trascrizione XBP1 (24).

Se l'UPR non riesce a ripristinare il corretto piegamento delle proteine nel RE si innesca una via pro-apoptotica mediata da CCAAT/2enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) (20).

Numerose evidenze sia in modelli animali sia nell'uomo dimostrano che il fenomeno di I-R induce stress del RE e attivazione della via UPR (25). È stato recentemente dimostrato che l'I-R si associa ad un aumento di proteine strutturalmente e funzionalmente difettive che danneggiano le normali funzioni cellulari e devono pertanto essere rimosse (26). In questo contesto è stato evidenziato che l'ATF6 può indurre l'espressione di proteine in grado di ridurre il danno miocardico da I-R in topi transgenici (27) e in cardiomiociti (28). Inoltre, anche l'attivazione degli altri sensori della via UPR è stata recentemente dimostrata in altri modelli animali di I-R (29-30).

L'"ischemic conditioning" è un fenomeno endogeno in cui uno o più brevi episodi di I-R sono in grado di proteggere le cellule da un episodio prolungato di I-R, potenzialmente letale (31). Più di 20 anni fa, Murry et al. (32) per primi hanno descritto questo fenomeno nel cuore di un cane, mostrando come l'applicazione di brevi cicli di ischemia non letale e riperfusione potessero ridurre l'area ischemica del successivo infarto miocardico. Da allora numerosi ricercatori si sono focalizzati su come aumentare la tolleranza cardiaca al danno da I-R utilizzando tecniche di condizionamento ischemico in modelli animali e nell'uomo (31). In particolare, è stato dimostrato che brevi episodi di I-R a livello coronarico che precedono ("ischemic preconditioning", IP) una prolungata I-R, sono in grado di ridurre le dimensioni dell'infarto non solo nei topi, ma anche nei pazienti con infarto miocardico acuto o sottoposti a by-pass o angioplastica percutanea (31).

Esistono delle condizioni patologiche come l'angina stabile e gli attacchi ischemici transitori nelle quali i pazienti sono esposti a numerosi brevi episodi di I-R; a questo proposito è stato suggerito che l'ischemia indotta da PAD è probabilmente il più importante modello di IP (33). Nonostante l'IP e la CI siano caratterizzati entrambi da ripetuti episodi di I-R, pochissimi studi si sono concentrati sul collegamento tra questi due fenomeni. Inoltre, anche la CI come trigger di IP ha ricevuto scarsa attenzione.

Da molti anni è noto che nei pazienti con PAD e CI l'esercizio fisico determina rilevanti benefici per quanto riguarda la sintomatologia dolorosa e l'abilità nella marcia (34). In particolare, i risultati di recenti metanalisi dimostrano che l'esercizio fisico controllato garantisce un maggior beneficio rispetto a quelli eseguiti a domicilio (35). Pertanto, è considerato un efficace trattamento di prima linea per pazienti con PAD e CI (36) ed è consigliato dalle linee guida internazionali come standard di cura (37).

È stato suggerito che le modificazioni metaboliche e meccaniche che si verificano durante il periodo di esercizio fisico possano provocare una risposta adattativa che alla fine riduce i sintomi della CI (38). In particolare, è stato suggerito che la risposta adattativa non solo migliora la perfusione vascolare ma anche riduce il danno al muscolo scheletrico, che in parte deriva dall'I-R (38). Recenti studi hanno inoltre dimostrato che l'esercizio fisico modifica l'espressione genica verso un profilo anti-infiammatorio e anti-aterosclerotico nelle cellule circolanti di soggetti sani (39) e nei pazienti con PAD e CI (40).

SCOPO DEL LAVORO

In questo studio ci siamo pertanto posti l'obiettivo di valutare se un breve ciclo di attività fisica controllata, caratterizzato da ripetuti episodi di I-R, renda le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) dei pazienti con PAD e CI più resistenti ai danni da I-R, riducendo lo stress ossidativo e inducendo una risposta adattativa mediata dalle vie UPR e Nrf2/ARE.

Successivamente, per capire se la CI possa essere un trigger di IP abbiamo esaminato l'effetto di ripetuti episodi di I-R sulla risposta adattativa in monocyte-like cells (THP-1).

MATERIALI E METODI

Selezione dei soggetti

Lo studio è stato approvato dalla Commissione Etica Ospedaliera in accordo con gli standard etici stabiliti dalla Dichiarazione di Helsinki. Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato prima di essere arruolati nello studio.

Hanno partecipato allo studio 24 pazienti afferenti all'ambulatorio di Patologia Vascolare del reparto di Riabilitazione Vascolare del Policlinico G.B. Rossi di Verona. Sono stati inclusi soggetti di ambo i sessi e di età compresa fra i 50 e gli 85 anni, affetti da PAD con CI allo stadio II della classificazione di Leriche Fontaine. La diagnosi é stata effettuata attraverso anamnesi, esame clinico, misurazione dell'indice braccio-caviglia (ABI) ($0,5 < 0,9$ nella gamba sintomatica) ed Ecocolordoppler degli arti inferiori (AAII) per la valutazione di stenosi o di occlusioni delle arterie iliache e dei segmenti femoro-poplitei. I criteri di esclusione sono stati i seguenti: microangiopatia diabetica avanzata con neuropatia periferica, angina, infarto cardiaco o ictus nei 6 mesi precedenti, insufficienza cardiaca ($FE < 40\%$), procedure di rivascolarizzazione nei 6 mesi precedenti, insufficienza renale (creatinina $> 1,5$ mg/dL), malattie respiratorie con ridotta performance fisica, controindicazioni all'attività fisica, neoplasie e grave depressione, mancato controllo dei fattori di rischio cardiovascolare (ipertensione arteriosa, diabete mellito, ipercolesterolemia).

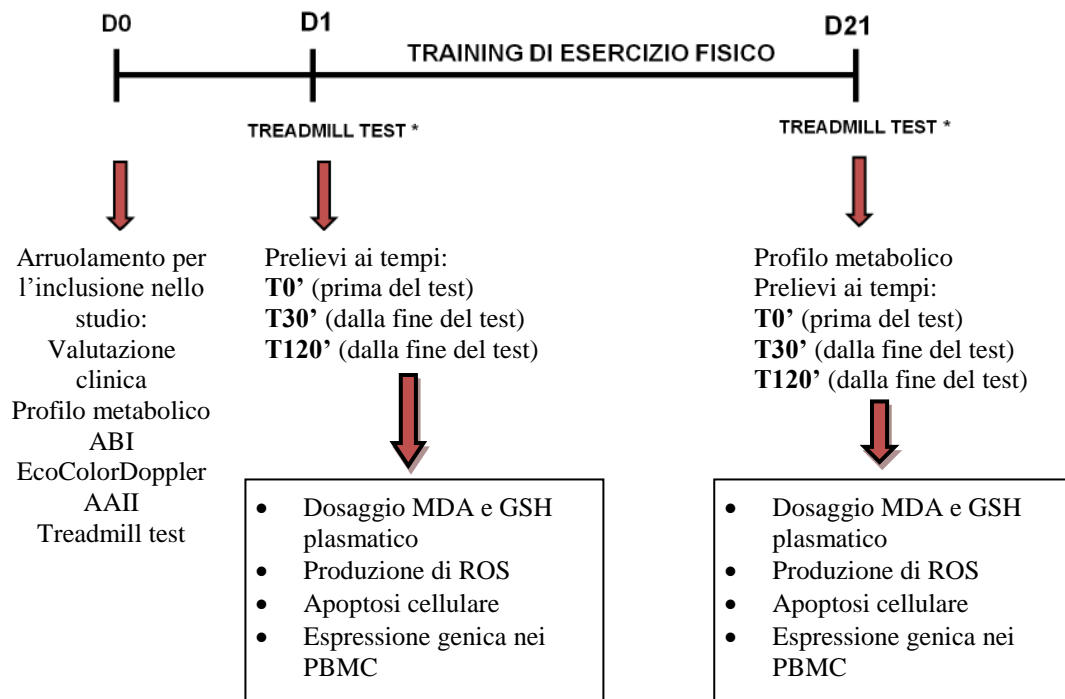
Disegno dello studio

Come indicato nella *Figura 1*, alla prima visita (run-in, D0) i soggetti sono stati sottoposti a valutazione clinica, prelievo ematochimico ed esami strumentali: Ecocolordoppler AAII, ABI e Treadmill test per verificare la capacità di camminare a velocità e pendenza predefiniti dal protocollo, ossia: 3,2 km/h e pendenza 10%, in accordo con le indicazioni TASCII (41). L'ABI è stato calcolato come rapporto tra la pressione arteriosa misurata a livello della caviglia e la pressione arteriosa misurata a livello del braccio attraverso sonda Doppler.

I pazienti che soddisfacevano i criteri di inclusione sono stati invitati a ritornare dopo una settimana per iniziare il training di attività fisica (42).

Il training di attività fisica della durata di 21 giorni prevedeva la seguente sessione di esercizio: 30 minuti di esercizio aerobico per stimolare la capacità respiratoria; 50 minuti di esercizio fisico con velocità e pendenza corrispondenti a quelli del Treadmill Test. L'esercizio era condotto fino all'insorgenza del dolore e quindi interrotto fino alla risoluzione del sintomo per poi ricominciare l'esercizio, in accordo con le prescrizioni TASCII. La sessione terminava con 20 minuti di cyclette senza resistenza (43).

FIGURA 1: Disegno dello studio



* Velocità 3,2 Km/h
 Pendenza 10 %
 Max distanza 800 mt

Walking ability

L'intervallo di marcia totale (MWD – Maximal Walking Distance) è definito come il momento dell'esercizio in corrispondenza del quale il paziente non riesce più a tollerare l'incremento di dolore al polpaccio sviluppatosi durante la marcia. Il momento in corrispondenza del quale inizia l'insorgenza del dolore, è definito invece come intervallo di marcia libero dal dolore (PFW – Pain Free Walking Distance). MWD e PFW sono stati determinati con Treadmill Test prima dell'inizio e alla fine dei 21 giorni di training.

Prelievi di sangue venoso

I prelievi di sangue venoso sono stati eseguiti in ciascun paziente a digiuno da 12 ore per la misurazione di colesterolo totale, colesterolo HDL, trigliceridi, HbA1C ed emocromo al run-in (D0) e al termine del training (D21). Per l'espressione genica (mRNA e proteina) i prelievi sono stati eseguiti il primo giorno (D1) e al termine del training di esercizio fisico (D21), prima di eseguire il Treadmill test, con paziente a riposo da almeno 30 minuti (T0) e dopo 2 ore dal termine del Treadmill test (T120). I prelievi per misurare la concentrazione plasmatica di malondialdeide (MDA) e GSH sono stati eseguiti il primo giorno di training di esercizio fisico (D1) e al termine del training di attività fisica (D21), prima di eseguire il Treadmill test, dopo 30 minuti (T0), e dopo 120 minuti (T120) dal termine del Treadmill test.

Il sangue dei pazienti è stato raccolto in provette pyrogen-free, aliquotato in vials con tappo a vite da 1ml insieme ad un antiossidante fenolico 2,6-di-ter-butil-4-metilfenolo (10mM; Sigma, Milano, Italia) necessario per prevenire la perossidazione lipidica. Le aliquote dei campioni sono state congelate a -80°C per non oltre 9 mesi ed ogni aliquota è stata scongelata una sola volta.

Isolamento dei PBMC

I PBMC sono stati isolati attraverso l'utilizzo di provette BD VACUTAINER® CPT™ con sodio-eparina e centrifugati a 1500g per 20 minuti a 20 °C.

I PBMC sono stati coltivati in flasche alla concentrazione di $1-2 \times 10^6$ di cellule/ml, con terreno RPMI1640, contenente L-glutamina (2 mM) e HEPES (25

mM) (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) addizionato di siero fetale di vitello (FCS) 10%. Al terreno sono stati aggiunti gli antibiotici penicillina (100 U/ml) e streptomina (100 µg/ml, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA). Le cellule sono state mantenute a 37°C in un incubatore a flusso di CO₂ al 5%. Tutti i trattamenti delle cellule sono stati fatti sotto cappa sterile a flusso laminare (Biohazard).

Modello di I-R in vitro

Per l'allestimento del modello in vitro, è stata utilizzata la linea immortalizzata THP-1, fatta crescere in terreno appropriato RPMI 1640, contenente 10% FCS, 2mM glutamina, 50 U/mL penicillina e 5 µg/mL streptomina a 37 °C in atmosfera umidificata con 5% CO₂ (44).

Per indurre I-R, è stato adoperato EVOS FL Auto Imaging System (Invitrogen), dotato di una camera in cui è possibile controllare i valori di temperatura e di umidità e soprattutto modificare le percentuali di gas atmosferici (N₂, O₂ e CO₂).

Le cellule THP-1 sono state alloggiare all'interno di questa camera per 2h con O₂ al 5% e N₂ al 95%, mimando una condizione di ischemia e successivamente per 1h con O₂ al 20% e N₂ all'80%, mimando così la riperfusione. I tempi adoperati per indurre l'episodio di I-R sono stati stabiliti grazie all'utilizzo di un composto fluorogenico (Image-iT® Hypoxia Reagent, Thermofisher, Invitrogen), che diventa fluorescente quando le basse concentrazioni di ossigeno (<5%) si sono stabilizzate all'interno della cellula. Come controllo sono state utilizzate THP-1 tenute in incubatore in condizioni di umidità, temperatura e percentuali di gas atmosferici standard.

Come per i PBMC, anche per le THP-1 dopo i vari cicli di I-R sono stati valutati i markers di stress ossidativo, la citotossicità e l'espressione dei geni della via UPR e Nrf2/ARE.

Estrazione dell'RNA dai PBMC e dalle THP-1 e Real-time PCR

L'RNA totale dei PBMC è stato isolato con RNEasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). La concentrazione e la qualità dell'RNA estratto sono stati valutati usando RNA 6000 Nano Lab Chip Kit (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent

Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). La trascrizione inversa dell'RNA totale per la produzione di cDNA è stata eseguita usando IScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) seguendo il protocollo suggerito dalla ditta madre. I livelli relativi di espressione genica dei geni di interesse (ATF6, IRE1, PERK, CHOP, Nrf2, HO-1 e GCLC) sono stati determinati in triplicato usando QuantiTect Primer Assay e QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) su MyiQ Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Il gene normalizzatore di riferimento per lo studio di espressione è stato QuantiTect Hs-ACTB Assay (Quiagen, Hilden, Germany).

Quantificazione dei markers sistemici e cellulari di stress ossidativo

L'MDA è uno dei prodotti fondamentali della perossidazione lipidica, mentre il GSH svolge un ruolo chiave nel mantenimento dell'equilibrio redox intracellulare e nell'attivare meccanismi di difesa cellulari in presenza di stress ossidativo.

La concentrazione plasmatica di MDA è stata misurata usando cromatografia liquida ad alta affinità (HPLC) con rilevatore a spettrometria di massa (HPLC-MS) in accordo con il metodo proposto da Mao et al (45).

I livelli plasmatici di GSH sono stati misurati usando HPLC con rilevatore fluorimetrico utilizzando come indice di fluorescenza l'acido 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-solfonico avente lunghezza d'onda di eccitazione (λ_{ex}) pari a 385nm e lunghezza d'onda di emissione (λ_{em}) 515nm, come precedentemente descritto (46).

La produzione intracellulare di ROS è stata quantificata in citofluorimetria grazie all'ossidazione di 2-7 dicloro-diidro-fluoresceina diacetato (DCFH-DA) (Molecular Probes, Eugene, USA), come precedentemente descritto (Coulter Corporation, Hialeah, Florida) (47).

Citotossicità

L'apoptosi cellulare è stata valutata mediante il saggio a doppia colorazione annessina V/ioduro di propidio (Kit Bender MEDSYSTEM, Vienna, Austria). Le cellule sono state incubate a temperatura ambiente per 20 minuti al buio e

analizzate mediante citometria a flusso. Il numero di ogni tipo di cellula è stato espresso come percentuale del numero di cellule totali colorate.

Concentrazione nucleare di ATF4, XBP1 e Nrf2

L'estratto nucleare è stato ottenuto utilizzando Nuclear Extraction Kit (Cayman, AnnArbor, U.S.A.) seguendo il protocollo fornito dalla Ditta. La concentrazione di ATF4 e Nrf2 nell'estratto nucleare è stata misurata utilizzando Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kits; la concentrazione nucleare di XBP1 è stata misurando utilizzando Chemiluminescence Immuno Assay (CLIA) kit (LifeSpanBioScience, Inc/Space, Milano, Italia).

Analisi statistica

I dati sono espressi come media \pm deviazione standard. Le differenze tra D1 e D21 e tra T0 e T120 sono state analizzate con test t-Student per dati appaiati. Per l'analisi statistica degli esperimenti in acuto è stata utilizzata l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test post-hoc di Tukey per confronti multipli. È stata considerata statisticamente significativa una probabilità (p-value) pari a 0,05. I dati sono stati analizzati con SPSS (IBM Corp. SPSS Statistic Version 20).

RISULTATI

Valutazione clinica, caratteristiche antropometriche, valori di pressione arteriosa e profilo lipidico

Hanno preso parte allo studio 24 pazienti con PAD e CI (18 maschi e 6 femmine), con un'età media di 71.8 ± 8.2 anni. Sulla base dei criteri di inclusione adottati, tutti i pazienti coinvolti nello studio erano ex fumatori e presentavano un controllo ottimale degli altri fattori di rischio quali ipercolesterolemia, ipertensione arteriosa e diabete mellito tipo 2 (*Tabella I*).

Le caratteristiche antropometriche, il profilo lipidico e i valori di pressione arteriosa e di emoglobina glicata (HbA1c) erano simili all'inizio e alla fine dello studio (*Tabella II*).

TABELLA I: Fattori di rischio cardiovascolare e terapie in atto

	N=24
Età	71.8 ± 8.2
Sesso, n(%)	M 18 (75)
Fumo	
- Non fumatori, n(%)	0
- Ex fumatori, n(%)	24 (100)
- Fumatori attivi, n(%)	0
Sigarette (Pack Year)	27.8 ± 36.6
Iperensione arteriosa, n(%)	23 (95.8)
Diabete mellito tipo 2, n(%)	7 (19.4)
Ipercolesterolemia, n(%)	24(100)
Terapia Statine, n(%)	24(100)
Terapia Antidiabetica, n(%)	7 (100)
Terapia Antipertensiva, n(%)	23(95.8)

TABELLA II: Caratteristiche antropometriche, valori di pressione arteriosa e parametri di laboratorio all'inizio e alla fine dello studio

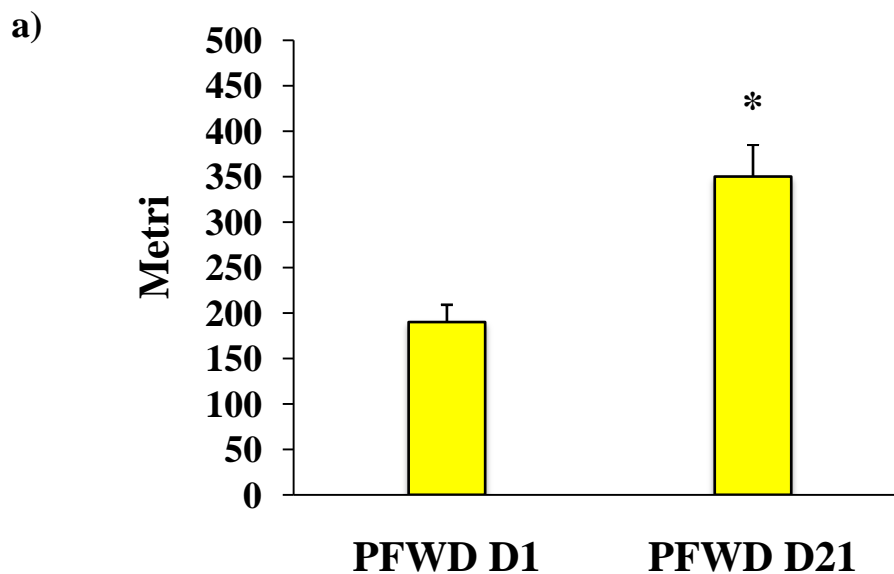
	D0 N=24	D21 N=24	P
Circonferenza vita (cm)	96.1±11.8	95.3±12.2	ns
BMI (kg/m²)	24.6±4.8	24.1±4.3	ns
PAS (mmHg)	128.6±11.7	125.2±12.3	ns
PAD (mmHg)	80.1±7.5	81.3±6.6	ns
Colesterolo totale (mg/dL)	147.9±17.6	146.0±18.3	ns
LDL colesterolo (mg/dL)	82.9±13.9	86.7±11.3	ns
HDL colesterolo (mg/dL)	36.7±8.4	38.3±8.2	ns
Trigliceridi (mg/dL)	121.3±24.4	115.8.3±19.2	ns
HbA1C (%)	6.1±0.3	6.0±0.5	ns

Legenda: i risultati sono espressi come media+DS; BMI= body mass index, PAS= pressione arteriosa sistolica; PAD= pressione arteriosa diastolica; HbA1C= Hb glicata.

L'esercizio fisico controllato aumenta l'intervallo di marcia libero dal dolore e l'intervallo di marcia assoluto

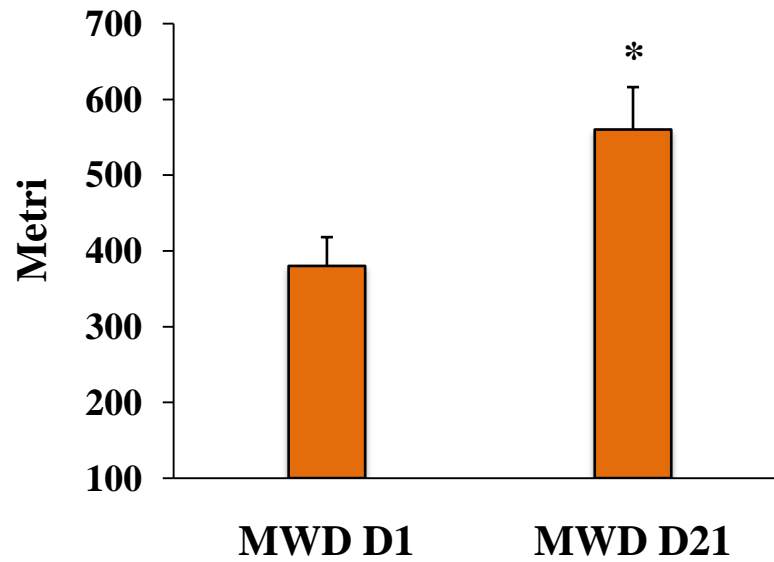
La *Figura 2a* mostra che dopo 21 sessioni di esercizio fisico controllato si ha un significativo aumento ($p<0.001$) dell'intervallo di marcia libero dal dolore (PFWD), rispettivamente da 192.3 ± 106.2 metri all'inizio del training (D1) a 359.6 ± 123.7 metri alla fine del training (D21). Inoltre, come mostrato in *Figura 2b*, i 21 giorni di training hanno aumentato significativamente ($p<0.001$) anche l'intervallo di marcia assoluto (MWD) passando da 372.8 ± 133.8 metri all'inizio del training (D1) a 590.8 ± 149.5 metri alla fine del training (D21).

FIGURA 2. Effetto del training di esercizio fisico controllato sulla capacità di marcia nei pazienti con PAD e CI



Legenda: Intervallo di marcia libero dal dolore (PFWD). I risultati sono espressi come media+DS e sono misurati in metri percorsi durante il test massimale Treadmill il primo giorno di training (D1) e dopo 21 giorni di esercizio fisico controllato (D21); * $p<0.001$ vs D1.

b)

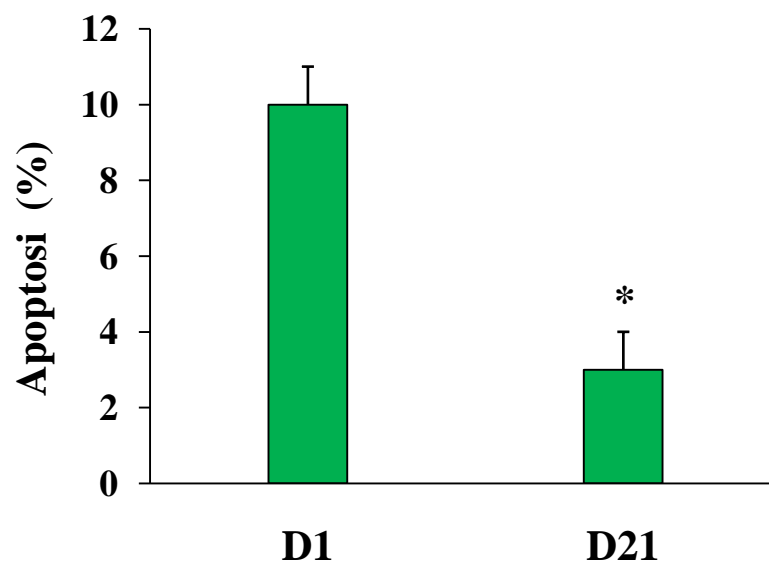


Legenda: Intervallo di marcia libero assoluto (MWD). I risultati sono espressi come media+DS e sono misurati in metri percorsi durante il test massimale Treadmill il primo giorno di training (D1) e dopo 21 giorni di esercizio fisico controllato (D21); * $p < 0.001$ vs D1.

Effetto dell'esercizio fisico controllato sull'apoptosi dei PBMC provenienti dai pazienti con PAD e CI

Abbiamo valutato se il training di esercizio fisico controllato fosse in grado di influenzare l'apoptosi dei PBMC derivanti dai nostri soggetti. Come evidenziato in *Figura 3* i nostri risultati dimostrano che l'esercizio fisico controllato determina una sostanziale riduzione ($p < 0.01$) della percentuale di PBMC apoptotici (dal 10% all'inizio del training a circa il 3% alla fine del training).

FIGURA 3. Effetto del training di esercizio fisico controllato sull'apoptosi dei PBMC derivanti dai soggetti con PAD e CI



Legenda: i risultati sono espressi come media \pm DS; D1=primo giorno di training; D21=dopo 21 giorni di esercizio fisico controllato. * $p < 0.01$ vs D1. La percentuale di cellule apoptotiche è stata determinata in citofluorimetria..

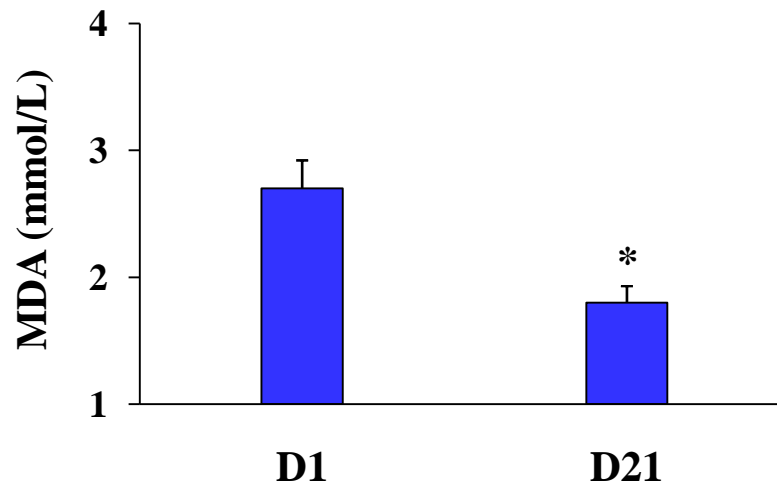
Effetto del training di esercizio fisico controllato sui markers di stress ossidativo sistemici e cellulari nei pazienti con PAD e CI

In questo studio abbiamo misurato le concentrazioni plasmatiche di MDA e GSH come markers di stress ossidativo sistemico. I nostri risultati dimostrano che l'esercizio fisico controllato induce una significativa riduzione dei livelli plasmatici di MDA ($p<0.01$), (*Figura 4a*) e un significativo aumento dei livelli plasmatici di GSH ($p<0.01$), (*Figura 4b*). Interessante è, inoltre, la dimostrazione che il training di esercizio fisico è in grado di ridurre significativamente ($p<0.01$) la produzione di ROS nei PBMC derivanti dai nostri soggetti con PAD e CI (*Figura 4c*).

Per valutare la risposta acuta all'I-R indotta dall'esercizio fisico controllato, abbiamo inoltre valutato la concentrazione plasmatica di MDA e GSH e la produzione di ROS nei PBMC derivanti dai nostri soggetti, 30 e 120 minuti dopo la fine del Treadmill test, il primo (D1) e l'ultimo giorno di training (D21). I nostri risultati dimostrano che il significativo ($p<0.01$) aumento di MDA e ROS riscontrato all'inizio del training di esercizio a partire da 30 minuti e che si mantiene elevato fino a 120 minuti, viene pressoché abolito alla fine del periodo di training di esercizio fisico (*Figura 5a-b*). Al contrario, un significativo ($p<0.01$) incremento di GSH che compare dopo 30 minuti e si mantiene elevato fino a 120 minuti, è stato evidenziato solo alla fine del training di esercizio fisico (*Figura 5c*).

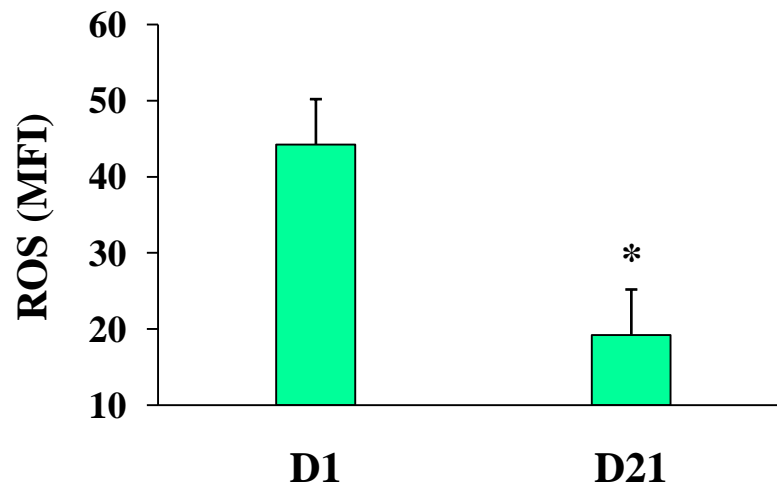
FIGURA 4. Effetto del training di esercizio fisico controllato sui markers di stress ossidativo sistemici e cellulari nei pazienti con PAD e CI

a)



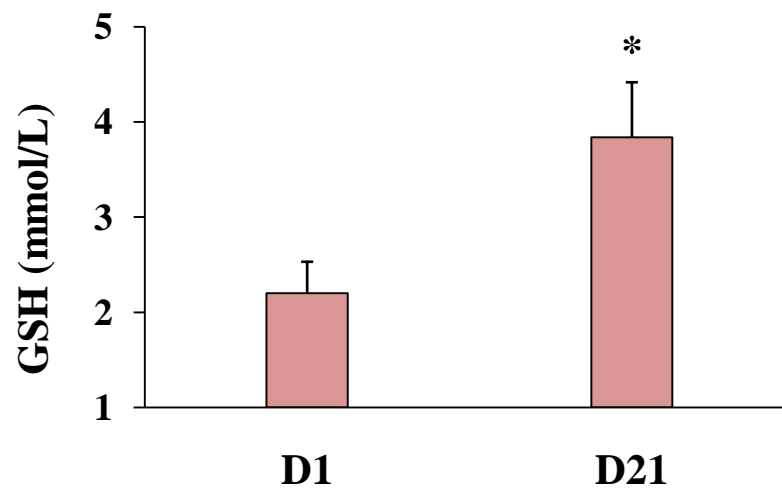
Legenda: Concentrazione plasmatica di malondialdeide (MDA) il primo giorno di training (D1) e dopo 21 giorni di esercizio fisico strutturato (D21). I risultati sono espressi come media \pm DS; * p <0.01 vs D1.

b)



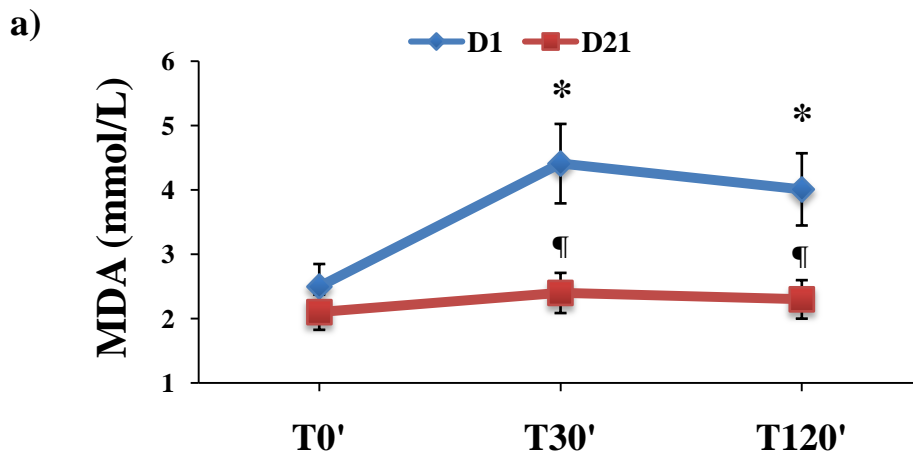
Legenda: Livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nei PBMC derivanti dai pazienti il primo giorno di training (D1) e dopo 21 giorni di esercizio fisico controllato (D21). I risultati sono espressi come media \pm DS. MFI= intensità media di fluorescenza * p <0.01 vs D1.

c)

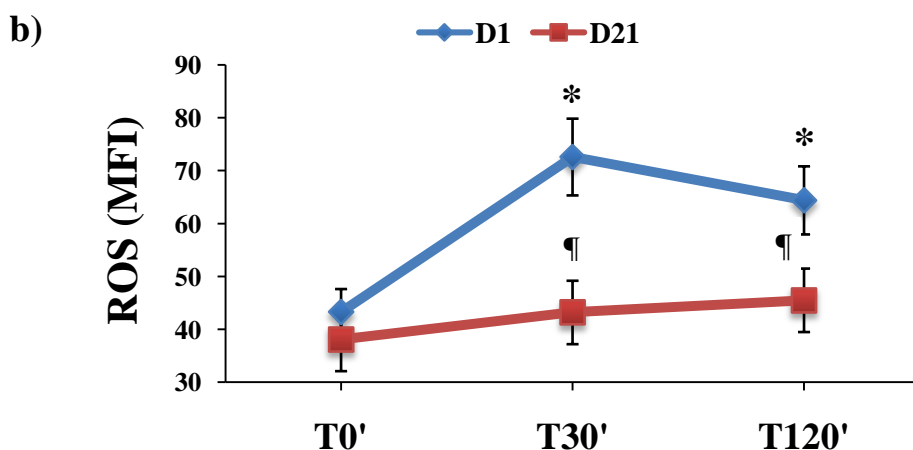


Legenda: Concentrazione plasmatica di glutatione (GSH) il primo giorno di training (D1) e dopo 21 giorni di esercizio fisico controllato (D21). I risultati sono espressi come media \pm DS; *p<0.01 vs D1.

FIGURA 5. Effetto del training di esercizio fisico controllato sulla risposta acuta all'I-R sui markers di stress ossidativo sistemici e cellulari nei pazienti con PAD e CI

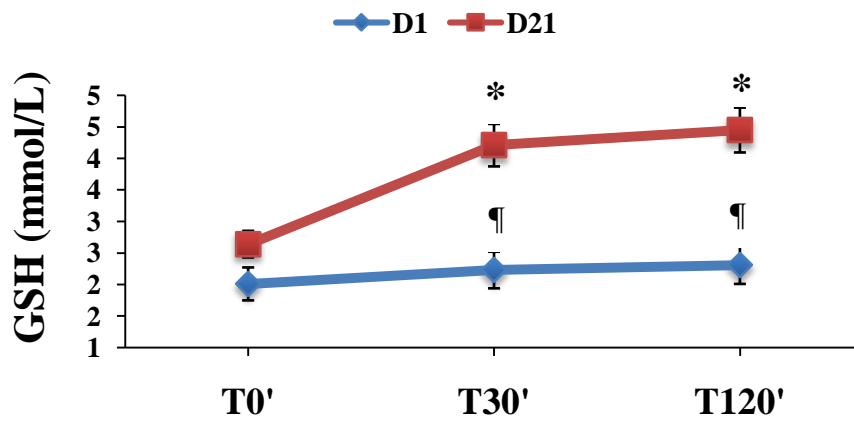


Legenda: Concentrazione plasmatica di malondialdeide (MDA) all'inizio (D1) e alla fine (D21) del training di esercizio fisico, prima del Treadmill test (T0') e dopo 30 (T30') e 120 minuti (T120') dalla fine del Treadmill test. I risultati sono espressi come media \pm DS; *p<0.01 vs T0; ‡ p<0.01 vs D1.



Legenda: Livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nei PBMC derivanti dai pazienti all'inizio (D1) e alla fine (D21) del training di esercizio fisico, prima del Treadmill test (T0') e dopo 30 (T30') e 120 minuti (T120') dalla fine del Treadmill test. MFI=intensità media di fluorescenza. I risultati sono espressi come media \pm DS; *p<0.01 vs T0; ‡ p<0.01 vs D1.

c)



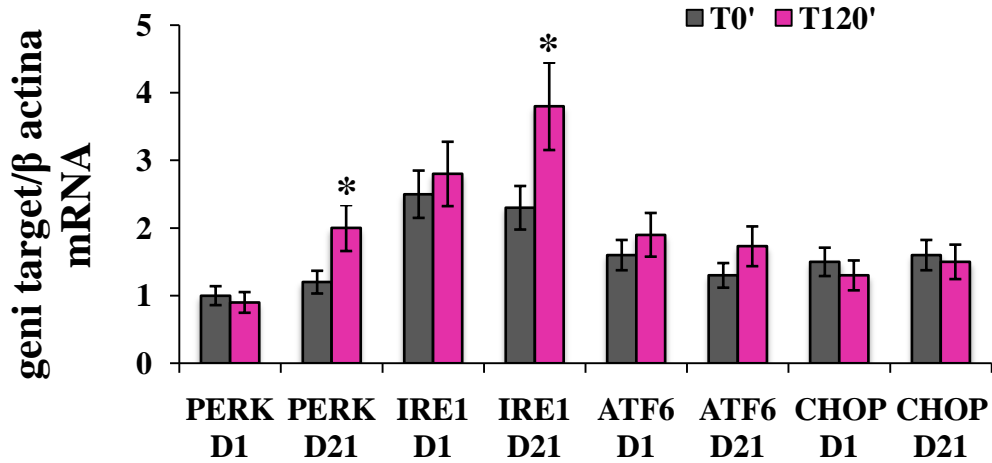
Legenda: Concentrazione plasmatica di glutatione (GSH) all'inizio (D1) e alla fine (D21) del training di esercizio fisico, prima del Treadmill test (T0') e dopo 30 (T30') e 120 minuti (T120') dalla fine del Treadmill test. I risultati sono espressi come media \pm DS; *p<0.01 vs T0'; ¶ p<0.01 vs D1.

Effetto dell'esercizio fisico controllato sull'espressione genica delle vie di segnale UPR e Nrf2/ARE nei PBMC derivanti dai pazienti con PAD e CI

Abbiamo poi analizzato il possibile coinvolgimento delle vie di segnale UPR e Nrf2/ARE nel miglioramento della sopravvivenza cellulare e nella riduzione dei markers di stress ossidativo indotti dal training di esercizio fisico controllato. Abbiamo pertanto valutato l'espressione genica delle vie di segnale UPR e Nrf2/ARE nei PBMC dei pazienti prima e dopo Treadmill test all'inizio e alla fine dei 21 giorni di training. I nostri risultati mostrano che il training di esercizio fisico determina un significativo aumento dell'espressione (mRNA) di PERK ($p < 0.01$) e IRE1 ($p < 0.01$), mentre l'espressione di ATF6 e CHOP resta invariata (*Figura 6a*). Inoltre, l'esercizio fisico ha determinato anche un significativo aumento dell'espressione (mRNA) di Nrf2 ($p < 0.01$), HO-1 ($p < 0.01$) e GCLC ($p < 0.01$), (*Figura 6b*). Analogamente, abbiamo riscontrato un significativo aumento della concentrazione nucleare di ATF4 ($p < 0.01$), (*Figura 7a*), XBP1 ($p < 0.01$), (*Figura 7b*) e Nrf2 ($p < 0.01$), (*Figura 7c*) alla fine dei 21 giorni di training, mentre la concentrazione nucleare di CHOP non si è modificata (risultati non mostrati).

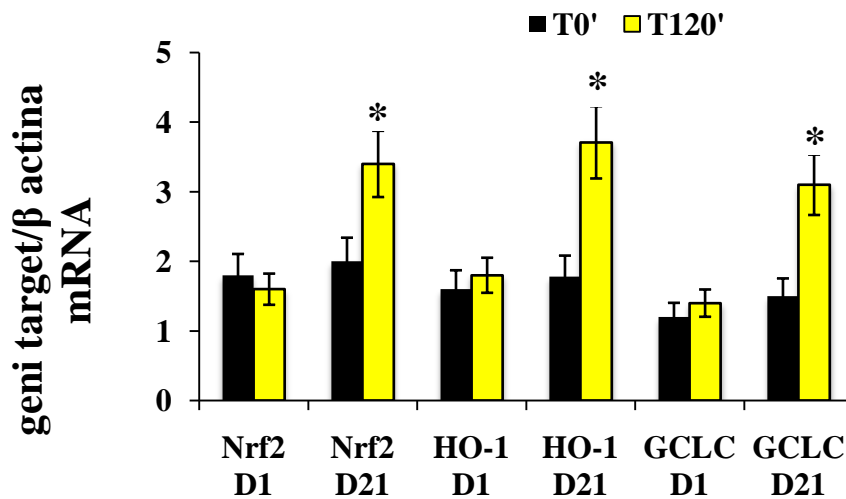
FIGURA 6. Effetto del training di esercizio fisico sull'espressione genica delle vie UPR e Nrf2/ARE nei PBMC derivanti dai pazienti con PAD e CI

a)



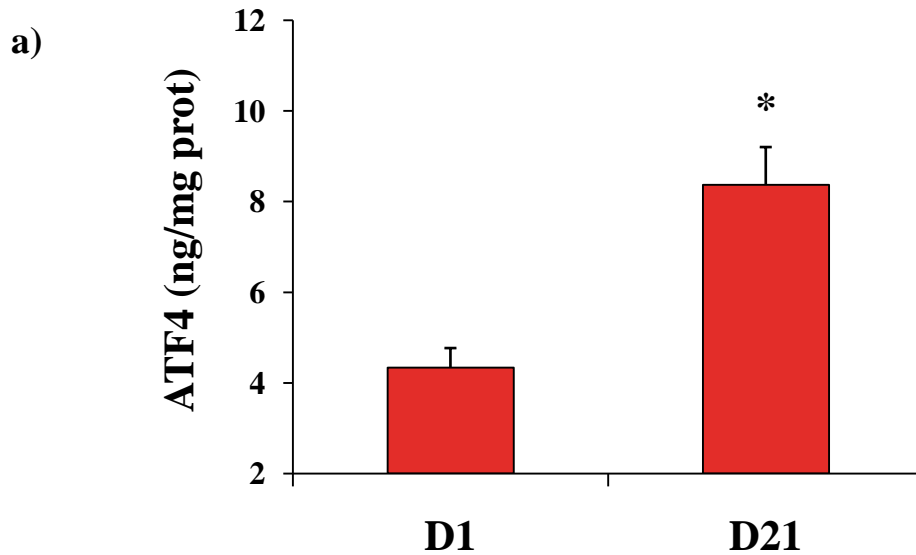
Legenda: Espressione (mRNA) di PERK, IRE1, ATF6 e CHOP nei PBMC dei pazienti prima del Treadmill test (T0') e dopo due ore dalla fine del Treadmill test (T120'), all'inizio (D1) e alla fine (D21) del training di esercizio fisico. *p<0.01 vs T0'.

b)

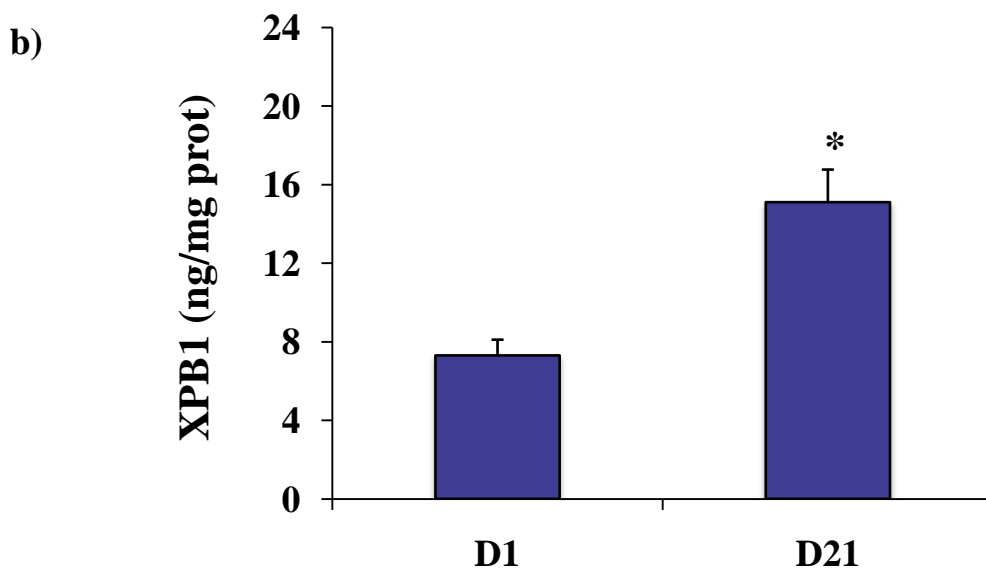


Legenda: Espressione (mRNA) di Nrf2, HO-1, GCLC nei PBMC dei pazienti prima del Treadmill (T0') e dopo due ore dalla fine del Treadmill test(T120'), all'inizio (D1) e alla fine (D21) del training di esercizio fisico. *p<0.01 vs T0'.

FIGURA 7. Effetto del training di esercizio fisico controllato sulla concentrazione nucleare di ATF4, XBP1 e Nrf2 nei PBMC derivanti dai pazienti con PAD e CI

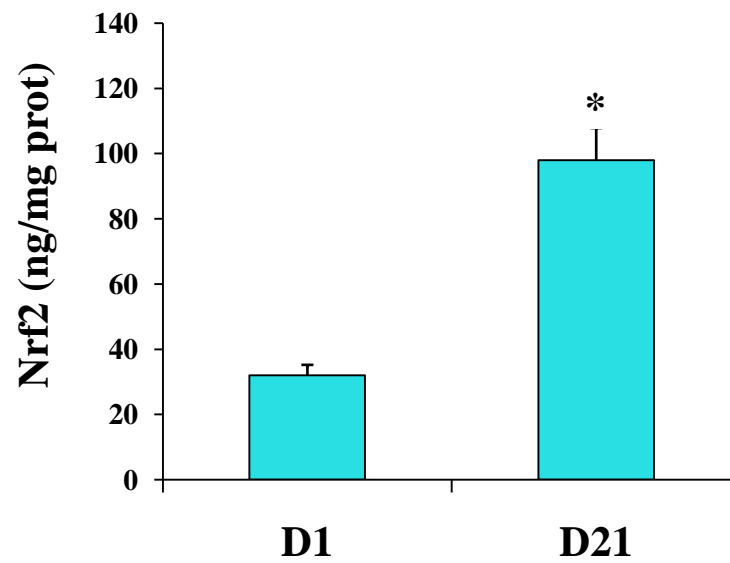


Legenda: Concentrazione nucleare di ATF4 nei PBMC derivanti dai pazienti all'inizio (D1) e alla fine (D21) del training di esercizio fisico. I risultati sono espressi come media \pm DS; *p<0.01 vs D1.



Legenda: Concentrazione nucleare di XBP1 nei PBMC derivanti dai pazienti all'inizio (D1) e alla fine (D21) del training di esercizio fisico. I risultati sono espressi come media \pm DS; *p<0.01 vs D1.

c)

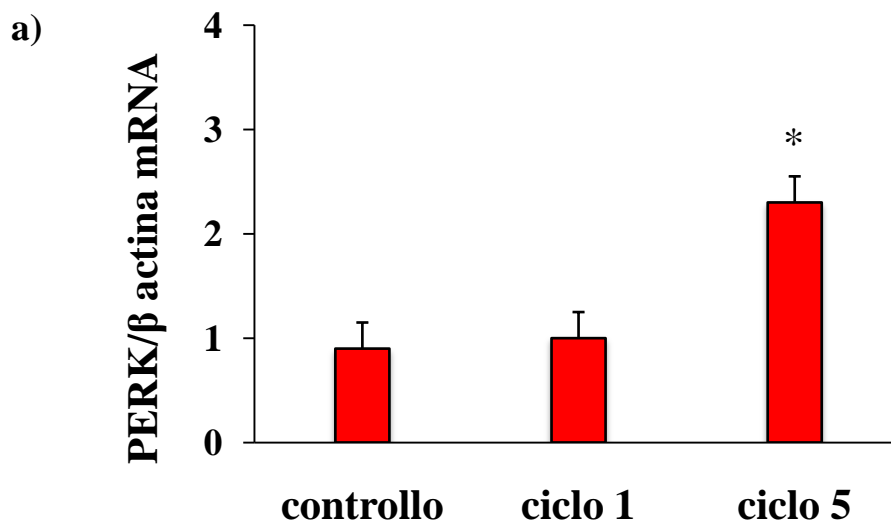


Legenda: Concentrazione nucleare di Nrf2 nei PBMC derivanti dai pazienti all'inizio (D1) e alla fine (D21) del training di esercizio fisico. I risultati sono espressi come media \pm DS; *p<0.01 vs D1.

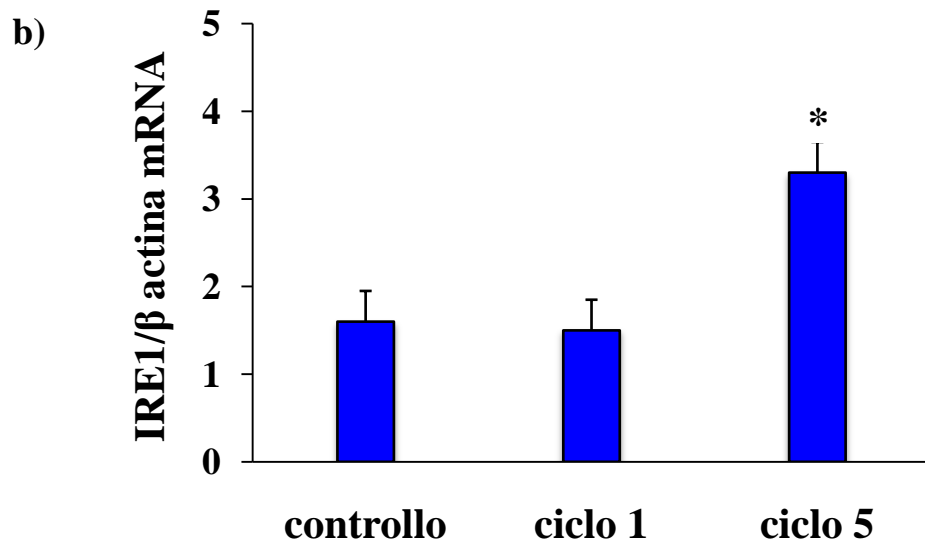
Effetto di ripetuti cicli di I-R (ischemic preconditioning) sull'espressione genica delle vie di segnale UPR e Nrf2/ARE in cellule THP-1

Per chiarire se l'aumentata espressione genica delle vie di sopravvivenza cellulare indotta dal training di esercizio fisico nei PBMC dei pazienti potesse essere dovuta ai ripetuti episodi di I-R, le cellule THP-1 sono state sottoposte a multipli (5) cicli di I-R. I nostri risultati mostrano un significativo aumento dell'espressione (mRNA) di PERK ($p<0.01$), IRE1 ($p<0.01$) e Nrf2 ($p<0.01$) alla fine del 5° ciclo di I-R, rispetto al 1° ciclo (*Figura 8a-c*). Queste variazioni di espressione di UPR e Nrf2 si associano a un concomitante significativo aumento della concentrazione nucleare di ATF4 ($p<0.01$), XBP1 ($p<0.01$) e Nrf2($p<0.01$), alla fine del 5° ciclo di I-R, rispetto al 1° ciclo (*Figura 9a-c*).

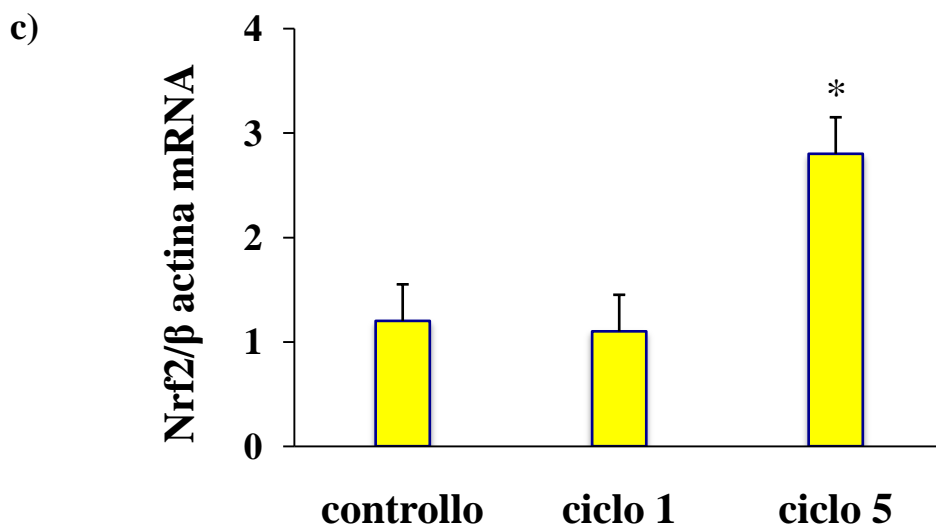
FIGURA 8. Effetto di ripetuti cicli di I-R (ischemic preconditioning) sull'espressione genica dei sensori UPR e di Nrf2 in cellule THP-1



Legenda: Espressione (mRNA) di PERK nelle cellule THP1 sottoposte a multipli (5) cicli di I-R. I risultati sono espressi come media \pm DS; * $p<0.01$ vs ciclo 1.

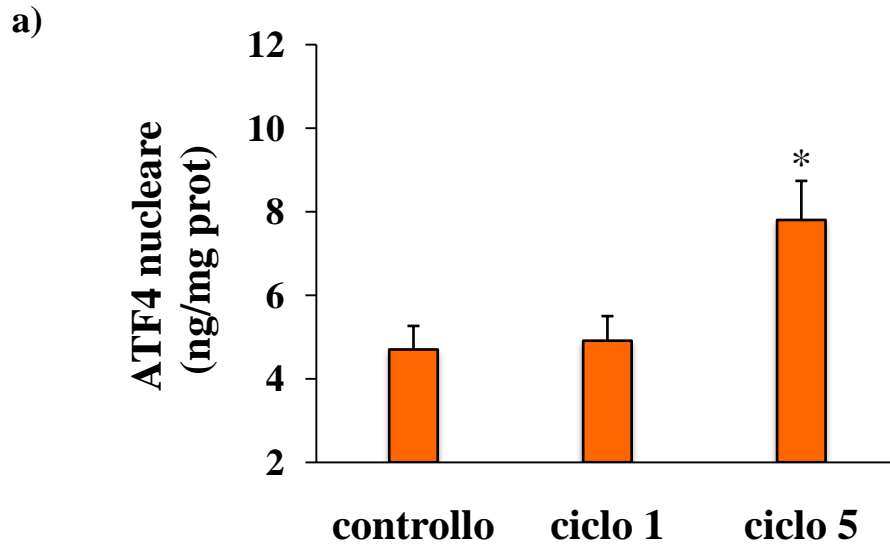


Legenda: Espressione (mRNA) di IRE1 nelle cellule THP1 sottoposte a multipli (5) cicli di I-R. I risultati sono espressi come media \pm DS; *p<0.01 vs ciclo 1.

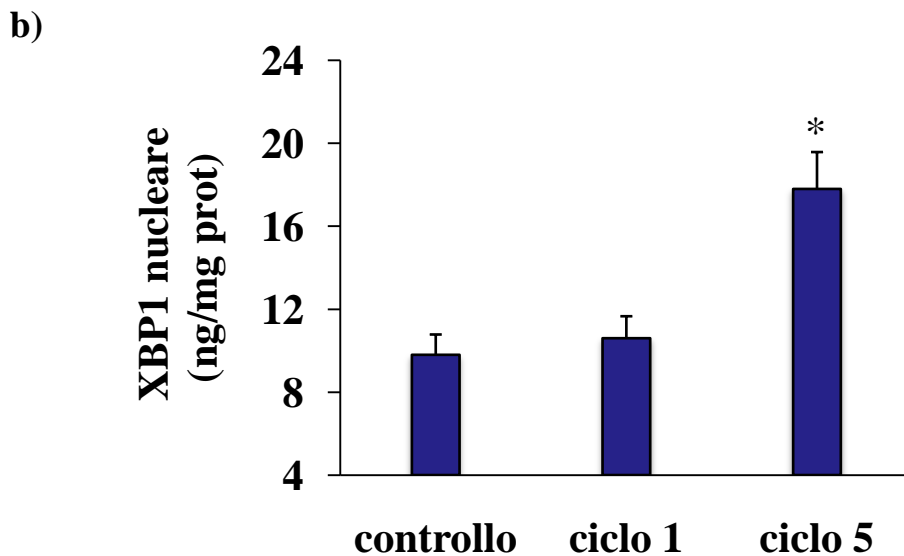


Legenda: Espressione (mRNA) di Nrf2 nelle cellule THP1 sottoposte a multipli (5) cicli di I-R. I risultati sono espressi come media \pm DS; *p<0.01 vs ciclo 1.

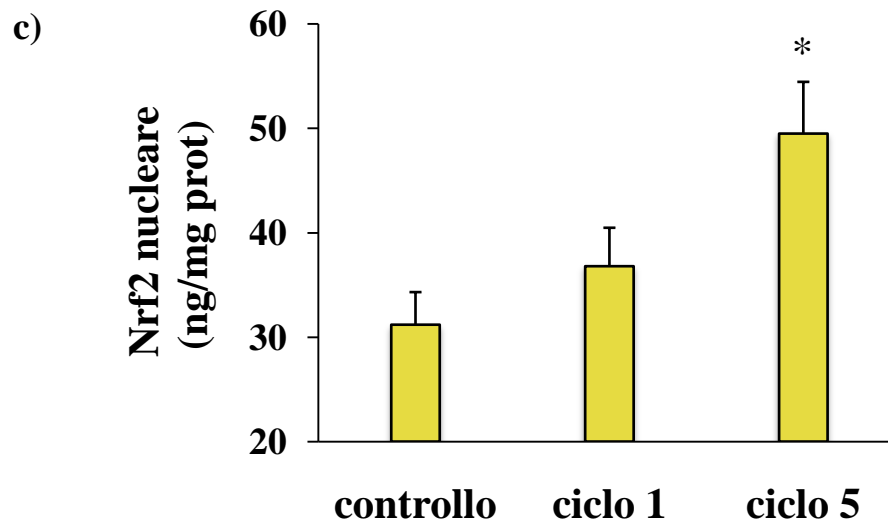
FIGURA 9. Effetto di ripetuti cicli di I-R (ischemic preconditioning) sulla concentrazione nucleare di ATF4, XBP1 e Nrf2 in cellule THP-1



Legenda: Concentrazione nucleare di ATF4 in cellule THP-1 sottoposte a multipli (5) cicli di I-R. I risultati sono espressi come media \pm DS; *p<0.01 vs ciclo 1.



Legenda: Concentrazione nucleare di XBP1 in cellule THP-1 sottoposte a multipli (5) cicli di I-R. I risultati sono espressi come media \pm DS; *p<0.01 vs ciclo 1.



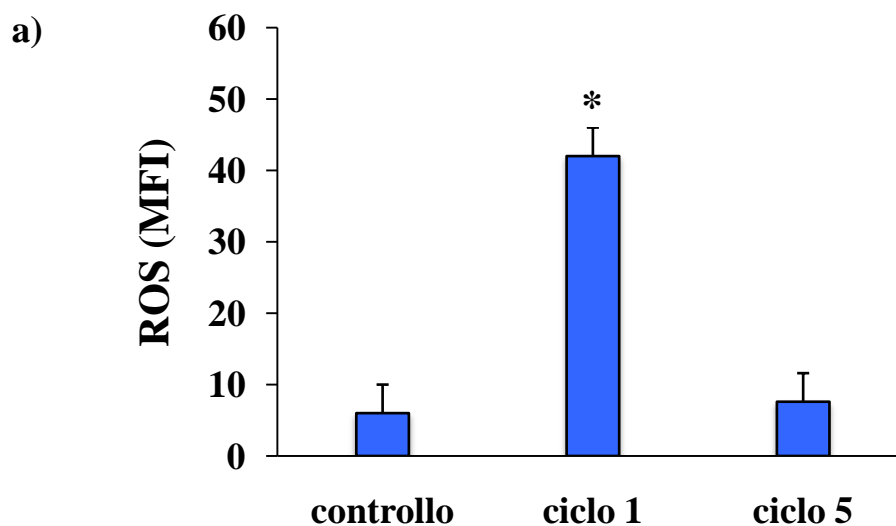
Legenda: Concentrazione nucleare di Nrf2 in cellule THP-1 sottoposte a multipli (5) cicli di I-R. I risultati sono espressi come media \pm DS; * $p < 0.01$ vs ciclo 1.

Effetto di ripetuti episodi di I-R (ischemic preconditioning) sui markers di stress ossidativo e sull'apoptosi in cellule THP1

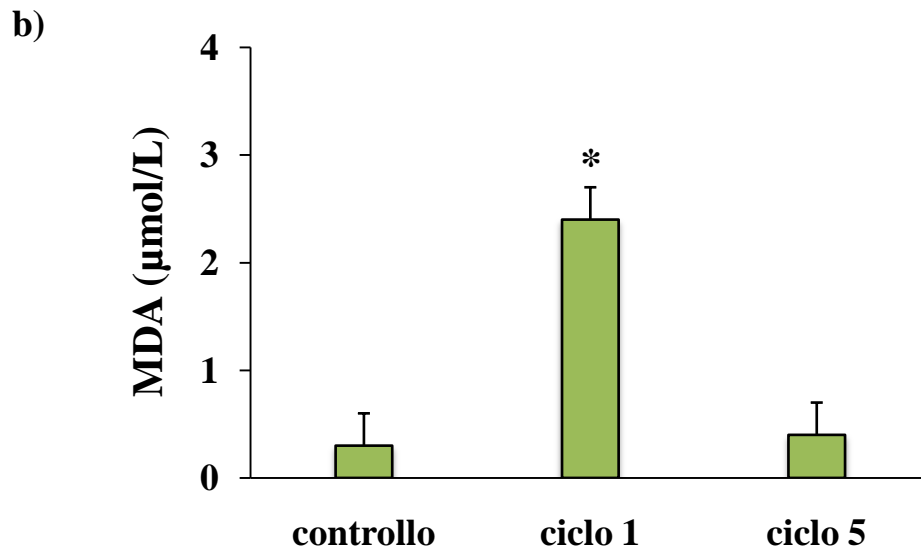
Quando le cellule THP-1 sono state sottoposte a multipli cicli di I-R, abbiamo osservato un significativo aumento dei ROS intracellulari ($p < 0.01$) e di MDA ($p < 0.01$) nel medium di coltura dopo il 1° ciclo di I-R, che veniva quasi completamente abolito dopo il 5° ciclo di I-R. Al contrario, la concentrazione di GSH nel medium che era significativamente ridotta ($p < 0.01$) dopo il 1° ciclo di I-R, ritornava verso i livelli basali alla fine del 5° ciclo di I-R (*Figura 10a-c*).

Per quanto riguarda la citotossicità, il significativo aumento dell'apoptosi delle cellule THP1 ($p < 0.01$) riscontrato dopo il 1° ciclo di I-R era quasi completamente abolito alla dopo il 5° ciclo di I-R (*Figura 11*).

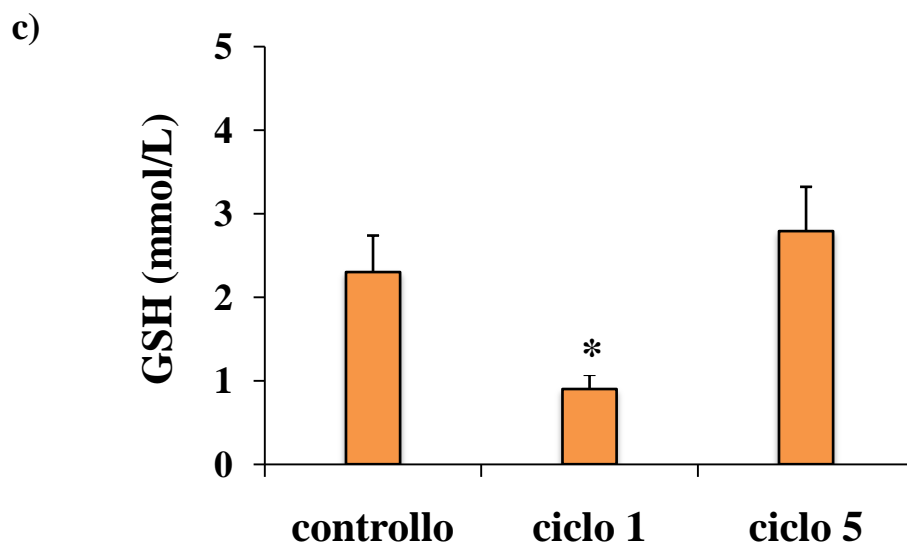
FIGURA 10. Effetto di ripetuti cicli di I-R (ischemic preconditioning) sui markers di stress ossidativo in cellule THP1



Legenda: Livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in cellule THP-1 sottoposte a multipli (5) cicli di I-R. MFI= intensità media di fluorescenza. I risultati sono espressi come media \pm DS; * $p < 0.01$ vs ciclo 1.



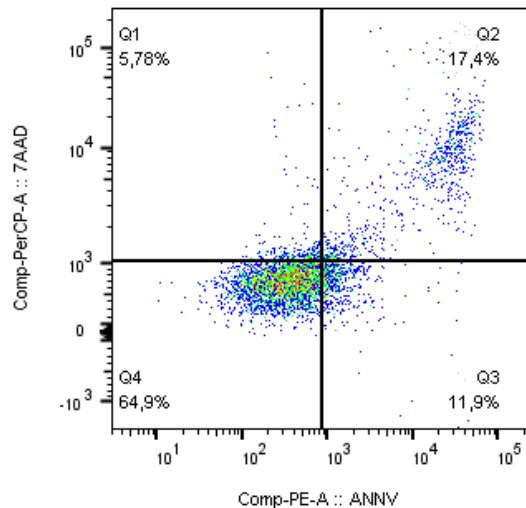
Legenda: Concentrazione di malondialdeide (MDA) nel medium di coltura in cellule THP-1 sottoposte a multipli (5) cicli di I-R. I risultati sono espressi come media \pm DS; *p<0.01 vs ciclo 1.



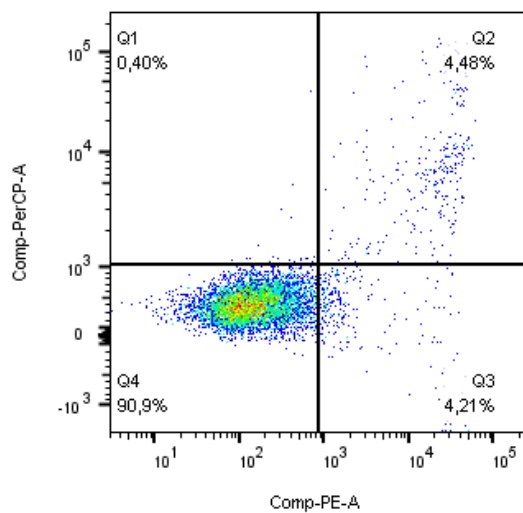
Legenda: Concentrazione di glutatione (GSH) nel medium di coltura in cellule THP-1 sottoposte a multipli (5) cicli di I-R. I risultati sono espressi come media \pm DS; *p<0.01 vs ciclo 5.

FIGURA 11. Effetto di ripetuti cicli di I-R (ischemic preconditioning) sull'apoptosi in cellule THP1

a) Dopo il 1° ciclo di I-R

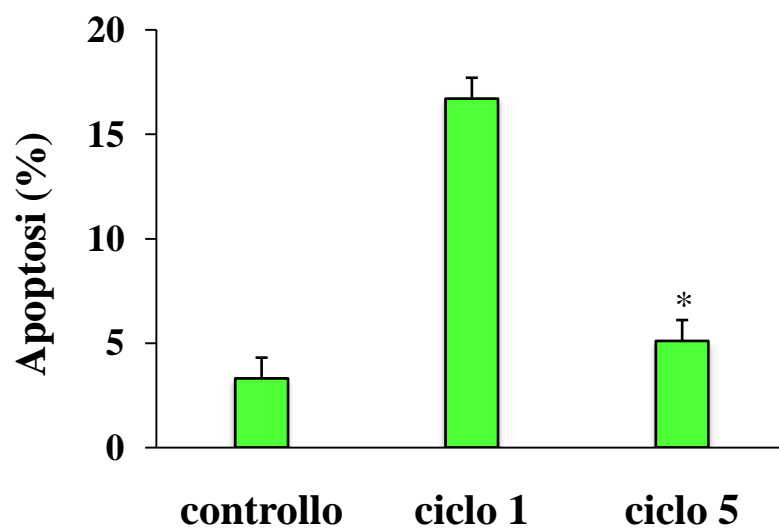


b) Dopo il 5° ciclo di I-R



Legenda. Esempio di distribuzione citofluorimetrica delle cellule THP-1 sottoposte a multipli (5) cicli di I-R. Q1: cellule necrotiche,annexina V⁻/propidio ioduro⁺; Q2: cellule apoptotiche, annexina V⁺/propidio ioduro⁺; Q3: cellule preapoptotiche,annexina V⁺/propidio ioduro⁻; Q4: cellule vive,annexina V⁻/propidio ioduro⁻.

c)



Legenda: Percentuale di cellule THP-1 apoptotiche sottoposte a multipli cicli (5) di I-R. I risultati sono espressi come media \pm DS e sono la media di esperimenti eseguiti in triplo.*p<0.01 vs ciclo 1.

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio dimostrano che un breve periodo di attività fisica controllata in pazienti con PAD e CI aumenta in modo significativo sia MWD che PWFD. I nostri dati sono in accordo con quelli di Andreozzi et al (43) i quali hanno evidenziato che periodi anche brevi di attività fisica controllata sono uno strumento assai utile per migliorare la CI in pazienti affetti da PAD ed hanno un'efficacia assai simile ad allenamenti più protratti nel tempo. Nel nostro studio abbiamo anche osservato un'aumentata sopravvivenza dei PBMC e una riduzione dello stress ossidativo con contemporaneo aumento del GSH, il più importante antiossidante endogeno, che è in grado di proteggere le cellule muscolari dai danni ischemici (44). Questi risultati sembrano quindi suggerire che la risposta adattativa indotta dal training di attività fisica, caratterizzato da ripetuti episodi di I-R, potrebbe modificare le cellule verso un "fenotipo resistente". È possibile che il miglioramento dello stress ossidativo determinato dall'esercizio fisico possa aver contribuito all'adattamento dei PBMC necessario per la sopravvivenza.

I risultati di questo studio evidenziano, inoltre, che un breve periodo di attività fisica controllata è in grado di ridurre quasi completamente lo stress ossidativo sistemico e nei PBMC indotto dall'esercizio massimale, come avviene nel Treadmill test, e di aumentare significativamente il GSH. Sebbene sia stato precedentemente riportato in pazienti con PAD e CI che l'esercizio massimale aumenta i livelli di MDA (45) e riduce quelli di GSH (46), i risultati del nostro studio per la prima volta dimostrano che un breve ciclo di attività fisica controllata è in grado di contrastare l'esacerbazione dello stress ossidativo indotta dall'esercizio massimale. Questo risultato può aver anche contribuito al miglioramento della capacità di cammino riscontrata nei nostri pazienti, poiché è stato in precedenza riportato che la riduzione dello stress ossidativo nei pazienti con PAD e CI si associa a un miglioramento di MWD (47). I nostri risultati nei PBMC sono in linea con precedenti evidenze ottenute in biopsie muscolari di pazienti con PAD che dimostrano un aumentato stress ossidativo e una degenerazione delle cellule muscolari (7-48). Anche se, sulla base dei nostri dati non possiamo concludere che le alterazioni dei PBMC riscontrate nei nostri pazienti con PAD e CI riflettano il danno delle cellule muscolari, i nostri risultati

suggeriscono che i PBMC possano rappresentare un promettente, non-invasivo, marker sistemico di citotossicità e di stress ossidativo. Inoltre, la dimostrazione che il training di esercizio fisico modifica questi parametri, rafforza ulteriormente questa ipotesi.

Sebbene dai risultati del nostro studio non possiamo sapere con certezza la causa del miglioramento della sopravvivenza dei PBMC, un'ipotesi potrebbe essere che i ripetuti episodi di I-R che avvengono durante il training di esercizio fisico, inducano stress del RE con successiva attivazione delle vie di segnale UPR (20) e Nrf2. L'UPR trasmette informazioni sul corretto ripiegamento delle proteine dal lume del RE al citoplasma e al nucleo per indurre risposte adattative (20); inoltre, l'UPR favorisce la biogenesi del RE, aumenta il ripiegamento, i meccanismi di controllo e regola la traslazione delle proteine. Pertanto, i sensori di UPR possono integrare informazioni in merito alla durata e all'intensità dello stress determinando il destino delle cellule, verso una risposta adattativa oppure verso la morte cellulare (20). I nostri risultati dimostrano per la prima volta che il training di esercizio fisico induce un aumento significativo dell'espressione (mRNA) di PERK e IRE1 nei PBMC alla fine del Treadmill test. Inoltre, questo incremento di PERK e IRE1 si associa ad un significativo aumento della concentrazione nucleare di ATF4 e XBP1, confermando l'attivazione della via UPR. Questi risultati, seppur in diverse condizioni sperimentali, sono in linea con precedenti lavori che hanno dimostrato l'attivazione di UPR in diversi modelli di I-R (27-28-29-30-49) ed indicano che il training di esercizio fisico, caratterizzato da ripetuti episodi di I-R, può aver contribuito all'adattamento pro-sopravvivenza dei PBMC. Un ulteriore contributo alla sopravvivenza cellulare dimostrata dopo il training di esercizio fisico controllato potrebbe essere ascrivibile all'attivazione della via di segnale Nrf2/ARE. È noto che l'I-R produce ROS che danneggiano le cellule muscolari, alterano le funzioni dei mitocondri e favoriscono l'apoptosi e la morte cellulare (7-8-48-50-51-52). In questo contesto, interessanti sono le recenti evidenze che indicano come l'Nrf2 sia in grado di ridurre i danni indotti dall'I-R (15-53).

Analogamente a quanto dimostrato per PERK e IRE1, i nostri risultati dimostrano che il training di esercizio fisico controllato determina un significativo aumento

dell'espressione (mRNA) di Nrf2, HO-1 e GCLC dopo Treadmill test; inoltre, la dimostrazione che l'Nrf2 aumenta anche nel nucleo conferma l'attivazione di questa via. Poiché la formazione di ROS sembra giocare un ruolo importante nel danno muscolare indotto dall'I-R (7), ridurre lo stress ossidativo è un potenziale utile approccio terapeutico per prevenire i danni da I-R. In questo lavoro, per la prima volta dimostriamo che un breve ciclo di esercizio fisico controllato induce un significativo aumento dell'espressione genica di Nrf2 e dei suoi geni correlati nei PBMC provenienti da pazienti con PAD e CI. Poiché in questi pazienti il training di esercizio fisico controllato è caratterizzato da ripetuti episodi di I-R i nostri risultati, seppur in diverse condizioni sperimentali, sono in accordo con precedenti evidenze che indicano che l'Nrf2 aumenta dopo I-R sia nelle cellule cardiache (54) che renali (55). Recenti evidenze inoltre, dimostrano che alcune sostanze che agiscono come attivatori della via di segnale Nrf2 sono in grado di proteggere le cellule nei confronti del danno da I-R (15-53). Queste osservazioni quindi, indicano che l'attivazione della via di segnale Nrf2/ARE indotta dal training di esercizio fisico nei nostri pazienti con PAD e CI potrebbe proteggere contro i danni da I-R ed essere il possibile determinante dell'adattamento alla sopravvivenza cellulare. Nel complesso i risultati del nostro studio evidenziano che un breve ciclo di esercizio fisico controllato induce una serie di adattamenti nei PBMC dei pazienti con PAD e CI che potrebbe contribuire a ridurre i danni cellulari provocati dall'I-R.

Ovviamente basandoci sui nostri risultati non possiamo concludere che la riduzione del danno cellulare e il conseguente miglioramento della sopravvivenza cellulare dopo un breve ciclo di attività fisica dipendano solamente dall'attivazione di UPR e Nrf2, indotta dall'I-R. Sembra però un'ipotesi stimolante e ulteriori studi saranno necessari per confermare l'esistenza di una relazione causa-effetto perchè fino ad oggi non esistono studi in modelli animali che valutino gli effetti positivi o negativi di alterate (over o down) espressioni di PERK/ATF4 durante danno da I-R. Al momento, è stato solamente dimostrato che l'aumentata espressione di XBP1s nelle cellule miocardiche è in grado di ridurre l'area infartuale e migliorare la funzione cardiaca dopo danno da I-R (56).

Abbiamo infine riprodotto *in vitro* un modello di I-R ed abbiamo valutato l'attivazione di UPR e Nrf2, la citotossicità e lo stress ossidativo in cellule THP1 sottoposte a multipli e consecutivi cicli di I-R. I nostri risultati dimostrano un significativo aumento dell'espressione di PERK, IRE1 e Nrf2 alla fine dei cicli di I-R, mentre i parametri di stress ossidativo e la citotossicità che aumentavano dopo la prima I-R, si riducevano significativamente alla fine dei multipli cicli di I-R. Al meglio delle nostre conoscenze, questa è la prima dimostrazione *in vitro* che multipli, relativamente brevi, episodi di I-R hanno un effetto antiossidante e pro-sopravvivenza probabilmente legato all'attivazione di UPR e Nrf2.

Anche se i risultati di questo studio non ci consentono una completa spiegazione del meccanismo sottostante, un'ipotesi potrebbe essere che brevi, multipli episodi di I-R potrebbero innescare un adattamento all'ipossia e un "conditioning", simile all'IP. L'evidenza che il training di esercizio fisico migliora lo stress ossidativo e la sopravvivenza cellulare nei nostri pazienti con PAD e CI può supportare l'ipotesi che ripetuti, brevi episodi di I-R possano innescare il "conditioning" attraverso l'attivazione di UPR e Nrf2.

In conclusione, in questo studio i PBMC si sono dimostrati un utile, promettente e non invasivo marker degli adattamenti positivi indotti dal training di esercizio fisico controllato nei pazienti con PAD e CI. Nello specifico, i nostri risultati dimostrano che l'esercizio fisico determina un'attivazione delle vie UPR e Nrf2 nei PBMC, che potrebbero contribuire a modificare le cellule verso un "fenotipo resistente".

BIBLIOGRAFIA

1. Criqui MH, Langer RD, Fronek A, Feigelson HS, Klauber MR, McCann TJ, Browner D. Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *N. Engl. J. Med.* 1992;326:381-6.
2. Belch JJF, Topol EJ, Agnelli G, Bertrand M, Califf RM, Clement DL, Creager MA, Easton JD, Gavin JR 3rd, Greenland P, Hankey G, Hanrath P, Hirsch AT, Meyer J, Smith SC, Sullivan F, Weber MA. Critical issues in peripheral arterial disease detection and management: a call to action. *Arch. Intern. Med.* 2003;163:884-92.
3. Kannel WB, McGee DL. Update on some epidemiologic features of intermittent claudication: the Framingham Study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 1985;33:13-8.
4. Hirsch AT, Criqui MH, Treat-Jacobson D, et al. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA.* 2001;286:1317-24.
5. Peach G, Griffin M, Jones KG, Thompson MM, Hinchliffe RJ. Diagnosis and management of peripheral arterial disease. *BMJ.* 2012;345:e5208.
6. De Groot H, Rauen U. Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplant. Proc.* 2007;39:481-484.
7. Weiss DJ, Casale GP, Koutakis P, Nella AA, Swanson SA, Zhu Z, Miserlis D, Johanning JM, Pipinos II. Oxidative damage and myofiber degeneration in the gastrocnemius of patients with peripheral arterial disease. *J. Transl. Med.* 2013;11:230.
8. Anderson JD, Epstein FH, Meyer CH, Hagspiel KD, Wang H, Berr SS, Harthun NL, Weltman A, Dimaria JM, West AM, Kramer CM. Multifactorial determinants of functional capacity in peripheral arterial disease: uncoupling of calf muscle perfusion and metabolism. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009;54:628-635.
9. Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2003;43:233-260.

10. Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends. Mol. Med.* 2004;10:549-557.
11. Gupte AA, Lyon CJ, Hsueh WA. Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like-2 Factor (Nrf2), a key regulator of the Antioxidant Response to protect against Atherosclerosis and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Curr. Diab. Rep.* 2013;13:362-371.
12. Keum YS, Choi BY. Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Molecules.* 2014;19:10074-89.
13. Zhang Y, Gordon GB. A strategy for cancer prevention: stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Mol. Cancer. Ther.* 2004;3:885-93. Review.
14. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects. Med.* 2009;30:42-59.
15. Calvert JW, Elston M, Nicholson CK, SusheelGundewar S, Jha S, Elrod JW, et al. Genetic and pharmacologic hydrogen sulfide therapy attenuates ischemia-induced heart failure in mice. *Circulation.* 2010;122:11-19.
16. Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *MutationResearch.* 2005;569:29-63.
17. Malhotra JD and Kaufman RJ. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2007;18:716-731.
18. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007;8:519-29.
19. Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2003;4:181-191.
20. Dufey E, Sepúlveda D, Rojas-Rivera D, Hetz C. Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease. 1. An overview. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2014;307:C582-C594.

21. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T & Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 2001;107:881-891.
22. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T & Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell*. 1999;10:3787-3799.
23. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS & Goldstein JL. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell*. 2000;6:1355-1364.
24. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A & Mori K. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1. *Dev. Cell*. 2007;13:365-376.
25. Nowak WN, Mika P, Nowobilski R, et al. Exercise training in intermittent claudication: effects on antioxidant genes, inflammatory mediators and proangiogenic progenitor cells. *Thromb. Haemost.* 2012;108:824-31.
26. Altamirano F, Wang ZV, Hill JA. Cardioprotection in ischaemia-reperfusion injury: novel mechanisms and clinical translation. *J. Physiol.* 2015;593:3773-3788.
27. Martindale JJ, Fernandez R, Thuerauf D, Whittaker R, Gude N, Sussman MA & Glembotski CC. Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6. *Circ. Res.* 2006;98:1186-1193.
28. Doroudgar S, Thuerauf DJ, Marcinko MC, Belmont PJ & Glembotski CC. Ischemia activates the ATF6 branch of the endoplasmic reticulum stress response. *J. Biol. Chem.* 2009;284:29735-29745.
29. Brooks AC, Guo Y, Singh M, McCracken J, Xuan YT, Srivastava S, Bolli R & Bhatnagar A. Endoplasmic reticulum stress-dependent activation of ATF3 mediates the late phase of ischemic preconditioning. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2014;76:138-147.

30. Thuerlauf DJ, Marcinko M, Gude N, Rubio M, Sussman MA & Glembotski CC. Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes. *Circ. Res.* 2006;99:275-282.
31. Hausenloy DJ, Yellon DM. The therapeutic potential of ischemic conditioning: an update. *Nat. Rev. Cardiol.* 2011;8:619-629.
32. Murry CE, Jennings RB and Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74:1124-1136.
33. Whittaker P, Przyklenk K. From ischemic conditioning to 'hyperconditioning': clinical phenomenon and basic science opportunity. *Dose Response.* 2014;12:650-663.
34. Lane R, Ellis B, Watson L, Leng GC. Exercise for intermittent claudication (Review). *The Cochrane Library* 2014, Issue 7 Copyright © 2014 The Cochrane Collaboration.
35. Fokkenrood HJ, Bendermacher BL, Lauret GJ, Willigendael EM, Prins MH, Tejjink JA. Supervised exercise therapy versus non-supervised exercise therapy for intermittent claudication. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2013;8:CD005263.
36. Fakhry F, van de Luitgaarden KM, Bax L, et al. Supervised walking therapy in patients with intermittent claudication. *J.Vasc. Surg.* 2012;56:1132-1142.
37. Tendera M, Aboyans V, Bartelink ML, et al. ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases. *Eur. Heart J.* 2011;32:2851-2906.
38. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Vina J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radical Biology and Medicine.* 2008;44:126-131.
39. Radom-Aizik S, Zaldivar FP Jr, Haddad F, Cooper DM. Impact of brief exercise on circulating monocyte gene and microRNA expression: implications for atherosclerotic vascular disease. *Brain Behav. Immun.* 2014;39:121-129.

40. Dopheide JF, Scheer M, Doppler C, Obst V, Stein P, Vosseler M, Abegunewardene N, Gori T, Münzel T, Daiber A, Radsak MP, Espinola-Klein C. Change of walking distance in intermittent claudication: impact on inflammation, oxidative stress and mononuclear cells: a pilot study. *Clin. Res. Cardiol.* 2015;104:751-763.
41. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG; TASC II Working M, Robbs J, Schaper N, Shigematsu H, Sapoval M, White C, White J, Clement D, Creager M, Jaff M, Mohler E 3rd, Rutherford RB, Sheehan P, Sillesen H, Rosenfield K. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2007;33:S1-75.
42. Andreozzi GM, Kalodiki E, L Gašpar L, Martini R, Minar E, Angelides N, Nicolaides AN, Novo S, Visonà A, Prior M, Arosio E, Hussein EA, Poredos P, Antignani PL, Avram R, Roztocil K, Stvrtinova V, Kozak M, Vacula I. Consensus Document on Intermittent Claudication from the Central European Vascular Forum (C.E.V.F.)-3rd revision (2013). *Int. Angiol.* 2014;33(4):329-47.
43. Andreozzi GM, Martini R, Laudani R, Salimistraro G, Deinite G. Effectiveness and costs of a short-course supervised training program in claudicants: proposal for a shared protocol with aerobic working load. *Int. Angiol.* 2008;27:401-7.
44. Sirsjo A, Kagedal B, Arstrand K, et al. Altered glutathione levels in ischemic and postischemic skeletal muscle: difference between severe and moderate ischemic insult. *J. Trauma.* 1996;41:123-12.
45. Hickman P, Harrison DK, Hill A, et al. Exercise in patients with intermittent claudication results in the generation of oxygen derived free radicals and endothelial damage. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1994;361:565-570.
46. Turton EP, Coughlin PA, Kester RC, Scott DJ. Exercise training reduces the acute inflammatory response associated with claudication. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2002;23:309-316.
47. Loffredo L, Pignatelli P, Cangemi R, Andreozzi P, Panico MA, Meloni V, Violi F. Imbalance between nitric oxide generation and oxidative stress in patients with peripheral

arterial disease: effect of an antioxidant treatment. *J.Vasc. Surg.* 2006;44:525-530.

48. Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. *Injury.* 2012;43:670-675.

49. Szegezdi E, Duffy A, O'Mahoney ME, Logue SE, Mylotte LA, O'Brien T & Samali A. ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2006;349:1406-1411.

50. Pipinos II, Swanson SA, Zhu Z, Nella AA, Weiss DJ, Gutti TL, McComb RD, Baxter BT, Lynch TG, Casale GP. Chronically ischemic mouse skeletal muscle exhibits myopathy in association with mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Am. J. Physiol.Regul.Integr. Comp. Physiol.* 2008;295:R290-R296.

51. Pipinos II, Judge AR, Zhu Z, Selsby JT, Swanson SA, Johanning JM, Baxter BT, Lynch TG, Dodd SL. Mitochondrial defects and oxidative damage in patients with peripheral arterial disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2006;41:262-269.

52. Pipinos II, Sharov VG, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Todor A, Filis KA, Sabbah HN. Abnormal mitochondrial respiration in skeletal muscle in patients with peripheral arterial disease. *J.Vasc. Surg.* 2003;38:827-832.

53. Ashrafian H, Czibik G, Bellahcene M, Aksentijević D, Smith AC, Mitchell SJ, Dodd MS, Kirwan J, Byrne JJ, Ludwig C, Isackson H, Yavari A, Støttrup NB, Contractor H, Cahill TJ, Sahgal N, Ball DR, Birkler RI, Hargreaves I, Tennant DA, Land J, Lygate CA, Johannsen M, Kharbanda RK, Neubauer S, Redwood C, de Cabo R, Ahmet I, Talan M, Günther UL, Robinson AJ, Viant MR, Pollard PJ, Tyler DJ, Watkins H. Fumarate is cardioprotective via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Cell.Metab.*2012;15(3):361-71.

54. Anedda A, López-Bernardo E, Acosta-Iborra B, Saadeh Suleiman M, Landázuri MO, Cadenas S. The transcription factor Nrf2 promotes survival by enhancing the expression of uncoupling protein 3 under conditions of oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.* 2013;61:395-407.

55. Leonard MO, Kieran NE, Howell K, Burne MJ, Varadarajan R, Dhakshinamoorthy S, Porter AG, O'Farrelly C, Rabb H, Taylor CT. Reoxygenation-specific activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 mediates cytoprotective gene expression in ischemia–reperfusion injury. *FASEB J.* 2006;20:2624-2626.

56. Wang ZV, Deng Y, Gao N, Pedrozo Z, Li DL, Morales CR, Criollo A, Luo X, Tan W, Jiang N, Lehrman MA, Rothermel BA, Lee AH, Lavandero S, Mammen PP, Ferdous A, Gillette TG, Scherer PE & Hill JA. Spliced X-box binding protein 1 couples the unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway. *Cell.*2014;156:1179-1192.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Luciano Cominacini per avermi offerto la possibilità di intraprendere questo percorso di crescita e di maturazione professionale.

Un particolare ringraziamento alla Dott.ssa Anna Fratta Pasini per la collaborazione e la pazienza dimostrata dal primo giorno di dottorato sino alla stesura delle tesi.

Ringrazio entrambi per avermi guidata giorno dopo giorno nel meraviglioso mondo della ricerca, insegnandomi ad affrontare le difficoltà di laboratorio, a ragionare e a risolvere dubbi e perplessità e a gioire delle piccole “grandi” soddisfazioni che la ricerca può regalare.

Uno ringraziamento al Dott. Ulisse Garbin per il suo aiuto nella realizzazione del progetto e per il suo essere di riferimento nella pratica di laboratorio.

Ringrazio il collega Dott. Andrea Pasini per avermi insegnato le basi della cromatografia e per avermi sempre supportata durante questi anni di dottorato.

Un grazie immenso alla colonna portante del laboratorio in cui ho lavorato, la Dott.ssa Chiara Stranieri. Grazie di cuore per avermi insegnato tutto il necessario per portare a termine questo percorso, grazie per la pazienza, la comprensione, l'affetto e il sostegno che mi hai regalato in questi tre anni. Sei per me il miglior esempio di passione e devozione alla ricerca, ti stimo e ti voglio un bene immenso.

Un grazie particolare a tutti i colleghi del LURM che in questi tre anni di dottorato sono diventati la mia famiglia. Grazie per aver condiviso con me le vostre esperienze di laboratorio, per avermi regalato un sorriso nelle giornate più difficili e per avermi trasmesso la vostra passione per la ricerca.

Un ringraziamento speciale a Massimo e alla mia famiglia per la loro insostituibile presenza. Grazie per avermi sostenuta in questa nuova esperienza di vita con preziosi consigli, per avermi assecondata nelle mie scelte e per avermi confortato nei momenti di difficoltà.

)