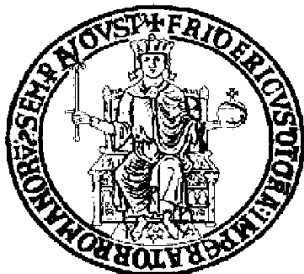


**Università degli Studi di Napoli**

**“Federico II”**



**DOTTORATO DI RICERCA**

in

Biologia applicata XXVIII ciclo

Curriculum Fisiologia

**Effetto della vitamina E sugli adattamenti del tessuto  
muscolare di ratto in seguito all'esercizio fisico**

Coordinatore

Ch.mo Prof. Ezio Ricca

Tutore

Ch.ma Prof.ssa Paola Venditti

Candidata

Dott.ssa Daniela Barone

**Anno Accademico**

**2015/2016**

# Indice

Premessa	pag.4
Introduzione	pag.6
Esercizio fisico	pag.6
• Spesa energetica nell'esercizio	pag.6
• Esercizio aerobico e anaerobico	pag.7
• Esercizio isometrico, concentrico ed eccentrico	pag.8
• Esercizio acuto e cronico	pag.9
Danno ossidativo e ROS	pag.11
• Antiossidanti cellulari	pag.16
• Enzimi antiossidanti	pag.17
• Sostanze antiossidanti	pag.19
• Proteine antiossidanti	pag.21
• Antiossidanti esogeni	pag.22
Esercizio fisico e ROS	pag.23
• Fonti di produzione di ROS durante l'esercizio	pag.27
• Perdita di elettroni a livello della catena di trasporto mitocondriale	pag.27
• Ischemia e riperfusione	pag.30
• Risposta infiammatoria	pag.33
• NAD(P)H ossidasi	pag.34
• Fosfolipasi A2	pag.35

• Ossidazione di catecolammine	pag.35
• Effetti delle ROS sul muscolo	pag.36
• Produzione di RNS	pag.37
Antiossidanti nell'esercizio	pag.38
• Effetti protettivi degli antiossidanti nel danno legato all'esercizio	pag.39
Allenamento all'esercizio	pag.43
Adattamenti all'esercizio	pag.44
• Training e omeostasi redox	pag.46
• Effetto del training sulle capacità antiossidanti	pag.47
• Adattamenti muscolari all'esercizio di resistenza	pag.52
• Meccanismi dei processi adattativi	pag.54
Esercizio e supplementazione antiossidante	pag.59
Scopo della tesi	pag.61
Materiali e Metodi	pag.63
• Animali e protocollo di allenamento	pag.63
• Preparazione degli omogenati	pag.65
• Preparazione dei mitocondri	pag.66
• Contenuto di Vitamina E	pag.67
• Attività della citocromo ossidasi	pag.69
• Espressione del citocromo c	pag.71
• SDS Page	pag.71
• Western blotting	pag.72
• Consumo di ossigeno	pag.74
• Danno ossidativo alle proteine	pag.76

• Perossidazione lipidica	pag.78
• Attività degli enzimi (GPX) e (GR)	pag.80
• Determinazione dei livelli di GSH	pag.82
• Suscettibilità allo stress ossidativo	pag.84
• Rilascio di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	pag.86
• Analisi statistica	pag.87
Risultati	pag.88
• Parametri corporei e contenuto di vitamina E	pag.88
• Attività della COX e contenuto proteico mitocondriale	pag.90
• Espressione del citocromo C	pag.92
• Consumo di ossigeno	pag.94
• Danno ossidativo	pag.97
• Attività degli enzimi antiossidanti e concentrazione di GSH	pag.99
• Suscettibilità allo stress ossidativo	pag.101
• Rilascio mitocondriale di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	pag.103
• Effetto degli inibitori sulla velocità di rilascio di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	pag. 105
• Espressione dei fattori trascrizionali	pag.107
Discussione	pag.109
Bibliografia	pag.120

## **Premessa**

L'attività fisica aerobica eseguita regolarmente ha effetti benefici per la salute. Infatti, esperimenti sugli animali ed indagini epidemiologiche indicano che essa è in grado di prevenire l'insorgenza di diverse malattie croniche, tra cui diabete di tipo 2 e malattie cardiovascolari, aumentando la sensibilità insulinica e migliorando la funzionalità cardiaca.

Inoltre, l'attività fisica regolare induce processi di adattamento che hanno l'effetto di migliorare la capacità di prestazione aumentando l'entità della forza che il muscolo scheletrico è in grado di esprimere e le capacità respiratorie di vari tessuti tra cui fegato, muscolo scheletrico e cardiaco. Viceversa l'esercizio fisico acuto, ovvero l'esercizio effettuato sporadicamente produce risposte metaboliche e cardiovascolari temporanee e può determinare danni significativi in diversi tessuti. In particolare, esso causa danni strutturali e reazioni infiammatorie nei muscoli, come è evidenziato dall'aumento nel plasma dell'attività degli enzimi citosolici e dalla distruzione del sarcolemma e della strie Z (Armstrong, R. B. et al., 1983).

L'entità del danno tessutale dipende principalmente dall'intensità e dalla durata dell'esercizio, e in particolare quello muscolare dipende dal tipo di contrazioni in cui il muscolo è impegnato. Ad esempio, il danno indotto da una contrazione di tipo eccentrico è molto più severo rispetto a quello che si osserva in seguito a contrazioni isometriche o concentriche (McCully et al., 1985).

Al danno contribuisce l'aumentata produzione di radicali e di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che si verifica durante l'esercizio. Le ROS, specie chimiche dotate di un'elevata reattività e capaci di ossidare tutte le macromolecole biologiche, sono formate *in vivo* come sottoprodotti del normale metabolismo. Le cellule sono dotate di un efficiente sistema di protezione antiossidante, ma, se l'esercizio è di notevole intensità e durata, la formazione di ROS aumenta eccessivamente e si instaura una condizione definita "stress ossidativo", che limita la prestazione in intensità e durata. Negli ultimi anni si è sempre di più affermata la pratica della integrazione antiossidante per prevenire o ridurre lo stress ossidativo e migliorare le prestazioni atletiche. Tuttavia, si stanno accumulando prove che le ROS svolgono un ruolo di regolazione in svariati processi cellulari e che l'aumento moderato e di breve durata della loro produzione, che si verifica durante ogni singola sessione di allenamento, potrebbe attivare meccanismi molecolari che portano le cellule ad adattarsi e a proteggersi da eventuali stress successivi. Queste osservazioni hanno sollevato dubbi sull'opportunità della assunzione di antiossidanti esogeni durante l'allenamento all'esercizio. Il dibattito in merito agli effetti della integrazione antiossidante su soggetti che si sottopongono ad un programma di allenamento è ancora aperto, e risulta difficile stabilire linee guida univoche.

Informazioni su tale argomento potrebbero essere ottenute studiando le eventuali modificazioni delle risposte adattative all'esercizio prodotte dalla somministrazione di un antiossidante durante il periodo di allenamento.

## **Introduzione**

Per una migliore comprensione dei temi affrontati in questa tesi è opportuno trattare brevemente dell'esercizio fisico, della produzione di ROS ad esso associata e dei sistemi di difesa antiossidante endogeni.

## **Esercizio fisico**

L'esercizio può essere definito come qualsiasi attività strutturata e pianificata che conduce ad un aumento della spesa energetica, della respirazione e della frequenza cardiaca. Esistono diverse modalità di esercizio fisico in relazione all'intensità (*aerobico e anaerobico*), alla contrazione muscolare (*isometrico, concentrico ed eccentrico*) e alla frequenza (*acuto e cronico*) (Couto Gomes, et al., 2012).

## **Spesa energetica nell'esercizio**

Un esercizio si caratterizza principalmente per il tipo di attività, la sua durata e la sua intensità, che determinano anche la spesa energetica connessa.

Galeno nel secondo secolo d.C. fu il primo a collegare attività fisica e attività respiratoria: *“Il criterio per valutare l'intensità dell'impegno fisico è la variazione dell'attività respiratoria: attività fisiche che non modificano la funzione respiratoria non possono essere considerate come esercizi fisici veri e propri”*. Questo criterio trova una spiegazione nel fatto che le reazioni esoergoniche alla fine si traducono in consumo di

ossigeno, che è commisurato alla velocità delle reazioni e all'intensità dell'attività di una persona. Infatti, è noto che l'individuo medio, che in condizioni basali consuma circa 0,25 litri di  $O_2$  al minuto ( $VO_2 = 0,25 \text{ L min}^{-1}$ ), quando compie un lavoro leggero o moderato può presentare un aumento di  $VO_2$  di tre volte. Un lavoro pesante può far aumentare di otto volte il consumo di  $O_2$ . Attività atletiche come correre, andare in bicicletta, nuotare possono aumentare la  $VO_2$  molto più di otto volte.

Ancora oggi, per stabilire l'intensità di un esercizio, si determina l'attività respiratoria, ma tale intensità non è normalmente espressa come livello di  $VO_2$ . Viceversa, come indicatore della intensità di un esercizio è di solito riportato il valore percentuale del massimo consumo di  $O_2$  ( $VO_{2max}$ ) anche definita massima potenza aerobica (*Lawrence et al., 2008, Komi et al., 2003*).

### **Esercizio aerobico e anaerobico**

La principale differenza fisiologica tra l'esercizio aerobico e anaerobico è la sorgente di energia. L'esercizio anaerobico è caratterizzato da brevi periodi di sforzi (elevati o massimi) quando l'energia è fornita attraverso il metabolismo anaerobico, cioè senza l'uso di ossigeno, e questo comporta un elevato accumulo di acido lattico nel sangue (*Lawrence et al., 2008; McArdle et al., 2009*). Esempi di esercizi anaerobici sono gli sprints (nuoto, ciclismo, o corsa), salto in lungo, sollevamento pesi, o qualsiasi attività di durata molto breve ed



effettuata al di sopra della soglia del lattato dei partecipanti (cioè 75%  $VO_{2max}$  per individui allenati).

L'esercizio aerobico può essere caratterizzato dall'uso del metabolismo aerobico durante lo sforzo fisico. In questo caso, il metabolismo aerobico genera energia principalmente dai grassi e, con l'uso di ossigeno, esso produce energia senza molto accumulo di acido lattico nel sangue. Esempi di esercizi aerobici di resistenza sono la corsa, il nuoto, la voga e il ciclismo.

### **Esercizio isometrico, concentrico ed eccentrico**

La contrazione muscolare si verifica quando il sistema nervoso centrale trasmette un segnale alla fibra muscolare.

Le fibre muscolari generano una forza (tensione muscolare) ed il muscolo può accorciarsi, allungarsi o rimanere della stessa lunghezza. La contrazione concentrica si riferisce all'accorciamento del muscolo con la produzione di forza. Le contrazioni concentriche hanno luogo durante un'azione muscolare in cui la forza esercitata da un muscolo è in grado di vincere una determinata resistenza. In questo caso assistiamo all'accorciamento del muscolo e all'avvicinamento dei capi articolari interessati (es. flessione dell'avambraccio sul braccio) (*Lawrence et al., 2008, Komi et al., 2003*). La fase concentrica è anche detta positiva. Le contrazioni eccentriche sono tipiche della fase negativa di un movimento, quando il ventre muscolare tende ad allungarsi e i capi articolari ad allontanarsi. Caratterizza i movimenti in cui si asseconda la resistenza esercitata dall'esterno ed il muscolo agisce

rallentando il movimento. Quindi, la contrazione eccentrica corrisponde allo “stiramento” del muscolo da una posizione concentrica o statica mentre esercita una tensione.

Sono denominate isometriche le contrazioni che non prevedono variazione di lunghezza nel muscolo, dove per variazione di lunghezza del muscolo intendiamo una variazione nel braccio di leva poiché, di fatto, le fibre muscolari subiscono un accorciamento. Questo si verifica, ad esempio, quando si esercita una forza contro una resistenza inamovibile, o mantenendo per un certo periodo di tempo una posizione sotto la spinta di un carico (non necessariamente inamovibile o massimale). In questo caso l'unico parametro incrementale sarà la forza espressa dal muscolo, senza variazione di lunghezza.

### **Esercizio acuto e cronico**

L'esercizio acuto è caratterizzato da singole sessioni di attività fisica che producono risposte metaboliche e cardiovascolari temporanee che durano da pochi minuti a diverse ore. Viceversa, si parla di esercizio cronico quando singole sessioni di esercizio sono effettuate ripetutamente inducendo risposte in cui adattamenti fisiologici e metabolici diventano più visibili e di lunga durata. Quando la ripetizione di attività fisiche avviene secondo un programma stabilito viene utilizzata l'espressione allenamento all'esercizio o training. Sia gli esercizi aerobici che quelli anaerobici possono essere eseguiti acutamente o cronicamente.

L'esercizio acuto provoca danno tissutale, la cui estensione dipende dalla durata, dall'intensità e dal tipo di contrazione. Infatti, la lesione delle fibre muscolari è più grave se si esegue una contrazione eccentrica rispetto a quella concentrica o isometrica (*Thompson et al., 2001*). Un esercizio acuto condotto ad esaurimento può anche causare danni strutturali alle cellule muscolari e reazioni infiammatorie nei muscoli, come evidenziato da un aumento nell'attività plasmatica di enzimi citosolici, come la creatin chinasi (*CK*) e la lattico deidrogenasi (*LDH*), da una distruzione del sarcolemma e delle strie Z e da alterazioni del reticolo sarcoplasmatico e dei mitocondri.

Di contro, l'esercizio cronico è in grado di indurre processi adattativi nei tessuti che potenziano la loro capacità di resistere ai danni indotti da ciascuna sessione di esercizio. Esso permette anche l'instaurarsi di processi di adattamento che portano all'aumento delle capacità di prestazione. Il miglioramento di prestazione dipende dal programma di allenamento, dalla sua intensità e dalla sua durata. Speciali programmi di allenamento possono migliorare la prestazione solo nell'ambito di una determinata attività, per cui ogni tipo di allenamento ha un campo di applicazione specifico. Tra i molteplici tipi di allenamento, è di particolare interesse l'allenamento di resistenza, caratterizzato da una serie di movimenti ripetuti ciclicamente, senza eccessivo dispendio di energia, allo scopo di migliorare le prestazioni dinamiche a lungo termine, ed è quindi la forma di allenamento tipica per gli sport di resistenza, come fondo, canottaggio, nuoto e ciclismo. Nell'allenamento di resistenza aumentano sia la

capacità aerobica che la capillarizzazione del muscolo; inoltre aumenta la capacità del sistema cardiocircolatorio di trasporto di O<sub>2</sub>.

### **Danno ossidativo e ROS**

Vi è ormai un notevole numero di prove che indicano che l'esercizio fisico, particolarmente di elevata intensità e durata, conduce, anche in individui allenati, ad un danno ossidativo nel muscolo scheletrico, nel miocardio e in altri tessuti, come documentato da un aumento di indicatori di danno ossidativo, come i prodotti della ossidazione di lipidi, proteine e *DNA* ed una diminuzione dei livelli di glutatione ridotto (*GSH*) (*Radak, et al., 1999*). Il danno ossidativo che si riscontra nei tessuti di animali sottoposti a condizioni di stress è generalmente attribuito all'alterazione del delicato bilancio, esistente nelle cellule, fra la produzione di ossidanti e la loro neutralizzazione da parte dei sistemi di difesa cellulari.

Gli ossidanti prevalentemente presenti nei sistemi cellulari sono costituiti da radicali ed altre specie reattive dell'ossigeno (*ROS*), derivanti dalla parziale riduzione dell'ossigeno.

I radicali liberi (*R'*) sono specie chimiche (atomi, molecole o ioni) capaci di esistenza indipendente, che presentano uno o più elettroni spaiati nei loro orbitali, disposizione che li rende molto instabili e che conferisce loro proprietà quali il paramagnetismo ed una notevole reattività.

La loro insolita reattività, è giustificata dalla forte tendenza dell'elettrone spaiato ad accoppiarsi con elettroni appartenenti ad altre specie chimiche.

Lo stesso ossigeno, avendo due elettroni spaiati con spin paralleli, nei due orbitali esterni, è una specie radicalica. Esso ha una capacità ossidante piuttosto elevata, avendo una forte tendenza ad accettare elettroni. Nonostante ciò, esso è poco reattivo nei confronti delle molecole organiche che costituiscono gli organismi viventi. Questa contraddizione è spiegata dal fatto che i suoi elettroni spaiati hanno spin paralleli e, quindi, i processi di ossidazione richiederebbero la messa a disposizione, da parte delle molecole da ossidare, di due elettroni con spin tra loro paralleli ed opposti a quelli dell'ossigeno.

Tuttavia, nelle molecole dei composti organici stabili sono presenti elettroni di valenza con spin opposti, e quindi occorrerebbe un'inversione dello spin prima che tali elettroni siano accettati negli orbitali dell'ossigeno, cosa che rallenta e, a volte, preclude la reazione con tali molecole, fenomeno definito *restrizione di spin*.

Poiché negli organismi aerobi l'energia necessaria per i processi vitali deriva da reazioni di ossidazione in cui è consumato l'ossigeno, è evidente che in tali organismi sono operanti processi attraverso cui la restrizione di spin è, in qualche modo, eliminata con conseguente aumento della reattività dell'ossigeno.

Le ossidazioni che si verificano in natura sono dovute all'intervento di sostanze che sono in grado di trasferire, con il giusto verso, uno o più elettroni dalla molecola da ossidare all' $O_2$ .

Tali sostanze comprendono ioni metallici di transizione con valenza variabile, come ferro o rame, ed enzimi, come la

citocromo ossidasi, che presenta ioni metallici nei loro siti attivi.

In passato si riteneva che la citocromo ossidasi (COX), attraverso la cessione graduale di quattro elettroni, portasse alla formazione delle forme intermedie parzialmente ridotte dell' $O_2$ . Secondo questa veduta, le prime tre fasi della reazione generavano in sequenza lo ione superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ), lo ione perossido ( $O_2^{2-}$ ), che era immediatamente protonato a perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), e il radicale ossidrilico ( $\cdot OH$ ). L'aggiunta del quarto elettrone conduceva allo ione ossidrilico, che era trasformato in acqua per aggiunta di un  $H^+$  (Fig. 1).

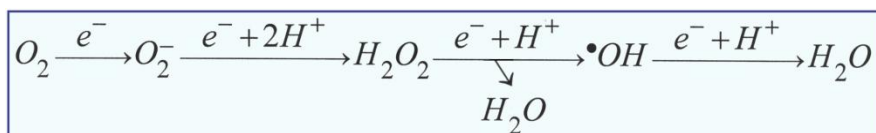
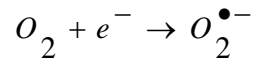


Fig.1 Fasi della trasformazione dell'ossigeno in acqua da parte della citocromo

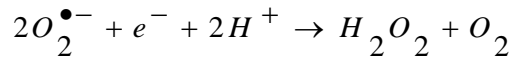
Tali intermedi, in particolare il radicale  $\cdot OH$ , non hanno gli impedimenti cinetici dell' $O_2$  allo stato fondamentale e sono molto più reattivi. Per tale motivo, essi sono indicati come specie reattive dell'ossigeno.

Col tempo tale modello è stato messo in dubbio, ma, comunque si riteneva che le forme intermedie parzialmente ridotte dell' $O_2$ , eventualmente formate dalla citocromo ossidasi, erano saldamente legate nel suo sito attivo, sino alla riduzione completa ad acqua, per cui la loro presenza negli organismi viventi doveva essere attribuita a processi diversi.

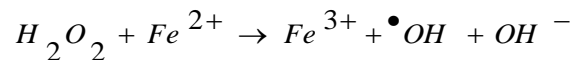
In genere, in vari siti cellulari si verificano reazioni in cui l'ossigeno prende un elettrone formando il radicale superossido:



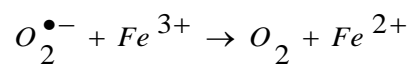
Il radicale superossido, prendendo un altro elettrone, si converte nel perossido di idrogeno secondo una reazione di dismutazione:



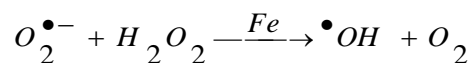
Il perossido di idrogeno non è un radicale perché non contiene elettroni spaiati e, pur essendo un forte ossidante, reagisce lentamente. Tuttavia, esso è sempre un agente potenzialmente pericoloso in quanto può interagire con i complessi di alcuni ioni metallici di transizione nella forma ridotta che lo decompongono nel radicale ossidrile molto reattivo e nello ione ossidrile secondo la reazione di Fenton:



La formazione di  $\bullet OH$  richiede quindi la presenza di ioni metallici quali  $Fe^{2+}$  o  $Cu^+$ . D'altra parte l' $O_2^{\bullet -}$  può rigenerare tali ioni riducendo  $Fe^{3+}$  o  $Cu^{2+}$ , secondo la reazione:



Combinando le equazioni si ottiene la reazione complessiva di Haber-Weiss:



Poiché il ferro è presente in quantità significative nei sistemi viventi, si ritiene che esso sia il più importante generatore del radicale  $\bullet OH$ . Se si confronta l' $O_2^{\bullet -}$  con tale radicale, sembra che esso sia abbastanza innocuo in termini chimici. La sua

forma protonata  $HO_2^{\cdot}$  è alquanto più reattiva per cui si può ritenere che il superossido può essere citotossico per la sua capacità di generare specie più reattive ed in particolare il radicale ossidrile. Infatti, molti studi *in vitro*, che hanno dimostrato la capacità di sistemi che generano  $O_2^{\cdot-}$  di uccidere cellule o danneggiare molecole biologiche, hanno anche trovato che protezione contro questi effetti era ottenuta impiegando, scavengers del radicale  $^{\cdot}OH$ . Inoltre l'adattamento ad elevate  $pO_2$  è ottenuto anche mediante induzione di altri enzimi in grado di metabolizzare  $H_2O_2$ .

Occorre sottolineare che alle specie menzionate debbono essere aggiunte altre contenenti l'azoto che attualmente vengono indicate come *specie reattive dell'azoto* (RNS). Esse comprendono specie radicaliche, come l'ossido nitrico ( $NO^{\cdot}$ ) e il biossido di azoto ( $NO_2^{\cdot}$ ), e non radicaliche, come il perossinitrito ( $ONOO^-$ ) (*Handy et al., 2012*).

Le ROS possono attaccare gli acidi grassi polinsaturi delle biomembrane (causando una catena di reazioni di perossidazione), proteine ed enzimi (danneggiandone le proprietà funzionali) e gli acidi nucleici (causando la rottura del filamento e alterazione delle basi azotate) (*Fisher and Bloomer, 2009*). Particolarmente suscettibile alle ROS è il DNA mitocondriale, perché si trova al livello di uno dei principali siti di produzione delle ROS e non è associato a proteine istoniche come il DNA nucleare.



## **Antiossidanti cellulari**

È ormai accertato che la sopravvivenza degli organismi aerobi in un ambiente di ossigeno implica una complessa interazione tra la produzione di radicali liberi e la capacità degli organismi di controllare tali sostanze. In condizioni normali la produzione di radicali liberi è bassa ed è bilanciata dall'azione dei sistemi di difesa antiossidanti. In diverse condizioni fisiopatologiche la velocità di produzione dei radicali liberi supera la capacità dei sistemi di difesa cellulare. Il termine "stress ossidativo" è stato introdotto per indicare un disturbo nel bilancio tra proossidanti ed antiossidanti in favore dei primi (*Powers and Jackson, 2008*).

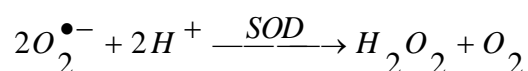
La definizione non indica se il disturbo deriva da un aumento della produzione di radicali liberi o da una diminuzione delle risposte omeostatiche del tessuto, né i suoi effetti dannosi sulla funzione tissutale, anche se l'evento più comune, che porta all'insorgenza di una condizione di stress ossidativo in un organismo vivente, è l'aumento della produzione di radicali liberi.

I sistemi di difesa antiossidante cellulare sono costituiti da enzimi e proteine antiossidanti e sostanze scavenger a basso peso molecolare.

## Enzimi antiossidanti

I principali enzimi antiossidanti sono la superossido dismutasi (SOD), la glutatione perossidasi (GPX) e la catalasi (CAT).

La famiglia delle SOD è costituita da metalloenzimi, la cui caratteristica comune è la capacità di catalizzare la dismutazione dell'anione superossido a perossido di idrogeno.



Questa reazione evita che il superossido possa interagire con l'ossido nitrico (NO<sup>•</sup>), sintetizzato da enzimi ossido nitrico sintasi (NOS) mitocondriali e citoplasmatici (*Knowles and Moncada, 1994*), formando una specie reattiva dell'azoto fortemente ossidante, il perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Questo è infatti capace di danneggiare le biomolecole e di scomporsi rilasciando il radicale ossidrile (*Radi et al., 2002*).

Le diverse isoforme dell'enzima si caratterizzano, oltre che per il diverso catione metallico che funge da cofattore, anche per la diversa compartimentazione; si distinguono una SOD1 citoplasmatica, una SOD2 mitocondriale e una SOD3 extracellulare. Per quanto riguarda la classificazione delle isoforme in funzione dei diversi cationi metallici contenuti si distinguono una Cu, Zn-SOD, principalmente intracellulare, una Mn-SOD, principalmente mitocondriale, mentre in alcuni procarioti e piante sono state individuate anche la Ni-SOD e la Fe-SOD (*Okado and Fridovich., 2001*).

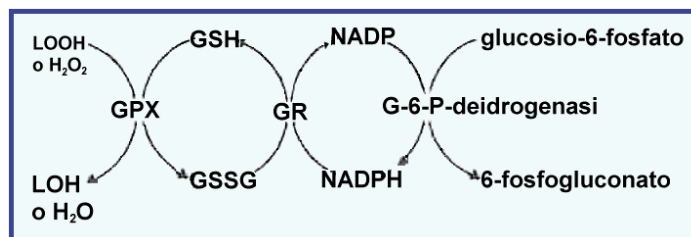
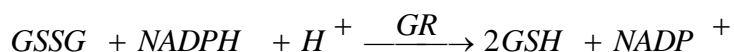


Fig. 2 Ossidazione e riduzione del GSH.

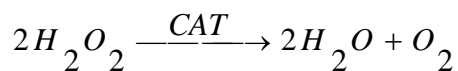
Nella detossificazione di  $H_2O_2$ , la GPX, un enzima selenio-dipendente, converte  $H_2O_2$  ad acqua attraverso l'ossidazione di glutatione ridotto (GSH) a glutatione ossidato (GSSG).



Il GSSG può ritornare alla forma ridotta ad opera della glutatione reduttasi (GR), una flavoproteina che permette di convertire GSSG in GSH attraverso l'ossidazione del NADPH a  $NADP^+$  (Fig.2):



Alla rimozione del perossido di idrogeno contribuisce la CAT, un enzima che provoca la dismutazione di  $H_2O_2$  ad ossigeno e acqua.



## Sostanze antiossidanti

Le sostanze antiossidanti prodotte endogenamente comprendono sostanze a basso peso molecolare come il glutatione, il coenzima Q e l'acido urico e proteine come le tioredoxine e le perossiredossine.

Il glutatione (GSH), è un tripeptide,  $\gamma$ -glutamyl-cistein-glicina, ed è il più abbondante tiolo a basso peso molecolare presente nelle cellule dei mammiferi. Esso riveste un ruolo centrale nella difesa contro le ROS ed è il regolatore non enzimatico più importante dell'omeostasi redox intracellulare (Lu S.C., 1999)

Nella cellula il glutatione può trovarsi anche come glutatione ossidato (GSSG) ma, in condizioni redox normali, la maggior parte di questa sostanza si trova nella forma ridotta. Il rapporto fra le concentrazioni di GSH e GSSG è una buona misura dello stato redox cellulare e la coppia redox GSH/GSSG può interagire facilmente con la maggior parte delle coppie redox fisiologicamente rilevanti, subendo reazioni reversibili di ossidazione e riduzione, e mantenendo così l'appropriato bilancio redox nella cellula ( Wu et al.,2004)

Il nome coenzima Q o ubiquinone indica un gruppo di composti liposolubili che hanno una struttura con un anello chinonico a cui è attaccata nella posizione 6 una catena laterale di 30-50 atomi di carbonio come unità isoprenoidi. Il numero di unità isoprenoidi nella catena laterale varia da 6 a 10.

L'idea del coenzima Q come antiossidante derivò dalla scoperta che la sua forma ridotta (ubichinolo) possiede una

notevole capacità di inibire la perossidazione lipidica in emulsioni di acido arachidonico. A differenza di fattori che appaiono essere stati selezionati per le loro capacità antiossidanti, altri, come il coenzima Q, appaiono essere stati selezionati per effettuare funzioni specifiche non legate all'attività antiossidante, ma a causa delle loro caratteristiche chimiche, possono svolgere un ruolo antiossidante.

L'acido urico è stato tradizionalmente considerato meramente un prodotto terminale del metabolismo delle purine nell'uomo e nelle scimmie. Infatti, nella maggior parte delle specie l'enzima perossisomale urato ossidasi converte l'urato in allantoina, che è poi ulteriormente convertita in prodotti tutti più idrosolubili dell'urato.

L'osservazione che l'urato è un potente scavenger del radicale  $\bullet OH$  e dei radicali perossilici *in vitro* suggerì che la sua funzione biologica è di antiossidante e che la perdita dell'urato ossidasi (permettendo l'accumulo di urato) fu vantaggiosa per i primati.

## Proteine antiossidanti

La funzione della coppia GSH/GSSG nell'omeostasi redox cellulare si verifica in congiunzione con proteine redox. Le tioredossine (Trxs), che rappresentano un partner cruciale con la coppia GSH/GSSG nella regolazione redox, sono piccole proteine ubiquitarie compartimentalizzate all'interno delle cellule.

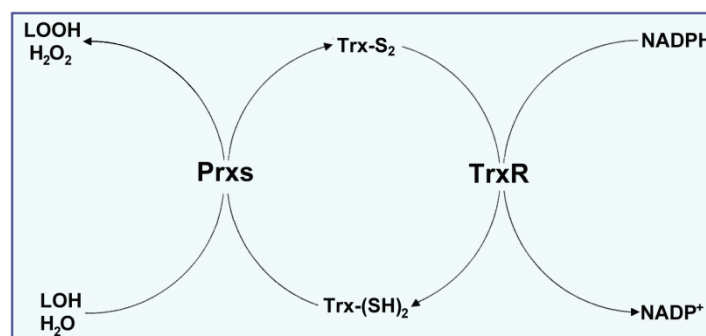


Fig. 3 Schema di attività del sistema della tioredossina. Trx-(SH)<sub>2</sub> (tioredossina ridotta) riduce le perossiredossine, generando Trx-S<sub>2</sub> (tioredossina ossidata). Trx-(SH)<sub>2</sub> è rigenerata dalla TrxR (tioredossina riduttasi) e NADPH.

Le tioredossine collaborano anche con le perossiredossine (Prxs) nella rimozione degli idroperossidi. Le Prxs sono un gruppo di perossidasi tiolo specifiche non contenenti selenio, che nelle cellule dei mammiferi comprendono sei isoforme. Le perossiredossine contribuiscono al controllo redox cellulare riducendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e idroperossidi organici ad acqua ed alcol, rispettivamente, usando riducenti equivalenti forniti da proteine contenenti gruppi tiolici come le tioredossine (Fig. 3). Una caratteristica particolare dei sistemi Trx/TrxR e Prx, come quella del sistema GPX/GR, è che fanno assegnamento sul NADPH come sorgente di riducenti equivalenti necessari per la loro attività.

## Antiossidanti esogeni

Nelle cellule e nei liquidi extracellulari si trovano sostanze antiossidanti che sono state introdotte con l'alimentazione. Esse comprendono l'acido ascorbico, i carotenoidi e i polifenoli. Uno dei più importanti scavenger introdotti con l'alimentazione è la vitamina E, una vitamina liposolubile che protegge le membrane cellulari dalla perossidazione lipidica (Halliwell B. and J.M.C., 2007, Burton *et al.*, 1983).

In realtà, la vitamina E è il nome che viene attribuito ad un gruppo di otto composti liposolubili con diversi livelli di attività biologica:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$  tocoferolo e  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$  tocotrienolo.

Dal punto di vista strutturale si possono considerare derivati del 2-metil-6-cromanolo con una catena laterale isoprenoide a 16 atomi di carbonio, il fitolo, e l'analogo presente in maggiori concentrazioni nelle cellule dei mammiferi e l' $\alpha$ -tocoferolo che presenta tre gruppi metilici sull'anello aromatico (Fig.4).

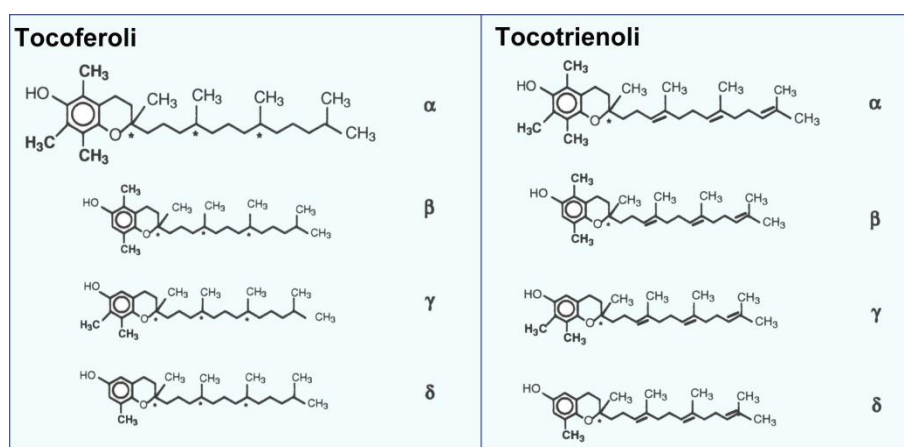


Fig. 4 Struttura della vitamina E.

Attualmente la vitamina E oltre a svolgere la sua azione antiossidante, viene considerata un agente antinfiammatorio, in quanto inibisce gli enzimi lipossigenasi e ciclossigenasi che partendo dall'acido arachidonico producono leucotrieni, trombossani e prostaglandine. Inoltre, diversi geni sono regolati dall' $\alpha$ -tocoferolo, attraverso vie di trasduzione del segnale che coinvolgono la proteina chinasi C e la fosfatidilinositolo 3-chinasi. Variazioni nell'attività di queste chinasi, sono associati a cambiamenti della proliferazione cellulare, dell'aggregazione piastrinica e dell'attivazione della NADPH-ossidasi (Azzi *et al.*, 2004).

### **Esercizio fisico e ROS**

Sebbene l'idea di uno stretto legame fra il danno ossidativo riscontrato in seguito all'esercizio e l'aumento della produzione delle ROS fosse già stata avanzata alla fine del 1970 (Dillard *et al.*, 1978), non vi erano prove dirette di tale aumento. Solo nel 1982 Davies e i suoi collaboratori (Davies *et al.*, 1982) riportarono che i segnali della risonanza di spin elettronico (ESR) (Ashton *et al.*, 1999), una procedura in grado di rilevare la presenza dei radicali liberi, erano intensificati negli omogenati di muscolo di ratti sottoposti ad una corsa ad esaurimento. Inoltre, furono riscontrati aumenti dei livelli di perossidazione lipidica, ed alterazioni funzionali dei mitocondri e del reticolo sarcoplasmatico. Analoghi risultati furono anche ottenuti sul cuore di ratto (Kumar *et al.*, 1992).



Successivamente, usando la 2',7'-diclorofluorescina come sonda intracellulare, fu dimostrato l'aumento della velocità di produzione di ROS in omogenati di muscolo di ratti esercitati all'esaurimento (*Reid et al., 1992*).

Malgrado la limitata disponibilità di prove dirette, l'idea che l'esercizio aumenta la produzione di ROS nel muscolo e nel cuore era avvalorata dalle misure di indicatori di danno ossidativo ai lipidi (malondialdeide, dieni coniugati plasmatici, pentano esalato), al DNA (8-idrossideossiguanosina urinaria), e alle proteine (carbonili legati a proteine) (*Pacifici et al., 1990*) e dello stato redox cellulare ricavato dal rapporto tra glutatione ridotto e ossidato (*Ji LL et al., 1999*) (Tab.1).

La perossidazione lipidica è stata utilizzata frequentemente come indice di stress ossidativo durante l'esercizio, in quanto gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) sono particolarmente suscettibili all'attacco dei ROS e i sottoprodotti derivanti sono facilmente rilevabili.

Molti studi hanno mostrato un aumento della perossidazione lipidica in vari tessuti, come il muscolo scheletrico (*Alessio et al., 1988*) e cardiaco (*Venditti and Di Meo, 1996*), il fegato (*Venditti and Di Meo, 1997*), il cervello (*Suzuki et al., 1983*), e negli eritrociti (*Rajuguru et al., 1994*) di ratti non allenati sottoposti ad esercizio acuto.

**Tabella 1 Effetto dell'esercizio acuto su indicatori di danno ossidativo**

Esercizio	Specie	Tessuto	Indice
Corsa	Ratto	Muscolo	MDA ↑
		Fegato	MDA ↑
Nuoto	Topo	Muscolo	GSH ↓
	Ratto	Muscolo	MDA ↑; HP ↑
		Cuore	MDA ↑; HP ↑
		Fegato	MDA ↑; HP ↑
		Fegato	TBARS ↑; HP ↑
		Fegato	GSH ↓
		Muscolo	CO ↑; HP ↑
		Cuore	CO ↑; HP ↑
		Fegato	CO ↑; HP ↑

MDA, Malondialdeide; TBARS, Sostanze reattive all'acido tiobarbiturico; CO, carbonili legati alle proteine; GSH, glutatione ridottoc; HP, idroperossidi.

Tuttavia, non tutti gli studi hanno riscontrato la presenza di stress ossidativo in seguito a esercizio. La natura variabile dei risultati potrebbe essere dovuta a diversi fattori, comprendenti le differenti specie e il tipo di esercizio (*Lovlin et al., 1987*).

Il glutatione ridotto (GSH) gioca un ruolo fondamentale nel mantenimento dello stato redox cellulare e nella protezione dei tessuti dallo stress ossidativo (*Meister et al., 1983*). Una diminuzione del rapporto GSH/GSSG indica che la produzione di ROS supera la capacità riducente del GSH e delle altre specie antiossidanti. Molti studi hanno dimostrato che l'esercizio acuto promuove l'ossidazione di GSH a GSSG nel sangue, nel fegato e nel muscolo cardiaco e scheletrico (*Ji LL, 1999, Rossi et al., 2002*). Lo stress ossidativo, derivante da un'eccessiva formazione di specie radicaliche a livello muscolare, è associato a fatica e lesioni muscolari, sia durante la contrazione, sia durante la fase di recupero dopo l'esercizio. È stato osservato che, quando la formazione di ROS è troppo elevata, la forza muscolare si riduce, mentre

cresce la fatica (*Reid et al., 1992*). Numerosi fattori sembrano essere implicati nella fatica muscolare indotta da radicali liberi. Tra quelli considerati maggiormente rilevanti sono le alterazioni delle funzioni mitocondriali (*Coombes et al., 2002*). Lipidi, proteine e DNA dei mitocondri sono particolarmente suscettibili al danno ossidativo indotto dalle ROS ed inoltre i danni al mtDNA possono portare ad alterazioni dei complessi enzimatici della catena respiratoria, con conseguente alterazione del trasporto di elettroni e della sintesi di ATP. Il metabolismo aerobico risulta meno efficiente, con conseguente aumentata utilizzazione della via anaerobica. Tutto ciò può avere effetti negativi a livello muscolare, poiché la via anaerobica induce sia un incremento dei livelli di fosfato inorganico (Pi) sia acidosi, che sono due dei fattori responsabili della fatica muscolare (*Reid et al., 1992*). Anche le proteine contrattili (actina e miosina) e la pompa del calcio sono componenti muscolari particolarmente sensibili allo stato redox. Quindi, quando aumenta la produzione di ROS e si ha uno squilibrio dello stato redox si possono evidenziare alterazioni a carico sia della contrazione muscolare sia del suo controllo (*Goldfarb et al. 1999*). Inoltre è stato osservato, durante alcune forme di esercizio come quello eccentrico, un importante rilascio di ferro, sia dalla ferritina sia dall'emoglobina. La liberazione di ferro può aggravare lo stress ossidativo, i danni e l'affaticamento muscolare, sia durante sia in seguito all'esercizio fisico (*Childs et al., 2001*).

## **Fonti di produzione di ROS durante l'esercizio**

Durante l'esercizio fisico le specie reattive sono prodotte principalmente ma non esclusivamente attraverso i seguenti meccanismi (*Vollard et al., 2005*):

### **Perdita di elettroni a livello della catena di trasporto mitocondriale**

Negli organismi aerobici circa il 95% dell'O<sub>2</sub> assunto è utilizzato dai mitocondri, che sono la principale sorgente di ATP nella cellula. I substrati energetici contenuti negli alimenti sono ossidati mediante trasferimento di elettroni al NAD<sup>+</sup> e alle flavine FMN e FAD. Quindi, i prodotti di reazione, NADH, FMNH<sub>2</sub> e FADH<sub>2</sub>, sono ossidati nei mitocondri.

All'interno di mitocondri, i componenti della catena di trasporto elettronico risiedono sulla membrana interna, in genere molto convoluta, in quanto forma una serie di ripiegamenti, noti come creste.

Mentre la membrana mitocondriale esterna è permeabile a piccole molecole e ioni, la membrana mitocondriale interna è impermeabile a quasi tutte le molecole e piccoli ioni compresi i protoni (H<sup>+</sup>). Quindi, essa può essere attraversata solo da specie chimiche che possiedono specifici trasportatori inseriti nella membrana stessa.

La catena respiratoria mitocondriale è costituita da una serie di trasportatori di elettroni, la maggior parte dei quali sono proteine integrali di membrana, contenenti gruppo prostetici in grado di accettare e di donare uno o due elettroni. Alcuni

componenti della catena respiratoria, sebbene trasferiscano gli elettroni al successivo componente della catena, sono in grado di cedere un piccolo numero di elettroni direttamente alla molecola di ossigeno provocando la sua riduzione a superossido. Il radicale superossido è facilmente ridotto da una superossido dismutasi (SOD) mitocondriale (contenente Mn) a perossido d'idrogeno, che può interagire con ioni metallici in forma ridotta, come  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Cu}^+$ , che lo decompongono nel radicale ossidrile secondo la reazione di Fenton.

Usando particelle submitocondriali fu calcolato che circa il 2% dell'ossigeno consumato dai mitocondri è ridotto incompletamente e appare come radicale superossido (*Takeshige et al., 1979*). Questo valore sta a dimostrare il fatto che i mitocondri sono un'importante sorgente di ROS. Tuttavia, il valore del 2% fu calcolato da dati ottenuti usando mitocondri distrutti, il succinato come solo substrato riducente e si riferiva solo allo stato 4 della respirazione in cui la produzione di ROS è più elevata. Inoltre, l'esperimento fu condotto a  $\text{pO}_2$  superiori a quelle presenti in vivo.

Lavori più recenti suggeriscono che, in condizioni più vicine a quelle fisiologiche, la reale percentuale di ossigeno consumato, che è convertito a radicali da parte di mitocondri intatti, è molto più bassa del 2%, e che l'aggiunta di ADP non riduce a zero la produzione di radicali liberi. La capacità dei mitocondri di produrre ROS, fra l'altro, dipende dal tipo di tessuto, dalla specie e dallo stato metabolico della cellula.

La maggiore capacità dei mitocondri di produrre ROS durante lo stato 4 della respirazione dipende dal fatto che la velocità della loro formazione da parte della catena respiratoria è

controllata dall'azione di massa, e, a parità di concentrazione di  $O_2$ , essa aumenta quando il flusso di elettroni rallenta aumentando la concentrazione dei donatori di elettroni (carriers mitocondriali nella forma ridotta):

$$d[O_2]/dt = k \cdot [O_2] \cdot [R^\bullet]$$

Basandosi sull'idea che la produzione di *ROS* è proporzionale al consumo di  $O_2$ , per molto tempo si è ritenuto che, poiché l'esercizio aumenta il consumo mitocondriale di  $O_2$ , esso aumenta anche la formazione mitocondriale di *ROS* (Vollard *et al.*, 2005). In realtà, quando i mitocondri producono attivamente *ATP* (stato 3), la proporzione di  $O_2$  convertito a *ROS* cade ad un decimo di quella nello stato di riposo (stato 4). Inoltre, vi sono scarse prove che la produzione mitocondriale di *ROS* aumenta durante l'esercizio. Infatti, le misure della velocità di generazione di *ROS*, che sono effettuate su mitocondri isolati dopo l'esercizio, non sono in grado di fornire informazioni sui valori di tale velocità durante l'esercizio.

In sostanza, l'idea che i mitocondri siano sede primaria di generazione di *ROS* durante l'esercizio è sostenuta solo da dati indiretti i quali evidenziano un danno ossidativo mitocondriale in seguito all'esercizio. Un altro risultato a favore è fornito dall'aumento, nei mitocondri di muscolo e di cuore, dello stato 4 della respirazione, che è un indice di una maggiore perdita di protoni da parte della membrana interna che si suppone sia dovuta al danneggiamento legato ad una elevata produzione di *ROS*.

## **Ischemia e riperfusione**

È stato proposto che la xantina ossidasi svolga un ruolo nella generazione di superossido da parte del muscolo scheletrico durante l'esercizio (*Gomez-Cabrera et al., 2003*). Attualmente, questa idea è principalmente basata sugli effetti degli inibitori della xantina ossidasi, allopurinolo o ossipurinolo. Sebbene i muscoli scheletrici di ratto contengano livelli significativi di xantina ossidasi, le cellule muscolari dell'uomo sembrano possedere basse quantità di xantina ossidasi-deidrogenasi. Tuttavia, questi enzimi sono inevitabilmente presenti nelle cellule endoteliali associate.

Un'ipotesi abbastanza diffusa è che il ruolo della xantina ossidasi nel muscolo, come in altri tessuti, sia legata al verificarsi di un fenomeno di ischemia-riperfusione. Durante l'esercizio, il flusso sanguigno è diretto verso i muscoli coinvolti nell'esercizio, portando a un rifornimento di sangue marcatamente ridotto ad altri muscoli e organi, dell'esercizio, il flusso sanguigno a tali organi riprende imitando il fenomeno particolarmente, fegato, rene ed intestino. Dopo la cessazione dell'ischemia riperfusione.

Tale fenomeno, che può spiegare l'esteso danno ossidativo riscontrato in tessuti come il fegato, può svolgere un ruolo anche nella produzione di *ROS* da parte dei muscoli che, durante la contrazione, subiscono un rilevante deficit di nucleotidi adeninici. Questa situazione può verificarsi durante lo sprint, l'esercizio in ambiente ipossico o con flusso sanguigno ridotto da malattie vascolari.

Numerosi fattori contribuiscono al danno dei tessuti durante l'ischemia e la riperfusione (Fig. 5).

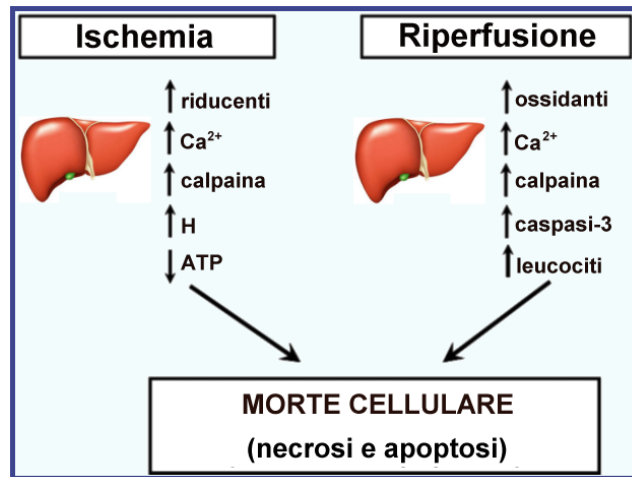


Fig. 5 Disturbi indotti da I-R nell'omeostasi della cellula e che conducono alla sua morte

Durante l'ischemia, vi è riduzione dei livelli cellulari di  $O_2$  e  $ATP$ , associata con aumento della produzione di riducenti cellulari, dei livelli di  $Ca^{2+}$  e  $H^+$  e attivazione della calpaina una proteasi attivata dal calcio. Si verifica un aumento della velocità della glicolisi con produzione di lattato e insorgenza di acidosi.

Dopo l'esercizio, il flusso di sangue riprende e può causare ulteriore danno (danno da riossigenazione) in parte mediato da ROS e dipendente dalla durata dell'ischemia (*Gomez-Cabrera et al., 2009*). All'inizio della riperfusione vi è un aumento del carico di  $Ca^{2+}$  e della produzione di ossidanti, che insieme promuovono l'attivazione della calpaina e della caspasi-3, che possono portare alla morte cellulare (*Kehrer et al., 1994*). Il danno cellulare indotto da I-R porta ad attivazione dei neutrofili e produzione di superossido, che possono contribuire ulteriormente al danno. Nell'insieme, questi disturbi indotti da



I-R nell'omeostasi cellulare contribuiscono al danno e alla morte cellulare dovuta a necrosi o apoptosi.

Il ruolo svolto dalla xantina ossidasi nella generazione di superossido nel muscolo o in altri tessuti è legato alla conversione xantina deidrogenasi-xantina ossidasi che ossida la ipoxantina (e la xantina), accumulatasi in seguito alla deplezione di *ATP* e della mancanza di  $O_2$  durante la fase ischemica che precede la ri-perfusione, cedendo elettroni all'ossigeno. La rapida generazione di  $O_2^{\cdot-}$  e, quindi, di  $H_2O_2$ , conduce ad un severo danno tessutale per interazione di tali *ROS* con ioni metallici di transizione che promuovono la formazione di  $\cdot OH$ .

Sebbene i muscoli scheletrici di ratto contengano livelli significativi di xantina ossidasi, le cellule muscolari dell'uomo sembrano possedere basse quantità di xantina ossidasi-deidrogenasi. Tuttavia questi enzimi sono inevitabilmente presenti nelle cellule endoteliali associate.

Il fegato è uno dei tessuti in cui si riscontra danno ossidativo in seguito ad un esercizio acuto. Tale danno potrebbe essere attribuito al fenomeno di ischemia e ri-perfusione, in quanto nel fegato si verifica riduzione del flusso sanguigno durante l'esercizio. Tuttavia, è probabile che sia coinvolto anche un altro meccanismo. Il mantenimento del livello del *GSH* epatico è un processo dinamico raggiunto mediante un bilancio fra le velocità di sintesi e di riconversione e le velocità di reazione con le *ROS*. Il *GSH* escreto nel plasma può essere prelevato da altre cellule che ne hanno bisogno mediante l'intervento dell'enzima  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasi. L'enzima, localizzato sulla membrana plasmatica, scinde il *GSH* in glutammato che

è legato ad altri aminoacidi, fra cui la cisteina, e la cisteinilglicina che penetra all'interno ed è riciclata a *GSH*. Durante l'esercizio, il *GSH* si sposta dal fegato ai muscoli coinvolti nell'esercizio in cui i livelli del *GSH* si sono ridotti in quanto la sua ossidazione a *GSSG* eccede la capacità della *GR* di ripristinarlo a causa dell'aumentata produzione di *ROS*. Lo spostamento del *GSH* al sangue è stimolato da sostanze come glucagone, vasopressina e adrenalina, che sono rilasciate maggiormente durante un esercizio prolungato. (Venditti and Di Meo, 2001, Lu et al., 1990)

### Risposta infiammatoria

Nell'esercizio, lo stiramento o altre forze meccaniche possono causare un danno significativo ai muscoli scheletrici.

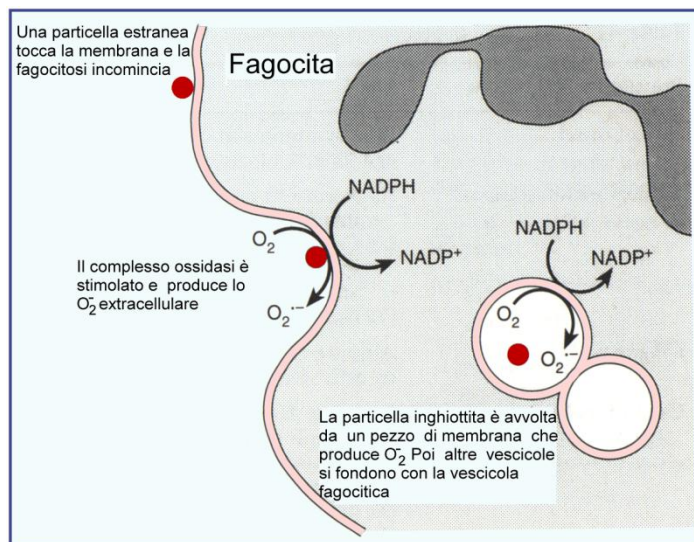


Fig. 6 Rappresentazione della fagocitosi e della produzione di ROS da parte dei neutrofili.

I neutrofili presenti nel sangue migrano al sito del danno attratti da fattori chemiotattici liberati da cellule danneggiate e rilasciano il lisozima e O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Il lisozima facilita la scissione

delle proteine danneggiate e dei frammenti cellulari, mentre il superossido prodotto dalla *NADPH ossidasi*, presente sulla membrana plasmatica dei fagociti genera  $H_2O_2$  e  $\cdot OH$  (Fig.6) (Babior B. M. et al., 2002) .

Sebbene i dati disponibili dimostrano un aumento dei biomarkers della risposta infiammatoria (leucociti e citochine circolanti) ed accumulo dei neutrofili nei muscoli danneggiati, non è chiaro il ruolo dei neutrofili nell'aumento della produzione di ROS durante l'esercizio.

Dato il tempo richiesto per l'infiltrazione di neutrofili, questa via non è la sorgente principale di ROS in esercizi di breve durata, ma può essere importante nel periodo di recupero che segue un esercizio intenso (Ji, 1999). Essa può contribuire al danno ossidativo del tessuto durante esercizi di resistenza (maratona) o esercizi eccentrici.

### **NAD(P)H ossidasi**

Alcuni studi hanno identificato enzimi *NAD(P)H* ossidasi associati col reticolo sarcoplasmatico dei muscoli scheletrici e cardiaci, che sembrano usare preferenzialmente *NADH* e influenzano il rilascio del calcio dal reticolo ossidando i recettori rianodinici. È stata anche descritta una *NAD(P)H* ossidasi localizzata sulla membrana plasmatica delle fibre muscolari, che ha la stessa struttura dell'enzima trovato nelle cellule fagocitiche, ed una *NAD(P)H* ossidasi localizzata sulle triadi ed i tubuli T che è attivata dalla depolarizzazione della membrana (Espinosa *et al.*, 2006)

## **Fosfolipasi A2**

La PLA<sub>2</sub> è un enzima responsabile della scissione dei fosfolipidi di membrana e del conseguente rilascio dell'acido arachidonico che rappresenta un buon substrato per enzimi, come la lipoossigenasi, in grado di generare ROS ( Nethery et al., 2000, Gong et al, 2006). L'attivazione della PLA<sub>2</sub> può stimolare la NAD(P)H ossidasi, mentre si è visto che l'aumento della sua attività stimola la produzione di ROS nel mitocondrio, nel citosol e il rilascio degli stessi nello spazio extracellulare (Powers S.K. et al., 2008). L'enzima PLA<sub>2</sub> è presente all'interno delle cellule come due isoforme: PLA<sub>2</sub> dipendenti da calcio (cPLA<sub>2</sub>) e PLA<sub>2</sub> indipendente da calcio (iPLA<sub>2</sub>); entrambe le isoforme giocano un ruolo importante nella produzione dei ROS.

## **Ossidazione di catecolammine**

L'esercizio stimola circolazione e secrezione di catecolammine, che aumentano: la prestazione cardiaca per un migliore apporto di sangue ai muscoli che si contraggono, la glicogenolisi epatica e la mobilizzazione degli acidi grassi, in quanto acidi grassi e carboidrati sono la miscela di substrati energetici utilizzati dal muscolo durante l'esercizio. Le catecolammine generano radicali liberi per autossidazione o ossidazione catalizzata da metalli, da O<sub>2</sub><sup>•-</sup> o da enzimi (*Ghimire et al.,2012*).

## **Effetti delle ROS sul muscolo**

Sebbene sia necessario comprendere meglio come questi sistemi di generazione delle *ROS* interagiscono, il meccanismo mediante il quale essi influenzano la funzione del muscolo che si esercita è ben stabilito.

A riposo, vi è una ridotta velocità di produzione di ROS per cui la loro concentrazione nei muscoli è relativamente bassa. Durante l'attività contrattile del muscolo vi è un aumento della velocità di produzione di ROS (Balon *et al.*, 1994, Hasegawa,1997). Da un lato, è stato mostrato che la produzione di specie reattive durante l'esercizio non esaustivo, sia aerobico sia anaerobico, è importante per l'adattamento delle fibre muscolari. Nondimeno, durante l'esercizio strenuo, la produzione di ROS può essere più alta della capacità tamponante degli antiossidanti del muscolo. Quando le ROS si accumulano nel muscolo in contrazione, la ossidazione di proteine e lipidi potrebbe causare, tra le altre cose, inibizione della produzione della forza, contribuendo allo sviluppo acuto della fatica. Inoltre, questo esagerato aumento dei livelli di ROS in risposta all'esercizio strenuo può anche condurre alla modificazione ossidativa del DNA, inibire l'attività locomotoria e battericida dei neutrofili, ridurre la proliferazione dei linfociti T e dei linfociti B, inibire le cellule killer naturali, danneggiare la membrana plasmatica ed altri componenti cellulari.

## Produzione di RNS

Oltre alle ROS, nel muscolo si ha anche un aumento della produzione delle RNS, e in particolare quello dell'ossido nitrico da parte delle NOS cellulari è ben documentato.

$NO^{\bullet}$  è generato continuamente dal muscolo scheletrico, una produzione che è aumentata dalla contrazione.  $NO^{\bullet}$  ha un ruolo fisiologico nella regolazione del flusso sanguigno durante l'esercizio poiché controlla l'iperemia indotta dall'esercizio nelle arterie coronariche del cuore e nel muscolo scheletrico in contrazione. E' noto che tre isoforme di NOS (*nNOS*, *iNOS*, e *eNOS*) sono espresse nei muscoli scheletrici dei mammiferi e che la *nNOS* è la isoforma predominante, che è fortemente espressa nelle fibre muscolari a scossa rapida in cui è localizzata sul sarcolemma associata col complesso glicoproteina-distrofina. La *iNOS* è espressa nel muscolo in alcune condizioni infiammatorie, ma non svolge un ruolo significativo nel muscolo a riposo.

Si può ritenere, estendendo al muscolo scheletrico quello che è stato trovato nel muscolo cardiaco, che  $NO^{\bullet}$ , prodotto dalla isoforma mitocondriale (*mtNOS*), regola la respirazione dei miociti e funziona come segnale intracellulare.  $NO^{\bullet}$  prodotto dall'isoforma del reticolo sarcoplasmatico (*eNOS*) è coinvolto nell'attivazione della GMP ciclasi e nella produzione di *cGMP* che attiva la pompa del  $Ca^{2+}$  del reticolo sarcoplasmatico e il sequestro del  $Ca^{2+}$  dopo la contrazione muscolare.

Questo dimostra che  $NO^{\bullet}$  svolge importanti funzioni durante la contrazione. Tuttavia, esso può reagire con il superossido formando il perossinitrito (*ONOO<sup>-</sup>*), un ossidante forte quanto

$\text{OH}^\bullet$ , che è in grado di interagire mediante processi di ossidazione, deaminazione e nitrificazione con un gran numero di sostanze cellulari portando a trasformazioni che inibiscono la loro funzione.

Tenendo presente le alterazioni prodotte dal perossinitrito, non è sorprendente che, oltre ad un danno di componenti della catena respiratoria da parte delle *ROS*, sia stata riportata un'inibizione irreversibile di molti componenti mitocondriali. Così, sia il danno ossidativo dovuto al radicale  $\text{OH}^\bullet$ , sia il danno nitrosativo dovuto a  $\text{ONOO}^-$ , rendono conto del declino della funzione mitocondriale rilevato dopo un esercizio acuto.

L'aumentato grado di riduzione dei componenti della catena respiratoria, dovuto a tale inibizione, spiegherebbe l'elevata produzione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  trovata in mitocondri isolati da animali esercitati.

### **Antiossidanti nell'esercizio**

Al danno ossidativo legato all'esercizio, oltre ad un aumento della produzione di *ROS* e *RNS*, può contribuire anche una caduta delle difese antiossidanti (Cobley et al., 2014).

Come già riportato, questo si verifica nel fegato e in altri tessuti in seguito alla deplezione del glutatione. Questo diminuisce l'efficacia del sistema antiossidante cellulare nel contrastare l'aumento della produzione di *ROS* e accentua il danno ossidativo dei tessuti.

Naturalmente, nelle cellule i sistemi antiossidanti costituiti da enzimi e sostanze scavenger a basso peso molecolare continuano a contrastare l'azione degli ossidanti, ma nel caso

di esercizi strenui o di lunga durata tale azione non è più sufficiente a far fronte alla produzione di ROS e RNS e insorge inevitabilmente una condizione di stress ossidativo (*Powers and Jackson, 2008*).

### **Effetti protettivi degli antiossidanti nel danno legato all'esercizio**

L'esercizio ad esaurimento, specialmente quando sporadico, causa danni strutturali alle cellule muscolari e reazioni infiammatorie nei muscoli, come evidenziato dall'aumento nell'attività plasmatica di enzimi citosolici e dalla distruzione del sarcolemma e delle strie Z (Armstrong, R. B. et al., 1983). Parte del danno indotto dall'esercizio è dovuta alla produzione di radicali liberi e potrebbe essere prevenuta aumentando la efficacia dei sistemi di difesa antiossidante dell'organismo. Diversi studi hanno mostrato che gli enzimi antiossidanti aumentano con lo stress ossidativo indotto dall'esercizio acuto. Tuttavia, l'aumento prodotto nelle difese antiossidanti non è evidentemente proporzionato alle necessità create dall'aumento dei processi pro-ossidanti. Queste potrebbero essere soddisfatte ottimizzando la nutrizione, particolarmente aumentando il contenuto di antiossidanti nella dieta. In effetti, vi sono forti motivi per ritenere che alti livelli di vitamine antiossidanti nei tessuti corporei possano proteggere contro lo stress ossidativo dovuto all'esercizio.

Il muscolo scheletrico contiene approssimativamente 30-50 nmoli di vitamina E per grammo di tessuto, mentre la concentrazione di vitamina E nel cuore e nel fegato ammonta a



60-70 nmoli/g. E' stato mostrato che la concentrazione di vitamina E in diversi tessuti di ratto diminuisce dopo esercizi di resistenza probabilmente a causa dell'aumento della produzione di radicali liberi. E' quindi concepibile che una riduzione del contenuto di vitamina E, in particolare sulla membrana mitocondriale interna, possa aumentare la perdita di radicali liberi, causando dannose reazioni a catena. In effetti, è stato osservato che la deficienza di vitamina E esacerba la produzione di radicali liberi nel muscolo e nel fegato ed aumenta la perossidazione lipidica e la disfunzione mitocondriale in ratti esercitati ad esaurimento.

La limitazione operata dalla vitamina E sull'estensione della perossidazione lipidica può essere attribuita ad una azione diretta sulla reazione a catena radicalica o alla capacità dell' $\alpha$ -tocoferolo e dell' $\alpha$ -tocoferile di spazzare il superossido (Institute of Medicine, 2000, Halliwell B. and J.M.C., 2007).

L'effetto dell'integrazione dietetica con vitamina E sulla perossidazione lipidica indotta dall'esercizio è stata esaminata utilizzando prevalentemente il ratto come modello. In generale, la vitamina E sembra essere in grado di prevenire il danno indotto dai radicali liberi durante l'esercizio (Tab. 2).

Il fatto che non tutti i lavori evidenziarono tale effetto portò alcuni autori a ritenere insufficiente per un atleta la quantità di vitamina E fornita da una alimentazione normale (circa 11 IU, 7,4 mg), e a raccomandare dosaggi fino a 400 IU al giorno ad atleti impegnati in esercizi moderati o pesanti.

Tuttavia, è probabile che la mancanza di effetti benefici evidenziata in alcuni lavori possa anche essere attribuita in parte a differenti modalità di esercizio impiegate ( Sharman et

al., 1971). Negli anni 80 si scoprì che il danno maggiore per il muscolo scheletrico si riscontrava quando l'esercizio implicava una notevole componente di contrazioni di allungamento, descritte come contrazioni eccentriche, che implicano lo stiramento del muscolo che si contrae. Dopo il danno indotto da questo tipo di contrazione, si verifica un danno ulteriore che comporta una perdita della forza contrattile ed è associato ad un notevole afflusso di fagociti e neutrofilo nelle fibre danneggiate. Questo danno secondario era quasi completamente bloccato dal preventivo trattamento degli animali con *SOD* legata a glicol polietilenico. Successivi studi sull'effetto protettivo della vitamina E fornirono risultati contrastanti poiché alcuni ricercatori riportarono nei soggetti trattati una diminuzione dell'attività della creatina chinasi (*CK*) sierica cinque giorni dopo l'esercizio in confronto ai controlli mentre altri ricercatori non evidenziarono né una riduzione di *CK* né un recupero della forza in seguito ad integrazione con vitamina E.

**Tabella 2 Effetto della vitamina E sul danno ossidativo indotto dall'esercizio**

Integrazione/kg cibo	Modello	Esercizio	Effetto
50 IU per 4 settimane	Ratto	Nuoto all'esaurimento	TBARS (fegato)↓
250 IU per 5 settimane	Ratto	Corsa di 60 minuti	TBARS (muscolo)↓
240 mg per 42-45 giorni	Ratto	Stimolazione elettrica	Perdita CK e LDH (muscolo)↓
400 IU per 8 settimane	Ratto	Corsa	MDA (fegato)↓
10000 IU per 4 settimane	Ratto	Corsa	C=O proteici (muscolo)↓
220 IU per 60 giorni	Ratto	Nuoto ad esaurimento	MDA cardiaca↓
800 IU per 48 giorni	Uomo	Corsa di 48 minuti	TBARS urinari↓

TBARS = Sostanze reattive all'acido tiobarbiturico; CK = creatina chinasi; LDH = lattico deidrogenasi; C=O = carbonili; MDA = Malondialdeide

Ricerche più recenti, che hanno usato un modello di contrazioni eccentriche in cui il muscolo è danneggiato in maniera notevolmente riproducibile, hanno evidenziato che la vitamina E ha effetti differenziali sui singoli indici di danno muscolare. Infatti, essa non ha alcun effetto sulla perdita di forza contrattile, ma previene l'aumento dei livelli sierici di enzimi muscolari, in accordo con l'idea che la vitamina può stabilizzare le membrane plasmatiche interagendo con i fosfolipidi. Attualmente la ricerca di potenziali approcci antiossidanti per ridurre il danno indotto da contrazioni eccentriche continua con alterni risultati.

Comunque, alcuni studi hanno permesso di stabilire una relazione tra fatica muscolare e radicali liberi. Uno di tali studi evidenziò che topi trattati per tre giorni con tre *spin trappers* o  $\alpha$ -tocoferolo presentavano una resistenza al nuoto maggiore rispetto agli animali di controllo non trattati. La produzione di radicali liberi nel muscolo non fu determinata, ma fu concluso che l'aumentata resistenza era dovuta alla protezione offerta dagli antiossidanti dal danno da radicali liberi.

Poiché una dieta vegetariana porta a un'elevata introduzione di antiossidanti è comprensibile che siano stati effettuati studi per stabilire se i molteplici benefici legati alla dieta vegetariana si estendevano ad una aumentata performance fisica. I risultati ottenuti indicano che una dieta vegetariana *per se* non è associata a un miglioramento della performance di resistenza aerobica. Tuttavia, altri benefici rendono questo regime alimentare degno di considerazione da parte degli atleti. Una dieta vegetariana ben pianificata può fornire agli atleti quantità adeguate di nutrienti, sebbene esista la possibilità, se la dieta è

troppo restrittiva, di un'introduzione sub-ottimale di proteine, ferro, zinco e altri oligoelementi. D'altra parte, questo problema esiste per tutti gli atleti, vegetariani e onnivori, i quali hanno una dieta povera. Atleti che consumano diete ricche di frutta, vegetali e grano integrale ricevono elevate quantità di nutrienti antiossidanti che aiutano a ridurre lo stress ossidativo associato con esercizi pesanti.

### **Allenamento all'esercizio**

Per un atleta, l'obiettivo principale dell'allenamento è indurre adattamenti strutturali e funzionali che migliorano la capacità di prestazione in una determinata attività. Col tempo lo scopo dell'esercizio si è espanso dagli sports competitivi alla prevenzione delle malattie e alla promozione della salute. Questo è dovuto al fatto che si sono accumulate prove convincenti che una regolare attività fisica può svolgere un ruolo importante nella prevenzione e nel trattamento delle malattie croniche legate all'invecchiamento e nel rallentamento dello stesso processo di invecchiamento.

Quindi, è chiaro che, entro limiti ancora da definire nei dettagli, l'esercizio regolare non induce deterioramento funzionale come l'esercizio sporadico, e, adeguatamente graduato, causa benefici come terapia aggiuntiva anche nel trattamento di pazienti con scompenso cardiaco cronico. Questo suggerisce che un programma di allenamento provoca un adattamento all'esercizio che contrasta gli effetti dello stress fisico. L'adattamento all'esercizio sembra minimizzare la distruzione dell'omeostasi dovuta ai singoli esercizi,

permettendo di compiere lavoro fisico per più tempo alla stessa potenza prima che insorga la fatica.

Gli effetti adattativi dell'esercizio regolare sono specifici dipendendo dalle caratteristiche dell'esercizio.

## Adattamenti all'esercizio

In genere si classifica l'allenamento fisico come allenamento

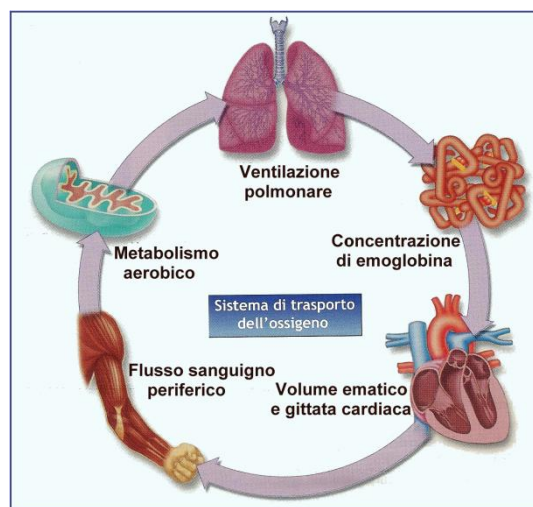


Fig. 7 Sistemi per il rifornimento, il trasporto, la distribuzione e l'utilizzazione di  $O_2$

volto ad incrementare la forza o volto ad incrementare la resistenza del muscolo (*force training* o *endurance training*).

Il "force training" comporta esercizi che richiedono uno sforzo molto intenso ripetuto a intervalli di tempo variabili (es. sollevamento pesi, salto, ecc). Questo tipo di esercizio fisico si basa sull'aumento del carico e porta ad un aumento della forza e della massa muscolare. Esso è associato ad ipertrofia delle fibre muscolari e, in particolare, di quelle che si basano sul metabolismo glicolitico anaerobico mentre i suoi effetti sul sistema cardiovascolare sono marginali.

L'”endurance training” consiste nell’ eseguire esercizi di intensità moderata ma prolungati ed è la forma di allenamento tipica per gli sport di resistenza, come il fondo, il canottaggio, il nuoto ed il ciclismo. Esso porta all’aumento della capacità aerobica e della capillarizzazione delle fibre muscolari e dell’efficienza del sistema respiratorio e cardiovascolare migliorando di conseguenza le capacità aerobiche dell’organismo.

**Tabella 3 Variabili metaboliche e fisiologiche in soggetti sedentari ed allenati**

Variabile	Sedentari	Allenati	Differenza %
Glicogeno mM/g	85	120	4,1
Vmit (%/Vcell)	2,15	8,0	272
ATP mM/g	3,0	6,0	100
Creatina mM/g	10,7	14,5	35
Gittata pulsatoria (mL)	120	180	50
Gittata cardiaca (L min <sup>-1</sup> )	20	30-40	75
Frequenza cardiaca (b min <sup>-1</sup> )	70	40	-43
Volume cardiaco (L)	7,5	9,5	27
Ventilazione max (L min <sup>-1</sup> )	110	190	73
VO <sub>2max</sub> (mL kg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	30-40	65-80	107
% grasso corporeo	15	11	-27

L’aumento indotto dall’allenamento nel massimo consumo di ossigeno richiede una risposta integrata dei sistemi di supporto fisiologici illustrati nella figura 7, che porta ad una variazione di molti parametri metabolici e fisiologici (Tab.3).

Gli adattamenti indotti dall’esercizio aerobico sono particolarmente evidenti nei sistemi cardiorespiratorio e muscolare scheletrico e nella composizione e nel metabolismo corporei, mentre gli adattamenti più evidenti indotti dall’esercizio anaerobico sono quelli del sistema muscolare. Comunque, entrambi i tipi di training sono accumulati da

benefici per la salute e aumentano la resistenza dell'organismo a condizioni di stress.

### **Training e omeostasi redox**

In seguito ad un programma di allenamento, la ossidazione dei lipidi e delle proteine diminuisce nel muscolo scheletrico. Inoltre, come mostrato nella tabella 4, l'allenamento al nuoto diminuisce anche il contenuto mitocondriale di indicatori di danno ossidativo ai lipidi e alle proteine in tessuti come il fegato e il muscolo, in netto contrasto con gli effetti dell'esercizio acuto.

**Tabella 4 Effetto dell'allenamento al nuoto sul danno ossidativo in tessuti di ratto**

	<b>Muscolo</b>		<b>Fegato</b>	
	Tessuto	Mitocondri	Tessuto	Mitocondri
<b>HPs</b>				
Allenati	0,14±0,01*	8,84±0,26*	1,07±0,04*	11,94±0,3*
Controlli	0,22±0,01	11,23±0,48	1,48±0,04	15,74±0,30
<b>C=O</b>				
Allenati	1,90±0,06*	2,21±0,16*	1,80±0,03*	2,23±0,06*
Controlli	2,38±0,04	2,73±0,12	2,57±0,09	2,47±0,03

Valori medi ± SE. Il contenuto di idroperossidi (HPs) è espresso in nM NADP/min/g per i tessuti e in nMNADP/min/mg di proteine per i mitocondri. Il contenuto di carbonili legati alle proteine (C=O) è espresso in nM/mg di proteine. \* significativo vs. i controlli (p < 0.05).

Queste osservazioni suggeriscono che il meccanismo molecolare, che sta alla base degli effetti favorevoli dell'esercizio regolare, potrebbe essere legato alla omeostasi redox, cioè che esso sia un meccanismo adattativo dipendente dai radicali liberi. L'adattamento molecolare poi condurrebbe ad una aumentata resistenza allo stress ossidativo e ad un miglioramento delle funzioni fisiologiche.

## Effetto del training sulle capacità antiossidanti

L'idea degli effetti deleteri dei radicali liberi, che è stata fermamente fissata nelle menti dei ricercatori per molti anni, ha subito in tempi recenti una profonda revisione per cui attualmente si ritiene che bassi livelli di ROS possano svolgere un importante ruolo fisiologico nell'organismo innescando effetti protettivi (Musarò A. et al ,2010, Radak et al 2008).

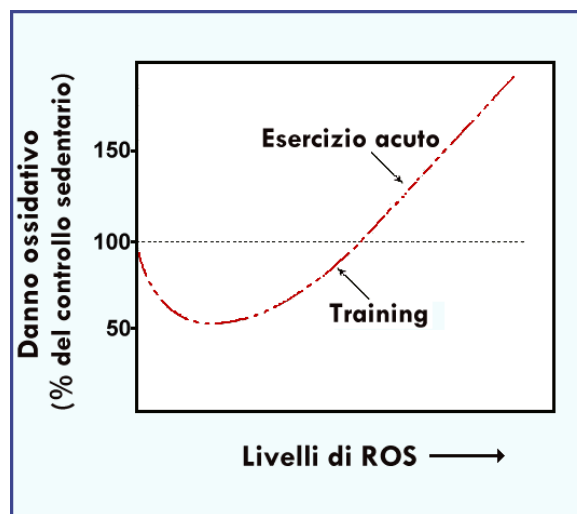


Fig. 8 Risposta ormetica all'esercizio

La base per questo fenomeno può essere trovata nel concetto di ormesi, un fenomeno caratterizzato da una particolare relazione dose-risposta per cui i radicali sono benefici a basse concentrazioni agendo come segnali per aumentare le difese corporee e provocando una riduzione dello stress ossidativo, mentre sono deleteri quando i loro livelli cellulari sono elevati e provocano un aumento del danno ossidativo (Fig.8) (Gomez-Cabrera M.C. et al, 2008, Calabrese et al 2003).

Esempi di un ruolo svolto dalle ROS si riscontrano anche nel muscolo scheletrico, in cui  $H_2O_2$  a basse concentrazioni aumenta il rilascio del  $Ca^{2+}$  dal reticolo sarcoplasmatico e la



produzione di forza, mentre un massiccio aumento della concentrazione di  $H_2O_2$  porta ad una netta diminuzione della forza (Reid et al., 2008).

Anche risultati ottenuti *in vitro* dimostrano che, nei muscoli scheletrici, le ROS hanno un effetto positivo sull'accoppiamento eccitazione-contrazione e sono obbligatori per una funzione contrattile ottimale. Viceversa, la deplezione delle ROS è deleteria per l'accoppiamento eccitazione-contrazione.

L'esatto meccanismo coinvolto nei suddetti processi non è completamente chiaro. Sulla base della letteratura esistente, è probabile che la variazione della forza, in risposta allo spostamento del bilancio redox, sia mediata da variazioni della permeabilità del reticolo sarcoplasmatico al calcio e della sensibilità miofibrillare allo ione.

Probabilmente, i bersagli che determinano la sensibilità al calcio del processo contrattile sono la troponina e la catena leggera regolatoria della miosina.

Inoltre, vi sono diverse prove che la continua presenza di un piccolo stimolo costituito da basse concentrazioni di ROS è capace di indurre l'espressione di enzimi antiossidanti o altri meccanismi di difesa.

È attualmente noto che un fenomeno di induzione genica si verifica anche nel caso dell'aumento della concentrazione delle ROS legate all'esecuzione di un esercizio.

Da tempo era stato suggerito che, poiché l'attività contrattile del muscolo causa un marcato aumento nella generazione di ROS nell'uomo e in altri animali, era concepibile che la ripetuta esposizione del muscolo ad un tale attacco ossidativo

potesse potenziare il sistema di difesa antiossidante proteggendo così il tessuto dal potenziale danno ossidativo.

**Tabella 5 Effetto dell'allenamento di resistenza sulle attività della SOD e della GPX del muscolo scheletrico**

Specie	Allenamento (settimane)	Muscolo	SOD	GPX
Ratto	Mulino (10)	Soleo	↔	↔
		Vasto laterale	↑	↑
Ratto	Mulino 10	Soleo	↑	↑
		Gastrocnemio rosso	↑	↑
		Gastrocnemio bianco	↓	↔
Ratto	Mulino (12)	Soleo	↑	↑
		Gastrocnemio misto	↔	↔
		Retto del femore	↔	↔
Ratto	Mulino (12)	Soleo	↔	↑
		Gastrocnemio rosso	↔	↑
		Gastrocnemio bianco	↔	↑
Ratto	Mulino (10)	Plantare	↑	-
		Diaframma	↑	-
		Parasternale	↑	-
		Intercostale	↑	-
Ratto	(8)	Gastrocnemio rosso		↑
		Vasto laterale mediale		↑
Cane	Mulino (5)	Gastrocnemio rosso		↑
Ratto	Nuoto (10)	Gastrocnemio		↑
Uomo	Ciclette (7)	Vasto laterale		↑

Secondo questa veduta, le *ROS* generate durante la contrazione muscolare avrebbero avuto un ruolo fisiologico nell'adattamento all'esercizio. Inoltre, poiché la risposta adattativa sarebbe derivata dagli effetti cumulativi di ripetute sessioni di esercizio, il segnale iniziale per la stimolazione che conduce alla modulazione a lungo termine deve verificarsi dopo ciascuna sessione di esercizio.

Sebbene complessivamente si siano ottenute forti prove che l'allenamento all'esercizio di resistenza porta ad un aumento dell'attività della *SOD* e della *GPX* muscolare, alcuni studi non sono stati in grado di mostrare ciò (Tab.5) (Hollander J. et al,1999).

Una spiegazione per questa discrepanza non è disponibile, ma differenze nelle tecniche usate per la determinazione delle attività, variazioni nel tipo e nel protocollo dell'allenamento e nella composizione in fibre del muscolo esaminato potrebbero essere dei fattori chiave.

Altri studi hanno dimostrato che, in alcuni muscoli locomotori, il training riduce l'attività della *CAT* ma aumenta il contenuto di *GSH* provocando una sua più rapida sintesi, spiegabile con aumenti nell'attività degli enzimi preposti alla sintesi, la  $\gamma$ -glutamylcisteina sintetasi e la *GSH* sintetasi, e ad una maggiore capacità di prelevare *GSH* dal sangue, dovuta all'aumentata attività della  $\gamma$ -glutamyl-trans-peptidasi.

**Tabella 6 Risposta del muscolo di ratto all'allenamento al nuoto**

GPX	↑
GR	↑
CA	↑
Numero di mitocondri	↑
Velocità di rilascio di ROS	↓
<b>Effetti sull'esercizio acuto</b>	
Velocità della perossidazione*	↓
Velocità del danno al SR	↑
Endurance	

CA, capacità antiossidante totale; SR, reticolo sarcoplasmatico  
\* velocità misurata in nmol MDA/g di tessuto/ora.

Lo studio degli effetti dell'aumento indotto dall'allenamento nell'attività di alcuni antiossidanti sulla protezione contro lo stress ossidativo legato all'esercizio, ha evidenziato che l'allenamento al nuoto porta ad un significativo aumento della capacità antiossidante di muscoli scheletrici e ad una riduzione della velocità di formazione di prodotti della perossidazione lipidica durante un esercizio ad esaurimento. La scoperta che

tale riduzione è associata ad una più lenta comparsa di danno strutturale al reticolo sarcoplasmatico ha suggerito che la ridotta sensibilità del tessuto muscolare degli animali allenati al danno indotto dall'esercizio è dovuta alla più bassa suscettibilità alla perossidazione lipidica. Inoltre, l'osservazione che a queste variazioni è anche associato un aumento della resistenza all'esercizio ha confermato l'idea di un legame fra produzione di *ROS*, danno ossidativo e fatica muscolare (Tabella 6).

Il training provoca un aumento del numero di mitocondri nei muscoli scheletrici di animali esercitati aerobicamente. Questa risposta adattativa al training, che induce un aumento del metabolismo aerobico del muscolo, potrebbe avere conseguenze dannose per la resistenza muscolare durante l'esercizio aerobico. Infatti, l'aumento del contenuto tissutale dei componenti della catena respiratoria, insieme con l'aumento del numero di capillari e quindi della maggiore quantità di O<sub>2</sub> fornita ai muscoli, porterebbe alla conclusione che il training è accompagnato da un'augmentata produzione di *ROS*. Tuttavia, nelle cellule muscolari questo è prevenuto da una riduzione della velocità di produzione delle *ROS* per mg di proteine mitocondriali durante la respirazione sostenuta da succinato (*Venditti et al., 1999*).

Fra l'altro, è stato dimostrato che l'allenamento porta ad un generale aumento della resistenza a condizioni che portano a stress ossidativo. Infatti, esso causa non solo un aumento della endurance, fenomeno che potrebbe essere indipendente dalla sensibilità alle *ROS*, ma riduce il danno collegato a svariati trattamenti che producono *ROS*, come l'ischemia-riperfusion,

l'esposizione al freddo, la somministrazione di ormoni tiroidei, il trattamento con sostanze epatotossiche. Questi risultati rimarcano ancora di più la differenza fra gli effetti dell'esercizio acuto e di quello cronico.

### **Adattamenti muscolari all'esercizio di resistenza**

Oltre ad aumentare l'efficacia del sistema di difesa antiossidante l'allenamento all'esercizio provoca variazioni nelle caratteristiche delle fibre muscolari e nelle prestazioni che esse sono in grado di offrire.

I numerosi cambiamenti e gli adattamenti strutturali che l'esercizio fisico induce nelle fibre muscolari sono il frutto dell'attivazione di varie vie molecolari e dell'espressione di numerosi geni. Le modifiche del fenotipo che sottolineano l'enorme plasticità del muscolo, variano a seconda del tipo di esercizio fisico, della frequenza, dell'intensità e della durata.

L'esercizio aerobico di resistenza, come il nuoto su grandi distanze, induce modificazioni metaboliche nelle fibre ossidative, che sono quelle reclutate principalmente nell'esercizio fisico aerobico. Per esempio, aumentano sia il numero di mitocondri nelle fibrocellule muscolari sia il numero di capillari che irrorano queste fibre. I muscoli così adattati sono capaci di utilizzare in modo più efficiente l' $O_2$  e quindi sono più capaci di resistere all'attività prolungata senza stancarsi. Tuttavia, le loro dimensioni rimangono invariate.

Le vie di segnalazione dello stress ossidativo (o sensibili allo stato redox) usano le ROS per trasferire segnali dalla membrana al nucleo per stimolare l'accrescimento, la

differenziazione, la proliferazione e l'apoptosi. Vi sono anche forti indicazioni che diversi effetti del training sono, almeno in parte, legati a processi di adattamento indotti dalle ROS prodotte nelle singole sessioni di esercizio.

Le indagini sull'efficacia dell'allenamento suggeriscono anche un adattamento del metabolismo epatico all'attività fisica regolare (*Johnson et al., 2009*). Infatti, è stato osservato che l'allenamento nei roditori previene l'iperglicemia e la steatosi epatica (*Lee et al., 2006*). Inoltre, ci sono prove di una regolazione dei meccanismi di difese antiossidanti nel fegato come nel muscolo scheletrico durante l'esercizio. Dati mostrano che nel ratto, il nuoto aumenta l'attività degli enzimi antiossidanti glutatione perossidasi e glutatione reduttasi (GR) non solo nel muscolo scheletrico, ma anche nel fegato e nel cuore (*Venditti and Di Meo 1996*).

Tuttavia, il nuoto nel ratto, non solo potenzia l'attività enzimatica antiossidante ma aumenta anche il contenuto di GSH nel tessuto epatico, sia mediante una sua più rapida sintesi, spiegabile con aumenti nell'attività degli enzimi preposti alla sintesi:  $\gamma$ -glutamil cisteina sintetasi (GCS) e GSH sintetasi (*Venditti et al., 2008*), sia mediante una maggiore capacità di prelevare GSH dal sangue, dovuta all'aumentata attività della  $\gamma$ -glutamiltranspeptidasi.

## **Meccanismi dei processi adattativi**

Nei meccanismi, che portano nel muscolo scheletrico ad un aumento della massa mitocondriale e del numero di capillari che irrorano le fibre e quindi delle capacità ossidative (*Baldwin et al, 1972; Davies et al, 1981*), un ruolo importante è svolto dal calcio e dal maggior dispendio energetico. L'aumento intracellulare del calcio porta all'attivazione delle chinasi CaMK, mentre il consumo di ATP associato al dispendio energetico aumenta i livelli di AMP. Bassi livelli di ATP e alti livelli di AMP attivano una chinasi attivata da AMP (AMPK) che ha il ruolo di controllare la disponibilità energetica (*Freysenet, 2007*). Entrambe le chinasi traslocano nel nucleo e, attraverso l'attivazione del co-attivatore trascrizionale peroxisomal proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PGC-1 $\alpha$ ), promuovono l'attivazione della biogenesi mitocondriale e la sintesi di enzimi ossidativi. PGC-1 $\alpha$ , infatti, regola l'espressione di fattori di trascrizione come nuclear respiratory factor 1 e 2 (NRF-1 e NRF-2) che promuovono la trascrizione di geni codificanti per proteine mitocondriali (*Hood et al., 2006*) e di fattori di trascrizione come il mitochondrial transcription factor (Tfam) che direttamente stimola la replicazione e la trascrizione del DNA mitocondriale.

L'attivazione di questi fattori, portando ad un aumento dell'attività respiratoria, dell'espressione degli enzimi del ciclo di Krebs e della catena di trasporto degli elettroni, determina l'adattamento mitocondriale all'esercizio. Inoltre le ROS prodotte in ogni singola sessione del programma di training , oltre ad essere coinvolti nell'attivazione di PGC-1 $\alpha$ ,

regolano diverse vie di segnalazione, quali la via di NfκB e di Ap-1, coinvolte nella regolazione positiva di enzimi antiossidanti (Brooks et al., 2008). Inoltre è stato osservato che i ROS possono indurre la produzione di citochine infiammatorie chiamate “miochine”, che si pensa svolgano un ruolo come anti-infiammatori apportando effetti benefici sia a livello locale che sistemico (Scheele et al., 2009). È stato inoltre dimostrato che l’esercizio fisico promuove anche la trascrizione di enzimi coinvolti nel riparo del DNA (Radák et al., 2002), mentre regola negativamente l’espressione di proteine pro- apoptotiche quali BAX (Siu et al., 2004, Adhietty et al., 2007). Un’intensa attività contrattile stimola l’aumento del trasporto di glucosio; infatti, è stato osservato che l’esercizio fisico aumenta l’espressione dell’ mRNA del trasportatore di glucosio GLUT-4 (*MacLean et al., 2002*) e stimola la sua traslocazione dallo spazio intracellulare alla membrana plasmatica e ai tubuli T. Tuttavia è stato dimostrato che l’attività della AMPK non è necessaria per l’aumento dell’espressione dell’RNA in seguito ad allenamento (*Holmes B F et al., 2004*). L’esercizio fisico porta ad un aumento del consumo di lipidi favorendo selettivamente l’espressione di enzimi coinvolti nel metabolismo e nell’ossidazione degli acidi grassi come MDAC, VDAC e PPARα (*Horowitz et al., 2000*). Fra i principali fattori coinvolti nella biogenesi mitocondriale e nella sintesi di enzimi ossidativi vi sono:

**-PGC-1** è un coattivatore trascrizionale dal peso molecolare di 92 kDa identificato per la prima volta in una linea cellulare differenziata del tessuto adiposo bruno sulla base della sua



interazione con PPAR $\gamma$ , un importante regolatore del differenziamento degli adipociti (*Puigserver et al., 1998*).

I coattivatori sono proteine che attivano la trascrizione e modificano la struttura della cromatina e la macchina di trascrizione per stimolare l'espressione genica. La maggior parte dei fattori di trascrizione si legano probabilmente ad uno o più coattivatori per iniziare la trascrizione. PGC-1 è dotato di un potente dominio di attivazione trascrizionale, ma, a differenza degli altri coattivatori, appare privo di una attività istone-acetil-transferasi. L'effetto positivo mediato da PGC-1 sulla trascrizione sembra essere indotto, quindi dalla sua capacità di reclutare altri coattivatori che hanno un'attività acetil-transferasica intrinseca (*Puigserver et al., 1998*).

E' stato messo in evidenza che l'espressione di PGC-1 si realizza preferenzialmente in tessuti con un'elevata capacità ossidativa, come cuore, muscolo scheletrico e tessuto adiposo bruno (BAT), dove esercita un ruolo importante nella regolazione della funzionalità mitocondriale e del metabolismo energetico cellulare. Esso risulta sovraespresso nell'esposizione a freddo, nel muscolo scheletrico esercitato, nel fegato e nel cuore di animali a digiuno. Nel fegato e nel BAT la via  $\beta$ -adrenergica/cAMP attiva la trascrizione del fattore. La calcineurina A, le proteine-chinasi calcio/calmodulina-dipendenti, nonché l'AMPK ne attivano l'espressione nel muscolo. Anche l'ossido nitrico (NO) rappresenta una molecola segnale implicata nella stimolazione di PGC-1 $\alpha$  tramite un meccanismo cGMP-dipendente in un'ampia gamma dei tipi cellulari.

PGC-1 coattiva anche un gran numero di fattori di trascrizione che sono coinvolti nell'espressione di proteine non mitocondriali, ad esempio PPAR $\alpha$  e ERR $\alpha$  (recettori connessi agli estrogeni), che influenzano l'ossidazione degli acidi grassi e la fosforilazione ossidativa. Inoltre, altri bersagli della coattivazione regolano vie esterne ai mitocondri, come HNF-4 e FOXO1, che attivano la gluconeogenesi, MEF-2 che è coinvolto nel trasporto del glucosio, e SREBP1 che stimola la lipogenesi .

**-NRF-1** è una proteina nucleare di 68 KDa, in grado di attivare geni codificanti per il citocromo c, per la maggior parte delle subunità nucleari dei Complessi I-V e per l'enzima 5-aminolevulinato sintasi, enzima coinvolto nella biosintesi dell'eme. Inoltre, NRF-1 promuove l'espressione di componenti chiave della trascrizione mitocondriale necessari per la sintesi di subunità respiratorie (*Scarpulla et al., 2002*). La sua induzione è stata osservata nel muscolo scheletrico di ratti sottoposti ad esercizio (*Murakami et al., 1998*) e di zebrafish esposto a freddo (*McClelland et al., 2006*).

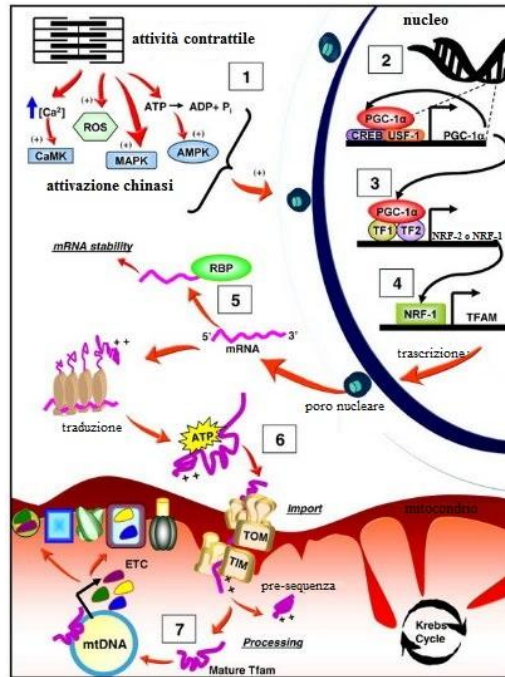


Fig. 9 Risposta ormetica all'esercizio

-**NRF-2** definito anche proteina legante GA (GABP) è un fattore composto da 5 subunità:  $\alpha$  ( 51,4 kDa );  $\beta$ 1 (42,5 kDa);  $\beta$ 2 (41,3 kDa);  $\gamma$ 1 (38,1 kDa);  $\gamma$ 2 (36,9 kDa). La subunità  $\alpha$  contiene una sequenza ETS grazie alla quale è in grado di legare il DNA anche in assenza delle altre subunità. Al contrario, le altre subunità possono formare un complesso con la  $\alpha$ , ma non sono in grado di interagire direttamente col DNA. NRF-2 è coinvolto nella regolazione di geni responsabili della funzionalità mitocondriale, nella biogenesi della subunità IV della citocromo ossidasi e del fattore A di trascrizione mitocondriale (Tfam), che stimola la trascrizione del mtDNA in un trascritto poligenico e viene trasformato in 14 tRNA, 12 mRNA, e due rRNA. Tale fattore coordina l'espressione dei componenti mitocondriali in risposta a richieste energetiche o segnali proliferativi (Fig.9).

## **Esercizio e supplementazione antiossidante**

L'osservazione che l'esercizio fisico provoca un aumento della produzione di ROS, ha condotto i ricercatori ad interrogarsi sugli effetti della supplementazione antiossidante sulle risposte adattative normalmente evocate dal training.

Il ruolo potenziale delle ROS nell'induzione di risposte adattative alla contrazione indica anche che gli antiossidanti potrebbero sopprimere queste risposte adattative. Infatti, se le ROS prodotte nell'esercizio agiscono come segnali che regolano importanti eventi molecolari nell'adattamento delle cellule muscolari all'esercizio, ne consegue che la somministrazione di antiossidanti dovrebbe prevenire tali adattamenti .

In accordo con tale idea, l'esame degli effetti dell'integrazione di vitamina C sulla risposta del muscolo scheletrico ad ossidanti endogeni ed esogeni dimostrò che tale trattamento causava una attenuazione delle risposte adattative agli ossidanti. Questo risultato è stato confermato da un numero crescente di lavori che hanno mostrato effetti deleteri del trattamento con antiossidanti sull'adattamento all'esercizio. La sola integrazione per la quale sono stati riportati effetti benefici è quella con il donatore di cisteina, la N-acetilcisteina (NAC) (Tabella 7) (Sestre J. et al.,1992)

**Tabella 7 Effetti di ROS o di antiossidanti sulla performance muscolare**

	Aggiunte o trattamenti	Effetto
In vitro	CAT e SOD	Diminuita forza contrattile
	CAT+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inversione dose dipendente
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (alta conc.)	Severa caduta della forza
	DMSO	Diminuita forza contrattile
In vivo	Vit E (400IU, 6 sett.)	Minore performance in nuotatori adolescenti
	Vit C (1 g, 4 sett.)	Minore velocità di levrieri da corsa
	Vitamina C (1 g, 14 giorni)	Lento recupero da un esercizio dannoso
	Vit E+acido lipoico (8 sett.)	Minore forza tetanica del muscolo di ratto
	N-acetilcisteina	Maggiore tolleranza dell'uomo all'esercizio

Un recente lavoro dimostrò che ratti non allenati erano in grado di correre per 100 minuti prima dell'esaurimento, mentre dopo 6 settimane di allenamento essi correvano per 300 minuti. Tuttavia, se essi erano trattati con vitamina C, dopo lo stesso periodo di allenamento correvano solo per 120 minuti.

E' stato anche riportato che la somministrazione di allopurinolo, un potente inibitore della xantina ossidasi, previene l'adattamento indotto dall'esercizio (Gomez-Cabrera M.C. et al.,2006, Vina J. et al, 2000) .

Queste osservazioni evidenziano l'importanza delle ROS, almeno alle concentrazioni generate durante l'allenamento all'esercizio, nell'indurre l'adattamento e indicano che la raccomandazione di prendere supplementi antiossidanti prima di un esercizio moderato dovrebbe essere rivista poiché essi possono prevenire utili adattamenti indotti dall'esercizio.

In conclusione queste scoperte suggeriscono che le ROS servono per l'adattamento delle cellule muscolari all'esercizio.

Quando si utilizzano supplementi antiossidanti questi adattamenti sono ostacolati. D'altro canto antiossidanti dovrebbero essere somministrati prima di una competizione quando è probabile che l'esercizio porti all'esaurimento e

comporti una generazione di ROS che sovrasta i meccanismi di difesa.

### **Scopo della tesi**

I risultati esposti nella precedente tabella dimostrano chiaramente che la supplementazione antiossidante produce effetti negativi sulla prestazione fisica che sono chiaramente collegabili ad alterazioni delle proprietà meccaniche del muscolo. Tali effetti appaiono molto simili a quelli indotti dalle ROS.

È possibile ritenere che questi effetti siano dovuti ad una riduzione delle risposte adattative che condizionano la endurance e la performance e che sono evocate dall'allenamento fisico, attraverso una continua produzione di ROS a bassi livelli.

Il sistema di elezione per dimostrare il coinvolgimento delle ROS nelle risposte all'allenamento è la determinazione degli effetti dell'integrazione antiossidante in animali allenati.

Poiché il training induce risposte adattative anche nel fegato e nel cuore, durante i primi due anni di dottorato, ho valutato gli effetti della somministrazione dell'antiossidante  $\alpha$  tocoferolo sugli adattamenti metabolici e del sistema di difesa antiossidante indotti dall'allenamento al nuoto su tali tessuti utilizzando come modello sperimentale il ratto albino. Nell'ultimo anno ho valutato gli effetti dell'antiossidante sul metabolismo e lo stato redox del muscolo scheletrico nei ratti allenati al nuoto.

Informazioni sul metabolismo sono state ottenute determinando la respirazione tissutale e mitocondriale e l'attività dell'enzima citocromo ossidasi, che fornisce informazioni sulla massima capacità respiratoria. La determinazione dell'attività dell'enzima nei preparati muscolari e la determinazione dell'espressione del citocromo c mi hanno anche permesso di valutare gli effetti dell'allenamento e dell'integrazione antiossidante sulla massa mitocondriale.

Informazioni sullo stato redox del muscolo sono state ottenute determinando il danno ossidativo, la velocità della produzione mitocondriale del perossido di idrogeno, l'attività degli enzimi GPX e GR che sono cruciali per il turnover del GSH e gli stessi livelli del tripeptide.

Infine, sono stati studiati gli effetti dell'allenamento e della integrazione antiossidante su un coattivatore dell'espressione genica, come il PGC-1, che è coinvolto nella regolazione del metabolismo e della omeostasi redox e di attivatori, come NRF-1 e NRF-2, che sono coinvolti con il PGC-1 nella biogenesi mitocondriale.

## **Materiali e Metodi**

### **Animali e protocollo di allenamento**

Gli esperimenti sono stati effettuati su ratti maschi del ceppo Wistar di 120 giorni di età. Gli animali sono stati forniti dalla ditta Nossan (Correzzana, Italia), all'età di 45 giorni e sono stati casualmente divisi in ratti sedentari ed allenati. Come esercizio per l'allenamento è stato scelto il nuoto, effettuato 5 giorni a settimana per 10 settimane.

Il programma di allenamento prevedeva inizialmente brevi periodi di nuoto e il loro aumento graduale, sia per facilitare il processo di apprendimento che per ridurre la reazione di stress. Pertanto, durante la prima settimana i ratti hanno nuotato per 15 minuti al giorno per familiarizzare con l'immersione in acqua. Nella seconda settimana, la sessione di nuoto è stata della durata di 50 minuti, nella terza settimana di 60 minuti, nella quarta di 70 minuti e dalla quinta alla decima settimana i ratti hanno nuotato per 90 minuti al giorno.

L'allenamento è stato eseguito in un contenitore di plastica dell'altezza di 100 cm e riempito all'altezza di 45 cm con acqua mantenuta alla temperatura di 35-36°C. Tale temperatura consente agli animali di sostenere un programma di nuoto di lunga durata senza incorrere in stress termico (Dawson et al., 1970).

Fino al cinquantesimo giorno i ratti sono stati alimentati con una dieta di controllo costituita da cibo, fornito dalla ditta Mucedola, contenente 70mg di vitamina E/Kg di mangime. Dal cinquantesimo giorno, con l'inizio del programma di



allenamento, la dieta di metà dei ratti sedentari e metà di quelli allenati è stata arricchita con vitamina E. In pratica al mangime standard per animali fornito dalla Mucedola veniva aggiunta vitamina E fino alla concentrazione di 700 mg di vitamina E/Kg di mangime. Mentre gli altri ratti hanno continuato la dieta di controllo.

In questo modo sono stati ottenuti quattro gruppi sperimentali di ratti:

- Ratti di controllo sedentari (**S**)
- Ratti sedentari trattati con vitamina E (**S+VE**)
- Ratti di controllo allenati (**T**)
- Ratti allenati trattati con vitamina E (**T+VE**).

Tutti i ratti sono stati sottoposti alle stesse condizioni: di stabulazione ossia, in un ambiente a temperatura controllata di 24-25° C, con ciclo circadiano artificiale di 12 ore di luce e 12 ore di buio in un ambiente con il 50±10% di umidità relativa ed alimentati ad libitum con acqua e cibo.

Il trattamento degli animali in questi esperimenti è stato conforme alle linee guida definite dalla University's Animal Care Review Committee



## **Preparazione degli omogenati**

Ventiquattro ore dopo la fine del programma di allenamento i ratti, sono stati sacrificati per decapitazione previa anestesia con cloralio (40mg/100g di peso corporeo).

I tessuti (cuore, fibre rosse del muscolo gastrocnemio) sono stati rapidamente rimossi e posti in beakers tenuti in ghiaccio contenenti un mezzo di omogenizzazione (HM) costituito da mannitolo 220 mM, saccarosio 70mM, EDTA 1 mM, albumina priva di acidi grassi (BSA) 0,1%, Tris 20 mM, a pH 7.4. Frammenti di ciascun tessuto sono stati rapidamente congelati in azoto liquido e conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  per essere utilizzati successivamente per allestire i western blotting. I tessuti, liberati del connettivo, sono stati pesati, finemente tagliuzzati e lavati con l'HM. Il tessuto muscolare e quello cardiaco sono stati incubati per 5 min a temperatura ambiente in soluzione HM contenete proteasi nagarse alla concentrazione 0,1mg/ml. Al termine del periodo d'incubazione la soluzione contenete nagarse è stata sostituita con soluzione HM contenete 0,1% BSA. Tutti i tessuti sono stati delicatamente omogenizzati nella stessa soluzione alla concentrazione finale del 20% p/v, utilizzando un omogenizzatore Potter-Elvehjem di vetro, ad una velocità standard di 500 rpm per 1 minuto. Aliquote degli omogenati sono state utilizzate per le successive procedure analitiche e per l'isolamento mitocondriale

## **Preparazione dei mitocondri**

Gli omogenati, diluiti 1:1 con l'HM, sono stati liberati dai debris cellulari e dai nuclei attraverso una centrifugazione a 500g per 10 minuti a 4°C. I surnatanti del tessuto muscolare e cardico sono stati centrifugati a 3000g per 10 minuti a 4 C. I pellets mitocondriali sono stati risospesi in una soluzione di lavaggio (WB) costituita da mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM, EGTA 1 mM, Tris 20 mM a pH 7,4 e centrifugati alla stessa velocità di sedimentazione per due volte. Infine i mitocondri sono stati risospesi in WB ed utilizzati per le procedure analitiche dopo aver determinato il contenuto proteico dei preparati, mediante il metodo del biureto (Gornall et al., 1949) usando albumina serica bovina (BSA) come standard. Il dosaggio è di tipo colorimetrico in quanto determina una variazione di colore la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione proteica del campione. Il solfato rameico, presente nella soluzione biureto, infatti, in ambiente alcalino, viene complessato dai gruppi amminici delle proteine, dando complessi colorati (azzurri) e leggibili a 550 nm.

## Contenuto di Vitamina E

L'efficacia del trattamento con vitamina E è stata valutata misurando, mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), il contenuto tissutale di vitamina E con la procedura di *Lang et al.*, (1986) utilizzando uno standard esterno per la determinazione quantitativa. In questo tipo di cromatografia gli eluenti (fase mobile) sono pompati a elevata pressione sulla fase stazionaria rappresentata dal supporto solido contenuto nella colonna metallica. La soluzione del campione è iniettata nella fase mobile, attraverso una porta di iniezione (loop di iniezione). Quando il campione fluisce insieme alla fase mobile attraverso la fase stazionaria, la migrazione dei suoi componenti dipende dalle interazioni non covalenti con la fase stazionaria. Le interazioni chimiche tra la fase stazionaria e il campione e tra questi e la fase mobile determinano il grado di migrazione e la separazione degli elementi contenuti nel campione. Nella cromatografia a fase inversa la separazione avviene in base all'idrofilicità e alla lipofilicità. La resina contenuta nella colonna di acciaio è costituita da sfere di silicio cui sono legate covalentemente catene n-alchiliche. In questo modo, i composti idrofilici fluiscono più rapidamente dei composti idrofobici. Questa tecnica è molto vantaggiosa perché consente di realizzare la separazione cromatografica in tempi molto brevi. Per la determinazione della vitamina E, gli omogenati tissutali sono stati deproteinizzati mediante trattamento con metanolo contenente butiloidrossitoluene (BHT) allo 0.05% nel rapporto 1:4 ed agitati con un vortex per 1 minuto. Alla sospensione è stato aggiunto esano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) per

estrarre la vitamina e la soluzione è stata agitata con un vortex per 10 minuti. La miscela ottenuta è stata centrifugata a 4000rpm per 10min a 4°C per separare le due fasi di soluzione acquosa ed esano. L'esano è stato prelevato ed è stato evaporato sotto flusso di azoto a 40°C. Infine i residui secchi sono stati disciolti in metanolo. Il campione così ottenuto è stato iniettato in un loop da 20 µl collegato ad una colonna cromatografica C<sub>18</sub>, della lunghezza di 250mm nella quale fluiva metanolo alla velocità di 1 ml/min. La posizione del picco di vitamina E e la sua concentrazione sono state ricavate utilizzando una retta di taratura ottenuta sottoponendo a separazione cromatografica soluzioni a concentrazione nota di vitamina E in metanolo. La concentrazione di vitamina E, nelle soluzioni standard è stata stabilita mediante la misura spettrofotometrica dell'assorbimento a 292nm e l'utilizzo del coefficiente di estinzione molare della vitamina E in alcool.

## **Attività della citocromo ossidasi**

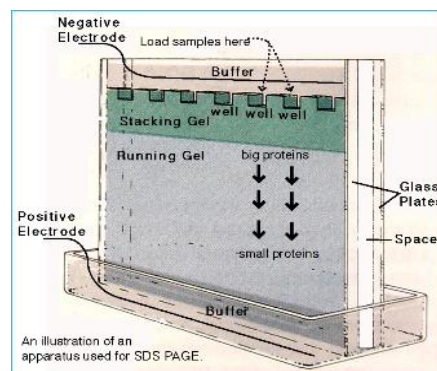
La citocromo ossidasi (COX), ultimo enzima della catena respiratoria mitocondriale, è direttamente responsabile della riduzione dell'O<sub>2</sub> ad H<sub>2</sub>O. La sua attività, in vitro, è stata positivamente correlata alla massima attività aerobica tessutale e mitocondriale (Simon et al., 1971). L'attività della COX è stata determinata polarograficamente a 30° C mediante l'utilizzo di un ossigrafo Hansatech, dotato di elettrodo Clark per l'ossigeno, attraverso una procedura messa a punto da Barrè et al. (1987). I campioni di omogenato (1:5) sono stati diluiti con uguale volume di soluzione di Chappel-Perry 2x (ATP 1 mM, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 5 mM) ottenendo in tal modo degli omogenati alla concentrazione di 1 g/10 mL. Quindi, uguali volumi di omogenati 1:10 e di una soluzione di Chappel-Perry contenente Lubrol alla concentrazione di 10 mg/mL sono stati mescolati e incubati per 30 minuti a 0°C per smascherare l'attività dell'enzima. Per determinare, invece, l'attività della COX delle frazioni mitocondriali, sospensioni di tali organelli, a concentrazione proteica nota, sono stati inizialmente diluiti in soluzione di Chappel-Perry 10x. Quindi, ai campioni così diluiti è stato aggiunto un volume di una soluzione di Lubrol (1,5 mg/mL) in soluzione di Chappel-Perry in modo da avere 0,25 mg di Lubrol per mg di proteine mitocondriali. La quantità di sospensione mitocondriale da utilizzare nella determinazione è stata calcolata tenendo conto che, nella camera di reazione, dovrà essere presente una concentrazione finale di 0,2 mg/mL di proteine mitocondriali. In seguito,

Nella camera di reazione del respirometro, è stato introdotto 1 ml di una soluzione contenente citocromo c 30  $\mu\text{M}$ , rotenone 4  $\mu\text{M}$  (inibitore del complesso I), 2,4-dinitrofenolo 0,5 mM (disaccoppiante della fosforilazione ossidativa), Na-malonato 10 mM (inibitore della succinato deidrogenasi), HEPES 75 mM, a pH 7,4, cui sono stati aggiunti 20  $\mu\text{l}$  del campione di omogenato (contenenti 0,001 g di tessuto) o 0,2 mg di proteine mitocondriali. Dopo la stabilizzazione dello strumento nella camera di reazione sono stati aggiunti 15  $\mu\text{l}$  di soluzione contenente Na-ascorbato 400 mM e tetrametilparafenildiammina (TMPD) 30 mM come substrato in grado di ridurre il citocromo c. L'attività della COX è stata espressa come  $\mu\text{mol O}/\text{min}/\text{g}$  di tessuto o come  $\mu\text{mol O}/\text{min}/\text{mg}$  di proteine mitocondriali. Il rapporto tra l'attività della COX tessutale e quella mitocondriale ha fornito una valutazione approssimata del contenuto in mg di proteine mitocondriali per grammo di tessuto dei campioni in esame (Venditti P et al., 1996)

## Determinazione dell'espressione del Citocromo c

### SDS page

La prima fase nella determinazione dell'espressione delle proteine è costituita dalla separazione delle proteine mediante elettroforesi. Le aliquote di muscolo sono state omogeneizzate (diluizione 1:10) in NaCl 500 mM, nonidet P-40 allo 0.5%, EDTA 6 mM, EGTA 6 mM, ditiotreitolo 1 mM, Tris-HCl 40 mM, pH 8 in presenza di una miscela di antiproteasi contenente PMS 40 µg/mL, leupeptina 5 µg/mL, aprotinina 5 g/mL, pepstatina 7 g/ml. Gli omogenati sono stati centrifugati a 2500 g per 10 minuti a 4°C. Il supernatante, su cui sono state preventivamente dosate le proteine presenti, è stato sottoposto a elettroforesi mediante SDS-PAGE utilizzando un gel di impaccamento di acrilamide al 6% e un gel di separazione al 12%, sul quale sono stati caricati 30 µg di proteine.



I campioni sono stati preparati diluendo 10 µL di sospensione proteica, contenente 1.5 mg/mL di proteine, con 5 µL di SDS al 3%, glicerolo al 30%, β-mercaptoetanolo al 15%, blu di bromofenolo allo 0.1%, Tris base 0.187 M, pH 6.8. I campioni



sono stati bolliti per 5 minuti e dunque sono stati caricati sul gel 30 µg di proteine mitocondriali. La corsa del gel è durata un'ora a voltaggio costante di 25. Per visualizzare il quadro di separazione elettroforetica, alcuni gel sono stati fissati con isopropanolo al 25% e acido acetico al 10% e dunque colorati con la medesima soluzione contenente Coomassie G-250 allo 0.02%. La decolorazione è stata ottenuta agitando i gel per 48 ore in acido acetico al 10%.

### **Western blotting**

La seconda fase della procedura per la determinazione dell'espressione delle proteine è costituita dal trasferimento delle proteine. Le proteine muscolari, separate mediante elettroforesi, sono state trasferite dal gel su una membrana di nitrocellulosa tramite elettroblotting. Le membrane sono state precedentemente attivate in metanolo assoluto per 10 minuti, dunque sciacquate con acqua distillata e poste in una soluzione di trasferimento per gel, contenente metanolo al 10% e soluzione di trasferimento 1x (Tris-HCl 480 mM e glicina 390 mM). Le membrane sono state dunque incubate con anticorpi per PGC-1, NRF-1 e NRF-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluiti 1:1000, in NaCl 154 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, latte scremato al 2.5%, Tween20 al 10%. Il riconoscimento dell'anticorpo primario, ottenuto mediante interazione con un anticorpo secondario marcato con HRP, ha consentito la visualizzazione delle bande di interesse mediante l'impressionamento di una lastra fotografica dovuto alla conversione del luminolo in una sostanza fluorescente,

reazione catalizzata dall'HRP in presenza di luminolo e perossido di idrogeno. E' stata usata actina per standardizzare il caricamento delle proteine. Per confrontare i livelli di espressione delle proteine tra i vari gruppi, su ogni gel è stato fatto correre un campione standard ottenuto da un animale sedentario. Dunque i valori di ciascun gruppo sono stati comparati con il campione sedentario al quale è stato assegnato il valore 1.

## Consumo di Ossigeno

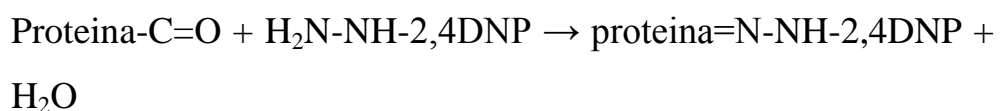
L'attività respiratoria nei preparati tissutali e mitocondriali è stata determinata con un metodo polarografico, che prevede l'utilizzo di un respirometro dotato di elettrodo di Clark (Hansatech). L'elettrodo di Clark è costituito da un catodo di platino e un anodo di argento, immersi in una soluzione salina e separati dal campione in esame tramite una membrana pervia al solo ossigeno. L'ossigeno diffonde dalla camera di misura, al catodo che lo riduce utilizzando 4 elettroni prodotti dall'anodo. Il trasferimento di elettroni genera una corrente che è misurata da un computer collegato all'apparecchio. Le variazioni della corrente registrata al catodo sono convertite in variazioni della concentrazione di ossigeno e riportate in un grafico. Le misure sono state effettuate a 30°C, utilizzando un mezzo di incubazione contenente KCl 145 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, Hepes 30 mM, EGTA 0,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, a pH 7,4 e BSA allo 0,1%. Sono stati utilizzati per ogni lettura 25 µl di omogenato 1:5 o 0,2 mg/ml di proteine mitocondriali. L'aggiunta del campione in soluzione ha determinato un temporaneo decremento della concentrazione di ossigeno in soluzione dovuto al consumo dei substrati endogeni (Fase1). Dopo una fase di stabilizzazione, è stato aggiunto un substrato respiratorio in eccesso, che ha provocato un consumo di ossigeno costante e prolungato a bassa velocità, Fase 2 della respirazione. Come substrati sono stati utilizzati succinato (10 mM), che produce equivalenti riducenti (FADH<sub>2</sub>) ossidati a livello del complesso II, o una miscela di piruvato (10mM) e malato (2,5mM), che producono

equivalenti riducenti (NADH) che entrano nella catena respiratoria a livello del complesso I. La successiva aggiunta di quantità saturanti di ADP (500  $\mu$ M) ha indotto la Fase 3 della respirazione, in tale fase il gradiente protonico è dissipato rapidamente dall'aumento dell'attività dell'ATP sintetasi e la velocità del consumo di ossigeno aumenta nel tentativo di ripristinare rapidamente tale gradiente. La velocità del consumo di ossigeno declina quando tutto l'ADP è stato consumato, riportando i livelli di ossigeno a quelli osservati durante la fase 2. Si parla a questo punto di Fase 4. I valori raccolti durante la fase 3 e la fase 4 della respirazione sono stati espressi come  $\mu$ molO/minuto/gr di tessuto o mg di proteine mitocondriali. Il rapporto tra il consumo di ossigeno in fase 3 e quello in fase 4, detto rapporto di controllo respiratorio (RCR), rappresenta un indice dell'integrità dei mitocondri. Infatti, un danno della membrana mitocondriale porta ad aumento della velocità del consumo di O<sub>2</sub> nella fase 4 e ad una conseguente riduzione di tale indice.

## **Danno ossidativo alle proteine**

Il danno ossidativo delle proteine è stato valutato utilizzando una procedura messa a punto da Reznick e Packer (1994) per quanto riguarda gli omogenati, e una procedura modificata da Schild et al., (1997) per quanto riguarda i mitocondri. La metodica utilizza come markers dell'ossidazione proteica i gruppi carbonilici (C=O) che si formano in seguito a ossidazione, da parte delle ROS, dei gruppi amminici delle catene laterali degli amminoacidi lisina, arginina, prolina ed istidina. Le reazioni ossidative sono catalizzate da cationi metallici come  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{+}$ , che si legano a specifici siti delle proteine.

La quantificazione dei gruppi carbonilici è effettuata con una metodica spettrofotometrica che consente di valutare i prodotti di reazione (idrazoni) della dinitrofenilidrazina (DNPH) con i gruppi carbonilici delle proteine:



Per ogni determinazione sono state utilizzate due aliquote del campione in esame, contenente ciascuna 0,5 mg di proteine mitocondriali. Tali proteine sono state precipitate in acido tricloroacetico (TCA) al 10%, centrifugate a 2500 rpm per 15 minuti a 4 °C, risospese in 150 µl di NaOH 0,1 M ed incubate a temperatura ambiente per 5 minuti. Ad una delle due aliquote sono stati aggiunti 1,5 ml di HCl 2,5 M (bianco), all'altra 1,5 ml di DNPH in HCl 2,5 M.

I preparati sono stati incubati per un'ora al buio a temperatura ambiente. La reazione della DPNH è stata bloccata dall'aggiunta

di 1,65 ml di TCA al 20% e i sedimenti, ottenuti per centrifugazione, sono stati lavati una volta con 1,5 ml di TCA al 10% e due volte con una miscela di etanolo/acetato di etile (1:1 v/v) e infine disciolti in 2 ml di idrocloruro di guanidina 6 M.

Per gli omogenati sono state utilizzate due aliquote del campione in esame, contenente ciascuna 0,5 ml di omogenato. Tali campioni sono stati diluiti 1:2 con un tampone fosfato 50 mM a pH 7.4 contenente digitonina allo 0,1% e antiproteasi quali fenilmetilsulfonilmetile (PMSF) 40 µg/ml, aprotonina 5 µg/ml, leupeptina 5 µg/ml, pepstatina 7 µg/ml. Dopo incubazione in ghiaccio per 15 minuti, i campioni sono stati centrifugati a 1550 rpm per 10 minuti, ed i supernatanti prelevati sono stati incubati a temperatura ambiente per 10 minuti con l'1% di streptomicina, per precipitare il DNA, e ricentrifugati a 1550 per 10 minuti a 4° C. Successivamente ad una delle due aliquote sono stati aggiunti 4 ml di HCl 2,5 M (bianco), all'altra 4 ml di DNPH 10 mM in HCl 2,5 M. I preparati sono stati incubati per un'ora al buio a T ambiente. Si è bloccata la reazione con l'aggiunta di 5 ml TCA al 20% ed i sedimenti, ottenuti per centrifugazione, sono stati lavati una volta con 4 ml di TCA al 10%, tre volte con 4 ml di una miscela di etanolo/acetato di etile (1:1 v/v) e alla fine disciolti in 2 ml di idrocloruro di guanidina 6 M.

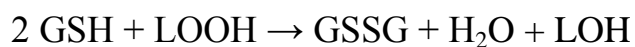
I prodotti di reazione della DNPH con i gruppi carbonilici delle proteine sono stati letti spettrofotometricamente a 355nm e 390 nm, per gli omogenati, e a 370 nm per i mitocondri, lunghezze d'onda a cui si hanno i picchi di massimo assorbimento della DNPH. Il contenuto di carbonili è stato calcolato, utilizzando il coefficiente di estinzione molare degli idrazoni alifatici ( $22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e dividendo per la concentrazione ottenuta, con FIG P.

Esso è espresso come nmol di carbonili/mg di tessuto e nmol di carbonili/mg di proteine.

### **Perossidazione lipidica**

L'estensione dei processi perossidativi negli omogenati di muscolo e nei preparati mitocondriali è stata determinata misurando il livello di idroperossidi lipidici (HPs), seguendo spettrofotometricamente il consumo di NADPH in un sistema di reazioni accoppiate (Heath and Tappel, 1976). Il metodo è basato su due reazioni.

Nella prima, catalizzata dall'enzima glutatione perossidasi (GPX), il GSH reagendo con gli idroperossidi è ossidato a GSSG:



Nella seconda reazione, il glutatione ossidato viene riconvertito a GSH dall'enzima glutatione reduttasi (GR), che sfrutta il potere riducente del NADPH, ossidandolo a NADP<sup>+</sup>:



Le sospensioni mitocondriali sono state diluite con una soluzione tampone (EDTA 0,2 mM, Tris-HCl 0,124 mM a pH 7,6) in modo da avere una concentrazione di 1 mg di proteine per ml. Gli omogenati di tessuto epatico, invece, sono stati diluiti 1:10 nel mezzo di omogenizzazione (HM) (mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM, EDTA 1 mM, Tris 20 mM, BSA allo 0.1% a pH 7,4).

In base alla procedura, 10 µl di campione sono stati incubati per 5 minuti a temperatura ambiente in 1 ml della stessa soluzione tampone utilizzata per diluire le sospensioni mitocondriali. Per

innescare la prima reazione sono stati aggiunti in rapida successione 100  $\mu$ l di GSH (4,25 mM), 50  $\mu$ l di NADPH (2 mM), e 10  $\mu$ l di GPX (2,5 U/ml). Le soluzioni così preparate sono state incubate a 33°C per 15 minuti. Successivamente, l'aggiunta di 10  $\mu$ l dell'enzima GR (2,5 U/ml) ha innescato l'ultima tappa del processo in cui il NADPH viene ossidato a NADP<sup>+</sup>.

Le letture sono state effettuate a 340 nm, al fine di valutare le variazioni nella quantità di NADPH, per 15 minuti. La differenza tra l'assorbimento iniziale e quello finale, divisa per il coefficiente di estinzione molare del NADPH ( $6,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), per il tempo della cinetica (15 minuti) e la quantità di preparato, ci ha fornito informazioni sul contenuto tissutale e mitocondriale di idroperossidi espresso come  $\mu$ moli di NADPH ossidato/min/g di tessuto o nmoli di NADPH ossidato/min/mg di proteine mitocondriali.



## **Attività degli enzimi glutatione perossidasi (GPX) e glutatione reduttasi (GR)**

La determinazione dell'attività dell'enzima GPX è stata eseguita secondo la procedura di Flohè e Gunzler (1985), utilizzando campioni di omogenato diluiti 1:10 nel mezzo di omogeneizzazione (HM) (mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM, EDTA 1 mM, Tris 20 mM, BSA allo 0.1% a pH 7,4), e campioni di mitocondri diluiti in maniera da avere una concentrazione pari a 1mg/mL in un tampone di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, EDTA 1 mM a pH 7,0. Tale procedura è basata sulla catalisi operata dalla Glutatione Perossidasi (GPX) nella reazione:



In questo metodo, il mezzo di reazione, contenente GSH e GR, è costituito dal tampone sopra indicato. Il campione è stato incubato in tale miscela per 5 min a 37 °C. In seguito è stato aggiunto NADPH, lasciandolo in incubazione per altri 5 minuti. In questo modo è stato possibile determinare il consumo di NADPH non legato alla riduzione dell'idroperossido. La reazione è stata innescata dall'aggiunta del terz-butil-idroperossido (TBH) che stimola il rilascio dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Il GSSG prodotto è stato riconvertito a GSH in una reazione catalizzata dall'enzima GR che usa come cofattore il NADPH. Il consumo di NADPH è stato determinato misurando la variazione di assorbimento a 340 nm e dividendo tale variazione per il coefficiente di estinzione molare del NADPH e la quantità di preparato.

L'attività della GPX è espressa in  $\mu\text{moli}$  di NADPH consumato/min/g tessuto oppure come nmoli di NADPH consumato/min/mg di proteine mitocondriali.

L'attività dell'enzima GR, invece, è stata determinata in accordo con il protocollo Carlberg e Mannervik (1985). Questo si fonda sulla capacità riducente mostrata dalla GR verso il GSSG, con formazione di GSH a spese del NADPH:



La determinazione è stata eseguita utilizzando 1 ml di un mezzo di reazione contenente il substrato, il GSSG a concentrazione 20 mM e il NADPH a concentrazione 2 mM. Questa miscela è stata incubata a 30 °C per 3 minuti e successivamente sono stati aggiunti 10  $\mu\text{l}$  di campione di omogenato o di mitocondri diluiti in modo analogo alla determinazione dell'attività della GPX, in modo che la reazione di riduzione del GSSG potesse essere innescata.

Anche per le reazioni catalizzate dalla GR, il consumo del NADPH è stato determinato spettrofotometricamente.

L'attività della GR è stata espressa come  $\mu\text{moli}$  di NADPH consumato/min/g tessuto oppure come nmoli di NADPH consumato/min/mg di proteine mitocondriali.

## **Determinazione dei livelli di GSH**

Per la valutazione del contenuto di glutatione ridotto (GSH), è stata seguita spettrofotometricamente, alla lunghezza d'onda di 412 nm, la riduzione dell'acido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) da parte del GSH. Il glutatione ossidato è ridotto dall'enzima Glutatione reduttasi, in presenza di NADPH. In pratica, per la valutazione del GSH gli omogenati e le sospensioni mitocondriali sono stati diluiti (1:1) con HClO<sub>4</sub> 0,5 N, per consentire la precipitazione delle proteine, e centrifugati poi a 4000 g per 10 minuti a 4°C (Ji et Fu, 1992). I supernatanti sono stati neutralizzati con NaOH 2M e diluiti 1:7 in soluzione tampone fosfato di sodio 125 mM + EDTA 6,3 mM a p H 7,5. Il campione è stato diviso in due aliquote, una per il dosaggio del glutatione totale (GSH + GSSG), una per la determinazione del solo glutatione ossidato (GSSG), dopo aver mascherato il GSH con 2-vinilpiridina.

Per determinare il GSH totale, sono stati prelevati 200 µL dalle diluizioni dei campioni, a cui sono stati aggiunti 600 µL di soluzione tampone (diluizione 1:20) e 48 µL di TEA (trietanolamina), che ha la funzione di prevenire l'autossidazione del GSH.

Per determinare il GSSG, a 400 µL di campioni, si aggiungono 8 µL di 2-vinilpiridina e 24 µL di TEA. Si incuba per 20-60 minuti in modo da ottenere il completo mascheramento del GSH, per poi procedere alla lettura allo spettrofotometro.

Per il dosaggio, si pongono nelle cuvette 700 µL di NADPH 0,3 mM, 100 µL di DTNB 6 mM ed il campione per un volume finale di 1 mL. Alle cuvette, equilibrate a 30°C, si aggiungono 10

$\mu\text{L}$  di GR 50 U/mL e si esegue una lettura continua a 412 nm per 10 minuti.

La concentrazione di GSH è stata misurata come descritto da Griffith (1980).

La velocità di riduzione del DTNB è sostanzialmente lineare e dipende dal solo glutatione totale (Tietze, 1969): la velocità di variazione del colore è proporzionale al contenuto del glutatione totale, che è ricavato da curve costruite con soluzioni standard di GSH e GSSG.

La concentrazione di GSH è data dalla differenza tra la concentrazione del GSH totale e quella del GSSG ed è espressa in  $\mu\text{moli}$  di DTNB ridotto/g di tessuto o nmoli di DTNB ridotto/mg di proteine mitocondriali.

## Suscettibilità allo stress ossidativo

È stata valutata la suscettibilità dei tessuti muscolari allo stress ossidativo in vitro con una metodica che utilizza una miscela di cloruro ferrico ed ascorbato per indurre lo stress (*Marcil et al, 2011*). Tale miscela permette l'innesco della perossidazione lipidica in quanto l'ascorbato mantiene il ferro nello stato  $Fe^{2+}$  il quale è capace di innescare la reazione a catena in seguito alla formazione del radicale ossidrilico  $\cdot OH$  che si forma nella reazione di Fenton.

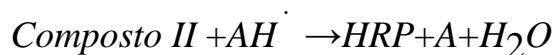
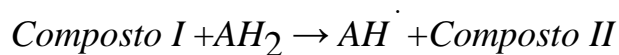
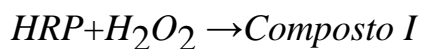
Il dosaggio è stato effettuato confrontando le variazioni di assorbimento ottenute durante la misura spettrofotometrica degli idroperossidi (HPs) tra campioni normali e stressati in vitro per 10 minuti. Il valore ottenuto rappresenta così la differenza tra la variazione dei livelli di HPs del campione stressato e la variazione dei livelli di HPs del campione normale. Gli omogenati di muscolo non stressati sono stati diluiti 1:10 nel mezzo di omogeneizzazione (HM) costituito da mannitolo 220 mM, saccarosio 70mM, EDTA 1 mM, albumina priva di acidi grassi 0,1%, Tris 20 mM, a pH 7.4.

Per la preparazione degli omogenati di muscolo stressati, a 50  $\mu l$  di omogenato 1:5 (per una diluizione finale di 1:10) sono stati aggiunti 10  $\mu l$  di cloruro ferrico 1000  $\mu M$ , 10  $\mu l$  di ascorbato 10 mM e 30  $\mu l$  di una soluzione tampone (EDTA 0,2 mM, Tris-HCl 0,124 mM a pH 7,6). I campioni così trattati sono stati incubati per 10 minuti a temperatura ambiente, e successivamente ad essi sono stati aggiunti 10  $\mu l$  dell'antiossidante butilatoidrossitoluene (BHT) al 2% per bloccare la reazione di stress ossidativo.

Su entrambi i campioni così preparati sono stati misurati i livelli di HPs utilizzando la stessa metodica precedentemente descritta per la determinazione della perossidazione lipidica (Heath e Tappel, 1976).

### **Rilascio mitocondriale di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Allo scopo di valutare quantitativamente il rilascio mitocondriale di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da parte di enzimi citoplasmatici o di organuli cellulari (mitocondri, perossisomi, microsomi) esistono diverse tecniche analitiche che sfruttano le proprietà della perossidasi di rafano (HRP). Questo enzima catalizza l'ossidazione di numerosi substrati donatori di idrogeno (AH<sub>2</sub>) in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, secondo le reazioni:



I donatori di idrogeno utilizzati sono sostanze che diventano fluorescenti reagendo con il composto I, o che perdono la fluorescenza in seguito a tale reazione. Sostanze dotate di tali caratteristiche sono la diacetildiclorofluorescina o l'acido paraidrossifenilacetico (PHPA). Il loro utilizzo consente una valutazione del rilascio mitocondriale di perossido di idrogeno. Nei miei esperimenti fu utilizzato il PHPA per le sue ottime caratteristiche funzionali. Esso in forma ridotta non è fluorescente, ma in seguito ad ossidazione catalizzata dalla perossidasi di rafano (HRP), in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, si converte nel

composto stabile 2,2'-diidross-difenil-5,5'-diacetato (PHPA)<sub>2</sub> (Hyslop P.A., Sklar L.A., 1984) che è fluorescente. La velocità di formazione di tale composto e quindi dell'aumento della fluorescenza, è strettamente associato alla velocità di rilascio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da parte dei mitocondri. Per seguire la fluorescenza generata dalla reazione di ossidazione del PHPA, fu utilizzato un fluorimetro Jasko, dotato di una celletta termostata e collegato ad un computer. Le determinazioni sono state effettuate in cuvette di quarzo, contenenti un agitatore magnetico, alla temperatura di 30°C, utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 320 nm ed una di emissione di 400 nm. La miscela di reazione conteneva 0,1 mg/ml di proteine mitocondriali disciolte in un tampone respirazione (KCl 145 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, Hepes 30 mM, EGTA 0.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, a pH 7,4 e BSA allo 0,1%) contenente PHPA 0,2 mg/ml ed HRP 60 U/ml. La reazione di produzione dell' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fu innescata dall'aggiunta di una soluzione di piruvato/malato (10mM/2,5mM) o di succinato (10 mM) e di una quantità saturante di ADP (75mM). I valori delle concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> furono ricavati usando una curva standard di concentrazioni note di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ed espressi come pmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg proteine. Vari inibitori del flusso elettronico attraverso la catena di trasporto mitocondriale sono comunemente utilizzati per ottenere informazioni sulle possibili alterazioni dei siti produttori di ROS. Infatti, la produzione di ROS dipende da due parametri: il primo è rappresentato dalla concentrazione dei carriers autossidabili localizzati nei complessi respiratori, mentre il secondo è rappresentato dal grado di riduzione di tali carriers. L'utilizzo di inibitori del trasferimento

elettronico, rende tutti i carriers localizzati a monte del sito di blocco completamente ridotti, rendendo così dipendente la velocità di rilascio del perossido esclusivamente dalla concentrazione dei carriers autossidabili. Nei miei esperimenti ho utilizzato il Rotenone (Rot), che blocca il trasferimento degli elettroni dal Complesso I all'ubichinone (Palmer G et al., 1968), e l'Antimicina (AA) che blocca il trasferimento degli elettroni all'interno del sito ubichinone-citocromo b del Complesso III (Turrens JF et al., 1985). Le concentrazioni degli inibitori scelte per gli esperimenti (1 $\mu$ M Rot; 10 $\mu$ M AA) non interferiscono col sistema PHPA-HRP utilizzato (Venditti P et al., 2003).

### **Analisi statistica**

I dati ottenuti in otto differenti esperimenti, sono stati espressi come valori medi  $\pm$  l'errore standard. I dati sono stati analizzati con il metodo dell'analisi della varianza a due vie. Quando è stato trovato un rapporto F significativo, è stato usato il test dell'intervallo multiplo di Student-Newman-Keuls per determinare la significatività statistica delle differenze tra le medie. I valori sono stati considerati significativamente differenti per un valore di probabilità (P) < 0,05.



## **Risultati**

### **Parametri corporei e contenuto di vitamina E**

Il peso corporeo medio, alla fine del periodo di trattamento, era:  $399 \pm 5$ ,  $387 \pm 15$ ,  $353 \pm 9,6$  e  $334 \pm 7,3$  g, nei dei ratti S, S+VE, T e T+VE rispettivamente. Il trattamento con vitamina E non ha influenzato il peso corporeo, mentre l'allenamento ha determinato una riduzione ( $p > 0,05$ ) di tale parametro indipendentemente dalla integrazione antiossidante. Le masse cardiache avevano un peso di  $0,89 \pm 0,02$ ,  $0,84 \pm 0,03$ ,  $0,96 \pm 0,02$ , e  $0,93 \pm 0,03$  g, nei dei ratti S, S+VE, T e T+VE rispettivamente. Esse sono state aumentate ( $p < 0,05$ ) dall'allenamento nei ratti trattati ed anche nei ratti non trattati con vitamina E ed è stato diminuito ( $p < 0,05$ ) dalla vitamina E nei ratti allenati.

Il rapporto cuore / peso corporeo era di  $2,18 \pm 0,05$ ,  $2,13 \pm 0,03$ ,  $2,68 \pm 0,07$  e  $2,76 \pm 0,09$  (mg/g) nei ratti S, S+VE, T e T+VE, rispettivamente, ed è stato aumentato ( $p < 0,05$ ) dall'allenamento indipendentemente dalla integrazione dietetica con vitamina E.

Il contenuto tessutale di vitamina E è riportato in Tab. 8. Come aspettato il contenuto di vitamina E è risultato maggiore nel tessuto muscolare degli animali alimentati con l'antiossidante. Inoltre, si è osservato un aumento del contenuto di vitamina E anche nei ratti allenati.

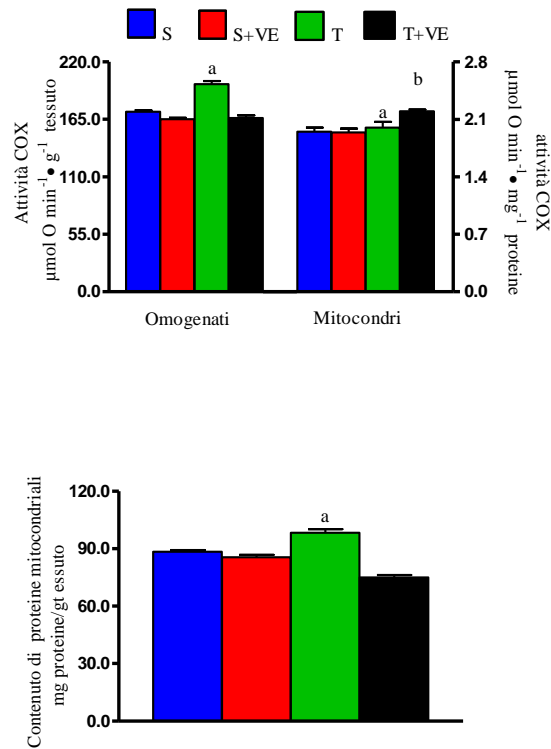
**Tabella 8. Contenuto di vitamina E nel muscolo scheletrico di ratto.**

<b>Gruppi</b>				
	<b>S</b>	<b>S+VE</b>	<b>T</b>	<b>T+VE</b>
<b>Vit E</b>	14.23±0.34	30.27±1.03 <sup>b</sup>	19.56±0.65 <sup>a</sup>	26.71±1.45 <sup>a,b</sup>

I dati rappresentano valori medi  $\pm$  SEM di otto diversi esperimenti. Il contenuto di vitamina E è espresso come nmol/g di tessuto. **S**, ratti di controllo sedentari; **S+VE**, ratti sedentari trattati con vitamina E; **T**, ratti allenati; **T+VE** ratti allenati e trattati con vitamina E. <sup>a</sup> significativamente diverso per i ratti allenati vs i rispettivi controlli sedentari, <sup>b</sup> significativamente diverso per animali trattati con vitamina E vs i rispettivi controlli non trattati. Il livello di significatività è stato scelto come  $P < 0.05$ .

## **Attività dell'enzima citocromo ossidasi e contenuto proteico mitocondriale**

In Fig. 10 (pannello superiore), è riportata l'attività dell'enzima citocromo ossidasi (COX) determinata nel tessuto e nei mitocondri. L'allenamento al nuoto ha influenzato l'attività della COX solo nei ratti non alimentati con vitamina E, aumentandola negli omogenati e diminuendola nei mitocondri. Il trattamento con vitamina E non ha influenzato l'attività dell'enzima nel tessuto e nei mitocondri degli animali sedentari, ma ha prevenuto i cambiamenti indotti dall'allenamento nell'attività dell'enzima. Il rapporto tra l'attività della citocromo ossidasi negli omogenati e nei mitocondri fornisce una stima approssimativa del contenuto di proteine mitocondriali, espresse come mg di proteine per g di tessuto. Nei ratti allenati non alimentati con la vitamina E il contenuto di proteine mitocondriali è stato aumentato. La supplementazione con vitamina, che non ha modificato il contenuto di proteine mitocondriali nei ratti sedentari, ha avuto l'effetto di ridurlo nei ratti allenati.



**Fig.10 Attività dell'enzima citocromo ossidasi e contenuto proteico mitocondriale nel muscolo di ratto.**

I dati rappresentano valori medi  $\pm$  SEM di otto diversi esperimenti. L'attività dell'enzima citocromo ossidasi (COX) è espressa in  $\mu\text{mol}$  di O/ min/ g di tessuto o  $\mu\text{mol}$  di O/ min/mg di proteine mitocondriali (grafico in alto), mentre le proteine mitocondriali sono espresse come mg di proteine per g di tessuto (grafico in basso). **S**, ratti di controllo sedentari; **S+VE**, ratti sedentari trattati con vitamina **E**; **T**, ratti allenati; **T+VE** ratti allenati e trattati con vitamina **E**.

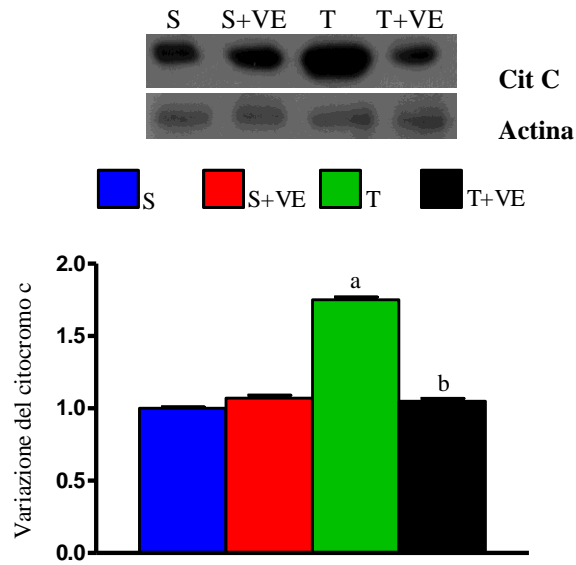
<sup>a</sup> significativamente diverso per i ratti allenati vs i rispettivi controlli sedentari,

<sup>b</sup> significativamente diverso per animali trattati con vitamina **E** vs i rispettivi controlli non trattati.

Il livello di significatività è stato scelto come  $P < 0.05$

## **Espressione del citocromo C**

Al fine di verificare se i trattamenti hanno modificato le concentrazioni del contenuto di citocromo c, una proteina marker dei mitocondri, è stata eseguita un'analisi western blotting. I risultati riportati in figura 12 mostrano che il livello di citocromo c è aumentato dall'allenamento. La somministrazione di vitamina E, che non ha modificato il contenuto di citocromo c nei ratti sedentari, ha ridotto tale contenuto nei ratti allenati.



**Fig. 11 Effetto del training e del trattamento con vitamina E sui livelli di citocromo c nel muscolo di ratto.**

I dati rappresentano valori medi  $\pm$  SEM di otto diversi esperimenti.

Le proteine totali del muscolo di ratti sedentari **S**, sedentari trattati con vitamina E **S+VE**, allenati **T** e allenati e trattati con vitamina E **T+VE**, sono state isolate e analizzate mediante analisi Western blot. E' mostrato un blot rappresentativo del citocromo c e dell'actina (sopra). L'analisi è stata eseguita come descritto in Materiali e Metodi. Gli istogrammi corrispondono alla quantificazione densitometrica. L'actina è stata utilizzata per la standardizzazione. I rapporti tra le intensità della banda della proteina d'interesse rispetto alle intensità della banda della  $\beta$ -actina sono stati confrontati con un campione standard sedentario non trattato a cui è stato assegnato il valore 1.

<sup>a</sup> significativamente diverso per i ratti allenati vs i rispettivi controlli sedentari,

<sup>b</sup> significativamente diverso per animali trattati con vitamina E vs i rispettivi controlli non trattati.

Il livello di significatività è stato scelto come  $p < 0,05$ .

## Consumo di ossigeno

La variazione della velocità del consumo di O<sub>2</sub> negli omogenati di muscolo è riportata in Fig. 10 (pannello in alto). L'attività fisica ha avuto l'effetto di aumentare la respirazione del tessuto muscolare. L'aumento del consumo di ossigeno è stato osservato in presenza di substrati respiratori legati al complesso I (piruvato più malato) e II (succinato), in entrambe le fasi della respirazione e indipendentemente dal trattamento con vitamina E.

La somministrazione di vitamina E ha determinato l'aumento della velocità del consumo di O<sub>2</sub> in Stato 4 nei ratti allenati, in presenza di succinato come substrato respiratorio. Mentre ha diminuito la velocità del consumo di ossigeno in Stato 3 nei ratti allenati e la ha aumentata nei ratti sedentari. In presenza di Piruvato e Malato la velocità del consumo di ossigeno è stata aumentata dalla vitamina E solo nei ratti sedentari durante entrambi gli stati della respirazione.

I valori del rapporto del controllo respiratorio (RCR) in presenza di succinato ( $2.65 \pm 0.19$ ,  $2.75 \pm 0.16$ ,  $2.83 \pm 0.04$  e  $2.42 \pm 0.05$ , per i ratti S, S+VE, T, and T+VE rispettivamente) e di piruvato malato ( $4.43 \pm 0.37$ ,  $3.81 \pm 0.38$ ,  $4.14 \pm 0.07$  e  $4.33 \pm 0.10$  per i ratti S, S+VE, T, and T+VE rispettivamente) non sono stati significativamente modificati né dal trattamento con l'antiossidante vitamina E né dal programma di allenamento.

La velocità del consumo di O<sub>2</sub> nei mitocondri di muscolo è riportata in Fig. 10 (pannello inferiore). Durante entrambi gli stati della respirazione, l'allenamento ha diminuito le velocità del consumo di ossigeno mitocondriale indipendentemente dal substrato respiratorio e dal trattamento con vitamina E. Il

trattamento con vitamina ha attenuato la diminuzione delle velocità del consumo di ossigeno indotte dall'allenamento con entrambi i substrati durante lo Stato 3, e con piruvato e malato durante lo Stato 4, mentre con succinato le suddette diminuzioni sono state accentuate. Il trattamento con vitamina E nei ratti sedentari non ha influenzato la velocità del consumo di O<sub>2</sub>, con l'eccezione di quella dello Stato 4 della respirazione sostenuta da succinato.

I valori di RCR ottenuti con succinato ( $3.59 \pm 0.10$ ,  $4.13 \pm 0.07$ ,  $2.98 \pm 0.06$  e  $5.11 \pm 0.33$  per i ratti S, S+VE, T e T+VE rispettivamente) sono stati diminuiti ( $p < 0.05$ ) dall'allenamento nei ratti non trattati con vitamina E ed aumentati ( $p < 0.05$ ) nei ratti trattati con la vitamina, mentre sono stati aumentati ( $p < 0.05$ ) dal trattamento con vitamina E negli animali allenati. I valori di RCR, ottenuti con piruvato e malato ( $6.56 \pm 0.12$ ,  $6.59 \pm 0.30$ ,  $6.65 \pm 0.17$  e  $7.06 \pm 0.29$  per i ratti S, S+VE, T e T+VE, rispettivamente) non sono stati modificati ( $p > 0.05$ ) dall'allenamento e dal trattamento con vitamina E.



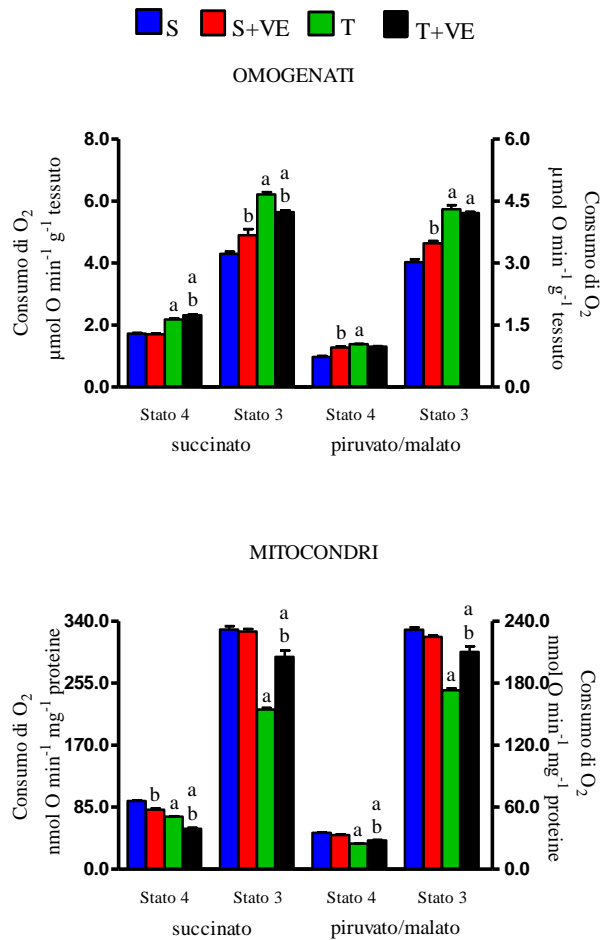


Fig. 12 I dati rappresentano valori medi  $\pm$  SEM di otto diversi esperimenti. Il consumo di ossigeno è espressa in  $\mu\text{mol}$  di  $\text{O}_2$  / min/ g di tessuto (grafico in alto) o  $\text{nmol}$  di  $\text{O}_2$  / min/mg di proteine mitocondriali (grafico in basso). **S**, ratti di controllo sedentari; **S+VE**, ratti sedentari trattati con vitamina **E**; **T**, ratti allenati; **T+VE** ratti allenati e trattati con vitamina **E**.

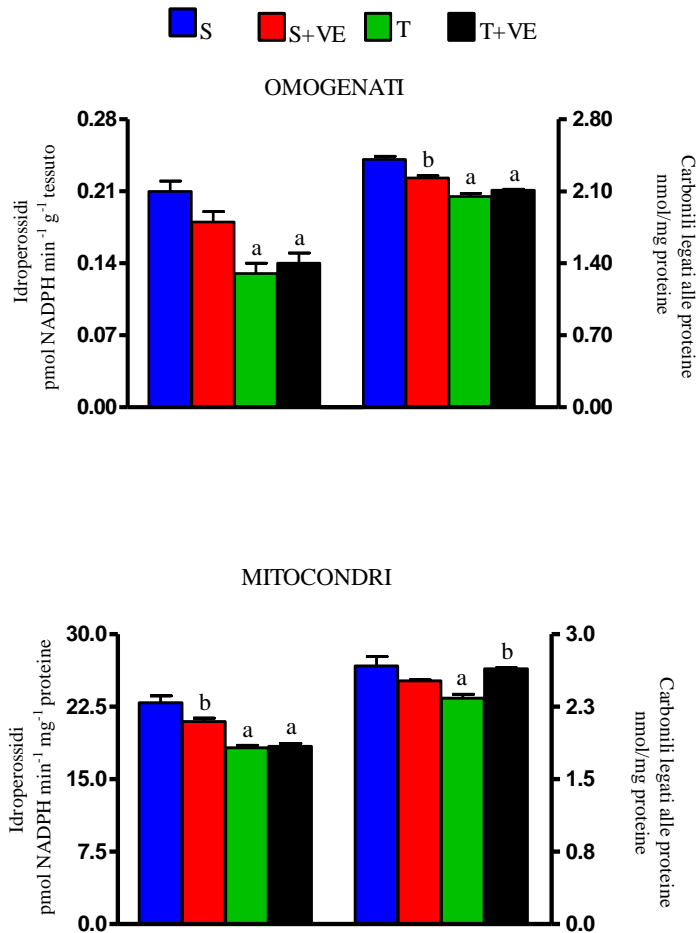
<sup>a</sup> significativamente diverso per i ratti allenati vs i rispettivi controlli sedentari,  
<sup>b</sup> significativamente diverso per animali trattati con vitamina **E** vs i rispettivi controlli non trattati.

Il livello di significatività è stato scelto come  $P < 0.05$

## **Danno ossidativo**

Gli effetti dell'allenamento e del trattamento con la vitamina E sugli indici di danno ossidativo tessutale e mitocondriale sono riportati in Fig. 13.

Sia negli omogenati che nei mitocondri di muscolo l'allenamento ha ridotto significativamente i livelli di idroperossidi lipidici indipendentemente dal trattamento con vitamina E. La Vitamina E ha ridotto significativamente i livelli di idroperossidi negli animali sedentari ma non nei ratti allenati e trattati con l'antiossidante. Similmente, il contenuto di carbonili proteici negli omogenati di muscolo e nei rispettivi mitocondri è stato ridotto dall'allenamento sia nei ratti di controllo che in quelli trattati con vitamina E, e dalla vitamina E solo nei ratti di controllo sedentari.



**Fig.13 Effetto dell'allenamento e del trattamento con vitamina E sul danno ossidativo nell' omogenato nei mitocondri di muscolo di ratto.** I dati ottenuti rappresentano la media  $\pm$  S.E.M di otto diversi esperimenti .I livelli di idroperossidi sono espressi come nmol di NADPH ossidato/min/mg di proteine o  $\mu$ mol di NADPH ossidato/min/g tessuto.

I livelli di carbonili sono espressi come nmol/mg di proteine.

S, ratti di controllo sedentari; S+VE, ratti sedentari trattati con vitamina E; T, ratti allenati; T+VE ratti allenati e trattati con vitamina E.

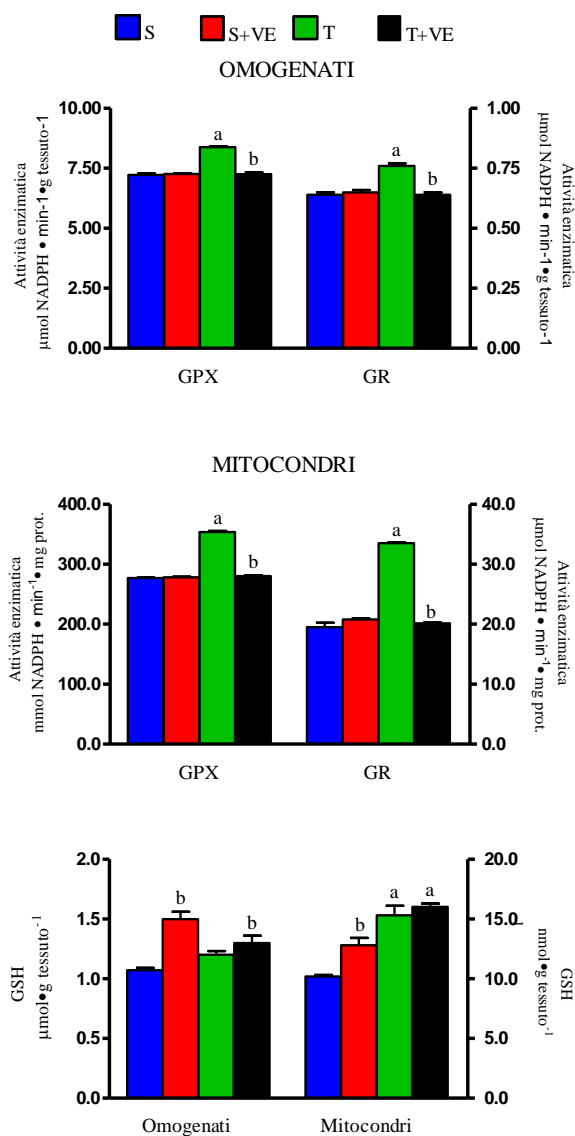
<sup>a</sup> significativamente diverso vs ratti sedentari di controllo.

<sup>b</sup> significativamente diverso vs ratti non trattati con vitamina E.

I livelli di significatività sono stati scelti come  $P < 0.05$ .

## **Attività degli enzimi antiossidanti e concentrazione di GSH**

Le attività degli enzimi GPX e GR ed il contenuto di GSH sono riportati in figura 14. Negli omogenati (pannello superiore) e nei mitocondri (pannello intermedio), le attività di GPX e GR sono state aumentate dall'allenamento e diminuite dalla vitamina E solo nei ratti allenati. Negli omogenati, il contenuto di GSH (pannello in basso) non è stato influenzato dall'allenamento ed è stato aumentato dal trattamento con vitamina E nei ratti sedentari ed allenati, mentre nei mitocondri, esso è stato aumentato dall'allenamento indipendentemente dal trattamento con l'antiossidante, e sono state aumentate dalla vitamina E nei ratti sedentari.



**Fig.14 Attività degli enzimi GPX e GR e il contenuto di GSH negli omoenati e nei mitocondri di muscolo di ratto.**

I dati rappresentano valori medi  $\pm$  SEM di otto diversi esperimenti. Le attività della GPX e della GR sono espresse come  $\mu\text{mol}$  di NADPH consumato /min/ g di tessuto o  $\text{nmol}$  di NADPH consumato/min/mg di proteine mitocondriali. Il GSH è espresso in  $\mu\text{mol}$  /g di tessuto o  $\text{nmol}$ /mg di proteine mitocondriali. Ratti sedentari S, sedentari trattati con vitamina E S+VE, allenati T e allenati e trattati con vitamina E T+VE.

<sup>a</sup> significativamente diverso per i ratti allenati vs i rispettivi controlli sedentari,

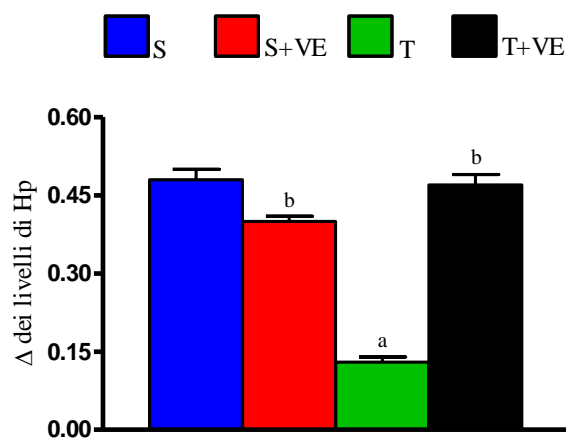
<sup>b</sup> significativamente diverso per animali trattati con vitamina E vs i rispettivi controlli non trattati.

Il livello di significatività è stato scelto come  $p < 0,05$ .

## **Suscettibilità allo stress ossidativo**

La suscettibilità allo stress ossidativo è stata valutata confrontando i livelli di idroperossidi (HP) tra campioni normali e stressati in vitro per 10 minuti. I risultati ottenuti, riportati in figura 15, rappresentano la differenza tra la variazione dei livelli di HP del campione stressato e la variazione dei livelli di HP del campione normale.

Dai dati raccolti si evince che l'allenamento riduce significativamente la suscettibilità del muscolo allo stress ossidativo solo nei ratti non alimentati con la vitamina E. Nei ratti sedentari l'integrazione vitaminica diminuisce in modo significativo la suscettibilità allo stress rispetto ai ratti di controllo.



**Fig. 15  $\Delta$ HP: variazione dei livelli di idroperossidi lipidici (Hp) in seguito a trattamento con una miscela di ferro/ ascorbato Fe/As.**

I dati ottenuti rappresentano la media  $\pm$  S.E.M di otto diversi esperimenti.

**S**, ratti di controllo sedentari; **S+VE**, ratti sedentari trattati con vitamina E; **T**, ratti allenati; **T+VE** ratti allenati e trattati con vitamina E.

<sup>a</sup> significativamente diverso per ratti allenati vs ratti sedentari di controllo.

<sup>b</sup> significativamente diverso per ratti trattati con vitamina E vs ratti non trattati con vitamina E.

I livelli di significatività sono stati scelti come  $P < 0.05$ .

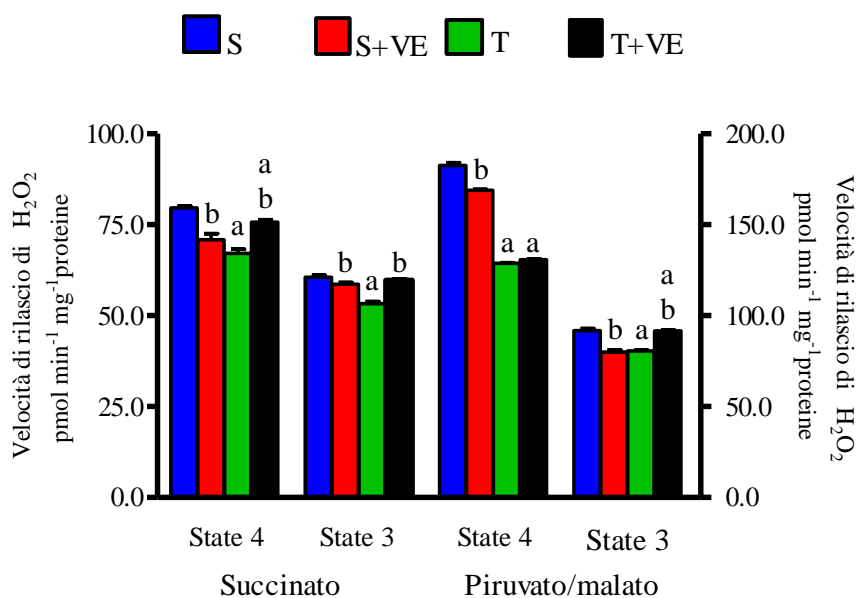
## **Rilascio mitocondriale di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

In figura 16 è mostrato il rilascio di acqua ossigenata durante lo Stato 4 e lo stato 3 della respirazione.

La velocità di rilascio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondriale è stata diminuita dal training nei ratti non trattati con vitamina E, in entrambi gli Stati della respirazione e con entrambi i substrati respiratori.

Il trattamento con vitamina E ha ridotto la velocità di rilascio nei ratti sedentari in entrambi gli Stati della respirazione e con entrambi i substrati respiratori, l'ha aumentata negli animali allenati in presenza di succinato in entrambi gli Stati della respirazione, e in presenza di piruvato malato solo durante lo stato 3.





**Fig.16 Rilascio mitocondriale di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Stato 4 e Stato 3 della respirazione.**

I valori sono espressi come valore medio ± SEM di otto esperimenti.

Le velocità di rilascio mitocondriale di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sono espresse come pmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> di proteine mitocondriali. S, ratti sedentari non trattati; S+VE, ratti sedentari trattati con vitamina E, T, ratti allenati non trattati, T+VE, ratti allenati trattati con vitamina E.

<sup>a</sup> indica valori significativamente diversi per i ratti allenati vs rispettivi controlli sedentari,

<sup>b</sup> indica valori significativamente diversi per animali trattati con vitamina E vs i rispettivi controlli non trattati.

Il livello di significatività è stato scelto come p < 0,05.

## **Effetto degli inibitori sulla velocità di rilascio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Gli effetti degli inibitori della catena respiratoria sul rilascio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sono riportati in Tabella 9. In presenza di succinato, le velocità di rilascio dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sono state diminuite dall'allenamento solo nei ratti non alimentati con vitamina E, e fu diminuita dalla vitamina E nei ratti sedentari ed aumentata in quelli allenati. L'aggiunta di rotenone ai mitocondri che respiravano in presenza di succinato ha diminuito la velocità di rilascio dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in tutti i gruppi, ma gli effetti dell'allenamento e del trattamento con antiossidante non differivano da quelli osservati in assenza di rotenone. La successiva aggiunta di antimicina ha determinato un aumento della velocità di rilascio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'allenamento ha diminuito tale velocità nei ratti non alimentati con vitamina E ma l'ha aumentata nei ratti alimentati con l'antiossidante.

L'aggiunta di antimicina o rotenone ai mitocondri supplementati con piruvato e malato ha determinato un aumento della velocità di rilascio dell' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, che è stata diminuita dal training indipendentemente dal trattamento con antiossidante Viceversa le velocità di rilascio dell' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sono state influenzate dalla vitamina E in presenza di rotenone e sono state aumentate solo nei ratti allenati in presenza di antimicina.

Substrato	Gruppo			
	S	S+VE	T	T+VE
Succinato (Succ)	136.7±1.8	126.9±0.6 <sup>b</sup>	111.1±3.1 <sup>a</sup>	130.2±0.7 <sup>b</sup>
Succ+rotenone	78.9±0.7 <sup>#</sup>	71.4±0.9 <sup>#,b</sup>	67.3±0.8 <sup>a,#</sup>	74.8±0.6 <sup>a,b,#</sup>
Succ+rot+antimicina A	747.9±2.3 <sup>#</sup>	741.2±2.4 <sup>#</sup>	717.7±3.5 <sup>a,#</sup>	769.1±1.5 <sup>a,b,#</sup>
Piruvato/Malato(Pir/Mal)	182.5±1.5	168.9±0.5 <sup>b</sup>	131.7±0.6 <sup>a</sup>	130.8±0.5 <sup>a</sup>
Pir/Mal+antimicina A	887.9±5.5 <sup>#</sup>	875.1.0±6.5 <sup>#</sup>	803.6±5.4 <sup>a,#</sup>	823.8±1.9 <sup>a,b,#</sup>
Piruvato/Malato(Pir/Mal)	182.5±1.5	168.9±0.5 <sup>b</sup>	131.7±0.6 <sup>a</sup>	131.6±0.2 <sup>a</sup>
Pir/Mal+rotenone	200.1±1.5 <sup>#</sup>	196.4±2.6 <sup>#</sup>	151.2±1.5 <sup>a,#</sup>	156.0±2.0 <sup>a,#</sup>

**Effetto degli inibitori sulla velocità di rilascio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> di mitocondri di muscolo di ratto.**

I valori sono espressi come valore medio ± SEM di otto esperimenti. La velocità di rilascio mitocondriale di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è espressa in pmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>proteine mitocondriali. S, ratti sedentari non trattati; S+VE, ratti sedentari trattati con vitamina E, T, ratti allenati non trattati, T+VE, ratti allenati trattati con vitamina E.

<sup>a</sup> indica valori significativamente diversi per i ratti allenati vs rispettivi controlli sedentari,

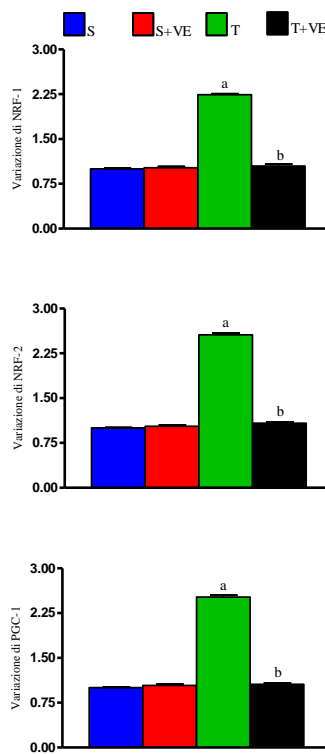
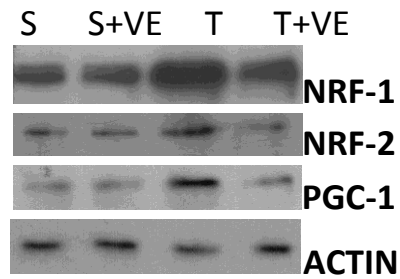
<sup>b</sup> indica valori significativamente diversi per animali trattati con vitamina E vs i rispettivi controlli non trattati. #

Effetto significativo dell'ultimo inibitore aggiunto vs i mitocondri nelle stesse condizioni senza tale inibitore.

Il livello di significatività è stato scelto come  $p < 0,05$

## **Espressione dei fattori trascrizionali**

I risultati riportati in figura 17 mostrano che i livelli di PGC-1, NRF-1 e NRF-2 sono stati aumentati dall'allenamento solo negli animali non alimentati con vitamina E. La somministrazione di vitamina E, che non ha avuto effetto negli animali sedentari, ha ridotto al valore dei controlli il livello di espressione di PGC-1, NRF-1 e NRF-2 negli animali allenti.



**Fig. 17** Effetto del training e del trattamento con vitamina E sui livelli di attivatori e co-attivatori di biogenesi mitocondriale: NRF-1, NRF-2 e PGC-1 nel muscolo di ratto.

I dati rappresentano valori medi  $\pm$  SEM di otto diversi esperimenti.

Le proteine totali estratte dal muscolo di ratti sedentari S, sedentari trattati con vitamina E S+VE, allenati T e allenati e trattati con vitamina E T+VE, sono state isolate e analizzate mediante analisi Western blot. I blot rappresentativi di PGC-1, NRF-1, NRF-2 e l'espressione della proteina actina sono mostrate sopra. L'analisi è stata eseguita come descritto in Materiali e Metodi. I grafici a barre corrispondono alla rispettiva quantificazione densitometrica. L'actina è stata utilizzata per il caricamento di standardizzazione. I rapporti tra le intensità della banda della proteina d'interesse rispetto alle intensità della banda della  $\beta$ -actina sono stati comparati con un campione standard sedentario non trattato, a cui è stato assegnato il valore 1.

## Discussione

I dati attualmente disponibili in letteratura indicano che l'attività fisica aerobica induce risposte adattative nell'intero organismo e nei tessuti corporei, specialmente nel muscolo scheletrico. Nel mio studio ho prestato particolare attenzione a due adattamenti che si riscontrano nel muscolo scheletrico in seguito ad un allenamento di tipo aerobico. Il primo consiste in un aumento della capacità respiratoria che provoca un aumento della capacità di sostenere esercizi di intensità maggiori di quelle raggiungibili da soggetti sedentari (aumento della performance). Il secondo conduce a un'umentata capacità del tessuto di opporsi agli insulti ossidativi e permette di sostenere esercizi per tempi maggiori prima che insorga la fatica (aumento della endurance) (*Venditti and Di Meo, 1996*).

Se, come alcuni dati sperimentali suggeriscono, le specie reattive dell'ossigeno (ROS), che si producono durante l'attività fisica, sono responsabili di entrambi gli adattamenti, l'integrazione antiossidante dovrebbe limitare o prevenire tali adattamenti.

Una valutazione della capacità metabolica aerobica dei tessuti può essere ottenuta misurando, in vitro, l'attività della citocromo ossidasi (COX), che è correlata al massimo consumo di ossigeno (Simon and Robin, 1971). E' noto da tempo che la capacità ossidativa del muscolo scheletrico aumenta in seguito ad un programma di allenamento (Davies et al., 1981). I miei risultati sono in accordo con tale osservazione e indicano che tale effetto è dovuto ad un aumento della massa mitocondriale del tessuto che compensa

la lieve riduzione della massima capacità aerobica dei mitocondri. L'integrazione antiossidante previene l'effetto dell'allenamento sulla capacità aerobica del tessuto cosicché questa non è differente da quella degli animali sedentari. Questo è ottenuto mediante una contemporanea inversione degli effetti dell'allenamento sulla massa dei mitocondri e sulla loro capacità aerobica massima.

Un sostegno alla osservazione che il contenuto tessutale di proteine mitocondriali è aumentato dall'allenamento ed è ridotto dalla somministrazione di vitamina E effettuata durante il periodo di allenamento è fornita dai risulti concernenti i livelli di espressione del citocromo c, il cui aumento è considerato un indicatore di biogenesi mitocondriale (Gomez-Cabrera et al., 2008). È interessante che la vitamina E influenza la capacità aerobica del muscolo solo quando è somministrata ad animali sottoposti ad un programma di allenamento. Questo suggerisce che la vitamina interferisce con qualche meccanismo alla base degli effetti dell'allenamento sulla popolazione mitocondriale, compresa la biogenesi degli organelli.

Le variazioni dell'attività della citocromo ossidasi indotte dall'allenamento sono in accordo con le variazioni della velocità del consumo di O<sub>2</sub> trovate durante lo stato 3 nei preparati muscolari di ratti allenati. Viceversa, la somministrazione della vitamina E riduce solo parzialmente la velocità del consumo di ossigeno nei preparati dei ratti allenati ed aumenta tale velocità negli omogenati dei ratti sedentari. Non è facile offrire una forte spiegazione per questa discrepanza, ma una possibilità è che il mantenimento di una

più alta velocità di respirazione sia dovuto ad un effetto protettivo esercitato dalla vitamina sui componenti della catena respiratoria.

Le variazioni metaboliche indotte dal training e dalla integrazione antiossidante sono accompagnati da variazioni del danno ossidativo mitocondriale.

Infatti, in entrambi i preparati muscolari i livelli degli indicatori di danno ossidativo ai lipidi e alle proteine sono ridotti dal training, mentre il concomitante trattamento con vitamina E non influenza il danno ossidativo ai lipidi e alle proteine negli omogenati e il danno ai lipidi nei mitocondri, ma previene la riduzione indotta dal training nel danno delle proteine mitocondriali.

L'osservazione che la integrazione con vitamina E esercita una certa protezione sui preparati dei ratti sedentari, ma non ha effetto sui preparati dei ratti allenati benché le sue concentrazioni nel tessuto siano elevate in entrambi i gruppi di animali, rappresenta una conferma indiretta dell'idea che la vitamina interferisce con l'adattamento del muscolo al training.

Poiché il danno ossidativo dipende dal bilancio tra le difese antiossidanti e la produzione di *ROS*, sono state determinate in primo luogo le variazioni indotte dall'allenamento e dalla vitamina in alcuni componenti del sistema di difesa antiossidante. I risultati ottenuti suggeriscono che se l'allenamento è in grado di indurre l'espressione di enzimi antiossidanti come la GPX e la GR, l'integrazione con la vitamina interferisce con il meccanismo che innesca questa risposta protettiva.



La precedente osservazione che l'attività di GPX e GR aumenta anche nel fegato e nel cuore di ratti allenati, porta a ritenere che la protezione antiossidante esercitata da un'attività fisica moderata si estende anche ad altri tessuti corporei. L'osservazione che l'allenamento e la integrazione antiossidante esercitano effetti analoghi sulle attività della GPX e della GR negli omogenati e nei mitocondri, trova una spiegazione nelle caratteristiche del sistema di traslocazione mitocondriale degli enzimi antiossidanti. Tali enzimi antiossidanti mitocondriali, dopo la codificazione da parte dei geni nucleari sono traslocati nei mitocondri attraverso il macchinario di importazione proteica (Baker et al, 2007; Bohnert et al, 2007; Bolender et al, 2008) che è costituito principalmente da due complessi denominati traslocasi della membrana esterna (complesso TOM) e traslocasi della membrana interna (complesso TIM). È stato dimostrato che l'importazione, nei mitocondri, di un componente del complesso TOM, Tom40, è aumentata dall'attività contrattile cronica del muscolo (Giuseppe and Hood, 2012). Così, è possibile ipotizzare che l'aumento dell'attività mitocondriale della GPX e della GR negli animali allenati, dipenda dall'aumento dell'importazione nei mitocondri di tali enzimi. D'altra parte, l'osservazione che l'aumento dell'attività della GPX e della GR mitocondriali, suggerisce una dipendenza del meccanismo di importazione da specie ossidanti. Sebbene GPX e GR siano enzimi cruciali nella determinazione dei livelli di GSH, le variazioni del contenuto tissutale di GSH non concordano con quelle delle attività della GPX e della GR.

Infatti, l'allenamento aumenta non aumenta i livelli tissutali di GSH, anche se aumenta quelli mitocondriali.

Questo risultato è in accordo con l'osservazione che il GSH mitocondriale deriva dal trasporto del GSH citosolico all'interno della matrice mitocondriale mediato da un carrier localizzato sulla membrana mitocondriale interna, il quale è in grado di trasportare il GSH contro il gradiente di concentrazione.

Poiché in alcune condizioni di stress ossidativo il contenuto di GSH ed il rapporto GSH/GSSG nei mitocondri sono direttamente correlati ai livelli di produzione di ROS, è stato ipotizzato che le ROS possano direttamente influenzare l'attività del carrier del GSH interagendo con residui di cisteina localizzati in siti chiave del carrier. E' anche possibile che l'aumento indotto dalle ROS nel contenuto di GSH mitocondriale sia capace di minimizzare i potenziali insulti ossidativi alla catena di trasporto elettronico mitocondriale.

La supplementazione con vitamina E aumenta il contenuto di GSH sia negli omogenati che nei mitocondri dei ratti sedentari mentre, quando accoppiata all'esercizio, essa aumenta il contenuto di GSH solo nel tessuto. Gli aumenti nel contenuto tissutale di GSH possono essere attribuiti alla capacità della vitamina di neutralizzare il radicale perossilico proteggendo il GSH dall'ossidazione. Viceversa, la mancanza di effetti sui mitocondri dei ratti allenati potrebbe essere attribuita all'interferenza dell'antiossidante con l'attivazione del carrier del GSH.

Le variazioni dell'attività di alcune componenti del sistema di difesa antiossidante forniscono solo limitate informazioni sulla

capacità di un tessuto di contrastare un insulto ossidativo. Per ottenere informazioni su tale capacità è stata determinata la suscettibilità *in vitro* all'attacco ossidativo ed è stato trovato che il muscolo degli animali allenati è meno sensibile all'attacco ossidativo rispetto a quello degli animali sedentari, solo se l'allenamento non è accoppiato con la integrazione con vitamina E. E' stato precedentemente mostrato che l'esercizio ad esaurimento induce un danno ossidativo ai tessuti che è indipendente dall'allenamento, come è dimostrato dall'osservazione che gli aumenti della perossidazione lipidica sono simili nei ratti allenati e in quelli sedentari, anche se tali aumenti sono raggiunti in tempi più brevi nei ratti sedentari (*Venditti e Di Meo, 1996*). Questo risultato suggerisce che il danno ossidativo può essere uno dei fattori coinvolti nell'insorgenza della fatica muscolare. Esso suggerisce anche che l'allenamento, provocando un rallentamento del danno indotto dai radicali liberi nel muscolo durante un esercizio acuto agisce come un antiossidante. Questa idea trova un sostegno nella osservazione che il muscolo allenato ha una minore suscettibilità ad un attacco ossidativo *in vitro*. D'altra parte, il fatto che tale suscettibilità sia aumentata dalla integrazione antiossidante è in accordo con osservazione che l'integrazione antiossidante durante l'allenamento riduce la massima durata dell'esercizio nel ratto (*Gomez-Cabrera et al., 2008*).

Naturalmente la suscettibilità di un tessuto ad un attacco ossidativo dipende anche dalla sua capacità di produrre ROS. Poiché i mitocondri sono ritenuti i principali siti di produzione cellulare di tali specie, sia nel muscolo a riposo che durante

l'esercizio, è stata determinata la velocità di rilascio dell' $\text{H}_2\text{O}_2$  mitocondriale. I risultati ottenuti mostrano che l'allenamento riduce la velocità di produzione di mitocondriale di  $\text{H}_2\text{O}_2$  in tutte le condizioni sperimentali esaminate, contribuendo così a prevenire il danno tissutale legato alla produzione di ROS, che dovrebbe essere associato all'incremento del contenuto di proteine mitocondriali. Anche il trattamento con vitamina E riduce la velocità mitocondriale di rilascio di ROS nei ratti sedentari. Tuttavia, la somministrazione dell'antiossidante durante il programma di allenamento generalmente previene la riduzione del rilascio di  $\text{H}_2\text{O}_2$  indotta dall'allenamento.

Questi risultati evidenziano un effetto tessuto specifico della vitamina E, poiché la velocità di rilascio di  $\text{H}_2\text{O}_2$  non viene modificata nel fegato e nel cuore dei ratti allenati.

Una possibile spiegazione degli effetti dell'allenamento e della vitamina sulla velocità di rilascio di  $\text{H}_2\text{O}_2$  è fornita dai risultati ottenuti in presenza di inibitori della catena respiratoria. Il blocco, operato da questi inibitori del flusso elettronico, rende i carriers elettronici autossidabili, dal lato del substrato, completamente ridotti cosicché la loro concentrazione diventa l'unico fattore che influenza la velocità di produzione di ROS. I risultati ottenuti suggeriscono che l'allenamento diminuisce la produzione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  riducendo le concentrazioni dei carriers autossidabili localizzati sia nel complesso I che nel complesso III. D'altro canto, è evidente che l'effetto della vitamina E sulla produzione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  nei ratti allenati è dovuto ad una riduzione degli effetti del training sui livelli dei carriers autossidabili, in particolare quello del complesso III, mentre l'effetto sulla produzione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  nei ratti sedentari non

dipende da variazioni di tali livelli. Viceversa, essa può essere dovuta alla capacità dell'alfa tocoferolo e del radicale alfa-tocoferossile di spazzare il radicale superossido, precursore del perossido di idrogeno.

Quindi, i risultati menzionati suggeriscono che la produzione di  $H_2O_2$  nel muscolo del ratto può essere ridotta dalla supplementazione antiossidante che aumenta il potenziale antiossidante del tessuto ROS sia dall'allenamento che aumenta la capacità di spazzare le ROS, inducendo l'espressione di enzimi antiossidanti, e riduce la produzione mitocondriale di tali specie, riducendo i livelli dei carriers autossidabili.

Il fatto che la vitamina E attenui le risposte al training dell'esercizio, che aumentano la capacità del tessuto di resistere agli stress, sia quelli che aumentano la sua capacità respiratoria inducono a ritenere che entrambe le risposte evocate dall'allenamento siano mediate dalle ROS

La biogenesi mitocondriale, che è alla base dell'aumento della capacità respiratoria del tessuto, è un processo complesso che coinvolge l'espressione coordinata del genoma mitocondriale e di quello nucleare, che controllano la sintesi delle proteine mitocondriali e la replicazione del DNA mitocondriale. Diverse prove sperimentali suggeriscono che un ruolo chiave nella risposta adattativa all'allenamento, compresa la biogenesi mitocondriale, è svolta da una famiglia di coattivatori, il cui membro più noto è il PGC-1 $\alpha$ , la cui espressione nel muscolo scheletrico di uomo e di ratto è indotta fortemente dall'allenamento di resistenza (*Liang and Ward, 2006*). L'azione di questo coattivatore è svolta attraverso la

regolazione dell'espressione di fattori di trascrizione quali NRF-1 e NRF-2. Questi, a loro volta, promuovono la trascrizione di geni che codificano per proteine coinvolte nella fosforilazione ossidativa, e per altri geni specifici dei mitocondri, compresi quelli coinvolti nella trascrizione e replicazione del DNA mitocondriale, come il fattore A di trascrizione (TFAM) (*Wu et al., 1999*). L'attivazione di questi fattori promuove l'aumento dell'espressione di enzimi del ciclo di Krebs e della catena di trasporto elettronico, aumentando così l'attività respiratoria e determinando l'adattamento dei mitocondri all'esercizio.

E' interessante che il PGC-1, oltre a regolare l'espressione di nuovi mitocondri, sembra essere coinvolto anche nella regolazione di enzimi antiossidanti. Questa coordinazione della proliferazione di organelli che producono *ROS* con l'aumento nei livelli di antiossidanti, probabilmente aiuta a mantenere l'omeostasi redox. Inoltre, la biogenesi mitocondriale mediata dal PGC-1 può promuovere la sostituzione di mitocondri disfunzionali, con elevato leak elettronico, con mitocondri che lavorano più efficientemente, con minore leak elettronico, in modo da ridurre la produzione mitocondriale di *ROS*.

Il coinvolgimento del PGC-1 e dei fattori di trascrizione nelle modificazioni osservate nei ratti allenati è confermato dall'osservazione che i livelli di PGC-1, NRF-1 e NRF-2 sono aumentati dall'allenamento.

E' interessante notare che altri stimoli ambientali, che comportano l'aumento della produzione di *ROS*, come l'esposizione al freddo, portano ad un'aumentata espressione

dei suddetti fattori ed alla proliferazione mitocondriale (Venditti *et al.*, 2011). Inoltre, è stato trovato che il trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conduce all'aumento nei livelli di PGC-1 $\alpha$  (St-Pierre *et al.*, 2006), il che suggerisce che le ROS possano giocare un ruolo importante nella induzione del PGC-1 $\alpha$  in svariate condizioni, compresa l'attività fisica. Alla luce della forte relazione tra ROS e PGC-1 $\alpha$ , ci si aspettava che l'induzione del PGC-1 e dei fattori di trascrizione, così come le risposte adattative indotte dall'allenamento, fossero prevenute dall'integrazione antiossidante. In effetti, è stato riscontrato che gli aumenti dei livelli di PGC-1 $\alpha$ , NRF-1 e NRF-2 indotti dall'allenamento sono prevenuti dalla integrazione con vitamina E. Questo risultato è in accordo con la precedente osservazione che la vitamina C previene gli aumenti nei livelli di PGC-1, NRF-1 e TFAM, così come nell'espressione di MnSOD e GPX nei ratti e negli uomini allenati (Gomez Cabrera *et al.*, 2008) e che la vitamina C ed E prevengono gli aumenti nell'espressione di PGC-1, Cu, ZnSOD, e GPX nell'uomo allenato (Ristow *et al.*, 2009).

Tuttavia è interessante notare che, in alcuni casi, la somministrazione di antiossidanti ha l'effetto di attenuare ma non di abolire completamente gli adattamenti indotti dall'allenamento. A questo proposito si deve considerare che un certo numero di vie di segnalazione, attivate durante l'esercizio, possono convergere sul PGC-1. Tra queste è possibile includere quelle iniziate dai flussi di Ca<sup>2+</sup>, il quale attiva varie vie di segnalazione, comprese quelle regolate dalla calcineurina fosfatasi, dalle chinasi regolate dalla calmodulina, dalla caduta dei livelli di fosfati ad alta energia che conducono

all'attivazione di chinasi sensibili all'AMP (AMPK), dalla stimolazione del sistema adrenergico, che porta alla sintesi dell'AMPc e all'attivazione della protein chinasi A e di altre chinasi, come la protein chinasi attivata da mitogeni (MAPK) (Arany, 2008).

Da quando è stato dimostrato che la vitamina E regola l'attività della protein chinasi C (Boscoboinik et al., 1991) sono state descritte altre funzioni di segnalazione per l' $\alpha$ -tocoferolo, non legate alla sua proprietà di antiossidante. Quindi, è ipotizzabile che esso possa anche regolare vie di trasduzione del segnale che sottendono alla risposta adattativa all'allenamento. Una tale via potrebbe coinvolgere l'attivazione, da parte dell' $\alpha$ -tocoferolo, della MAPK (Numakawa et al., 2006), la quale induce l'aumento dell'attività di PGC-1 attraverso fosforilazione (Knutti et al., 2001). Tuttavia, altri studi sono necessari per stabilire se la vitamina E è capace di modulare vie di segnalazione indipendenti dalle ROS coinvolte negli adattamenti del muscolo scheletrico all'allenamento.



## **Bibliografia**

- Adhihetty, PJ, Ljubicic, V, Hood, DA,** (2007), “Effect of chronic contractile activity on SS and IMF mitochondrial apoptotic susceptibility in skeletal muscle”, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292(3): E748-55.
- Alessio HM, Goldfarb AH.** (1988) Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *J Appl Physiol.* Apr;64(4):1333-6.
- Armstrong, R. B., Ogilvie, R. W., Schwane, J. A.,** (1983) “Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle”. *J. Appl. Physiol.* 54:80-93.
- Arany, Z,** (2008) PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease. *Curr Opin Genet Dev.* 18: 426–434.
- Ashton, T. , I. S. Young, J. R., Peters et al.,** (1999). “Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study,” *Journal of Applied Physiology*, vol. 87, no. 6, pp. 2032–2036, .
- Azzi A., Gysin R., Kempnà P., Negis Y., Villacorta L., Visarius T., Zingg J.M.,** (2004) *Ann NY Acad Sci.* Dec; 1031:86-95.
- Babior, B. M. , Lambeth, J.D., and Nauseef ,W. ,** (2002) “The neutrophil NADPH oxidase,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol.397, no. 2, pp. 342–344,.

**Baker, M.J., Frazier, A.E., Gulbis, J.M., Ryan, M.T.** (2007). Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function. *Trends Cell Biol.* 17, 456–464.

**Baldwin, K.M., Klinkerfuss, G.H., Terjung, R.L., Mole, P.A., Holloszy, J.O.,** (1972) Respiratory capacity of white, red and intermediate muscle: adaptive response to exercise. *Am. J. Physiol.* 222, 373\_378.

**Balon, TW, Nadler, JL.,** (1994) “Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations”. *J Appl Physiol* 77: 2519–2521.

**Barré H., Bailly L., Rouanet J.L.** (1987). Increased oxidative capacity in skeletal muscles from acclimated ducklings: a comparison with rats. *Comp Biochem Physiol* 88B: 519-522.

**Bohnert, M., Pfanner, N., van der Laan, M.,** (2007). “A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins”. *FEBS Lett.* 581, 2802–2810.

**Bolender, N., Sickmann, A., Wagner, R., Meisinger, C., Pfanner, N.** (2008) “Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins”. *EMBO Rep.* 9, 42–49.

**Boscoboinik D, Szewczyk A, Azzi A.** (1991) Alpha-tocopherol (vitamin E) regulates vascular smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity. *Arch Biochem Biophys.* 286:264-269.

**Brooks SV, Vasilaki A, Larkin LM, McArdle A, Jackson MJ.** (2008) Repeated bouts of aerobic exercise lead to reductions in skeletal muscle free radical generation and nuclear factor kappaB activation. *J Physiol.* 586(16):3979-90.

**Burton, G.W., Joyce, A., & Ingold. K.U.,** (1982). “First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma” [letter]. *Lancet* 2: 327.

**Burton, G. W., Cheeseman, K. H., Doba, T., Ingold, K.U., and Slater, T.F.** (1983). “Vitamin E as an antioxidant in vitro and in vivo”. *Ciba Found. Symp* 101, 4-18.

**Calabrese, E. J.; Baldwin, L. A.** (2003) “Hormesis: the dose–response revolution”. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43:175–197.

**Carlberg I.; Mannervik B.** (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113, 484-490

**Childs, A., Jacobs, C., Kaminski, T., Halliwell, B., & Leeuwenburgh, C.,** (2001) “Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise”. *Free Radic Biol Med*, 31(6), 745-753.

**Cobley, J. N., Sakellariou, G. K., Owens, D. J., Murray, S., Waldron, S., Gregson, W., et al.** (2014). “Lifelong training preserves some redox-regulated adaptive responses following an acute exercise stimulus in aged human skeletal

muscle”. *Free Radic. Biol. Med.* 70, 23–32. Doi:10.1016/j. free rad  
biomed.2014.02.004

**Coombes, J. S., Rowell, B., Dodd, S. L., Demirel, H. A., Naito, H., Shanely, R. A., et al.** (2002). “Effects of vitamin E deficiency on fatigue and muscle contractile properties”. *Eur J Appl Physiol*, 87(3), 272-277.

**Couto Gomes, E., Silva, A. N., Rubino de Oliveira, M.,** (2012) “Oxidants, Antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Article ID 756132, 12 pages doi:10.1155/2012/756132

**Davies, K. J. A., Quintanilha, TA, Brooks GA, Paker L.,** (1982) “Free radical and tissue damage produced by exercise”. *Biochem biophys res commun* 107:1198-1205

**Davies, K.J.A., Packer, L., Brooks, G.A.,** (1981) Biochemical adaptation of mitochondria, muscle and whole-animal respiration to endurance training. *Arch. Biochem. Biophys.* 209, 539\_554.

**Dawson CA, Horvath S.,** (1970) “Swimming in small laboratory animals” *Med Sci. Sports* 2, 51-78

**Dillard, C. J., Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL,** (1978) Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol.* Dec;45(6):927-32.

**Diplock, A.T.**, (1983) “The role of vitamin E in biological membranes”. Ciba Found. Symp. 101: 45–55.

**Espinosa, A, Leiva, A, Pena M, Muller M, Debandi A, Hidalgo C, Carrasco MA, Jaimovich E**, (2006) “Myotube depolarization generates reactive oxygen species through NAD(P)H oxidase; ROS-elicited Ca<sup>2+</sup> stimulates ERK, CREB, early genes”. J Cell Physiol . 209: 379–388.

**Fisher-Wellman and Bloomer, R. J.**, (2009) “Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history,” Dynamic Medicine, vol. 8,no. 1, pp. 1–25,

**Flohè L.; Gunzler W.A.** (1985) *Assays of glutathione peroxidase*. Methods Enzymol. 105: 114-121.

**Flück M, Hoppeler H.**, (2003) “Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function”. Rev Physiol Biochem Farmacol 2003. 146: 159-216.

**Freysenet D.** (2007) *Energy sensing and regulation of gene expression in skeletal muscle*. J Appl Physiol. 102(2):529-40.

**Ghimire, U. Kohli, C. Li et al.**, (2012) “Catecholamine pathway gene variation is associated with norepinephrine and epinephrine concentrations at rest and after exercise,” Pharmacogenet Genomics, vol. 22, no. 4, pp. 254–260

**Goldfarb AH.**, (1999) “Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive

modalities in exercise-induced muscle damage”. *Can J Appl Physiol* 24: 249–266

**Gomez-Cabrera, M. C.; Martinez, A.; Santangelo, G.; Pallardo, F. V.; Sastre, J.; Vina, J.,** (2006) “Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation”. *Br. J. Nutr.* 96(Suppl. 1): S31–S33.

**Gomez- Cabrera, M.C.; Domenech, E.; Romagnoli, M.; Arduini, A.; Borrás, C.; Pallardo, F.V.; Sastre, J.; Viña, J.,** (2008) “Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptation in endurance performance”. *Am. J. Clin. Nutr.* 87:142-149

**Gomez-Cabrera, F. V. Pallard´ o, J. Sastre, J. Vina, andL. Garcia-Del-Moral,** (2003) “Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France,” *Journal of the American Medical Association,* vol. 289, no. 19, pp. 2503–2504.

**Gomez-Cabrera MC, Vina J, JiLL,** (2009) “Interplay of oxidants and antioxidants during exercise : implication for muscle health”, *phys sports med* DEC; 37(4):116-23

**Gong MC, Arbogast S, Guo Z, Mathenia J, Su W, Reid MB.,** (2006) “Calcium-independent phospholipase A2 modulates cytosolic oxidant activity and contractile function in murine skeletal muscle cells”. *J Appl Physiol* 100: 399–405,

**Gornall AG, Bardawill CJ, David MM** (1949), “Determination of serum proteins by mean of the biuret reaction”. *J Biol Chem* 177, 751-766.

**Gornall, A.G.M.; Bardawill, C.J.** (1949) *David, M.M.* Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177: 751-766; 1949.

**Griffith H.R. et al.,** (1980) *Free radic. Chem. Pathol. & Med.* 439-454.

**Halliwell B.; Gutteridge J.M.C.** (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85.

**Halliwell B. and J. M. C. Gutteridge,** (2007) “*Free Radicals in Biology and Medicine*”, Oxford University Press, New York, NY, USA

**Handy, D.E.; Loscalzo, J.,** (2012) “Redox regulation of mitochondrial function”. *Antioxid. Redox Sign.* 16:1323-1367

**Hasegawa A, Suzuki S, Matsumoto Y, Okubo T.,** (1997) In vivo fatiguing contraction of rat diaphragm produces hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med* 22: 349–354

**Heath R.L., Tappel A.L.** (1976). “A new sensitive assay for the measurement of hydroperoxides”. *Anal Biochem* 76: 184–191

**Hyslop P.A., Sklar L.A.** (1984). A quantitative fluorimetric assay for the determination of oxidant production by polymorphonuclear leukocytes: its use in the simultaneous fluorimetric assay of cellular activation processes. *Anal Biochem* 141: 280 – 286.

**Hollander J, Fiebig R, Gore M, et al.** (1999). Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training. *Am J Physiol.*; 277(3 Pt 2): R856-62.

**Holmes BF, Lang DB, Birnbaum MJ, Mu J, Dohm GL.** (2004) AMP Kinase is not required for the GLUT4 response to exercise and denervation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 287: E739-E743.

**Hood DA, Irrcher I, Ljubicic V, Joseph AM.** (2006) Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol.* 209(Pt 12):2265-75.

**Horowitz JF, Leone TC, Feng W, Kelly DP, Klein S.** (2000) Effect of endurance training on lipid metabolism in women: a potential role for PPAR alpha in the metabolic response to training. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 279(2): E348-55.

**Institute of Medicine,** (2000) Dietary Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, Carotenoids, National Academy Press, Washington, DC, USA, 2000.

**Ji LL,** (1999) "Antioxidants and oxidative stress in exercise," *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 222, no. 3, pp. 283–292

**Johnson NA, Sachinwalla T, Walton DW, Smith K, Armstrong A, Thompson MW and George J.,** (2009) Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. *Hepatology* 50: 1105-1112.



**Kehrer JP, Lund LG.,(1994)** Cellular reducing equivalents and oxidative stress. Free Radic Biol Med. Jul;17(1):65-75.

**Knowles R.G. and Moncada S. (1994).** Nitric oxide synthases in mammals. Biochem. J. 298: 249 - 258.

**Knutti D, Kressler D, Kralli A. (2001)** Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. Proc Natl Acad Sci U S A.98:9713-9718.

**Komi, (2003)** Strength and Power in Sport, John Wiley & Sons, Oxford, UK.

**Kumar CT, Reddy VK, Prasad M, Thyagaraju K, Reddanna P.,(1992)** Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress Mol Cell Biochem. Apr;111(1-2):109-15.

**Lawrence and Hope, R., (2008)** Advanced Circuit Training: a Complete Guide to Progressive Planning and Instructing, A & C Black, London, UK.

**Lee KY, Kim SJ, ChaYS, So JR, Park JS, Kang KS and Chon TW., (2006)** Effect of exercise on hepatic gene expression in an obese mouse model using cDNA microarrays. Obesity (Silver Spring) 14: 1294-1302.

**Lang J.K.; Gohil K.; Packer L., (1986)** “Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinols, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions”. Anal. Biochem. 157: 106-116.

**Liang H, Ward FW.** (2006) PGC1- $\alpha$ : A key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ* 30: 145–151.

**Lovlin R, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M, Belcastro AN.,**(1987)

Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 56(3):313-6.

**Lu S.C.,** (1999) “Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies,” *The FASEB Journal*, vol. 13, no. 10, pp. 1169–1183.

**Mc Cully K, Faulkner JA** (1985) Injury to skeletal muscle fibers of mice following lengthening contractions. *J Appl Physiol.* 59: 119-126

**MacLean PS, Zheng D, Jones JP, Olson AL, and Dohm GL.** (2002) *Exercise induced transcription of the muscle glucose transporter (GLUT 4) gene.* *Biochem Biophys Res Commun.* 292: 409–414.

**McArdle, F. I., Katch, and V. L., Katch,** (2009) *Exercise Physiology: Nutrition, Energy, and Human Performance,* Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia, Pa, USA.

**Marcil V, Lavoie JC, Emonnot L, Seidman E, Levy E.** (2011) Analysis of the iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage, antioxidant response and inflammation in THP-1 macrophages. *Clin Biochem.* 44(10-11): 873-83.

**Meister A, Anderson ME.,**(1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:711-60.

**Murakami, T., Shimomura, Y., Yoshimura, A., Sokabe, M., and Fujitsuka, N.** (1998). Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle. *Biochem. Biophys. Acta* **1381**, 113–122

**Musaro` A., S. Fulle, and G. Fano,** (2010) “Oxidative stress and muscle homeostasis,” *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, vol. 13, no. 3, pp. 236–242

**Nethery D, Callahan LA, Stofan D, Mattera R, DiMarco A, Supinski G.,** (2000) PLA<sub>2</sub> dependence of diaphragm mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Appl Physiol* 89: 72–80.

**Numakawa, Y.; Numakawa, T.; Matsumoto, T.; Yagasaki, Y.; Kumamaru, E.; Kunugi, H.; Taguchi, T.; Niki, E.** (2006) Vitamin E protected cultured cortical neurons from oxidative stress-induced cell death through the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Neurochem.* 97:1191–1202.

**Okado-Matsumoto A., Fridovich I.** (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 276: 38388–38393.

**Pacifici RE, Davies, K.J.,**(1990) Protein degradation as an index of oxidative stress. *Methods Enzymol*; 186:485-502.

**Palmer G, Horgan D.J., Tisdale H, Singer TP, Beinert H,** (1968). Studies on the respiratory chain-linked reduced nicotinamide adenine di nucleotide dehydrogenase. XIV. Location of the sites of inhibition of rotenone, barbitures and piericidin by means of electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J.Biol.Chem.*243, 844-847.

**Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN.** (2008) “Exercise-induced cardio protection against myocardial ischemia-reperfusion injury”. *Free Radic Biol Med.* 44(2):193-201.

**Powers and M. J. Jackson,** (2008) “Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production,” *Physiological Reviews*, vol. 88, no. 4, pp. 1243–1276.

**Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O’Malley, B., and Spiegelman, B.M.** (1999). Activation of PPAR gamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* 286, 1368–1371.

**Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, and Spiegelman BM.,** (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829–839.

**Radak, Z.; Pucsok, J.; Mecseki, S.; Csont, T.; Ferdinandy, P,** (1999) Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 26:1059–1063

**Radák Z, Naito H, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Takahashi R, Cardozo-Pelaez F, Goto S.** (2002) Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 445(2):273-8.

**Radak, H. Y. Chung, and S. Goto,** (2008) “Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 44, no. 2, pp. 153–159.

**Radi R., Cassina A., Hodara R., Quijana C. and Castro L.** (2002). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 1451 - 1464. *Regl.* 38: 291-336.

**Rajguru SU, Yeargans GS, Seidler NW.,**(1994) Exercise causes oxidative damage to rat skeletal muscle microsomes while increasing cellular sulfhydryls *Life Sci.* 1994;54(3):149-57.

**Reid,M.B.; Khawli, F.A.; Moody, M.R.** (1993). Reactive oxygen in skeletal muscle. Contractility of un fatigued muscle. *J. Appl. Physiol.* 75:1081–1087.

**Reid MB.** (2008) Free radicals and muscle fatigue: of ROS, canaries, and the IOC. *Free Radic Biol Med* 44:169–79.

**Reid MB, Haack KE, Franchek KM, Valberg PA, Kobzik L, West MS.,** (1992) Reactive oxygen in skeletal muscle. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro *J Appl Physiol.* Nov;73(5):1797-804.

**Rietjens, M. G. Boersma, L. D. Haan et al.,** (2002 ).“The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids,” *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 11, no. 3-4, pp. 321–333.

**Reznick A.Z., Packer L.** (1994). *Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay.* *Methods Enzymol* 233: 357–363.

**Ristow, M.; Zarsea, K.; Oberbachc, A.; Klotingc, N.; Birringera, M.; Kiehntopfd, M.; Stumvollc, M.; Kahne, C.R.; Bluherc, M.,** (2009)

“Antioxidants prevent health-promoting effects physical exercise in humans”.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:8665-8670; 2009.

**Rossi R., A. Milzani, I. Dalle-Donne et al.,** (2002) “Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact?” *Clinical Chemistry*, vol. 48, no. 5, pp. 742–753, 2002.

**Sastre, J.; Asensi, M.; Gasco, E.; Pallardo, F. V.; Ferrero, J. A.; Furukawa, T.; Vina, J.** (1992) “Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration”. *Am. J. Physiol.* 263: R992– R995; 1992.

**Scarpulla, R.C.,** (2002) Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1576:1-14; 2002.

**Scheele C, Nielsen S, Pedersen BK.** (2009) ROS and myokines promote muscle adaptation to exercise. *Trends Endocrinol Metab.* 20(3):95-9.

**Sharman, I. M.; Down, M. G.; Sen, R. N.** (1971) “ The effects of vitamin E and training on physiological function and athletic performance in adolescent swimmers”. *Br. J. Nutr.* 26:265–276.

**Schild L., Reinheckel T., Wiswedel I., Augustin W.** (1997). Short-term impairment of energy production in isolated rat liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation: involvement of oxidative protein modification. *Biochem J* 328: 205–210.

**Simon LM & Robin ED** (1971) "Relationship of cytochrome oxidase activity to vertebrate total and organ oxygen consumption". *International Journal of Biochemistry* 2 560-573.

**Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE.,** (2004) " Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles". *FASEB J.* 18(10):1150-2.

**St-Pierre, J.; Drori, S., Uldry, M.; Silvaggi, J.M.; Rhee, J.; Jäger, S.; Handschin, C.; Zheng, K.; Lin, J.; Yang, W.; Simon, D.K.; Bachoo, R.; Spiegelman, B.M.,** (2006) "Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators". *Cell* 127:397-408

**Suzuki M, Katamine S, Tatsumi S.,**(1983) Exercise-induced enhancement of lipid peroxide metabolism in tissues and their transference into the brain in rat. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* Apr;29(2):141-51.

**Takehige K, Minakami S** (1979) NADH- and NADPH-dependent formation of superoxide anion by bovine heart submitochondrial particle and NADH-ubiquinone reductase preparation. *Biochem J.* 180: 129-135.

**Terjung, RL, Baldwin, KM, Molé, PA, Klinkerfuss GH, Holloszy, JO,** (1972) Effect of running to exhaustion on skeletal muscle mitochondria: a biochemical study *Am J Physiol.* 1972 Sep;223(3):549-54.

**Thompson, S. F. Crouse, B. Goodpaster, D. Kelley, N. Moyna, and Pescatello, L.,** (2001) "The acute versus the chronic response to exercise,"

Medicine and Science in Sports and Exercise, vol. 33, no. 6, pp. S438–S445, 2001.

**Tietze G.** (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* 27(3):502-22.

**Tonkonogi M, Harris B, Sahlin K.**(1998).Mitochondrial oxidative function in human saponin-skinned muscle fibres: effects of prolonged exercise. *J Physiol.* 510 ( Pt 1):279-86.

**Turrens J.F., Alexandre a., Lehninger A.L.,** (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch.Biochem.Biophys.* 237, 408-414.

**Vollaard, J. P. Shearman, and C. E. Cooper,** (2005 ).“Exercise induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance,” *Sports Medicine,* vol. 35, no. 12, pp. 1045–1062,.

**Venditti, P., Bari, A.; Di Stefano, L.; Di Meo, S.,** (2008) Tri-iodothyronine treatment differently affects liver metabolic response and oxidative stress in sedentary and trained rats. *J. Endocrinol.* 197: 65-74; 2008.

**Venditti P, Di Meo S.,**(1997) Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. *Int J Sports Med.* Oct;18(7):497-502.



**Venditti P., De Rosa R., Di Meo S.,** (2003). “Effect of thyroid state on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by rat liver mitochondria”. *Mol. Cell. Endocrinol.*205, 185-192

**Venditti, P.; Di Meo, S.,** (1996) “Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats”. *Arch. Biochem. Biophys.* 331:63-68.

**Venditti, P.; Di Meo, S.**( 2001). Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol signals recept ;* 10:125-140.

**Venditti P, Masullo P, Meo S.,** (1999) “Effect of exercise duration on characteristics of mitochondrial population from rat liver.” *Arch Biochem Biophys.* Aug 1;368(1):112-20.

**Venditti P, Masullo P, Di Meo S.,** (1999) “effect of training on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by mitochondria from rat skeletal muscle”. *Arch Biochem Biophys.* 1999 Dec 15;372(2):315-20.

**Venditti P, Bari A, Di Stefano L, Cardone A, Della Ragione F, D’Esposito M, Di Meo S.** (2011) Involvement of PGC-1, NRF-1, and NRF-2 in metabolic response by rat liver to hormonal and environmental signals. *Mol Cell Endocrinol* 35:22-29.

**Vina, J.; Gomez-Cabrera, M.C.; Lloret, A.; Marquez, R., Minana, J.B., Pallardo, F.V., Sastre, J.,** (2000) Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 50:271–277

**Vollaard, J. P. Shearman, and C. E. Cooper,** (2005) “Exerciseinduced oxidative stress: myths, realities and physiologicalrelevance,” *Sports Medicine*, vol. 35, no. 12, pp. 1045–1062

**Wu G., Y. Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton, and N. D. Turner,** (2004)  
“Glutathione metabolism and its implications for health,” *Journal of Nutrition*, vol. 134, no. 3, pp. 489–492, 2004.

**Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM.** (1999) “Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1”. *Cell* 98: 115–124.