

Università degli studi di Napoli

“Federico II”



Dottorato di ricerca

in

Biologia Applicata XXII ciclo

Curriculum Fisiologia

“Effetto dell' ormone T_3 sulla risposta metabolica e sullo stress ossidativo nel muscolo scheletrico di ratti sedentari ed allenati”

Coordinatore

Ch.mo Prof. Ezio Ricca

Candidata

Dott.ssa Lisa Di Stefano

Tutore

Ch.mo Prof. Sergio Di Meo

Premessa

Una delle caratteristiche peculiari degli organismi viventi pluricellulari è la capacità di mantenere la stabilità del loro ambiente interno. Questa condizione di stabilità, per la quale fu coniato il termine di omeostasi, è conseguita mediante processi fisiologici precisamente coordinati. L'omeostasi rischia incessantemente di essere compromessa dall'azione di agenti stressanti derivanti da sorgenti interne ed esterne. L'organismo si difende da tali agenti mediante meccanismi protettivi, che coinvolgono la mobilitazione di vari componenti cellulari e la loro integrazione funzionale. Questi sistemi di difesa tamponano gli effetti deleteri degli agenti stressanti, minimizzando il disturbo del mezzo interno e preservando l'attività cellulare ottimale.

Una delle principali minacce per l'omeostasi e l'integrità degli organismi aerobici deriva da reazioni ossidative, indotte nella cellula da radicali liberi o altre specie reattive, derivanti dalla parziale riduzione dell'ossigeno. Per neutralizzare tali effetti ossidativi, negli organismi aerobici si è evoluto un sistema di difese biochimiche che è fortemente dipendente dalla introduzione con gli alimenti di sostanze ad azione antiossidante. Tuttavia, tale sistema può non essere in grado di contrastare una eccessiva produzione di specie radicaliche per cui può insorgere una condizione nota come stress ossidativo. Diversi studi hanno evidenziato che la condizione di stress ossidativo è spesso associata a stati ipermetabolici, caratterizzati da un aumento della velocità metabolica basale e del consumo di ossigeno dei tessuti, indotti da eventi patologici o da trattamenti capaci di agire sul metabolismo. In particolare, uno stato di ipertiroidismo, indotto da trattamento ormonale o esposizione al freddo, e l'esecuzione di un esercizio

strenuo o di un esercizio aerobico prolungato sono in grado di causare una condizione di stress ossidativo in vari tessuti corporei, compreso il tessuto muscolare.

E' ormai ampiamente dimostrato che gli effetti deleteri dell'ipertiroidismo e dell'esercizio acuto possono essere combattuti dalla integrazione dietetica antiossidante. Più recenti sono gli studi che hanno evidenziato un effetto protettivo dell'allenamento fisico opportunamente graduato (training) contro i danni ossidativi legati all'esecuzione di un esercizio acuto. Diversi studi suggeriscono che tale effetto è legato alla capacità dell'allenamento regolare di indurre adattamenti nel tessuto muscolare scheletrico, capaci di proteggere le cellule contro gli effetti dannosi delle specie ossidanti. E' quindi concepibile che tali risposte adattative al training possano essere efficaci anche nell'offrire protezione contro gli effetti deleteri degli ossidanti nei tessuti degli animali ipertiroidei. Una indagine a questo riguardo è di grande interesse perché potrebbe portare elementi a favore della utilizzazione dell'attività fisica aerobica come terapia nel caso di disordini legati ad una eccessiva produzione di radicali dell'ossigeno.

Introduzione

Radicali liberi

Il termine “*radicale*” fu introdotto da Liebig e Wohler nel 1832, per indicare un gruppo di atomi che si manteneva inalterato in reazioni che interessavano il gruppo funzionale del composto di appartenenza, e la cui sostituzione, con altri gruppi, non causava modificazioni nelle reazioni stesse. L’interesse nei confronti dei radicali liberi, tuttavia, si sviluppò solo agli inizi del secolo scorso quando, in seguito all’isolamento del trifenilmetile, si capì che i radicali erano capaci di esistenza indipendente.

Attualmente si definisce “*radicale libero*” ($R\cdot$) qualsiasi specie chimica capace di esistenza indipendente che possieda uno o più elettroni spaiati nei suoi orbitali (Boveris et al., 1976; Chance et al., 1979) .

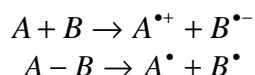
La presenza di elettroni spaiati, conferisce ai radicali liberi proprietà additive quali il paramagnetismo e, spesso, un’ elevata reattività.

La maggior parte delle molecole presenta solo elettroni appaiati. Ad un elettrone che occupa un orbitale è associato un momento magnetico espresso da un numero quantico di spin pari a $-1/2$ o $+1/2$. Per il principio di esclusione di Pauli, due elettroni che occupano lo stesso orbitale avranno valore di spin opposto, per cui una molecola ha un momento magnetico totale pari a zero.

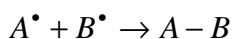
Viceversa, i radicali, possedendo elettroni spaiati, presentano un momento magnetico totale diverso da zero. Questa caratteristica fa sì che essi siano leggermente attratti da un campo magnetico. Inoltre poiché la stabilità di una molecola dipende dalla presenza di elettroni accoppiati nei suoi orbitali, i radicali sono tendenzialmente più reattivi delle specie non radicaliche.

Le reazioni radicaliche consistono per lo meno di due fasi: una fase detta *iniziale* ed una detta *terminale*.

Durante la fase iniziale si ha la formazione di radicali liberi, dovuta al trasferimento di un elettrone fra specie non radicaliche o, più frequentemente, dalla rottura omolitica di un legame covalente.



Un radicale appena formato tende a reagire con qualsiasi specie chimica entri in contatto, per cui, se questa è rappresentata da un altro radicale, alla fase iniziale segue subito quella terminale in cui il radicale prodotto nella prima fase viene distrutto con formazione di un prodotto stabile non radicalico.



Tuttavia, poiché di norma la concentrazione dei radicali è bassa, è più facile che il radicale neo formato reagisca con una molecola non radicalica e che tra la fase iniziale e quella terminale sia interposta una *fase di propagazione* in cui si susseguono una o più trasformazioni. Queste prevedono sempre la formazione di un nuovo radicale che, a sua volta, può continuare la sequenza finché l' incontro di due radicali non termina la reazione.

Vari fattori possono inibire o prolungare la fase di propagazione. Un inibitore è un sostanza capace di reagire con il radicale interrompendo la catena o rallentando la velocità di propagazione formando un radicale più stabile. Sostanze di questo tipo sono definiti *scavenger* .

Radicali liberi nei sistemi biologici: Le specie reattive dell'ossigeno

La sopravvivenza degli organismi aerobi è possibile grazie alla presenza sulla Terra di molecole di ossigeno. Questo, infatti, è alla base delle reazioni di ossidazione biologica da cui tali organismi traggono energia. Tuttavia, l'ossigeno può rappresentare anche una minaccia per i viventi comportandosi come un agente tossico. La capacità degli organismi di sopravvivere in presenza di tale molecola, quindi, dipende dall'evoluzione di un elaborato sistema di difesa antiossidante messo a punto come adattamento all'atmosfera ossidante terrestre (Yu, 1994). Tale sistema risulta però adeguato solo alla pressione dell'ossigeno atmosferico (circa 156 mm Hg), mentre l'esposizione a pressioni maggiori arreca gravi danni alla salute.

Il comportamento apparentemente contraddittorio dell'ossigeno, è correlato alla capacità della molecola di produrre radicali liberi.

La specie chimica stabile dell'ossigeno, alle pressioni e temperature di interesse biologico, è l' $^3\text{O}_2$ (ossigeno tripletto).

In questo stato, l'ossigeno presenta due elettroni spaiati negli orbitali più esterni, per cui è da considerarsi un radicale libero. Tuttavia, tali elettroni hanno spin paralleli per cui affinché si verifichi una reazione di ossidazione, la molecola da ossidare dovrebbe mettere a disposizione due elettroni con spin tra loro paralleli ma opposti a quelli dell'ossigeno. Le molecole dei composti organici stabili presentano generalmente elettroni con spin opposti per cui sarebbe necessaria un'inversione di spin affinché gli elettroni siano accettati negli orbitali dell'ossigeno. Tale limitazione, detta restrizione di spin, rallenta o preclude la reazione rendendo l'ossigeno poco reattivo a dispetto della sua natura radicalica.

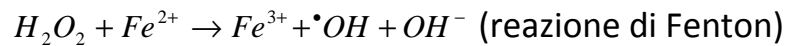
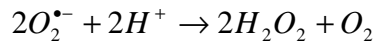
La restrizione di spin può essere eliminata mediante il passaggio dell'O₂ dallo stato fondamentale ad uno stato eccitato di singoletto (¹O₂) in cui i due elettroni presentano spin opposti. Esistono due stati eccitati di singoletto per l'ossigeno a seconda che gli elettroni si trovino in due orbitali diversi o nello stesso orbitale. In questo ultimo caso non si ha un radicale, ma la specie è accomunata alle specie radicaliche dalla elevata reattività.

Negli organismi viventi, la generazione dell'ossigeno singoletto è tuttavia piuttosto ridotta e quindi non in grado di spiegare le numerose ossidazioni che si verificano a livello cellulare. In effetti, queste reazioni sono dovute al trasferimento di elettroni da molecole riducenti all'O₂ promosso da sostanze quali gli ioni dei metalli di transizione, come ferro e rame, che hanno elettroni spaiati con spin paralleli ed enzimi, come la citocromo ossidasi (COX), che hanno ioni metallici nei loro siti attivi.

La COX è in grado di trasferire gradualmente quattro elettroni ottenuti da molecole di citocromo c all'O₂, formando l'acqua. Le forme parzialmente ridotte dell'ossigeno, che si formano durante questo processo di riduzione tetravalente dell'O₂, non sono liberate in quanto sono strettamente legate nel sito catalitico dell'enzima. Comunque, nella cellula vi sono diverse sostanze in grado di cedere un elettrone all'O₂ (riduzione univalente) formando l'anione radicale superossido (O₂^{•-}).

Da tale specie si possono ottenere, attraverso una serie di reazioni, altri intermedi di riduzione dell'O₂ quali il perossido di idrogeno (H₂O₂) ed il radicale ossidrilico ([•]OH) (Halliwell et al., 1998).

Il perossido di idrogeno può essere ottenuto per dismutazione del superossido, mentre il radicale ossidrilico è ottenuto per reazione del perossido con ioni metallici di transizione nella forma ridotta.



Le specie parzialmente ridotte dell' O_2 non hanno gli impedimenti cinetici dell' 3O_2 e sono molto più reattive, per cui sono indicate come specie reattive dell'ossigeno (*ROS*). Fra esse la più pericolosa è l'ossidrilico il quale è in grado di reagire praticamente con qualsiasi sostanza con cui viene in contatto.

Le *ROS* non sono limitate agli intermedi di riduzione dell' O_2 , ma comprendono anche altre specie radicaliche, che presentano un elettrone spaiato sull'atomo di ossigeno come i radicali alcossilici ($RO\bullet$) ed i radicali perossilici ($ROO\bullet$), e specie non radicaliche come l'ossigeno singoletto (1O_2) e l'ozono (O_3) (Tabella 1).

RADICALI	$O_2^{\bullet-}$	Radicale superossido
	$\bullet OH$	Radicale ossidrilico
	$RO\bullet$	Radicale alcossilico
	$ROO\bullet$	Radicale perossilico
NON RADICALI	H_2O_2	Perossido di idrogeno
	$HOCl$	Acido ipocloroso
	1O_2	Ossigeno singoletto
	O_3	Ozono

A queste specie possono essere aggiunte altre contenenti l'azoto, come l'ossido nitrico ed il biossido di azoto, che attualmente vengono indicate come specie reattive dell'azoto (*RNS*) (Tabella 2).

Radicali	NO^\bullet	Ossido nitrico
	NO_2^\bullet	Biossido d'azoto
Non Radicali	HNO_2	Acido nitroso
	N_2O_4	Tetrossido d'azoto
	$ONOO^-$	Perossinitrito

Siti di produzione delle ROS

Negli organismi viventi, le ROS sono continuamente generate come sottoprodotti del normale metabolismo cellulare. La loro produzione può inoltre essere incrementata da fattori ambientali.

Nelle cellule, esistono diversi siti che possono fornire un contributo significativo alla generazione di ROS. Tali siti comprendono:

- i) il reticolo endoplasmatico, in cui le ROS sono prodotte dal citocromo P450 che è coinvolto nel metabolismo ossidativo di molti composti lipofili;
- ii) i perossisomi, che generano H_2O_2 anche come sottoprodotto della β -ossidazione degli acidi grassi;
- iii) il citoplasma, in cui sono presenti ossidasi, fra cui la xantina ossidasi, in grado di produrre il radicale superossido;
- iv) la membrana plasmatica, in cui radicali dell'ossigeno sono prodotte dall'azione delle lipossigenasi e delle cicloossigenasi, che sono coinvolti nel metabolismo dell'acido arachidonico.

Tuttavia, in condizioni non patologiche, la maggior parte delle ROS deriva dalla catena di trasferimento elettronico, localizzata sulla membrana interna mitocondriale (Turrens et al., 1980; Loschen et al., 1974).

Negli animali, i mitocondri utilizzano circa il 95% dell'ossigeno respirato per produrre l'ATP necessario al fabbisogno cellulare. Le sostanze contenute negli alimenti, infatti, sono ossidate cedendo elettroni a trasportatori di elettroni come la nicotinamide adenin nucleotide (NAD^+) e le flavine (FMN e FAD). I risultanti prodotti della reazione (NADH , FMNH_2 e FADH_2) sono riossidati dall'ossigeno nei mitocondri, producendo grandi quantità di energia (Fig. 1).

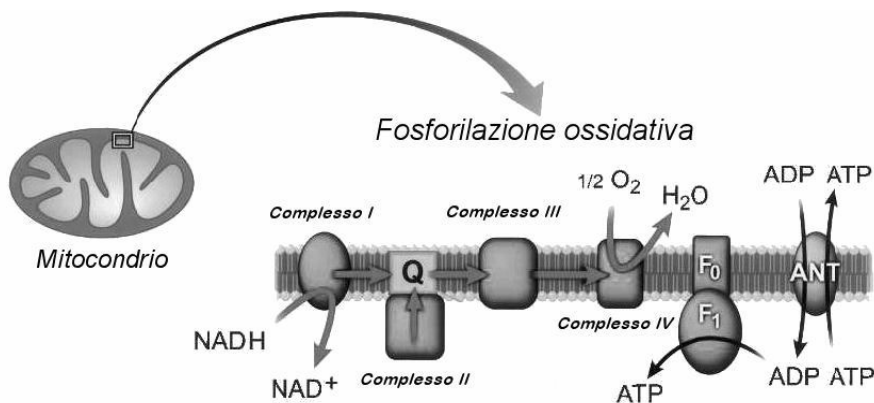


Fig. 1 Consumo di O_2 e produzione di ATP nella catena respiratoria mitocondriale

L'ossidazione si verifica in una serie di tappe successive, che coinvolge numerosi centri redox, organizzati in quattro complessi proteici immersi nella membrana mitocondriale interna. L'energia derivante dalla caduta dell'energia potenziale degli elettroni, è, quindi, rilasciata gradualmente.

Gli elettroni provenienti dal NADH passano nel complesso I a proteine contenenti ferro non emico (proteine Fe-S), convertendo il loro ferro legato dallo stato Fe^{+3} allo stato Fe^{2+} . Il passaggio degli elettroni al successivo accettore provoca la riconversione di Fe^{3+} a Fe^{2+} . Gli elettroni sono poi trasferiti dal Complesso I al Complesso III attraverso il Coenzima Q (CoQ) solubile nella membrana, il quale trasferisce al Complesso III anche gli elettroni derivanti dalla ossidazione, nel Complesso II, del succinato a fumarato. Nel Complesso III gli elettroni sono trasferiti mediante citocromi, proteine emiche i cui atomi di ferro passano alternativamente tra gli stati di

ossidazione +2 e +3. Gli elettroni sono poi trasferiti al citocromo c, una proteina legata alla superficie esterna della membrana mitocondriale interna, che li porta al Complesso IV costituito dalla citocromo ossidasi (COX), da cui sono ceduti all'O₂.

L'energia ottenuta in tre fasi del processo è utilizzata per creare un gradiente protonico ai lati della membrana mitocondriale interna. Il ritorno dei protoni nella matrice mitocondriale attraverso una ATPasi di membrana (complesso V) è utilizzato per la sintesi di ATP attraverso il processo che va sotto il nome di fosforilazione ossidativa (Fig. 1).

Alcuni componenti della catena respiratoria (carriers autoossidabili), pur cedendo la maggior parte degli elettroni al trasportatore successivo, ne cedono una piccola frazione direttamente a molecole di O₂ provocando la formazione del radicale superossido. Questo viene generalmente rilasciato nella matrice mitocondriale dove è trasformato, mediante dismutazione spontanea o catalizzata dall'enzima superossido dismutasi (SOD) (Fridovich, 1986), in H₂O₂, il quale può attraversare la membrana mitocondriale e raggiungere il compartimento citoplasmatico.

L'H₂O₂ rilasciata dai mitocondri è solo una parte di quella realmente prodotta in quanto una parte di essa è metabolizzata da enzimi o trasformata in radicale ossidrilico da complessi del ferro a basso ed elevato peso molecolare presenti nei mitocondri. Malgrado ciò, la misura della quantità di H₂O₂, che diffonde attraverso la membrana mitocondriale, fornisce indicazioni sui livelli relativi di produzione di ROS in diverse condizioni metaboliche.

Così è stato evidenziato che le ROS sono prodotte con velocità dipendente dallo stato metabolico. Infatti, il loro rilascio è più elevato durante lo stato 4 della respirazione, quando il potenziale di membrana mitocondriale è alto e la velocità con cui l'ossigeno è consumato è relativamente bassa. Viceversa,

la produzione è più bassa durante lo stato 3 della respirazione quando il potenziale di membrana cade per l'ingente flusso di protoni verso la matrice mitocondriale e il consumo d'ossigeno è più rapido.

La velocità di rilascio può essere ridotta da sostanze che agiscono come disaccoppianti della fosforilazione ossidativa, che aumentano la velocità di consumo dell'ossigeno e quindi il grado di ossidazione dei componenti della catena di trasporto. Un disaccoppiamento fisiologico si verifica nei mitocondri del tessuto adiposo bruno, la cui membrana presenta proteine disaccoppianti (UCP), che permettono il ritorno dei protoni nella matrice e la caduta del potenziale di membrana, dissipando così l'energia necessaria per la sintesi di ATP sotto forma di calore. Proteine analoghe sono presenti anche in altri tessuti sembrano regolare la generazione di ROS (Negre-Salvayre et al., 1997; Vidal-Puig et al., 2000).

Studi, effettuati misurando la velocità di rilascio di H₂O₂ in presenza di diverse combinazioni di substrati ed inibitori specifici per segmenti distinti della catena di trasporto, hanno permesso di stabilire che i siti di produzione mitocondriale delle ROS sono localizzati a livello dei complessi I e III della catena respiratoria (Turrens, 2003). Il metodo utilizzato è basato sull'idea che, a pressione costante di O₂, la velocità di produzione delle ROS dipende dalla concentrazione dei carriers auto ossidabili nella forma ridotta.

$$\frac{d[O_2]}{dt} v = k \cdot [O_2] \cdot [R^*]$$

Il blocco del trasferimento elettronico lungo la catena respiratoria da parte di un inibitore aumenta il grado di riduzione dei trasportatori localizzati a monte del blocco ed il grado di ossidazione dei trasportatori localizzati dall'altro lato. Così, un aumento della produzione di H₂O₂ in presenza di un inibitore, indica la presenza di un sito di generazione localizzato dal lato del

substrato. Viceversa, una diminuzione della produzione indica la presenza di un sito generatore dal lato dell'ossigeno.

Bersagli cellulari dei radicali liberi

Sebbene le ROS siano prodotte dal normale metabolismo cellulare, esse rappresentano una forte minaccia per gli organismi viventi in quanto, essendo fortemente reattive, possono reagire con un gran numero di molecole biologiche causando modificazioni che possono provocare mutazioni, inattivazione di enzimi, distruzione di tessuti (Freeman et al., 1982). I principali bersagli dei radicali liberi sono rappresentati dai lipidi, dalle proteine e dal DNA.

La componente fosfolipidica delle membrane e delle lipoproteine plasmatiche è molto vulnerabile all'attacco radicalico. Gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) subiscono infatti un processo a catena detto perossidazione lipidica con formazione di idroperossidi lipidici ed altri derivati. Tale processo presenta il tipico andamento delle reazioni radicaliche, caratterizzato dalle fasi di induzione, propagazione e terminazione. Esso può essere innescato da una qualsiasi specie radicalica capace di strappare un atomo di H da un gruppo metilenico di un acido grasso polinsaturo (LH). Dato che l'atomo di idrogeno trattiene un solo elettrone, l'atomo di carbonio, da cui l'idrogeno è stato allontanato, rimane con un elettrone spaiato e diviene un radicale alchilico. Il suo successivo riarrangiamento molecolare dà origine a un diene coniugato. Il radicale alchilico (L^{\bullet}) reagisce con l'ossigeno formando un radicale perossilico (LOO^{\bullet}). Questo può reagire con un altro radicale perossilico e terminare la catena portando alla formazione di ponti tra le catene laterali di lipidi differenti ($LOOOOL$). Tuttavia, è più probabile che esso stacchi un H da un acido grasso

adiacente, formando un idroperossido lipidico (LOOH) ed un altro radicale alchilico, che porta alla propagazione della reazione.

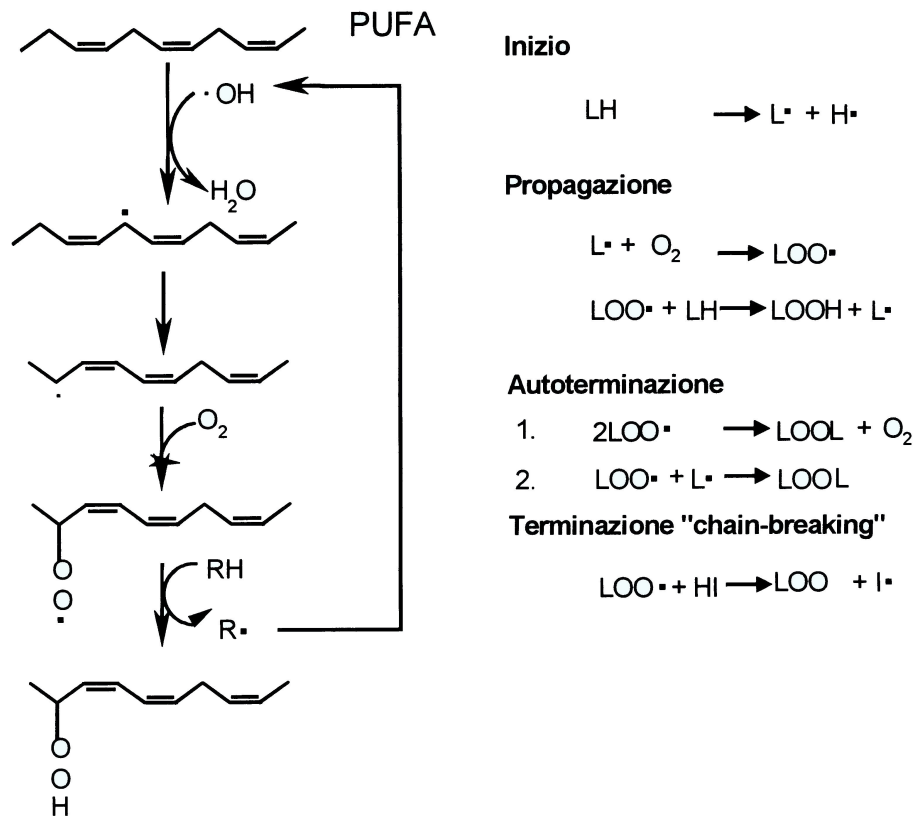


Fig. 2 Sequenza degli eventi della perossidazione lipidica

La perossidazione lipidica è quindi un processo autocatalitico che può portare alla formazione di una elevata quantità di idroperossidi a meno che non sia presente nella membrana una sostanza antiossidante (HI) in grado di cedere un idrogeno al radicale perossilico interrompendo la fase di propagazione (Fig. 2).

Gli idroperossidi lipidici possono andare incontro a decomposizione producendo radicali perossilici e alcossilici che, iniziando un nuovo processo a catena, o subendo una decomposizione di natura diversa, generano prodotti come alcani e aldeidi. I derivati aldeidici della perossidazione lipidica sono markers del danno ossidativo (Gutteridge, 1995). Questo risulta legato

principalmente alla perdita di grassi polinsaturi, che comporta una alterazione della fluidità e della permeabilità delle membrane, danni agli enzimi associati alle membrane, un alterato trasporto ionico e la produzione di metaboliti tossici degli idroperossidi.

Livelli fisiologici di H_2O_2 e di $O_2^{\bullet-}$ hanno scarso effetto sulle proteine a meno che esse non presentino un gruppo $-SH$ accessibile facilmente ossidabile. Per contro, l'attacco del radicale $\bullet OH$ porta all'ossidazione delle catene laterali, alla formazione dei legami proteina-proteina e all'ossidazione dello scheletro proteico con conseguente frammentazione della proteina stessa.

L'azione del radicale $\bullet OH$ consiste nell'estrazione di un atomo di idrogeno da un residuo amminoacidico, con formazione di un radicale carbonilico. Quest'ultimo reagisce con l'ossigeno formando un radicale alchilperossilico, che a sua volta si trasforma in radicale alcossilico, cui segue la formazione di una idrossi-proteina, nella quale si osserva una variazione della struttura e dunque perdita di funzione.

Gli intermedi radicalici di questa sequenza di reazioni possono reagire con altri radicali amminoacidici per generare un nuovo radicale carbonilico, inoltre il radicale carbonilico può reagire con un altro radicale carbonilico e formare un derivato proteina-proteina, oppure, reagire con un radicale derivante dalla perossidazione lipidica, producendo un aggregato proteina-lipide.

Danni a proteine, che ne comportano la perdita di funzione, possono alterare vari processi cellulari, come ad esempio il trasporto di membrana, quando vengono danneggiate molecole trasportatrici. La conseguenza più pericolosa è rappresentata dall'accumulo intracellulare di calcio, che provoca estensione del danno alla membrana, deterioramento cellulare e amplificazione della lesione iniziale. Poiché molte delle reazioni correlate alle ossidazioni radicaliche portano alla formazione di derivati proteici che presentano gruppi carbonilici, questi vengono spesso usati come marcatori

dell' ossidazione delle proteine che a sua volta è associata a condizioni di aumentata produzione di ROS (Pacifici et al., 1990).

Un ulteriore sito di attacco delle ROS è rappresentato dal materiale genetico cellulare (Shigenaga et al., 1990). Il radicale ossidrilico può danneggiare il DNA sia a livello delle basi puriniche e pirimidiniche, modificandole, sia a livello dello scheletro di ribosio fosfato portando alla scissione della doppia elica. Il DNA mitocondriale risulta più suscettibile all' ossidazione. Questo è dovuto alle elevate dosi di radicali a cui è esposto e alla assenza di proteine associate capaci di captare i radicali ossidrilici che si formano nei pressi del DNA stesso.

Sistema di difesa antiossidante

Gli organismi viventi hanno sviluppato, nel corso dell'evoluzione, un efficiente sistema di difesa contro i danni da radicali liberi (Yu, 1994). Tale sistema è in grado di esplicare un'attività di prevenzione, intercettazione o restauro. Generalmente le attività di prevenzione e restauro sono le uniche possibili nel caso di specie radicaliche particolarmente reattive, in quanto molti agenti, per manifestare la loro capacità di intercettazione, dovrebbero essere presenti a concentrazioni non tollerabili biologicamente per ragioni osmotiche. Il restauro riguarda principalmente il materiale genetico, in quanto è importante che il DNA danneggiato venga velocemente riparato prima che il danno diventi una mutazione.

In generale, una sostanza, capace di ritardare o inibire significativamente l'ossidazione di un substrato presente a più alta concentrazione, si definisce *antiossidante*. Questi possono sia prevenire la formazione di radicali molto reattivi, quali l'ossidrile o l'ossigeno singoletto, sia intercettare una molecola radicalica interrompendo o rallentando una reazione a catena.

Appartengono alla classe degli antiossidanti sostanze a basso peso molecolare e sistemi enzimatici.

Il glutatione, l'acido ascorbico, l' α -tocoferolo e il Coenzima Q sono alcune delle sostanze a basso peso molecolare caratterizzate da proprietà antiossidanti.

Il **glutatione** (GSH), γ -glutamyl-cistein-glicina, è un tiolo a basso peso molecolare presente, in grande concentrazione, in tutte le cellule dei mammiferi (Meister et al, 1983).

La principale sorgente di produzione del GSH è il fegato, dal quale la sostanza viene trasferita nel plasma e nella bile mediante almeno due differenti sistemi di trasporto.

La funzione antiossidante del glutatione sembra fortemente legata alla sua struttura chimica, in particolare al gruppo tiolico che gli consente di cedere un atomo di idrogeno a composti ossidanti, quali il perossido di idrogeno, radicali superossido e idrossilico, formando il radicale tiolico (GS^\bullet). Questo, a sua volta può essere eliminato per dimerizzazione formando il glutatione ossidato (GSSG). Oltre a rimuovere specie reattive come OH^\bullet , la principale fonte di danno ossidativo, il GSH interviene in numerosi processi metabolici, fra cui il metabolismo dell'acido ascorbico, la detossificazione di xenobiotici, la comunicazione tra le cellule.

Essendo una molecola di grande importanza per il sistema di difesa antiossidante, il GSH è sottoposto ad un continuo turnover metabolico per cui presenta una emivita piuttosto breve che varia comunque a seconda delle specie e del tessuto considerati (Griffith et al, 1979).

L'**acido ascorbico**, è considerato il più importante antiossidante dei fluidi extracellulari dove è presente generalmente come ascorbato (AsC^-). Questo può reagire con H_2O_2 , in una reazione non radicalica, formando il radicale ascorbico, il quale è relativamente stabile grazie all'estesa delocalizzazione elettronica, ed inoltre può subire dismutazione ad ascorbato o deidroascorbato. L'ascorbico e il deidroascorbato possono successivamente essere riconvertiti ad ascorbato a spese del NADH o del GSH (Yu, 1994; Halliwell et al. 1998).

L'azione antiossidante dell'ascorbato è fortemente legata alla sua capacità di sostituire un radicale reattivo con uno molto meno reattivo. Sfruttando questa caratteristica, può proteggere le membrane biologiche spazzando i radicali perossidici nella fase acquosa prima che essi inizino la perossidazione lipidica.

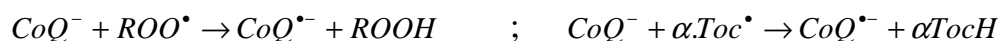
L' **α -tocoferolo** è un componente della vitamina E, termine con cui si indicano due gruppi di composti liposolubili, tocoferoli e tocotrienoli, caratterizzati da un anello aromatico con un ossidrile ed una catena isoprenoide laterale. I tocotrienoli si distinguono dai tocoferoli per la presenza di tre doppi legami nella catena isoprenoide. In ogni gruppo, gli omologhi differiscono nel numero e nella posizione dei gruppi metilici presenti sull' anello. L' α -tocoferolo, l'omologo più abbondante nei tessuti animali e con più elevata attività biologica, presenta tre gruppi $-\text{CH}_3$.

Data la sua elevata liposolubilità, esso si concentra nei siti idrofobici di membrane e lipoproteine dove svolge la funzione di chain-breaking, ovvero di interruttore della catena dei reazioni della per ossidazione (Burton et al., 1983). Donando l' atomo di idrogeno fenolico, infatti, può reagire con i radicali perossilici interferendo con le reazioni autocatalitiche della perossidazione. Nel processo, l' α -tocoferolo perde un elettrone per cui diviene a sua volta un radicale. L' α -tocoferile è tuttavia relativamente stabile essendo l' elettrone spaiato delocalizzato sull' anello aromatico. Il radicale neo formatosi può andare incontro a diversi destini: reagire con antiossidanti quali l'ubichinolo, il GSH o, soprattutto, l' ascorbato che lo riconvertono in α -tocoferolo, o reagire con un secondo perossile, o con un altro radicale, per formare un prodotto non radicalico. I prodotti della reazione possono facilmente subire idrolisi ed essere escreti nell' urina (Niki et al, 1995).

L' α -tocoferolo è particolarmente presente nelle membrane dei mitocondri e dei cloroplasti che sono particolarmente soggette ad attacco ossidativo. Sfruttando l'idrofobicità della sua catena laterale, si fissa nel doppio strato lipidico delle membrane dove protegge gli acidi grassi polinsaturi dai processi perossidativi spazzando i radicali perossilici e riducendo la fluidità delle membrane.

Coenzima Q o ubiquinone è un nome collettivo per un gruppo di composti liposolubili costituiti da un anello chinonico a cui sono legati da 30 a 50 atomi di carbonio come unità isoprenoidi. Il numero di unità isoprenoidi nella catena laterale varia da 6 a 10 e i membri del gruppo sono designati da una sottoscritta seguente la lettera Q ad indicare il numero di unità isoprenoidi nella catena laterale. Il coenzima Q si trova nella maggior parte delle cellule viventi e sembra essere particolarmente concentrato nei mitocondri. Esso può essere sintetizzato nelle cellule dei mammiferi, da intermedi della sintesi del colesterolo.

La forma ridotta dell'ubichinone (l'ubichinolo) può ridurre il radicale perossilico ad idroperossido interrompendo il processo della perossidazione lipidica. In effetti il Coenzima Q₆ e l'α-tocoferolo posseggono eguale capacità di inibire la perossidazione lipidica (Ernster et al., 1992). Tuttavia, l'ubichinolo sembra in grado di svolgere la sua azione antiossidante anche ripristinando l'α-tocoferolo (α-TocH) dal radicale α-tocoferile (α-Toc[•]) (Kagan et al., 1990).



La superossido dismutasi, la catalasi, la glutazione perossidasi e la glutazione riduttasi rappresentano i principali enzimi costituenti del sistema di difesa antiossidante.

La **superossido dismutasi** (SOD) è il primo enzima coinvolto nei meccanismi di riduzione parziale dell'O₂^{•-} e di difesa contro i suoi effetti dannosi. Ne esistono due forme: una Mn-dipendente, localizzata nella matrice mitocondriale (Fridovich, 1995), ed una Cu,Zn-dipendente, localizzata nello spazio fra le membrane mitocondriali e nel citosol (Okado-Matsumoto et al.,

2001). La funzione antiossidante della SOD è correlata alla sua capacità di prevenire l'azione diretta del superossido convertendolo in perossido di idrogeno. Affinché la protezione sia efficace è, tuttavia, necessario che l' H_2O_2 sia immediatamente convertita in H_2O . Tale reazione è possibile grazie all'azione di altri enzimi: la catalasi (CAT) e la glutatione per ossidasi (GPX).

La **catalasi** è un enzima costituito da 4 subunità, presente nella maggior parte degli organismi aerobi, con un'attività particolarmente elevata nel fegato, nel rene e negli eritrociti. Ciascuna delle sue subunità contiene un gruppo eme che sembra svolgere un ruolo importante nell'attività catalitica. La sua funzione infatti consiste nel trasformare l' H_2O_2 in acqua mediante due reazioni che vedono l'intervento del Fe^{3+} legato all'eme (Yu, 1994).

La **glutazione perossidasi** è costituita da 4 subunità che legano un atomo di selenio. La sua distribuzione nei tessuti è generalmente opposta a quella della catalasi ma in generale l'enzima è comunque ampiamente presente negli organismi viventi. La sua azione consiste nel rimuovere perossido di idrogeno o diperosidi organici a spese del GSH che utilizza come substrato da ossidare (Flohé, 1982). In entrambi i casi, si ottiene come prodotto di reazione il GSSG che può essere riconvertito a GSH mediante l'intervento della glutatione riduttasi.

La funzione principale dell'enzima **glutazione riduttasi** consiste nel mantenimento del rapporto intracellulare GSH/GSSG ad un livello maggiore di 10:1. La reazione utilizza come riducente il NADPH prodotto nel ciclo dei pentoso-fosfati (Flohé, 1982).

Stress ossidativo

Da quanto fino ad ora detto, la sopravvivenza degli organismi aerobi risulta fortemente condizionata da una complessa interazione tra le sostanze ossidanti, che ne minacciano l'omeostasi, e l'azione del sistema di difesa antiossidante che ne previene, riduce o ripara l'effetto.

In condizione di normalità, esiste un equilibrio tra proossidanti ed antiossidanti che può però essere compromesso in diverse condizioni. Infatti, quando l'azione dei radicali liberi supera le capacità antiossidanti, insorge uno stato noto come stress ossidativo il quale può portare alla morte cellulare. (Sies, 1991).

Recenti progressi negli studi di biologia cellulare hanno rivelato che, quando i sistemi di difesa antiossidante non sono in grado di contrastare l'insorgenza dello stress ossidativo, sono attuati meccanismi di morte cellulare programmata come ultima linea di difesa dei tessuti.

In effetti, la morte per apoptosi, che si verifica in cellule di tutti i tipi di eucarioti multicellulari, può essere innescata da condizioni di stress dell'ambiente cellulare. La prima fase del processo è rappresentata dal danno ossidativo mitocondriale che origina segnali in grado di innescare il fenomeno apoptotico. Una delle strutture mitocondriali coinvolte nel controllo dell'apoptosi è il poro di transizione di permeabilità (PT) (Zoratti et al., 1995). Questo è un complesso multiproteico dinamico posto a contatto tra le membrane interna ed esterna mitocondriale. Il poro partecipa alla regolazione del Ca^{2+} , del pH, del volume e del potenziale transmembranario. L'apertura del poro è indotta da un'elevata concentrazione di Ca^{2+} , nella matrice mitocondriale. Tuttavia, la sensibilità al Ca^{2+} è aumentata da una serie di induttori tra cui le ROS. Quando il poro si apre, gli ioni possono diffondere, dissipando così il gradiente protonico attraverso la membrana

interna. Le conseguenze riguardano un' acidificazione del citosol ed un disaccoppiamento della catena di trasporto con conseguente cessazione della sintesi di ATP. Inoltre si assiste ad una espansione del volume della matrice dovuta ad una condizione di iperosmolarità che causa la rottura della membrana esterna ed il conseguenziale rilascio nel citosol di proteine, dello spazio intermembranario, che sono essenziali per la fase di esecuzione dell'apoptosi. Queste perturbazioni nello stato bioenergetico, nell'equilibrio redox e nell'omeostasi ionica risultano quindi letali per la cellula (Halestrap, 2009).

Lo stress ossidativo può essere indotto sia da un incremento della produzione di ROS sia da una riduzione nell'efficienza del sistema di difesa antiossidante. Diversi fattori possono portare all'insorgenza di una condizione di stress ossidativo provocando un incremento della produzione di ROS.

Fra questi:

- i. l'esposizione ad agenti ionizzanti, fumo di sigaretta, xenobiotici, quali cloroformio e tetracloruro di carbonio;
- ii. la riperfusione di un tessuto precedentemente sottoposto ad ischemia;
- iii. risposta infiammatoria ad un danno tissutale;
- iv. stati ipermetabolici, caratterizzati da un aumentato flusso di O_2 a livello cellulare, fra cui quello che si instaura durante l'esecuzione di un esercizio fisico acuto o negli stati di ipertiroidismo.

Stress Ossidativo nell'ipertiroidismo

Ormoni tiroidei

Come è ben noto, circa il 90% del prodotto della secrezione della ghiandola tiroide è sotto forma di tiroxina (T_4). Tuttavia, la maggior parte della T_4 secreta viene convertita in triiodotironina (T_3) per rimozione di uno dei suoi atomi di iodio catalizzata da enzimi deiodinasi. Circa l'80% della T_3 circolante deriva da questo processo, che si verifica in tessuti periferici, particolarmente fegato e rene. Benché la concentrazione ematica della T_3 rimanga notevolmente più bassa di quella della T_4 , la sua attività biologica è molto più elevata per cui essa rappresenta la principale forma attiva dell'ormone tiroideo a livello cellulare.

Funzioni degli ormoni tiroidei

Le funzioni degli ormoni tiroidei possono essere divise in due gruppi: quelle riguardanti la crescita e lo sviluppo(1) e quelle riguardanti la regolazione del metabolismo(2).

1) La tiroide è essenziale per il normale sviluppo di tutti i mammiferi e di molti animali inferiori. La capacità degli ormoni tiroidei di servire da segnale per la crescita e la differenziazione è dimostrata in modo particolarmente evidente nel processo della metamorfosi degli anfibi (Galton, 1983). Nella trasformazione da girino a rana, gli impressionanti cambiamenti morfologici (riassorbimento della coda, sviluppo del fegato) sono accompagnati da fondamentali trasformazioni biochimiche (sintesi degli enzimi del ciclo dell'urea, conversione dell'emoglobina da fetale ad adulta, cambiamenti dei pigmenti retinici ed aumento delle idrolasi lisosomiali). Il fatto che il processo è largamente dipendente dagli ormoni tiroidei è dimostrato dall'osservazione che, nei girini tiroidectomizzati, sebbene la crescita continui, non si assiste a metamorfosi e ottenendo, alla fine, girini giganti. Per contro, la prematura somministrazione di ormone tiroideo può dare origine a rane in miniatura.

Nei mammiferi, il deficit di ormone tiroideo compromette sia la crescita fisica che il differenziamento tessutale, ma i due effetti sono dovuti a meccanismi differenti (Schwartz, 1983). Il rallentamento della crescita fisica è in parte dovuto alla mancanza dell'ormone della crescita, la cui sintesi e secrezione sono dipendenti dall'ormone tiroideo. Viceversa, gli effetti sul differenziamento dei tessuti, che comprendono il rimodellamento osseo, il normale sviluppo delle epifisi e della muscolatura scheletrica e la maturazione del sistema nervoso centrale sono probabilmente diretti. Nell'uomo, l'ipotiroidismo neonatale può produrre danno celebrale irreversibile e ritardo mentale.

Di particolare interesse è l'influenza della triiodotironina sullo sviluppo dei muscoli scheletrici. E' noto che un normale funzionamento della tiroide è molto importante per la differenziazione delle caratteristiche biochimiche e contrattili dei muscoli. Tradizionalmente le fibre dei muscoli scheletrici sono classificate in tre gruppi in base alla velocità di contrazione e al tipo di meccanismo enzimatico che usano principalmente per la formazione di ATP: *fibre ossidative lente* (tipo I); *fibre ossidative rapide* (tipo IIa); *fibre glicolitiche rapide* (tipo IIb). Le fibre muscolari a contrazione rapida sviluppano tensione due o tre volte più velocemente delle fibre a contrazione lenta. La velocità di contrazione di un muscolo è determinata dall'isoforma di miosina presente nei filamenti spessi. In effetti, le fibre a contrazione rapida presentano un'attività ATPasica miosinica più elevata di quella delle fibre lente. La capacità della miosina di far fronte a differenti richieste funzionali, ovvero contrazioni rapide o lente, è da ricercarsi nell'esistenza di molteplici isoforme sia della catena pesante (MHC) che della catena leggera (MLC). Piccole differenze nella sequenza aminoacidica di queste ultime danno origine a differenti proprietà strutturali e funzionali. Nei mammiferi sono state isolate otto differenti isoforme della catena pesante della miosina che si combinano

con varie isoforme della catena leggera della miosina in modo da generare numerose isoforme di miosina che si differenziano per la loro attività ATP-asi (Buckingham et al., 1986).

Anche la durata della contrazione varia in base al tipo di fibra. La durata di ogni scossa è determinata soprattutto dalla velocità di rimozione del Ca^{2+} dal citoplasma da parte del reticolo sarcoplasmatico. Le fibre a contrazione rapida pompano Ca^{2+} nel reticolo sarcoplasmatico più rapidamente di quelle a contrazione lenta, per cui hanno scosse di minore durata.

Un'altra importante differenza esistente tra i vari tipi di fibre muscolari è costituita dal tipo di macchinario enzimatico di cui dispongono per sintetizzare *ATP*. Le fibre a scossa lenta ad alta attività ossidativa sono caratterizzate da una più elevata capacità per la fosforilazione ossidativa e contengono più mitocondri, mentre l'attività degli enzimi glicolitici è relativamente bassa. Esse contengono una proteina di colore rosso, chiamata mioglobina e vengono spesso indicate come *fibre rosse*. Una ulteriore caratteristica è la loro notevole resistenza alla fatica.

Le fibre rapide a bassa attività ossidativa posseggono un patrimonio enzimatico che è destinato alla utilizzazione del glucosio e della via glicolitica per la produzione della maggior parte del loro *ATP*. Queste fibre contengono pochi mitocondri ed hanno un alto contenuto di enzimi glicolitici. Poiché contengono poca mioglobina vengono spesso indicate come *fibre bianche*. Inoltre esse hanno una bassa resistenza alla fatica.

Le fibre a scossa rapida e ad alta attività ossidativa hanno proprietà intermedie tra quelle degli altri due tipi.

L'ormone tiroideo esercita un controllo sui geni che codificano per la MHC durante lo sviluppo dei muscolo scheletrici (Rubinstein et al., 1988). In

particolare è stato mostrato che la normale transizione dalla isoforma MHC_{neo} alla isoforma $MHC_{adult-fast}$ richiede la presenza dell'ormone tiroideo.

2) L'ormone tiroideo esercita un marcato effetto sul metabolismo dell'intero organismo. Esso è, infatti, il più importante regolatore della velocità del consumo di O_2 e della spesa energetica in condizioni di riposo da parte dell'organismo. Strettamente correlata con l'azione metabolica dell'ormone tiroideo è la sua azione calorigena. Quasi tutti i tessuti partecipano all'aumento della produzione di calore. Le principali eccezioni sono rappresentate dai testicoli, dalla milza e (negli adulti) dal cervello (Guernsey et al., 1983). Oltre ad aumentare il metabolismo basale generale, l'ormone tiroideo modula la velocità di molte reazioni specifiche che intervengono nel metabolismo intermedio, ovvero dei substrati metabolici, carboidrati, lipidi e proteine. Le azioni dell'ormone tiroideo sui substrati metabolici hanno molteplici aspetti. Non soltanto esso è in grado di influenzare la sintesi e la degradazione dei carboidrati, dei lipidi e delle proteine, ma quantità diverse dell'ormone possono indurre azioni opposte. Così, quantità adeguate di ormone tiroideo sono essenziali per la sintesi proteica necessaria per la crescita corporea normale, mentre dosi elevate, come nell'ipersecrezione tiroidea, favoriscono la degradazione delle proteine.

Sebbene i meccanismi molecolari, che sono alla base della calorigenesi tiroidea non siano completamente compresi, è ampiamente condivisa l'idea che la regolazione del metabolismo energetico da parte dell'ormone tiroideo sia ottenuta attraverso azioni a breve e a lungo termine. Variazioni fisiologiche nelle richieste energetiche sono soddisfatte mediante un meccanismo a breve termine mediato dalla 3,5-diiodotironina, un derivato della T_3 , che porta alla attivazione allosterica della citocromo ossidasi (Moreno et al., 2002), mentre effetti a lungo termine dell'ormone tiroideo o

stati che modulano l'attività della tiroide (esposizione a freddo, invecchiamento, cambiamenti dietetici) sono dipendenti da variazioni indotte dalla T_3 nell'espressione genica nucleare e mitocondriale (Yen, 2001) che portano ad una biogenesi dei componenti dell'apparato respiratorio mitocondriale. Il risultante aumento della capacità della fosforilazione ossidativa e del rifornimento di ATP è parzialmente compensato mediante una parallela diminuzione nell'efficienza della sintesi di ATP dovuta al disaccoppiamento legato al forte aumento dell'espressione delle UCP in diversi tessuti (Videla, 2000).

La richiesta di una più elevata perfusione da parte dei tessuti in cui è indotto un aumento del metabolismo energetico, è soddisfatta dall'aumento della frequenza e della contrattilità cardiaca provocato dallo ormone tiroideo (Kahaly et al., 2005). Questi effetti sono ottenuti mediante una azione diretta della T_3 sul muscolo cardiaco ed una azione indiretta mediata dal potenziamento della risposta del tessuto alle catecolamine (*adrenalina e noradrenalina*) prodotte nel cervello, nelle terminazioni nervose del sistema simpatico e nella midollare del surrene (Bilezikian et al., 1983).

È noto da tempo che l'effetto cronotropo diretto è esercitato dall'ormone tiroideo attraverso una modulazione delle proprietà elettrofisiologiche del cuore. RegISTRAZIONI con elettrodi intracellulari dal nodo senoatriale del coniglio (Johnson et al. 1973) e da preparati ventricolari di diversi mammiferi (Sharp et al., 1985; Binah et al., 1987; Di Meo et al., 1991) mostrarono che gli ormoni tiroidei sono in grado di modulare la durata del potenziale di azione. Minori informazioni sono disponibili sui meccanismi dell'azione ormonale sulla elettrofisiologia cardiaca. L'effetto tardivo della T_3 sulla durata del potenziale di azione ventricolare (Di Meo et al., 1991) e la stretta relazione trovata tra potenza di spostamento del legame nucleare ed effetti elettrofisiologici delle iodotironine (Di Meo et al., 1997) suggerirono un

meccanismo nucleare anche per la modulazione delle proprietà elettrofisiologiche del miocardio. Tale meccanismo è probabilmente alla base dell'aumento di una corrente del potassio che accelera il declino del potenziale d'azione (Shimoni et al., 1995).

La T_3 porta anche ad un aumento dell'espressione dell'mRNA che codifica per i canali rianodinici (i canali del calcio) del reticolo sarcoplasmatico (Arai et al., 1991). L'aumentato numero di canali rianodinici porta ad un aumento del rilascio del calcio dal reticolo durante la sistole e rende conto dell'aumentata attività contrattile sistolica del cuore indotta dalla T_3 .

La T_3 aumenta anche la trascrizione del gene α della MHC e diminuisce la trascrizione del gene β della MHC, provocando un aumento della miosina V1 (contenente due MHC α) e una diminuzione della miosina V3 (contenente due MHC β) (Morkin, 1993). La miosina V1 ha una attività ATPasica più elevata della miosina V3, per cui la sua prevalenza conduce ad un più rapido movimento della testa globulare della miosina lungo il filamento sottile con un risultante aumento della velocità della contrazione.

La T_3 conduce altresì ad un aumento della velocità del rilassamento diastolico causando un più efficiente trasporto attivo del calcio nel reticolo sarcoplasmatico. Questo effetto della T_3 deriva da un aumento, indotto dall'ormone, nei livelli di mRNA che codifica per l'ATPasi che trasporta il calcio nel reticolo, che porta, ad un maggior numero di pompe del calcio nel reticolo (Periasamy et al., 2008).

Anche l'espressione delle isoforme della MHC nel muscolo scheletrico del ratto adulto è sensibile all'ormone tiroideo. Tuttavia, lo stesso gene MHC in differenti muscoli può rispondere abbastanza differentemente all'ormone tiroideo. Così, è probabile che l'ormone tiroideo influenzi l'espressione della MHC in una maniera muscolo-specifica (Izumo et al., 1986).

Ipertiroidismo

Le anomalie della funzionalità tiroidea sono fra i disordini endocrini più comuni. Uno stato di ipertiroidismo è legato ad una ipersecrezione della tiroide. Questa condizione patologica può essere dovuta a varie cause specifiche. Tuttavia, qualunque sia la causa, le conseguenze della ipersecrezione di ormone tiroideo sono in gran parte prevedibili in base alla conoscenza delle funzioni dell'ormone tiroideo. Il soggetto ipertiroidico ha un metabolismo basale elevato. Il conseguente aumento della termogenesi determina eccessiva sudorazione e scarsa tolleranza al calore. Nonostante l'aumento della assunzione di cibo, la massa corporea diminuisce poiché l'organismo brucia combustibili metabolici ad una velocità troppo elevata. Da ciò deriva una degradazione netta delle riserve di carboidrati, lipidi e proteine. La perdita di proteine del muscolo scheletrico causa deterioramento e debolezza muscolare. Nell'ipertiroidismo clinico, i muscoli dei pazienti mostrano una diminuzione della grandezza delle fibre muscolari e occasionali variazioni degenerative (Korenyi-Both et al., 1981). Analoghe modificazioni sono state descritte nei muscoli di topi tireotossici (Kazakov et al., 1986). Le modificazioni degenerative includono una diminuzione nelle striature, degenerazione grassa, necrosi e incremento del numero dei nuclei sarcolemmali. Indagini ultrastrutturali hanno evidenziato un accumulo di grossi mitocondri nello spazio subsarcolemmale (Angeras et al., 1986). Indagini elettrofisiologiche hanno dimostrato che l'ipertiroidismo influenza le proprietà contrattili e la resistenza alla fatica del muscolo scheletrico con un coinvolgimento preferenziale dei muscoli di tipo I (Fitts et al., 1984).

All'ipertiroidismo sono associate varie alterazioni cardiovascolari, causate sia dalle azioni dirette dell'ormone tiroideo sia dalle sue interazioni con le catecolammine. Gli effetti cardiovascolari comprendono tachicardia sinusale,

ipertensione sistolica, alterazioni delle funzioni sistolica e diastolica del ventricolo sinistro, modificazioni della resistenza vascolare periferica, e la predisposizione alle disritmie, in particolare alla fibrillazione atriale (Klein et al., 2001). La frequenza e la forza della contrazione cardiaca possono aumentare ad un livello tale che il soggetto ha palpitazioni. Nei casi gravi, il cuore può non riuscire a soddisfare le richieste metaboliche dell'organismo nonostante l'aumento della gittata cardiaca.

Inducendo un aumento delle pompe del calcio nel reticolo sarcoplasmatico, la T_3 porta ad un aumento del consumo di ATP nel cuore. Inoltre, l'energia chimica dell'ATP è usata di meno a scopi contrattili e una maggiore quantità di essa è dissipata sotto forma di calore. Questo causa una diminuita efficienza del processo contrattile nel cuore di animali ipertiroidi.

Prima dell'avvento di trattamenti efficaci per l'ipertiroidismo serie complicazioni epatobiliari, comprendenti necrosi epatica centro lobulare e cirrosi (Weller, 1933), furono associate con la malattia. È stato proposto che questa associazione poteva coinvolgere:

- i) un danno epatico secondario alle azioni sistemiche di un eccesso di ormone tiroideo;
- ii) effetti dell'ormone tiroideo attraverso meccanismi autoimmuni;
- iii) effetti tossici diretti dell'ormone tiroideo sul fegato (Vassilopoulou-Sellin et al., 1996).

Stress ossidativo nei tessuti ipertiroidei

Asayama e Kato mostrarono vari modelli di danno muscolare in cui si riteneva che le ROS svolgessero un ruolo chiave. Poiché i muscoli di animali ipertiroidei evidenziavano variazioni biochimiche simili, essi proposero che le ROS contribuivano al danno muscolare causato dagli ormoni tiroidei (Asayama et al., 1990). D'altra parte studi di altri autori hanno suggerito che le ROS svolgono un ruolo, non solo nelle miopatie e nelle cardiomiopatie tireotossiche, ma anche nelle disfunzioni indotte dagli ormoni tiroidei in altri distretti corporei (Videla, 2000; Venditti et al., 2006).

Sebbene attualmente non vi siano ancora prove dirette che la disfunzione di alcuni tessuti degli animali ipertiroidei sia mediata dalle ROS, un numero notevole di studi attesta che l'ipertiroidismo induce uno stato di stress ossidativo nei tessuti bersaglio dell'ormone tiroideo.

Danno ossidativo

Gli effetti ormonali sul danno ai lipidi di membrana, sono stati analizzati in diversi laboratori attraverso la valutazione di indicatori dell'estensione dei processi perossidativi. Gli indicatori principalmente usati sono stati i livelli delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS) e degli idroperossidi lipidici. Incrementi di entrambi i parametri sono stati osservati in fegati di ratti resi ipertiroidei mediante somministrazione di T₃ (Fernández et al, 1985; Venditti P. et al, 1997; Huh et al, 1998) .

Aumenti dei processi perossidativi, indotti dagli ormoni tiroidei, sono stati osservati anche nel cervello di ratti giovani ed adulti (Adamo et al, 1989; Das et al, 2004) e negli omogenati di cuore di giovani ratti (Venditti et al., 1997; Venditti et al., 1998; Civelek et al, 2001).

L'incremento della perossidazione lipidica, determinata dai livelli di TBARS, non è stato trovato in tutti i muscoli. Infatti, aumenti di tale indice sono stati

osservati nel soleo (Asayama et al., 1987; Zaiton et al., 1993) e nel gastrocnemio (Venditti et al., 1997; Seymen et al., 2004) di animali resi sperimentalmente ipertiroidei, mentre nessuna variazione è stata trovata nel digitorum longus (Asayama et al., 1987; Zaiton et al., 1993).

L'ipertiroidismo promuove anche l'ossidazione delle proteine tessutali, come dimostrato dall'aumento del contenuto di carbonili legati alle proteine nel fegato (Tapia et al., 1999) e nei testicoli (Choudhury et al., 2003).

Produzione di ROS e RNS

La capacità di indurre uno stress ossidativo mostrata dallo stato ipertiroideo è legata ad un incremento nella produzione di specie radicaliche dell'ossigeno e dell'azoto. L'ormone tiroideo, infatti, causa, nei ratti, un significativo aumento dell'attività delle ossido nitrico sintetasi (NOS), l'enzima che catalizza la sintesi dell'ossido nitrico, in tessuti quali il fegato (Fernández et al., 1997) e il cuore (Masullo et al., 2000) e aumenta l'espressione genica di tale enzima a livello dell'ipotalamo (Ueta et al., 1995). Numerosi lavori hanno sottolineato la capacità dell'ormone di incrementare la produzione di ROS mitocondriale. In particolare, particelle submitocondriali di fegati di ratti trattati con T_3 esibiscono un aumento nella produzione del radicale superossido, supportata dal succinato o dal NADH, e di H_2O_2 supportata da succinato (Fernández et al., 1993).

Un aumento nella produzione di H_2O_2 è stata anche osservata in mitocondri intatti, isolati da fegato (Venditti et al., 2003a), muscolo gastrocnemio (Venditti et al., 2003b) e cuore (Venditti et al., 2003c) di ratti giovani ipertiroidei, in presenza di substrati legati al complesso I o al complesso II. La velocità di rilascio di H_2O_2 aumentava nei mitocondri di fegato e di cuore sia durante lo stato basale della respirazione che durante lo stato stimolato

dall'aggiunta di ADP. Nei mitocondri isolati dal muscolo invece, l'incremento si registrava solo durante la respirazione basale.

Informazioni relative ai principali siti di generazione di ROS e su come questi siano modificati dall'alterazione dello stato tiroideo sono state ottenute dall'analisi degli effetti degli inibitori respiratori e dei substrati sulla produzione di H_2O_2 . I risultati di tali analisi suggeriscono che:

- i) In tutti gli stati tiroidei, il piruvato/malato è un substrato più efficiente del succinato per la produzione di H_2O_2 nel fegato (Venditti et al., 2003a), nel muscolo (Venditti et al., 2003b) e nel cuore (Venditti et al., 2003c).
- ii) Nel fegato, sia nello stato eutiroideo che in quello ipertiroideo, il principale sito di generazione del radicale superossido è localizzato nel Complesso I (Venditti et al., 2003a).
- iii) Nel cuore, in tutti gli stati tiroidei, il principale sito di generazione del radicale superossido si trova nel complesso III (Venditti et al., 2003c).
- iv) Nel muscolo, in tutti gli stati tiroidei, non sembra esserci un sito principale per la produzione del radicale superossido (Venditti et al., 2003b).

Capacità antiossidanti

Come precedentemente sottolineato, una condizione di stress ossidativo si verifica in seguito ad uno squilibrio tra la produzione di ROS e la capacità del sistema di difesa antiossidante. Quindi, è lecito domandarsi se allo stress ossidativo indotto dall'ipertiroidismo contribuisca una riduzione dell'efficienza del sistema di difesa antiossidante dei tessuti. A tale proposito, diversi ricercatori hanno evidenziato una variabilità tessuto-dipendente dell'effetto dell'ipertiroidismo delle attività degli enzimi antiossidanti e dei livelli degli scavengers a basso peso molecolare (Venditti et al., 2006). D'altra parte la determinazione della capacità antiossidante totale dei tessuti ha evidenziato che l'ipertiroidismo causa, nel ratto, un significativo decremento

della capacità antiossidante totale del fegato e del cuore ma non del muscolo gastrocnemio (Venditti et al., 2006).

Strategie contro lo stress ossidativo indotto dall'ormone tiroideo

Integrazione antiossidante

La strategia di elezione per contrastare lo stress ossidativo indotto da varie condizioni fisiopatologiche è l'integrazione dietetica con sostanze dotate di proprietà antiossidanti. Questa strategia si è mostrata efficace anche nel combattere lo stress ossidativo indotto dall'ipertiroidismo. Così, Asayama e suoi collaboratori (Asayama et al., 1987) mostrarono che la somministrazione di vitamina E era in grado di prevenire i processi perossidativi nei muscoli di ratti ipertiroidici. Studi successivi hanno dimostrato che la somministrazione di vitamina E causa anche una riduzione del danno ossidativo di omogenati di fegato di ratto nell'ipertiroidismo sperimentale (Venditti et al., 1999), indotto da trattamento con T₃, e nell'ipertiroidismo funzionale (Venditti et al., 2007), indotto da esposizione al freddo.

Allenamento fisico

Numerosi studi, condotti nelle ultime due decadi, indicano che l'esercizio acuto causa, nel muscolo scheletrico, un incremento nella produzione di radicali ed altre specie reattive dell'ossigeno che provoca una condizione di stress ossidativo (Ji LL, 1995). Alcuni studi hanno evidenziato che anche la durata della prestazione muscolare è dipendente dalla produzione di radicali in quanto essa può essere aumentata mediante integrazione antiossidante (Novelli et al., 1990). D'altra parte, è anche ben stabilito che l'esercizio cronico (training) aerobico opportunamente graduato induce, negli animali, adattamenti che permettono la durata dell'attività per un lungo periodo di

tempo prima che i segnali legati alla fatica diventino limitanti. Diversi studi hanno evidenziato che uno dei meccanismi attraverso cui l'allenamento aumenta la durata della prestazione è il potenziamento delle difese antiossidanti del tessuto. Tale potenziamento pare correlato alla durata ed all'intensità dell'esercizio, ed è fibra-specifico. Così, sebbene in generale il training promuova un aumento dell'attività della SOD e della GPX nei muscoli scheletrici (Caillaud et al., 1999), sembra che il training di intensità più elevata sia più efficace nell'aumentare le attività della SOD e della GPX. Inoltre, l'aumento indotto dal training nell'attività degli enzimi antiossidanti è limitato ai muscoli scheletrici ad alta capacità ossidativa (Power et al., 1999).

Il GSH svolge un ruolo chiave nel mantenimento dello stato redox intracellulare e della funzione di enzimi antiossidanti durante l'esercizio cronico. L'allenamento regolare migliora le capacità antiossidanti nei muscoli scheletrici attivi aumentando i livelli di GSH (Caillaud et al., 1999). L'aumento nei livelli di GSH è spiegabile con l'incremento dell'abilità del tessuto sia di sintetizzare il composto sia di prelevarlo dal sangue.

Alcuni risultati suggeriscono che l'aumento indotto dall'allenamento nella capacità antiossidante dei muscoli scheletrici è fisiologicamente significativo poiché i muscoli di animali allenati subiscono un minor danno ossidativo in seguito ad un attacco ossidativo *in vitro* (Venditti et al., 1996; Venditti et al., 1997). Inoltre, il danno ossidativo che tali muscoli subiscono durante un esercizio acuto si verifica più lentamente per cui è allungato il tempo richiesto affinché la funzione cellulare sia sufficientemente danneggiata da rendere impossibile il proseguimento dell'esercizio (Venditti et al., 1996; Venditti et al., 1997).

Scarse informazioni sono disponibili sugli effetti dell'allenamento sulla capacità dei mitocondri di produrre specie reattive dell'ossigeno. Tuttavia, uno studio ha evidenziato che il rilascio mitocondriale di H_2O_2 , sostenuto da succinato, è più basso nei muscoli di ratti allenati che in quelli di ratti sedentari sia durante lo Stato 4 che lo Stato 3 (Venditti et al., 1999). Questa diminuzione sembra dipendere dalla caduta indotta dal training nel potenziale di membrana mitocondriale. Tuttavia, questo effetto non è dovuto ad un aumento del livello delle proteine disaccoppianti mitocondriali, poiché in presenza di GDP, un inibitore delle UCP, l'aumento del potenziale di membrana e il rilascio di H_2O_2 è più grande nei ratti sedentari che in quelli allenati.

Scopo della tesi

I risultati precedentemente esposti suggeriscono che le modificazioni adattative, promosse dall'esercizio cronico, in grado di proteggere il tessuto muscolare dallo stress ossidativo legato all'esercizio acuto comprendono una induzione di enzimi antiossidanti ed una diminuzione della capacità dei mitocondri di produrre ROS. E' quindi concepibile che l'allenamento possa anche proteggere i muscoli dal danno ossidativo indotto dall'ormone tiroideo.

Questo lavoro si propone di studiare gli effetti di un programma di nuoto, della durata di 10 settimane, sullo stress ossidativo indotto dal trattamento con ormone tiroideo nel muscolo scheletrico di ratto. A tale scopo sono state determinate le capacità respiratorie, i livelli dei marker di danno ossidativo e di componenti del sistema di difesa antiossidante, la suscettibilità agli ossidanti e la produzione di H_2O_2 . Per tali determinazioni sono stati utilizzati omogenati e mitocondri isolati dal muscolo gastrocnemio di ratto. La scelta di tale muscolo è dovuta al fatto che esso è fortemente coinvolto durante il nuoto. Inoltre, nel ratto l'ormone tiroideo provoca aumenti della perossidazione lipidica nel soleo, un muscolo rosso composto prevalentemente di fibre a scossa lenta ad alta attività ossidativa (tipo I) ma non nell'estensore lungo delle dita, un muscolo bianco composto prevalentemente da fibre glicolitiche a scossa rapida (tipo IIb). Il gastrocnemio è un muscolo a fibre miste che contiene anche fibre a scossa rapida e ad alta attività ossidativa (tipo IIa) e può, perciò fornire un quadro più accurato della risposta muscolare all'ormone tiroideo. D'altra parte, poiché la modulazione, operata dal training, nell'attività degli enzimi

antiossidanti è limitata ai muscoli scheletrici ad alta capacità ossidativa, il gastrocnemio rappresenta il modello più opportuno per ottenere informazioni riguardante la risposta della muscolatura scheletrica adattativa in ratti allenati e sedentari all'attacco promosso dall' ormone tiroideo.

Materiali e metodi

Materiali

Tutte le sostanze chimiche usate (Sigma Chimica, Milano, Italia) furono del più alto grado di purezza disponibile. La risposta allo stress ossidativo fu determinata usando reagenti e strumentazione dell' Amerlite System commercialmente disponibile (Ortho-Clinical Diagnostics, Milano, Italia).

I livelli sierici della triiodotironina libera (FT₃) e della tiroxina libera (FT₄) furono determinati usando un kit RIA commerciale (DiaSorin, Salluggia, Italia).

Animali

Ratti Wistar maschi dell'età di 50 giorni, forniti dalla Nossan (Correzzana, Italia) furono divisi a caso in animali sedentari ed allenati. Il nuoto, usato come esercizio per i ratti allenati, fu effettuato 5 giorni alla settimana per 10 settimane. Nella prima settimana i ratti nuotarono per 15 minuti al giorno per familiarizzare con l'immersione in acqua. Nella seconda settimana, la sessione di allenamento durò 50 minuti, e dalla terza alla decima settimana i ratti nuotarono per 60 minuti al giorno.

Il nuoto fu effettuato in un contenitore di plastica dell'altezza di 100 cm, riempito fino a 45 cm dal bordo con acqua mantenuta ad una temperatura di 35°C. Durante le sessioni di nuoto, gli animali sedentari furono tenuti in una piccola camera contenente circa 3 cm di acqua mantenuta a 35°C.

Dieci giorni prima della fine del programma di allenamento, metà dei ratti allenati e metà di quelli sedentari furono resi ipertiroidei mediante trattamento con iniezioni giornaliere intraperitoneali di triiodotironina (10 µg per 100 g di massa corporea). Così, vi furono quattro gruppi di ratti: eutiroidei sedentari (ES), eutiroidei allenati (ET), ipertiroidei sedentari (HS) e ipertiroidei allenati (HT). Ciascun gruppo fu costituito da otto animali.

Tutti i ratti furono sottoposti alle stesse condizioni (uno per gabbia, ciclo circadiano artificiale costante di 12 ore di luce e 12 ore di buio, e 50±10 % di umidità relativa) e furono nutriti con la stessa dieta, un alimento commerciale per ratti fornito dalla Nossan , e bevvero acqua *ad libitum*.

Il trattamento degli animali in questi esperimenti fu in accordo con le linee guida fissate dalla University's Animal Care Review Committee.

Preparazione dei tessuti

Ventiquattro ore dopo la fine del programma di allenamento, a circa 120 giorni di età, tutti gli animali, anestetizzati con etere, furono sacrificati per decapitazione. Campioni di sangue arterioso furono raccolti e successivamente analizzati per determinare i livelli plasmatici di FT₃ e FT₄ mediante dosaggio radioimmunologico. I muscoli (gastrocnemio) furono rapidamente prelevati e posti in un mezzo di omogenizzazione (HM) raffreddato con ghiaccio (mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM, EDTA 1 mM, albumina priva di acidi grassi 0,1%, Tris 10 mM, pH 7,4). Poi i muscoli furono privati del grasso extracellulare e del tessuto connettivo, pesati, finemente tagliuzzati e lavati con HM. Frammenti di tessuto furono incubati per 5 minuti con HM contenente 0.1 mg/ml di nagarse, lavati e omogenizzati in HM (20% w/v) per 1 minuto ad una velocità di 500 rpm, usando un

omogeneizzatore di vetro Potter-Elvehjem. Aliquote degli omogenati furono usate per i procedimenti analitici e la preparazione delle frazioni mitocondriali.

Preparazione dei mitocondri

Gli omogenati, diluiti 1:1 con HM, furono privati dei nuclei e dei frammenti cellulari mediante centrifugazione a 500 *g* per 10 minuti a 4°C. I risultanti supernatanti furono centrifugati a 3.000 *g* per 10 minuti. I sedimenti mitocondriali furono risospesi in un tampone di lavaggio (WB) (mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM, EGTA 1 mM, Tris 20 mM, pH 7,4) e centrifugati alla stessa velocità di sedimentazione. I preparati mitocondriali furono lavati in questa maniera due volte prima della sospensione finale in WB. Le proteine mitocondriali furono misurate 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 nel 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.

Consumo di Ossigeno

L'attività respiratoria nei mitocondri isolati fu misurata con un metodo polarografico, che prevede l' utilizzo di un respirometro dotato di elettrodo di Clark (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, USA). Tale elettrodo 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. Questo può quindi diffondere dal campione, posto nella camera di misura, al catodo che lo riduce utilizzando 4 elettroni prodotti dall' anodo. Il trasferimento di elettroni genera una corrente che viene letta da un computer collegato all' apparecchio. Applicando agli elettrodi un voltaggio di 0,5–0,8 volts, e mantenendo la temperatura costante durante le letture, la corrente registrata dipende solo dalla concentrazione di ossigeno presente nella camera di misura. Variazioni di tale concentrazioni sono espresse in termini di variazioni di pendenza della curva disegnata sul computer.

Le nostre misurazioni furono effettuate a 30°C, ponendo il campione in una camera termostata, ed utilizzando un mezzo di incubazione contenente KCl 145 mM, MgCl₂ 3 mM, Hepes 30 mM, EGTA 0,1 mM, KH₂PO₄ 5 mM, a pH 7,4 e albumina serica bovina (BSA) allo 0,1%.

La quantità di campione usata per ogni lettura fu di 25 µl di omogenato 1:5 o 0,2 mg/ mL di proteine mitocondriali.

L'aggiunta del campione in soluzione determina un temporaneo decremento della concentrazione di ossigeno in soluzione dovuto al consumo dei substrati endogeni (*Fase1*). Dopo la stabilizzazione, viene aggiunto substrato in eccesso, in modo da provocare un costante e prolungato consumo di ossigeno (*Fase2*).

Nel nostro caso furono utilizzati come substrati succinato (10 mM), che produce equivalenti riducenti (FADH₂) ossidati a livello del complesso II, o una miscela di piruvato (10mM) e malato (2,5mM), che produce equivalenti riducenti (NADH) che entrano nella catena respiratoria a livello del complesso I.

La *Fase 3* insorge in seguito all'aggiunta di quantità saturanti di ADP (500 μ M) che, stimolando l'ATP-sintetasi, costringe il sistema a lavorare più intensamente per mantenere il gradiente protonico. Il risultato è un immediato e brusco aumento del consumo di ossigeno che 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 furono espressi come nmolO/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.

Attività della citocromo ossidasi

La citocromo ossidasi (*COX*) è l'ultimo enzima della catena di trasporto mitocondriale. Esso catalizza una reazione in cui l'ossigeno viene ridotto ad H_2O . La valutazione in vitro della sua attività può essere usata come misura della massima capacità aerobica dei tessuti (Simon *et al.*, 1971).

Al fine di valutare l'attività della *COX* campioni di omogenati o sospensioni mitocondriali furono diluite con il mezzo di Chappel-Perry modificato (ATP 1 mM, KCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 5 mM), cosicché i preparati contengono 100 mg di tessuto o 0.2 mg di proteine mitocondriali per ml, quindi mescolati con opportuni volumi di una soluzione di Chappel-Perry contenente lubrol (10mg/ml) ed incubati per 30 minuti a 0°C.

Dopo l'incubazione, la misurazione fu effettuata polarograficamente a 30°C mediante un respirometro Gilson (Yellow Springs Instruments, Ohio, USA), utilizzando la procedura di Barrè (Barrè *et al.*, 1987): Nella camera di

reazione furono introdotti 1 ml di una soluzione contenente Citocromo C 30 μM , capace di trasferire gli elettroni alla COX; Na-Malonato 10 mM, inibitore della succinato deidrogenasi; Hepes 75 mM; Rotenone 4 μM , inibitore del complesso I; 2-4-Dinitrofenolo 0,5 mM, disaccoppiante della fosforilazione ossidativa. A tale soluzione furono aggiunti 20 μl del campione di omogenato o 0,2 mg/ml di proteine mitocondriali.

Dopo la stabilizzazione dello strumento, nella camera di reazione, furono aggiunti 15 μl di soluzione contenente Na-Ascorbato 400 mM e tetrametilparafenildiammina (TMPD) 30 mM, capace di cedere elettroni al citocromo c.

L'attività della COX fu espressa come $\mu\text{mol O}/\text{min}/$ per g di tessuto o per mg di proteine.

Danno ossidativo

Per ottenere informazioni riguardanti il livello di stress ossidativo, sono stati analizzati i danni subiti dai lipidi e dalle proteine di membrana, mediante la quantificazione degli idroperossidi lipidici e dei carbonili proteici.

La quantificazione degli **idroperossidi lipidici** (HPs) fu determinata seguendo spettrofotometricamente il consumo di NADPH in un sistema di reazioni accoppiate (Heath & Tappel, 1976) .

La metodica utilizzata è basata su due reazioni: nella prima, catalizzata dall'enzima glutatione perossidasi (*GPX*), il GSH reagendo con gli idroperossidi è ossidato a GSSG. Nella seconda, il GSSG viene riconvertito a GSH dall'enzima glutatione reduttasi (*GR*), che sfrutta il potere riducente del NADPH, ossidandolo a NADP^+ .

Secondo la procedura, i campioni, diluiti 1:10 in soluzione HM, furono incubati in una soluzione tampone (EDTA 0,2 mM, Tris-HCl 0,124 mM, pH

7,6) per 5 minuti a temperatura ambiente. Quindi, per innescare la prima reazione furono aggiunti in rapida successione:

100 μ l di GSH 4,25 mM

50 μ l di NADPH 2 mM

10 μ l di GPX 2,5 U/ml

Le soluzioni così preparate furono nuovamente incubate a 33°C per 15 minuti, quindi furono aggiunti 10 μ L di GR (2,5 U/ml). Le letture furono 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 ($6,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), fornisce informazioni sul contenuto mitocondriale di idroperossidi espresso come nmoli di NADP/min/ gr tessuto o pmoli di NADP/min per mg di proteine mitocondriali.

Per la valutazione quantitativa del danno ossidativo delle proteine fu utilizzato il metodo di Reznick e Packer (1994), modificato da Schild *et al.* (1997). Questo metodo utilizza come marker dell'ossidazione proteica i **gruppi carbonilici** (C=O) che si formano in seguito a modificazioni ossidative indotte dai radicali su alcuni amminoacidi delle proteine. Le reazioni sono catalizzate da cationi metallici come Fe^{2+} e Cu^{2+} , che, legandosi a specifici siti sulle proteine, e coadiuvati da H_2O_2 e O_2 , possono trasformare i gruppi amminici delle catene laterali degli amminoacidi lisina, arginina, prolina ed istidina in gruppi carbonilici.

La metodica usata consente di valutare spettrofotometricamente i prodotti di reazione (idrazoni) della Dinitrofenilidrazina (DNPH) con i gruppi carbonilici delle proteine.

Tali prodotti di reazione furono letti spettrofotometricamente a 355nm e a 390nm, per l' omogenato, e a 370 nm per i mitocondri. Il contenuto di carbonili fu quindi calcolato, utilizzando il coefficiente di estinzione molare degli idrazoni alifatici ($22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ed espresso come nmoli /mg di proteine.

Antiossidanti

Solo sugli omogenati di muscolo furono determinate le attività di enzimi antiossidanti e i livelli di antiossidanti a basso peso molecolare.

L'attività della **Glutatione Perossidasi (GPX)** fu monitorata a 37 °C in accordo al protocollo di Flohé e Gunzler (1984). Il principio su cui si basa tale metodica è che il GSSG, formato durante la reazione catalitica dall'enzima presente nei preparati biologici, è istantaneamente e continuamente ridotto in presenza di un eccesso di attività dell'enzima glutatione reduttasi, dovuto ad un livello elevato e costante di GSH. Il protocollo prevede la preparazione di una mix di reazione contenente omogenato diluito 1:10 con tampone fosfato pH 7 (EDTA 1mM pH 7; GSH 10 mM; GR 2,4 U/mL) alla quale fu aggiunto NADPH 1,5 mM, per innescare la reazione di riduzione del GSSG, quindi l' H_2O_2 che funge da substrato per l'enzima GPX. Le letture furono effettuate allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 340nm, per 5 minuti dopo ciascuna aggiunta.

L'attività dell'enzima fu quindi calcolata come $\mu\text{moli NADPH /minuto/g}$ tessuto.

L'attività dell'enzima **Glutatione reduttasi (GR)** fu valutata mediante il metodo di Carlberg e Manneryk del 1985, seguendo la variazione dell'assorbimento a 340 nm del NADPH, il cofattore della reazione di riduzione del GSSG catalizzata dall'enzima. Le letture furono effettuate a 30

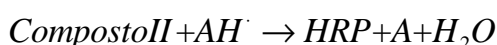
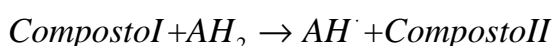
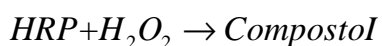
°C utilizzando campioni di omogenato diluiti 1:10 con il mezzo di omogenizzazione HM. L'attività della GR fu espressa come $\mu\text{moli di NADPH}/\text{min}/\text{gr}$ di tessuto.

La concentrazione di **Glutazione (GSH)** fu calcolata mediante il protocollo di Griffith del 1980. La metodica, di tipo colorimetrico, consiste nella rilevazione delle variazioni a 412nm dell'acido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) che risultano funzione del contenuto di glutazione totale (GSH+GSSG). Il dato finale ottenuto mediante l'utilizzo di curve standard di GSH e GSSG fu espresso in termini di $\mu\text{mol}/\text{gr}$ tessuto.

I contenuti di **Coenzima Q₉** , **CoenzimaQ₁₀** e di **Vitamina E** furono valutati mediante HPLC secondo il metodo di Lang et al. del 1986 ed espressi come nmol/g tessuto.

Rilascio mitocondriale di H₂O₂

Allo scopo di valutare quantitativamente il rilascio mitocondriale di H₂O₂ 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 (AH₂) in presenza di H₂O₂, 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 nostri 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_2O_2 , si converte nel composto stabile 2,2'-diidross-difenil-5,5'-diacetato (PHPA)₂ (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_2O_2 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 furono 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, $MgCl_2$ 3 mM, Hepes 30 mM, EGTA 0.1 mM, KH_2PO_4 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_2O_2 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_2O_2 furono ricavati usando una curva standard di concentrazioni note di H_2O_2 ed espressi come pmol H_2O_2 /min/mg proteine.

Capacità di rimozione di H_2O_2

La capacità di rimuovere l' H_2O_2 (CR) fu determinata confrontando la capacità di ridurre l'emissione di fluorescenza legata alla formazione di H_2O_2 dei campioni mitocondriali, con quella di soluzioni di desferiossammina, a concentrazione nota (Venditti *et al.*, 2001).

Per rimozione si intende il processo di trasformazione dell' H_2O_2 in radicale idrossilico, operata da enzimi come la catalasi e la glutatione perossidasi e da citocromi mitocondriali.

Per riprodurre *in vitro* una condizione simile a quella delle cellule *in vivo*, si utilizza un sistema caratterizzato da una sorgente continua di H_2O_2 . Come sorgente fu utilizzata la reazione di ossidazione del glucosio catalizzata dall'enzima glucosio ossidasi (GOX), una flavoproteina altamente specifica per il β -D(+)-glucosio. Il substrato non fluorescente PHPA fu ossidato nel prodotto fluorescente stabile 2,2'-diidrossi-difenil-5,5'-diacetato (Hyslop & Skla, 1984), tramite la riduzione enzimatica di H_2O_2 catalizzata dall'HRP. La fluorescenza fu monitorata attraverso un fluorimetro Jasco, all'interno di cuvette di quarzo mantenute a 30°C. La reazione fu innescata dall'aggiunta di 10 μl GOX 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ad una miscela contenente PHPA 0,2 mg/ml, HRP 6 U/ml, glucosio 5 mM in KCl 145 mM, Hepes 30 mM, KH_2PO_4 5mM, MgCl_2 3 mM, EGTA 0,1 mM, a pH 7,4. Dopo 100 secondi di incubazione, 10 μl di desferossiamina (contenente da 1 a 12 nmol), oppure aliquote di sospensioni mitocondriali (contenenti da 0,1 a 1 mg di proteine mitocondriali) furono aggiunte al volume finale di 2,0 ml.

I valori della variazione di fluorescenza per unità di tempo ($\Delta\text{I}/\text{min}$), ottenuti dopo l'aggiunta di desferossiamina o di mitocondri, furono convertiti nella relativa percentuale dei valori ottenuti prima dell'aggiunta.

I valori della desferossiamina furono usati per ricavare le curve standard tramite il programma Fig P (Biosoft, Cambridge, Mass.). I valori ottenuti per le sospensioni mitocondriali furono, invece, utilizzati per ricavare le capacità

di tali sospensioni di rimuovere l' H_2O_2 , utilizzando l'equazione che descrive le curve standard. La capacità di rimuovere H_2O_2 fu espressa come quantità equivalente di desferiossamina per mg di proteine mitocondriali.

Effetti degli inibitori del rilascio di H_2O_2

Per ottenere informazioni riguardo ai siti di produzione di H_2O_2 e per valutare eventuali variazioni legate ai trattamenti, sono state effettuate misurazioni di produzione di perossido di idrogeno in presenza di diversi inibitori della catena di trasporto mitocondriale. Le sostanze ad azione inibente utilizzate furono: il rotenone (*Rot*) che blocca il passaggio di elettroni dal Complesso I all'Ubichinone e l' antimicina (AA) che nel Complesso III impedisce il flusso elettronico dal citocromo b_{560} al coenzima Q o al semichinone dal lato della matrice. La concentrazione scelta per gli inibitori (5 μ M Rot e 10 μ M AA) fu tale da non interferire con il sistema PHPA-HRP. Per studiare l'effetto del rotenone fu applicato il protocollo di Palmer et al. del 1968, mentre per l'antimicina fu seguito il protocollo di Turrens et al. el 1985.

Risposta allo stress ossidativo

La suscettibilità muscolare all'ossidazione fu determinata come descritto da Venditti et al. nel 1999. Diverse diluizioni degli omogenati furono preparate in una soluzione 15 mM di Tris a pH=8,5. In piastre, furono innescate reazioni di amplificazione della chemiluminescenza dall'aggiunta di 250 μ L di una mix ai 25 μ L di campione. La mix conteneva substrato in eccesso o reagenti segnale-generanti in un buffer a pH=8,6 (Vitros Signal Reagent). Le piastre furono incubate a 37 °C per 30 secondi sotto agitazione continua per essere successivamente trasferite in un analizzatore di luminescenza (Amerlite

analyzer). I valori di emissione luminosa furono elaborati per la costruzione di curve utilizzando i sussidi statistici del programma grafico Fig.P (Biosoft, Cambridge, UK).

Analisi dei dati

I dati ottenuti in otto differenti esperimenti sono espressi come medie \pm errore standard. I dati furono analizzati con il metodo dell'analisi della varianza a due vie. Quando fu trovato un rapporto F significativo, il test di Student-Newman-Keuls fu usato per determinare la significatività statistica tra le medie. Gli effetti degli inibitori respiratori nello stesso gruppo furono analizzate statisticamente con il Student's *t* test. Valori di probabilità (P) < 0,05 furono considerati significativi.

Risultati

Parametri corporei

Le masse corporee dei ratti ES, ET, HS e ET, che furono rispettivamente 384 ± 6 , 375 ± 7 , 363 ± 7 , and 355 ± 9 g, non furono significativamente influenzate ($P > 0,05$) dal trattamento ormonale e dall'allenamento. Viceversa, a causa delle variazioni nelle masse cardiache, i rapporti massa cardiaca/massa corporea ($2,29\pm 0,04$; $2,85\pm 0,10$; $3,00\pm 0,05$ e $3,07\pm 0,08$ rispettivamente per i ratti ES, ET, HS e HT) furono aumentati significativamente ($P < 0,05$) dall'allenamento nei ratti eutiroidei e dal trattamento con T_3 nei ratti sedentari ed allenati.

L'efficacia del trattamento con l'ormone T_3 sullo stato tiroideo fu documentata dalle modificazioni nei livelli di FT_3 ed FT_4 riscontrate nel siero (Fig. 1). Negli animali ipertiroidei si osservò un incremento dei livelli sierici di FT_3 ed una riduzione di quelli di FT_4 in confronto ai rispettivi controlli eutiroidei. Viceversa, non si osservarono variazioni significative dei due livelli fra animali sedentari ed allenati.

Attività della citocromo ossidasi

L'attività dell'enzima citocromo ossidasi, misurata in omogenati di muscolo e in sospensioni mitocondriali, è mostrata in figura 2.

Negli omogenati di muscolo, l'attività della COX fu aumentata dal trattamento con T_3 solo nei ratti sedentari, e dall'allenamento solo nei ratti eutiroidei.

Nei mitocondri, l'attività fu aumentata dal trattamento con T_3 solo nei ratti sedentari e fu significativamente diminuita dall'allenamento solo nei ratti ipertiroidei.

I contenuti di proteine mitocondriali del muscolo furono $15,0 \pm 1,4$; $24,2 \pm 1,9$; $18,4 \pm 1,3$ e $23,1 \pm 1,0$ rispettivamente per i ratti ES, ET, HS e HT. L'analisi statistica mostrò che il contenuto di proteine mitocondriali non fu modificato ($P > 0,05$) dal trattamento ormonale e fu aumentata ($P < 0,05$) dall'allenamento in entrambi gli stati tiroidei.

Consumo di Ossigeno

In figura 3 sono riportate le velocità del consumo di O_2 , sostenuta da succinato e piruvato/malato, dei preparati muscolari.

In presenza di succinato, substrato legato al Complesso II, le velocità di respirazione degli omogenati, durante la Fase 4 e la Fase 3, furono aumentate dal trattamento con T_3 nei ratti sedentari e allenati e dall'allenamento negli animali eutiroidei ed ipertiroidei. I valori del rapporto del controllo respiratorio (RCR) furono $2,8 \pm 0,2$; $2,7 \pm 0,1$; $3,0 \pm 0,1$ e $2,4 \pm 0,1$ rispettivamente per i ratti ES, ET, HS e HT. Il valore fu significativamente diminuito ($P < 0,05$) dall'allenamento nei ratti ipertiroidei. In presenza di piruvato e malato, substrati legati al Complesso I, le velocità di consumo di O_2 , durante la Fase 4, furono aumentate solo dal trattamento con T_3 , mentre, durante la Fase 3, esse furono anche aumentate dall'allenamento in entrambi gli stati tiroidei. I valori di RCR furono $3,3 \pm 0,1$, $3,2 \pm 0,1$, $3,1 \pm 0,2$ e $2,8 \pm 0,1$ rispettivamente per i ratti ES, ET, HS e HT. I valori di RCR non furono significativamente influenzati ($P > 0,05$) dal trattamento con T_3 e dal training. Durante la Fase 4, la respirazione mitocondriale sostenuta da succinato fu aumentata dal trattamento con T_3 nei gruppi sedentari ed allenati e fu

ridotta dal training nel gruppo eutiroideo. Durante la Fase 3, la respirazione fu aumentata dal trattamento con T_3 nei ratti sedentari ed allenati e diminuita dal training in entrambi gli stati tiroidei. I valori di RCR furono $3,9\pm 0,3$; $3,1\pm 0,1$; $4,3\pm 0,2$ e $2,9\pm 0,2$ rispettivamente per i ratti ES, ET, HS e HT. I valori di RCR furono significativamente diminuiti ($P < 0,05$) dall'allenamento in entrambi gli stati tiroidei. In presenza di piruvato/malato, la velocità di consumo mitocondriale dell'ossigeno, durante la respirazione basale, fu aumentata dal trattamento con T_3 nei ratti allenati e diminuita dall'allenamento nei ratti eutiroidei. In presenza di ADP il consumo di O_2 fu aumentato dal trattamento con T_3 nei ratti sedentari e diminuito dal training in entrambi gli stati tiroidei. I valori di RCR furono $6,5\pm 0,6$; $6,8\pm 0,3$; $6,2\pm 0,3$ e $4,6\pm 0,2$ rispettivamente per i ratti ES, ET, HS e HT. I valori di RCR furono significativamente più bassi ($P < 0,05$) nel gruppo ipertiroideo allenato che nei controlli eutiroidei e sedentari.

Danno ossidativo

La figura 4 mostra l'effetto del trattamento con T_3 e del training sui livelli di idroperossidi lipidici e carbonili legati alle proteine nei preparati muscolari. Sia nei mitocondri che negli omogenati, i marcatori di danno ossidativo furono aumentati dalla T_3 negli animali allenati e sedentari e ridotti dall'allenamento in entrambi gli stati ormonali.

Antiossidanti

In tabella 1 sono riportate le attività degli enzimi glutatione perossidasi e glutatione riduttasi ed i livelli di coenzima Q9, coenzima Q10, vitamina E e GSH negli omogenati di muscolo.

L'attività della GPX fu aumentata dal trattamento ormonale sia nei ratti sedentari che allenati e dall'allenamento indipendentemente dallo stato tiroideo. L'attività della GR fu influenzata solo dall'allenamento che la aumentò sia nei ratti eutiroidei che in quelli ipertiroidei.

Il contenuto di vitamina E fu ridotto dall'ormone nei ratti allenati ed aumentato dall'allenamento nei ratti eutiroidei. Viceversa, il trattamento T_3 diminuì la concentrazione del coenzima Q9 nei ratti sedentari mentre l'allenamento la diminuì nei ratti eutiroidei. Il livello del coenzima Q10 non fu influenzato dal trattamento ormonale e dal training. Infine, il contenuto di GSH fu aumentato dall'allenamento in entrambi gli stati tiroidei mentre non fu significativamente modificato dal trattamento con T_3 .

Risposta allo stress ossidativo

Come mostrato in figura 5, la risposta luminescente alle diverse concentrazioni di omogenato fu aumentata dal trattamento con T_3 nei ratti

sedentari ed allenati e ridotta dall'allenamento negli animali ipertiroidei. Questa valutazione qualitativa fu confermata dai valori della emissione massima riportati nella tabella 2. Tali valori, come indicato dalla relazione: $E_{\max} = a/e \cdot b$, dove e è il numero di Nepero, dipendono dai parametri a e b . Tali parametri sono contenuti nell'equazione $E = a \cdot C / \exp(b \cdot C)$, la quale descrive la relazione tra la luce emessa (E) e la concentrazione dell'omogenato (C). A loro volta, i valori dei parametri a e b dipendono dalla concentrazione di sostanze capaci rispettivamente di indurre (ligandi del ferro e del rame) e di inibire (antiossidanti) la reazione luminescente indotta da H_2O_2 . L'esame dei valori di tali parametri mostra che, sebbene le loro variazioni non siano sempre significative, gli aumenti dei livelli del picco di emissione trovati in seguito al trattamento ormonale sono da imputare principalmente ai più alti valori di a . Viceversa, la diminuzione di E_{\max} , indotta dall'esercizio nei preparati ipertiroidei, è dipendente dall'aumento del valore di b .

Rilascio e capacità di rimozione mitocondriale di H_2O_2

Il rilascio di H_2O_2 , sostenuto da succinato e da piruvato/malato, sia durante lo stato basale che durante lo stato stimolato da ADP, fu aumentato dal trattamento T_3 nei ratti sedentari ed allenati e diminuito dall'allenamento in entrambi gli stati tiroidei (figura 6).

Le capacità dei mitocondri di rimuovere il perossido di idrogeno furono $2,65 \pm 0,07$; $2,13 \pm 0,04$; $2,86 \pm 0,05$ e $2,33 \pm 0,07$ rispettivamente nei gruppi ES, ET, HS e HT. Tali capacità furono significativamente aumentate ($P < 0,05$) dal trattamento con T_3 nei ratti sedentari ed allenati e ridotte ($P < 0,05$) dall'allenamento in entrambi gli stati tiroidei.

Effetto degli inibitori sul rilascio di H₂O₂

In tabella 3 è mostrato l'effetto dell'aggiunta di inibitori della catena di trasporto mitocondriale sul rilascio di perossido di idrogeno. In assenza di rotenone, la velocità di rilascio, supportata dal succinato, fu aumentata dal trattamento T₃ nei ratti sedentari ed allenati, e ridotta dall'allenamento in entrambi gli stati tiroidei. L'aggiunzione di rotenone diminuì la velocità di rilascio di H₂O₂ in tutti i gruppi, bloccando quello che si verificava al Complesso I, dovuto al flusso inverso di elettroni dal coenzima Q (Chance et al., 1961).

L'aggiunta di antimicina AA ai mitocondri supplementati con succinato e trattati con rotenone e a quelli supplementari con piruvato/malato aumentò significativamente le velocità di rilascio di H₂O₂ in tutti i gruppi. Tuttavia, sia in presenza che in assenza degli inibitori, tali velocità rimasero più alte nei ratti trattati con T₃ che nei ratti eutiroidei e più basse negli animali allenati che in quelli sedentari.

Discussione

L'ormone tiroideo è in grado, nei mammiferi, di regolare il metabolismo basale modificando le capacità respiratorie di diversi tessuti (Barker et al., 1952). In particolare, nel muscolo gastrocnemio di ratto, è stato trovato che il trattamento ormonale porta ad un incremento nell'attività respiratoria evidenziato da un aumento nell'attività della citocromo ossidasi (Venditti et al., 2003b). L'attività in vitro della COX è stata correlata positivamente al massimo consumo di ossigeno (Simon et al., 1971) cosicché essa può essere usata come una misura della capacità metabolica aerobica dei tessuti. Per questo motivo, il risultato precedentemente riportato indica che il

trattamento con T_3 provoca un aumento della capacità metabolica aerobica del tessuto muscolare.

E' altresì noto da molto tempo che le capacità ossidative del muscolo scheletrico possono subire un incremento in seguito ad un programma di allenamento di resistenza (Davies et al., 1981).

I risultati riportati in questa tesi confermano le precedenti osservazioni riguardanti gli effetti del trattamento con T_3 su ratti sedentari e del programma di allenamento su ratti eutiroidei. Tuttavia, essi evidenziano anche l'incapacità dell'ormone tiroideo di accentuare le variazioni indotte dall'allenamento. Le variazioni indotte dalla T_3 e dall'allenamento sono ottenute attraverso differenti modificazioni della popolazione mitocondriale. Infatti, il trattamento con T_3 non modifica il contenuto di proteine mitocondriali del muscolo gastrocnemio dei ratti sedentari, mentre aumenta la capacità aerobica mitocondriale. Questa modificazione è stata attribuita alla conversione, indotta dall'ormone tiroideo, delle fibre muscolari del tipo IIb a fibre del tipo IIa, caratterizzate da una più elevata capacità ossidativa, senza stimolare le attività degli enzimi mitocondriali delle singole fibre (Lomax et al., 1992).

Viceversa, l'allenamento aumenta la capacità respiratoria solo aumentando il contenuto di proteine mitocondriali del muscolo, in accordo con la precedente osservazione che nel muscolo scheletrico allenato all'esercizio aerobico si verifica un incremento del numero di mitocondri funzionalmente immutati (Venditti et al., 1999).

Gli aumenti, indotti dal trattamento con T_3 , nelle capacità ossidative di omogenati e mitocondri dei ratti sedentari sono in accordo con gli aumenti delle velocità di consumo dell'ossigeno trovate durante la Fase 3 in presenza di substrati legati al Complesso I ed al Complesso II. Viceversa, le variazioni nell'attività della citocromo ossidasi e nel consumo d'ossigeno, registrate in

preparati muscolari da ratti allenati, sembrano essere tra loro in disaccordo. Questa discrepanza potrebbe essere dovuta ad un effetto differenziale dell'allenamento sui complessi della catena di trasporto elettronico. Se questa ipotesi fosse corretta, la risposta dei mitocondri all'allenamento sarebbe dipendente dal tessuto poiché i risultati disponibili suggeriscono che l'allenamento può modificare la popolazione mitocondriale epatica senza, tuttavia, alterare il rapporto tra i diversi componenti della catena respiratoria (Venditti et al., 2008).

Anche il meccanismo alla base delle variazioni delle velocità di respirazione durante la Fase 4 non è ancora completamente compreso. L'incremento della velocità di consumo dell'ossigeno, registrato durante la Fase 4, rappresenta una risposta compensatoria all'aumento del flusso di protoni verso la matrice mitocondriale (leak protonico). Questo può verificarsi mediante variazioni nella conduttanza protonica basale ed inducibile legata a proteine della membrana mitocondriale interna (Hafner et al., 1990). Le modificazioni ossidative dei lipidi della membrana mitocondriale interna contribuirebbero alla conduttanza protonica basale (Ivanov et al., 1977; Putvinskii, 1977), mentre proteine disaccoppianti sarebbero coinvolte nella conduttanza protonica inducibile (Brand, 2000).

Poiché l'allenamento non modifica il contenuto mitocondriale di UCP3 (Jones, 2003), la riduzione indotta dal training nella velocità respiratoria durante la Fase 4 (mitocondriale), evidenziata negli animali eutiroidei, può essere attribuita al più basso livello mitocondriale di idroperossidi lipidici. Sebbene l'allenamento induca una riduzione nel livello di idroperossidi anche negli animali ipertiroidei, non si è osservata una diminuzione della velocità della respirazione durante lo Stato 4, probabilmente a causa dell'aumento dell'espressione dei livelli mitocondriali di UCP3 promossa dal trattamento

ormonale (Cunningham et al., 2003). L'aumento indotto dal training nella velocità del consumo basale di O_2 negli omogenati dei ratti eutiroidei è solo apparentemente in contrasto con la diminuzione osservata nei preparati mitocondriali, poiché l'allenamento è associato con un aumento del contenuto delle proteine mitocondriali. Questo spiega anche l'aumento, indotto dal training nella espressione genica degli omologhi dell'UCP1 nei muscoli scheletrici (Jones, 2003; Tsuboyama-Kasaoka et al., 1998). Il contenuto di proteine mitocondriali è aumentato dal training anche nei muscoli scheletrici degli animale ipertiroidei. Tuttavia, tale incremento è troppo piccolo per spiegare l'elevato aumento nella velocità della respirazione nella Fase 4 sostenuta da succinato, che, d'altro canto, è in contrasto con l'assenza di variazioni della velocità respiratoria osservata con omogenati utilizzando piruvato/malato.

Una importante osservazione fatta in questo lavoro è che la somministrazione di T_3 induce un differente grado di stress ossidativo nei muscoli dei ratti sedentari ed allenati. In precedenza è stato riportato che la perossidazione lipidica esibisce aumenti significativi nel muscolo gastrocnemio di ratti ipertiroidei (Venditti et al., 1997; Seymen et al., 2004), mentre gli effetti della T_3 sulla ossidazione delle proteine di tale muscolo non è stata precedentemente studiata. I risultati riportati in questa tesi mostrano che il danno ossidativo indotto dalla T_3 coinvolge anche le proteine del muscolo e la sua estensione è significativamente ridotta quando l'ormone tiroideo è somministrato ad animali allenati, il che fornisce un forte sostegno all'idea che il training eserciti un effetto protettivo contro lo stress ossidativo indotto dalla T_3 .

In generale, una condizione di stress ossidativo si instaura come conseguenza di uno squilibrio tra la produzione di ROS e la capacità tissutale

di neutralizzarne la loro azione. In teoria, per comprendere perché l'estensione del danno ossidativo di un tessuto è modificato da un trattamento, occorrerebbe esaminare le possibili variazioni nella capacità del tessuto di generare e neutralizzare i radicali liberi. Tuttavia, è difficile stabilire con certezza che una riduzione della efficacia del sistema di difesa antiossidante ha contribuito allo sviluppo dello stress ossidativo. Spesso, infatti, variazioni nei componenti dei sistemi antiossidanti non sono la causa, ma la conseguenza dello stress ossidativo indotto da uno specifico trattamento che porta ad una più elevata velocità di produzione di radicali liberi. Questo è, ad esempio, il caso di enzimi antiossidanti, la cui espressione è aumentata dalla stress ossidativo, e di scavengers i cui livelli sono ridotti a causa delle reazioni che si verificano con i radicali liberi. Così, gli aumenti, legati al trattamento con T_3 e all'allenamento, delle attività della GPX possono essere ascritti alla stimolazione dell'espressione dell'enzima da parte dei trattamenti, e le differenze nei livelli di GSH trovati nei ratti allenati e sedentari possono dipendere dai differenti livelli di stress ossidativo nei due gruppi di ratti. Inoltre, la determinazione di singole sostanze, dotate di attività antiossidante, fornisce una valutazione parziale della protezione del tessuto contro un attacco ossidativo. In questa ottica, i risultati riportati in questa tesi indicano semplicemente che il contributo che alcuni ossidanti forniscono alla capacità del muscolo di contrastare un attacco ossidativo è modificato sia dal trattamento con T_3 che dall'allenamento.

Informazioni indirette sui cambiamenti indotti dai trattamenti sullo stato antiossidante del gastrocnemio sono state ottenute valutando la sensibilità degli omogenati del muscolo ad un attacco ossidativo mediante i livelli di emissione luminosa derivanti dalla esposizione in vitro degli omogenati all'azione di H_2O_2 . I risultati ottenuti rivelano che tale sensibilità è aumentata

dal trattamento ormonale, ma in misura minore negli animali allenati. Inoltre, l'analisi dei parametri a e b , che influenzano i livelli di emissione, mostra che la minore suscettibilità al danno ossidativo, trovata negli animali ipertiroidei allenati, può essere attribuita ad un miglior funzionamento del sistema di difesa antiossidante, come documentato dall'incremento del parametro b . Questo suggerisce che il tessuto muscolare di ratti ipertiroidei allenati presenta, rispetto al rispettivo controllo sedentario, non solo un più basso grado di danno ossidativo ma anche un sistema antiossidante capace di opporsi in maniera più efficiente all'attacco da parte di specie ossidanti. Informazioni più chiare sono state ottenute sul contributo della generazione delle ROS al differente grado di danno ossidativo indotto dalla T_3 nei ratti sedentari ed allenati. Sebbene le ROS siano prodotte in diversi siti cellulari, i mitocondri sono considerati il più importante sito cellulare di generazione dei radicali dell'ossigeno (Turrens, 2003). In un lavoro precedente fu mostrato che il training riduce il rilascio mitocondriale di ROS nel muscolo gastrocnemio di ratti eutiroidei (Venditti et al., 1999). Gli attuali risultati confermano questa osservazione e mostrano che tale effetto del training è anche operativo nel gastrocnemio dei ratti ipertiroidei. La scoperta che, nei muscoli di ratti ipertiroidei allenati, vi è un alto contenuto di proteine mitocondriali, suggerirebbe che il trattamento con T_3 di animali allenati è accompagnato da un aumento del flusso di ROS dai mitocondri al compartimento citoplasmatico. Tuttavia, è evidente che il training induce modificazioni adattative nel muscolo gastrocnemio che prevengono un elevato efflusso mitocondriale di ROS. Infatti, la determinazione delle velocità del rilascio mitocondriale di H_2O_2 mostra che l'allenamento limita l'aumento indotto dalla T_3 in tali velocità. L'effetto sembra riguardare principalmente il rilascio di H_2O_2 durante la respirazione sostenuta dai substrati legati al Complesso I. Tuttavia, i risultati, ottenuti con mitocondri

supplementati con succinato in assenza di rotenone, mostrano che l'allenamento riduce anche la velocità del rilascio di H_2O_2 durante la respirazione sostenuta dal substrato legato al Complesso II.

Occorre puntualizzare che il perossido di idrogeno prodotto dai mitocondri è parzialmente rimosso da enzimi localizzati nella matrice e dalle emoproteine presenti nella membrana interna. Quindi, la quantità di H_2O_2 realmente prodotta dalla catena respiratoria mitocondriale è maggiore di quella rilasciata dagli organelli isolati. I risultati riportati in questa tesi evidenziano che le capacità mitocondriali di rimuovere H_2O_2 sono più basse negli animali allenati che in quelli sedentari e più elevate negli animali ipertiroidei che in quelli eutiroidei. Questo indica che le differenze fra le velocità di rilascio mitocondriale di H_2O_2 tra ratti eutiroidei ed ipertiroidei e fra ratti allenati e sedentari sono più basse delle differenze tra le velocità di generazione mitocondriale di H_2O_2 fra tali gruppi. Poiché i mitocondri sono il principale bersaglio della ROS che essi producono (Turrens, 2003), ci si aspetta che la velocità di produzione delle ROS e l'estensione del danno ossidativo ai componenti mitocondriali siano correlate positivamente. Così, l'idea che la generazione di ROS sia più lenta nei mitocondri dei ratti allenati che in quelli dei ratti sedentari è sostenuta dall'osservazione che, in entrambi gli stati tiroidei, il danno ossidativo alle proteine e ai lipidi mitocondriali è più bassa nei ratti allenati che in quelli sedentari.

Informazioni sul contributo che i generatori mitocondriali di ROS forniscono all'aumento, indotto dalla T_3 , nella produzione di ROS negli animali sedentari ed allenati, è ottenuta analizzando gli effetti degli inibitori respiratori sul rilascio di H_2O_2 . Questa analisi indica che, in entrambi i gruppi di animali, tale incremento è dovuto all'aumento della concentrazione dei carriers di elettroni autoossidabili localizzati sia nel Complesso I che nel Complesso III.

Infatti, le velocità di rilascio di H_2O_2 , misurate in presenza di succinato, rotenone e antimicina e quelle misurate in presenza di piruvato/malato e rotenone, che dipendono dalla concentrazione dei generatori localizzati rispettivamente nel Complesso III e nel Complesso I, sono più alte nei ratti ipertiroidei che nei loro controlli eutiroidei. La predetta analisi indica anche che l'effetto della T_3 sul contenuto mitocondriale di generatori di ROS è attenuata dall'allenamento. Tuttavia, essa non è in grado di individuare uno dei due siti come il principale responsabile delle variazioni nella produzione di H_2O_2 , suggerendo così che la T_3 induce aumenti simili nel contenuto mitocondriale dei carriers di elettroni autoossidabili.

In conclusione, questo lavoro di tesi fornisce forti indicazioni sulla capacità dell'allenamento moderato di limitare lo stress ossidativo indotto dall'ormone tiroideo nel muscolo gastrocnemio di ratto, riducendo la produzione di ROS mitocondriale e la suscettibilità del tessuto all'attacco ossidativo. Quindi, esso suggerisce che, insieme alla integrazione antiossidante, l'allenamento può fornire protezione contro le disfunzioni tissutali legate al danno ossidativo tipico dello stato ipertiroideo.

Figure e tabelle

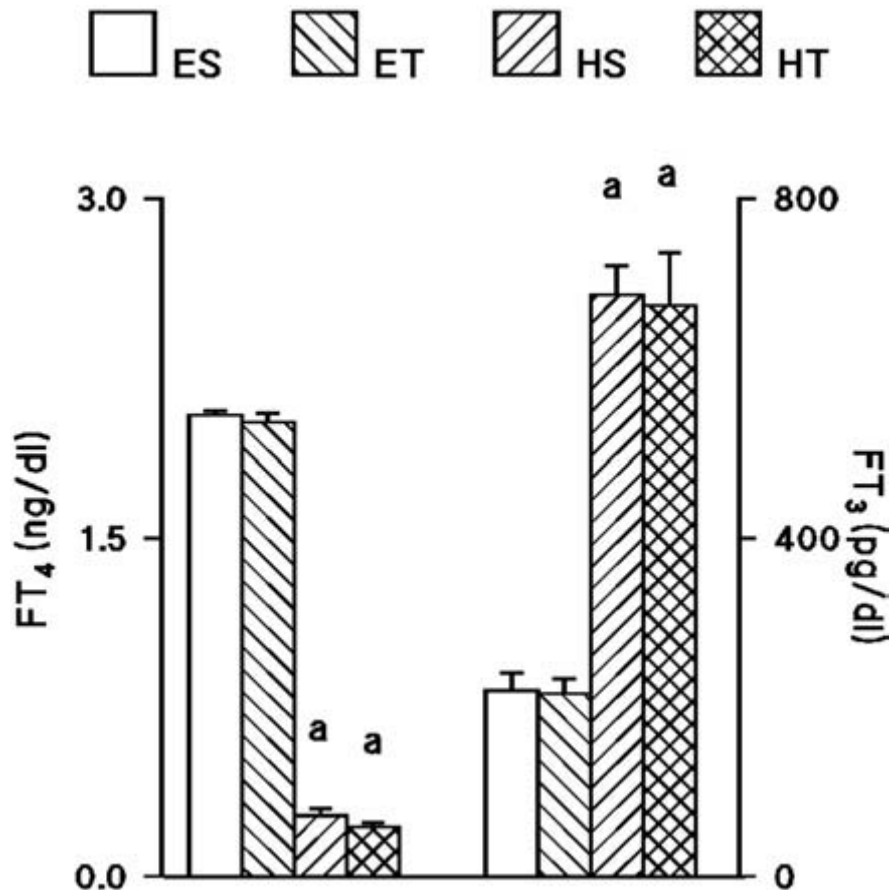


Figura 1. Livelli sierici di triiodotironina (FT₃) e tiroxina (FT₄) in ratti eutiroidi sedentari (ES), eutiroidi allenati (ET), ipertiroidi sedentari (HS) e ipertiroidi allenati (HT). I valori rappresentano la media \pm errore standard di otto differenti esperimenti. Un ratto era usato per ciascun esperimento. ^a significativo rispetto al controllo eutiroidico. Il livello di significatività scelto è con $p < 0.05$.

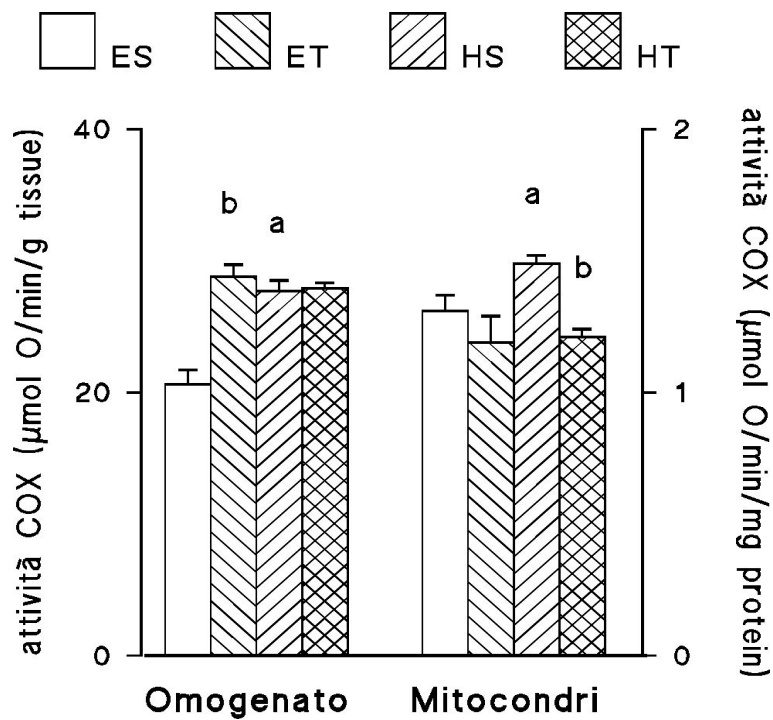


Figura2. Attività della citocromo ossidasi (COX) in preparati di muscolo da ratti eutiroidi sedentari (ES), eutiroidi allenati (ET), ipertiroidi sedentari (HS) e ipertiroidi allenati (HT). L'attività della COX è espressa, per l'omogenato, come $\mu\text{mol O/min/g}$ tessuto, per i mitocondri, come $\mu\text{mol O/min/mg}$ proteine. I valori rappresentano la media \pm errore standard di otto differenti esperimenti. Un ratto era usato per ciascun esperimento. ^a significativo rispetto al controllo eutiroidico. ^b significativo rispetto al controllo sedentario. Il livello di significatività scelto è con $p < 0.05$.

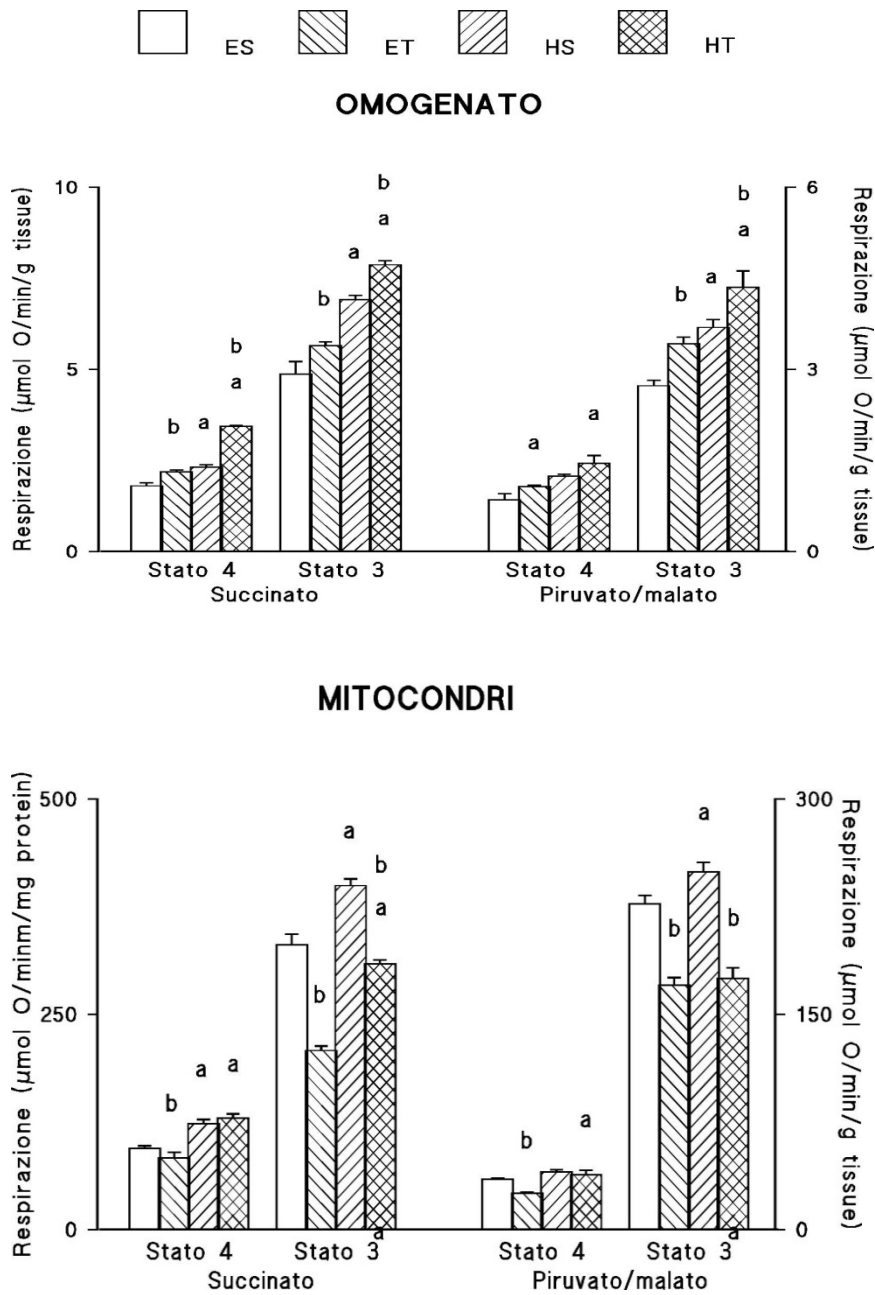


Figura3. Velocità di consumo di ossigeno in preparati di muscolo da ratti eutiroidi sedentari (ES), eutiroidi allenati (ET), ipertiroidi sedentari (HS) e ipertiroidi allenati (HT). I valori rappresentano la media \pm errore standard di otto differenti esperimenti. Un ratto era usato per ciascun esperimento. ^a significativo rispetto al controllo eutiroidico, ^b significativo rispetto al controllo sedentario. Il livello di significatività scelto è con $p < 0.05$.

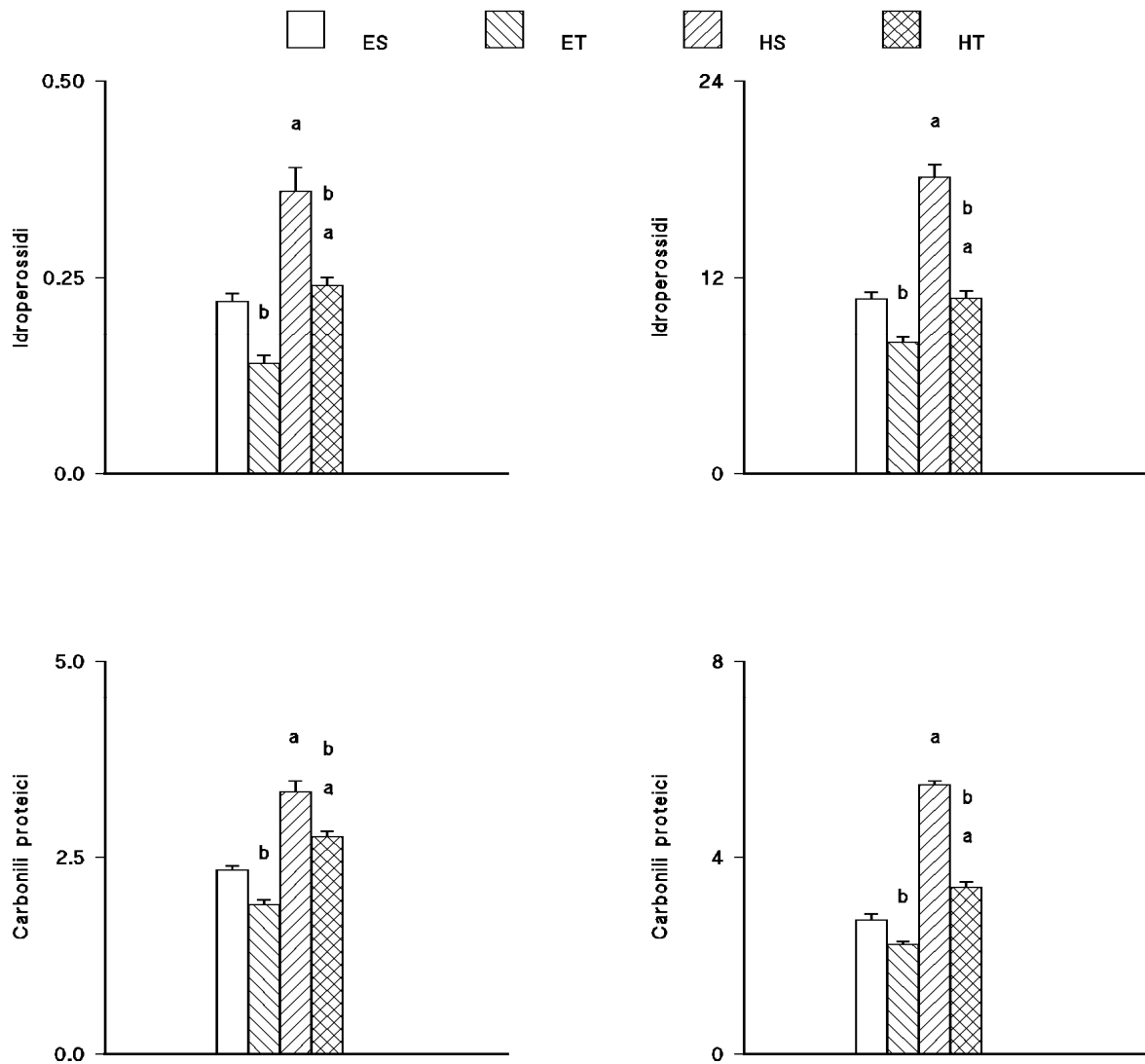


Figura4. Danno ossidativo in preparati di muscolo da ratti eutiroidi sedentari (ES), eutiroidi allenati (ET), ipertiroidi sedentari (HS) e ipertiroidi allenati (HT). Gli idroperossidi sono espressi come nmol NADP/min/g tessuto e pmol NADP/min/mg proteine mitocondriali. I carbonili proteici sono espressi come nmol/mg proteine. I valori rappresentano la media \pm errore standard di otto differenti esperimenti. Un ratto era usato per ciascun esperimento. ^a significativo rispetto al controllo eutiroido. ^b significativo rispetto al controllo sedentario. Il livello di significatività scelto è con $p < 0.05$.

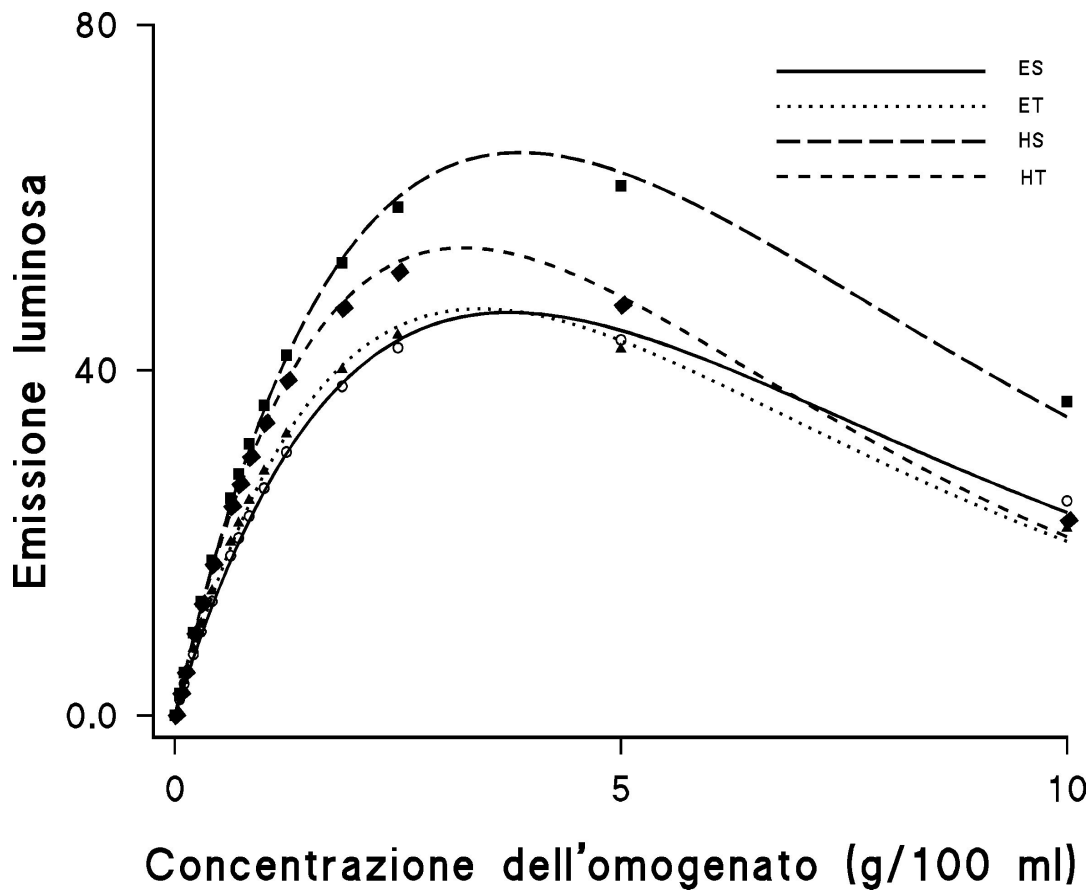


Figura5. Effetto del trattamento T_3 sulla risposta, a cambiamenti ossidativi indotti in vitro, di omogenati di muscolo da ratti eutiroidei sedentari (ES), eutiroidei allenati (ET), ipertiroidei sedentari (HS) e ipertiroidei allenati (HT). La suscettibilità del tessuto allo stress è valutata determinando la variazione, al variare della concentrazione di omogenato, della luce emessa in una reazione luminescente. I valori delle emissioni sono espresse come percentuale di uno standard arbitrario (44ng/mL perossidasi). Le curve sono ottenute usando i dati sperimentali ed applicando l'equazione $E = a \cdot C / \exp(b \cdot C)$.

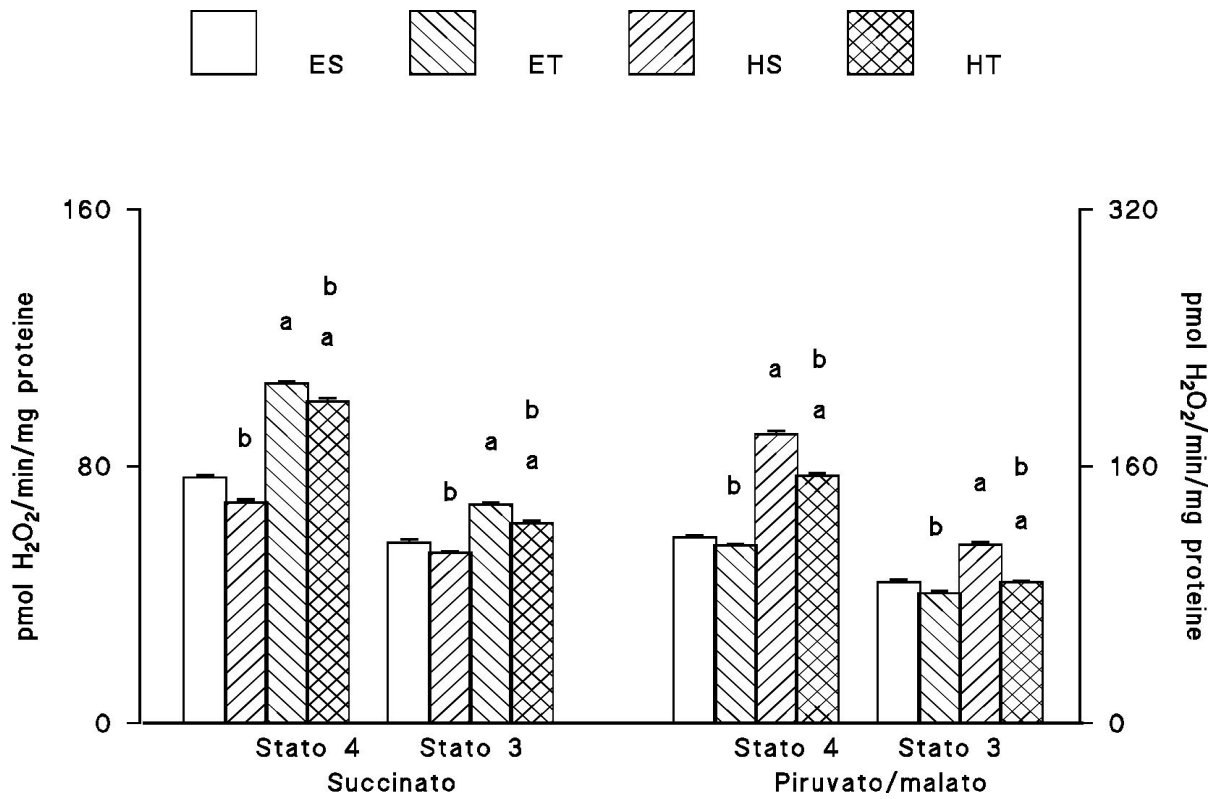


Figura6. Velocità di rilascio di H_2O_2 da mitocondri di muscolo da ratti eutiroidi sedentari (ES), eutiroidi allenati (ET), ipertiroidi sedentari (HS) e ipertiroidi allenati (HT). I valori rappresentano la media \pm errore standard di otto differenti esperimenti. Un ratto era usato per ciascun esperimento. ^a significativo rispetto al controllo eutiroideo. ^b significativo rispetto al controllo sedentario. Il livello di significatività scelto è con $p < 0.05$.

	ES	ET	HS	HT
GPX	3.66±0.06	3.92±0.08 ^b	4.67±0.07 ^a	5.54±0.012 ^{a,b}
GR	0.66±0.02	0.75±0.03 ^b	0.62±0.01	0.77±0.03 ^b
VitE	14.25±0.70	21.15±1.46 ^b	13.79±0.94	14.43±0.73 ^a
Q9	69.4±1.7	62.8±1.0 ^b	57.2±0.6 ^a	60.6±2.0
Q10	4.5±0.2	4.40±0.1	4.1±0.1	4.4±0.1
GSH	1.00±0.08	1.23±0.08 ^b	0.86±0.04	1.10±0.05 ^b

Tabella1. Attività degli enzimi antiossidanti e livelli degli scavenger in muscolo di ratti eutiroidei sedentari (ES), eutiroidei allenati (ET), ipertiroidei sedentari (HS) e ipertiroidei allenati (HT). L'attività della glutazione perossidasi (GPX) è espressa come $\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{g}$ tessuto. L'attività della glutazione riduttasi (GR) è espressa come $\mu\text{molNADPH}/\text{min}/\text{g}$ tessuto. Il contenuto di coenzima Q9 (CoQ9), coenzima Q10 (CoQ10) e di vitamina E (Vit E) è espresso in nmol/g tessuto. Il glutazione ridotto (GSH) è espresso in $\mu\text{mol}/\text{g}$ tessuto. I valori rappresentano la media \pm errore standard di otto differenti esperimenti. Un ratto era usato per ciascun esperimento. ^a significativo rispetto al controllo eutiroideo. ^b significativo rispetto al controllo sedentario. Il livello di significatività scelto è con $p < 0.05$.

	ES	ET	HS	HT
a	35.3±2.0	40.5±2.5	48.4±1.9 ^a	45.7±3.9
b	0.30±0.01	0.34±0.02	0.28±0.01	0.35±0.02 ^b
E_{max}	43.3±1.8	43.8±2.1	61.4±2.1 ^a	50.9±2.0 ^{a,b}

Tabella2. Parametri caratterizzanti la risposta allo stress ossidativo di omogentato di ratti eutiroidei sedentari (ES), eutiroidei allenati (ET), ipertiroidei sedentari (HS) e ipertiroidei allenati (HT). I valori rappresentano la media \pm errore standard di otto differenti esperimenti. Un ratto era usato per ciascun esperimento. ^a significativo rispetto al controllo eutiroideo. ^b significativo rispetto al controllo sedentario. Il livello di significatività scelto è con $p < 0.05$.

	ES	ET	HS	HT
Succ	108.5±1.4	100.8±0.6 ^b	135.8±0.6 ^a	114.8±0.6 ^{a,b}
Succ+Rot	76.5±0.8 ^c	68.6±0.9 ^{b,c}	105.8±0.6 ^{a,c}	100.1±1.0 ^{a,b,c}
Succ+Rot+AA	742.9±2.0 ^c	722.2±1.4 ^{b,c}	884.5±9.8 ^{a,c}	809.0±3.2 ^{a,b,c}
P/M	115.6±0.7	110.7±0.9 ^b	179.6±1.5 ^a	154.2±0.6 ^{a,b}
P/M+AA	880.6±4.6 ^c	785.7±1.2 ^{b,c}	950.0±3.1 ^{a,c}	911.1±1.4 ^{a,b,c}
P/M+Rot	132.1±1.3 ^c	118.9±1.0 ^{b,c}	2440±2.2 ^{a,c}	230.1±2.1 ^{a,b,c}

Tabella3. Effetto di inibitori, specifici per vari segmenti della catena di trasporto mitocondriale, sulla velocità di rilascio di H₂O₂ da mitocondri isolati da muscolo di ratti eutiroidei sedentari (ES), eutiroidei allenati (ET), ipertiroidei sedentari (HS) e ipertiroidei allenati (HT). I valori rappresentano la media ± errore standard di otto differenti esperimenti. Un ratto era usato per ciascun esperimento. L' H₂O₂ mitocondriale rilasciata è espressa come pmol/min/mg di proteine. Succ= succinato; P/M= piruvato + malato. ^a significativo rispetto al controllo eutiroideo. ^b significativo rispetto al controllo sedentario. ^c significativo effetto dell' ultimo inibitore aggiunto rispetto al valore registrato nelle stesse condizioni ma in assenza dell' inibitore. Il livello di significatività scelto è con p < 0.05.

Bibliografia

Adamo AM, Llesuy SF, Pasquini JM, Boveris A (1989). Brain chemiluminescence and oxidative stress in hyperthyroid rats. *Biochem J* 263: 273–277.

Angeras U, Oldfors A, Hasselgren PO (1986). The effect of beta-adrenergic blockade on the myopathic changes in experimental hyperthyroidism in rats. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect A* 94: 91-99.

Arai M, Otsu K, MacLennan DH, Alpert NR, Periasamy M (1991). Effect of thyroid hormone on the expression of mRNA encoding sarcoplasmic reticulum proteins. *Circ Res* 69: 266–276.

Asayama H, Kato K (1990). Oxidative muscular injury and its relevance to hyperthyroidism. *Free Radic Biol Med* 8: 293-303.

Asayama K, Dobashi K, Hayashibe H, Megata Y, Kato K (1987). Lipid peroxidation and free radical scavengers in thyroid dysfunction in the rat: a possible mechanism of injury to heart and skeletal muscle in hyperthyroidism. *Endocrinology* 121: 2112-2118.

Barker SB, Klitgaard HM (1952). Metabolism of tissues excised from thyroxine-injected rats. *Am J Physiol* 170: 81-86.

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.

Bilezikian JP, Loeb JN (1983). The influence of hyperthyroidism and hypothyroidism on α - and β -adrenergic receptor systems and adrenergic responsiveness. *Endocr Rev* 14: 378–387

Binah O, Rubinstein I, Gilat E (1987). Effects of thyroid hormone on the action potential and membrane currents of guinea pigs ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 409: 214–216.

Boveris A, Cadenas E, Stoppani AO (1976). Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *J Biochem* 156: 435-444.

Brand MD (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp Gerontol* 35: 811-820.

Buckingham M, Alonso S, Barton P, Cohen A, Daubas P, Garner I, Robert B, Weydert A (1986). Actin and myosin multigene families: their expression during the formation and maturation of striated muscle. *Am J Med Genet* 25: 623-634.

Burton GW, Joyce A, Ingold KU (1983). Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys* 221: 281-290.

Caillaud C, Py G, Eydoux N, Legros P, Prefaut C, Mercier J (1999).

Antioxidants and mitochondrial respiration in lung, diaphragm, and locomotor muscles: effect of exercise. *Free Radic Biol Med* 26: 1292-1299.

Carlberg I, Mannervik B (1985). Glutathione reductase. *Methods Enzymol*

113:484–499.

Chance B, Hollunger GJ (1961) The interaction of energy and electron

transfer reactions in mitochondria. I. General properties and nature of the products of succinate-linked reduction of pyridine nucleotide. *J Biol Chem* 236: 1534-1543.

Chance B, Sies H, Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.

Choudhury S, Chainy GBN, Mishro MM (2003). Experimentally induced hypo- and hyper-thyroidism influence on the antioxidant defence system in adult rat testis. *Andrologia* 35: 131-140.

Civelek S, Seymen O, Seven A, Yig'it G, Hatemi H, Burçak G (2001) Oxidative stress in heart tissue of hyperthyroid and iron supplemented rats. *J Toxicol Environ Health A* 64: 499–506

Cunningham O, McElligott AM, Carroll AM, Breen E, Reguenga C, Oliveira

ME, Azevedo JE, Porter RK (2003). Selective detection of UCP 3 expression in skeletal muscle: effect of thyroid status and temperature acclimation. *Biochim Biophys Acta* 1604: 170-179.

Das K, Chainy GBN (2004). Thyroid hormone influences antioxidant defense system in adult rat brain. *Neurochem Res* 29: 1755–1766.

Davies KJA, Packer L, Brooks GA (1981). Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training. *Arch Biochem Biophys* 209: 539-554.

Di Meo S, De Martino Rosaroll P, De Leo T (1991). Thyroid state and electrical properties of rat papillary muscle fibres. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* 99: 377–383.

Di Meo S, Venditti P, De Leo T (1997). Effect of iodothyronines on electrophysiological properties of rat papillary muscle fibres. *Horm Metab Res* 29: 225–230.

Ernster L, Forsmark P, Nordenbrand K (1992). The action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes: Relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitor of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *J Nutr Sci Vitaminol* 548: 41-46.

Fernández V, Barrintos X, Kipreos K, Valenzuela A, Videla LA (1985). Superoxid radical generation, NADPH oxidase activity and cytochrome P-450 content of rat liver microsomal fractions in a experimental hyperthyroid state: relation to lipid peroxidation. *Endocrinology* 117: 496-501

Fernández V, Cornejo P, Tapia G, Videla LA (1997). Influence of hyperthyroidism on the activity of liver nitric oxide synthase in the rat. *Nitric Oxide* 6: 463-468.

Fernández V, Videla LA (1993). Influence of hyperthyroidism on superoxide radical and hydrogen peroxide production by rat liver submitochondrial particles. *Free Radic Res Commun* 18: 329-335.

Fitts RH, Brimmers CJ, Troup JP, Unsworth BR (1984). Contractile and fatigue properties of thyrotoxic rat skeletal muscle. *Muscle & Nerve* 7: 470-477.

Flohè L (1982). Glutathione peroxidase brought into focus. *Free Rad in Biol and Med* 5: 223-253.

Flohé L, Günzler WA (1984). Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105:115–121.

Freeman BC, Crapo JD (1982) Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426.

Fridovich I (1986) Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 58:61-97

Fridovich I (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64, 97–112.

Galton VA (1983). Thyroid hormone action in amphibian metamorphosis. *Molecular basis of thyroid hormone action.* (A cura di Oppenheimer JH, Samuels HH), pp 445-483. *Academic Press, New York.*

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

Griffith O, Meister A (1979). Glutathione: interorgan, translocation, turnover, and metabolism. *Proc Natl Acad Scie USA* 76: 5606-5610.

Griffith OW (1980). Determination of glutathione disulphide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106:207–212.

Guernsey DL, Edleman IS (1983). Regulation of thermogenesis by thyroid hormones. In: *Molecular basis of thyroid hormone action.* (A cura di Oppenheimer JH, Samuels HH), pp 293-294. *Academic Press, New York.*

Gutteridge JMC (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41: 1819-1828.

Hafner RP, Brown G, Brand MD (1990). Analysis of the control of respiration rate, phosphorylation rate, proton leak rate and protonmotive force in isolated mitochondria using the 'top-down' approach of metabolic control theory. *Eur J Biochem* 188: 313-319.

Halestrap AP (2009). What is the mitochondrial permeability transition pore ?. *J Mol Cell Cardiol.* 46: 821-831.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1998). Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, Oxford.

Heat RL, Tappel AL (1976). A new sensitive assay for the measurement of hydroperoxides. *Anal Biochem* 76:184–191.

Hyslop PA, Sklar LA (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.

Huh K, Kwon TH, Kim JS, Park JM (1998). Role of the hepatic xanthine oxidase in thyroid dysfunction: effect of thyroid hormones in oxidative stress in rat liver. *Arch Pharm Res* 21: 236-249

Ivanov AS, Putvinskii AV, Antonov VF, Vladimirov IuA (1977). Magnitude of the protein permeability of liposomes following photoperoxidation of lipids. *Biofizika* 22: 621-624.

Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1986). All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science* 231, 597-600

Ji LL (1995). Oxidative stress during exercise: implications of antioxidant nutrients. *Free Radic Biol Med* 18: 1079-1086.

Johnson PN, Freedberg A S, Marshall J M (1973). Action of thyroid hormone on the trans-membrane potentials from sinoatrial node cells and atrial muscle cells in isolated atria of rabbits. *Cardiology* 58: 273–289.

Jones TE, Baar K, Ojuka E, Chen M, Holloszy JO (2003). Exercise induces an increase in muscle UCP3 as a component of the increase in mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol* 284: E96-E101.

Kagan VE, Sebrinova EA, Packer L (1990). Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. *Biochem Biophys Res Commun* 169: 851-857.

Kahaly GJ, Dillmann WH (2005). Thyroid hormone action in the heart *Endocr Rev* 26: 704–728.

Kazakov VM, Katinas GS, Skorometz AA, (1986). Pathogenesis of experimental thyrotoxic myopathy. *Eur Neurol* 25: 212-224.

Klein I, Ojamaa K (2001). Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med* 344: 501-509.

Korenyi-Both A, Korenyi-Both I, Kages BC (1981). Thyrotoxic myopathy pathomorphological observations of human material and experimentally induced thyrotoxicosis in rats. *Acta Neuropath* 53: 237-248.

Lang JK, Gohil K, Packer L (1986). Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinol, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and

subcellular fractions. *Anal Biochem* 157:106–116.

Lomax RB, Robertson WR (1992). The effects of hypo- and hyperthyroidism on fibre composition and mitochondrial enzyme activities in rat skeletal muscle. *J Endocrinol* 133: 375-380.

Loschen G, Azzi A (1974) Proceedings: Formation of oxygen radicals and hydrogen peroxide in mitochondrial membranes. *Physiol Chem* 355 :1226

Masullo P, Venditti P, Agnisola C, Di Meo S (2000). Role of nitric oxide in the reperfusion induced injury in hyperthyroid rat hearts. *Free Rad Res* 32: 411-421.

Meister A, Anderson ME (1983). Glutathione. *Annu Biochem* 52: 711-760.

Moreno M, Lombardi A, Beneduce L, Silvestri E, Pinna G, Goglia F, Lanni A (2002). Are the effects of T₃ on resting metabolic rate in euthyroid rats entirely caused by T₃ itself? *Endocrinology* 143: 504–510.

Morkin E (1993). Regulation of myosin heavy chain genes in the heart. *Circulation* 87: 1451–1460.

Negre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Trolly M, Salvayre R, Peenicaud L, Casteilla L (1997) A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J* 11: 809–815.

Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N (1995). Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *Am J Clin Nutr* 62: 1322S-1326S.

Novelli GP, Bracciotti G, Falsini S (1990). Spin-trappers and vitamin E prolong endurance to muscle fatigue in mice. *Free Radic Biol Med* 8: 9–13.

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, Davis KJA (1990). Protein degradation as an index of oxidative stress. *Methods Enzymol* 186: 485-502.

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

Periasamy M, Bhupathy P, Babu GJ (2008). Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovasc Res* 77 :265-273.

Power SK, Ji LL, Leeuwenburgh C (1999). Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 31: 987-997.

Putvinskii AV (1977). Decrease in the electrical stability of lipid membranes following UV-irradiation. *Biofizika* 22: 725-727.

Reznick AZ, Packer L (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric

method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233:357–363.

Rubinstein NA, Lyons GE, Kelly AM. (1988). Hormonal control of myosin heavy chain genes during development of skeletal muscles. *Ciba Found Symp* 138: 35-51.

Schwartz HL (1983). Effect of thyroid hormones on growth and development. *Molecular basis of thyroid hormone action.* (A cura di Oppenheimer JH, Samuels HH), pp 413-444. Academic Press, New York.

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.

Seymen HO, Civelek S, Seven A, Yiğit G, Hatemi H, Burçak G (2004). Iron supplementation in experimental hyperthyroidism: effects on oxidative stress in skeletal muscle tissue. *Yonsei Med J* 45: 413-418.

Sharp NA, Neel DS, Parsons RL (1985). Influence of thyroid hormone levels on the electrical and mechanical properties of rabbit papillary muscle. *J Mol Cell Cardiol* 17: 119–132.

Shimoni Y, Severson DL (1995) Thyroid status and potassium currents in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 268: H576–H583.

Shigenaga MK, Park JW, Kundy KC, Gimeno CJ, Ames BN (1990). In vivo oxidative DNA damage: measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Method Enzymol* 186: 521-530.

Sies H (1991). Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *Academic Press London*.

Simon LM, Robin ED (1971). Relationship of cytochrome oxidase activity to vertebrate total and organ oxygen consumption. *Int J Biochem* 2: 560-573.

Tapia G, Cornejo P, Fernández V, Videla LA (1999). Protein oxidation in thyroid hormone-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation. *Toxicol Lett* 106: 209-214.

Tsuboyama-Kasaoka N, Tsunoda N, Marayuma K, Takahashi M, Kim H, Ikemoto S, Ezaki O (1998). Up-regulation of uncoupling protein 3 (UCP3) mRNA by exercise training and down-regulation of UCP3 by denervation in skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 498-503.

Turrens JF and Boveris A (1980). *Biochem J* 191: 421-427.

Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 237:408–414.

Turrens JF (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552: 335-344.

Ueta Y, Chowdrey HS, Lightman SL (1995). Hypothalamic nitric oxide synthase gene expression is regulated by thyroid hormones. *Endocrinology* 136: 4182-4187.

Vassilopoulou-Sellin R, Sellin JH (1996). The gastrointestinal tract and liver in thyrotoxicosis. In: *Werner and Ingbar's The Thyroid. A fundamental and clinical Text.* (A cura di Braverman LE, Utiger RD), pp 632-636. Lippincott-Raven, New York.

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 (1997). Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. *Int J Sports Med* 18: 497-502.

Venditti P, Balestrieri M, Di Meo S, De Leo T (1997). Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *J Endocrinol* 155: 151-157.

Venditti P, De Leo T, Di Meo S (1998). Antioxidant-sensitive shortening of ventricular action potential in hyperthyroid rats is independent of lipid peroxidation. *Mol Cell Endocrinol* 142: 15–23.

Venditti P, Daniele MC, Masullo P, Di Meo S (1999). Antioxidant-sensitive triiodothyronine effects on characteristics of rat liver mitochondrial population. *Cell Physiol Biochem* 9: 38-52.

Venditti P, Masullo P, Di Meo S (1999). Effect of training on H₂O₂ release by mitochondria from rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 372: 315-320.

Venditti P, De Leo T, Di Meo S (1999). Determination of tissue susceptibility to oxidative stress by enhanced luminescence technique. *Methods Enzymol* 300:245–252.

Venditti P, Masullo P, Di Meo S (2001). Hemoproteins affect H₂O₂ removal from rat tissues. *Int J Biochem Cell Biol* 33:293–301.

Venditti P, De Rosa R, Di Meo S (2003). Effect of thyroid state on H₂O₂ production by rat liver mitochondria. *Mol Cell Endocrinol* 205: 185-192.

Venditti P, Puca A, Di Meo S (2003). Effect of thyroid state on rate and sites of H₂O₂ production in rat skeletal muscle mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 411: 121-128.

Venditti P, Puca A, Di Meo S (2003). Effects of thyroid state on H₂O₂ production by rat heart mitochondria: sites of production with Complex I and Complex II-linked substrates. *Horm Met Res* 35: 55-61.

Venditti P, Di Meo S (2006). Thyroid hormone-induced oxidative stress. *Cell Mol Life Sci* 63: 414-434.

Venditti P, Bari A, Di Stefano L, Di Meo S (2007) Vitamin E attenuates cold-induced rat liver oxidative damage reducing H₂O₂ mitochondrial release. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 1731–1742.

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.

Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha V, Cortright R, Muoio DM, Lowell BB (2000). Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem* 275: 16258–16266.

Videla LA (2000). Energy metabolism, thyroid calorogenesis, and oxidative stress: functional and cytotoxic consequences. *Redox Report* 5: 265-275.

Weller CU (1933). Hepatic pathology in exophthalmic goiter. *Annu Intern Med* 7: 543-560.

Yen PM (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 81: 1097-1142.

Yu BP (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74: 139-162.

Zaiton Z, Merican Z, Khalid BAK, Mohamed JB, Baharom S (1993). The effects of propranolol on skeletal muscle contraction, lipid peroxidation products and antioxidant activity in experimental hyperthyroidism. *Gen Pharmacol* 24: 195-199.

Zoratti M, Szabo I (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1241: 139–176.

Indice

Premessa _____ pag. 1

Introduzione _____ pag. 3

Radicali liberi

Radicali liberi nei sistemi biologici: le specie reattive dell'ossigeno.

Siti di produzione delle ROS

Bersagli cellulari dei radicali liberi

Sistema di difesa antiossidante

Stress ossidativo

Stress ossidativo nell'ipertiroidismo

Ormoni tiroidei

Funzioni degli ormoni tiroidei

Ipertiroidismo

Stress ossidativo nei tessuti ipertiroidei

Danno ossidativi

Produzione di ROS e RNS

Capacità antiossidanti

Strategie contro lo stress ossidativo indotto dall'ormone tiroideo

Integrazione antiossidante

Allenamento fisico

Scopo della tesi pag. 43

Materiali e metodi pag. 45

Materiali

Animali

Preparazione dei tessuti

Preparazione dei mitocondri

Consumo di Ossigeno

Attività della citocromo ossidasi

Danno ossidativo

Antiossidanti

Rilascio mitocondriale di H_2O_2

Capacità di rimozione di H_2O_2

Effetti degli inibitori del rilascio di H_2O_2

Risposta alle stress ossidativo

Analisi dei dati

Risultati pag. 60

Parametri corporei

Attività della citocromo ossidasi

Consumo di Ossigeno

Danno ossidativo

Antiossidanti

Risposta alle stress ossidativo

Rilascio e capacità di rimozione mitocondriale di H_2O_2

Effetto degli inibitori sul rilascio di H_2O_2

Discussione pag. 66

Figure e tabelle pag. 75

Bibliografia pag. 83

