

Dottorato di Ricerca in Sviluppo e Riproduzione Umana

CICLO XXII

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE: BIO/13

Stress ossidativo ed adattamenti morfo-funzionali e
biomolecolari in due condizioni opposte: denervazione ed
esercizio fisico

Presentata da: Dott.ssa Provvidenza Maria Abruzzo

Coordinatore dottorato:

Prof. Elisabetta Caramelli

Tutor:

Prof. Marina Marini

Anno esame finale: 2010

Indice

Capitolo 1	4
• 1.1 il muscolo scheletrico	4
• 1.2 Tipi di fibre muscolari	8
• 1.3 Miogenesi	9
Capitolo 2 Specie radicali che dell'ossigeno(ROS) e sistemi antiossidanti	12
• 2.1 Specie reattive dell'ossigeno (ROS)	12
• 2.2 Principali fonti di ROS nel muscolo scheletrico	15
• 2.3 Principali difese antiossidanti	17
• 2.4 Stress Ossidativo e danno cellulare	.25
• 2.5 Ruolo fisiologico dei ROS e concetto di ormesi	27
Capitolo 3 Esercizio fisico e denervazione	29
• 3.1 Plasticità muscolare	29
• 3.2 Esercizio fisico: principali caratteristiche	29
• 3.3 Principali adattamenti del muscolo scheletrico sottoposto ad esercizio fisico moderato	30
• 3.4 Denervazione: principali caratteristiche	34
• 3.5 Principali adattamenti del muscolo scheletrico sottoposto a denervazione	35
Scopo della tesi	39
Capitolo 4 Materiali e metodi	41
• 4.1 Animali e protocolli	41
• 4.2 Estrazione dell'RNA da tessuto di muscolo	43
• 4.3 Analisi della qualità dell'RNA	44
• 4.4 Retrotrascrizione	46
• 4.5 Real Time PCR	47
• 4.6 Progettazione primers	48
• 4.7 Estrazione delle proteine da tessuto di muscolo	50
• 4.8 Quantificazione delle proteine	51
• 4.9 Valutazione della produzione dei ROS nei muscoli TA denervati mediante sonda DCF	52
• 4.10 Western Blot	53
• 4.11 Saggi per la valutazione di attività enzimatiche	56
• 4.12 Purificazione delle membrane del SR e del sarcolemma	59
• 4.13 Perossidazione lipidica	60

• 4.14 Valutazione dell'attività delle pompe e dei canali ionici	61
• 4.15 Istochimica e Immunofluorescenza	62
Capitolo 5 Risultati	66
• 5.1 Principali adattamenti dei muscoli Soleo ed EDL sottoposti ad esercizio fisico moderato	66
• 5.2 Valutazione dello stress ossidativo e delle difese antiossidanti nei muscoli Soleo ed EDL di ratti sottoposti ad esercizio fisico	70
• 5.3 Principali adattamenti del muscolo Tibiale Anteriore sottoposto a denervazione	78
Discussione	97
Conclusioni	106
Bibliografia	108

Capitolo 1

Il tessuto muscolare: struttura e funzione

Il tessuto muscolare è un tessuto altamente specializzato le cui proprietà fondamentali sono la eccitabilità, la capacità cioè di rispondere a diversi stimoli di tipo meccanico, chimico ed elettrico, promuovendo variazioni di potenziale della membrana plasmatica, e la contrattilità, la capacità cioè di modificare attivamente la propria forma, riducendosi in lunghezza e generando una forza che viene trasmessa a tessuti e a componenti extracellulari contigui.

Esistono tre tipi di tessuto muscolare che presentano una diversa organizzazione strutturale, pur mantenendo costante il meccanismo di contrazione.

- Muscolo liscio, responsabile dei movimenti involontari di organi come lo stomaco, l'intestino, l'utero e i vasi sanguigni. Permette l'avanzamento delle sostanze liquide e solide lungo il canale digerente, oltre a svolgere svariate funzioni nell'ambito di altri apparati.
- Muscolo cardiaco, responsabile del flusso del sangue all'interno dei vasi del sistema circolatorio.
- Muscolo scheletrico, responsabile di tutti i movimenti volontari.

1.1 Il muscolo scheletrico

I muscoli scheletrici sono organi contrattili connessi alle ossa mediante strutture di tessuto connettivo molto robuste chiamate tendini. Svolgono varie funzioni:

determinano il movimento delle diverse parti dello scheletro;

mantengono la postura e la posizione del corpo;

offrono protezione e supporto agli organi interni;

controllano l'apertura degli orifizi interni ed esterni;

mantengono la temperatura corporea.

La fibra muscolare.

L'unità morfologica muscolare scheletrica è definita fibra muscolare (Fig.1.1).

Nel muscolo scheletrico queste fibre sono disposte parallelamente le une alle altre e sono tenute insieme da un'impalcatura di tre strati concentrici di tessuto connettivo (Epimisio, Perimisio e Endomisio) che rivestono un ruolo importante nella connessione dei muscoli ad altre strutture.

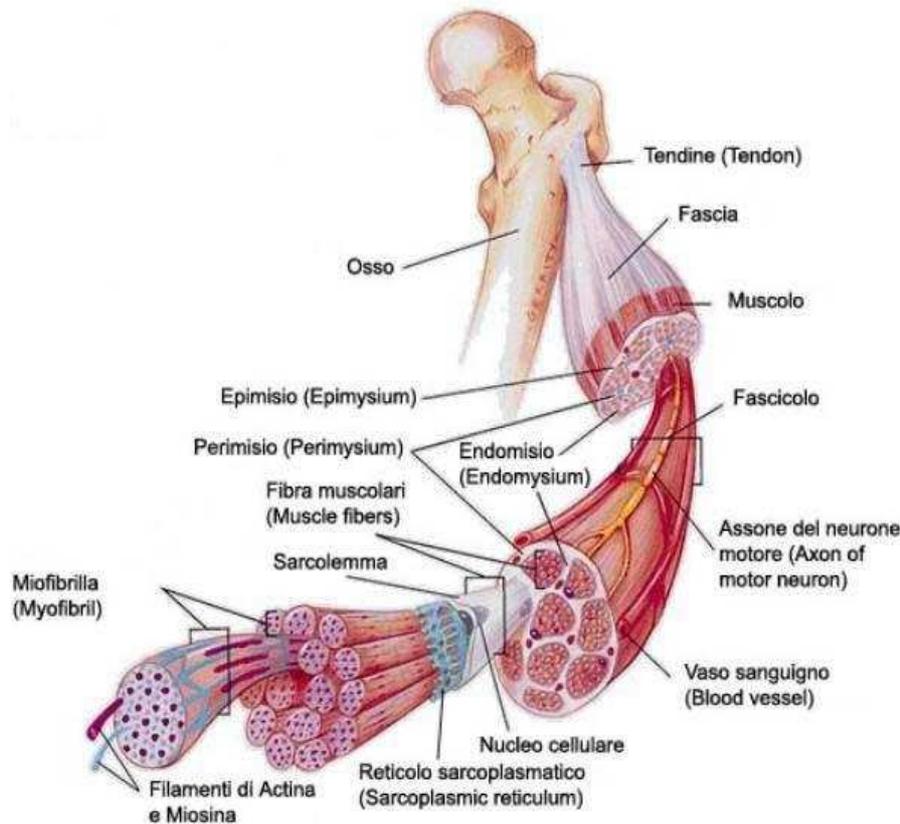


Fig. 1.1 Struttura del muscolo scheletrico.

L'epimisio e l'endomisio sono attraversati da nervi e vasi sanguigni diretti verso le fibre muscolari. I nervi penetrano nei tre strati di tessuto connettivo andando ad innervare la fibra muscolare. La connessione tra il terminale sinaptico del neurone e la fibra avviene a livello delle *giunzioni neuromuscolari*, dove il neurone entra in contatto con la *placca motrice* della fibra.

Una vasta rete di capillari circonda le fibre muscolari in modo tale da fornire ossigeno e sostanze energetiche necessarie a far fronte alle enormi richieste energetiche durante la contrazione muscolare.

Le fibre muscolari, circondate dall'endomisio, sono le unità contrattili del muscolo scheletrico. Ogni fibra è delimitata da una membrana plasmatica chiamata *sarcolemma*, che circonda e racchiude la massa di citoplasma, chiamata sarcoplasma, nella quale sono immerse centinaia di migliaia di miofibrille che, avendo la capacità di accorciarsi, sono responsabili della contrazione muscolare. Infatti, essendo queste ancorate al sarcolemma, la loro contrazione determina l'accorciamento dell'intera fibra muscolare. Ogni miofibrilla a sua volta è costituita da fasci di miofilamenti composti

principalmente da due proteine filamentose, actina e miosina, che, insieme ad altre proteine accessorie come la troponina e la tropomiosina, si organizzano tra di loro in unità ripetitive chiamati sarcomeri (Fig. 1.2).

A livello della fibra muscolare, il sarcolemma si invagina in numerose introflessioni tubulari (tubuli trasversi) che circondano trasversalmente le miofibrille. Addossata perimetralmente alle miofibrille c'è una fitta rete tubulare di reticolo sarcoplasmatico (SR) che, con ampie porzioni di membrana chiamate cisterne terminali, si affaccia estesamente alla membrana dei tubuli trasversi. La struttura formata dal tubulo trasverso con le estensioni delle cisterne terminali prende il nome di triade giunzionale (Fig.1.3). Proprio a livello della triade giunzionale si articola un complesso strutturale proteico deputato alla trasmissione dell'impulso elettrico proveniente dai centri superiori, ed alla sua conversione nel fenomeno della contrazione. Tale meccanismo di conversione del segnale prende il nome di accoppiamento eccitazione-contrazione (E-C), e gli elementi proteici che ne garantiscono lo svolgimento sono:

1. La proteina canale detta recettore della diidropiridina (DHPR), un canale del calcio voltaggio-dipendente della membrana del tubulo trasverso
2. Il canale di rilascio del calcio RyR1, e proteine transmembrana come la triadina e la giunctina sulla membrana delle cisterne terminali.
3. Proteine come FKBP12, la calmodulina, la calsequestrina, e proteine ATPasi Ca^{2+} dipendente che permettono il riassorbimento degli ioni Ca^{2+} nelle cisterne del SR.

Le due proteine canale DHPR e RYR1 sono disposte a livello della triade giunzionale in modo da formare un'unità funzionale. Infatti ogni molecola dell'omotetramero RyR1 si giustappone a quattro canali DHPR, stabilendo con essi un intimo contatto (favorita anche da proteine accessorie, quali la giunctina e calsequestrina). È proprio tale unità funzionale che presiede al meccanismo di accoppiamento E-C muscolare.

La contrazione muscolare è un articolato processo che ha origine nei centri superiori con un impulso elettrico. Questo impulso, raggiunto l'assone del neurone motore, si dirama nelle varie giunzioni neuromuscolari dei fascicoli muscolari, dove genera a livello postsinaptico la depolarizzazione del sarcolemma. Tale depolarizzazione della membrana si trasmette ai tubuli T, determinando il cambiamento conformazionale dei recettori DHPR; il cambiamento conformazionale viene percepito dal canale RyR1 (sulla cisterna terminale) che si apre e genera un flusso di calcio dal reticolo sarcoplasmatico al citoplasma. Lo ione calcio innesca a questo punto la contrazione muscolare. Il Ca^{2+} nel citoplasma si lega a siti specifici sulle molecole proteiche di troponina C ed il complesso troponina/C-tropomiosina si dissocia dall'interazione con i filamenti di actina lasciando scoperti i siti di legame per le "teste" delle molecole di miosina. Queste quindi

legano l'actina, rilasciano il gruppo fosfato dal complesso ad alta energia miosina-ADP-Pi e compiono un movimento di rotazione che consente lo scorrimento dei filamenti di actina. Una volta rilasciato il gruppo fosfato e compiuto il movimento traslazionale dei filamenti di actina, le molecole di miosina possono legare nuovamente le molecole di ATP, rilasciando ADP. Questo complesso miosina-ATP è un complesso a bassa affinità per i siti di legame dell'actina, e si separa quindi dai filamenti di actina. La successiva idrolisi dell'ATP rigenera il complesso ad alta affinità miosina-ADP-Pi che è pronto nuovamente per il legame ad un nuovo sito sui filamenti di actina. La reiterazione di questi cicli di legame actina-miosina, scorrimento filamenti di actina e dissociazione ponti actina-miosina genera macroscopicamente la contrazione delle fibre muscolari.

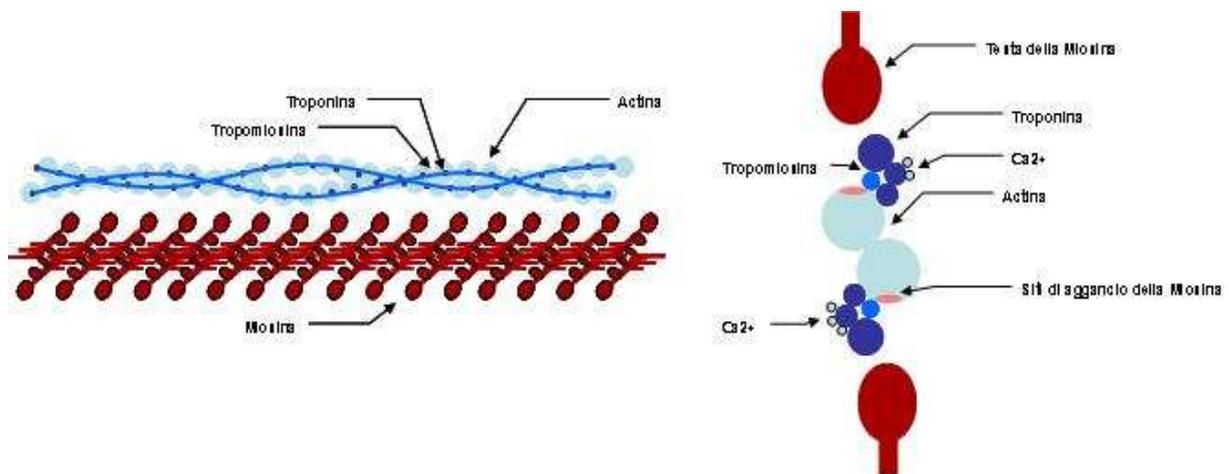


Fig. 1.2 Struttura dell'actina e della miosina

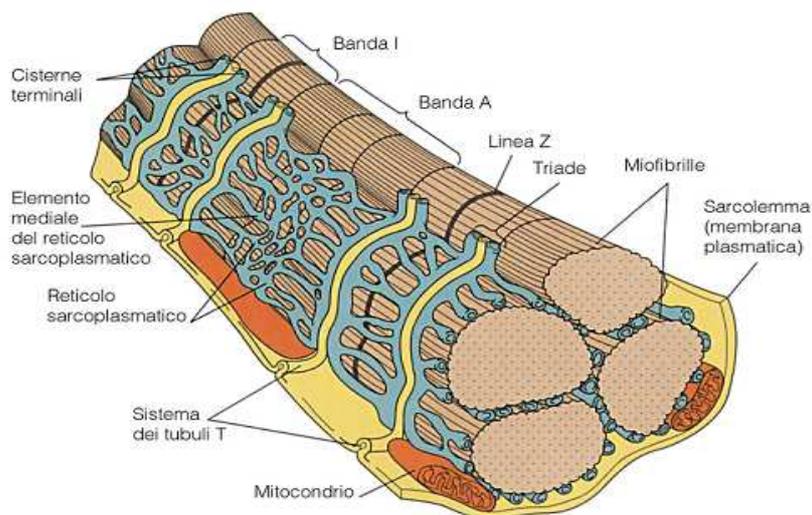


Fig. 1.3 Triade.

1.2 Tipi di fibre muscolari e scheletriche

I muscoli scheletrici adulti sono un insieme di fibre con differenti proprietà fisiologiche; esistono infatti tre tipi di fibre muscolari scheletriche, definite rapide, lente ed intermedie. La differenza tra questi tre gruppi è correlata alla diversa modalità con cui tali fibre procurano ATP necessario alla contrazione.

FIBRE RAPIDE dette anche fibre fast IIB perché esprimono l'isoforma IIB della Catena Pesante della Miosina (MHC). Hanno un elevato diametro, contengono miofibrille fittamente stipate, grandi riserve di glicogeno e pochi mitocondri. La tensione prodotta è direttamente proporzionale al numero dei sarcomeri, e dunque queste fibre in genere sviluppano forze molto elevate. Queste contrazioni potenti, però, richiedono un'enorme quantità di ATP, e gli scarsi mitocondri non riescono a far fronte alla domanda. In tal modo le contrazioni delle fibre rapide sono sostenute primariamente dalla glicolisi anaerobia, che non richiede ossigeno e converte il glicogeno accumulato in acido lattico. Di conseguenza, l'affaticamento di queste fibre si manifesta rapidamente, perché le riserve di glicogeno sono limitate e perché il pH acido dovuto alle alte concentrazioni di acido lattico interferisce con il meccanismo della contrazione.

FIBRE LENTE (fibre rosse) esprimono l'isoforma I della MHC e per questo motivo sono chiamate fibre di tipo I slow; sono fibre il cui diametro è circa la metà di quello delle fibre rapide, e la cui contrazione dopo stimolazione richiede un tempo tre volte più lungo. Possono continuare a contrarsi per tempi prolungati senza mostrare affaticamento, e questo perché i loro mitocondri, più abbondanti rispetto a quelli presenti nelle fibre rapide, possono produrre ATP per tutto il periodo della contrazione. Le fibre lente utilizzano un metabolismo aerobio (i mitocondri assorbono ossigeno per generare ATP), in cui l'ossigeno proviene da due sorgenti, una ricca rete di vasi capillari che dà un elevato apporto di ossigeno alle fibre muscolari attive, e un pigmento rosso chiamato mioglobina. Questa è una proteina globulare strutturalmente simile all'emoglobina (il pigmento in grado di legare ossigeno che si trova nei globuli rossi), anch'essa in grado di legare ossigeno. In tal modo le fibre lente possiedono, anche a riposo, riserve di ossigeno che possono venire mobilizzate al momento della contrazione.

Le fibre muscolari lente contengono, rispetto alle fibre rapide, un numero maggiore di mitocondri disposti attorno ai nuclei o posti in colonna tra le miofibrille. In vicinanza del nucleo e tra le miofibrille vi è un maggior numero di gocce lipidiche. E così, mentre le fibre rapide nei momenti di massima contrazione possono contare soltanto sulle riserve di glicogeno, i mitocondri delle fibre lente consentono loro di contrarsi per periodi prolungati, ottenendo energia anche dal catabolismo di carboidrati e lipidi e persino dalle proteine. Nei muscoli dei maratoneti e di altri atleti che praticano

sforzi prolungati nel tempo predominano le fibre lente, mentre nei muscoli dei sollevatori di pesi o dei saltatori prevalgono le fibre rapide. Tale assetto dipende sia da una predisposizione genetica, sia dal tipo specifico di attività fisica praticata, ma è oggetto di dibattito quanto importante sia l'apporto della genetica e quanto quello dell'allenamento.

FIBRE INTERMEDIE. Hanno caratteristiche intermedie tra i due tipi di fibre descritte in precedenza. Ad esempio, le fibre intermedie si contraggono più rapidamente delle fibre lente, ma più lentamente delle fibre rapide. A questa classe di fibre appartengono le fibre di tipo IIA; come le fibre di tipo I, sono ricche di mitocondri e capillari ma possiedono anche gli enzimi glicolitici. Per queste caratteristiche queste fibre mostrano maggiore resistenza all'affaticamento rispetto alla fibre rapide. Le fibre IIX (chiamate anche IId) sono fibre caratterizzate da un metabolismo di tipo glicolitico e hanno delle caratteristiche intermedie tra le fibre di tipo IIA e quelle di tipo IIB.

1.3 Miogenesi

L'apparato muscolare deriva, con pochissime eccezioni, dal mesoderma embrionale e in particolare i muscoli scheletrici, eccetto quelli della testa, si sviluppano dai somiti, gruppi di cellule che si frammentano da raggruppamenti cellulari, somitomeri, del mesoderma par assiale (Chargé et al., 2004, Parker et al., 2003, Buckingham et al., 2003).

Lo sviluppo dei muscoli scheletrici nei vertebrati avviene attraverso una serie di eventi ben caratterizzati: le cellule precursori si differenziano nella linea miogenica e si sviluppano nei mioblasti che successivamente si fondono a formare i miotubi (elemento sinciziale).

Più tardi, nei miotubi inizia e procede la sintesi delle proteine costituenti i miofilamenti e si organizza il sistema delle miofibrille con un progressivo allungamento per fusione di nuovi mioblasti. Nei miotubi i nuclei si dispongono nella parte centrale del citoplasma e progressivamente, con l'ulteriore produzione di miofilamenti e l'aumento di dimensioni, si ha lo spostamento dei nuclei nella parte periferica e la trasformazione dei miotubi in fibre muscolari differenziate e altamente specializzate.

Il controllo molecolare di ciascuno di questi eventi è stato studiato dai ricercatori e notevoli progressi sono stati fatti durante gli ultimi due decenni del ventesimo secolo, con la scoperta dei geni che codificano per fattori di trascrizione responsabili dell'attivazione del programma muscolare durante lo sviluppo embrionale.

Molti di questi fattori, che sono silenziati nell'adulto in condizioni fisiologiche, vengono riattivati in seguito a traumi, malattie neurodegenerative, denervazione o sollecitazioni muscolari e possono quindi avere un ruolo anche nella miogenesi riparativa.

Principali fattori che intervengono nella miogenesi

La miogenesi è regolata da diversi fattori di trascrizione chiamati MRF dall'inglese "Muscle Regulatory Factors". Gli MRFs appartengono alla superfamiglia dei fattori di regolazione "elica-ansa-elica" (bHLH) e contengono diversi domini funzionali responsabili dell'attivazione trascrizionale, del rimodellamento della cromatina, del legame con il DNA, della localizzazione nucleare e della eterodimerizzazione. Il primo fattore che è stato identificato è MyoD; la sua attivazione porta all'espressione di geni come miogenina, M-caderina, le catene pesante e leggera della miosina e la creatina-chinasi muscolare. Successivamente è stato identificato un altro fattore chiamato Myf5, la cui espressione risulta fondamentale per la determinazione della linea miogenica (Rudnicky et al., 1993).

Anche la miogenina gioca un ruolo fondamentale nella miogenesi; in particolare sembra essere coinvolta nel differenziamento dei mioblasti, mentre non è fondamentale per la formazione della linea miogenica (Parker et al., 2003).

Un altro fattore di trascrizione importante è MRF4; ha una complessa espressione temporale che suggerisce sia un ruolo nella determinazione che un ruolo nel differenziamento terminale della linea miogenica.

Studi ottenuti utilizzando modelli murini mutanti negativi per ognuno di questi fattori o doppi mutanti, hanno permesso di delineare il probabile meccanismo d'azione dei MRFs (Fig.1.4).

MyoD e Myf5 determinano la formazione dei mioblasti e possono essere considerati fattori di specificazione, la miogenina ha un ruolo importante nel differenziamento terminale dei mioblasti in miotubi, mentre MRF4 sembra avere entrambe le funzioni (Berckes et al., 2005).

In base a questo modello, le cellule miogeniche, responsive a MyoD e Myf5, proliferano e prendono il nome di mioblasti. I mioblasti escono dal ciclo cellulare per diventare miociti differenziati, che esprimono le MRFs tardive, miogenina e MRF4, e successivamente geni muscolo-specifici come la catena leggera della miosina (MHC) e la creatina muscolo chinasi(MCK).

In seguito, i mioblasti mononucleati si fondono insieme a formare un sincizio multinucleato, con i nuclei localizzati alla periferia, che eventualmente matura in una fibra muscolare contrattile. Durante lo sviluppo del muscolo, una sottopopolazione di mioblasti smette di differenziarsi, rimanendo associata alla superficie delle miofibre come cellule quiescenti chiamate cellule satelliti. Le cellule satelliti sono in grado di rispondere, nell'adulto, a vari stimoli. Dopo la maturità sessuale, il muscolo scheletrico è un tessuto stabile caratterizzato da fibre muscolari multinucleate (Chargé et al., 2004).

Accanto ai fattori di trascrizione MRF esistono altri fattori come le MEF2 (myocyte enhancer factors 2) che intervengono nella determinazione e nel differenziamento del muscolo scheletrico. Questi fattori sono molto conservati e si pensa possano svolgere un ruolo fondamentale nel differenziamento; inducono l'espressione di geni muscolo-specifici riconoscendo delle sequenze di DNA ricche in AT (Perry et al., 2000; Berkes et al., 2005). Dopo la nascita, l'espressione di MEF2 decresce, ma viene nuovamente ripristinata durante la rigenerazione muscolare (Parker et al., 2003). Oltre ai fattori che stimolano la miogenesi, ci sono dei fattori che invece agiscono come antagonisti (Id, Twist, MyoR e Mist-1) (Berckes et al., 2005), e altri che agiscono come co-attivatori e co-repressori della trascrizione miogenica, come la proteina istone-deacetilasi (HDAC) che regola negativamente l'espressione dei geni muscolo specifici.

L'azione combinata di questi fattori di trascrizione, attivati a sua volta da altre molecole segnale, concorrono alla formazione e al differenziamento del tessuto muscolare attraverso l'induzione di pathways molecolari ben precisi.

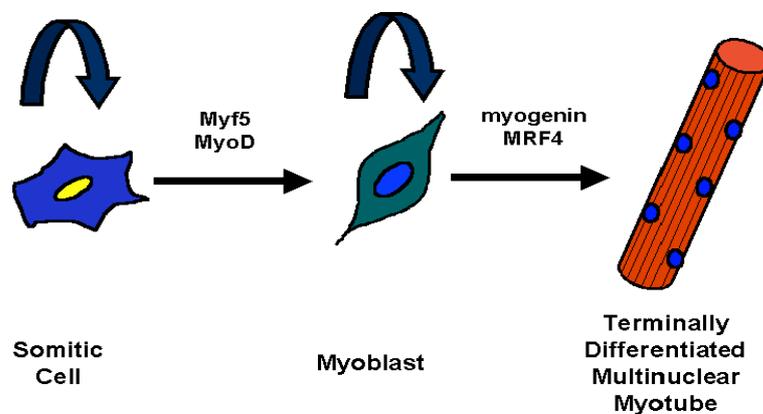


Fig. 1.4 Relazioni genetiche e funzionali degli MRFs

Capitolo 2

Specie reattive dell'ossigeno (ROS) e sistemi antiossidanti

2.1 Specie reattive dell'ossigeno (ROS)

L'ossigeno è una molecola essenziale per la sopravvivenza degli organismi aerobi; tuttavia, a causa della sua struttura atomica che non gli permette di accettare doppietti elettronici, può generare intermedi altamente instabili noti come specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Fig. 2.1) (Gutteridge et al., 2000). Queste specie sono il risultato di successive riduzioni monoelettroniche fino alla completa riduzione dell'ossigeno ad H₂O e possono essere suddivise in due categorie:

- a) i radicali liberi dell'ossigeno (ad es. O₂⁻ e OH[·]), che contengono un elettrone spaiato
- b) le specie non radicaliche (ad es. H₂O₂).

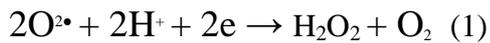
Anione superossido

L'anione superossido è il primo radicale libero che si forma come intermedio durante le reazioni biochimiche di riduzione dell'ossigeno.

Possiede carica negativa e a differenza di altri radicali liberi, ha un'emivita relativamente lunga ed è capace di attaccare un ampio numero di substrati per completare i propri orbitali. L'anione superossido si può formare:

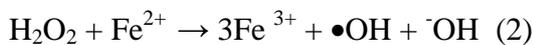
- Per interazione dell'O₂ con gli elettroni che talora sfuggono alla catena respiratoria quando questa funziona a regimi elevati, soprattutto nel passaggio ossido-riduttivo tra coenzima Q e citocromi.
- Nel corso di ossidazioni metallo-dipendenti di molecole tipo adrenalina, noradrenalina o anche alcuni composti tiolici.
- Per produzione diretta in alcune reazioni enzimatiche specifiche quali quelle catalizzate dalle xantine ossidasi, triptofano diossigenasi e indolamine diossigenasi.

Le cellule infiammatorie producono grandi quantità di anioni superossido come meccanismo di difesa nei confronti di batteri o organismi potenzialmente dannosi (Fuchs, 1992). La dismutazione dell'anione superossido spontanea o catalizzata dall'enzima Superossido Dismutasi (SOD) rappresenta la maggiore fonte di perossido di idrogeno nella cellula (1).



Perossido di idrogeno

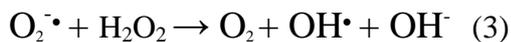
Il perossido di idrogeno (H_2O_2) è una molecola reattiva relativamente stabile, in grado di oltrepassare le membrane e all'interno delle cellule ha un'emivita piuttosto lunga. Oltre che per dismutazione dell'anione superossido, il perossido di idrogeno si può formare anche per produzione diretta in alcune reazioni enzimatiche a livello dei microsomi, perossisomi e mitocondri. Risulta essere citotossico ma è considerato un debole agente ossidante. La tossicità risiede nel fatto che è in grado di dare origine al radicale idrossile attraverso delle reazioni catalizzate da ioni metallici (2).



Radicale idrossile

Nel processo di Haber-Weiss, una molecola di superossido ed una molecola di perossido di idrogeno si combinano per formare una molecola di ossigeno, un equivalente di radicale idrossile ed uno di anione ossidrile.

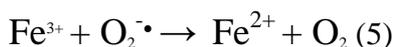
Questo processo è catalizzato dagli ioni Fe^{2+} o Cu^+ (3)



Nelle reazioni di Fenton, una molecola di perossido di idrogeno è convertita in un radicale idrossile ed in un anione ossidrile con contemporanea ossidazione di Fe^{2+} a Fe^{3+} (4)



Il Fe^{3+} così formatosi può, a sua volta, reagire con un radicale superossido secondo la reazione seguente, rigenerando Fe^{2+} che può nuovamente reagire con H_2O_2 nella reazione di Fenton (5).



Va precisato che il ferro, contenuto nelle cellule e nel plasma, è solitamente legato a proteine di trasporto, di deposito e funzionali e, in questa forma, non è mai reattivo. La reazione di Fenton può quindi avvenire solo in presenza di ferro libero. Il ferro si può liberare dalle proteine chelanti in

seguito alla diminuzione del pH, dovuta, per esempio, all'accumulo di acido lattico in seguito ad ischemie, emorragie, traumi e per interazione di $O_2^{\bullet-}$ con la ferritina.

Il radicale idrossile OH^{\bullet} è una molecola altamente reattiva con forti capacità ossidanti e costituisce l'agente responsabile della fase iniziale dei processi perossidativi nei nostri tessuti.

È in grado di collidere e danneggiare tutte le macromolecole cellulari: proteine, acidi nucleici, glicosaminoglicani e soprattutto gli acidi grassi polinsaturi dei fosfolipidi di membrana.

Ossigeno singoletto 1O_2

L'ossigeno singoletto è una forma altamente reattiva di ossigeno molecolare che può nuocere ai sistemi viventi ossidando molecole organiche critiche. È un derivato della molecola di ossigeno in cui tutti gli elettroni di valenza hanno spin opposti. Da studi in vitro è emerso che 1O_2 ossida molte molecole organiche inclusi lipidi di membrana, proteine, aminoacidi, acidi nucleici, nucleotidi, nucleotidi piridinici, carboidrati e tioli. 1O_2 si può formare tramite esposizione a luce ultravioletta (320-380nm) o durante l'attivazione dei macrofagi. L'azione della NADPH ossidasi produce il radicale anione superossido che, spontaneamente o enzimaticamente, dismuta per formare perossido di idrogeno. La mieloperossidasi dei macrofagi o attività perossidasiche correlate, catalizzano la riduzione del perossido di idrogeno per formare l'ossidante acido ipocloroso. L'acido ipocloroso e H_2O_2 reagiscono per formare l'ossigeno singoletto (Powers S.K. et al., 2008).

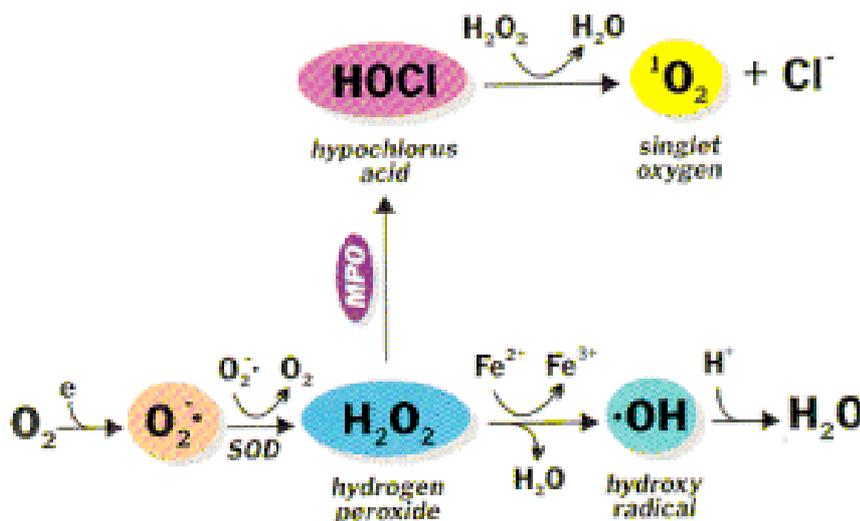


Fig. 2.1: Schema rappresentativo della formazione di ROS

Specie radicali che dell'azoto (RNS)

Accanto ai Ros esiste una famiglia di radicali liberi che interessa l'azoto e che vengono chiamati specie radicaliche dell'azoto (RNS). Appartengono a questa classe, i radicali come l'ossido nitrico (NO^\bullet) che si forma a partire dalla L-arginina in una reazione catalizzata dalla Ossido Nitrico Sintasi (NOS) e che in condizioni fisiologiche svolge una funzione di messaggero intracellulare (Ignaro et al., 1990).

Se a livello cellulare risultano elevati i livelli di superossido e di H_2O_2 , l'ossido nitrico può reagire con queste due molecole portando alla formazione di perossinitrito (OONO^-) che è un composto ad elevata citotossicità, il cui potere ossidante è maggiore di quello dell'anione superossido e del perossido di idrogeno (McCord et al., 2000). Il perossinitrito ha la capacità di reagire con diverse molecole come la CO_2 e a seconda delle condizioni può dare origine ad altri composti ad elevata reattività.

2.2 Principali fonti di ROS nel muscolo scheletrico

I ROS possono essere generati in diversi distretti cellulari sia in condizioni fisiologiche sia in risposta a vari stimoli. A livello delle fibre muscolari i ROS e in particolare l'anione superossido, possono essere prodotti in diversi siti cellulari tra i quali il mitocondrio, reticolo sarcoplasmatico SR, tubuli T, sarcolemma e citosol (Fig. 2.2).

I mitocondri sono considerati il maggior sito di produzione dei ROS (Davies et al., 1982). In particolare durante la fosforilazione ossidativa, processo che porta alla sintesi ATP, circa 1-2% degli elettroni che fluiscono lungo la catena di trasporto, sfuggono dai complessi proteici ed, interagendo con l'ossigeno, generano il radicale superossido soprattutto a livello dei Complessi I e III (Barja et al., 1999). Nel complesso I, gli elettroni provenienti dal NADH prima riducono l'FMN, poi, attraverso una serie di subunità contenenti centri Fe-S, vengono trasportati all'ubichinone (Q) che viene ridotto a ubichinolo (QH_2) e/o semichinone (QH^-). Il sito esatto di sintesi di ROS da parte del Complesso I non è stato ancora definito, ma l'FMN, i centri Fe-S e il QH^- sono considerati le principali sedi da cui possono sfuggire gli elettroni necessari alla formazione del radicale superossido.

La produzione di ROS e, in particolare del radicale superossido, da parte del Complesso III può avvenire sui siti Q_0 o Q_1 , attraverso i quali avviene il trasporto degli elettroni tramite il cyt b.

A livello del muscolo scheletrico altre possibili fonti di ROS potrebbero risiedere nel SR e nei Tubuli Trasversi. Diversi studi hanno evidenziato la presenza di un enzima, la NAD(P)H ossidasi,

associata a livello del SR del muscolo scheletrico (Xia R. et al., 2003, Powers and Jackson, 2008). L'anione superossido generato da questo enzima può stimolare il corretto rilascio del calcio dal SR attraverso l'ossidazione dei recettori della Ryanodina (Cherednichenko G et al., 2004, Hidalgo et al., 2006).

Recenti studi hanno messo in rilievo che anche i Tubuli T del muscolo scheletrico contengono una NAD(P)H ossidasi, la cui attività aumenta in seguito all'arrivo della depolarizzazione (Espinosa A et al., 2006). L'anione superossido prodotto viene rilasciato a livello del citosol della cellula muscolare (Powers S.K. et al., 2008).

Anche la membrana plasmatica può essere considerata come fonte di ROS. Numerosi studi hanno messo in evidenza che le cellule muscolari sono in grado di rilasciare l'anione superossido nello spazio extracellulare (McArdle A et al., 2001). Questo meccanismo sebbene sia ancora poco conosciuto sembra coinvolgere un enzima NAD(P)H ossidasi presente a livello della membrana plasmatica.

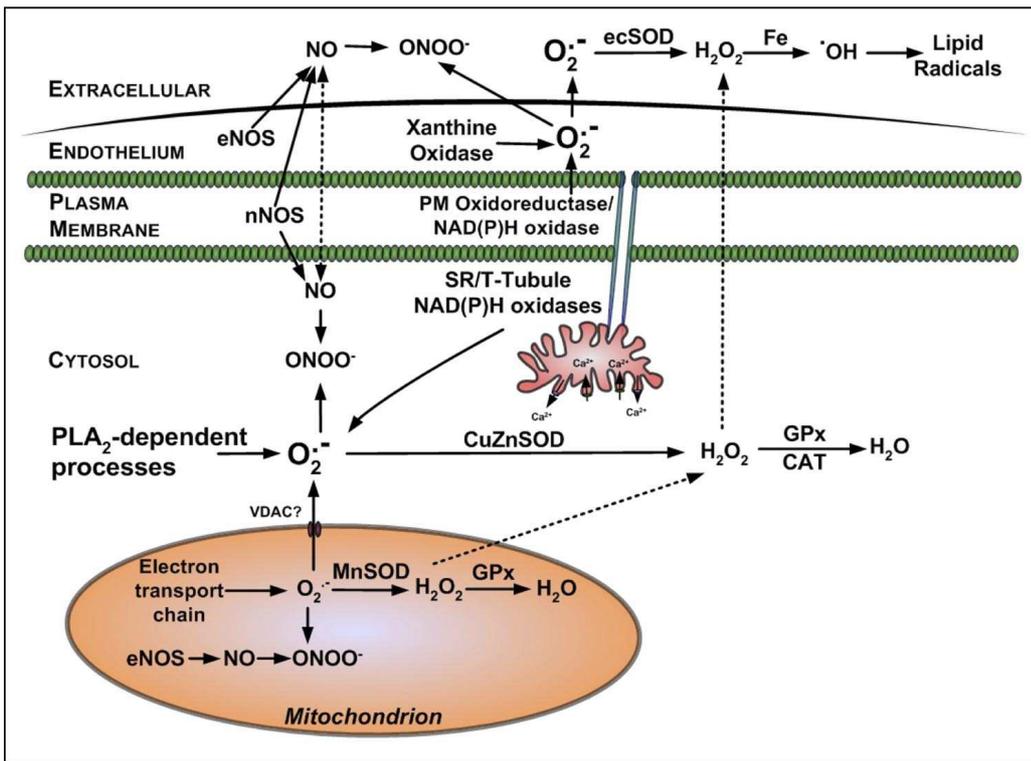


Fig. 2.2: potenziali siti di produzione dell'anione superossido

Accanto a queste potenziali fonti di ROS è stato ipotizzato il coinvolgimento di altri enzimi quali la Fosfolipasi A₂ (PLA₂) e la Xantina Ossidasi.

La PLA₂ è un enzima responsabile del clivaggio dei fosfolipidi di membrana e del conseguente rilascio dell'acido arachidonico che rappresenta un buon substrato per enzimi, come la lipoossigenasi, in grado di generare ROS (Zuo L et al., 2004). L'attivazione della PLA₂ può stimolare la NAD(P)H ossidasi, mentre si è visto che l'aumento della sua attività stimola la produzione di ROS nel mitocondrio, nel citosol e il rilascio degli stessi nello spazio extracellulare (Powers S.K. et al., 2008). L'enzima PLA₂ è presente all'interno delle cellule come due isoforme: PLA₂ dipendenti da calcio (cPLA₂) e PLA₂ indipendente da calcio (iPLA₂); entrambe le isoforme giocano un ruolo importante nella produzione dei ROS.

Un gruppo di ricercatori ha ipotizzato che la iPLA₂ sia la maggior responsabile della produzione di ROS in condizioni di riposo, mentre l'altra isoforma, cPLA₂, sembra essere attivata durante tutti i processi che aumentano la concentrazione intracellulare del calcio, come la contrazione muscolare e lo stress termico (Gong MC et al., 2006).

La Xantina Deidrogenasi (XDH) è un enzima citoplasmatico che in presenza di un ambiente ossidativo o di un'eccessiva quantità di substrati (xantina o ipoxantina) viene convertito a Xantina Ossidasi; quest'ultimo è in grado di produrre anione superossido e perossido di idrogeno. Il ruolo di questo enzima nella produzione di ROS nel muscolo scheletrico è ancora da chiarire.

Sebbene i mitocondri rappresentino il sito di maggiore produzione di ROS, esistono un numero elevato di fonti alternative di specie radicaliche dell'ossigeno.

Resta da chiarire se nel muscolo scheletrico tutti questi possibili siti di produzione di ROS concorrono all'aumento delle specie radicaliche dell'ossigeno o se ci sono delle vie preferenziali. Probabilmente ognuna di queste fonti può essere attivata in situazioni differenti, in modo che i ROS generati sono relativamente localizzati e possono svolgere in maniera settoriale la loro funzione. Per esempio i ROS prodotti a livello del SR o dei Tubuli T possono svolgere un ruolo importante nella regolazione della modulazione del calcio rispetto a quelli generati dai mitocondri o dalle ossidasi extracellulari (Powers S.K. et al., 2008).

2.3 Principali difese antiossidanti

Gli effetti dei radicali liberi possono essere estremamente gravi: potenzialmente possono essere in grado di attaccare qualsiasi molecola del nostro organismo determinando la produzione di numerosi danni che si ripercuotono a livello di cellule, organi e apparati.

Tuttavia l'organismo umano possiede dei sistemi di difesa estremamente efficaci che permettono di neutralizzare i ROS e di bloccare la loro attività ossidante. Gli antiossidanti si possono classificare in antiossidanti primari o di tipo enzimatico e secondari o non enzimatici. Questa classificazione si basa non su un criterio di importanza, ma di sequenza temporale di azione.

Antiossidanti enzimatici o primari

Alla classe degli antiossidanti primari appartengono una vasta gamma di enzimi in grado di detossificare la cellula dai ROS attraverso delle reazioni enzimatiche in cui le specie radicaliche dell'ossigeno perdono la loro reattività e vengono trasformate in sostanze innocue per la cellula (Fig. 2.3)

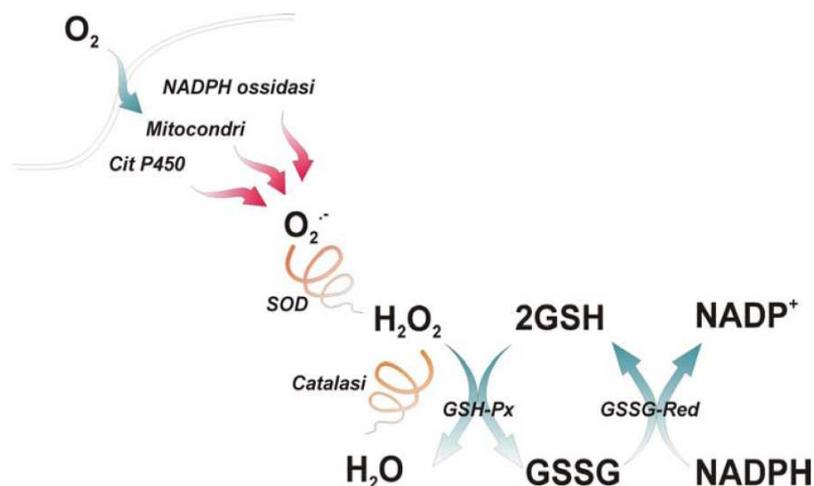


Fig 2.3 Principali difese antiossidanti enzimatiche. SOD (superossido dismutasi); GSHPx (glutazione perossidasi); GSSG-Red (Glutazione Redattasi); Catalasi.

Superossido Dismutasi

L'enzima superossido dismutasi (SOD) è stato scoperto nel 1969 da McCord and Fridovich e rappresenta la prima difesa nei confronti dei ROS e in particolare del radicale superossido. La SOD infatti catalizza la reazione di dismutazione del radicale superossido in perossido di idrogeno e ossigeno molecolare. Nei mammiferi sono presenti tre isoforme dell'enzima SOD (SOD-1, SOD-2 e SOD-3) e tutte hanno la caratteristica di avere un metallo di transizione redox attivo nel loro sito catalitico necessario per catalizzare la reazione di dismutazione (Culotta VC et al., 2006). Le diverse isoforme dell'enzima SOD, codificate da geni diversi, si caratterizzano, oltre che per il diverso catione metallico che funge da cofattore, anche per la diversa compartimentazione; si distinguono una Cu,Zn SOD (SOD1) localizzata principalmente a livello della zona citoplasmatica e nello spazio intermembrana, una Mn SOD (SOD2) principalmente presente nella matrice mitocondriale e una Fe-SOD (SOD-3) localizzata nello spazio extracellulare.

Nei muscoli scheletrici circa il 15-35% della attività totale della SOD risiede nel mitocondrio, mentre il restante 65-85% è nel citosol (Ji LL et al., 1988).

I geni che codificano per le tre famiglie di SOD, ad oggi note, derivano da due geni ancestrali tra loro non correlati. Da uno dei due geni ancestrali deriva il gruppo delle Mn-SOD e delle Fe-SOD,

estremamente diffuso a livello degli organismi aerobi, dai batteri, alle piante fino all'uomo. Dall'altro discende la famiglia delle Cu,Zn-SOD, distribuito esclusivamente tra gli organismi eucariotici.

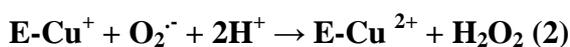
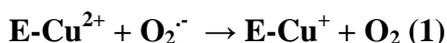
Cu,Zn-SOD

La Cu,Zn-SOD (Fig. 2.4) è costituito da due subunità identiche, ciascuna di 154 amminoacidi (circa 32.000 Dalton) contenente uno ione zinco ed uno ione rame, unite da interazioni deboli non covalenti. La struttura secondaria della Cu,ZnSOD è costituita da foglietti β antiparalleli e presenta due anse che costituiscono il sito di legame allo zinco e il canale elettrostatico attraverso il quale il superossido è guidato verso il sito attivo. Studi di omologia tra enzimi provenienti da specie diverse indicano che numerose regioni sono altamente conservate. Tra queste, oltre al già citato canale elettrostatico, vi è chiaramente la regione legante i metalli.



Fig. 2.4: Struttura tridimensionale della Cu,ZnSOD

La reazione di dismutazione (1, 2) procede tramite due passaggi di uguale velocità: nel primo si ha la formazione di ossigeno molecolare a partire dal radicale superossido con la conseguente riduzione di Cu(II) a Cu(I), mentre nel secondo si ha la riduzione del Cu⁺ da parte di un altro anione superossido rigenerando in questo modo il centro catalitico con produzione di perossido di idrogeno.



Mentre lo ione Cu²⁺ rappresenta il sito catalitico della Cu,ZnSOD, lo ione Zn²⁺ sembra avere unicamente un ruolo strutturale.

Mn-SOD e Fe-SOD

La struttura della Mn-SOD e della Fe-SOD (Fig. 2.5 e 2.6) non è stata ancora dettagliata quanto quella dell'analogo Cu,Zn-SOD; questi enzimi contenenti ferro e manganese hanno subunità molecolari di circa 23.000 Dalton e, mentre l'enzima contenente ferro esiste unicamente in forma dimerica, l'analogo con manganese può esistere sia in forma dimerica sia tetramerica.

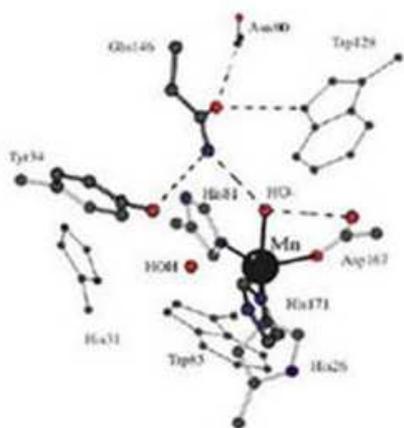


Fig. 2.5: Sito di legame per il metallo della MnSOD

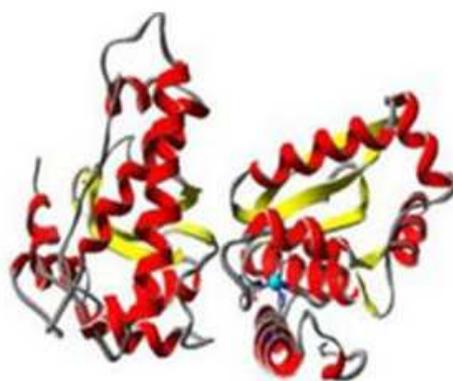


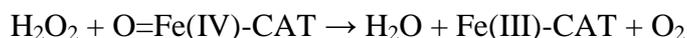
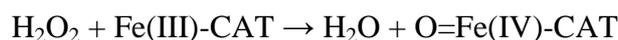
Fig 2.6: Struttura tridimensionale della Fe-SOD

Le poche conoscenze attuali sulle due metallo-proteine sono sufficienti a delineare un meccanismo di reazione abbastanza analogo a quello della Cu,Zn-SOD, ma non per identificare le basi della funzione catalitica. Il meccanismo catalitico della proteina contenente ferro o manganese segue lo schema generale mostrato per la Cu,Zn-SOD, coinvolgendo le coppie di Fe(III)/Fe(II) e di Mn(III)/Mn(II). Si deve comunque considerare che l'efficienza catalitica è leggermente più bassa nell'isoenzima contenente ferro e manganese rispetto alla Cu,Zn-SOD. Le due isoforme, oltre all'inibizione da anioni a singola carica, presentano come svantaggio la sensibilità a valori di pH prossimi alla neutralità (Argese et al., 1983).

Catalasi

Dato che la reazione di dismutazione dell'anione superossido porta alla formazione del perossido di idrogeno, la funzione antiossidante della Cu,ZnSOD è legata all'attività di altri enzimi detossificanti, quali la catalasi e GSH-Px.

La catalasi è un enzima tetramerico ad alto peso molecolare contenente porfirina nel sito attivo. La funzione principale di questo enzima è quella di eliminare il perossido di idrogeno (H_2O_2) ad elevate concentrazioni catalizzando la sua dismutazione ad ossigeno e acqua attraverso una reazione che avviene in due passaggi:



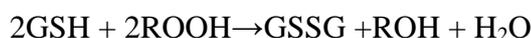
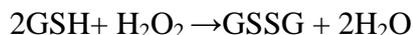
La reazione netta risultante è quindi: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

È stato dimostrato che il livello di espressione proteica dell'enzima è più che altro nelle fibre ossidative, piuttosto che in quelle glicolitiche (Powers S.K. et al., 2008).

Glutathione Perossidasi e Glutathione Reduttasi

Un altro enzima fondamentale nella detossificazione del perossido di idrogeno è la Glutathione Perossidasi (GPX). Nei mammiferi sono state identificate cinque isoforme (GPX-1-GPX-5) che differiscono tra di loro per localizzazione cellulare e tissutale (Tabella 2.1) (Brigelius-Flohe R, 2006). Si tratta di enzimi selenio-dipendente che convertono H_2O_2 o gli idroperossidi organici ad acqua o alcoli (ROH) rispettivamente attraverso l'ossidazione di glutathione ridotto (GSH).

Di seguito viene riportata la reazione di dismutazione del H_2O_2 e gli idroperossidi organici



Property	GPX1	GPX2	GPX3	GPX4	GPX5
Cellular location	Cytosol and mitochondria	Cytosol	Extracellular space and cytosol	Membrane-bound nuclei and mitochondria	Extracellular and membrane bound
Subunit	Tetrameric	Tetrameric	Tetrameric	Monomeric	Dimeric
Molecular mass, kDa	21	22	22.5	19	24
Tissue location	All tissues	Stomach, intestine	All tissues	Testes, spermatozoa, heart, brain	Epididymis, spermatozoa, liver, kidney

Tabella 2.1: Principali caratteristiche fisiche e localizzazione tissutale degli enzimi GPX

Sebbene tutte le GPX catalizzano apparentemente la stessa reazione, ogni enzima differisce sia per la localizzazione cellulare (citosol, mitocondrio, ecc) che per la specificità del substrato (Brigelius-Flohe R, 1999). Per esempio la GPX-4 è un enzima associato alle membrane che agisce a livello degli idroperossidi dei fosfolipidi di membrana (Ursini et al. 1986). Analogamente a quanto avviene per la SOD anche le GPX sono maggiormente espresse nelle fibre di tipo slow piuttosto che nelle fibre fast.

Un altro enzima coinvolto nella detossificazione di substrati ossidati è Glutathione-S-Transferasi (GST-transferasi) che catalizza la coniugazione del GSH direttamente ai substrati ossidati che

vengono poi eliminati dall'organismo. Nell'uomo e nei mammiferi sono state identificate e caratterizzate 7 diverse classi di glutatione S-transferasi appartenenti ad un'unica famiglia di enzimi solubili citosolici e, solo recentemente, sono state identificate altre due famiglie di enzimi a localizzazione rispettivamente mitocondriale e microsomiale (MAPEG) (Hayes, J.D, 2005).

L'attività sia delle GPX che delle GST comporta un abbassamento del livello totale del GSH intracellulare ed un aumento del GSSG; al fine di mantenere costante il rapporto GSH/GSSG, il GSSG viene rilasciato dalla cellula e degradato nell'ambiente extracellulare. Il GSH può essere rigenerato attraverso la sintesi *ex novo* o attraverso riduzione della forma ossidata GSSG ad opera della glutatione reduttasi (GR), una flavoproteina che permette di convertire GSSG in GSH utilizzando come agente riducente il NADPH. La fonte di NADPH nel muscolo scheletrico è essenzialmente garantita dall'enzima isocitrato deidrogenasi.

Il GSH può essere sintetizzato *ex novo* attraverso due reazioni sequenziali, ATP-dipendenti, catalizzate rispettivamente dalla γ -glutamilcisteina sintetasi (γ GCS), la cui attività limita la velocità di sintesi, e dalla glutatione sintetasi (Fig. 2.7).

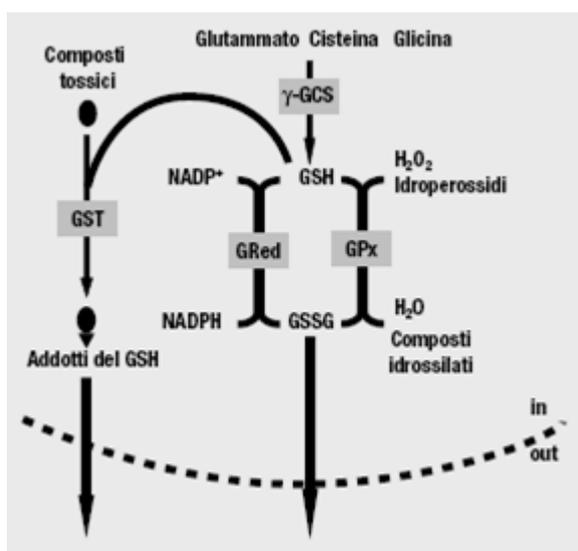


Fig. 2.7: Ciclo del Glutatione

Tioredoxina

Un altro enzima antiossidante è la tioredoxina-1 (Trx-1), è una piccola proteina di 105 aminoacidi molto conservata. Nel suo sito catalitico, infatti, si trovano due residui di cisteina che riducono i ponti disolfuro (S-S) su altre proteine che sono state bersaglio dell'azione dei radicali liberi dell'ossigeno. Cedendo due equivalenti riducenti, la Trx-1 così riduce la proteina bersaglio per divenire ossidata a sua volta. La tioredoxina reduttasi 1 (TxR1) è il suo corrispondente enzima rigenerante, il quale utilizza gli equivalenti riducenti del cofattore $NADPH^+$ (derivato dalla

vitamina PP o nicotinamide) per trasferirli sulle cisteine ossidate della Trx-1. In tal modo, il sito catalitico della Trx-1 è rigenerato ed è pronto a riconvertire altre proteine cui certi residui di cisteina sono stati ossidati.

La Trx1 è presente nel citoplasma ed è facilmente inducibile da molti tipi di stress (ROS, raggi UV ecc).

Antiossidanti non enzimatici o secondari

Accanto agli antiossidanti enzimatici, esiste una classe di antiossidanti non enzimatici che hanno la funzione di implementare le difese antiossidanti ripristinando, per esempio, il pool dei tioli oltre ad agire di per sè come scavenger dei radicali liberi.

Tra gli antiossidanti non enzimatici troviamo il GSH, che oltre ad essere un substrato per le GPX e le GST, può agire direttamente da scavenger di radicali liberi durante i processi di detossificazione del perossido di idrogeno e degli idroperossidi lipidici.

Il GSH è un tripeptide ed è considerato il regolatore non enzimatico più importante dell'omeostasi redox intracellulare. È presente ubiquitariamente in tutti i tipi di cellule; in particolare nelle fibre di tipo slow la sua concentrazione è di circa 2-3 mM, mentre nelle fibre di tipo fast è di circa 0,5 mM (Leeuwenburgh C, et al., 1997).

Un altro antiossidante non enzimatico è il coenzima Q che svolge la sua azione a livello della catena mitocondriale del trasporto degli elettroni. Anche le vitamine A, E, C sono considerate antiossidanti non enzimatici e vengono assunte con la dieta.

Proteine citoprotettive: Heat Shock Proteins

La produzione di proteine da shock termico, negli organismi viventi, può essere indotta da parte di qualsiasi stress, ma più frequentemente da quello termico e per questo motivo prendono il nome di *heat shock proteins*. I primi studi su queste proteine risalgono al 1962 quando cellule delle ghiandole salivari di *Drosophila busckii*, esposte ad alta temperatura, mostravano dei rigonfiamenti ("puff") accompagnati da un aumento nell'espressione di proteine con masse molecolari comprese tra 26 e 70 KDa (Ritossa, 1962). Le Hsp sono state identificate praticamente in tutte le specie appartenenti agli eubatteri, archea e organismi superiori animali e vegetali. Inoltre è stata verificata una considerevole somiglianza fra le Hsp nelle differenti specie, il che è indice di una differenziazione precoce del corso evolutivo che le rende conservate in tutti gli organismi viventi. Questo, inoltre, suggerisce l'esistenza di una simile funzione protettiva in tutti gli organismi. Molte delle proteine da stress sono presenti a bassi livelli, anche nelle cellule non stressate o a condizioni

fisiologiche (Halliwell e Gutteridge, 1999). La funzione principale delle Hsp è di ridurre al minimo gli effetti dannosi di un qualsiasi stress. Uno degli effetti più comuni dello stress sulle proteine è la perdita della loro struttura terziaria, responsabile della completa perdita di funzionalità del sito attivo. Le proteine da stress sono chaperones molecolari, e hanno, quindi, il compito di garantire il corretto ripiegamento e il ripristino della struttura nativa. Sono state classificate in sei famiglie, essenzialmente sulla base del peso molecolare: hsp100 (100-110 kDa), hsp90 (83-90 kDa), hsp70 (66-78 kDa), hsp60, hsp40 e le small hsp (15-30 kDa). Esse si trovano in diversi compartimenti cellulari dove sono deputate a svolgere specifiche funzioni. La famiglia delle Hsp110 è costituita da proteine associate con la componente fibrillare del nucleolo, sito nella cromatina nucleolare o rDNA (Lindquist and Craig, 1988). I membri appartenenti alla famiglia Hsp90 cooperano nel trasporto delle proteine attraverso il reticolo endoplasmatico. La famiglia Hsp70 è la più conservata e la più studiata e comprende la forma inducibile Hsp70, la forma espressa costitutivamente Hsc70, la forma mitocondriale Hsp75, e la forma localizzata nel reticolo endoplasmatico, Grp78. Le proteine appartenenti alla famiglia delle Hsp60 danno origine ad un apparato complesso composto da due tipi di subunità. Hsp60 (GroEL in *E. Coli*) è formata da due anelli eptamerici impilati l'uno sull'altro che vanno a delimitare una cavità centrale. Questa cavità ha il compito di alloggiare le proteine non correttamente ripiegate e instaurare legami non covalenti col peptide attraverso residui idrofobici. A questa struttura si associa Hsp10 (GroES in *E. Coli*) che svolge la funzione regolativa e provoca variazioni conformazionali che portano al rilascio del peptide ripiegato. Le Hsp40, come le Hsp60, sono coinvolte in processi di stabilizzazione e di corretto ripiegamento delle proteine nascenti. La più studiata e caratterizzata è DnaJ di *E.coli* che, agisce come cochaperone con DnaK (Hsp70). Tutte le Small HSP/ α -cristalline hanno subunità minori di 35 kDa e sono caratterizzate dalla presenza di una sequenza omologa di circa 80 residui, denominata "crystallin domain." Le α -cristalline sono presenti abbondantemente nella lente dei mammiferi (35%), costituite da due subunità, α A e α B, membri della famiglia delle small Hsp (shsp). Le α A si ritrovano principalmente nella lente con tracce negli altri tessuti, mentre le α B sono presenti ubiquitariamente, il meccanismo molecolare di interazione tra le α -cristalline e i substrati rimane in gran parte sconosciuto. Alle α B cristalline appartiene anche la Hsp27 che come gli altri membri della famiglia agisce con chaperon molecolare prevenendo l'aggregazione delle proteine denaturate. in risposta a stress fisiologici come stress da calore e stress ossidativo. L'isoforma inducibile della proteina HSP-70 è costitutivamente espressa nei muscoli slow piuttosto che in quelli Fast. In seguito a vari stress come ischemia esercizio fisico in entrambi i muscoli si ha un'attivazione della HSP-70i che non è solo correlata con la transizione verso un fenotipo slow ma anzi rivela la sua azione nella risposta allo stress (Tarricone et al., 2008).

2.4 Stress Ossidativo e danno cellulare

Il termine stress ossidativo è stato introdotto per la prima volta nel 1989 da Sies che lo definì come uno squilibrio tra la produzione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) e i sistemi di difesa antiossidanti. In condizioni fisiologiche la cellula mantiene al suo interno uno stato riducente grazie ad un bagaglio di enzimi e molecole che controbilanciano la produzione di ROS.

Se la generazione di ROS eccede le capacità antiossidanti della cellula stessa, o si verifica una diminuzione dei meccanismi di detossificazione, si viene ad instaurare una nuova condizione che prende il nome di stress ossidativo. Questa condizione sembra giocare un ruolo di primaria importanza in numerose patologie spesso associate ad atrofia muscolare, come cancro, traumi e altre malattie neurodegenerative (Tisdale MJ, 1997; Monani U R, 2005). È stato dimostrato che lo stress ossidativo è un elemento chiave nei processi di invecchiamento (Porter MM et al., 1995; Fulle S et al., 2004).

I danni provocati dai ROS

Lo stress ossidativo quindi deriva da un aumento dei ROS; queste molecole sono caratterizzate dall'aver una notevole reattività chimica che le rende molto instabili ed in grado di ossidare le catene idrocarburiche degli acidi grassi insaturi, i residui amminioacidici delle proteine, i carboidrati e le basi azotate degli acidi nucleici. Il danno ossidativo da parte dei ROS porta, in casi estremi, all'alterazione e alla compromissione della funzione di tutte le strutture e le macromolecole cellulari con conseguente morte cellulare (Davies, 1987).

Perossidazione lipidica

La perossidazione dei lipidi si ha a livello degli acidi grassi polinsaturi, contenuti in elevate concentrazioni soprattutto nei fosfolipidi delle membrane cellulari.

Il processo consiste in una serie di reazioni a catena in cui gli acidi grassi insaturi dei fosfolipidi di membrana si trasformano progressivamente in radicali lipidici ($L\bullet$), radicali perossidi ($LOO\bullet$) e perossidi lipidici ($LOOH$). Questi ultimi possono decomporsi facilmente in diverse specie quali alcossidi lipidici ($LO\bullet$), aldeidi (malondialdeide, MDA), alcani, epossidi lipidici e alcool.

Anche il colesterolo può subire modificazioni dello stesso tipo dando origine ad epossidi e alcool. In seguito a tali processi degenerativi, le membrane della cellula diventano rigide perdendo la fluidità e la funzione di permeabilità selettiva che le contraddistingue (Spiteller, 2006).

Ossidazione delle proteine

Per quanto riguarda le proteine, le reazioni ossidative provocate dai radicali liberi hanno come conseguenza la proteolisi o la loro aggregazione aberrante. È stato dimostrato su proteine purificate che l'azione dei ROS altera completamente le proprietà chimico-fisiche caratteristiche della proteina stessa. È stato osservato infatti sia una variazione del punto isoelettrico (causata da ossidazioni dei gruppi -R degli amminoacidi mediante carbonilazione) (Davies, 1987) sia un'alterazione del peso molecolare dovuta alla formazione di legami intramolecolari o alla scissione della proteina in frammenti peptidici (Salo et al., 1990; Wolff et al., 1986). Questi cambiamenti provocano l'attivazione di specifici enzimi proteolitici e conseguente degradazione della proteina (Dean et al., 1993). La carbonilazione, laddove avvenga in maniera lieve e progressiva, è associata alla perdita irreversibile della funzione della proteina che viene eliminata dal proteasoma e dunque permette la sopravvivenza cellulare. L'eccessiva ossidazione e il conseguente cross-linking rende, invece, le proteine resistenti alla degradazione proteolitica e determina l'insorgenza della morte cellulare (Dalle Donne et al., 2006).

Tra le proteine enzimatiche, che per prime risentono dell'attacco dei radicali liberi e che quindi si denaturano, sono da ricordare la fosfofruttochinasi I (enzima chiave della via glicolitica) e il complesso I della catena respiratoria. L'inattivazione di questi due enzimi porta ad una riduzione del metabolismo energetico cellulare.

Danni agli acidi nucleici

Per ciò che riguarda gli acidi nucleici, è stato dimostrato che le alterazioni ossidative inibiscono irreversibilmente i processi di trascrizione, traduzione e replicazione del DNA portando alla prematura senescenza e alla morte cellulare (Harman, 1981; Schraufstatter et al., 1988). Il danno ossidativo a carico del DNA può tradursi nella rottura dei filamenti (doppi e singoli), nella formazione di legami crociati DNA-DNA (o DNA-proteine), scambio dei cromatidi fratelli, modificazione delle basi azotate. Tutti e quattro i nucleotidi, infatti, possono subire modificazioni ossidative, anche se le pirimidine (citosina e timidina) sembrano essere le più suscettibili ai processi di idrossilazione, saturazione, apertura o condensazione dell'anello imidazolico. Inoltre, la guanina può andare incontro alla formazione di un derivato ossidato, quale l'8-oxoguanina (8-oxoG), che si rinviene spesso come comune denominatore di patologie neurodegenerative come il Morbo di Parkinson, la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) e l'Alzheimer. Data l'immediata vicinanza al sito di produzione dei ROS, il DNA mitocondriale rappresenta il primo bersaglio della tossicità dei

ROS. Il DNA mitocondriale ha, infatti, una maggiore insorgenza di mutazioni spontanee rispetto a quello nucleare, data anche la relativamente scarsa complessità dei sistemi di riparo del DNA in questo compartimento (Kakkar et al., 2007). In ogni caso, le mutazioni insorte nel DNA mitocondriale determinano, in ultimo, l'ulteriore produzione di superossido e l'attivazione della cascata apoptotica mitocondriale (Ricci et al., 2008).

2.5 Ruolo fisiologico dei ROS e concetto di ormesi.

La definizione di stress ossidativo, intesa come aumento delle specie ossidanti con conseguente danno al DNA, proteine e lipidi, è un concetto che è stato ultimamente rivisto.

La produzione di ROS non ha solo effetti dannosi per la cellula; esistono svariati esempi che dimostrano il ruolo fondamentale dei ROS nei processi fisiologici cellulari (Brigelius-Flohè R., 2009). L'anione superossido prodotto dai fagociti, svolge un'azione di difesa nei confronti di infezioni batteriche, mentre il perossido di idrogeno, considerato come prodotto derivante del mal funzionamento della catena mitocondriale, può agire come regolatore chiave nei meccanismi apoptotici (Gogvadze et al., 2008). Anche i ROS prodotti da enzimi come la lipoossigenasi sono considerati importanti mediatori nelle risposte infiammatorie.

Inoltre nel corso decennio che va dal 1980 al 1990 è stata ampiamente accettata l'idea che l'attività (esercizio fisico) o l'inattività (immobilizzazione, denervazione) muscolare sia associata ad un aumento della produzione di ROS e si pensava che questo aumento delle specie radicaliche dell'ossigeno potesse avere azione citotossica per le fibre muscolari. Davies et al., osservarono per la prima volta nel 1982, un aumento dei ROS nel muscolo scheletrico in seguito ad esercizio fisico; successivamente l'aumento dei ROS è stato evidenziato anche nelle fibre muscolari sottoposte a lunghi periodi di disuso (immobilizzazione) (Kondo H et al 1991). Recenti evidenze però, indicano che l'aumento dei ROS ha un ruolo importante nella regolazione dei meccanismi molecolari richiesti per l'adattamento del muscolo scheletrico in risposta ad esercizio fisico o inattività muscolare.

Quindi appare evidente il duplice ruolo dei ROS: da un lato queste molecole sono potenzialmente dannose per la cellula, dall'altro lato svolgono un ruolo di regolazione in svariati processi. Questa duplice funzione, probabilmente dovuta a differenze nella produzione di ROS sia per durata che per quantità, può essere spiegata con il concetto di ormesi che viene usato in tossicologia per esprimere l'andamento della risposta dei sistemi biologici in seguito ad esposizione ad agenti tossici. Si tratta di una curva dose-risposta con andamento a campana (Fig.2.8). Nel caso dei ROS, un aumento moderato e di breve durata dei ROS nei muscoli scheletrici può attivare quei meccanismi molecolari

che portano la cellula ad adattarsi e a proteggersi da eventuali stress successivi; elevate concentrazioni di ROS per lunghi periodi invece, potrebbero attivare altre vie di segnalazione con conseguente proteolisi e morte cellulare (Ji LL. et al., 2006).

Nei prossimi due capitoli verranno meglio descritti il ruolo dei ROS in due condizioni opposte: esercizio fisico e denervazione.

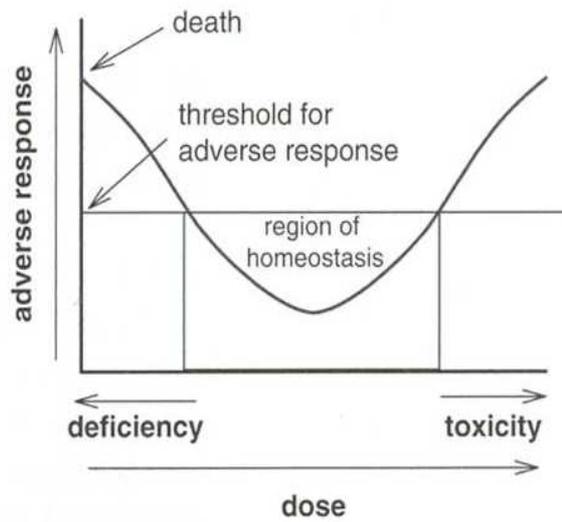


Fig. 2.8: Ormesis: curva dose-risposta

Capitolo 3

Esercizio fisico e denervazione

3.1 Plasticità muscolare

Il muscolo scheletrico adulto è un tessuto molto stabile con un basso turnover di nuclei. È stato stimato che in un muscolo di ratto adulto, in condizioni normali, solo 1-2% dei mionuclei siano rimpiazzati ogni settimana (Chargé et al., 2004). In realtà il muscolo scheletrico mostra un'enorme plasticità e malleabilità in risposta a numerose condizioni sia fisiologiche che patologiche. Infatti il muscolo scheletrico ha la capacità di cambiare struttura e funzione in risposta a fattori che possono modificare la sua attività contrattile (l'esercizio fisico, la stimolazione elettrica e la denervazione), a stimoli che possono modificare il carico (esercizio di resistenza e microgravità) ed ad altri fattori ambientali come la mancanza di substrati, l'ipossia e lo stress termico.

La straordinaria capacità del muscolo di adattarsi con grande facilità ai cambiamenti ambientali e ai diversi stimoli provenienti dall'esterno comporta la modificazione di compartimenti cellulari (mitocondri, miofibrille, ecc.) ed extracellulari (capillari, nervi, tessuto connettivo). Questi adattamenti strutturali e funzionali che modificano il fenotipo del muscolo scheletrico sono il risultato di una rapida variazione dell'espressione di geni chiave che vengono attivati o silenziati a seconda della loro funzione.

Questa duttilità del muscolo è stata osservata in tutti i vertebrati anche se con una certa variabilità tra le diverse specie e tra gli individui della stessa specie (Flück M. et al., 2003).

3.2 Esercizio fisico: principali caratteristiche

Dati clinici e studi epidemiologici supportano l'idea che l'esercizio fisico moderato aerobico regolarmente eseguito possa esercitare un'azione benefica sui disturbi e sulle malattie che colpiscono il miocardio e il muscolo scheletrico. Infatti l'esercizio fisico può ridurre il rischio di patologie cardiocircolatorie, come coronaropatie, ictus ed ipertensione arteriosa, e degenerative, come aterosclerosi e diabete di tipo II. Queste evidenze hanno indotto i ricercatori a cercare di capire i meccanismi molecolari alla base di questi eventi. Diversi studi hanno dimostrato che l'esercizio induce tolleranza all'ischemia/riperfusion, IR (Powers S K et al. 2004, Marini M et al. 2007) e che quindi potrebbe agire come un evento pre-condizionante in grado di proteggere il cuore da eventuali insulti di maggiore entità (Powers S K et al. 2008).

A livello muscolare, l'esercizio fisico induce numerosi cambiamenti e adattamenti strutturali delle fibre muscolari che sono il frutto dell'attivazione di vari pathways molecolari e dell'espressione di numerosi geni. Le modifiche del fenotipo che sottolineano l'enorme plasticità del muscolo, variano a seconda del tipo di esercizio fisico, della frequenza, dell'intensità e della durata. In genere si classifica l'allenamento fisico come allenamento volto ad incrementare la forza o volto ad incrementare la resistenza del muscolo (force training o endurance training). Il "force training" comporta esercizi che richiedono uno sforzo molto intenso ma che vengono ripetuti poche volte (es. sollevamento pesi, salto ecc). Questo tipo di esercizio fisico si basa sull'aumento del carico, che porta ad un aumento della forza e della massa muscolare. È associato ad ipertrofia delle fibre muscolari e, in particolare, di quelle che si basano sul metabolismo glicolitico anaerobico; i suoi effetti sul sistema cardiovascolare sono marginali.

L'"endurance training" consiste nell'effettuare esercizi di intensità moderata, ma ripetuti più volte. Porta all'incremento della capacità aerobica delle fibre muscolari e, di conseguenza, migliora le capacità aerobiche dell'organismo, influenzando anche l'efficienza del sistema respiratorio e cardiovascolare.

L'esercizio fisico moderato sarà oggetto di questa tesi e nei prossimi paragrafi verranno chiariti i principali meccanismi che si attivano e che concorrono all'adattamento del muscolo all'esercizio fisico.

3.3 Principali adattamenti del muscolo scheletrico sottoposto ad esercizio fisico moderato

È stato dimostrato che l'esercizio fisico moderato aumenta le capacità ossidative e il consumo degli acidi grassi; inoltre promuove la proliferazione mitocondriale e la trasformazione delle fibre di tipo fast a slow.

Switching delle fibre muscolari e adattamenti metabolici

La composizione delle fibre del muscolo scheletrico può essere fortemente influenzata da aumenti dell'attività neuromuscolare come nel caso dell'esercizio fisico.

È ormai noto che l'esercizio fisico moderato porta ad una maggiore espressione delle miosine (MHC) di tipo slow nei muscoli prevalentemente costituiti da fibre fast, contribuendo ad una graduale transizione delle fibre fast a slow. La transizione fast-to-slow è un processo controllato principalmente da una via di segnalazione calcio dipendente che coinvolge la Calcineurina-NFAT/MEF2. L'aumento di calcio citosolico nel muscolo attiva la calcineurina che va a defosforilare i

fattori di trascrizione NFAT e MEF2. Contemporaneamente anche la proteina chinasi calcio dipendente CaMKII libera MEF2 dal suo inibitore HDAC; i fattori di trascrizione una volta attivati, traslocano nel nucleo e inducono la trascrizione di diversi geni tipici di un fenotipo slow-ossidativo come le isoforme slow delle MCH (Fig.3.1) (Fluck M. et al., 2003, Koulmann N. et al., 2006).

Il coinvolgimento dei fattori di trascrizione della miogenesi (MRFs) nei meccanismi di adattamento che si verificano in seguito ad esercizio fisico rimane ancora poco chiaro, sebbene la miogenina sembra essere implicata nei processi che portano ad un aumento delle capacità ossidative del muscolo.

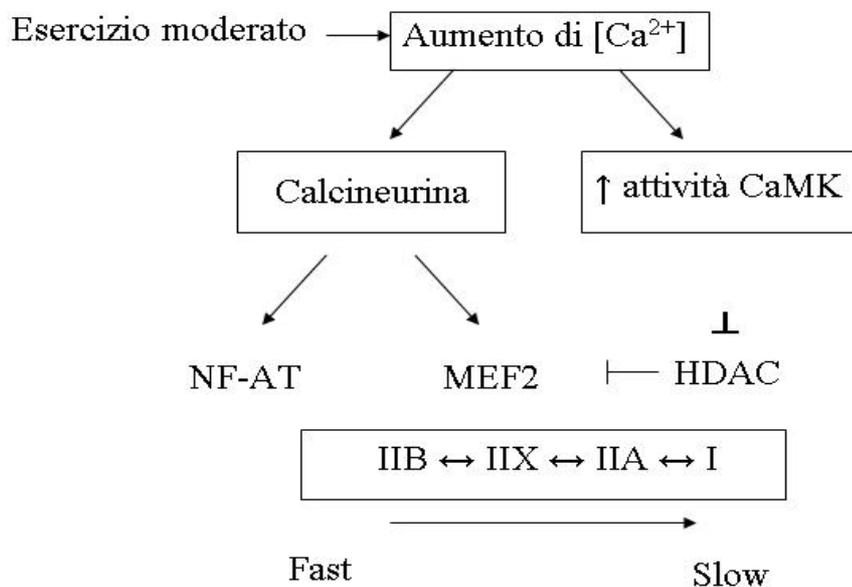


Fig. 3.1 Transizione delle isoforme MHC da fast a slow

Parallelamente alla transizione delle isoforme MHC da fast a slow, l'esercizio fisico induce nel muscolo scheletrico dei cambiamenti metabolici che coinvolgono diverse vie di segnalazione e che portano ad un aumento delle capacità ossidative.

Protagonista è sempre l'aumento del calcio intracellulare che porta all'attivazione delle chinasi CaMK; contemporaneamente all'aumento del calcio, l'esercizio fisico comporta anche un maggior dispendio energetico, con consumo di ATP e aumento di AMP. Bassi livelli di ATP e alti livelli di AMP attivano una chinasi attivata da AMP (AMPK) che ha il ruolo quindi di controllare la disponibilità energetica (Freyssenet D, 2007). Entrambe le chinasi traslocano nel nucleo e, attraverso l'attivazione del co-attivatore trascrizionale PGC-1alpha, promuovono l'attivazione della biogenesi mitocondriale e la sintesi di enzimi ossidativi. PGC-1alpha, infatti regola l'espressione di fattori di trascrizione come NFR-1 e NFR-2 che promuovono la trascrizione di geni codificanti per

proteine mitocondriali (Hood D et al., 2006,) e di fattori di trascrizione come Tfam che direttamente stimola la replicazione e la trascrizione del DNA mitocondriale. L'attivazione di questi fattori, portando ad un aumento dell'attività respiratoria, dell'espressione degli enzimi del ciclo di Krebs e della catena di trasporto degli elettroni, determina l'adattamento del mitocondrio all'esercizio.

Un'intensa attività contrattile stimola l'aumento del trasporto di glucosio; infatti, è stato osservato che l'esercizio fisico aumenta l'espressione dell'mRNA del trasportatore di glucosio GLUT-4 (MacLean PS et al., 2002) e stimola la sua traslocazione dallo spazio intracellulare alla membrana plasmatica e ai tubuli T. Tuttavia è stato dimostrato che l'attività della AMPK non è necessaria per l'aumento dell'espressione dell'RNA in seguito ad allenamento (Holmes B F et al., 2004).

L'esercizio fisico porta ad un aumento del consumo di lipidi favorendo selettivamente l'espressione di enzimi coinvolti nel metabolismo e nell'ossidazione degli acidi grassi come MDAC, VDAC e PPAR α (Horowitz JF et al., 2000).

Esercizio fisico, ipossia e angiogenesi

Accanto ai cambiamenti metabolici, è stato dimostrato che l'esercizio fisico porta ad una diminuzione della pressione parziale di ossigeno con formazione locale di piccole zone ipossiche (Koulmann N et al., 2006). Uno dei principali fattori che si attivano in condizioni di ipossia è HIF-1 (Hypoxia-inducible factor); si tratta di una famiglia di fattori di trascrizione in grado di indurre l'espressione di geni coinvolti in un'ampia varietà di processi tra cui l'angiogenesi e l'eritropoiesi. È stato ipotizzato che la diminuzione della tensione di ossigeno nel muscolo scheletrico possa essere lo stimolo chiave per l'induzione della neo-angiogenesi. La formazione di nuovi vasi infatti potrebbe facilitare il trasporto di ossigeno e far fronte alle richieste energetiche del muscolo scheletrico sottoposto ad esercizio fisico. L'angiogenesi è fortemente regolata da un fattore VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) che è prodotto dalle cellule endoteliali e perivascolari. VEGF è positivamente regolato da citochine, fattori di crescita e ipossia attraverso HIF-1. Il legame di VEGF al suo recettore KDR attiva una cascata di segnali che portano in ultima analisi ad un aumento della formazione di nuovi vasi. È stato dimostrato che l'attività fisica comporta un aumento sia di VEGF che KDR (Koulmann N et al., 2006). L'attivazione di queste vie di segnalazione concorre all'aumento delle capacità ossidative del muscolo.

Esercizio fisico e ROS

L'aumento della velocità del consumo di ossigeno in seguito ad esercizio fisico può provocare un incremento della produzione di ROS come risultato di una non completa riduzione dell'ossigeno stesso. Già nel 1982 Davies e colleghi osservarono un aumento della produzione di ROS nel muscolo scheletrico sottoposto ad attività fisica. Questa maggiore generazione di ROS in un primo momento è stata associata al concetto di stress ossidativo e quindi ad un danno alle fibre muscolari. Recenti dati però assegnano ai ROS un ruolo fisiologico nella regolazione di numerosi processi cellulari. In questa ottica i ROS prodotti in seguito ad esercizio fisico sembrano essere delle molecole chiave nei meccanismi di adattamento del muscolo scheletrico sottoposto ad esercizio fisico (Brooks et al., 2008). Infatti si pensa che la produzione di ROS associata ad esercizio fisico potrebbe essere quantitativamente limitata o controbilanciata da un' aumentata produzione di sistemi antiossidanti. Tale ipotesi è corroborata da diversi lavori, che mostrano che in seguito ad esercizio fisico si ha un aumento delle difese antiossidanti, come la superossido dismutasi e catalasi, e di enzimi citoprotettivi come HSP-70 (McArdle, et al., 2001, McArdle 2004).

Se da un lato l'aumento di ROS porta ad un aumento delle difese antiossidanti, i ROS possono anche agire come fattori di regolazione andando a regolare le risposte adattative del muscolo scheletrico. È stato recentemente dimostrato che i ROS regolano positivamente la trascrizione di PGC-1 α attraverso una via di segnalazione che coinvolge la AMPK (Irrcher et al., 2009). L'attivazione di PGC-1 α , come descritto in precedenza, determina un aumento della biogenesi mitocondriale e contribuisce alla trasformazione del metabolismo del muscolo, che tenderà a divenire progressivamente sempre più di tipo ossidativo.

Oltre ad essere coinvolti nell'attivazione di PGC-1 α , i ROS regolano diverse vie di segnalazione, quali la via di Nf κ B e di Ap-1, coinvolte nella regolazione positiva di enzimi antiossidanti (Brooks et al., 2008).

Inoltre è stato osservato che i ROS possono indurre la produzione di citochine infiammatorie chiamate "miochine", che si pensa svolgano un ruolo come anti-infiammatori apportando effetti benefici sia a livello locale che sistemico (Scheele et al., 2009).

È stato inoltre dimostrato che l'esercizio fisico promuove anche la trascrizione di enzimi coinvolti nel riparo del DNA (Radák et al., 2002), mentre regola negativamente l'espressione di proteine pro-apoptotiche quali BAX (Siu et al., 2004, Adhietty et al., 2007).

Tuttavia fattori come il tipo di esercizio, la durata, l'intensità, l'età dei soggetti, i tessuti e le fibre esaminate possono influenzare l'instaurarsi e l'attivazione dei pathways descritti. Questo concorre all'enorme eterogeneità dei dati presenti in letteratura.

3.4 Denervazione: principali caratteristiche

L'innervazione è un fattore di fondamentale importanza per il supporto strutturale e l'integrità funzionale del muscolo scheletrico. Danni a livello dei nervi o del midollo spinale associati a traumi, malattie neurodegenerative e normali processi di invecchiamento portano a denervazione delle fibre muscolari. Carlson BM et al., (2002), osservarono che la perdita di innervazione (denervazione) nel muscolo scheletrico è associata ad un declino della massa muscolare e della forza dovuto ad atrofia e ad un decremento delle miofibrille. In particolare Carlson B, (2002) dimostrò che la perdita della funzione è antecedente alla perdita della struttura (Fig. 3.2).

Il muscolo sottoposto a denervazione va incontro ad una serie di cambiamenti; si possono distinguere in tre fasi: in un primo momento il muscolo diventa atrofico con progressiva trasformazione delle miofibre verso un fenotipo fast. Successivamente l'atrofia diventa sempre più severa e si assiste ad una perdita dell'organizzazione sarcomerica; nell'ultima fase si ha una progressiva sostituzione delle miofibre con tessuto adiposo e connettivo.

La perdita della funzione correla con un alto numero di modificazioni delle proprietà morfologiche biochimiche e fisiologiche del muscolo scheletrico frutto dell'attivazione di varie vie di segnalazione e dell'espressione di un ampio range di geni.

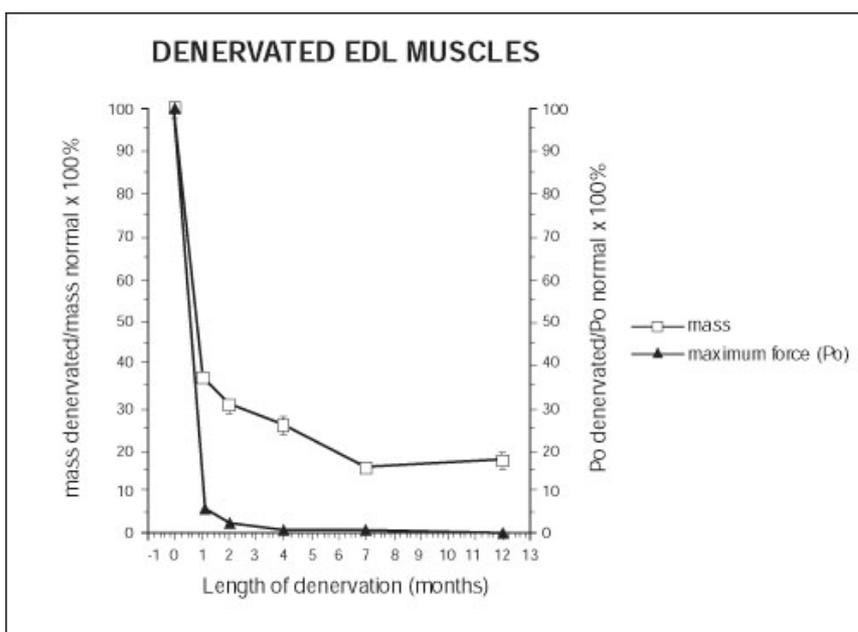


Fig. 3.2 Declino della forza e della massa nel muscolo denervato.

3.5 Principali adattamenti del muscolo scheletrico sottoposto a denervazione

Transizione delle fibre muscolari da slow a fast

La denervazione porta a drammatici cambiamenti e adattamenti del muscolo scheletrico che riflettono la grande malleabilità e plasticità del muscolo scheletrico.

Uno dei principali cambiamenti che si verifica in seguito a denervazione è una transizione delle fibre muscolari verso un fenotipo fast e in taluni casi si ha una completa perdita delle fibre di tipo slow (Fluk et al., 2003). Infatti, in seguito a denervazione è stato evidenziato un aumento dell'isoforma fast della catena pesante della miosina (MHC) e in particolare dell'isoforma IIX (Burnham et al., 1997).

Nel muscolo scheletrico in seguito a denervazione, si assiste ad un aumento dei fattori di trascrizione della miogenesi, come MyoD, miogenina e MRF4, sia a livello di mRNA (Eftimie et al., 1991, Adams et al., 1995) che di proteina (Dedkov et al., 2003).

È stato ipotizzato che MRF4 regola i geni che codificano per le proteine dell'apparato contrattile e per le subunità dei recettori dell'acetilcolina che risultano maggiormente espresse in seguito a denervazione (Adams et al., 1995 Weis et al., 2000). MyoD e miogenina invece, si pensa possano svolgere un ruolo nel regolare i geni coinvolti nel metabolismo e nella transizione delle fibre verso un fenotipo fast. Anche la defosforilazione del fattore MEF2 è coinvolto nell'induzione dell'espressione delle MHC II (Fig.3.3).

L'aumento di questi fattori della miogenesi può essere coinvolto nell'attivazione delle cellule satelliti e nei processi di rigenerazione e formazione di nuove fibre muscolari (Kostrominova et al., 2005, Lapalombella et al., 2008).

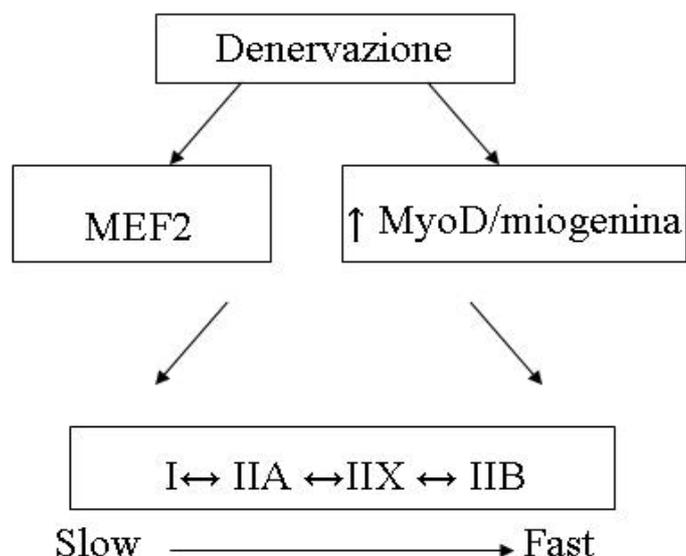


Fig. 3.3 Transizione delle isoforme MHC da slow a fast

Denervazione e processi degenerativi

Le prime fasi successive al trauma sono accompagnate dall'attivazione di neutrofili e macrofagi, che agiscono nell'ambito di un processo infiammatorio.

Sebbene i macrofagi possano lisare le cellule muscolari attraverso la produzione di ossido nitrico (NO) sia in vivo che in vitro, portando ad un danneggiamento del muscolo, ci sono parecchie evidenze che indicano il coinvolgimento dei macrofagi nella riparazione e nel rimodellamento del muscolo danneggiato (Chargé et al., 2004)

Recenti studi hanno dimostrato che anche l'apoptosi può essere coinvolta nella degenerazione muscolare a seguito della denervazione. Nel muscolo si assiste a quella che viene chiamata apoptosi nucleare che, piuttosto che portare alla morte della fibra muscolare, serve per ridurre il numero dei mionuclei per fibra contribuendo all'atrofia muscolare.

In seguito a denervazione, il rapporto Bax/Bcl-2 aumenta, come pure la concentrazione citosolica dei fattori apoptogenici mitocondriali. Anche la cascata delle Caspasi risulta essere attivata durante la denervazione (Siu et al., 2005).

La denervazione induce un intenso rimodellamento della matrice extracellulare (ECM) (Goetsch et al., 2003). La matrice extracellulare (lamina basale) è costituita da una serie di proteine, come il

collagene di tipo IV e la laminina, immerse in una sostanza, simile ad un gel e costituita soprattutto da proteoglicani; essa sembra avere un ruolo nel processo di riparazione del muscolo.

Le proteine matrice metalloproteinasi, MMPs, rappresentano una famiglia di enzimi proteolitici che mediano la degradazione di vari componenti della ECM durante lo sviluppo embrionale, la morfogenesi e il rimodellamento tissutale. Partecipano a molti processi patologici in cui è coinvolta la ECM, come metastasi e processi infiammatori. A livello muscolare svolgono un ruolo importante nella crescita, nello sviluppo del muscolo e nel processo di riparazione.

Esse sono endopeptidasi calcio/zinco dipendenti e vengono indotte da citochine; la loro azione è controllata da un gruppo di enzimi inibitori delle MMPs, TIMPs, enzyme tissue inhibitors of matrix metalloproteinase.

Una delle più importanti MMPs è la matrice metalloproteinasi di tipo 2, MMP-2, che è regolata a parecchi livelli.

Oltre ad avere un ruolo nella degradazione del collagene IV, MMP-2 è coinvolta nei processi degradativi dell'elastina, della fibronectina, della laminina e di molte altre proteine localizzate nella ECM (Carmeli et al., 2004).

Denervazione e ROS

Produzione di ROS e disfunzioni a carico del mitocondrio sono associate ad atrofia muscolare da disuso. Kondo e colleghi (1991) osservarono per la prima volta, che le molecole ossidanti giocano un ruolo importante nella regolazione dei meccanismi che contribuiscono al rimodellamento del muscolo in seguito ad atrofia. L'aumento della produzione di ROS è associata a diverse situazioni correlate con una diminuzione della massa muscolare. Infatti è stato dimostrato che la produzione di ROS aumenta nei mitocondri durante i normali processi di invecchiamento ed è correlata ad atrofia muscolare (Muller et al., 2007).

Mutanti negativi per la SOD-1 ($Sod1^{-/-}$) mostrano un aumento di ROS con conseguente perdita della massa muscolare (Muller et al., 2006, Muller et al., 2007). Inoltre malattie neurodegenerative come la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) sono correlate ad un aumento dello stress ossidativo (Debrowolny G. et al., 2008, Muller F.L. et al., 2007).

L'aumento della produzione di ROS è stata osservata anche nel mitocondrio di muscoli sottoposti a denervazione chirurgica (Muller F.L. et al., 2007).

I ROS possono contribuire all'atrofia muscolare attraverso la regolazione di pathways molecolari e di diversi enzimi coinvolti nei processi di proteolisi come le calpaine, la caspasi-3 e la via dell'ubiquitina-proteosoma.

In particolare, le calpaine sono degli enzimi che si attivano in presenza di un aumento di calcio citosolico libero. La produzione di ROS gioca un ruolo chiave nell'omeostasi del calcio favorendo un aumento dello stesso a livello citoplasmatico. Infatti è stato osservato che l'ossidazione dei recettori della rianodina porta ad un aumento del rilascio del calcio dal reticolo sarcoplasmatico; inoltre una produzione elevata di ROS può inattivare la SERCA e ritardare il riassorbimento del calcio nel reticolo stesso (Powers et al., 2008).

Anche la Caspasi-3 può essere attivata dai ROS e si è visto che promuove la degradazione dei complessi actina-miosina (Powers et al., 2010).

I ROS sono coinvolti nella regolazione del sistema ubiquitina-proteasoma stimolando la coniugazione dell'ubiquitina al proteine muscolari.

Scopo della tesi

Il muscolo scheletrico è un tessuto dotato di enorme plasticità e duttilità. Infatti in risposta a stimoli esterni che ne modificano l'attività contrattile (come da un lato l'esercizio fisico e dall'altro la denervazione), il muscolo scheletrico è in grado di modificare la sua struttura per adattarsi meglio alla nuova condizione.

Dati epidemiologici e studi clinici indicano che l'esercizio fisico induce numerosi effetti benefici a livello del miocardio e del muscolo scheletrico. Infatti la pratica di un'attività fisica regolare e moderata porta ad un miglioramento del benessere e ad una minore incidenza di malattie a carico del sistema cardiovascolare. Questo spiega la crescente attenzione da parte della comunità scientifica verso l'esercizio fisico. Tuttavia molti di questi dati riguardano l'esercizio fisico di intensità più elevata, quello praticato in genere dagli sportivi, mentre si conoscono ancora poco i processi molecolari che si attivano nell'esercizio fisico moderato. Inoltre molti dei lavori presenti in letteratura non sono confrontabili e ciò è dovuto all'impiego di protocolli che differiscono uno dall'altro per intensità, durata e frequenza di allenamento. Gli aspetti che abbiamo indagato in questo lavoro sono associati in particolare agli adattamenti cui va incontro il muscolo scheletrico e all'eventuale aumento della sua resistenza agli stress, in analogia con quanto è stato già approfondito per il sistema cardiovascolare.

L'innervazione è un fattore molto importante per il supporto e l'integrità funzionale del muscolo scheletrico. Traumi, malattie neurodegenerative o invecchiamento sono alcune delle cause che possono essere associate alla perdita di innervazione. Negli ultimi anni il crescente interesse verso queste problematiche da parte di studiosi e ricercatori, associato allo sviluppo di tecniche innovative, ha portato a numerosi progressi in questo campo, che hanno delineato un quadro più chiaro degli eventi molecolari associati alla perdita di innervazione. Infatti, al declino funzionale del muscolo sottoposto a denervazione è associato un intenso processo di degenerazione e rigenerazione, caratterizzato da un elevato numero di modificazioni morfologiche, biochimiche e fisiologiche, che si riflettono in una variazione di numerosi geni, molti dei quali implicati nel metabolismo e nell'adattamento muscolare alla nuova condizione. Questi studi sono comunque in numero limitato e non hanno chiarito numerosi aspetti riguardanti le modificazioni morfologiche funzionali dovute alla denervazione, importanti per esplorare possibili interventi terapeutici e rigenerativi.

È stato ipotizzato il coinvolgimento dei ROS nei meccanismi che portano all'adattamento del muscolo sia all'esercizio fisico sia alla denervazione. Tuttavia però rimangono ancora molti punti da chiarire circa i ruoli che potrebbero essere svolti dai ROS, ossia quelli associati ai danni, sia

strutturali sia funzionali, da essi prodotti, sia quelli associati al meccanismo di segnalazione nelle vie metaboliche; infine, la sede di produzione dei ROS nel meccanismo di denervazione è ancora tutta da chiarire.

Lo scopo di questo elaborato è quello di comprendere i meccanismi molecolari e gli adattamenti morfo-funzionali che vengono indotti in seguito ad esercizio fisico aerobico moderato o a denervazione; infatti, i due processi sono chiaramente opposti: mentre l'esercizio fisico è associato ad un aumento dell'attività contrattile e a un aumento della massa muscolare e della sua vascolarizzazione, la denervazione nel muscolo scheletrico porta necessariamente ad atrofia, con un declino della massa muscolare e della forza, un decremento delle miofibrille e della vascolarizzazione.

Particolare attenzione è stata rivolta verso l'analisi dello stress ossidativo che risulta coinvolto nell'induzione dei cambiamenti fenotipici del muscolo scheletrico in entrambi i modelli sperimentali. Questo ci ha portato a valutare le variazioni dell'espressione genica e, in taluni casi l'espressione proteica e l'attività, di enzimi che svolgono un ruolo chiave nei meccanismi di adattamento, al fine di confermare e di estendere le conoscenze presenti in letteratura per meglio chiarire le dinamiche di questi processi.

Capitolo 4

Materiali e metodi

4.1 Animali e protocolli

Animali. Gli esperimenti di questo lavoro riguardanti sia gli studi relativi alla denervazione che all'esercizio fisico sono basati sull'utilizzo di un modello animale e in particolare sull'uso di ratti appartenenti alla razza Sprague-Dawley e aventi due mesi di vita. Gli animali sono stati stabulati in gabbie singole ad una temperatura di $21 \pm 2^\circ\text{C}$ alternando dodici ore di giorno a dodici ore di buio. I ratti sono stati alimentati secondo una dieta standard senza limitazioni e il loro stato di salute periodicamente controllato. Abbiamo scelto il modello animale perché ci permette di avere omogeneità del campione, di minimizzare le variabili confondenti (stili di vita differenti, fumo, ecc) e di poter studiare i meccanismi molecolari. La scelta dell'età (dodici settimane) deriva dall'analisi comparativa della curva di crescita nell'uomo e nel ratto.

Protocollo di denervazione. La denervazione chirurgica è stata condotta dal gruppo del Prof. Ugo Carraro dell'Università di Padova. Gli animali, dopo essere stati anestetizzati, sono stati sottoposti al taglio del nervo sciatico di entrambi gli arti posteriori a livello del troncatero in modo da bloccare il contatto tra il nervo afferente e il muscolo Tibiale Anteriore; un frammento di nervo (circa 1cm) è stato rimosso e il troncone periferico è stato legato. Il troncone prossimale, invece, è stato suturato su un muscolo superficiale per ridurre la possibilità di reinnervazione e ottenere una denervazione permanente di entrambe le zampe. Gli animali, dopo l'intervento chirurgico di denervazione, recuperavano velocemente una moderata capacità di locomozione.

A tempi definiti dopo la denervazione (quindici giorni, tre mesi o 9 mesi), i ratti sono stati sacrificati e il muscolo Tibiale Anteriore (TA) è stato isolato asepticamente e velocemente pesato. Successivamente i muscoli sono stati congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino al momento dell'uso. Per questi esperimenti sono stati utilizzati sedici ratti suddivisi in quattro gruppi, ognuno costituito da quattro animali: il gruppo dei ratti sacrificati dopo quindici giorni della denervazione (15gg), il gruppo dei ratti sacrificati dopo tre mesi dalla denervazione (3 mesi); il gruppo dei ratti sacrificati dopo nove mesi dalla denervazione (9 mesi); il quarto gruppo, quello dei controlli (Ctr), è invece costituito da animali che non sono stati sottoposti a denervazione chirurgica.

Il TA anteriore della zampa sinistra è stato utilizzato per la valutazione della perossidazione lipidica e dell'attività dei canali ionici, mentre il muscolo controlaterale è stato usato per tutte le altre analisi. Tutti gli esperimenti sono stati approvati dal Comitato Etico dell'Università di Padova.

Protocollo di allenamento. L'allenamento è stato condotto dal gruppo IEFSAS di Milano. Gli allenamenti e i sacrifici dei ratti sono stati eseguiti secondo le norme sull'utilizzo degli animali da laboratorio approvate dal Comitato Etico dell'Autorità Sanitaria di Milano, secondo le Direttive CEE 86/609.raggiunta.

Per questi esperimenti sono stati utilizzati venti ratti; dopo una settimana di acclimatamento, 10 animali sono stati scelti, in maniera del tutto casuale, per essere sottoposti ad esercizio fisico. Essi sono stati preventivamente fatti correre su di un nastro trasportatore specifico per ratti, ad un ritmo di 10 m/min, senza inclinazione, ogni giorno per una settimana. Dopo aver preso confidenza con il tipo di esercizio richiesto, i ratti sono stati sottoposti al vero e proprio allenamento. Gli animali sono stati allenati per 14 settimane ed hanno effettuato l'esercizio un'ora al giorno per tre volte a settimana. Alla fine del protocollo di allenamento i ratti raggiungevano progressivamente circa il 55% $VO_2 \text{ max}$ (Wisloff et al 2001) con una velocità di 30 m/min a pendenza nulla (0%). (Fig. 4.1) Gli animali di controllo (N=10) sono stati posizionati su un nastro trasportatore non in funzione, durante le sessioni di allenamento.

I ratti sono stati sacrificati 48h ore dopo l'ultima sessione di esercizio e i muscoli Soleo ed EDL sono stati isolati asetticamente, pesati e immediatamente congelati in azoto liquido. I muscoli prelevati sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'uso.

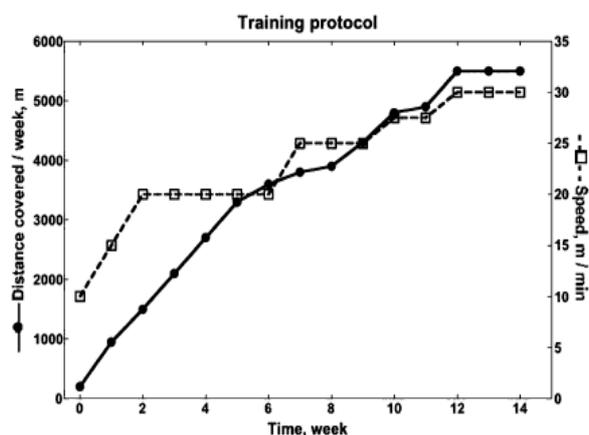


Fig.4.1 Carico dell'esercizio fisico (distanza percorsa per settimana) e velocità di corsa raggiunta settimanalmente dai ratti allenati

4.2 Estrazione dell'RNA da tessuto di muscolo

I tessuti di muscolo (Soleo, EDL e TA), ancora congelati, sono stati ridotti in polvere utilizzando un pestello e un mortaio sterili. Circa 100mg di polvere di ciascun campione è stato omogeneizzato usando 1ml del reagente TRIZOL[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA). Il TRIZOL[®] è una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato in grado di lisare i tessuti e di dissolvere i vari componenti pur mantenendo l'integrità dell'RNA (Chomezynsky e Sacchi, 1987). I campioni, una volta omogeneizzati, sono incubati per 5 minuti a temperatura ambiente per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. Al fine di eliminare il materiale insolubile (proteine, grassi e polisaccaridi), i campioni sono stati centrifugati a 12000 x g per 10min a 4°C e il surnatante è stato trasferito in un tubo tipo eppendorf sterile al quale sono stati aggiunti 0,2 ml di cloroformio. I tubi sono stati agitati vigorosamente per 15 secondi fino ad ottenere una sospensione lattiginosa. I campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per 2-3 minuti e successivamente sono stati centrifugati a 12.000 x g per 15 minuti a 4°C.

A seguito della centrifugazione, la soluzione si separerà in due fasi: una fase inferiore organica, corrispondente al fenolo-cloroformio nella quale si trovano le proteine, e una fase superiore acquosa contenente esclusivamente l'RNA. All'interfaccia tra le due fasi si stratifica il DNA. Facendo attenzione a non prelevare il DNA, la fase acquosa è stata prelevata e trasferita in un tubo tipo eppendorf sterile e addizionata di 0,5 ml di alcool isopropilico per favorire la precipitazione dell'RNA. I campioni sono stati incubati Over Night (ON) e successivamente centrifugati a 12.000 x g per 10 minuti a 4°C.

L'RNA, invisibile prima della centrifugazione, forma un pellet gelatinoso in fondo alla provetta. Il supernatante è stato rimosso e il pellet è stato lavato con 1ml di EtOH al 75% agitando vigorosamente. I campioni sono stati centrifugati a 7.500 x g per 5 minuti a 4°C per rimuovere l'etanolo e il pellet è stato asciugato all'aria e infine risospeso in 40 µl di H₂O DEPC.

La concentrazione dell'RNA estratto è stata determinata misurando l'assorbanza a 260 nm allo spettrofotometro (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech Cambridge, Inghilterra), mentre la sua purezza è stata valutata attraverso il rapporto A280/A260; per ciascun campione questo rapporto è risultato compreso tra 1.8 e 2, che è indice di buona purezza.

4.3 Analisi della qualità dell'RNA

Analisi dell'integrità dell'RNA

L'integrità dell' RNA isolato da ciascun campione è stata esaminata valutando la qualità delle bande 28S (4.7 kb) e 18S (1.9 kb) in un gel denaturante all'1% di agarosio sottoposto ad elettroforesi orizzontale in un Buffer TAE (1X) (TRIS-acetato 40mM, EDTA 1 mM, pH 7.5). Le bande sono state visualizzate mediante Bromuro di Etidio in presenza di raggi UV (Fig. 4.2). I campioni che presentavano delle bande dell'rRNA nette, quindi non degradati, sono stati usati per i passaggi successivi. Qualche campione che appariva degradato è stato riestratto.

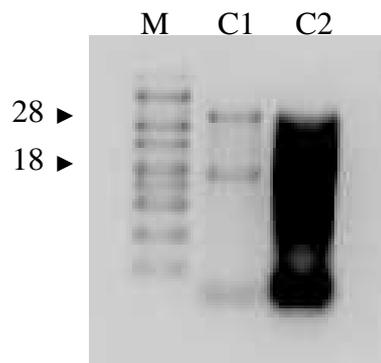


Fig 4.2: Gel rappresentativo di campioni di RNA di muscolo non degradati (C1) e degradati (C2). M: Marker RNA Ladder Fermentas

PCR di controllo per valutare la presenza di DNA genomico

L'eventuale presenza di DNA genomico contaminante è stata valutata amplificando i campioni di RNA con la tecnica della PCR (Polimerase Chain Reaction) ideata nel 1983 da Kary B. Mullis. La PCR è un processo ciclico che consente di ottenere centinaia di migliaia di copie di DNA a partire da un filamento bersaglio. Si basa sull'uso di due primer di lunghezza pari a 18-20 nucleotidi, che sono disegnati in modo da essere esattamente complementari alle corrispondenti sequenze fiancheggianti il tratto di DNA da amplificare e sull'attività della DNA polimerasi. La reazione è divisa in tre stadi; il primo è quello della **denaturazione** che viene effettuata a temperatura di 94°C per separare i due filamenti della molecola stampo. La reazione successiva è quella dell' **annealing** che avviene a temperature inferiori a quella della denaturazione in modo da consentire ai primer di appaiarsi alle sequenze complementari. La temperatura di annealing è un parametro variabile che dipende dal primer stesso e che in genere è compreso tra 50-60°C. Il terza fase è quella della **polimerizzazione** o **estensione** che è condotta a 72°C, temperatura ottimale per la DNA polimerasi del batterio termofilo *Thermus aquaticus* (Taq DNA polimerasi), enzima che viene usato nella maggior parte delle applicazioni.

Nel nostro caso sono stati utilizzati dei primers specifici per il promotore della Keratina 19 di ratto il cui prodotto di amplificazione è di 160 bp (left: tggtcactctctctccat, right: cataaggcatttggcacctt). Il promotore, infatti, è un elemento genico presente nel DNA che non viene trascritto, per cui, se l'RNA estratto è completamente puro, ci aspettiamo di non ottenere alcuna banda nel gel di agarosio (1%) corrispondente a 160 bp, eccetto che nel pozzetto dove è stato caricato il controllo positivo (DNA di milza di ratto).

La PCR viene effettuata utilizzando il Taq PCR Core kit (QIAGEN). Seguendo il protocollo del fornitore, a ciascun campione di RNA (1µl) sono stati aggiunti 2.5µl di 10x Buffer (contenente MgCl₂ 15 mM), 0.5µl di deossinucleotide mix (10mM dNTP), 0.25µl di ciascun primer 20µM, 0.25µl di Taq DNA Polimerasi (5U/µl) ed acqua sterile per un volume finale di 25µl. Il termociclatore PTC-100™ (Peltier Thermal Cycler) è stato programmato per effettuare i seguenti step:

94°C, 3 min.	}	40 cicli
94°C, 30 sec. (denaturazione)		
61°C, 1 min. (annealing)		
72°C, 1 min. (estensione)		
72°C, 10 min.		

Dopo l'amplificazione i campioni sono stati fatti correre su un gel di agarosio al 1% a 70 mV per 90 min.; la presenza di bande di DNA amplificato di lunghezza 160 bp nella maggior parte dei campioni di RNA (Fig. 4.3) ha reso necessario il trattamento con DNAsi.

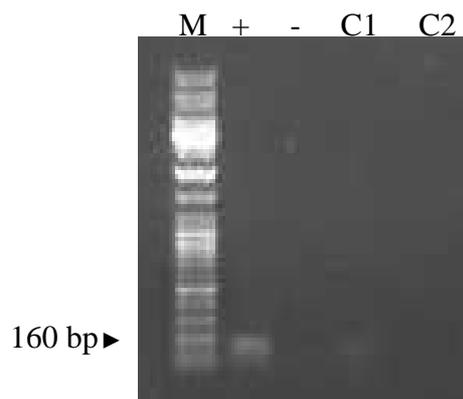


Fig 4.3: Gel rappresentativo di una PCR di controllo di muscolo; + controllo positivo; - controllo negativo; C1 Campione leggermente contaminato da DNA genomico; C2 campione non contaminato da DNA genomico; M: Marker DNA Ladder Fermentas

Trattamento con DNAasi

Il trattamento con DNAsi è stato effettuato utilizzando Amplication Grade DNase I (SIGMA), un'endonucleasi isolata dal pancreas bovino, in grado di digerire il DNA a singolo e a doppio filamento.

Seguendo il protocollo fornito dal produttore, a ciascun campione di RNA contaminato (50 µl) sono stati incubati a temperatura ambiente per 15 minuti con 5 µl di 10x Reaction Buffer (200 mM Tris-HCl e 20 mM MgCl₂ a pH 8,3) e 5 µl di Amplication Grade DNaseI (1U/µl in 50% glicerolo, 10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂); successivamente la reazione è stata bloccata aggiungendo 5 µl di Stop Solution (50 mM EDTA).

Dopo l'estrazione dell'RNA in fenolo acido-cloroformio e la precipitazione in isopropanolo, i campioni sono stati risospesi in H₂O e conservati a -80°C.

Per verificare l'efficacia del trattamento con DNAasi, viene effettuata una seconda PCR di controllo identica alla prima sui campioni trattati con DNasi. Una volta accertata l'assenza di contaminazione si procede al passaggio successivo ossia la retrotrascrizione.

4.4 Retrotrascrizione

Con questa reazione otteniamo il primo filamento di cDNA con cui effettuare la Real-Time PCR per l'analisi della espressione genica.

Per la retrotrascrizione, effettuata utilizzando il termociclatore PTC-100™ (Peltier Thermal Cycler), abbiamo utilizzato il kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis (FERMENTAS) che è ottimizzato per retrotrascrivere una quantità di RNA compresa nel range di 0.1-5µg.

In base alla concentrazione, circa 4µg di ciascun campione di RNA sono incubati a 70°C per 5 min con 1 µl di Oligo(dT) primer (0,5µg/µl) in un volume finale di 12 µl. Successivamente, ad ogni tubo sono aggiunti 7 µl di RT mix contenente 4µl di 5X Reaction Buffer, 2 µl di dNTP mix (10 mM), 1 µl di Ribolock™ Ribonuclease inibitore (20 u/µl) e i campioni sono incubati a 37°C per 5 min; infine è stato aggiunto in ogni tubino, 1 µl di trascrittasi inversa RevertAid™-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl) per un volume finale di 20 µl. Quindi i campioni sono stati incubati a 42°C per 60 min; la reazione è stata bloccata riscaldando la piastra a 70°C per 10 min.

La quantità di cDNA di ciascun campione viene valutata facendo una lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro.

4.5 Real Time PCR

La Real Time PCR è un metodo che si basa sull'amplificazione e quantificazione del DNA. La tecnica a differenza di una tradizionale PCR "end point" sfrutta l'utilizzo di molecole fluorescenti o sonde che permettono di seguire in tempo reale e quantificare la reazione di amplificazione.

Nel nostro caso, è stata utilizzata la sonda SYBR Green I una molecola fluorescente non specifica che si lega al solco minore del DNA a doppia elica.

I campioni di cDNA dei muscoli sono stati preparati utilizzando la SYBR® Green PCR Master mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) composta da una HotStart Taq DNA Polimerasi, una sonda SYBR Green I, MgCl₂ ad una concentrazione di 5 mM, dNTP, e il colorante fluorescente referente passivo ROX. Quest'ultimo serve come riferimento interno per normalizzare il segnale emesso dalla sonda SYBR Green I, consentendo così di correggere le possibili variazioni tra i pozzetti dovute ad errori nel pipettamento e a fluttuazioni della fluorescenza. Per ciascun gene da studiare la reazione è stata effettuata in duplicato utilizzando inizialmente due diverse concentrazioni del cDNA, 100 ng/μl e 200 ng/μl.

La mix, avente volume finale di 25 μl, conteneva 12.5 μl di SYBR Green PCR Master Mix, 0.4 μl di primer sinistro e 0.4 μl di primer destro specifici per ogni gene (la concentrazione finale dei primers è 0.3 μM), il cDNA stampo di ciascun pool ed H₂O DEPC per portare a volume.

La reazione è stata eseguita utilizzando lo strumento ABI PRISM 5700 (Applied Biosystems, Warrington, UK).

Il protocollo utilizzato per la reazione di amplificazione del gene consiste di 4 passaggi:

- Un ciclo di pre-incubazione di 10 minuti a 95° C per attivare la HotStart Taq polimerasi e denaturare il DNA.
- 45 cicli di amplificazione, ognuno di essi diviso in una fase in cui il campione viene portato a 94° C per 15 secondi per permettere la denaturazione, una fase di 30 secondi a 60° C in cui si ha l'annealing dei primer e una fase di 30 secondi a 72° C in cui si ha l'allungamento del filamento di DNA. In quest'ultima fase la sonda si intercala al DNA e si acquisisce la fluorescenza fondamentale per la quantificazione.
- Analisi della curva di melting. Tale fase è costituita da un unico ciclo in cui la temperatura viene portata da 95° C a 55° C molto rapidamente e riportata a 95° C molto lentamente (all'incirca 0,1° C al secondo). Durante l'aumento della temperatura si può valutare specificamente la temperatura alla quale il frammento di DNA si separa: a questo valore di temperatura si ha un calo della fluorescenza dovuto al fatto che il fluoroforo si intercala solo su DNA duplex. In questo modo possiamo determinare la temperatura di melting, ossia

quella temperatura a cui un frammento di DNA caratteristico si separa in base alla composizione nucleotidica. Se la fluorescenza di alcuni frammenti non decade a questa temperatura, allora essi saranno prodotti aspecifici.

- Raffreddamento dello strumento. La temperatura viene portata a 40° C in 30 secondi.

Il software collegato allo strumento ABI PRISM 5700 consente di rappresentare i risultati in un grafico in cui in ascisse si trova il numero di cicli e in ordinata il logaritmo della fluorescenza, che si misura al termine della fase di allungamento. In tale grafico, ogni campione, quindi, descrive una sigmoide, in cui si può osservare una regione ad incremento esponenziale. I dati sono analizzati automaticamente dal software una volta scelto il punto centrale del tratto esponenziale della curva per il campione a maggiore concentrazione (quello cioè che raggiunge il ciclo-soglia dopo un numero minore di cicli).

Nella quantificazione relativa, la concentrazione del gene di interesse (target) viene espressa in funzione della concentrazione di un gene di riferimento (gene housekeeping), che si assume essere costante tra i diversi tessuti di un organismo, a tutti gli stadi di sviluppo (espresso costitutivamente) e non dovrebbe subire modificazioni in seguito al trattamento sperimentale. Nel nostro caso, per normalizzare i campioni è stato scelto il gene housekeeping *Ckm* (Muscle Creatine Kinase) perché si è visto che la sua espressione non varia in seguito a denervazione o a esercizio fisico (Adams L. et al., 1995; Lapalombella R., 2008).

Per prima cosa abbiamo realizzato una Real Time PCR per il solo gene housekeeping, per poter così calibrare tutti i campioni, e portarli alla stessa concentrazione iniziale. Successivamente la differenza di espressione degli altri geni è stata valutata attraverso una quantificazione relativa basata sul ciclo soglia (Ct) (Livak JK et al., 2001).

Gli mRNA di cui si voleva valutare l'espressione sono stati oggetto di almeno tre determinazioni indipendenti. È stata quindi calcolata la media e la deviazione standard per i dati relativi a ciascun gene di ciascun gruppo e i dati sono espressi come percentuale della quantità del gene housekeeping *Ckm*.

4.6 Progettazione primers

Le sequenze dei primers studiati sono state disegnate con “Primer 3” un programma disponibile in rete (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) che a partire dalla sequenza di mRNA del gene specifico, che è possibile trovare sul sito dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>), ci fornisce una o più coppie di primer compatibili con la regione da amplificare. Le sequenze di nucleotidi così studiate sono poi controllate utilizzando un altro software gratuito “Amplify”, (Amplify3 for MacOS) che

simula una PCR in modo tale da capire se i primers possono appaiarsi tra di loro generando dei dimeri o legarsi in altri punti del gene in esame. Per verificare che le sequenze scelte sono uniche e non si appaiano con altri mRNA, i primer vengono verificati con BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). La regione da amplificare è stata scelta in prossimità del 3' in quanto la retrotrascrizione è stata effettuata utilizzando gli oligo(dT) che si appaiano alla sequenza poli A presenti al 3' del trascritto. In questo modo ci si assicura, appunto, che tutti gli mRNA sono retro trascritti almeno nella regione del 3' e si evitano problemi legati all'efficienza dell'enzima retrotrascrittasi utilizzata nella retrotrascrizione. Come ulteriore precauzione, ove possibile, sono stati scelti dei primers a cavallo tra due introni evitando così ogni possibilità di amplificare DNA genomico.

Le sequenze dei primer scelte sono state acquistate dalla ditta PROLIGO (Proligo, France SAS) e sono riassunte nella tabella 4.1.

La specificità dei primers è stata valutata analizzando le curve di melting mentre la lunghezza degli ampliconi è stata verificata caricando i prodotti di PCR su un gel di agarosio. Nel caso in cui i primer avessero presentato degli aspecifici, venivano immediatamente ridisegnati.

Tabella 4.1: sequenze dei primers e lunghezza degli ampliconi dei geni studiati negli esperimenti di denervazione. Il gene *ckm* è stato usato come housekeeping.

Unigene accession no	Gene	Left Primer	Right Primer	Amplicon length (bp)
Rn.64583	<i>AMP kinase</i>	AGCTCGCAGTGGCTTATCAT	GGGGCTGTCTGCTATGAGAG	181
Rn.90982	<i>ATP2b4</i>	ACCTCAACCTCATTCCCATGC	GCTAATGTCAGGCCTCCTTG	159
Rn.10111	<i>Cals2</i>	GTTCCAAGAGGCAGCTGAAC	GACGTAGGTTGGGTCTTTGA	211
Rn.3001	<i>Catalase</i>	ATTCAGAGGAAAGCGGTCAA	CCAGCGATGATTACTGGTGA	249
Rn.39658	<i>Ccl21b</i>	GCCTTGTCACACCCTTGCTCT	GGACAGTCCTGCTGTCTCCT	149
Rn 5834	<i>Ccng</i>	TTCTGTTGGGTTGGGTTTGT	GGTGAGGGGCTGAGGTTT	148
Rn.66581	<i>Citrate Synthase</i>	AGGCTAAAGGTGGGGAAGAG	CACTGTTGAGGGCTGTGATG	215
NC_001665	<i>CoxI/mt-CoI</i>	TTGGTGTCCTCTTCCCTGTC	TACTGGGGATGGGTAGCAAG	186
Rn.10162	<i>cPla2a</i>	AGCCCTCCATTCAAGGAACT	CTTCAATCCTTCCCGATCAA	105
Rn.10900	<i>GLUT4</i>	AGGCACCCTCACTACCCTTT	TTTTCTTCCCAACCATTGA	109
Rn.11323	<i>Gpx1</i>	GTTCCAGTGCGCAGATACAG	AACACCGTCATGGAAAAACC	163
Rn.3647	<i>Gpx4</i>	CCGGCTACAATGTCAGGTTT	ACGCAGCCGTTCTTATCAAT	166

Rn.202944	<i>Gstm1</i>	TCATTCTCCCCACTTTCTTTCA	GAACAGGCTGGCACTGAGAC	153
Rn.3841	<i>Hsp27/Hspb1</i>	ACGAAGAAAGGCAGGATGAA	CGCTGATTGTGTGACTGCTT	161
Rn.1950	<i>Hsp70/Hspa1a</i>	TCTAACACGCTGGCTGAGAA	CACCCTGAGAGCCAGAAAAG	205
Rn.88869	<i>KDR (VEGF-R)</i>	TGGTGTGTGGTCTTTTGGTG	GGTACATTTGTGGGGTGGTG	154
Rn.98847	<i>Myh3</i>	AGAGTCTGTGAAGGGCCTGA	CAGCCTGCCTCTTGTAGGAC	146
Rn.43395	<i>MyoD</i>	TTTTTCATGCGACTCACAGC	GAAGGCAGGGCTTAAGTGTG	137
Rn.9465	<i>Myogenin/MYF</i> <i>4</i>	ACCAGGAGCCCCACTTCTAT	GTCCCCAGTCCCTTCTCTTC	139
Rn.2236	<i>MRF4/MYF6</i>	CTCAGAGGAACGCAAACCTCC	ACTTGAGGTGGGGAGAGGTT	191
Rn.6422	<i>MMP2</i>	GGACAGTGACACCACGTGAC	GTATCCTCGCTCCAGAGTGC	173
Rn.10305	<i>Ncx2</i>	TTTGTGGTCATTGCTGTGTG	AGATGCTCCAAGAGGCTGTG	100
Rn.99540	<i>Nedd4</i>	CTGCACGACATGGAGTCTGT	ATCGCCACTGGATTACAAGG	211
Rn.220465	<i>Nox1</i>	TCCCTTTGCTTCCTTCTTGA	CCAGCCAGTGAGGAAGAGTC	208
Rn.19172	<i>Pgc1alpha/</i> <i>Ppargc1a</i>	ATGAGAAGCGGGAGTCTGAA	GCAGATTTACGGTGCATTCC	171
Rn.6059	<i>Sod1</i>	CATTCCATCATTGGCCGTA	GGCTTCCAGCATTTCCAGT	100
Rn.10139	<i>Scya3</i>	CCAGTCCCTTCTCTGCTCTG	AAAGGCTGCTGGTCTCAAAA	226
Rn.10488	<i>Sod2</i>	GCTGTGCACTGTTGAAATGC	CTGACCACAGCCTTTTTGGT	164
Rn.9417	<i>Sub1beta L</i> <i>Channel</i>	AGGACCTTGGATCTCCCCTA	TCTCTGGACCAGCTGTGATG	195
Rn.1923	<i>VEGF</i>	AATGATGAAGCCCTGGAGTG	TTTCTTGCGCTTTCGTTTTT	210
Rn.202951	<i>Xdh</i>	GTTTGTCCGCAACTGGATTT	ATCAATGGCAGGATTCAAGC	195
Rn.13754	<i>Xrcc1</i>	TCTTCCTGTACGGCGAGTTC	ATCAGGGCCTCCTCAAAGTT	156
Rn.10756	<i>Ckm</i>	GGCGTAAAGCTTATGGTGGA	CAAAGTCGGTTGGTTGGACT	156

4.7 Estrazione delle proteine da tessuto di muscolo

I muscoli ancora congelati sono ridotti in polvere usando un pestello e un mortaio di ceramica precedentemente sterilizzato. La polvere così ottenuta è stata omogeneizzata con un buffer di lisi contenente TRIS-HCl 10mM, KCl 50mM, EDTA 1mM addizionato di 0.3% di inibitori delle

proteasi (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, St. Louis MO). La lisi del tessuto è stata effettuata a 4°C per 30 minuti. L'omogenato proteico così ottenuto è stato centrifugato a 10000 rpm per 10 min e il surnatante è stato trasferito in un tubo tipo eppendorf pulito e conservato a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

Il lisato proteico così preparato è stato utilizzato per gli esperimenti di valutazione della produzione dei ROS e dell'attività della SOD in quanto i componenti del buffer di lisi usato non vanno ad interferire con questo tipo di misure.

Per quanto riguarda gli esperimenti riguardanti l'espressione proteica (Western Blot) e l'attività della Citrato Sintasi, i campioni sono stati lisati aggiungendo al buffer di lisi precedentemente descritto 1% NONIDET P-40.

Per tutti i lisati dei campioni è stata valutata la concentrazione proteica che è necessaria per consentire un omogeneo caricamento dei campioni nelle successive analisi.

4.8 Quantificazione delle proteine

La concentrazione proteica dei lisati è stata determinata utilizzando un kit, Protein Assay Kit, fornito dalla ditta Biorad che si basa sul metodo di Bradford (1976). Il metodo di Bradford, che utilizza il colorante Coomassie brilliant blue G-250 (CBBG), è un saggio colorimetrico molto usato perché rapido, semplice, economico e di facile esecuzione; il colorante ha elevata affinità per i gruppi solfidrici dei residui amminoacidi basici quali arginina, triptofano, tirosina, istidina e fenilalanina. Il CBBG nella soluzione madre si trova in forma cationica e ha un massimo di assorbanza a 470 nm; in ambiente acido e in seguito al legame con le proteine si ha uno spostamento del picco di assorbimento da 470 nm a 595 nm che visivamente è rappresentato dal viraggio del colorante dal marrone al blu (Fig. 4.4) L'assorbanza a 595 nm misurata attraverso uno spettrofotometro (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech Cambridge, Inghilterra) è direttamente proporzionale alla sua concentrazione proteica secondo la legge di Lambert-Beer.

Il saggio permette di lavorare in un intervallo di linearità compreso tra 0.1- 1,4 mg/ml di proteina.



Fig. 4.4 Metodo di Bradford; aumento dell'intensità della colorazione con l'aumento della concentrazione proteica

Il valore di assorbanza di ogni campione viene letto allo spettrofotometro e la concentrazione proteica viene calcolata interpolando tali valori su una curva di taratura i cui punti sono concentrazioni scalari di una soluzione a concentrazione nota (1.45 mg/ml) di una proteina, la Albumina Sierica Bovina (BSA).

4.9 Valutazione della produzione dei ROS nei muscoli TA denervati mediante sonda DCF

Per valutare la produzione di ROS è stata utilizzata una metodica, precedente descritta da M. Degli Esposti, che sfrutta l'ossidazione da parte dei ROS di una sonda fluorogena diclorodididrofluorescina (H_2DCF , Sigma-Aldrich, St. Louis MO); quest'ultima viene convertita in un prodotto che emette fluorescenza, Diclorofluorescina (DCF), che può essere misurato fluorimetricamente. H_2DCF è prevalentemente ossidata dal H_2O_2 , ma è in grado di reagire con altre specie radicaliche, come gli idroperossidi organici e in particolar modo con gli idroperossidi lipidici (Cathcart R et al., 1983).

L'intensità della fluorescenza dunque sarà proporzionale alla quantità di ROS presenti nel campione preso in esame.

In una piastra da 96 pozzetti è stata preparata una miscela di reazione contenente $1\mu M$ di H_2DCF in phosphate-buffer saline (PBS) alla quale è stato aggiunto $0.5\ \mu g/\mu l$ di lisato proteico (precedentemente ottenuto) per ciascun campione. La fluorescenza, misurata a 520nm, è stata monitorata per almeno 45 min usando un lettore di piastre (Victor² Multilabel Counter, Perkin-Elmer, Waltham, MA). I dati sono espressi come media delle differenze delle unità di fluorescenza tra T_{45min} e T_{0min} per milligrammo di proteina.

4.10 Western Blot

Il **Western Blot** è stato inventato nel 1979 da Towbin ed è una tecnica semplice e rapida che permette di identificare una determinata proteina in una miscela di proteine, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici. La miscela di proteine (lisato proteico) viene prima separata in base al loro peso molecolare tramite corsa elettroforetica su un gel di poliacrilammide e successivamente trasferita su una membrana di nitrocellulosa; si procede al riconoscimento della proteina target mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico e il legame proteina-anticorpo può essere visualizzato con tecniche diverse, tra cui prodotti colorati chemiluminescenza o autoradiografia.

Preparazione dei campioni

I campioni precedentemente preparati e quantificati sono mescolati un buffer chiamato *LAEMMLI BUFFER*, (40mM Tris-HCl pH 8, 1% SDS, 5% glicerolo, 1% beta mercaptoetanolo e Blue di bomofenolo) (Laemlli UK, 1970).

Il sodio dodecilsolfato (SDS, detergente anionico) presente nel buffer ha una duplice funzione: da un lato, essendo un detergente, favorisce la denaturazione delle proteine in combinazione con altri agenti riducenti (beta mercaptoetanolo), dall'altro si intercala ogni due aminoacidi, conferendo alla proteina denaturata una carica elettrica negativa; le proteine possono essere così risolte secondo la loro massa in una corsa elettroforetica.

Per permettere la completa denaturazione, i campioni vengono portati a 95°C per 5min.

SDS-PAGE

Per la corsa elettroforetica è stato utilizzato un sistema discontinuo costituito da due gel di poliacrilammide (PAA, acrilammide-bisacrilamide 29:1) contenenti SDS 0.1% in una soluzione Tris-HCl pH 6.8 (Stacking gel) o Tris-HCl pH 8.8 (Running Gel). L'aggiunta di due catalizzatori APS 10% (Ammonio Persolfato) e TEMED favorisce la polimerizzazione tra acrilammide e bisacrilammide portando alla formazione di una sorta di reticolo a maglie più o meno larghe a seconda della quantità dei due polimeri.

Lo stacking gel che contiene PAA al 4% favorisce l'impaccamento dei campioni all'interfaccia con

il running gel; in quest'ultimo vengono invece aggiunte percentuali diverse dei due polimeri in maniera tale da ottenere la separazione della proteina di interesse nella maniera più opportuna. Nel nostro caso abbiamo preparato un gel al 12% di PAA per separare la proteina HSP-70 mentre per quanto riguarda gli enzimi OXPHOS è stato preparato un gel a gradiente in cui la percentuale dei due polimeri varia in modo uniforme dal 12% (parte alta del gel) al 20% (in fondo allo stesso).

Quantità uguali di campione proteico (30µg) sono caricati sul gel e sottoposti a corsa elettroforetica che è stata condotta a corrente costante (50 mA) per circa 1h in un tampone di corsa a pH 8.8 (Tris 25mM, Glicina 192mM, SDS 1%). Per monitorare la separazione delle proteine è stato caricato un marker proteico (Prestained Protein Ladder Marker, Fermetas) che è costituito da una miscela di proteine a peso molecolare noto. Al termine della corsa l'apparato elettroforetico è stato disassemblato ed il gel recuperato per il passaggio successivo.

Blotting

Le proteine risolte tramite corsa elettroforetica, vengono trasferite (blotting) su una membrana di nitrocellulosa applicando un campo elettrico in cui le proteine ancora cariche negativamente migreranno dal polo negativo al polo positivo. Il trasferimento è stato effettuato a voltaggio costante a 100V per 90 minuti a 4°C in un Buffer di Trasferimento contenente Tris 25mM, Glicina 192mM, SDS 1% e metanolo 20%.

L'avvenuto trasferimento delle proteine su nitrocellulosa è stato verificato mediante colorazione con Rosso Ponceau (Sigma) in TCA (0,2% Rosso Ponceau in 3% di Acido Tricloracetico, TCA) della nitrocellulosa per 5 minuti in agitazione a temperatura ambiente. La suddetta colorazione può essere facilmente rimossa con dei brevi lavaggi con acqua. Il Rosso Ponceau, legandosi alle proteine presenti sulla membrana di nitrocellulosa, fornisce informazioni non solo sul trasferimento delle proteine ma ci dà un'idea circa l'uniformità della quantità di proteina caricata.

Blocco dei siti aspecifici e incubazione con gli anticorpi primari

Per minimizzare il background, i siti di legame aspecifici presenti sulla membrana di nitrocellulosa vengono saturati con una soluzione di bloccaggio costituita da latte privo di grassi 5% e BSA 2% in Phosphate Buffer Saline (PBS) per un'ora a temperatura ambiente in costante agitazione. Al termine dell'incubazione la membrana è stata lavata con PBS e incubata Overnight (ON) a 4°C con

l'anticorpo primario specifico opportunamente diluito in una soluzione di PBS contenete TWEEN-20 0,05% e 1%BSA.

Per gli esperimenti di questa tesi sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: Mouse anti-rat HSP70i (Stressgen, diluizione 1:1000), mouse anti-rat beta-Actina (Sigma-Aldrich, diluizione 1:1000), mouse anti-rat OXPHOS complex e Cyclophilin D (MitoSciences Inc., diluizione 1:1000).

Dopo l'incubazione vengono effettuati tre lavaggi, ognuno di 15min, alternando PBS a PBS-TWEEN-20 0.15%; in questo modo viene lavato via tutto l'anticorpo primario che non si è legato all'antigene.

Incubazione con anticorpo secondario e sviluppo

Successivamente la membrana è stata incubata per 60 minuti a temperatura ambiente in costante agitazione, con un anticorpo secondario di capra anti-mouse IgG coniugato con l'enzima HRP (Horseradish Peroxidase) acquistato dalla ditta Pierce e diluito opportunamente con PBS contenente TWEEN-20 0,05% (diluizione 1:10000).

Dopo aver rimosso l'eccesso di anticorpo con tre lavaggi da 15 minuti, alternando PBS a PBS-TWEEN-20 0.15%, è stata effettuata la rilevazione delle proteine mediante l'utilizzo di un kit Super Signal West Dura (PIERCE) che evidenzia il substrato mediante una reazione chemiluminescente. La membrana è stata così impressionata su una lastra fotografica (Kodak) in camera oscura; il tempo di esposizione viene regolato in relazione all'intensità del segnale emesso.

Analisi dei dati

Le bande presenti sulla lastra sono state quantificate con l'ausilio dell'apparecchio GelDoc 2000 (BioRad) e del software QuantityOne, che ne valuta l'intensità e la dimensione. I dati sono stati espressi come densità integrata (unità di densità ottica per volume della banda). I livelli proteici sono poi stati normalizzati rispetto alla quantità della proteina riferimento: la beta-Actina.

Le bande relative al gene target vengono poi normalizzate utilizzando quelle relative al gene housekeeping; in questo modo i dati sono espressi come rapporto tra gene target e l'housekeeping nel caso specifico come rapporto tra HSP70i e la beta-Actina.

4.11 Saggi per la valutazione di attività enzimatiche

Saggio WST-1 per valutare l'attività della Superossido Dismutasi

La Superossido Dismutasi (SOD) è uno dei più importanti enzimi antiossidanti e catalizza la dismutazione dell'anione superossido in perossido di idrogeno e ossigeno molecolare.

L'attività della SOD è stata misurata usando un saggio competitivo colorimetrico (Peskin and Winterbourne, 2000; Zhou and Prognon, 2006) nel quale gli anioni superossido, prodotti dal sistema xantina-xantina ossidasi, riducono il WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt, Dojindo Laboratories Co., Kumamoto, Japan) in formazano (sale colorato) che assorbe a 450nm. In presenza dell'enzima SOD, gli anioni superossido vengono dismutati in perossido di idrogeno e ossigeno impedendo quindi la riduzione del WST-1 a formazano (Fig.4.5).

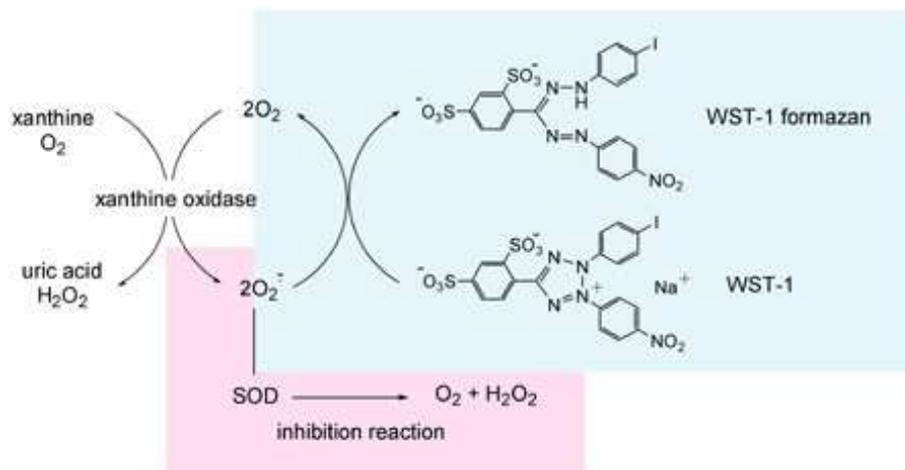


Fig 4.5: Schema del saggio WST-1

Di conseguenza l'attività della SOD può essere determinata come percentuale di inibizione della reazione colorimetrica che è proporzionale alla sua concentrazione: infatti l'enzima entra in competizione con il WST-1 per l'anione O_2^- e determina una diminuzione della reazione colorimetrica (Fig. 4.6). Con questo metodo è possibile non solo quantificare l'attività della SOD totale ma anche discriminare l'attività delle due isoforme della SOD (SOD-1 e SOD-2). L'aggiunta di KCN alla miscela di reazione permette di inibire in maniera specifica l'attività della SOD1; in questo modo la percentuale di inibizione della SOD2 può essere sottratta alla percentuale di inibizione della SOD totale (reazioni senza KCN) ricavando così la percentuale di inibizione della SOD1. L'attività della SOD viene espressa come unità per milligrammo di proteina (U/mg) dove

per 1 unità di SOD si intende la quantità di proteina in grado di inibire il 50% di riduzione del WST-1.

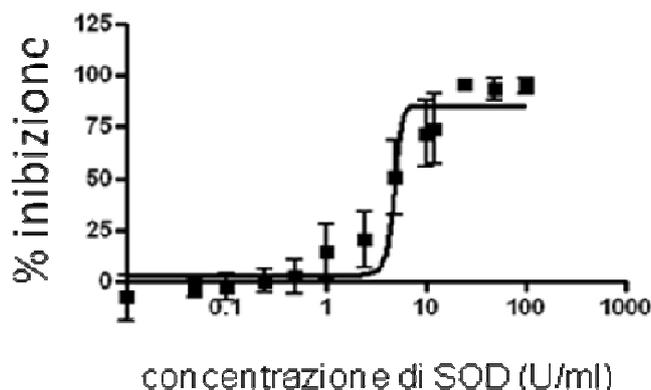


Fig 4.6: Curva di inibizione della SOD

Preparazione dei campioni e della curva standard

Gli estratti proteici precedentemente quantificati vengono portati ad una stessa concentrazione proteica ($0.4\mu\text{g}/\mu\text{l}$) che verrà usata per il saggio enzimatico.

È stata preparata una curva standard per l'enzima SOD ottenuta facendo delle diluizioni seriali a partire da una soluzione madre della proteina stessa ($200\text{U}/\text{ml}$). Le concentrazioni scelte, in U/ml , erano 100, 50, 12.5, 10, 5, 2.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.01.

Preparazione della Working Solution

La Working Solution è stata preparata aggiungendo al tampone CHES 50mM pH 8.0 (2-N-[Cyclohexylamino] ethanesulfonic acid, Sigma-Aldrich) WST-1 $500\mu\text{M}$. Per la valutazione dell'attività della SOD2 è stata preparata una Working Solution identica alla precedente con l'aggiunta di KCN 1mM .

Dato che il WST-1 è fotosensibile, la working solution è stata preparata al buio e tenuta in ghiaccio. E' stata inoltre preparata una soluzione di xantina ossidasi ($600\text{mU}/\text{ml}$) in PBS.

Preparazione dei controlli

Il saggio prevede l'utilizzo di tre bianchi ovvero di tre controlli negativi per monitorare e azzerare il background della reazione.

Nel Bianco1 (B1) viene omissa sia l'estratto proteico che la SOD. In queste condizioni il WST-1 viene interamente ridotto a formazano sviluppando il massimo della colorazione. Questo bianco è dunque il controllo del reagente e ci permette di monitorare l'effettiva funzionalità del sistema xantina-xantina ossidasi.

Il Bianco2 (B2) contiene esclusivamente la Working Solution e il campione; questo controllo costituisce quindi il background del campione.

Il Bianco3 (B3) contiene esclusivamente la Working Solution ovvero viene omessa la xantina ossidasi, di conseguenza non si ha la riduzione del WST-1 in formazano dando così il minimo di colorazione. Questo controllo serve quindi per eliminare il rumore di fondo.

Preparazione della piastra

I lisati proteici (o l'enzima SOD nel caso della curva standard) sono stati aggiunti ad una miscela di reazione contenente la Working Solution, la Xantina 75mM e l'enzima Xantina Ossidasi 50U/ml.

Per saggiare l'attività della SOD2, i campioni e i bianchi sono stati caricati su piastra utilizzando la Working Solution con KCN.

La reazione è stata eseguita in una piastra da 96 pozzetti caricata secondo lo schema seguente (Fig. 4.7):

	campione	bianco1	bianco2	bianco3
sol. Campione	10µl		10µl	
H ₂ O distillata		10µl		10µl
Soluzione WST 1	100µl	100µl	100µl	100µl
Enzima	10µl	10µl		
Buffer di lisi			10µl	10µl

Fig. 4.7: Schema utilizzato nella preparazione della piastra

La piastra viene centrifugata a 3000 rpm per 5 minuti e successivamente incubata a 37°C al buio per 20 minuti. I valori di assorbanza sono letti a 450 nm usando un lettore di piastre (Victor2 Multilabel Counter, Perkin-Elmer).

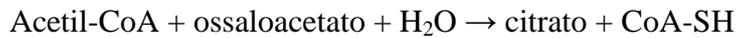
L'attività della SOD è stata calcolata come percentuale di inibizione tramite la formula seguente:

$$ASOD = \{[(A_{b1} - A_{b3}) - (A_s - A_{b2})] / (A_{b1} - A_{b3})\} * 100$$

Dove A_{b1} , A_{b2} , A_{b3} sono rispettivamente i tre bianchi, mentre A_s è l'assorbanza relativa al campione. I valori ottenuti applicando questa formula sono poi interpolati sulla curva standard e espressi come unità per milligrammo di proteina.

Valutazione dell'attività enzimatica della Citrato Sintasi

La citrato sintasi (CS) è un enzima localizzato nella matrice mitocondriale codificato nel DNA nucleare. È uno degli enzimi del ciclo dell'acido citrico che catalizza la seguente reazione tra acetil coenzima A (acetil-CoA) ed acido ossaloacetico (OAA) nella sintesi dell'acido citrico:



Il saggio è stato eseguito incubando i lisati proteici con Triton X-100 0.02%; la reazione è stata monitorata spettrofotometricamente misurando la velocità del rilascio del Coenzima A libero. L'attività enzimatica è stato espressa come nmol/min/mg di proteina. L'attività della citrato sintasi è stata oggetto di due valutazioni indipendenti.

4.12 Purificazione delle membrane del SR e del sarcolemma

Le membrane del reticolo sarcoplasmatico (SR) sono preparate seguendo il metodo messo a punto da Rock e colleghi (1990). I muscoli ancora congelati sono omogenati a temperatura ambiente in una soluzione contenente HEPES 20mM, saccarosio 300mM, DTT 1mM, BSA 1%, PMSF 500 μ M (pH 7.0) utilizzando un omogenizzatore (Ultra-Turrax). L'omogenato così ottenuto è stato centrifugato a 8000g per 15 minuti. Il surnatante è stato filtrato e centrifugato a 40000g per 70 min. Il pellet è stato poi risospeso in una soluzione contenente HEPES 10mM, saccarosio 300mM (pH 6.8) e incubato con KCl 0,6mM (pH 6.8) per 4 ore. Al termine dell'incubazione, la sospensione è stata centrifugata a 40000g per 70 min e il pellet è stato lavato nuovamente utilizzando lo stesso buffer. Le membrane del SR sono risospese ad una concentrazione di 20-30 mg/ml in una soluzione a pH 6.8 contenente HEPES 10mM e KCl 150mM. La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo di Bradford.

La purificazione del sarcolemma dei muscoli di ratto è stata eseguita seguendo il protocollo messo a punto da Renganathan M. e colleghi (1997). Con l'aiuto di un omogeneizzatore (Ultra-Turrax), i muscoli sono omogenati in otto volumi di un buffer a pH 6.8 contenente NaCl 100mM, Pipes-KOH 20 mM, EDTA 2mM, EGTA 0.2 mM e un cocktail di inibitori delle proteasi 0.3% (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, St. Louis MO).

L'omogenato così ottenuto è stato filtrato e immediatamente congelato e conservato a -135°C. La concentrazione proteica è stata misurata con il metodo di Bradford.

Le preparazioni così ottenute sono state utilizzate per la valutazione della perossidazione lipidica e dell'attività dei canali ionici.

4.13 Perossidazione lipidica

La presenza di eventuali danni a carico del sarcolemma e delle membrane del SR è stata determinata utilizzando il metodo TBARS che misura i livelli di MDA (malondialdeide), marker di stress ossidativo. Si tratta di un saggio semplice e poco costoso che funziona bene se applicato a sistemi puliti come nel nostro caso (membrane purificate). I campioni vengono incubati con acido tiobarbiturico (TBA) a pH acido che reagirà con la MDA formando un composto rosa che può essere misurato fluorimetricamente (lunghezza di eccitazione 530 nm, lunghezza di emissione 552nm).

Per minimizzare l'amplificazione dell'ossidazione durante il saggio, il sarcolemma e le membrane del SR sono state incubate con butilato idrossi-toluene (BHT) prima dell'aggiunta del TBA, mentre per separare al meglio l'addotto TBA-MDA da altri cromogeni o composti che assorbono a 532nm, i campioni sono iniettati in HPLC.

Procedura

Ai campioni di sarcolemma e alle membrane del SR (50µl), precedentemente preparate, sono stati aggiunti 350 µl di KH_2PO_4 1 mM pH 3.0 e 10 µl di BHT 18 nM. Dopo aver incubato i campioni per 10 minuti a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 100µl di una soluzione acido tiobarbiturico (TBA) 0,6% w/v. I campioni sono incubati per 45min temperatura a 93°C. Al termine dell'incubazione, la reazione è stata bloccata raffreddando i campioni in ghiaccio per 10 minuti che successivamente sono stati centrifugati a 9500g per 5 minuti. Il supernatante è stato trasferito in una eppendorf pulita e iniettato in un sistema di HPLC composto da una pompa (Waters 515) con una velocità di 1.8 ml/min, una colonna (C18 Rainin Microsorb) e un detector a fluorescenza (Waters 470).

La fase mobile è costituita da KH_2PO_4 50mM, pH 7.0 e metanolo 40%. Il tempo di ritenzione della MDA è di circa 7 minuti. Il saggio è stato eseguito in triplicato e il risultato è espresso come nmol di MDA per milligrammo di proteina.

4.14 Valutazione dell'attività delle pompe e dei canali ionici

Canale della Rianodina

L'attività del Canale della Rianodina è stata valutata usando delle specifiche tecniche di binding. Le membrane del SR sono state lavate in uno specifico buffer di binding (KCl 200mM, HEPES pH 7.4 10mM, CaCl₂ 100μM, PMSF 0.1 mM, e leupeptina 1 gamma/ml), centrifugate a 100000 g per 90 minuti e successivamente risospese ad una concentrazione di 1 mg/ml. Aliquote di proteina (65mg) sono incubate a 25°C con un buffer contenente 10nM di [³H] rianodina (61,5 Ci/mmol, Du Pont-New England Nuclear) in un volume finale di 250 ml per 120minuti. Al termine dell'incubazione, i campioni sono filtrati con filtri Whatman GF/C e lavati con sei volumi un soluzione fredda contenente HEPES 10mM pH 7.4 e KCl 200 mM. La quantità del legame [³H] rianodina è stata determinata mediante scintillazione liquida (Treves et al., 1997).

Attività della SR Ca²⁺ATPasi

L'attività della Ca²⁺ATPasi è stata determinata seguendo il protocollo descritto precedentemente da Fulle S et al., (2003) e incubando 50μM di proteina del SR con buffer contenente ATP 2.5 mM e CaCl₂ 10μM in un volume finale di 1ml.

Attività del recettore della Diidropiridina (DHPR) presente nel sarcolemma

L'attività del DHPR è stata determinata usando un radioligando [³H]PN200-110 (80 Ci/mol, Amersham). Le proteine del sarcolemma (100mg) sono incubate a temperatura ambiente con un buffer contenente 1nM di [³H] PN200-110 in un volume finale di 250 ml per 60 minuti. Al termine dell'incubazione, i campioni sono filtrati con filtri Whatman GF/C e lavati con sei volumi un soluzione fredda contenente 200 mM choline chloride, Tris-HCl 20 mM, pH 7.5. La radioattività è stata determinata mediante scintillazione liquida (Treves et al., 1997).

Il legame aspecifico della [³H]PN200-110 è stato misurato in presenza di 10nM di nifedipia non radioattiva (Sigma).

Ca²⁺/Mg²⁺-ATPasi del sarcolemma

L'attività della Ca²⁺/Mg²⁺-ATPasi è stata valutata seguendo il protocollo descritto da Fulle S (2003) e incubando 30mg di proteina con un buffer contenente ATP 5mM e CaCl₂ 10mM in un volume finale di 1ml.

Na⁺/K⁺-ATPasi del sarcolemma

L'attività enzimatica della Na⁺/K⁺-ATPasi è stata valutata sulle membrane esterne del muscolo scheletrico precedentemente purificate e quantificate. Le proteine (25mg) sono incubate con 1ml di un buffer a pH 7.5 (NaCl 134mM, KCl 21mM, EGTA 1mM, HEPES 25 mM, ATP 2.5mM) in presenza o assenza di 1nM ouabina (Sigma). Dopo 10 minuti di incubazione a 37°C, la reazione è stata stoppata aggiungendo 12.5% di TCA. Il precipitato è stato rimosso centrifugando i campioni a 5000g per 10min; il rilascio dell'ortofosfato è stato misurato in 1 ml di surnatante seguendo il metodo di Taussky (1952).

4.15 Istochimica e Immunofluorescenza

Colorazione mATPasi pH 4.35 e pH 10.4

Questa tecnica permette di distinguere le fibre muscolari sulla base della diversa attività della miofibrillar ATPasi a pH acido o basico. La reazione si basa sul deposito di un sale di un fosfato inorganico dovuto al clivaggio dell'ATP da parte della mATPasi che verrà sostituito da un cromogeno insolubile. Brooke e Kaiser nel 1970 dimostrarono che nelle fibre slow (fibre I), l'attività della miofibrillar ATPasi è elevata e stabile dopo una pre-incubazione a pH acido (4.35), labile a pH basici (10.4).

Al contrario le fibre Fast (tipo II) mostrano un'intensa attività della mATPasi a pH basici mentre a pH acidi l'attività è debole. In questo modo allora le fibre slow in seguito ad una pre-incubazione a pH acido saranno scure mentre quelle veloci appariranno non colorate. L'inverso avviene nel caso di una pre-incubazione a pH alcalino; in questo caso le fibre slow appariranno chiare mentre le fast saranno scure.

Colorazione mATPasi a pH 4.35: procedura

Questa tecnica è una modifica della procedura descritta da Brooke e Kaiser nel 1970. Le sezioni, aventi uno spessore di 8 μm , sono incubate a temperatura ambiente per 7 minuti con una soluzione costituita da acetato di sodio 54.3 mM e barbitalo di sodio 32.6 mM portato a pH 4.35 con HCl. Dopo un lavaggio con una soluzione a pH 7.8 contenente CaCl_2 18mM e Tris-HCl 100mM, le sezioni sono incubate a temperatura ambiente per 45 min in un medium a pH 9.4 composto da ATP, CaCl_2 19.5mM e 2-ammino-2-metil-1-propanolo 116 mM (Sigma alkaline buffer solution 221) (Sigma;St Louis, MO). Dopo tre successive incubazioni di 3 minuti in CaCl_2 11mM, le sezioni sono incubate per 1.5 min in CoCl_2 2% (W/v); l'operazione viene ripetuta due volte. Successivamente viene effettuata un'incubazione di 30 secondi in barbitalo di sodio 10mM, che viene ripetuta per sei volte, seguita da un'altra incubazione di 30 secondi in acqua distillata. Le sezioni vengono poi incubate per 45 secondi in $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ 2% (W/v) e successivamente vengono lavate con acqua di rubinetto, disidratate con etanolo, schiarite nello xilene e montate con Entellan (Merck) (Hamalainen et al., 1993).

Colorazione mATPasi a pH 10,4: procedura

Le sezioni di muscolo sono incubate per 8 minuti a 4°C in una soluzione a pH 7.6 costituita da sodio cacodilato 145mM, CaCl_2 68mM, e saccarosio 325mM e contenente formaldeide al 1,85% (w/v). Dopo aver effettuato un lavaggio con una soluzione costituita da Tris 100mM e CaCl_2 18mM (pH 7.8), le sezioni sono pre-incubate per 10 min a temperatura ambiente in una soluzione a pH 10.4, contenete 2-ammino-3-metil-1-propanolo 34mM e CaCl_2 120mM. I vetrini sono successivamente lavati (due lavaggi da 1 minuto) in una soluzione costituita da Tris 100mM e CaCl_2 18mM (pH 7.8) e incubati per 25 minuti a 37°C in una soluzione a pH 9.4 contenente ATP 2,5mM, 2-ammino-3-metil-1-propanolo 100mM, CaCl_2 18mM e KCl 50mM. Successivamente vengono effettuate tre incubazioni da 30 secondi in una soluzione di CaCl_2 11mM seguite da un'altra incubazione di 3 minuti in una soluzione 2% (w/v) CoCl_2 ; vengono effettuati quattro lavaggi di 30 secondi in 2-ammino-3-metil-1-propanolo 115mM (pH 9.4). Le sezioni vengono poi incubate per 45 secondi in $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ 2% (W/v) e successivamente vengono lavate con acqua di rubinetto, disidratate con etanolo, schiarite nello xilene e montate con Entellan (Merck) (Hamalainen et al., 1993).

Le immagini delle sezioni così colorate sono state acquisite utilizzando un microscopio collegato ad una videocamera (Leyca).

Colorazione con Ematossilina ed Eosina

La colorazione con Ematossilina ed Eosina è un metodo di colorazione molto usato in istologia.

Sezioni congelate di muscolo tibiale anteriore tagliate al criostato, con uno spessore di 8 µm vengono colorate con Ematossilina per solo 5 sec.

Successivamente vengono immerse in un contenitore con acqua, poi vengono trasferite in un altro contenitore e sciacquate con acqua di rubinetto per circa 1 min fin quando l'acqua non è pulita, facendo attenzione a regolare la pressione dell'acqua per evitare di far scivolare via le sezioni di tessuto.

Si effettua, quindi, la colorazione di contrasto con Eosina per solo 3 secondi. Le sezioni vengono disidratate immergendole prima in etanolo 95% (due volte per 30 secondi), poi in etanolo 100% (due volte per 30 secondi) e infine nello xilene (due volte per 30 secondi).

I vetrini vengono montati con Entellan (Merck).

Le immagini delle sezioni così colorate sono state acquisite utilizzando un microscopio collegato ad una videocamera (Leyca).

Immunofluorescenza

Sezioni congelate del muscolo tibiale anteriore, vengono tagliate usando un criostato, KRIOSTAT 1700 digital, LEYCA, programmato ad una temperatura di -25°C.

Le sezioni così ottenute sono incubate a temperatura ambiente per 1h con il blocking buffer costituito da 2% BSA in TBS.

Dopo tre lavaggi ognuno di 5 minuti in TBS per eliminare l'eccesso di blocking buffer, le sezioni di muscolo sono marcate con anticorpi anti MHC-emb (NCL-MHCd diluito 1:20, Novocastra, UK) per 1h a temperatura ambiente.

Si effettuano due lavaggi, ognuno di 5min, con TBS; successivamente le sezioni vengono incubate con un anticorpo secondario anti-mouse Cy3 (C-2181 diluito 1:1000, Sigma) per 1h a temperatura ambiente.

Si effettua un lavaggio di 5 min per rimuovere l'anticorpo secondario che non si è legato e successivamente vengono colorati i nuclei con Hoechst 33258. Nel controllo negativo è stato ommesso l'anticorpo primario. Le immagini sono state acquisite con un microscopio a fluorescenza collegato ad una video-camera (Leica).

Analisi statistica

Tutti i dati sono espressi come la media dei valori \pm la deviazione standard (SD). L'analisi statistica è stata effettuata tramite analisi della varianza e il livello di significatività è stato fissato per $p \leq 0.05$.

Capitolo 5

Risultati

Parte I: Esercizio fisico moderato

5.1 Principali adattamenti dei muscoli Soleo ed EDL sottoposti ad esercizio fisico moderato

Dati relativi agli animali allenati

I dati relativi agli animali studiati sono riportati nella Tabella 5.1. Alla fine dell'allenamento, si è evidenziato che i ratti allenati avevano un peso corporeo minore di quello dei ratti sedentari, nonostante la disponibilità di cibo ad libitum. Inoltre, nei ratti allenati è stato riscontrato un incremento del rapporto peso soleo/ peso corporeo rispetto al controllo, il che dimostra l'efficacia dell'esercizio fisico.

Si può per altro notare che all'aumento della massa muscolare non corrisponde un aumento del peso del cuore relativo al peso corporeo, ossia l'allenamento effettuato secondo i due protocolli applicati non ha determinato ipertrofia cardiaca.

	Controllo	Esercizio Moderato	ANOVA test
Body mass (BM), g	591 ± 7	539 ± 8	<0.001
Heart mass, g	1.356 ± 0.021	1.384 ± 0.071	NS
Heart/BM, mg/g	2.359 ± 0.032	2.566 ± 0.068	NS
EDL/BM, mg/g	0.43 ± 0.01	0.47 ± 0.01	<0.001
Soleus/BM, mg/g	0.38 ± 0.01	0.45 ± 0.01	<0.001

Tabella 5.1: Parametri del peso del cuore e dei muscoli nei ratti controllo e allenati

Valutazione dell'espressione di alcuni geni coinvolti nella crescita cellulare e della proliferazione

Tramite Real-Time è stata valutata l'espressione del gene che codifica per la Ciclina G (CcnG) che potrebbe essere coinvolta nei meccanismi di crescita cellulare e quindi nell'aumento della massa muscolare. I dati sono espressi come percentuale relativa del gene housekeeping Ckm.

La figura 5.1 mostra che l'esercizio fisico moderato aerobico porta ad aumento significativo dell'espressione della CcnG sia nel Soleo che nel EDL (1,83 e 2.15 volte) dei ratti allenati rispetto ai controlli.

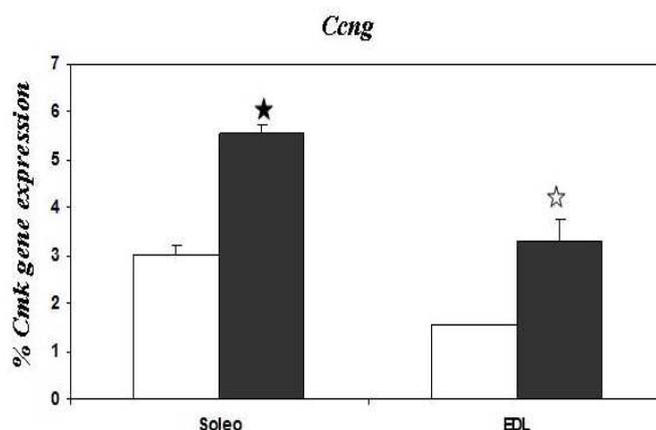


Fig 5.1: Variazione dell'espressione genica della *CcnG* nei muscoli Soleo e EDL dei ratti sottoposti ad esercizio fisico (colonna nera) e dei controlli (colonna bianca).

I simboli "stella bianca" e "stella nera" indicano la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.01$ e $p < 0.05$ rispettivamente) rispetto al controllo.

Valutazione dell'espressione genica dei fattori MRFs

È stata analizzata l'espressione genica dei membri della famiglia MRF (MRF4, MyoD, e Miogenina) che sono coinvolti nella miogenesi; questi fattori di trascrizione risultano maggiormente espressi nei muscoli sottoposti ad esercizio fisico (Fig 5.2). In particolare l'mRNA codificante per MRF4 aumenta di 1.53 volte nell'EDL dei ratti allenati rispetto al relativo controllo mentre rimane invariato nel muscolo Soleo.

È stata valutata l'espressione genica di MyoD; si può notare dal grafico sottostante come i livelli del suo messaggero risultano maggiormente espressi sia nel Soleo che nell'EDL dei ratti allenati (2,66 e 1.50 volte) rispetto ai controlli.

La miogenina sembra non essere coinvolta nei meccanismi di adattamento che sia attivano in seguito ad esercizio fisico; infatti la sua espressione non cambia sia nel Soleo che nell'EDL dei ratti allenati rispetto ai controlli.

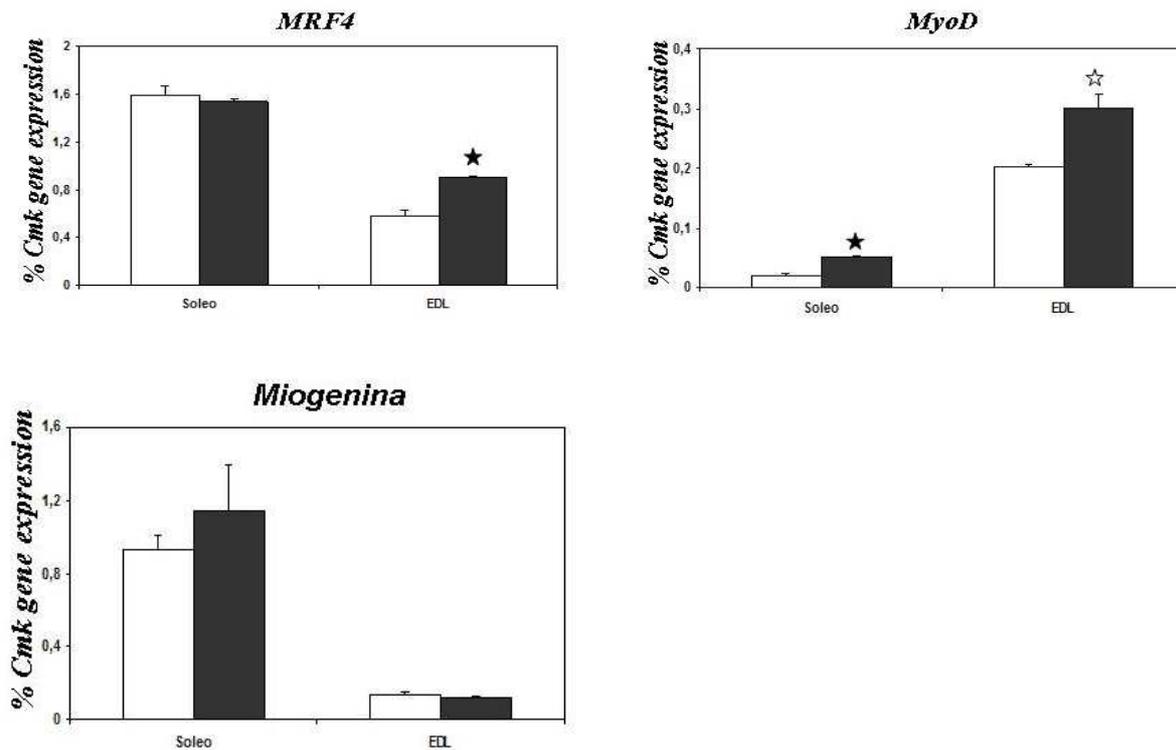


Fig. 5.2: Variazione dell'espressione genica dei fattori MRF4, MyoD e Miogenina nei muscoli Soleo e EDL dei ratti sottoposti ad esercizio fisico (colonna nera) e dei controlli (colonna bianca).

I simbolo "stella bianca" e "stella nera" indicano la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.01$ e $p < 0.05$ rispettivamente) rispetto al controllo.

Valutazione dell'espressione di geni nell'adattamento metabolico e nella biogenesi mitocondriale

Tramite Real-Time PCR è stata valutata l'espressione genica di Glut-4, il principale trasportatore del glucosio. La figura 5.3 mostra un aumento significativo dell'mRNA di Glut-4 sia nel Soleo che nell'EDL (2.16 e di 2,84 volte) dei ratti allenati rispetto al controllo.

I livelli di mRNA del gene Pgc-1alpha, coinvolto nei meccanismi che portano alla biogenesi mitocondriale e alla transazione verso un fenotipo ossidativo, risultano maggiormente elevati nel muscolo EDL dei ratti allenati (4.84 volte) rispetto ai controlli mentre non variano nel Soleo (Fig.5.3)

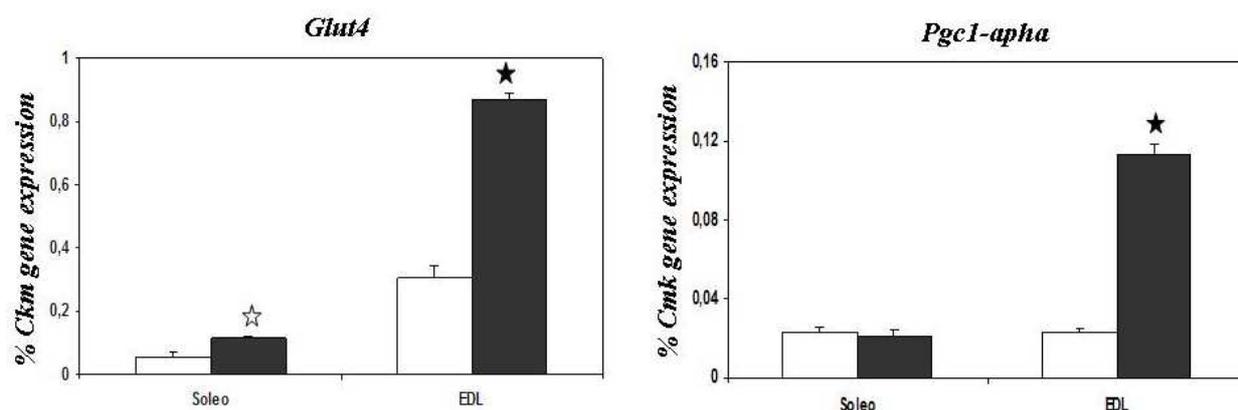


Fig. 5.3: Variazione dell'espressione genica di *Glut-4* e *Pgc1-apha* nei muscoli Soleo e EDL dei ratti sottoposti ad esercizio fisico (colonna nera) e dei controlli (colonna bianca).

I simbolo "stella bianca" e "stella nera" indicano la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.01$ e $p < 0.05$ rispettivamente) rispetto al controllo.

Variazione dell'espressione dei geni correlati nella neoangiogenesi

È stata analizzata l'espressione di due importanti geni coinvolti nella neoangiogenesi, VEGF e il suo recettore KDR. Come mostrato in figura 5.4, i livelli di mRNA di entrambi i geni risultano significativamente elevati nel muscolo EDL sottoposto ad esercizio fisico rispetto ai controlli mentre rimangono invariati nel Soleo. Tale aumento è di 2.98 volte per VEGF e 2.42 volte per KDR.

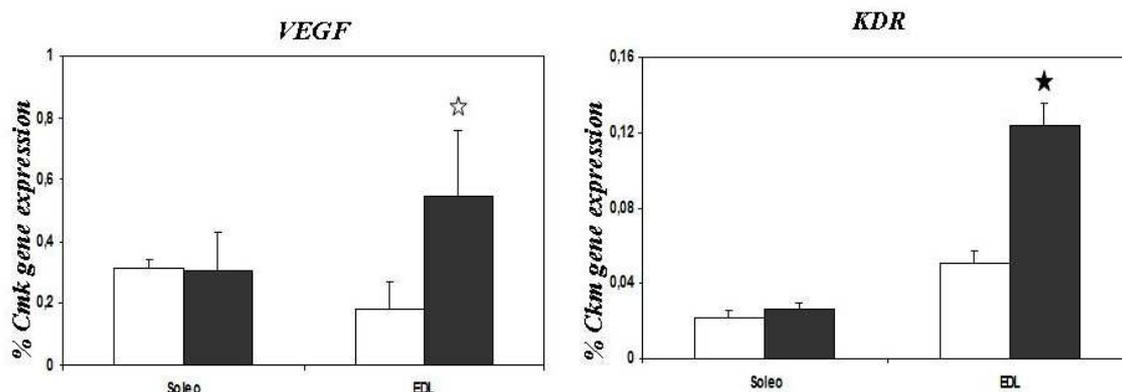


Fig. 5.4: Variazione dell'espressione genica di *VEGF* e *KDR* nei muscoli Soleo e EDL dei ratti sottoposti ad esercizio fisico (colonna nera) e dei controlli (colonna bianca).

I simbolo "stella bianca" e "stella nera" indicano la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.01$ e $p < 0.05$ rispettivamente) rispetto al controllo.

5.2 Valutazione dello stress ossidativo e delle difese antiossidanti nei muscoli Soleo ed EDL di ratti sottoposti ad esercizio fisico

Perossidazione lipidica

È stata valutata la perossidazione lipidica nei muscoli Soleo ed EDL di ratti allenati e controlli calcolando i livelli di MDA a livello del sarcolemma e delle membrane del reticolo sarcoplasmatico (SR) con il metodo del TBARS. I dati sono espressi come nmol di MDA per milligrammo di proteina.

Come mostrato in figura 5.5, sia nel Soleo che nell'EDL, si può notare un aumento significativo della perossidazione lipidica specificatamente a carico delle membrane del SR; tale alterazione potrebbe portare ad un'alterata omeostasi del calcio.

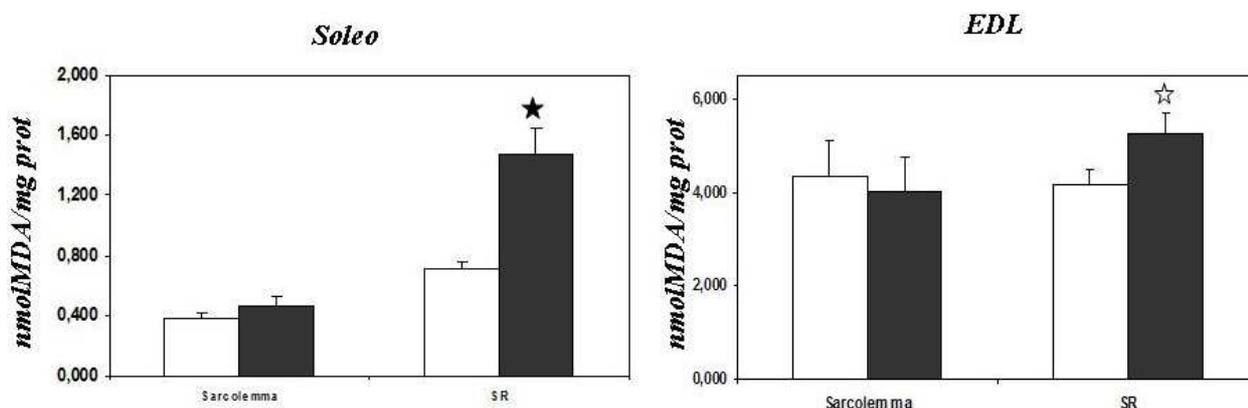


Fig. 5.5: Valutazione della perossidazione lipidica nel muscolo Soleo e EDL dei ratti sottoposti ad esercizio fisico (colonna nera) e dei controlli (colonna bianca).

I simboli “stella bianca” e “stella nera” indicano la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.01$ e $p < 0.05$ rispettivamente) rispetto al controllo.

Attività di canali e pompe

È stata valutata l'attività dei canali e delle pompe coinvolti nell'omeostasi del calcio utilizzando preparazioni di reticolo sarcoplasmatico (SR) e del sarcolemma dei muscoli Soleo e EDL dei ratti allenati e dei controlli.

I grafici relativi alle Figure 5.6 e 5.7 mostrano i saggi di binding del DHPR e della Rianodina e l'attività specifica della pompa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPasi.

Il binding della Rianodina mostra solo nell'EDL dei ratti allenati un leggero aumento, mentre non c'è alcuna differenza nel muscolo Soleo.

Per quanto riguarda il binding del DHPR in entrambi i muscoli non si evidenziano variazioni significative tra animali di controllo e allenati.

Nel caso della $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPasi invece, sia nel Soleo che nell'EDL l'allenamento determina un aumento dell'attività della pompa ionica.

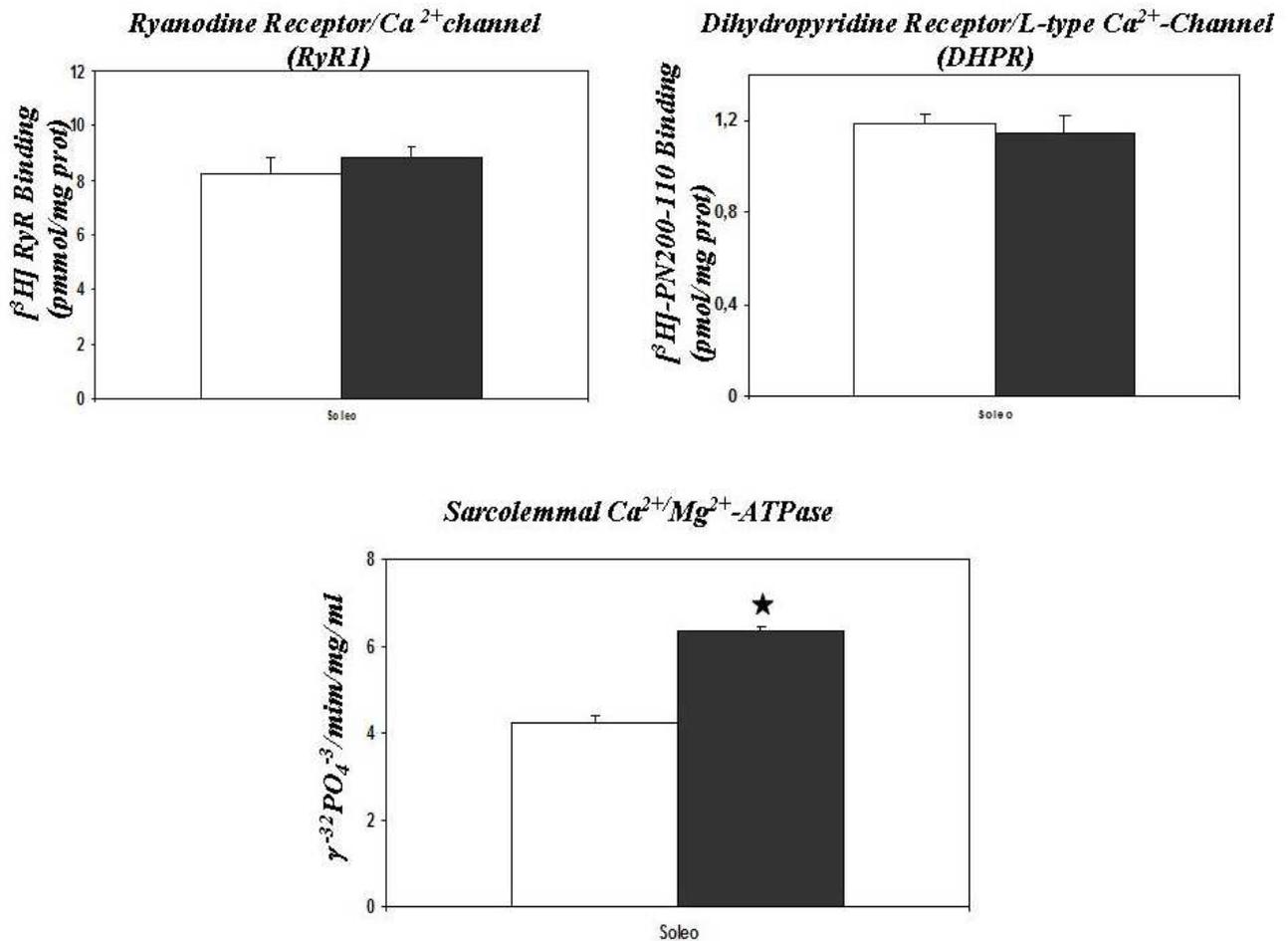


Fig. 5.6 Analisi dell'attività del recettore della RyR1, del recettore DHPR e della $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPasi nel muscolo Soleo dei ratti sottoposti ad esercizio fisico (colonna nera) e dei controlli (colonna bianca).

Il simbolo "stella nera" indica la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.01$) rispetto al controllo.

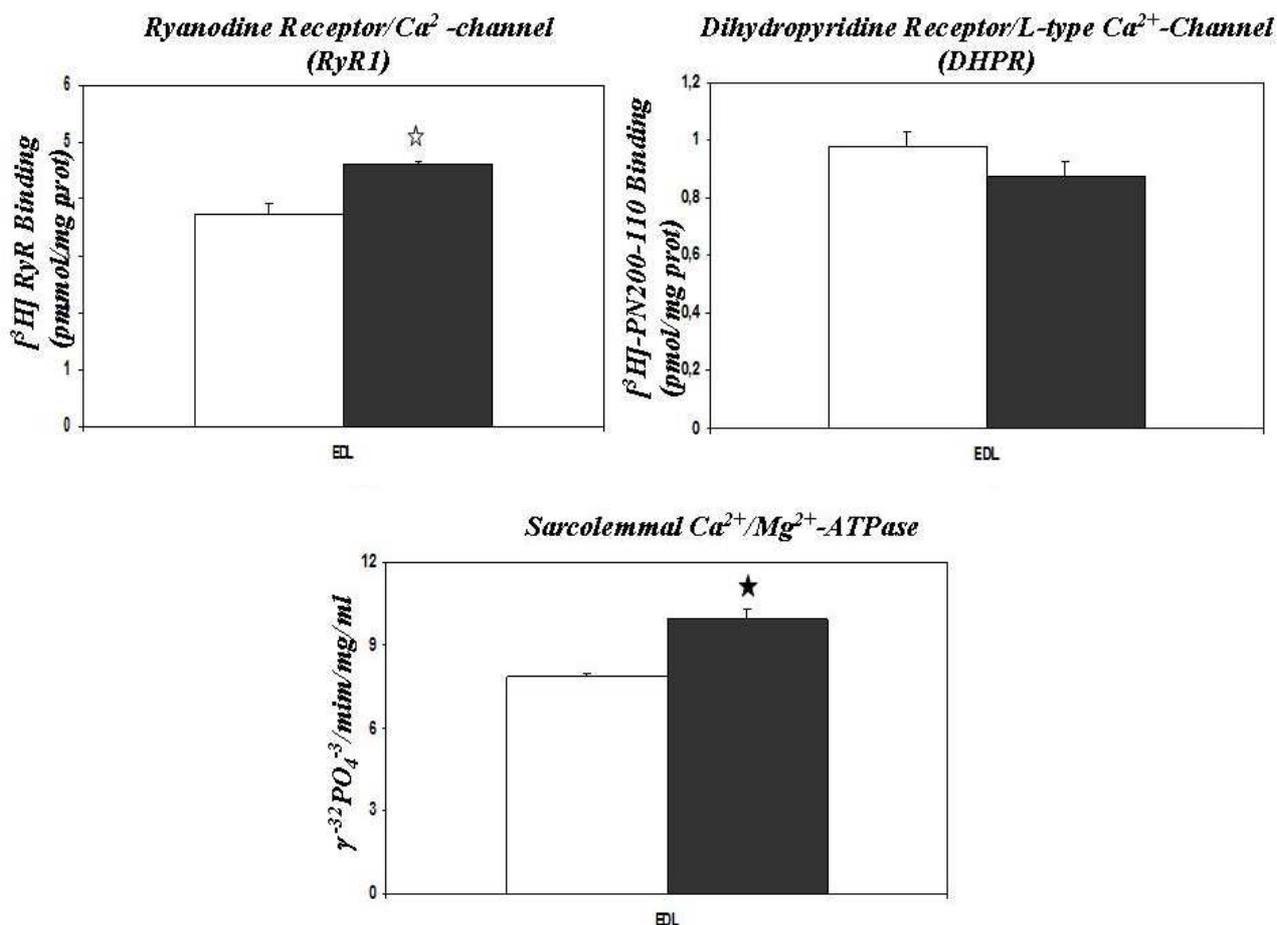


Fig. 5.7 Analisi dell'attività del recettore della RyR1, del recettore DHPR e della Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATPasi nel muscolo EDL dei ratti sottoposti ad esercizio fisico (colonna nera) e dei controlli (colonna bianca).

I simboli "stella bianca" e "stella nera" indicano la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.05$ e $p < 0.01$ rispettivamente) rispetto al controllo.

Analisi dell'espressione dei geni antiossidanti

Tramite Real-Time PCR è stata valutata l'espressione genica di alcuni enzimi (SOD-1, SOD-2 e Catalasi) che svolgono un'azione di detossificazione dei ROS all'interno della cellula.

I dati, espressi come percentuale relativa del gene housekeeping Ckm, sono rappresentati nella Figura 5.8. Si può osservare, sia nel Soleo sia nell'EDL, che l'espressione genica della Sod-1 e della Sod-2 non varia con l'allenamento. Per quanto riguarda la Catalasi, la figura 5.8 mostra un calo significativo (0,73 volte) dei livelli del suo mRNA nel muscolo Soleo allenato; al contrario nel muscolo EDL l'espressione della Catalasi aumenta (3.22 volte) in seguito ad allenamento rispetto ai controlli.

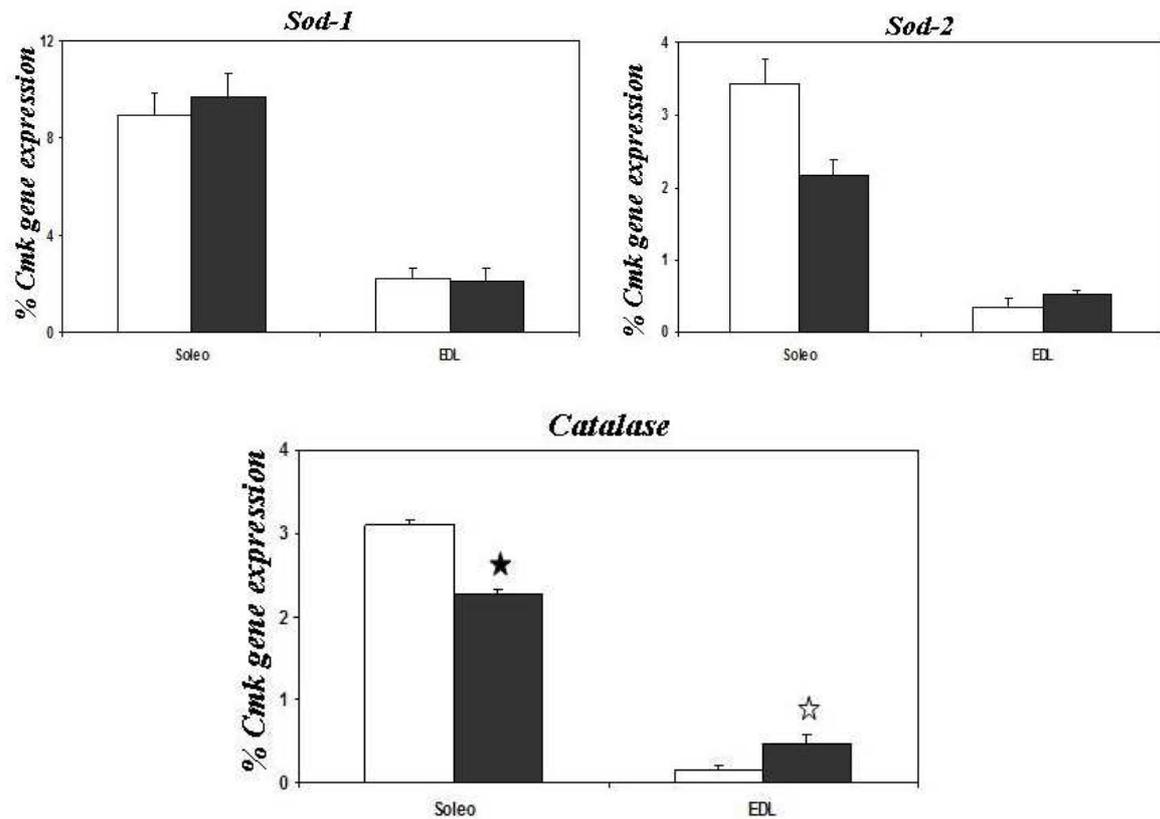


Fig. 5.8: Variazione dell'espressione genica della *Sod-1*, *Sod-2* e *Catalasi* nei muscoli Soleo e EDL dei ratti sottoposti ad esercizio fisico (colonna nera) e dei controlli (colonna bianca).

I simboli "stella bianca" e "stella nera" indicano la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.01$ e $p < 0.05$ rispettivamente) rispetto al controllo.

È stata valutata l'espressione di due geni, *Gstm-1* e *Gpx-1* coinvolti nel ciclo del glutatione.

Come mostrato in figura 5.9, per quanto riguarda i livelli di mRNA di *Gstm-1* non si evidenziano variazioni significative tra animali di controllo e allenati sia per il Soleo che per l'EDL.

Tuttavia l'espressione di *Gpx-1* risulta aumentata di 2.5 volte nell'EDL dei ratti allenati rispetto ai controlli, mentre non c'è alcuna differenza nel Soleo.

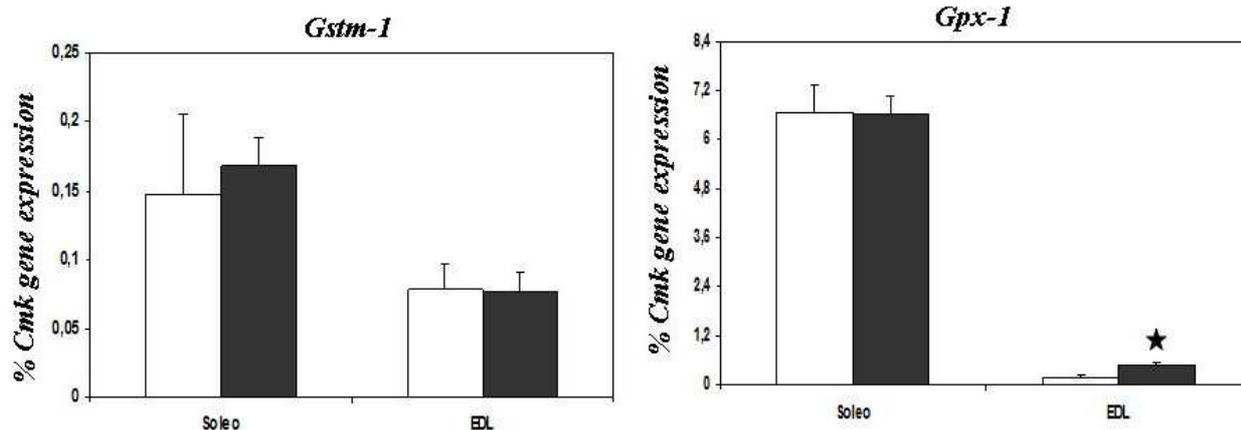


Fig. 5.9: Variazione dell'espressione genica della *Sod-1*, *Sod-2* e *Catalasi* nei muscoli Soleo e EDL dei ratti sottoposti ad esercizio fisico (colonna nera) e dei controlli (colonna bianca).

Il simbolo "stella nera" indica la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.01$) rispetto al controllo.

Valutazione dell'attività enzimatica della SOD

L'attività della SOD è stata valutata nei muscoli Soleo ed EDL dei ratti sottoposti ad esercizio fisico e dei controlli tramite sonda DCF. I dati, espressi come unità per milligrammo di proteina sono riportati in figura 5.10. L'analisi dell'attività della SOD è in accordo con i dati relativi all'espressione genica. Infatti sia nel Soleo che nell'EDL non si evidenziano variazioni significative dell'attività della SOD-2; mentre l'attività della SOD-1 presenta un leggero aumento solo nell'EDL mentre rimane invariata nel Soleo.

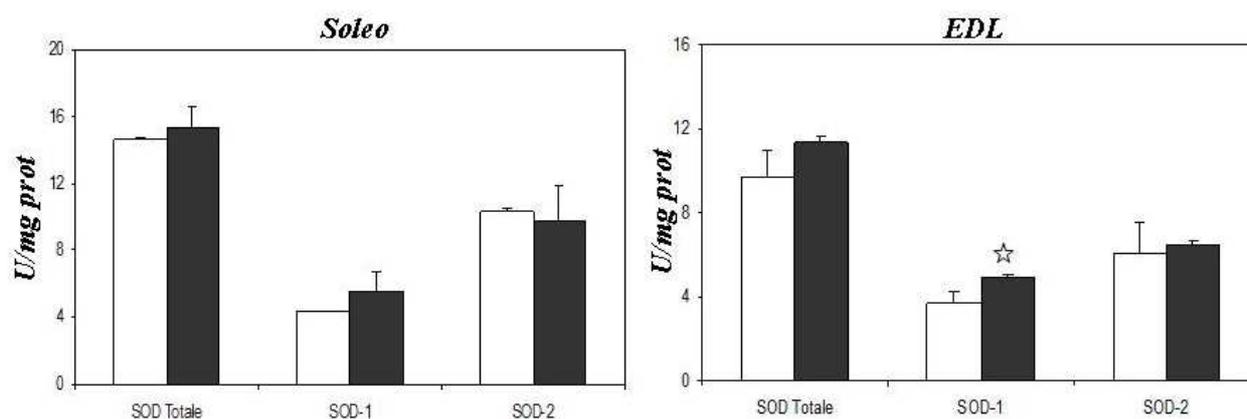


Fig. 5.10: Valutazione dell'attività della SOD Totale, della SOD-1 e della SOD-2 nei muscoli Soleo e EDL dei ratti sottoposti ad esercizio fisico (colonna nera) e dei controlli (colonna bianca).

Il simbolo "stella bianca" indica la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.05$) rispetto al controllo.

Analisi dell'espressione proteica di HSP-70

È stata analizzata l'espressione genica della isoforma inducibile dell'HSP-70 nel Soleo e nell'EDL dei ratti allenati e dei controlli.

Le figure 5.11 e 5.12 mostrano una corsa rappresentativa di un gel per HSP-70 e per la proteina housekeeping Beta-Actina. I grafici invece mostrano la variazione dell'espressione proteica di HSP-70 espresso come rapporto tra la proteina target e il gene di riferimento.

Nel Soleo la forma inducibile di HSP-70 è espressa anche a livello basale e in seguito ad allenamento si ha un aumento della sua espressione.

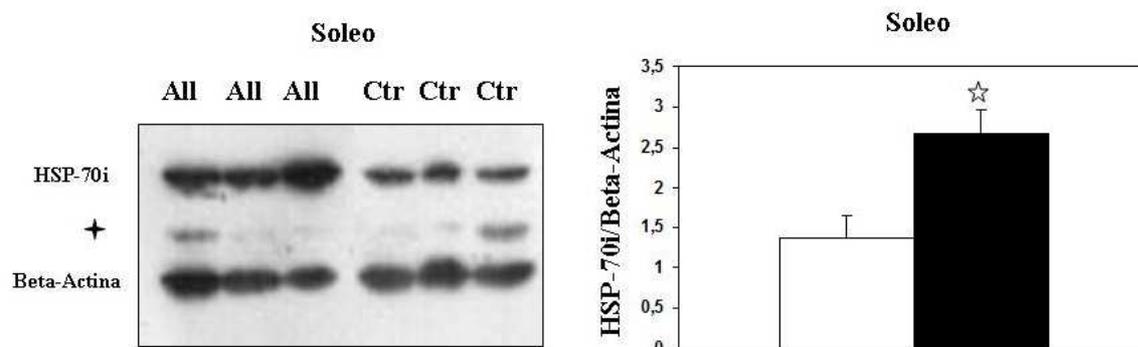


Fig. 5.11 Immagine rappresentativa di un WB per HSP-70 (70kDa) nel soleo dei ratti allenati e dei controlli.

Beta-Actin gene housekeeping (42kDa). Quantificazione della proteina HSP-70; le bande relative alle proteine HSP-70 e Beta-Actina di diverse corse sono state quantificate. I dati sono espressi come media del rapporto tra HSP-70 e Beta-Actina. Il simbolo "croce nera" banda aspecifica dell'anticorpo HSP-70. Il simbolo "stella bianca" indica la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.05$) rispetto al controllo.

Come mostra la figura 5.12, nel muscolo EDL controllo, l'isoforma inducibile di HSP-70 è poco espressa ma, in seguito ad allenamento si ha un incremento significativo della sua espressione negli animali allenati rispetto al controllo.

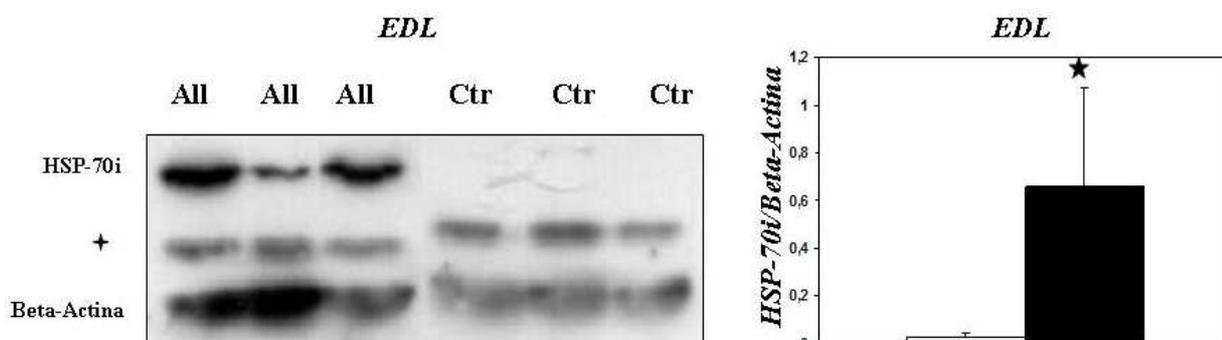


Fig. 5.12 Immagine rappresentativa di un WB per HSP-70 (70kDa) nel EDL dei ratti allenati e dei controlli.

Beta-Actin gene housekeeping (42kDa). Quantificazione della proteina HSP-70; le bande relative alle proteine HSP-70 e Beta-Actina di diverse corse sono state quantificate. I dati sono espressi come media del rapporto tra HSP-70 e Beta-Actina. Il simbolo “croce nera” banda aspecifica dell’anticorpo HSP-70. Il simbolo “stella nera” indica la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.01$) rispetto al controllo

Valutazione dell’espressione di geni coinvolti nell’infiammazione e nel riparo

Tramite Real-Time PCR, è stata valutata l’espressione genica di *Ccl21b* e *Scya3*, due chemochine coinvolte nei processi infiammatori e nella risposta immunitaria e di *Xrcc1*, che interviene nei meccanismi di riparo da danni al DNA. I dati, espressi come percentuale relativa del gene housekeeping *Ckm*, sono rappresentati nella Figura 5.13 e 5.14.

I geni *Ccl21b* e *Scya3*, risultano maggiormente espressi nel EDL dei ratti allenati rispetto ai controlli mentre nel Soleo non si evidenziano differenze significative di espressione.

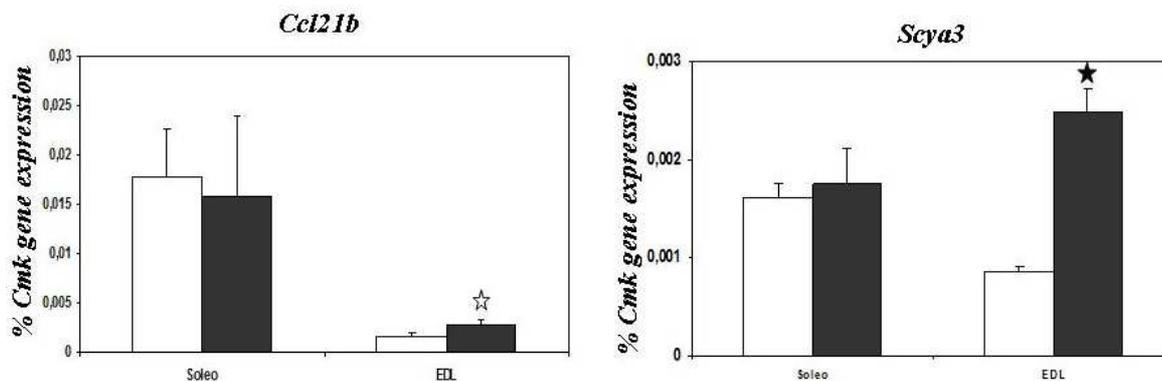


Fig. 5.13: Variazione dell’espressione genica di *Ccl21b* e *Scya3* nei muscoli Soleo e EDL dei ratti sottoposti ad esercizio fisico (colonna nera) e dei controlli (colonna bianca).

I simboli “stella bianca” e “stella nera” indicano la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.01$ e $p < 0.05$ rispettivamente) rispetto al controllo.

Per quanto riguarda l’espressione di *Xrcc1*, si può notare un leggero ma significativo aumento solo nei muscoli EDL dei ratti allenati mentre nel soleo i livelli di mRNA rimangono invariati rispetto al controllo. Tuttavia si può notare come nei muscoli Slow si ha un livello di espressione basale maggiore rispetto ai muscoli Fast. (Fig.5.14)

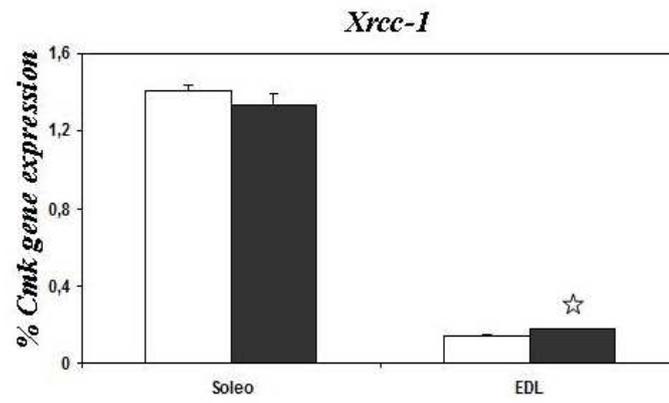


Fig. 5.14: Variazione dell'espressione genica della *Xrcc1* nei muscoli Soleo e EDL dei ratti sottoposti ad esercizio fisico (colonna nera) e dei controlli (colonna bianca).

Il simboli "stella bianca" indica la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.05$) rispetto al controllo.

Parte II Denervazione

5.3 Principali adattamenti del muscolo Tibiale Anteriore sottoposto a denervazione

Valutazione del grado di atrofia in seguito a denervazione

Come mostrato in Figura 5.15, i muscoli TA denervati mostrano un progressivo calo del rapporto peso muscolo/peso corporeo. In particolare questo calo si verifica principalmente nell'arco delle prime settimane dall'intervento chirurgico; infatti si ha una diminuzione del 50% del peso del muscolo già dopo 15 giorni dalla denervazione; questo calo diventa significativamente maggiore a 9 mesi della denervazione. Il rapporto peso muscolo/peso corporeo dei muscoli denervati sono espressi come percentuale del corrispondente muscolo controllo.

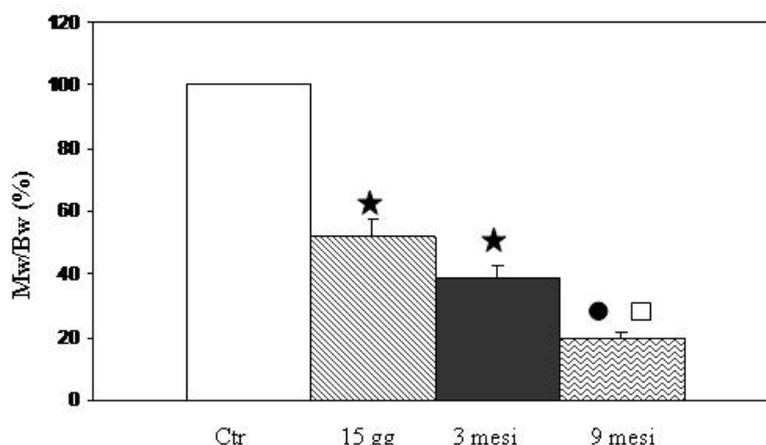


Fig. 5.15: Atrofia del muscolo denervato; I simboli “stella nera” indicano la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.01$) rispetto al controllo; Il simbolo “pallino nero” indica la significatività ($p < 0.005$) rispetto al controllo e il simbolo “quadrato bianco” indica la significatività rispetto ai muscoli sacrificati a 15 giorni dalla denervazione.

Colorazione con Ematossilina-Eosina e mATPasi a pH 4.35 e a pH 10.4

La colorazione Ematossilina-Eosina (H-E) colora in blu i nuclei basofili (ematossilina), e in rosso il citoplasma e il connettivo (eosina).

La colorazione mATPasi permette di distinguere le fibre muscolari sulla base della diversa attività della miofibrillar ATPasi a pH acido o basico. La reazione si basa sul deposito di un sale di un fosfato inorganico dovuto al clivaggio dell'ATP da parte della mATPasi che verrà sostituito da un cromogeno insolubile. Brooke e Kaiser nel 1970 dimostrarono che nelle fibre slow (fibre I),

l'attività della miofibrillar ATPasi è elevata e stabile dopo una pre-incubazione a pH acido (4.35), labile a pH basici (10.4).

Al contrario le fibre Fast (tipo II) mostrano un'intensa attività della mATPasi ai pH basici mentre ai pH acidi l'attività è debole. In questo modo le fibre slow in seguito ad una pre-incubazione a pH acido saranno scure mentre quelle veloci appariranno non colorate. L'inverso avviene nel caso di una pre-incubazione a pH alcalino; in questo caso le fibre slow appariranno chiare mentre le fast saranno scure.

Nelle figure 5.16 A, B, C si osservano delle sezioni trasversali di muscolo tibiale anteriore (TA) che non ha subito la denervazione (controllo).

La colorazione con H-E (Fig 5.16 A) evidenzia la struttura del muscolo, costituita da fibre con un diametro piuttosto elevato dove è possibile distinguere il citoplasma che assume una colorazione rossa dai nuclei periferici che assumono una colorazione blu. La colorazione mATPasi a pH 4.35 (Fig.5.16 B) o a pH 10.4 (Fig 5.16 C) evidenzia sia le fibre Slow sia quelle Fast.

Nelle figure 5.16 D, E, F si osservano sezioni trasversali di muscolo denervato di TA prelevato da un ratto sacrificato dopo 15 giorni dalla denervazione. È possibile osservare, con una colorazione H-E (Fig.5.16 D) il cambiamento morfologico rispetto al controllo. Le fibre muscolari risultano avere un diametro notevolmente più piccolo; questo andamento viene confermato con la colorazione mATPase a pH 4.35 (Fig 5.16 E), con la quale è possibile anche notare una riduzione delle fibre Slow e una maggiore prevalenza di fibre Fast che viene confermata dalla colorazione mATPase a pH 10.4 (Fig. 5.16 F).

Le figure 5.16 G, H, I mostrano due sezioni di TA denervato di ratto sacrificato dopo tre mesi dalla denervazione. Si osserva, con la colorazione H-E, un notevole aumento del tessuto connettivo lasso (Fig. 5.16 G), mentre le fibre presentano caratteristiche di tipo Fast, come si osserva con la colorazione mATPase (Fig. 5.16 H, I)

Infine, le figure 5.16 M N O mostrano una sezione trasversale del TA di un muscolo a 9 mesi dalla denervazione. Si nota come il diametro delle fibre non subisca un ulteriore decremento, ma rimanga piuttosto costante, come appare evidente dalla colorazione con H-E che mostra, anche, come il tessuto muscolare venga progressivamente sostituito dal tessuto adiposo (Fig.5.16 M) Le fibre muscolari, ancora presenti, sono di tipo Fast (Fig 5.16 N, O).

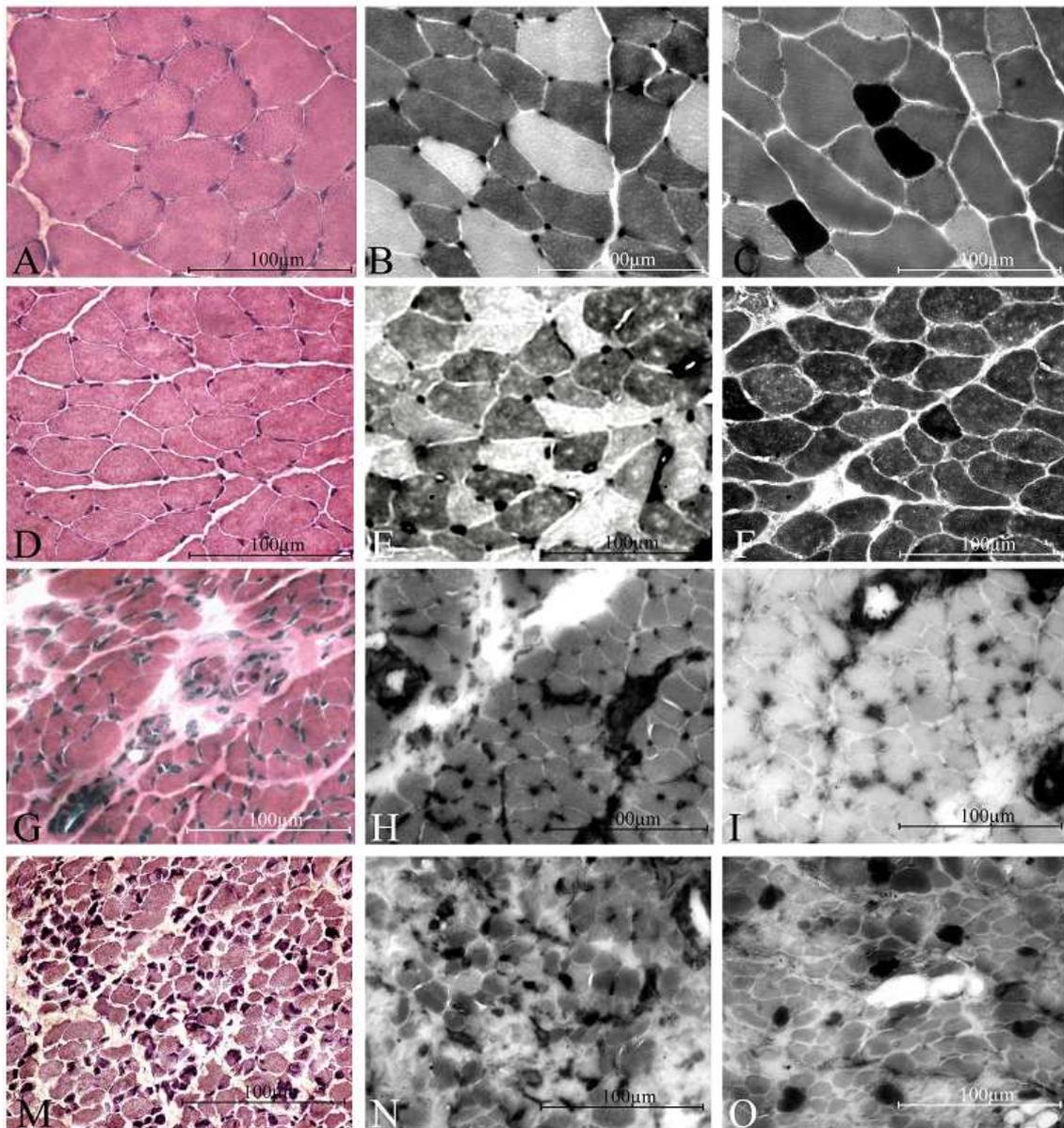


Fig. 5.16 Colorazione con H-E (A, D, G, M), mATPase pH 4.35 (B, E, H, N) mATPase pH 10.4 (C, F, I, O) di sezioni di muscolo tibiale anteriore (TA) di ratto controllo (A, B, C), sacrificato a 15 giorni (D, E, F), a tre mesi (G, H, I) e a nove mesi (M, N, O) dalla denervazione.

Immunofluorescenza

La figura 5.17 mostra delle sezioni di muscolo TA di ratto controllo (A, C) e denervato (9 mesi) (B, D) dopo colorazione con ematossilina-eosina (A, B) o dopo incubazione con un anticorpo che riconosce l'isoforma embrionale di MyCH (C, D)

La colorazione con ematossilina-eosina mostra come in seguito a denervazione (B) si ha una diminuzione della grandezza delle miofibre che progressivamente sono sostituite da tessuto adiposo rispetto al controllo (A) che invece presenta delle fibre muscolari con diametro elevato. Nel pannello D si osservano parecchie miofibre di piccolo diametro che vengono riconosciute

dall'anticorpo che lega l'isoforma embrionale dell'MyCH che invece non viene espressa nei controlli (C).

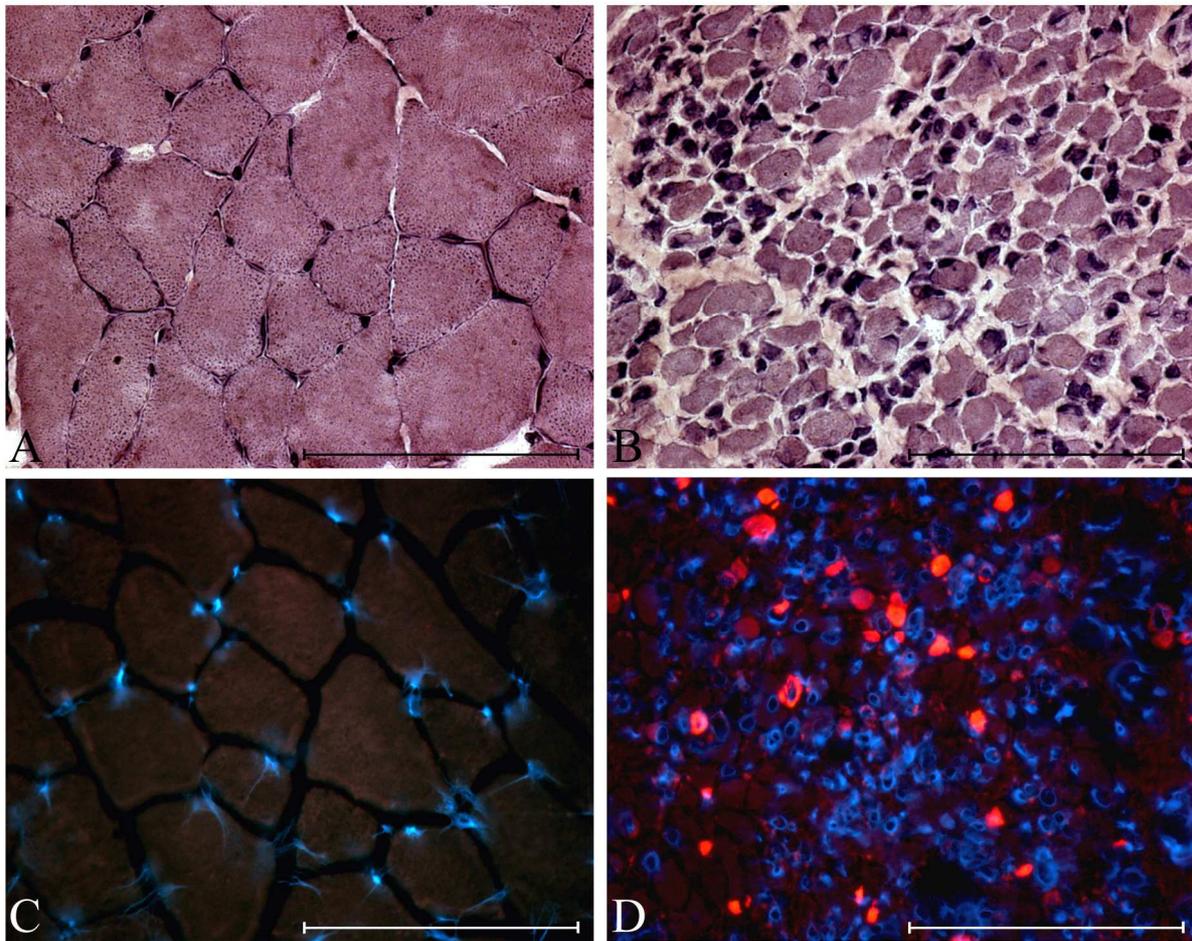


Fig. 5.17 Sezioni di TA di ratto controllo (A, C) e di ratto sacrificato dopo 9 mesi dalla denervazione (B, D) colorate con ematossilina-eosina (A, B) o marcate con anticorpi che riconoscono l'isoforma embrionale di MyCH (C, D).

Valutazione dell'espressione genica dei fattori di trascrizione muscolo specifici e di Myh3

Tramite Real-Time PCR è stata valutata l'espressione genica dei fattori di trascrizione muscolo-specifici che regolano la miogenesi (MyoD, Miogenina e Mrf4) e l'isoforma embrionale della Catena Pesante della Miosina (Myh3) nei muscoli denervati a tre mesi e a 9 mesi dalla denervazione. I dati sono espressi come percentuale relativa dell'espressione del gene housekeeping *Ckm*.

Come mostrato in figura 5.18, l'mRNA messaggero di tutti i geni risulta notevolmente aumentato nei muscoli a tre mesi dalla denervazione; tuttavia, sebbene i loro livelli rimangano elevati rispetto al controllo anche a nove mesi dalla denervazione, si può osservare che i valori tendono a tornare verso quelli del controllo (Fig. 5.18).

In particolare, rispetto ai controlli, l'espressione genica nei muscoli TA a tre mesi e a nove mesi dalla denervazione aumenta rispettivamente di 36,8 e 12,9 volte per MyoD, 48.8 e 31.1 volte per la Miogenina, di 9.3 e 4.4 volte per MRF4 e di 221.9 e 57.6 volte per Myh3.

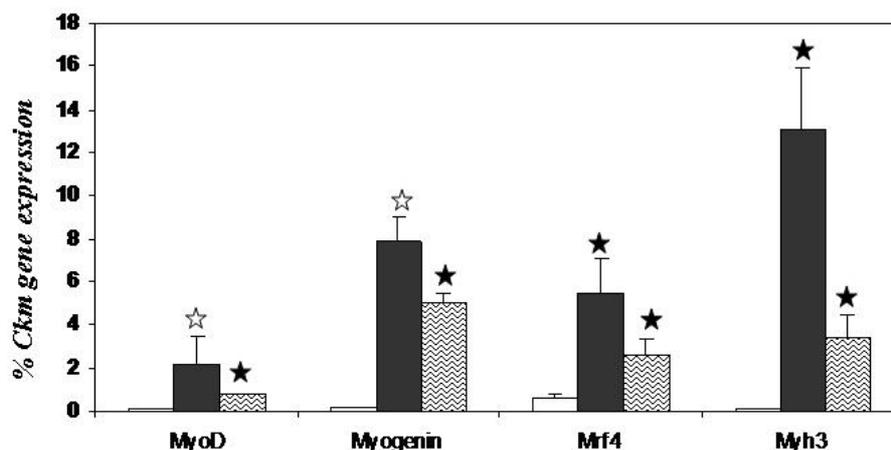


Fig. 5.18 Variazione dell'espressione dei geni codificanti per i fattori di trascrizione muscolo-specifici e per l'isoforma embrionale della catena pesante della miosina nei muscoli TA di ratti sacrificati a 3 mesi (colonna nera) e a 9 mesi (colonna righe) della denervazione rispetto ai controlli (colonna bianca). I simboli "stella bianca" e "stella nera" indicano la significatività calcolata con il test Anova rispettivamente ($p < 0.05$) e ($p < 0.01$), rispetto al controllo.

Valutazione dell'espressione di alcuni geni funzionali

È stata valutata tramite Real-Time PCR l'espressione di alcuni geni funzionali. I dati sono espressi come rapporto tra l'espressione del gene target nel tessuto denervato rispetto al controllo (Fig. 5.19) È stata studiata l'espressione della Kinasi attivata da AMP (AMPK), che ha un ruolo importante nell'attività cellulare e nella regolazione del trasportatore del glucosio sensibile all'insulina (GLUT-4).

L'espressione dell'mRNA dell'AMPK diminuisce nei muscoli sia a tre che a nove mesi dalla denervazione, rispettivamente di 19 e 15 volte.

Questo decremento si riflette nell'espressione del gene GLUT-4, che diminuisce nei muscoli dopo tre mesi e 9 mesi dalla denervazione di 9.8 volte e di 3 volte rispetto ai controlli

Anche l'espressione di due geni implicati nell'angiogenesi, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e il suo recettore KDR (Kinase Insert Domain Receptor), risulta diminuire nei muscoli denervati rispetto ai controlli. In particolare, l'espressione genica di VEGF diminuisce di 1,7 e 2,5 volte, rispettivamente a tre mesi e a nove mesi dalla denervazione; KDR invece, mostra un sensibile calo solo a 9 mesi dalla denervazione.

È stata valutata l'espressione genica di Nedd4 che codifica per una ubiquitina ligasi coinvolta la via di degradazione proteica ubiquitina-proteosoma. Come atteso, i livelli di mRNA appaiono elevati nei muscoli denervati rispetto ai controlli. In particolare Nedd4 è maggiormente espresso a tre mesi dalla denervazione (3.8 volte) mentre l'aumento a 9 mesi risulta statisticamente non significativo. Anche l'espressione genica della Metalloproteinasi-2 della Matrice (MMP2) aumenta rispettivamente di 3 e di 2 volte nei muscoli a tre mesi e a nove mesi dalla denervazione rispetto ai controlli.

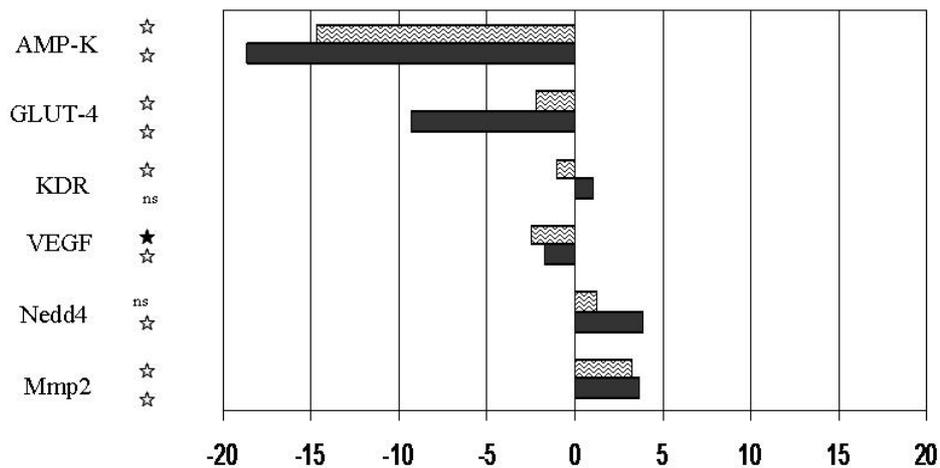


Fig. 5.19 Espressione differenziale dei geni funzionali, nei muscoli TA di ratti sacrificati a 3 mesi (colonna nera) e a 9 mesi (colonna righe) dalla denervazione.. I simboli "stella bianca" e "stella nera" indicano la significatività calcolata con il test Anova rispettivamente ($p < 0.05$) e ($p < 0.01$), rispetto al controllo. Ns: non significativo

Valutazione della produzione di ROS nei muscoli denervati

La produzione di ROS nel muscolo denervato è stata valutata tramite sonda DCF nei lisati proteici di muscolo TA di ratti controllo e denervati rispettivamente sacrificati a 15 giorni o a 3 mesi dall'intervento chirurgico.

La figura 5.20 A riporta un esperimento rappresentativo della produzione di ROS in funzione del tempo (0-45 minuti). Come si può vedere dal grafico la velocità con la quale i ROS vengono generati aumenta nei muscoli denervati e questo incremento è funzione del tempo di denervazione.

In particolare la produzione di ROS aumenta sensibilmente a 15 giorni dalla denervazione rispetto ai controlli; l'incremento dei ROS è ancora maggiore a 3 mesi dalla denervazione.

La figura 5.20 B confronta la quantità dei ROS prodotta alla fine dell'esperimento nei campioni di TA controllo e nei campioni sacrificati a 15 giorni e a 3 mesi della denervazione. Per ogni

campione, è stata calcolata la media delle differenze tra la quantità di ROS prodotta dopo 45 min di incubazione ($T_{45\text{min}}$) e quella prodotta al tempo zero ($T_{0\text{min}}$). La figura mostra un aumento dei ROS di 7,9 volte ($p<0.01$) nei muscoli di ratto sacrificati dopo 13 gironi dalla denervazione rispetto al controllo. L'aumento della produzione di ROS è ancora più pronunciato a tre mesi dalla denervazione che risulta essere 64.1 ($p<0.01$) volte maggiore rispetto al controllo e 7.6 volte ($p<0.01$) più elevato rispetto ai muscoli dei ratti sacrificati a 15 giorni dalla denervazione.

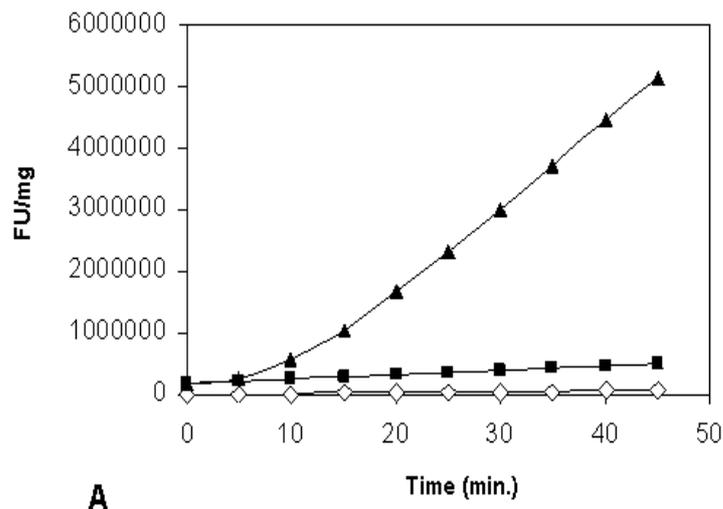


Fig. 5.20 A: Aumento della produzione dei ROS in funzione del tempo. Triangolo bianco: TA controlli; quadrato nero: TA a 15 giorni dalla denervazione; triangolo nero: TA a 3 mesi dalla denervazione.

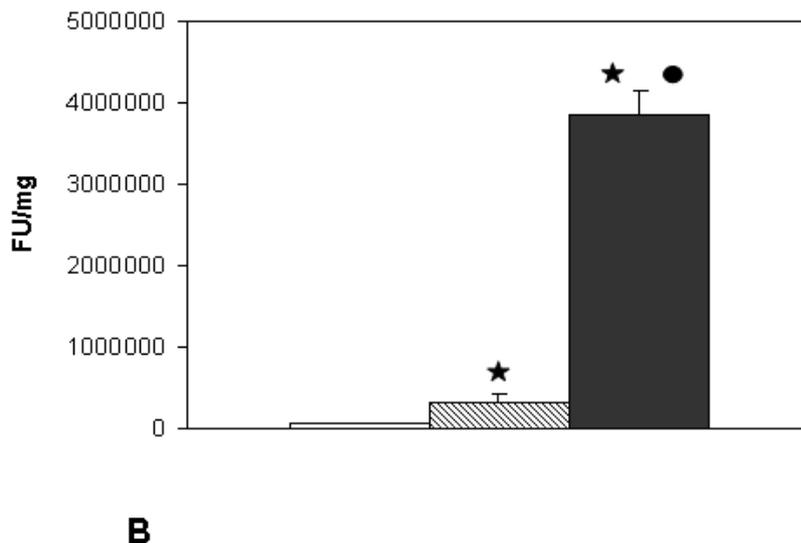


Fig. 5.20 B Aumento della produzione dei ROS nel muscolo TA dei ratti sacrificati a 15 giorni (colonna a righe) e a 3 mesi (colonna nera) dalla denervazione rispetto ai controlli (colonna bianca).

I simboli "stella nera" e "pallino nero" indicano la significatività calcolata con il test Anova ($p<0.01$) rispetto al controllo e muscoli sacrificati a 15 giorni dalla denervazione

Perossidazione lipidica

La presenza di danno ossidativo è stata valutata con il metodo del TBARS. La figura 5.21 mostra un aumento significativo dei valori di MDA nel sarcolemma e nelle membrane del SR sia a 15 giorni che a tre mesi dalla denervazione indicando che l'aumento di ROS può favorire la perossidazione lipidica, influenzando negativamente l'integrità delle membrane cellulari.

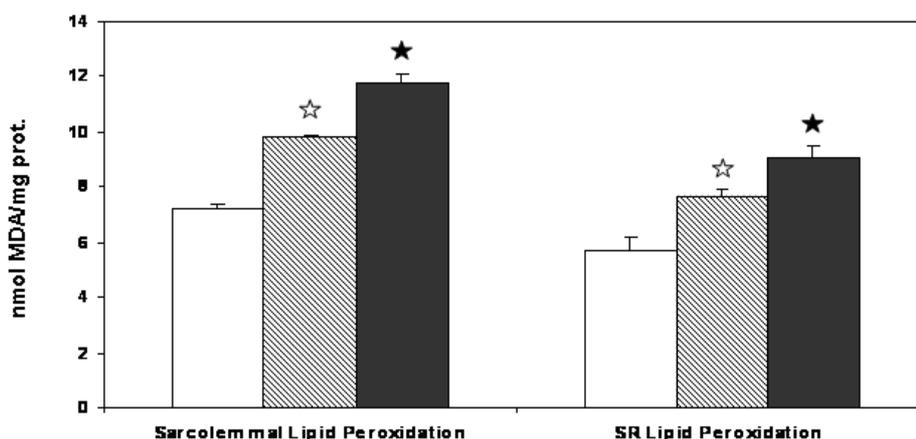


Fig. 5.21 Perossidazione lipidica nel muscolo TA dei ratti sacrificati a 15 giorni (colonna a righe) e a 3 mesi (colonna nera) dalla denervazione rispetto ai controlli (colonna bianca).

I simboli “stella bianca” e “stella nera” indicano la significatività calcolata con il test Anova rispettivamente ($p < 0.05$) e ($p < 0.01$), rispetto al controllo.

Attività delle pompe e dei canali ionici

Le 5.22 A-E mostrano una diminuzione dell'attività delle pompe e dei canali ionici nei muscoli TA denervati rispetto ai controlli.

Il legame del [^3H] Rianodina al Canale del Calcio presente sulla membrana del SR (recettore della Rianodina) è un indice della capacità di rilascio del calcio da parte del canale stesso. Nei muscoli dei ratti denervati e sacrificati a 15 giorni e a tre mesi dell'intervento chirurgico si osserva (Fig. 5.22 A), una diminuzione del legame della [^3H] rianodina del 45% e del 32% ($p < 0.01$ e $p < 0.05$) rispettivamente, rispetto al controllo. Questo dato indica una diminuzione della capacità del recettore di mantenersi nella configurazione attiva “open”.

L'attività della pompa del Ca^{2+} del SR, un indice della capacità del SR di riassorbire il calcio, è stata valutata misurando la capacità della stessa di rimanere nello stato fosforilato. La figura 5.22 B mostra come l'attività della pompa del Ca^{2+} diminuisce del 61% (15 giorni dalla denervazione) e del 54,4% (3 mesi dalla denervazione) rispetto al controllo ($p < 0.01$).

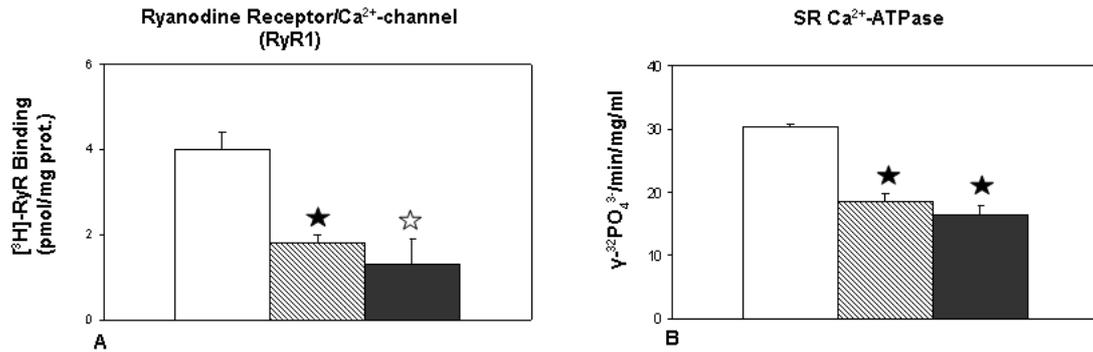


Fig.5.22 **A**: Attività del recettore della Rianodina, **B** attività pompa del Ca^{2+} nel muscolo TA dei ratti sacrificati a 15 giorni (colonna a righe) e a 3 mesi (colonna nera) dalla denervazione rispetto ai controlli (colonna bianca). I simboli “stella bianca” e “stella nera” indicano la significatività calcolata con il test Anova rispettivamente ($p < 0.05$) e ($p < 0.01$), rispetto al controllo.

La quantità del recettore della Diidropiridina (DHPR) presente nelle membrane dei tubuli T è stata valutata attraverso la misura del legame del [³H]PN200-110 al recettore stesso (Canale del Ca^{2+} di tipo L). La figura 5.22 C mostra un marcata diminuzione del legame con [³H]PN200-110 (37.3% nei muscoli denervati rispetto al controllo). Questo dato suggerisce che la denervazione induce una forte diminuzione dell’attività contrattile del muscolo.

È stata valutata l’attività di due pompe ioniche presenti nel sarcolemma: la Na^+/K^+ -ATPasi e la $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPasi, misurando la quantità del rilascio di γ -³²PO₄³⁻. In entrambi i casi, i dati mostrano un decremento significativo dell’attività delle pompe in seguito a denervazione, il che indica una diminuzione delle capacità della cellula muscolare di riequilibrare il calcio nel citosol e di mantenere un apparato contrattile funzionale.

In effetti, si riscontra una diminuita attività della Na^+/K^+ -ATPasi (Fig.5.22 D) sia a 15 giorni (-52,5%) che a 3 mesi (-47,0%) dalla denervazione, rispetto ai controlli. La figura 5.22 E mostra un calo netto e significativo dell’attività della $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPasi a 15 giorni (-66,7%) e a 3 mesi (-41,7%) della denervazione rispetto al controllo.

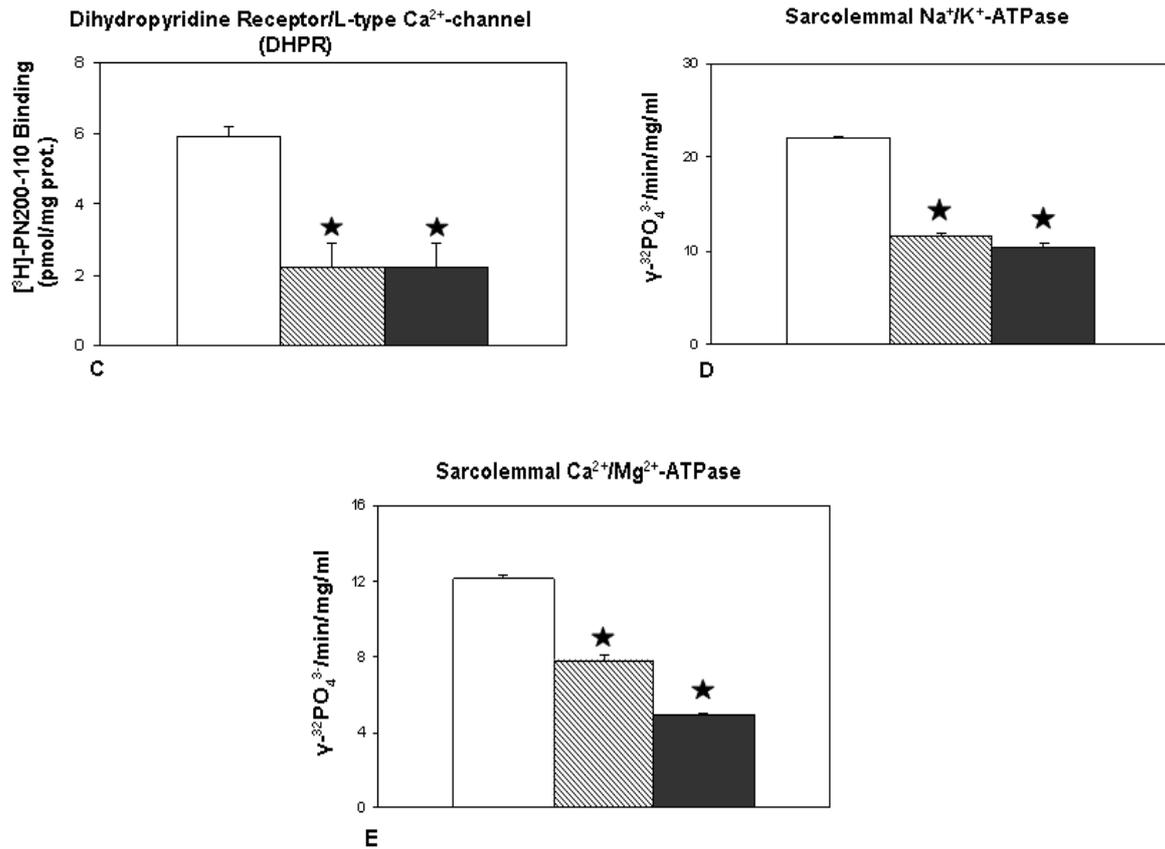


Fig. 5.22 **C**: Attività del recettore della DHPR, **D** attività Na⁺/K⁺-ATPasi, **E** Ca²⁺/Mg²⁺-ATPasi nel muscolo TA dei ratti sacrificati a 15 giorni (colonna a righe) e a 3 mesi (colonna nera) dalla denervazione rispetto ai controlli (colonna bianca).

Il simbolo “stella nera” indica la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.01$) rispetto al controllo.

Valutazione di alcuni geni coinvolti nel controllo del calcio intracellulare

È stata valutata l’espressione genica di diversi enzimi legati al controllo del calcio: la Subunità beta 1 del Canale del calcio di tipo L, lo scambiatore sodio-calcio (NCX2), un trasportatore calcio ATPasi (ATP2B4) e la Calsequestrina 2, un enzima coinvolto nel mantenimento dello ione calcio nel reticolo sarcoplasmatico. Come mostrato in figura 5.23 gli mRNA di tutti i geni esaminati mostrano un aumento significativo sia a 15 giorni che a 3 mesi relativamente ai controlli.

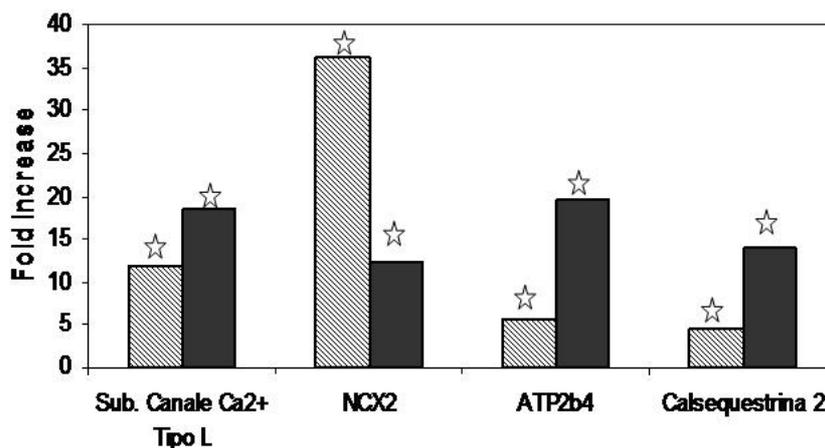


Fig. 5.23: Espressione differenziale di alcuni geni coinvolti nel controllo del calcio nei muscoli TA dei ratti sacrificati a 15 giorni (colonna a righe) e a 3 mesi (colonna nera) dalla denervazione.

Il simbolo “stella bianca” indica la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.01$) rispetto al controllo.

Valutazione dell’espressione di alcuni geni codificanti per enzimi cito-protettivi e antiossidanti

Tramite Real-Time PCR, è stata valutata nel muscolo TA di ratti controllo e denervati, l’espressione di geni coinvolti nella risposta allo stress ossidativo. I risultati mostrano un significativo aumento dell’espressione genica a 15gg dalla denervazione; molti dei geni presi in esame rimangono significativamente sovraespressi anche per 3 mesi rispetto al controllo, sebbene l’incremento sia di entità minore che a 15 giorni. I dati ottenuti sono espressi come percentuale relativa all’espressione del gene housekeeping *Ckm*.

È stata valutata la variazione dell’espressione genica di due chaperones molecolari, Hsp27 e Hsp70 (Fig. 5.24), che permettono un corretto ripiegamento delle proteine e che è stato dimostrato essere coinvolti nella risposta antiossidante. Nonostante l’espressione basale molto bassa, l’RNA di *Hsp-70* aumenta sia a 15 giorni che a 3 mesi dalla denervazione, (32,7 e 4,9 volte) rispetto ai controlli. A differenza di *Hsp-70*, l’mRNA di *Hsp-27* è espresso anche nei controlli e tende ad aumentare in seguito a denervazione (9,6 e 5,9 volte rispettivamente). Tuttavia è possibile notare come l’aumento dell’espressione di entrambi i geni a tre mesi dalla denervazione risulti essere significativamente minore rispetto ai 15 giorni.

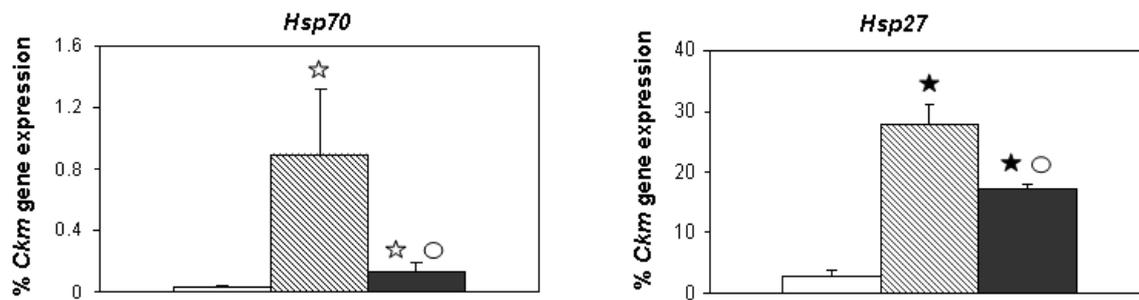


Fig. 5.24: Variazione dell'espressione genica degli enzimi citoprotettivi *Hsp-70* e *Hsp-27* nel muscolo TA dei ratti sacrificati a 15 giorni (colonna a righe) e a 3 mesi (colonna nera) della denervazione rispetto ai controlli (colonna bianca).

I simboli "stella bianca" e "stella nera" indicano la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.05$ e $p < 0.01$) rispetto al controllo. Il simbolo "pallino bianco" indica la significatività ($p < 0.05$) rispetto ai 15 giorni.

È stata valutata l'espressione genica della SOD-1 e della SOD-2, due importanti enzimi antiossidanti coinvolti nella risposta allo stress ossidativo. L'mRNA della *Sod-1* aumenta di 8,5 volte nei muscoli a 15 giorni dalla denervazione rispetto ai controlli e la sua espressione è fortemente incrementata (11,5 volte) anche dopo tre mesi dall'intervento chirurgico. La quantità dell'RNA relativa alla *Sod-2*, come mostra, appare invariata nei muscoli denervati rispetto ai controlli (Fig. 5.25).

Gli enzimi SOD catalizzano la reazione di dismutazione dell'anione superossido a perossido di idrogeno; l'attività di questi due enzimi quindi è strettamente connessa alla *Catalasi*, un enzima chiave nella detossificazione del perossido di idrogeno.

Infatti, parallelamente all'aumento della *Sod-1*, l'RNA della *Catalasi* risulta aumentata di 16,2 e 6,0 volte rispettivamente a 15 giorni e a 3 mesi dalla denervazione rispetto ai controlli. Tuttavia è possibile notare che l'espressione della *Catalasi* a tre mesi dalla denervazione risulta essere significativamente minore rispetto ai 15 giorni (Fig. 5.25).

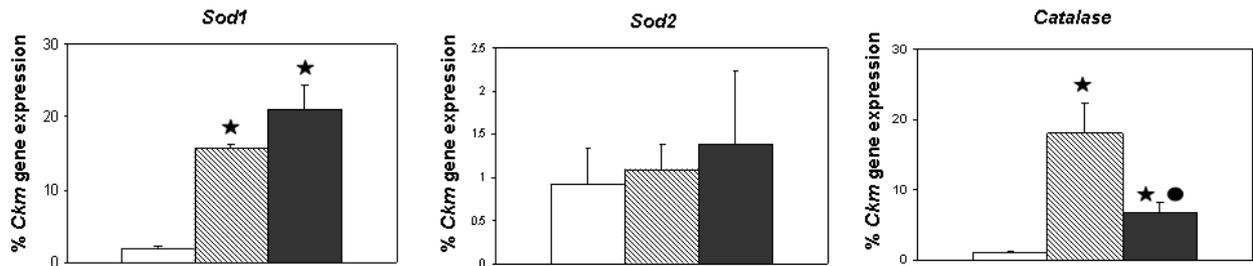


Fig. 5.25: Variazione dell'espressione genica degli enzimi antiossidanti *Sod-1*, *Sod-2* e *Catalasi* nel muscolo TA dei ratti sacrificati a 15 giorni (colonna a righe) e a 3 mesi (colonna nera) della denervazione rispetto ai controlli (colonna bianca).

Il simbolo "stella nera" indica la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.01$) rispetto al controllo. Il simbolo "pallino nero" indica la significatività ($p < 0.01$) rispetto ai 15 giorni.

È stata valutata l'espressione genica di tre enzimi coinvolti nel ciclo del GSH: Glutazione S-Trasferasi (*Gstm1*), la Glutazione Perossidasi 1 (*Gpx-1*) e la Glutazione Perossidasi 4 (*Gpx-4*) (Fig. 5.26). I dati mostrano che l'mRNA codificante per la *Gstm1* aumenta sia a 15 giorni (3.3 volte) che a 3 mesi (2.2 volte) dalla denervazione. Lo stesso andamento si evidenzia per sia per *Gpx-1* che per *Gpx-4* che aumentano di 3.0 e 2.2 volte rispettivamente a 15 giorni dalla denervazione e di 1,8 e 1,7 volte a 3 mesi dalla denervazione.

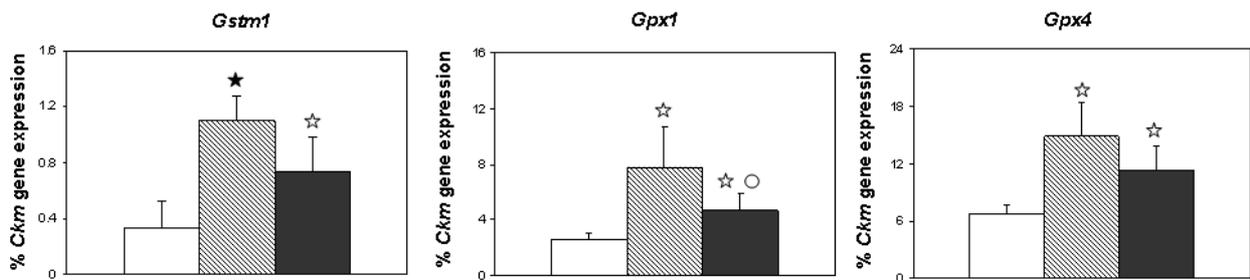


Fig. 5.26: Variazione dell'espressione genica degli enzimi antiossidanti *Gstm-1* e *Gpx-1* e *Gpx-4* nel muscolo TA dei ratti sacrificati a 15 giorni (colonna a righe) e a 3 mesi (colonna nera) della denervazione rispetto ai controlli (colonna bianca).

I simboli "stella bianca" e "stella nera" indicano la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.05$ e $p < 0.01$) rispetto al controllo. Il simbolo "pallino bianco" indica la significatività ($p < 0.05$) rispetto ai 15 giorni.

Valutazione dell'espressione proteica dell'enzima HSP-70i

L'enzima HSP-70 (Mol. W. 70 kDa) è stata analizzato anche a livello di espressione della proteina, tramite la tecnica del Western Blotting. Dall'analisi risulta che la proteina è espressa maggiormente e in maniera significativa ($p < 0.05$) nei muscoli di ratti sacrificati a 15 giorni dalla denervazione

rispetto al controllo (Fig. 5.27 A e B). Questo risultato è in accordo con i dati della valutazione dell'espressione genica ottenuti tramite Real-Time (Fig. 5.24)

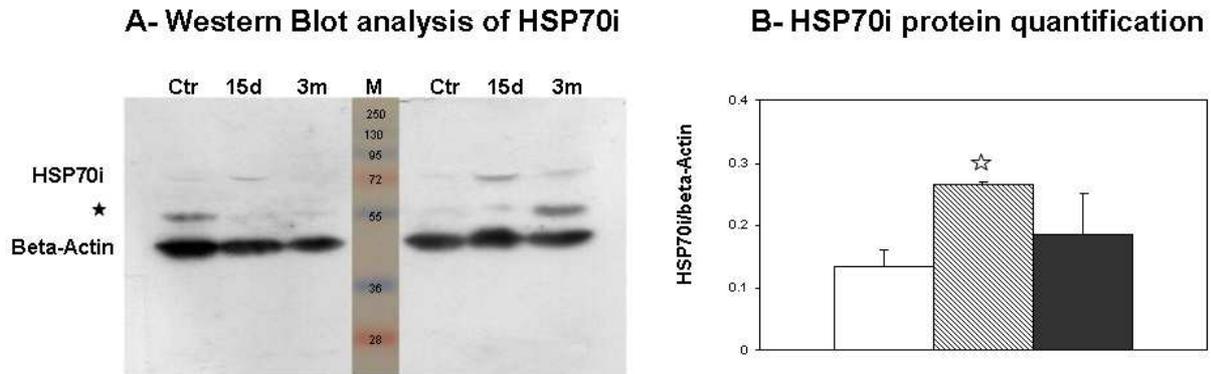


Fig. 5.27 **A**: Immagine rappresentativa di un WB per HSP-70 (70kDa); Ctr (controllo), 15d (15 giorni), 3m (3 mesi), M (marker di peso molecolare). Beta-Actin gene housekeeping (42kDa). **B**: Quantificazione della proteina HSP-70; le bande relative alle proteine HSP-70 e Beta-Actina di diverse corse sono state quantificate. I dati sono espressi come media del rapporto tra HSP-70 e Beta-Actina. Il simbolo * indica una banda aspecifica relativa all'anticorpo HSP-70. Il simbolo "stella bianca" indica la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.05$) rispetto al controllo.

Valutazione dell'attività della SOD

La figura 5.28 mostra la valutazione dell'attività della SOD totale e della SOD-1 e della SOD-2 con il metodo del WST-1. Come si può osservare, l'attività della SOD totale aumenta significativamente sia a 15 giorni che a 3 mesi dalla denervazione rispetto ai controlli. L'incremento dell'attività della SOD totale probabilmente è dovuto esclusivamente all'aumento dell'attività della SOD-1 dato che la SOD-2 rimane invariata sia a 15 giorni che a 3 mesi.

I dati ottenuti sono in accordo con la valutazione dell'espressione genica della *Sod-1* e della *Sod-2*.

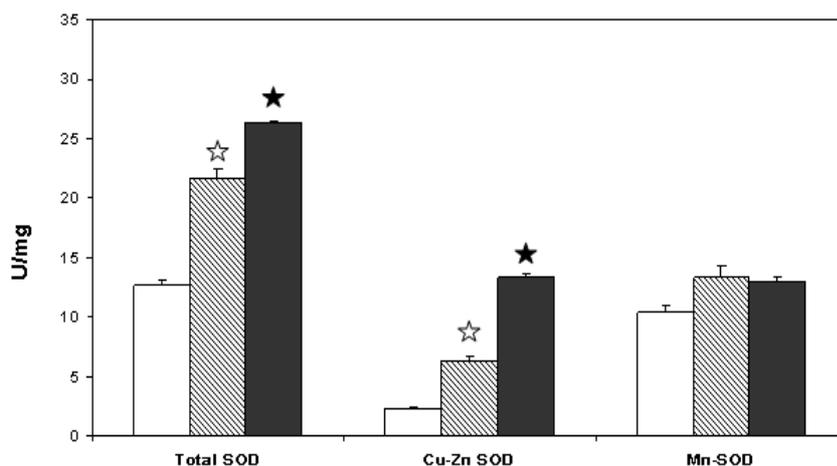


Fig. 5.28: Valutazione dell'attività della SOD totale (total SOD), della SOD-1 (Cu-Zn SOD) e della SOD-2 (Mn-SOD) nel muscolo TA dei ratti sacrificati a 15 giorni (colonna a righe) e a 3 mesi (colonna nera) della denervazione rispetto ai controlli (colonna bianca).

I simboli "stella bianca" e "stella nera" indicano la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.05$ e $p < 0.01$) rispetto al controllo.

Valutazione dell'espressione di alcuni geni codificanti per enzimi pro-ossidanti

Tramite Real-Time PCR, è stata valutata, nel muscolo denervato, l'espressione genica di due enzimi, la Xantina Deidrogenasi (XDH) e la NADPH Ossidasi I (NOX1), potenziali fonti di ROS. I dati sono espressi come percentuale relativa dell'espressione del gene housekeeping *Ckm*.

I dati riportati in figura 5.29 mostrano un aumento dell'espressione genica della *Xdh* a 15 giorni (5.8 volte) dalla denervazione; è possibile notare come nei muscoli TA di ratti sacrificati a tre mesi della denervazione, la quantità di mRNA risulta essere diminuire di 1.9 volte se confrontata con i valori dei soggetti sacrificati dopo 15 giorni dalla denervazione.

Il grafico relativo all'espressione genica di *Nox-1* mostra un netto calo della quantità di mRNA a 15 giorni dalla denervazione (0.4 volte rispetto al controllo). La diminuzione è ancora più marcata con l'aumentare del tempo dalla denervazione (0.2 volte rispetto al controllo).

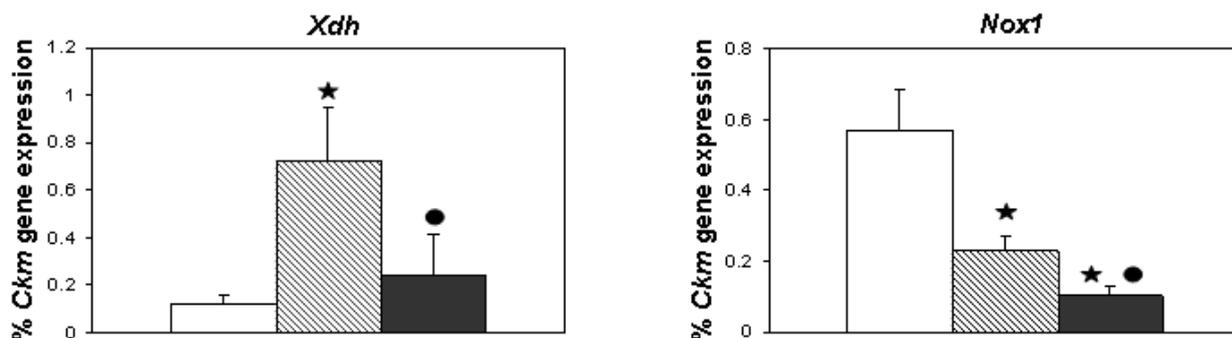


Fig. 5.29 Variazione dell'espressione genica degli enzimi pro-ossidanti *Xdh* e *Nox1* nel muscolo TA dei ratti sacrificati a 15 giorni (colonna a righe) e a 3 mesi (colonna nera) dalla denervazione rispetto ai controlli (colonna bianca). Il simbolo "stella nera" indica la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.01$) rispetto al controllo. Il simbolo "pallino nero" indica la significatività ($p < 0.01$) rispetto ai 15 giorni.

È stata valutata l'espressione genica della *cPLA₂*, un enzima capace di idrolizzare i lipidi perossidati dalle membrane. Come mostrato in figura 5.30, la quantità di mRNA che codifica per tale enzima risulta significativamente più elevata nei muscoli denervati a 15 giorni (7.2 volte rispetto al controllo). Sebbene i dati mostrino un sensibile aumento dell'espressione della *cPLA₂* anche a 3 mesi dalla denervazione (1,7 volte rispetto ai controlli), si può osservare che si ha un forte calo della quantità di mRNA rispetto ai muscoli denervati a 15 giorni.

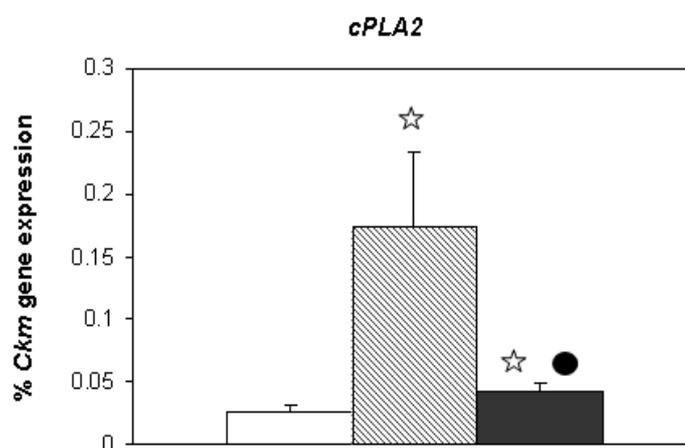


Fig. 5.30 Variazione dell'espressione genica dell'enzima *cPLA₂* nel muscolo TA dei ratti sacrificati a 15 giorni (colonna a righe) e a 3 mesi (colonna nera) dalla denervazione rispetto ai controlli (colonna bianca). Il simbolo "stella bianca" indica la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.05$) rispetto al controllo. Il simbolo "pallino nero" indica la significatività ($p < 0.01$) rispetto ai 15 giorni.

Valutazione dell'espressione genica di enzimi correlati al mitocondrio

È stata valutata l'espressione genica di due enzimi mitocondriali, la Citocromo Ossidasi Subunità 1 (COXI) e la Citrato Sintasi e del fattore di trascrizione PGC1-alpha che stimola la biogenesi degli enzimi della fosforilazione ossidativa ed è attivato dai ROS.

Come mostrato in Figura 5.31 l'mRNA della *CoxI* risulta maggiormente espresso (21.0 e 4.6 volte rispetto al controllo) sia a 15 giorni che a 3 mesi dalla denervazione. L'espressione genica della *CoxI* nei muscoli di ratto sacrificato dopo 3 mesi dalla denervazione è significativamente diminuita. L'espressione genica della *Citrato Sintasi* e di *Pgc1-alpha* seguono lo stesso andamento; entrambi i geni sono sovraespressi di a 15 giorni dalla denervazione (3.0 e 2.2 volte rispetto al controllo) ma ritornano ai valori basali nei muscoli di ratto sacrificato dopo 3 mesi dalla denervazione.

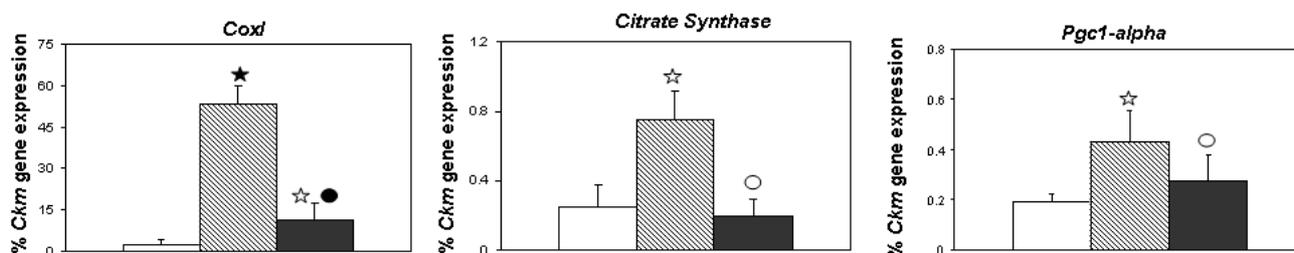


Fig. 5.31 Variazione dell'espressione genica dell'enzima *CoxI*, *Citrato Sintasi* e *Pgc1-alpha* nel muscolo TA dei ratti sacrificati a 15 giorni (colonna a righe) e a 3 mesi (colonna nera) dalla denervazione rispetto ai controlli (colonna bianca).

I simboli "stella bianca" e "stella nera" indicano la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.05$ e $p < 0.01$ rispettivamente) rispetto al controllo. I simboli "pallino bianco" e "pallino nero" indicano la significatività ($p < 0.05$ e $p < 0.01$ rispettivamente) rispetto ai 15 giorni.

Valutazione dell'espressione genica di alcuni enzimi dei complessi mitocondriali OXPHOS

È stata analizzata tramite Western Blotting, l'espressione proteica di alcuni enzimi mitocondriali coinvolti nella fosforilazione ossidativa (Fig. 5.32). COXI (un enzima del complesso IV, risulta maggiormente espresso sia a 15 giorni che a 3 mesi dalla denervazione rispetto al controllo. Questo risultato è in accordo con i dati relativi all'espressione genica dello stesso enzima (Fig.5.31).

L'espressione di due enzimi, la proteina di Rieske e la Subunità A della Succinato Deidrogenasi (SDHA), appartenenti rispettivamente al Complesso III e II, aumenta moderatamente nei muscoli denervati. La figura 5.32 tuttavia, mostra solo un leggero incremento dell'espressione proteica della subunità beta della $-F_1F_0$ ATP-sintasi e della proteina NDFUA9 (NADH Deidrogenasi (ubichinone) 1alpha del subcomplesso 9), che fa parte del complesso I, nei muscoli denervati.

È stata valutata l'espressione proteica della Ciclofillina D, indice della massa mitocondriale, che risulta sostanzialmente diminuita a tre mesi della denervazione.

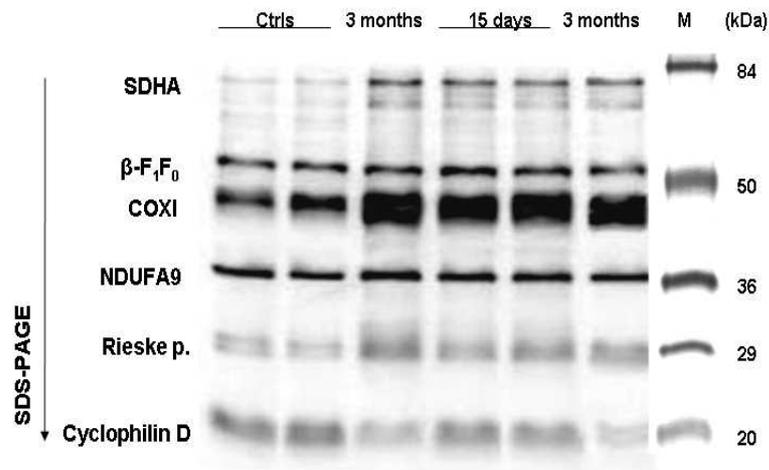


Fig. 5.32 Analisi dell'espressione proteica degli enzimi OXPHOS nei muscoli TA controllo (Ctrls), sacrificati a 15 giorni (15 days) e 3 mesi (3 months) dalla denervazione. M. marker di peso molecolare. SDHA (70 kDa), β -F₁F₀ ATP-asi (52 kDa), COXI (57 kDa, peso molecolare apparente 45 kDa), NDFUA9 (39 kDa), proteina di Rieske (22 kDa, peso molecolare apparente 30 kDa) e Ciclofillina D (18 kDa).

Valutazione dell'attività della Citrato Sintasi

L'attività della Citrato Sintasi, considerato come indice della massa mitocondriale, è stata valutata misurando la velocità di rilascio del coenzima A sia nei muscoli denervati che nei controlli.

I dati riportati in figura 5.33 mostrano una diminuzione significativa dell'attività della citrato sintasi (15%; $p < 0.05$) a 15 giorni dalla denervazione rispetto ai controlli. Questo calo diventa ancora più pronunciato (-34%; $p < 0.01$) nei muscoli TA dei ratti sacrificati dopo 3 mesi dalla denervazione. I dati relativi all'attività della citrato sintasi tuttavia non sono in accordo con i valori relativi all'espressione genica che risulta aumentata a 15 giorni dalla denervazione per poi tornare ai valori basali del controllo a 3 mesi.

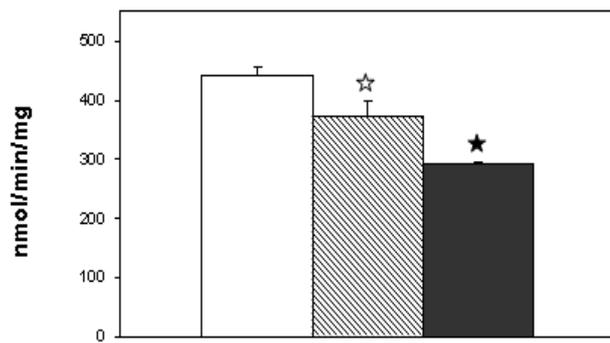


Fig. 5.33: Attività della Citrato Sintasi nel muscolo TA dei ratti sacrificati a 15 giorni (colonna a righe) e a 3 mesi (colonna nera) dalla denervazione rispetto ai controlli (colonna bianca). L'attività dell'enzima è espressa come nmol/min /mg di proteina). I simboli "stella bianca" e "stella nera" indicano la significatività calcolata con il test Anova ($p < 0.05$ e $p < 0.01$ rispettivamente) rispetto al controllo.

Capitolo 6

Discussione

Il muscolo scheletrico in condizioni normali è un tessuto stabile con un basso turnover di cellule (Chargé et al., 2004). Tuttavia in seguito a stimoli esterni, esercizio fisico o denervazione, il muscolo è sottoposto ad una serie di cambiamenti morfologici, biochimici e funzionali, che gli permettono di adattarsi alla nuova situazione (Flück et al., 2003) attraverso un'intensa variazione dell'espressione di molti geni coinvolti in questo complicato processo, per molti aspetti ancora poco chiaro.

Il presente studio, infatti, nasce dall'esigenza di voler comprendere i meccanismi molecolari alla base dell'adattamento muscolare in due situazioni totalmente opposte, esercizio fisico e denervazione. A tale scopo si è ricorso ad un modello animale che, rispetto al modello umano, consente approcci sperimentali diretti. Un gruppo di ratti adulti maschi Sprague-Dowley, sono stati allenati per 14 settimane seguendo un protocollo di allenamento che prevedeva una corsa su un nastro trasportatore (un'ora, tre volte a settimana, 55% $VO_{2\max}$); questo tipo di esercizio rappresenta un allenamento moderato di tipo aerobico (Wisloff et al 2001). Un altro gruppo è stato sottoposto a denervazione chirurgica e sono stati sacrificati a tempi differenti dalla denervazione (15 giorni, tre mesi o nove mesi). Abbiamo valutato in entrambi i casi alcuni dei meccanismi che si sa dalla letteratura essere implicati nei processi di adattamento del muscolo scheletrico in seguito a stimolazione esterna. L'esercizio fisico e la denervazione rappresentano due condizioni completamente opposte; infatti mentre il primo porta all'attivazione delle vie di segnalazione relative all'ipertrofia, la denervazione invece attiva i meccanismi che portano ad atrofia. Entrambi i processi dipendono da sottili regolazione della via Akt/mTOR (Sandri 2008).

Indubbiamente l'esercizio fisico produce effetti benefici a livello del miocardio, probabilmente agendo come fattore preconditionante in grado di proteggere il cuore da eventi dannosi (Powers S K et al. 2008). A livello muscolare l'esercizio fisico comporta una serie di cambiamenti e adattamenti che portano a profonde modifiche del fenotipo, frutto dell'intensa variazione dell'espressione di diversi geni. Tuttavia questi cambiamenti della struttura muscolare dipendono dal tipo di esercizio, dall'intensità, dalla durata.

Nel nostro caso, l'esercizio fisico aerobico moderato determina un aumento della massa muscolare e un diminuzione del peso corporeo; come mostrato nella tabella 5.1, la massa sia dell'EDL che del Soleo relativa al peso corporeo, aumenta negli animali allenati rispetto ai controlli; tuttavia l'ipertrofia muscolare non è associata ad ipertrofia cardiaca, infatti, non si evidenziano differenze

significative tra controlli e allenati nel rapporto peso del cuore-peso corporeo. L'aumento della massa muscolare trova supporto a livello molecolare nell'incremento, sia nel Soleo che nell'EDL, del gene della ciclina G, una proteina coinvolta nei meccanismi di proliferazione cellulare. L'aumento di espressione della ciclina G suggerisce infatti che l'ipertrofia muscolare sia da collegarsi alla proliferazione delle cellule satelliti, stimolata dall'esercizio fisico, cui segue la fusione di nuovi nuclei con le miofibre esistenti. I nostri dati inoltre mostrano un aumento dei fattori di trascrizione muscolo-specifici MRFs quali MyoD e MRF4. Questi fattori di trascrizione sono espressi a livello embrionale e sono di fondamentale importanza nell'induzione e nel differenziamento della linea miogenica (Rudnicki et al., 1993); nella vita post-natale vengono negativamente regolati principalmente dall'attività elettrica del muscolo (Adams et al., 1995; Buonanno et al., 1992; Eftimie et al., 1991). Tuttavia questi fattori possono essere riespressi anche nell'adulto in seguito a determinati stimoli e indurre la formazione di nuove fibre muscolari o il riparo di fibre già esistenti, promuovendo il differenziamento delle cellule satelliti. Inoltre è stato visto che nel caso dell'esercizio fisico possono contribuire nella transizione verso un fenotipo slow delle fibre (Fluck et al., 2003). Ci sembra che l'aumento di espressione delle MRFs da noi osservato sia da collegarsi logicamente con l'aumento di espressione della ciclina G e con l'aumento della massa muscolare, suggerendo quindi che l'adattamento del tessuto muscolare all'esercizio moderato ed aerobico determini anche fenomeni di stimolazione del ciclo cellulare e di differenziamento delle cellule satelliti, un aspetto relativamente trascurato in letteratura.

L'esercizio fisico induce nel muscolo scheletrico anche dei cambiamenti metabolici (Wu H et al., 2003); in particolare, l'esercizio moderato aerobico determina una transizione dei muscoli verso un fenotipo maggiormente lento/ossidativo, che consente loro di resistere maggiormente alla fatica.

Ad esempio, si è visto che un'intensa attività contrattile stimola l'aumento del trasporto del glucosio (MacLean PS et al., 2002); in accordo con tali dati, dimostriamo qui che, in seguito ad esercizio fisico moderato, si ha un aumento di espressione di Glut-4, il principale trasportatore del glucosio, sia nel Soleo che nell'EDL. Tali dati dimostrano che entrambe le tipologie muscolari vengono potenziate in seguito all'allenamento.

D'altro canto, abbiamo visto che alcuni cambiamenti dovuti all'esercizio aerobico moderato si riflettono esclusivamente sull'EDL, un muscolo a metabolismo prevalentemente rapido/glicolitico, mentre non sembrano interessare il Soleo, che già possiede caratteristiche fenotipiche di muscolo lento/glicolitico.

Ciò vale, ad esempio, per la stimolazione della biosintesi mitocondriale; i dati della letteratura indicano che l'aumento delle capacità ossidative e della biosintesi mitocondriale, dipende da PGC1-alpha, che, a sua volta, regola l'espressione dei fattori di trascrizione NFR-1 e NFR-2, che

promuovono la trascrizione di geni codificanti per proteine mitocondriali (Hood D et al., 2006,) e Tfam, che direttamente stimola la replicazione e la trascrizione del DNA mitocondriale. In effetti, i nostri dati mostrano che l'esercizio fisico moderato induce un aumento di PGC1-alpha nell'EDL dei ratti allenati rispetto al controllo.

Inoltre, la transizione verso un metabolismo maggiormente ossidativo richiede anche un aumento della rete capillare. I fattori coinvolti sono soprattutto VEGF e il suo principale recettore, KDR, a loro volta controllati da HIF-1. A sua volta, HIF-1 potrebbe essere indotto da episodi localizzati e transitori di ipossia (Koulmann N et al., 2006). In tal modo, attraverso la formazione di nuovi vasi e capillari si migliora il trasporto di ossigeno e metaboliti e si ha quindi l'aumento delle capacità ossidative del muscolo. In effetti, i nostri dati, mostrano un aumento dell'espressione di entrambi i geni della neoangiogenesi nel muscolo EDL, mentre nel Soleo non si evidenziano differenze di espressione.

L'esercizio fisico è stato associato ad un aumento della produzione di ROS dovuto al maggior consumo di ossigeno (Davies et al., 1982), ma la produzione dei ROS è controbilanciata dalla presenza a livello cellulare di enzimi antiossidanti che neutralizzano le specie ossidanti. Uno squilibrio tra la produzione di ROS e le difese antiossidanti determina una condizione che prende il nome di stress ossidativo. L'eccesso di ROS determina una serie di modificazione dannose per DNA, proteine e lipidi. Ci siamo quindi posti il problema se l'esercizio fisico moderato determina, a livello del muscolo scheletrico, un vero e proprio stress ossidativo. Infatti, abbiamo osservato che, a livello sistemico, i nostri animali presentano elevate quantità di MDA nel sangue (Marini et al., 2007); inoltre, sia nel Soleo che nell'EDL dei ratti allenati si può osservare un aumento della perossidazione dei lipidi a carico delle membrane del reticolo sarcoplasmatico. Tuttavia, il Soleo, probabilmente per la maggior esposizione basale ai ROS, collegata al maggior contenuto di mitocondri, sembra già predisposto ad una maggiore espressione delle difese antiossidanti, tanto che il livello basale di MDA è risultato minore nel Soleo rispetto all'EDL.

Una maggior perossidazione lipidica a livello del reticolo sarcoplasmatico potrebbe alterare la funzionalità dei canali del calcio e, in particolare, Sun et al., (2001) dimostrarono che il canale della rianodina è sensibile allo stato di ossidazione, che può alterarne la sua attività e influenzare la contrazione muscolare. Numerosi studi sono già stati condotti per valutare eventuali variazioni della funzionalità delle proteine di trasporto del calcio in seguito ad esercizio fisico, ma spesso tali studi riguardavano allenamenti intensi ed esaustivi (Inashima et al., 2003). I nostri dati indicano che i ROS non vanno a intaccare la funzionalità dei canali del sarcolemma e del SR; anzi, tali trasportatori risultano maggiormente attivi in entrambi i muscoli sottoposti ad esercizio fisico, il che è indice della loro maggiore attività contrattile. Come mostrato nelle figure 5.26 e 5.27, si ha un

aumento della $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPasi, una pompa in grado di regolare l'omeostasi del calcio sia nel Soleo e nell'EDL dei ratti allenati rispetto al controllo e, per quanto riguarda l'EDL, dell'attività del recettore della RyR1. Possiamo quindi dedurre che l'aumento dei ROS dovuto all'aumento dell'attività metabolica di tipo ossidativo, pur determinando perossidazione lipidica, non sembra avere conseguenze funzionali sulle membrane del reticolo sarcoplasmatico, che svolgono un ruolo fondamentale non solo nel meccanismo dell'accoppiamento eccitazione-contrazione (ECC), ma anche nel controllo del livello del calcio citoplasmatico e, quindi, dell'integrità cellulare stessa.

È noto inoltre che l'esercizio fisico promuove l'espressione genica degli enzimi antiossidanti (Powers Sk et al., 2010). Infatti in uno studio condotto da Brooks et al., (2008) è stato osservato che l'attività fisica porta ad un aumento dell'attività della SOD totale e della SOD-2, mentre l'attività della SOD-1 e della Catalasi rimangono invariate. In letteratura esistono molti lavori che riportano un aumento delle capacità ossidanti ma, come detto in precedenza, gli adattamenti molecolari indotti dall'esercizio variano in base al tipo di esercizio, alla durata, e all'intensità.

I nostri dati mostrano un debole aumento, in seguito ad esercizio fisico, dell'espressione degli enzimi antiossidanti, soprattutto a carico dell'EDL, che, come abbiamo notato, è meno esposto ai ROS in condizioni basali e quindi deve contrastare, con un potenziamento delle difese antiossidanti, gli adattamenti che lo portano ad una tipologia maggiormente ossidativa. In particolare, si ha un incremento dei livelli di mRNA della catalasi e di GPx-1 rispetto ai controlli. Non si riscontra nessuna variazione di espressione genica per gli enzimi che fanno parte della famiglia delle superossido dismutasi, sebbene un leggero aumento dell'attività della SOD-1 sia stato osservato nei muscoli EDL allenati rispetto ai controlli. Tutti i geni che codificano per gli enzimi antiossidanti presi in esame non mostrano differenze significative nel Soleo eccetto per la catalasi che risulta diminuire nei muscoli allenati (Fig.5.27 e 5.28). Questi dati sembrano in contrasto, comunque, con la constatazione di un aumento della perossidazione lipidica, che abbiamo osservato sia a livello sistemico sia a livello dei singoli muscoli, ma bisogna tener conto che i nostri studi sono stati condotti su muscoli prelevati 48 h dopo l'ultimo allenamento; si potrebbero quindi interpretare tali dati come risultato di adattamenti che hanno luogo in maniera transitoria, in presenza di una produzione "acuta" di ROS e che vengono rapidamente down-regolati, mentre la perossidazione lipidica è indice di un danno pregresso e i lipidi modificati richiedono un certo tempo per la loro eliminazione.

A dimostrazione che comunque l'esercizio fisico moderato determina, in particolare nell'EDL, una risposta di tipo "difensivo", vi sono i dati relativi all'espressione di due chemochine, Ccl21b e Sca3, coinvolte nei processi di infiammazione cellulare e di un gene coinvolto nel riparo, Xrcc1. I

nostri dati mostrano un aumento di entrambe le chemochine e di Xrcc1 nel muscolo EDL dei ratti allenati rispetto al controllo.

Inoltre, è stato dimostrato che il muscolo scheletrico si adatta ad eventi che causano stress aumentando l'espressione delle proteine Heat Shock, una famiglia di proteine citoprotettive altamente conservate coinvolte nel folding delle proteine neoformate o mal ripiegate. È stato dimostrato che l'esercizio fisico acuto o di resistenza porta ad un aumento delle proteine HSP-70, HSP-27 e HSP-60. Mentre l'espressione genica di queste proteine aumenta durante l'esercizio o immediatamente dopo, ma è transitoria, la proteina è più stabile e può essere visualizzata tramite WB (Morton et al., 2009). I nostri dati, in accordo con quelli presenti in letteratura, mostrano un aumento della proteina HSP-70 sia nel soleo che nell'EDL. Tuttavia va sottolineato che l'aumento più pronunciato si ha nell'EDL, in quanto l'isoforma inducibile risulta già maggiormente espressa a livello basale nel Soleo che nell'EDL (Tarricone et al., 2008).

Sebbene i ROS da sempre siano stati associati allo stress ossidativo, ci diverse evidenze che indicano che essi agiscono anche come molecole segnale, in grado di regolare i normali processi cellulari. In questa ottica si pensa che i ROS prodotti in seguito ad esercizio fisico possano giocare un ruolo chiave nei meccanismi di adattamento del muscolo scheletrico, attivando diverse vie di segnalazione (Brooks et al., 2008), come per esempio, PGC1-alpha, che stimola la biogenesi mitocondriale e la sintesi degli enzimi antiossanti, contribuendo alla transizione verso un fenotipo lento (Irrcher et al., 2009).

In conclusione, i nostri dati suggeriscono che l'aumento di produzione dei ROS associato all'esercizio fisico moderato sia un fattore che 1) contribuisce all'instaurarsi di quelle modificazioni di espressione genica che portano ad un fenotipo maggiormente lento/ossidativo; 2) allo stesso tempo, portando ad un aumento delle difese cellulari, non solo non si riflette in un vero e proprio stress, ma anzi possa contribuire alla protezione nei confronti di stimoli più intensi e potenzialmente più dannosi che il tessuto muscolare potrebbe incontrare in seguito ad attività più intense.

La perdita di innervazione (denervazione) porta invece ad un declino della massa muscolare e della forza, dovuto ad atrofia e ad un decremento delle miofibrille. In particolare, Carlson B, nel 2002 dimostrò che la perdita della funzione è antecedente alla perdita della struttura.

Queste evidenze trovano conferma nei nostri dati; infatti, gli esperimenti di istochimica mostrano una diminuzione del diametro delle fibre già dopo 15 giorni mesi dalla denervazione, che tuttavia diventa costante con il trascorrere dei mesi dalla denervazione.

Inoltre, in seguito a denervazione a lungo termine, si assiste ad una progressiva trasformazione del muscolo, che va incontro ad atrofia e che poi è sostituito da tessuto connettivo e, più tardi, da

tessuto adiposo. La colorazione con mATPase mette in evidenza che, in seguito a denervazione a medio termine, si ha un aumento delle fibre di tipo rapido e un decremento delle fibre di tipo lento. Nonostante questo quadro piuttosto drammatico, si assiste ad un processo di rigenerazione (Borisov et al., 2001), che vede l'attivazione delle cellule satelliti. Come è possibile osservare nei nostri esperimenti di immunofluorescenza, alcune miofibre del tibiale anteriore di ratti sacrificati nove mesi dopo la denervazione sono positive all'isoforma embrionale della MyCH (Fig 5.16 D), a dimostrazione del fatto che nei muscoli denervati si ha la riattivazione di quei geni tipici della miogenesi embrionale che concorrono alla formazione di nuove miofibre. Questo dato è supportato anche dall'aumento dell'espressione genica dell'isoforma embrionale della catena pesante della miosina, Myh3 sia a tre mesi che a 9 mesi dalla denervazione. L'aumento di Myh3 in seguito a denervazione, descritto per la prima volta da Schiaffino et al., (1988), oltre ad essere indice della rigenerazione muscolare, rappresenta una reazione al danno muscolare, come dimostra il fatto che Myh-3 è espresso nei pazienti affetti da distrofia muscolare (Muller-Felber et al., 1993), e nei topi in seguito ad ischemia (Paoni et al., 2002).

Inoltre è stata analizzata l'espressione genica dei MRFs, MyoD, Miogenina e MRF4. Variazioni dell'espressione genica dei MRFs in seguito a denervazione sono state precedentemente descritte (Dedkov et al., 2001, Buonanno A et al., 1992, Eftimie et al 1992), sebbene alcuni risultati differiscano da i nostri. Weis et al., (2000) riportano un aumento dell'espressione proteica di MRF4 solo nelle prime fasi della denervazione, mentre Adams et al. (1995) osservarono un aumento di MRF4 e miogenina dopo 10 giorni dalla denervazione, che tuttavia tornava ai valori basali dopo due mesi dall'intervento chirurgico. I nostri dati mostrano che MyoD, miogenina e MRF4 sono espressi ad alti livelli nei ratti sacrificati 3 mesi o 9 mesi dopo la denervazione, sebbene ci sia una tendenza ad un graduale ritorno verso i valori a basali a 9 mesi. Quindi la denervazione porta da un lato all'istaurasi di una condizione di atrofia, dall'altro lato attiva le vie principali della miogenesi nel tentativo di rigenerare e riparare le fibre danneggiate.

L'inattività associata alla denervazione porta ad un una minore richiesta di ossigeno, un minore consumo d ATP e un minore trasporto del glucosio. È stata valutata l'espressione di AMPK che è coinvolta nell'attività delle cellule muscolari e nella regolazione di GLUT-4; entrambe risultano diminuire a medio e a lungo termine dalla denervazione.

AMP-K è una chinasi indotta dal calo dell'ATP, che può verificarsi in seguito ad esercizio fisico o ad insufficiente apporto di energia. A sua volta, l'attivazione dell'AMP-K induce la sintesi, tra l'altro, di GLUT-4, il principale trasportatore di membrana del glucosio, controllato dall'insulina. L'espressione di GLUT-4 aumenta con l'esercizio fisico e diminuisce nel muscolo denervato (Block et al.,1991). Sebbene siano stati identificati nel promotore di GLUT-4 (Tsunoda et al., 2000)

elementi di risposta alla denervazione e all'esercizio fisico, molto resta da chiarire per quanto riguarda la sua regolazione; i nostri dati, comunque, mettono in risalto la correlazione tra l'espressione di AMPK e GLUT-4; entrambe infatti subiscono un calo in seguito a denervazione.

In accordo con quanto riportato da Wagatsuma et al., (2005), abbiamo osservato che l'espressione genica di VEGF e KDR diminuisce sia a tre mesi che a nove mesi dalla denervazione; tale calo può essere correlato ad una minore necessità dell'apporto di ossigeno nel muscolo inattivo in seguito a denervazione.

La denervazione non è solo accompagnata da un calo delle richieste energetiche; infatti in seguito a denervazione si attivano processi che portano ad un intenso rimodellamento del muscolo scheletrico accompagnato alla degradazione delle proteine via ubiquitina-proteosoma, che contribuisce all'avanzamento dell'atrofia.

Le Matrici Metalloproteinasi sono una piccola famiglia di enzimi proteolitici Zn-dipendenti coinvolti nel mantenimento e rimodellamento della matrice extracellulare con una specifica localizzazione all'interno del tessuto. MMP-2 e MMP-9 sono localizzati a livello delle giunzioni neuromuscolari e la loro espressione aumenta durante il processo di rigenerazione e degenerazione degli assoni (Carmeli et al., 2004). Nel nostro studio, i livelli dell'RNA che codifica per la MMP-2 sono più alti rispetto al controllo nei muscoli denervati a medio termine, il che suggerisce che dopo tre mesi dalla denervazione è in atto nel muscolo un intenso processo di rimodellamento tissutale al quale partecipano altre proteine con attività proteolitica (Duguez et al., 2003). Infatti gli enzimi E3 ubiquitina ligasi aumentano nelle prime fasi della denervazione. Tra questi enzimi quello che maggiormente viene espresso è NEDD-4 a tre mesi della denervazione (Bat et al., 2006). I nostri risultati confermano l'aumentata espressione a tre mesi ed estendono lo studio fino a tempi più lunghi (9 mesi), dove Nedd-4 rimane invariato.

È stato dimostrato che la denervazione associata ad atrofia, porta un incremento dei ROS (Muller et al., 2007). Il nostro modello sperimentale conferma tale dato e ne valuta la variazione nel tempo; infatti abbiamo riscontrato un aumento della produzione di ROS a 15 giorni dalla denervazione, con un notevole incremento a tre mesi. Inoltre abbiamo verificato che l'eccesso di produzione di ROS porta ad una progressiva alterazione dell'integrità delle membrane: in effetti, abbiamo riscontrato aumento della perossidazione lipidica sia a livello del sarcolemma che delle membrane del reticolo sarcoplasmatico. Inoltre abbiamo dimostrato che, in seguito a stress ossidativo, si ha un forte calo dell'attività dei canali e delle pompe legati all'omeostasi del calcio (Fig. 5.22), in accordo con quanto suggerito da Sun et al. (2001). Il fatto che i geni coinvolti nell'omeostasi del calcio appaiano maggiormente espressi sia a 15 giorni che a tre mesi dalla denervazione, potrebbe essere considerato come una reazione compensatoria alla riduzione e all'assenza dell'attività muscolare e

può essere correlato ai meccanismi che portano all'aumento della processi di rigenerazione delle miofibre (Squecco et al., 2009).

L'analisi dell'espressione genica degli enzimi antiossidanti (SOD-1, SOD-2, Catalase, Gstm-1, Gpx-1 e Gpx-4) e citoprotettivi (Hsp-70 e Hsp-27) mostra un aumento significativo dei livelli di mRNA a 15 giorni dalla denervazione. Questi dati sono confermati anche dall'aumentata espressione proteica e dell'attività enzimatica di alcuni di questi enzimi (Fig. 5.27 e 5.28). L'attivazione dei sistemi antiossidanti fa sì che nelle prime fasi della denervazione l'aumento dei ROS sia moderato; tuttavia a tre mesi dalla denervazione l'abilità delle cellule muscolari nel fronteggiare l'aumento dello stress ossidativo risulta compromessa, con conseguente aumento dei ROS e una più debole risposta citoprotettiva; sebbene una certa attività antiossidante sia mantenuta anche tre mesi dalla denervazione, tuttavia non è probabilmente sufficiente a controbilanciare i ROS, che aumentano con l'aumentare del tempo dalla denervazione (Fig 5.6 A e B).

Come si è visto per l'esercizio fisico, l'aumento dei ROS induce la trascrizione di PGC-1 alpha, che è coinvolto nella biogenesi e nella sintesi degli enzimi ossidativi. L'espressione genica di PGC1-alpha appare aumentata a 15 giorni della denervazione; anche i livelli di mRNA della Citato Sintasi e di COXI sono maggiormente espressi in seguito a denervazione.

Diversi sono i siti di produzione dei ROS a livello cellulare (Powers SK. 2010). I ROS possono essere generati dall'attività di enzimi citoplasmatici o di membrana come la Xantina Ossidasi e la NADPH Ossidasi I (NOX-1). I nostri dati escludono la partecipazione di questi enzimi nella formazione dei ROS. Infatti la Xantina Deidrogenasi è un enzima citosolico che in presenza di un ambiente ossidante e dei suoi substrati (xantina e ipoxantina) può essere convertita a Xantina Ossidasi e catalizzare reazioni che portano ad un aumento di ROS. I nostri mostrano un aumento dell'espressione della Xdh in seguito a denervazione; tuttavia dati ottenuti in collaborazione con il gruppo del Prof Lenaz, escludono un aumento nei muscoli denervati di xantina e ipoxantina, suggerendo che la produzione di ROS non sia dovuta all'attività di questo enzima.

Anche il contributo della NOX-1, un enzima che catalizza la reazione di ossidazione dell'ossigeno producendo anione superossido, appare improbabile, dato che i livelli di espressione del suo mRNA risultano diminuire in seguito a denervazione.

Sebbene altre fonti di ROS non possano essere escluse, i dati riportati in figura 5.32 suggeriscono che la produzione di ROS sia dovuta ad uno squilibrio dell'espressione di differenti complessi della catena mitocondriale. Infatti tutti gli enzimi presi in esame appaiono maggiormente espressi nel muscolo denervato sia a livello trascrizionale che a livello tradizionale; tuttavia, confrontando l'espressione proteica della COXI con il complesso I e la ATP sintasi, quest'ultimi appaiono solo

debolmente aumentati, probabilmente come risultato di una maggiore suscettibilità al danno ossidativo (Guerrieri et al., 1999; Fato et al., 2008).

Questo squilibrio favorirebbe la produzione di ROS (Lenaz 2001; Jezek et al., 2005). Infatti il complesso I è considerato una delle principali fonti di ROS se i meccanismi di trasferimento degli elettroni dal NADH all'ubichinone risultano danneggiati (Fato et al., 2009). Inoltre il complesso I, essendo esso stesso particolarmente sensibile al danno provocato dai ROS, porta ad una maggiore produzione dei ROS dovuta ad una sorta di circolo vizioso che si viene a stabilire (Paradies et al., 2004), che coinvolge anche PGC1 alpha, in quanto, essendo regolato positivamente dai ROS, potrebbe portare ad un aumento della sintesi delle proteine mitocondriali e quindi a un ulteriore squilibrio degli enzimi coinvolti nella catena respiratoria.

In un recente studio (Bhattacharya et al., 2009) è stato dimostrato che la denervazione a breve termine porta ad un aumento degli idroperossidi degli acidi grassi dovuto probabilmente ad un aumento dell'attivazione della fosfolipasi A2, considerata come una probabile fonte di ROS. Si tratta di un enzima citosolico calcio-dipendente associato alla membrana e che causa il rilascio degli idroperossidi degli acidi grassi. L'analisi dell'espressione genica della cPLA₂ mostra un aumento dei suoi livelli di mRNA sia a 15 giorni che a tre mesi dalla denervazione. La sua funzione dipende dalla presenza del calcio; i nostri dati indicano un danneggiamento delle pompe dei canali del calcio con conseguente aumento della concentrazione di calcio citoplasmatico; infatti uno studio indipendente mostra un aumento di circa 150 volte della concentrazione citosolica di calcio in seguito a denervazione (Squecco et al., 2009). Quindi la denervazione porta all'istaurarsi di tutte le condizioni adatte per l'attivazione della cPLA₂ con conseguente aumento dei lipidi idroperossidi. Queste molecole sono eliminate dall'enzima GPX-4 (Toppo et al., 2009). I nostri dati mostrano un aumento dell'espressione genica di GPX-4 in seguito a denervazione supportando l'idea di un suo coinvolgimento nella detossificazione dei lipidi idroperossidi.

I nostri dati quindi suggeriscono che l'aumento della produzione di ROS, dovuto ad uno squilibrio degli enzimi della catena respiratoria, può portare all'aumento della perossidazione dei lipidi della membrana mitocondriale; in un ambiente ricco di calcio, l'aumento della cPLA₂ porta ad un rilascio di questi idroperossidi i cui effetti negativi possono essere controbilanciati dall'azione della GPX-4.

Tutto quindi porta alla conclusione che i ROS svolgano un ruolo importante nel determinare i danni morfologici e funzionali del muscolo scheletrico associati alla denervazione.

Conclusioni

La letteratura riporta numerosi dati relativi alle trasformazioni che il muscolo scheletrico subisce in seguito a esercizio fisico o a denervazione.

È stato dimostrato che sia l'esercizio fisico che la denervazione inducono numerosi cambiamenti e adattamenti strutturali che portano ad un esito finale totalmente opposto: nel primo caso si viene ad instaurare un condizione di ipertrofia, mentre nel secondo caso una condizione di atrofia.

La corsa su nastro trasportatore, cui sono stati soggetti i ratti, si configura come allenamento aerobico di resistenza; la letteratura riporta che in tali condizioni si determina una transizione delle fibre muscolari verso un fenotipo lento, implementando le caratteristiche ossidative e, di conseguenza, la resistenza alla fatica del muscolo stesso. I nostri risultati, oltre a confermare tali dati presenti in letteratura, evidenziano l'induzione di processi di ipertrofia che non erano stati in precedenza associati all'esercizio moderato aerobico.

In seguito a denervazione invece, è stata descritta l'atrofia, con perdita della massa e della funzione muscolare; inoltre, è stata vista una transizione a un fenotipo muscolare di tipo rapido, con calo del livello del metabolismo e della vascolarizzazione; abbiamo confermato in effetti la diminuzione nel diametro delle miofibre, la pressoché totale scomparsa delle fibre di tipo lento, la diminuzione dell'espressione di AMP-K, di GLUT4 e di VEGF e KDR. In letteratura era stata già descritta la compresenza di fenomeni di degenerazione e di rigenerazione; noi abbiamo osservato come tali meccanismi di rigenerazione (ad esempio l'espressione di geni embrionali), peraltro abortivi, continuino a tempi molto dilazionati rispetto al momento della denervazione. Ciò è particolarmente importante perché, fino al momento in cui la capacità di rigenerazione permane, sono possibili interventi clinici (fisioterapia, stimolazione elettrica), che possono migliorare la qualità della vita del paziente.

Parte di questo elaborato è dedicato allo studio del coinvolgimento dei ROS sia nel muscolo scheletrico sottoposto ad esercizio fisico, sia in quello sottoposto a denervazione. In entrambe le condizioni è stato dimostrato un aumento della produzione di ROS. Si sa che i ROS possono determinare l'instaurarsi di stress ossidativo, ma che, a concentrazioni più basse, possono agire come molecole segnale.

I nostri dati suggeriscono che nell'esercizio fisico moderato l'aumento dei ROS agisce sicuramente come segnale coinvolto nel rimodellamento fenotipico, mentre non vi sono dati inconfutabili riguardanti l'instaurarsi di un vero e proprio stress ossidativo; infatti, vi sono prove di perossidazione lipidica, che però non sono accompagnate da danni funzionali. L'aumento di

espressione di diverse proteine citoprotettive, quali HSP e XRCC1, suggerisce che l'aumento dei ROS va comunque ad aumentare le capacità antiossidanti del muscolo scheletrico allenato.

Per quanto riguarda la denervazione, possiamo concludere che la produzione di ROS sembra essere coinvolta nei meccanismi che inducono atrofia, in quanto, principalmente con la stimolazione di PGC1-alpha, determina uno squilibrio nell'espressione di alcuni enzimi coinvolti nella catena respiratoria. L'eccesso di produzione dei ROS determina, inoltre, un vero e proprio stress ossidativo, determinando danni alle membrane e, quindi ai canali e ai trasportatori del calcio; a sua volta, la perdita del controllo della concentrazione citosolica del calcio è foriera di danno cellulare.

Questo dato suggerisce l'utilità di una terapia antiossidante in tutte quelle patologie e condizioni che portano a danni del sistema di connessione nervo-muscolo.

Bibliografia

Adams L, Carlson BM, Henderson L, et al. Adaptation of nicotinic acetylcholine receptor, myogenin, and MRF4 gene expression to long-term muscle denervation. *J Cell Biol* 1995; 131: 1341–1349

Adhihetty PJ, Ljubicic V, Hood DA. Effect of chronic contractile activity on SS and IMF mitochondrial apoptotic susceptibility in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007. 292(3):E748-55.

Adhihetty PJ, O'Leary MF, Chabi B, Wicks KL, Hood DA. Effect of denervation on mitochondrially mediated apoptosis in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2007. 102(3):1143-51.

Argese E, De Carli B, Orsega E, Rigo A, Rotilio G. A rotating disk electrode for kinetic studies of superoxide dismutases: applicability in a wide pH range and for continuous monitoring of enzyme inactivation. *Anal Biochem*. 1983. 132(1):110-4.

Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* 1999. 31: 347–366.

Batt J, Bain J, Goncalves J, et al. Differential gene expression profiling of short and long term denervated muscle. *FASEB J* 2006; 20: 115–117

Berkes CA, Tapscott SJ. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2005 Aug-Oct;16(4-5):585-95.

Bhattacharya A, Muller FL, Liu Y, Sabia M, Liang H, Song W, Jang YC, Ran Q, Van Remmen H. Denervation induces cytosolic phospholipase A2-mediated fatty acid hydroperoxide generation by muscle mitochondria. *J Biol Chem*. 2009. 284(1):46-55.

Block NE, Menick DR, Robinson KA, Buse MG. Effect of denervation on the expression of two glucose transporter isoforms in rat hindlimb muscle. *J Clin Invest* 1991.88: 1546-1552.

Bradford MM. A rapid method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye –binding. *Anal. Biochem*;72;248-254 1976

Brigelius-Flohé R. commentary: oxidative stress reconsidered. *Genes Nutr*. 2009. 4(3):161-3.

Brigelius-Flohe R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem* 2006. 387: 1329–1335.

Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999. 27: 951–965.

Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 1970. 23:369.

- Brooks SV, Vasilaki A, Larkin LM, McArdle A, Jackson MJ. Repeated bouts of aerobic exercise lead to reductions in skeletal muscle free radical generation and nuclear factor kappaB activation. *J Physiol*. 2008. 586(16):3979-90.
- Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D, Relaix F. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J. Anat.*2003; 202: 59-68.
- Buonanno A, Apone L, Morasso MI, et al. The MyoD family of myogenic factors is regulated by electrical activity: Isolation and characterization of a mouse Myf-5 cDNA. *Nucleic Acids Res* 1992. 20: 539–544
- Burnham R, Martin T, Stein R, Bell G, MacLean I, Steadward R. Skeletal muscle fibre type transformation following spinal cord injury. *Spinal Cord*. 1997. 35(2):86-91.
- Carlson BM, Borisov AB, Dedkov EI, Khalyfa A, Kostrominova TY, Macpherson PC, Wang E, Faulkner JA. Effects of long-term denervation on skeletal muscle in old rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2002. 57(10):B366-74.
- Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve* 2004. 29: 191-197.
- Cathcart R, Schwiens E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal. Biochem*. 1983;134(1):111-116.
- Chargé SPB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004. 84: 209-238.
- Cherednichenko G, Zima AV, Feng W, Schaefer S, Blatter LA, Pessah IN. NADH oxidase activity of rat cardiac sarcoplasmic reticulum regulates calcium-induced calcium release. *Circ Res* 2004. 94: 478–486.
- Chomczynski P., Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156, 1987
- Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta* 2006. 1763: 747–758.
- Dalle Donne I., Aldini G., Carini M., Colombo R., Rossi R. and Milzani A. Davies K.J.A. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biol. Chem* 1987. 262: 9895-9901.
- Davies KJ, Maguire JJ, Brooks GA, Dallman PR, Packer L. Muscle mitochondrial bioenergetics, oxygen supply, work capacity during dietary iron deficiency and repletion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1982.242: E418–E427.
- Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982. 107(4):1198-205.
- Dean R.T., Giese S. and Davies M.J. Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem. Sci*. 1993. 18: 437-441.

Debrowolny G., Aucello M., Rizzuto E., Beccafico S., Mammucari C., Boncompagni S., Belia S., Wannenes F., Nicoletti C., Del Prete Z., Rosenthal N., Molinaro M., Protasi F., Fanò G., Sandri M., Musarò A. Skeletal Muscle is a primary target of SOD-1^{G93A}-mediated toxicity. *Cell Metabolism* 2008; 8:425-436.

Dedkov AI, Kostrominova TY, Borisov AB, et al. Reparative myogenesis in long-term denervated skeletal muscles of adult rats results in a reduction of the satellite cell population. *Anat Rec* 2001. 263: 139–154

Degli Esposti M. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods* 2002;26:335-340.

Duguez S, Bihan MC, Gouttefangeas D, Feasson L, Freyssenet D. Myogenic and nonmyogenic cells differentially express proteinases, Hsc/Hsp70, and BAG-1 during skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003. 285: E206-E215.

Eftimie R, Brenner HR, Buonanno A. Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci* 1991. 88(4):1349-53.

Eftimie R. The MyoD family of myogenic factors is regulated by electrical activity: Isolation and characterization of a mouse Myf-5 cDNA. *Nucleic Acids Res* 1992. 20: 539–544

Espinosa A, Leiva A, Pena M, Muller M, Debandi A, Hidalgo C, Carrasco MA, Jaimovich E. Myotube depolarization generates reactive oxygen species through NAD(P)H oxidase; ROS-elicited Ca₂⁺ stimulates ERK, CREB, early genes. *J Cell Physiol* 2006. 209: 379–388.

Fano` G, Belia S, Fulle S, et al. Functional aspects of calcium transport in sarcoplasmic reticulum vesicles derived from frog skeletal muscle treated with saponin. *J Muscle Res Cell Motil* 1989. 10:326–30.

Fato R, Bergamini C, Bortolus M, Maniero AL, Leoni S, Ohnishi T, Lenaz G. Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 2009. 1787(5):384-92.

Fato R, Bergamini C, Leoni S, Strocchi P, Lenaz G. Generation of reactive oxygen species by mitochondrial complex I: implications in neurodegeneration. *Neurochem Res*. 2008. 33(12):2487-501.

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

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

Fuchs J. *Oxidative Injury in Dermatology*. New York: Springer-Verlag, 1992.

Fulle S, Belia S, Vecchiet J, Morabito C, Vecchiet L, Fanò G. Modification of the functional capacity of sarcoplasmic reticulum membranes in patients suffering from chronic fatigue syndrome. *Neuromuscul Disord*. 2003. 13(6):479-84.

- Fulle S, Protasi F, Di Tano G, Pietrangelo T, Beltramin A, Boncompagni S, Vecchiet L, Fanó G. The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Exp. Gerontol.* 2004. 39(1):17-24.
- Genova ML, Baracca A, Biondi A, Casalena G, Faccioli M, Falasca AI, Formiggini G, Sgarbi G, Solaini G, Lenaz G Is supercomplex organization of the respiratory chain required for optimal electron transfer activity? *Biochim Biophys Acta.* 2008. 1777(7-8):740-6
- Goetsch SC, Hawke TJ, Gallardo TD, Richardson JA, Garry DJ. Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. *Physiol Genomics* 2003. 14: 261-271.
- Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol.* 2008. 18(4):165-73.
- Gong MC, Arbogast S, Guo Z, Mathenia J, Su W, Reid MB. Calcium-independent phospholipase A2 modulates cytosolic oxidant activity and contractile function in murine skeletal muscle cells. *J Appl Physiol* 2006.100: 399–405.
- Gutteridge J.M. and Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. NY Acad. Sci* 2000. 899: 136-147.
- Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford, UK: Oxford Univ. Press, 936pp 2002.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. Antioxidant defenses; in *Free Radicals in Biology and Medicine*, pp. 105-244, 1999
- Hämäläinen N, Pette D. The Histochemical Profiles of Fast Fiber Types IIB, IID, and IIA in Skeletal Muscles of Mouse, Rat and Rabbit. *J Histochem Cytochem* 1993. 41:733-743.
- Harman D. The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981. 78: 7124-7128.
- Hayes, J.D.; Flanagan, J.U.; Jowsey, I.R.; Glutathione transferases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2005, 45, 51-88.
- Hidalgo C, Sánchez G, Barrientos G, Aracena-Parks P. A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S - glutathionylation. *J Biol Chem.* 2006 Sep 8;281(36):26473-82.
- Holmes BF, Lang DB, Birnbaum MJ, Mu J, Dohm GL. AMP Kinase is not required for the GLUT4 response to exercise and denervation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004. 287: E739-E743.
- Hood DA, Irrcher I, Ljubcic V, Joseph AM. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol.* 2006. 209(Pt 12):2265-75.
- Horowitz JF, Leone TC, Feng W, Kelly DP, Klein S. Effect of endurance training on lipid metabolism in women: a potential role for PPARalpha in the metabolic response to training. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000. 279(2): E348-55.

- Ignarro, L. J. Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol Toxicol*, 1990. 67(1), 1-7.
- Inashima S, Matsunaga S, Yasuda T, Wada M. Effect of endurance training and acute exercise on sarcoplasmic reticulum function in rat fast- and slow-twitch skeletal muscles. *Eur J Appl Physiol*. 2003. 89(2):142-9.
- Irrcher I, Ljubcic V, Hood DA. Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1 α transcription in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009. 296(1):C116-23.
- Jezek P, Hlavatá L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005. 37(12):2478-503.
- Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci*. 2006. 1067:425-35.
- Ji LL, Stratman FW, Lardy HA. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, acute exercise. *Arch Biochem Biophys* 1988. 263: 150–160.
- Kakkar P. and Singh B.K. Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control. *Mol. Cell. Biochem*. 2007. 305: 235-53.
- Kondo H, Miura M, Itokawa Y. Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Acta Physiol Scand*. 1991. 142(4):527-8.
- Kostrominova TY, Dow DE, Dennis RG, Miller RA, Faulkner JA. Comparison of gene expression of 2-mo denervated, 2-mo stimulated-denervated, and control rat skeletal muscles *Physiol Genomics*. 2005. 14;22(2):227-43.
- Koulmann N, Bigard AX. Interaction between signalling pathways involved in skeletal muscle responses to endurance exercise. *Pflugers Arch*. 2006. 452(2):125-39.
- Laemlli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259); 680-5,1970
- Lapalombella R, Kern H, Adami N, Biral D, Zampieri S, Scordari A, di Tullio S, Marini M. Persistence of regenerative myogenesis in spite of down-regulation of activity-dependent genes in long-term denervated rat muscle. *Neurol Res*. 2008. 30(2):197-206.
- Leeuwenburgh C, Hollander J, Leichtweis S, Griffiths M, Gore M, Ji LL. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1997. 272: R363–R369.
- Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life*. 2001. 52(3-5):159-64.
- Lindquist S. Craig E.A. The heat-shock proteins *Annu Rev Genet*. 1988. 22:631-77.

- Livak JK, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001;25:402-408.
- MacLean PS, Zheng D, Jones JP, Olson AL, and Dohm GL. Exercise induced transcription of the muscle glucose transporter (GLUT 4) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2002. 292: 409–414.
- Marini M, Lapalombella R, Margonato V, Ronchi R, Samaja M, Scapin C, Gorza L, Maraldi T, Carinci P, Ventura C, Veicsteinas A. Mild exercise training, cardioprotection and stress gene profile. *Eur J Appl Physiol* 2007. 99:503–510.
- McArdle A, Pattwell D, Vasilaki A, Griffiths RD, Jackson MJ. Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptive responses. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001. 280: C621–C627.
- McArdle A, van der Meulen J, Close GL, Pattwell D, Van Remmen H, Huang TT, Richardson AG, Epstein CJ, Faulkner JA, Jackson MJ. Role of mitochondrial superoxide dismutase in contraction-induced generation of reactive oxygen species in skeletal muscle extracellular space. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004. 286(5):C1152-8.
- McArdle F, Spiers S, Aldemir H, Vasilaki A, Beaver A, Iwanejko L, McArdle A, Jackson MJ. Preconditioning of skeletal muscle against contraction-induced damage: the role of adaptations to oxidants in mice. *J Physiol*. 2004. 561(Pt 1):233-44.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* 1969. 244: 6049–6055.
- McCord, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*, 2000;108(8), 652-659.
- Mecocci P, Fanó G, Fulle S, MacGarvey U, Shinobu L, Polidori MC, Cherubini A, Vecchiet J, Senin U, Beal MF. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*. 1999. 26(3-4):303-8.
- Monani UR. Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron* 2005. 48(6):885-896.
- Morton JP, Kayani AC, McArdle A, Drust B. The exercise-induced stress response of skeletal muscle, with specific emphasis on humans. *Sports Med*. 2009. 39(8):643-62.
- Muller F.L., Song W., Jang Y.C., Liu Y., Sabia M, Richardson A., Van Remmen H. Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293: R1159-R1168.
- Muller F.L., Song W., Liu Y., Chaudhuri A, Picke-Dahl S., Strong R., Huang T-T., Epstein CJ, Robert II L.J., Csöcs M., Faulkner J.A., Van Remmen H. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radical Biology & Medicine* 2006; 40:1993-2004
- Muller-Felber W, Schmidt Achert M, Pongratz DE. Skeletal muscle in children with congenital myotonic dystrophy in the first year of life. *Clin Neuropathol* 1993; 12:211-214.

- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
- Paoni NF, Peale F, Wang F, Errett-Baroncini C, Steinmetz H, Toy K, Bai W, Williams PM, Bunting S, Gerritsen ME, Powell-Braxton L. Time course of skeletal muscle repair and gene expression following acute hindlimb ischemia in mice. *Physiol Genomics* 2002. 11: 263-272.
- Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Federici A, Ruggiero FM. Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circ Res.* 2004.
- Parker MH, Seale P, Rudnicki MA. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet.* 2003 Jul;4(7):497-507
- Perry RL, Rudnick MA. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci.* 2000 Sep 1;5:D750-67.
- Peskin V.A and Winterbourne C.C. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clin.Chim.Acta* 2000. 293;157-166.
- Porter MM, Vandervoort AA, Lexell J. Aging of human muscle: structure, function and adaptability. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 1995. 5:129-142.
- Powers SK, Duarte J, Kavazis AN, Talbert EE. Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. *Exp Physiol.* 2010. 95(1):1-9.
- Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 2008. 88(4):1243-76.
- Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 2008. 44(2):193-201.
- Radák Z, Naito H, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Takahashi R, Cardozo-Pelaez F, Goto S. Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 2002. 445(2):273-8.
- Renganathan M, Messi ML, Delbono O. Dihydropyridine receptor-ryanodine receptor uncoupling in aged skeletal muscle. *J Membr Biol.* 1997. 157(3):247-53.
- Ricci C, Pastukh V, Leonard J, Turrens J, Wilson G, Schaffer D, Schaffer SW. Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial-superoxide generation and apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008. 294(2):C413-22.
- Ritossa F.M A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila *Cell and Molec. Life Sciences.* 18 (12):571-573,1962
- Rock E, Mammari MS, Vignon X, Thomas MA, Viret J. Abnormal fluidity state in membranes of malignant hyperthermia pig skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys.* 1990. 281(1):36-40.
- Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell.* 1993 Dec 31;75(7):1351-9.

Salo D.C., Pacifici R.E., Lin S.W., Giulivi C. and Davies K.J.A. Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. *J. Biol. Chem.* 1990. 265: 11919-

Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)*. 2008. 23:160-70.

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

Schiaffino S, Gorza L, Pitton G, et al. Embryonic and neonatal myosin heavy chain in denervated and paralyzed rat skeletal muscle. *Dev Biol* 1988. 127: 1–11

Schraufstatter I., Hyslop P.A., Jackson J.H. and Cochrane C.G. Oxidant-induced DNA damage of target cells. *J Clin Inves.* 1988. 82: 1040-1050.

Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985.311: 617–631.

Siu PM, Alway SE. Mitochondria-associated apoptotic signalling in denervated rat skeletal muscle. *J Physiol* 2005. 565.1: 309-323.

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

Spiteller G. Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radic. Biol. Med.* 2006. 41: 362-387.

Squecco R, Carraro U, Kern H, Pond A, Adami N, Biral D, Vindigni V, Boncompagni S, Pietrangelo T, Bosco G, Fanò G, Marini M, Abruzzo PM, Germinario E, Danieli-Betto D, Protasi F, Francini F, Zampieri S. A subpopulation of rat muscle fibers maintains an assessable excitation-contraction coupling mechanism after long-standing denervation despite lost contractility. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009. 68(12):1256-68.

Sun J, Xu L, Eu JP, Stamler JS, Meissner G. Classes of thiols that influence the activity of the skeletal muscle calcium release channel. *J Biol Chem.* 2001. 276(19):15625-30.

Tarricone E, Scapin C, Vitadello M, Esposito F, Margonato V, Milano G, Samaja M, Gorza L. Cellular distribution of Hsp70 expression in rat skeletal muscles. Effects of moderate exercise training and chronic hypoxia. *Cell Stress Chaperones.* 2008.13(4):483-95.

Taussky HH, Shorr E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem* 1952. 202: 675–82.

Tisdale MJ. Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations. *Nutrition* 1997. 13:1-7.

Toppo S, Flohé L, Ursini F, Vanin S, Maiorino M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta.* 2009.1790(11):1486-500.

- Treves S, Scutari E, Robert M, Groh S, Ottolia M, Prestipino G, Ronjat M, Zorzato F. Interaction of S100A1 with the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle. *Biochemistry*. 1997. 36(38):11496-503.
- Tsunoda N, Kayo Maruyama K, David W, Cooke DW, Daniel M, Lane DM, Osamu Ezaki O. Localization of Exercise- and Denervation-Responsive Elements in the Mouse GLUT4 Gene. *Biochim Biophys Res Commun* 2000. 267: 744-751.
- Ursini, F., Maiorino, M., & Gregolin, C. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Int J Tissue React*, 1986. 8(2), 99-103.
- Vendemiale G, Grattagliano I, Altomare E, Serviddio G, Portincasa P, Prigigallo F, Palasciano G. Mitochondrial oxidative damage and myocardial fibrosis in rats chronically intoxicated with moderate doses of ethanol. *Toxicol Lett*. 2001. 123(2-3):209-16.
- Wagatsuma A, Tamaki H, Ogita F. Capillary supply and gene expression of angiogenesis-related factors in murine skeletal muscle following denervation. *Exp Physiol* 2005. 90: 403-409.
- Weis J, Kaussen M, Calvo S, Buonanno A. Denervation induces a rapid nuclear accumulation of MRF4 in mature myofibers. *Dev Dyn*. 2000. 218(3):438-51.
- Weis J, Kaussen M, Calvo S, et al. Denervation induces a rapid nuclear accumulation of MRF4 in mature myofibers. *Dev Dyn* 2000. 218: 438–451
- Wisloff U, Helgerud J, Kemi OJ, and Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in rats: VO₂ max) and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001. 280: H1301- H1310,
- Wolff S.P, Garner A. and Dean R.T.Fragmentation of proteins by free radicals and its effects on their susceptibility to enzymatic hydrolysis. *Biochem. J*. 1986. 234: 399-403.
- Wu H, Gallardo T, Olson EN, Williams RS, Shohet RV. Transcriptional analysis of mouse skeletal myofiber diversity and adaptation to endurance exercise. *J Muscle Res Cell Motil*. 2003. 24(8):587-92.
- Xia R, Webb JA, Gnall LL, Cutler K, Abramson JJ. Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum contains a NADH-dependent oxidase that generates superoxide. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003. 285:C215–C221.
- Zhou JY, Prognon P. Raw material enzymatic activity determination: a specific case for validation and comparison of analytical methods--the example of superoxide dismutase (SOD). *J Pharm Biomed Anal*. 2006; 40(5):1143-8.
- Zuo L, Christofi FL, Wright VP, Bao S, Clanton TL. Lipoygenase- dependent superoxide release in skeletal m progression. *J. Cell. Mol. Med*. 2006. 10: 389-406.