

Consumo di ossigeno negli organismi aerobi

- Circa il 90 % dell'O₂ consumato è utilizzato nella fosforilazione ossidativa;**
- Il 10 % è consumato da enzimi che lo utilizzano per reazioni d'idrossilazione ed ossidazione;**
- Circa l'1 % è convertito in Specie Reattive all'Ossigeno (ROS), quali superossido (O₂^{-•}) e perossido d'idrogeno (H₂O₂) che sono forme tossiche e reattive dell'O₂**

ROS: REACTIVE OXYGEN SPECIES

Radicaliche e non radicaliche

OSSIGENO TRIPLETTO	O₂
ANIONE RADICALE SUPEROSSIDO	O₂^{-•}
RADICALE IDROSSILICO	HO[•]
PEROSSIDO D'IDROGENO	H₂O₂
OSSIGENO SINGOLETTO	¹O₂

L'ossigeno tripletto (O₂) è una molecola biatomica con 2 elettroni spaiati di spin uguali messi su due orbitali diversi (tripletto)

L'ossigeno singoletto è uno stato eccitato dell'ossigeno molecolare con inversione degli spin in uno degli elettroni spaiati spostato in un diverso orbitale

RADICALE LIBERO

DEFINIZIONE: molecola che contiene uno o più elettroni spaiati nell'orbitale di legame.

I radicali reagiscono con altre molecole allo scopo di catturare protoni necessari al raggiungimento della stabilità.

Alcune specie radicaliche sono estremamente reattive mentre altre risultano relativamente inerti.

ANIONE RADICALE SUPEROSSIDO $O_2^{\cdot-}$

Il radicale prodotto in maggiore quantità

Generato:

- accidentalmente nella catena di trasporto degli e^- a livello mitocondriale**
- intenzionalmente dalle cellule fagocitiche tramite le ossidasi NADPH-dipendente**

Il radicale superossido gioca un ruolo cruciale nella formazione di altre specie radicaliche come: il radicale idrossile, l'ossigeno singoletto

RADICALE IDROSSILE HO•

Radicale molto reattivo

Generato:

- **nella catena di trasporto degli e⁻ nei mitocondri;**
- **per azione delle radiazioni elettromagnetiche;**
- **in presenza di metalli di transizione.**

OSSIDO NITRICO $\cdot\text{N}=\text{O}$

- Generato dalle cellule endoteliali con funzione di modulatore della contrazione a livello dei vasi, reazione catalizzata dall'ossido nitrico sintasi
- macrofagi e neutrofili durante i processi infiammatori
- La sua tossicità è legata alla formazione di perossinitrito, un agente nitrante:



RADICALI PEROSSILICI $\text{ROO}\cdot$

- Generati nella fasi di propagazione delle reazioni a catena radicaliche di perossidazione lipidica

SPECIE NON RADICALICHE

PEROSSIDO DI IDROGENO



Generato:

- enzimaticamente dalla superossidodismutasi a partire dal radicale superossido
- enzimaticamente dalle xantina ossidasi dei perossisomi
- nella catena di trasporto degli e⁻ nei mitocondri

E' degradato dalla catalasi nei perossisomi

OSSIGENO SINGOLETTO



E' uno stato eccitato dell'ossigeno molecolare con inversione degli spin in uno degli elettroni spaiati spostato in un diverso orbitale.

Può reagire con doppi legami, per esempio degli acidi grassi producendo idroperossidi

E' coinvolto nell'ossidazione del colesterolo

La produzione dei radicali liberi è un processo biologico che caratterizza tutte le cellule eucariotiche

Si verifica normalmente nelle reazioni biochimiche cellulari, soprattutto nei processi ossidativi.

ORIGINE DELLE SPECIE REATTIVE

- ESOGENA

- Fumo di sigaretta**
- Inquinamento ambientale**
- Radiazioni elettromagnetiche**
- Eccessivo contenuto di Ferro o Rame**
- Farmaci, pesticidi, anestetici**
- Luce ultravioletta**
- Esercizio fisico**

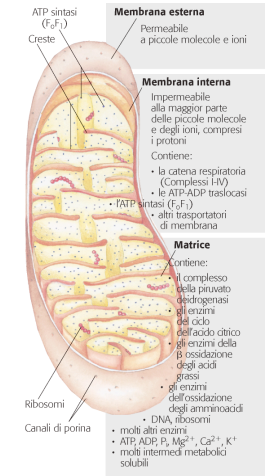
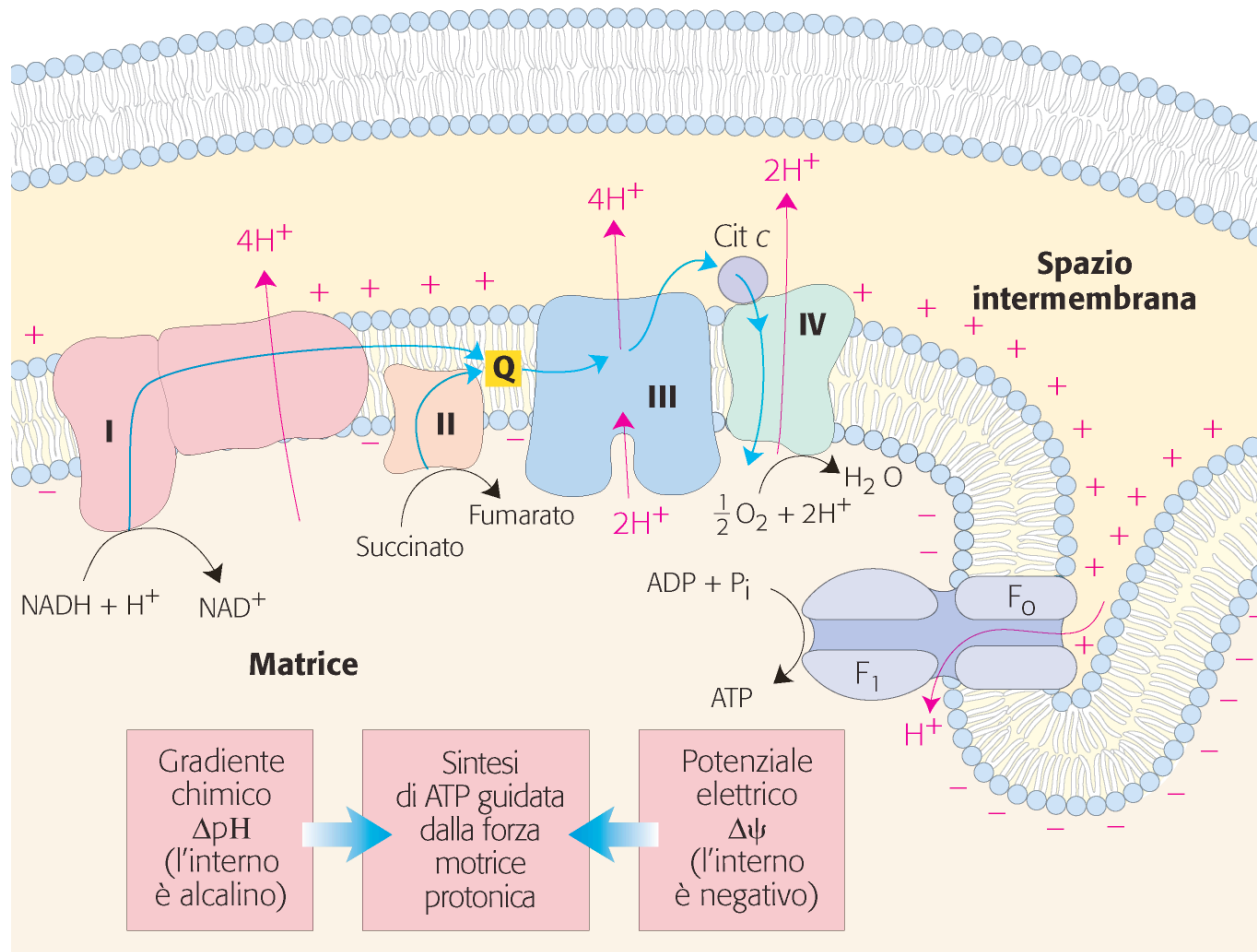
ORIGINE DELLE SPECIE REATTIVE

ENDOGENA

Nel nostro organismo i radicali liberi si producono:

- **Trasporto di elettroni nei mitocondri (fosforilazione ossidativa); metabolismo degli acidi grassi perossisomali; reazioni del citocromo P-450 microsomale**
- **Nelle reazioni immunitarie cellulo-mediate (fagocitosi)**
- **Attraverso l'azione della xantina ossidasi, enzima che origina dalla xantina deidrogenasi in seguito ad esposizione ad ipossia dei tessuti**
- **Nelle reazioni di detossificazione epatica (ossidazione dei substrati eso- ed endo-tossici catalizzati dagli isoenzimi della famiglia del citocromo P-450); enzimi che generano ossidanti (Monoamine oxidase, NADPH-oxidase, NO-synthase, etc)**
- **Nelle fasi di riperfusione dei tessuti dell'organismo interessati da fenomeni ischemici.**

LA FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA



GENERAZIONE DEI ROS DURANTE LA FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA

Quando la velocità di entrata degli e^- nella catena di trasporto e la velocità di trasferimento degli e^- lungo la catena respiratoria non sono uguali aumenta la produzione del radicale superossido ($\cdot O_2^-$) a livello dei complessi I e III;

COMPLESSO I
(NADH deidrogenasi)

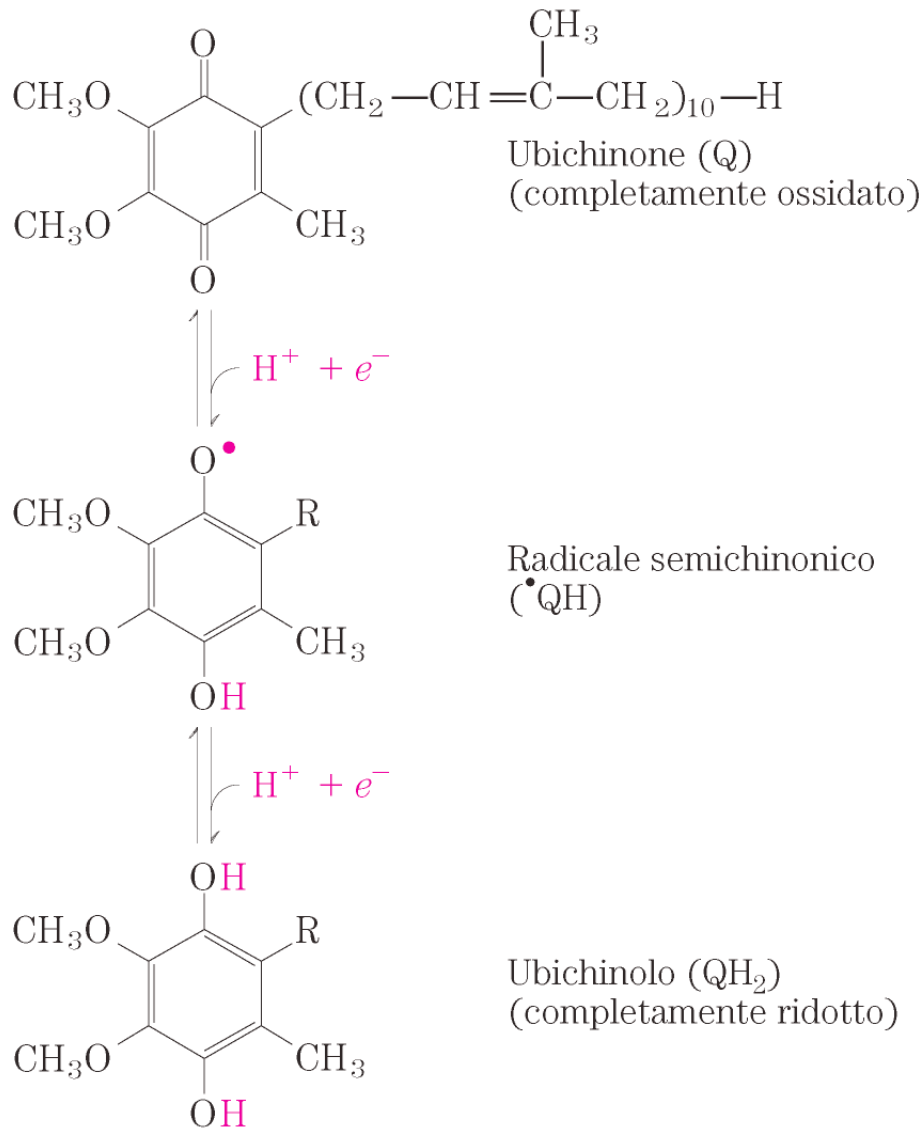
Generazione di $\cdot O_2^-$ durante il trasferimento di e^- dal complesso I all'Ubichinone (Q).

COMPLESSO III
(citocromo c ossidoreduttasi)

Generazione di $\cdot O_2^-$ durante il trasferimento di e^- dall'ubichinolo (QH_2) al citocromo c-complesso III.

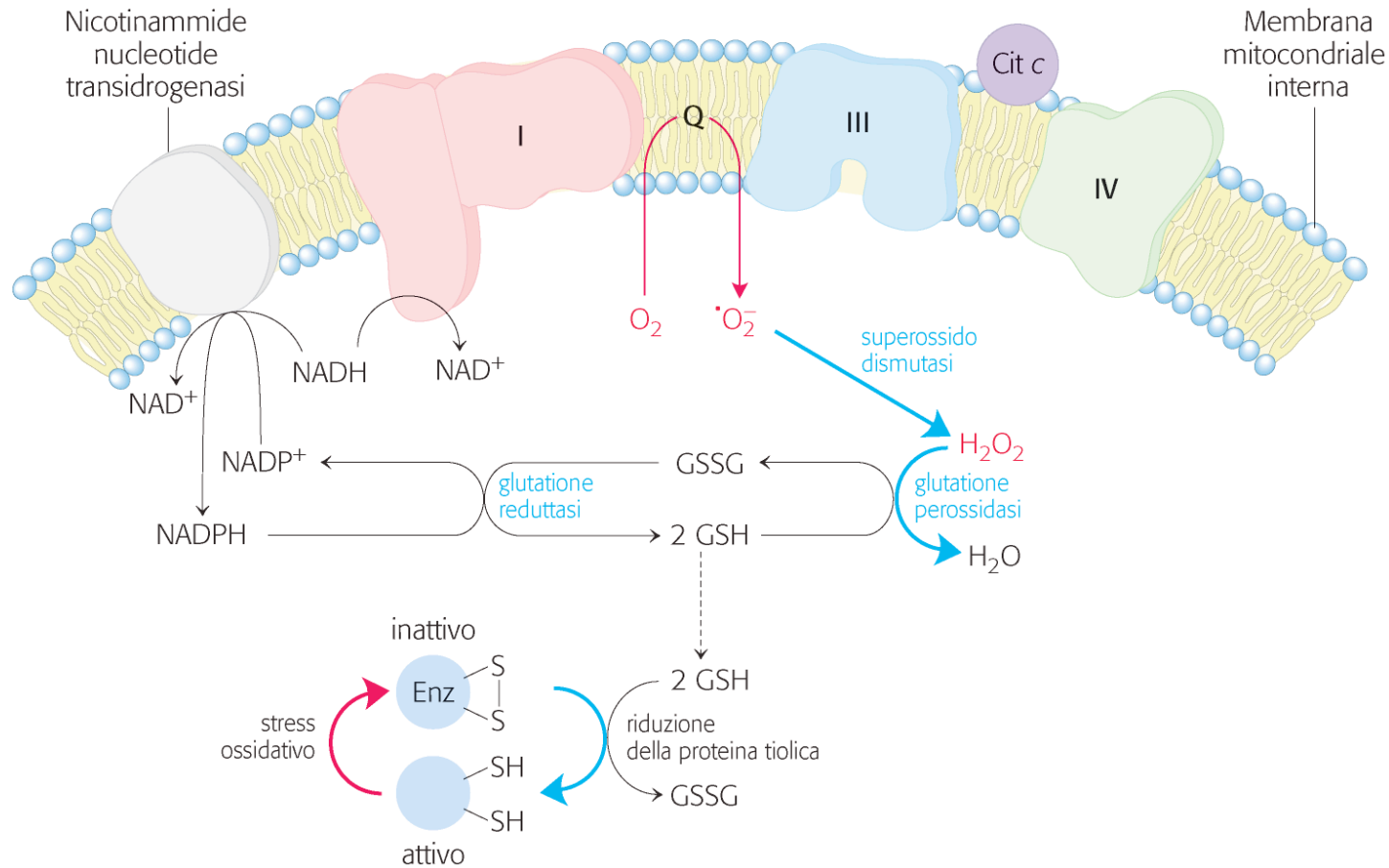
In queste due reazioni, si forma come intermedio il radicale semichinonico $Q\cdot^-$, parzialmente ridotto, che può cedere un e^- all' O_2 , producendo $O_2\cdot^-$

Riduzione dell'Ubichinone o Coenzima Q



La riduzione completa dell'Ubichinone richiede 2 elettroni e 2 protoni, e può avvenire in 2 tappe mediante la formazione intermedia di un radicale semichinonico

FORMAZIONE DEI ROS NEI MITOCONDRI E DIFESE MITOCONDRIALI



Formazione del radicale superossido a livello dei complessi I e III e difese mitocondriali; in blu, Superossido dismutasi (SOD), e glutatione perossidasi.

I fattori che alterano la velocità della catena respiratoria influenzano la formazione del superossido

L'ipossia provoca uno squilibrio tra il flusso degli elettroni provenienti dall'ossidazione dei substrati nella matrice mitocondriale (principalmente Ciclo di Krebs, beta-ossidazione) ed il trasferimento degli elettroni all'O₂ molecolare.

Ne consegue un aumento nella formazione dei ROS

Utilizzo di agenti antiossidanti, es. VitC

Effetti dei ROS sulle biomolecole: proteine, carboidrati, acidi nucleici, lipidi

PROTEINE:

ossidazione gruppi -SH ($\text{NO}\cdot$, $\text{HO}\cdot$, ONOO^-)

ossidazione di alcuni AA (HIS, ARG, LYS, PRO)

liberazione del Fe per degradazione degli anelli porfirinici

con perdita di funzionalità (H_2O_2)

CARBOIDRATI:

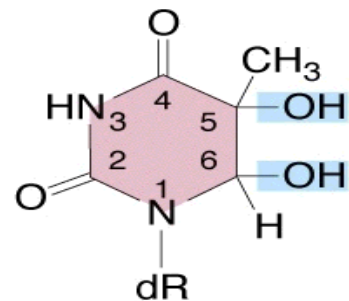
Sottrazione di un H da un C sulla catena polisaccaridica con formazione di un radicale ($\text{HO}\cdot$) con conseguente frammentazione e depolimerizzazione

Effetti dei ROS sulle biomolecole

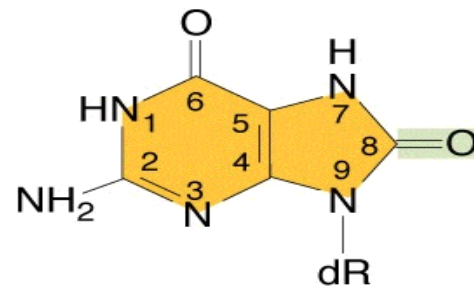
ACIDI NUCLEICI:

Il radicale ossidrilico danneggia anche gli acidi nucleici, sia causando la rottura del filamento polinucleotidico, sia variando la struttura delle basi del DNA. Sono state descritte circa 20 diverse variazioni di basi o lesioni al DNA. Alcune lesioni sono mutageniche, perché la base alterata creata (come la **8-ossoguanina**) forma appaiamenti che non rispettano le regole di Watson e Crick).

Altre lesioni, come il **glicole della timina**, sono potenzialmente letali perché bloccano la replicazione.



Thymidine glycol



8-Oxo-7-hydrodeoxyguanosine
(8-oxodG)

Idrossilazione delle basi per addizione del radicale OH• o sottrazione di un H dalla molecola saccaridica.

Effetti dei ROS sulle biomolecole

PEROSSIDAZIONE LIPIDICA

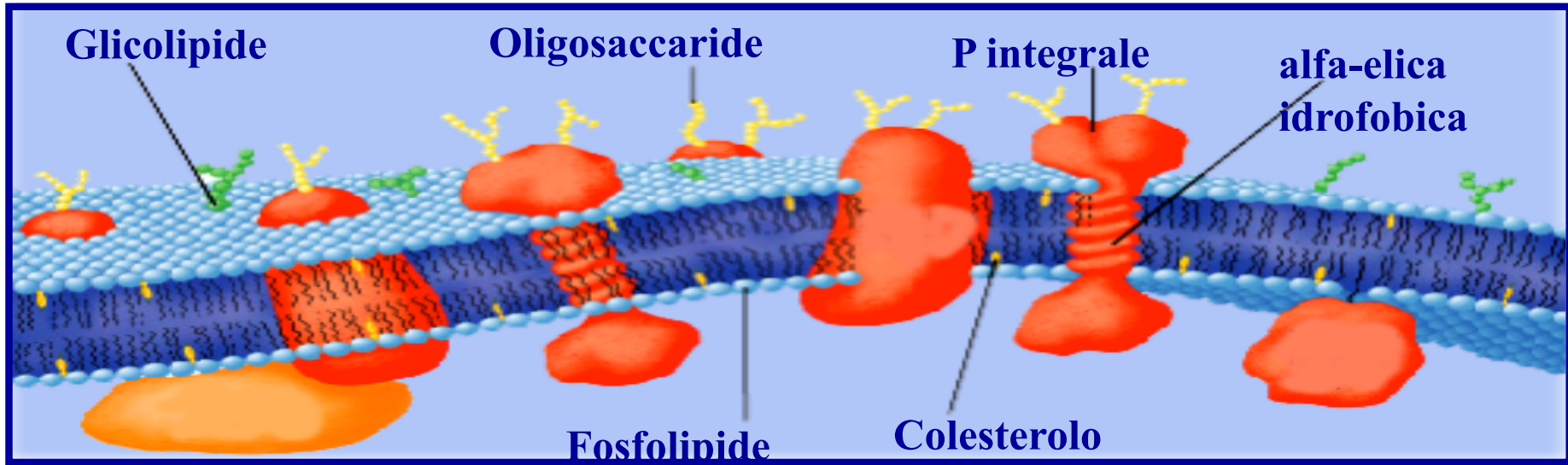
I lipidi sono la classe di biomolecole più suscettibile all'attacco dei radicali

L'iniziatore principale è il radicale idrossilico HO•

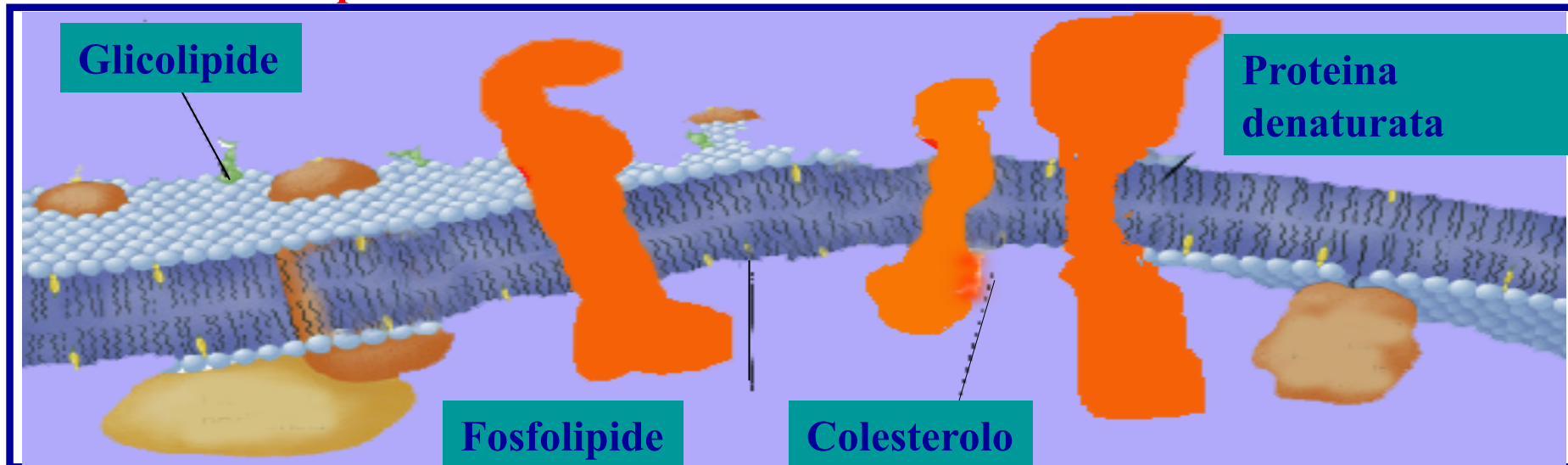
- L'autossidazione avviene a carico degli acidi grassi presenti nelle membrane cellulari o nelle lipoproteine**
- La suscettibilità aumenta all'aumentare dei doppi legami**
- La reazione di perossidazione porta alla formazione di prodotti secondari tossici o cancerogeni come aldeidi, chetoni**

DANNO INDOTTO SULLE MEMBRANE

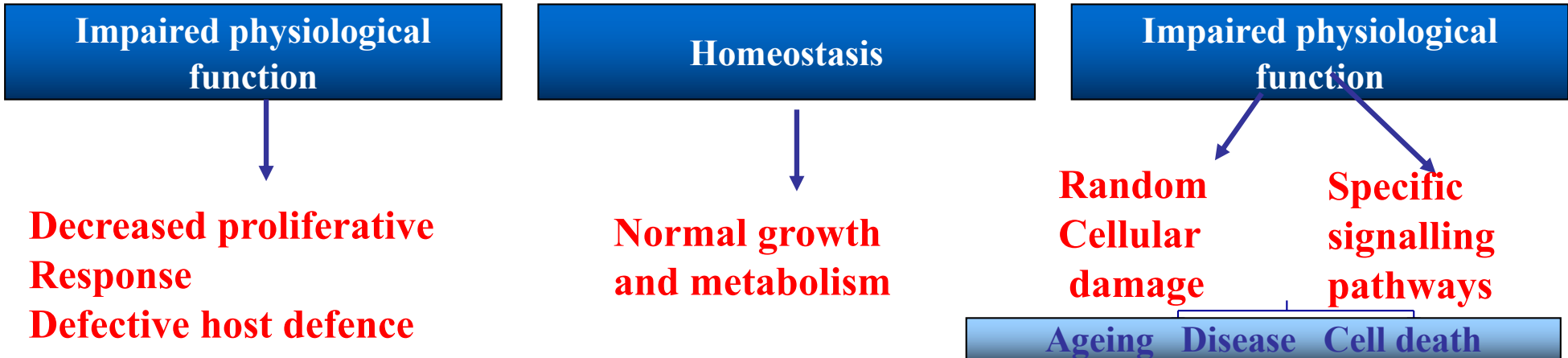
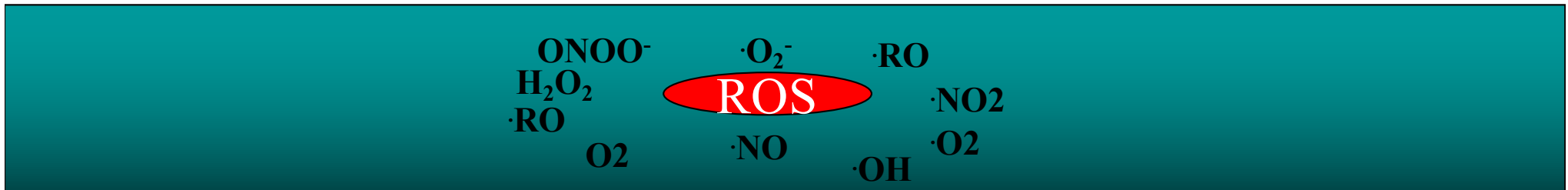
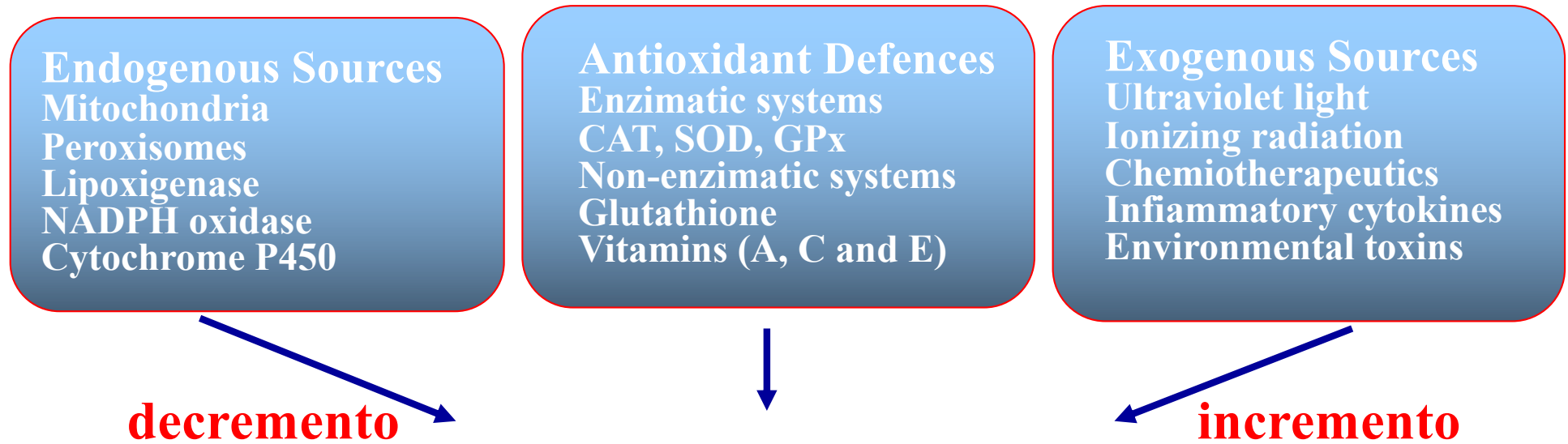
Membrana integra



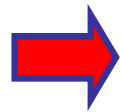
Perossidazione lipidica



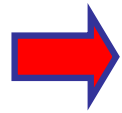
DIFFERENTI AZIONI DEI ROS



AZIONE DEI ROS SUL METABOLISMO



**MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE
DI FATTORI TRASCRIZIONALI**



**MODULAZIONE DELLA VELOCITA'
METABOLICA**

Insulti ambientali
Calore, Citochine, H₂O₂, Radiazioni

ROS

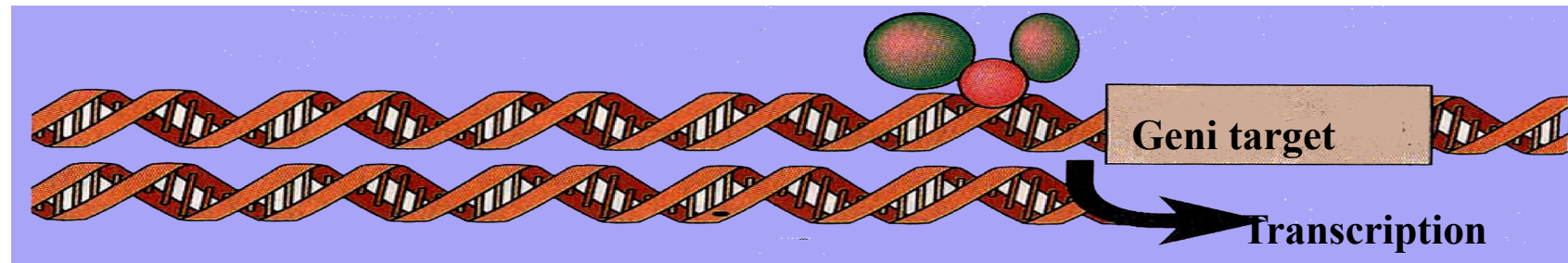
HSF1

NF-kB

p53

**PI(3)K
Akt**

**Erk
JNK
p38**



CONSEQUENCES

Apoptosi

Proliferazione

Arresto delle crescita

Senescenza

Nell'organismo sono presenti numerosi sistemi in grado di neutralizzare l'effetto dannoso dei radicali liberi

- **Antiossidanti enzimatici**
- **Antiossidanti non-enzimatici**

Antiossidanti enzimatici

SUPEROSSIDO DISMUTASI (SOD)



Metalloenzimi che catalizzano una reazione di dismutazione (una reazione in cui 2 stesse molecole di substrato hanno destini diversi). In questo caso una molecola di superossido viene ossidata e l'altra viene ridotta.

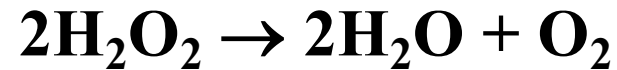
Esistono diversi isoenzimi SOD che differiscono per i diversi ioni metallici e per differente localizzazione cellulare:

Una forma di SOD rame e zinco-SOD (Cu-Zn-SOD) è citosolica, una forma Manganese-SOD (Mn-SOD) è mitocondriale.

Il perossido d'idrogeno viene metabolizzato dalla catalasi e dalla perossidasi.

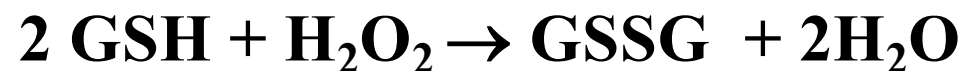
Antiossidanti enzimatici

CATALASI (CAT): espressa in grande quantità nei perossisomi



GLUTATIONE PEROSSIDASI:

catalizza la demolizione di perossidi tramite elettroni donati dal glutatione ridotto (GSH), che, a sua volta, viene mantenuto allo stato ridotto da un sistema NADPH-dipendente



L'esercizio fisico provoca un aumento di questa attività enzimatica.

ANTIOSSIDANTI NON ENZIMATICI

Sostanze capaci di inattivare i radicali liberi

Nel loro insieme, queste molecole vengono dette scavengers (spazzini).

Principali antiossidanti: vit C, vit. E, Glutatione, β -carotene e Selenio (cofattore della glutazione perossidasi)

Vitamina C: antiossidante idrosolubile

**Vitamina E (Tocoferolo) liposolubile
spegne le reazioni a catena dei radicali liberi e protegge
gli acidi grassi dei lipidi di membrana**

Principali antiossidanti alimentari

Vitamina E	Oli: germe di grano, girasole, soia, colza, mais Spinaci, broccoli Arachidi, semi di girasole
Vitamina C	Mirtilli, fragole, arance, kiwi Peperoni rossi, patate, broccoli, lattuga
β -carotene	Carote, spinaci, pomodori, piselli, lattuga, zucca, cicoria Agrumi, melone, albicocche, pesche, nespole
Selenio	Verdure, funghi Noci brasiliane, semi di girasole
Flavonoidi	Bevande: tè, vino rosso Cipolla, lattuga Mele, arance, uva
Licopene	Pomodori, meloni, papaia
Resveratrolo	Uva a buccia scura, vino rosso
Acido lipoico	Patate, carote, verdure in foglia Carni rosse
Ubichinone	Oli: soia, germe di grano Noci, nocciole Spinaci, aglio, cavoli Fagioli Carni e pesci in generi

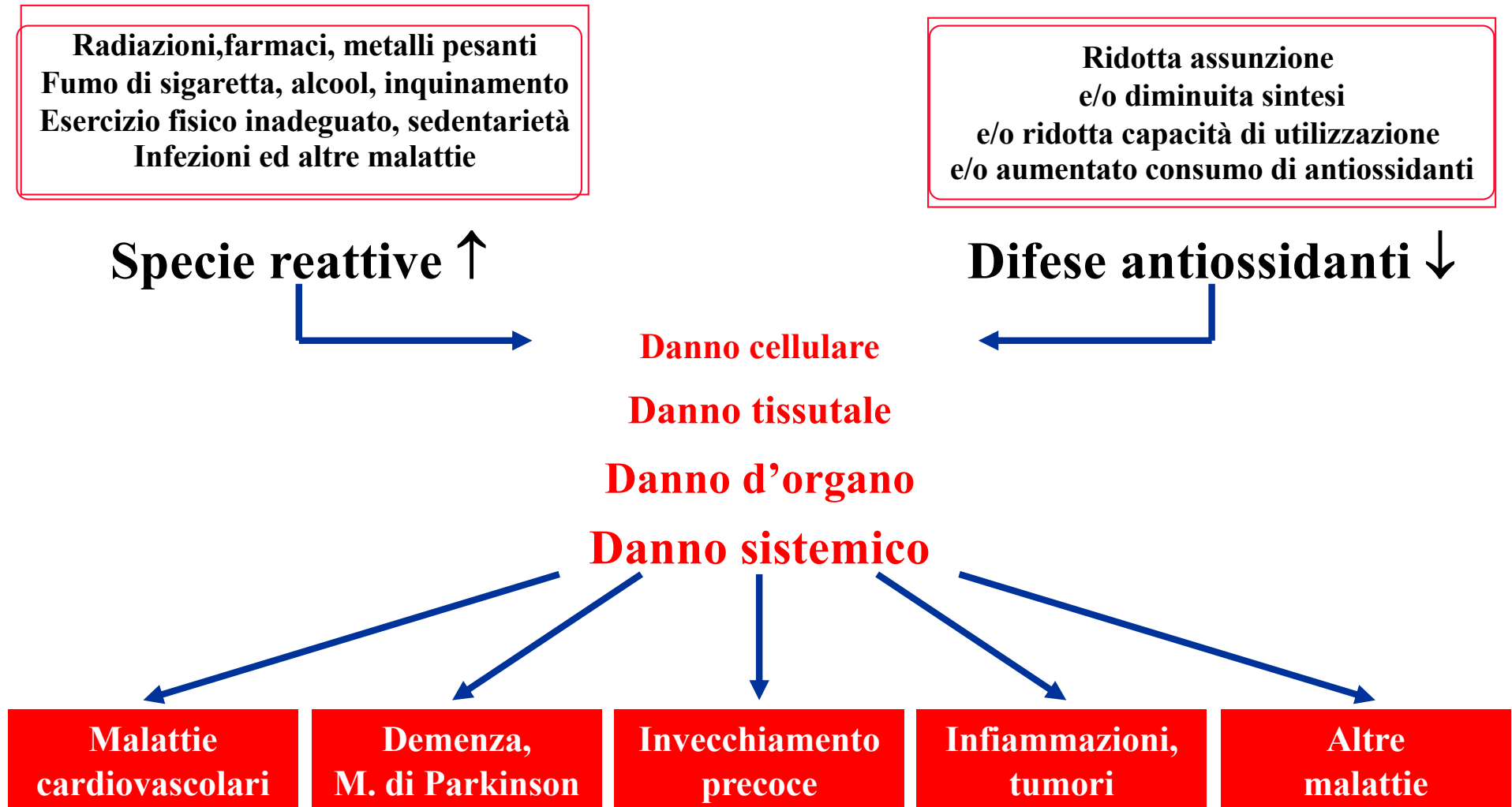
STRESS OSSIDATIVO



Si verifica quando la cellula non riesce a far fronte alla produzione di radicali liberi si viene a determinare un processo noto come STRESS OSSIDATIVO.

E' inteso come rottura dell'equilibrio tra i componenti reattivi ossidanti ed i meccanismi di difesa antiossidanti, a scapito di questi ultimi.

STRESS OSSIDATIVO



L'invecchiamento e numerose malattie sono correlate allo STRESS OSSIDATIVO



“The free radical man”

ROS ED ESERCIZIO FISICO

L'esercizio fisico porta ad un notevole aumento nella produzione di ROS soprattutto a livello muscolare.

L'esercizio fisico determina un aumento del metabolismo ossidativo correlato ad un aumentato livello di ROS.

Durante l'esercizio fisico, il consumo totale di O_2 può aumentare fino a 10-15 volte (il consumo O_2 nel muscolo scheletrico attivo può aumentare fino a 100 volte).

I ROS vengono prodotti costantemente ed in basse concentrazioni durante un'attività fisica moderata.

I ROS possono aumentare, anche in maniera drammatica, quando si svolge un'attività fisica molto intensa causando danni cellulari soprattutto a livello muscolare.

Meccanismi responsabili di aumentata produzione di ROS durante l'esercizio fisico

Il 2-5% dell'ossigeno mitocondriale genera perossidi durante l'esercizio fisico intenso

NADPH ossidasi (miociti scheletrici e cardiaci) produce radicali liberi in cellule stimulate *in vitro*

Elevati livelli di xantina ossidasi muscolare sono stati riscontrati nel plasma di ratti sottoposti ad esercizio fisico intenso ($\text{VO}_2\text{max} > 70\%$) indicando un ruolo diretto delle xantina ossidasi nella produzione di ROS associata ad esercizio fisico intenso.

Esercizio Fisico: causa o protezione allo Stress Ossidativo ?

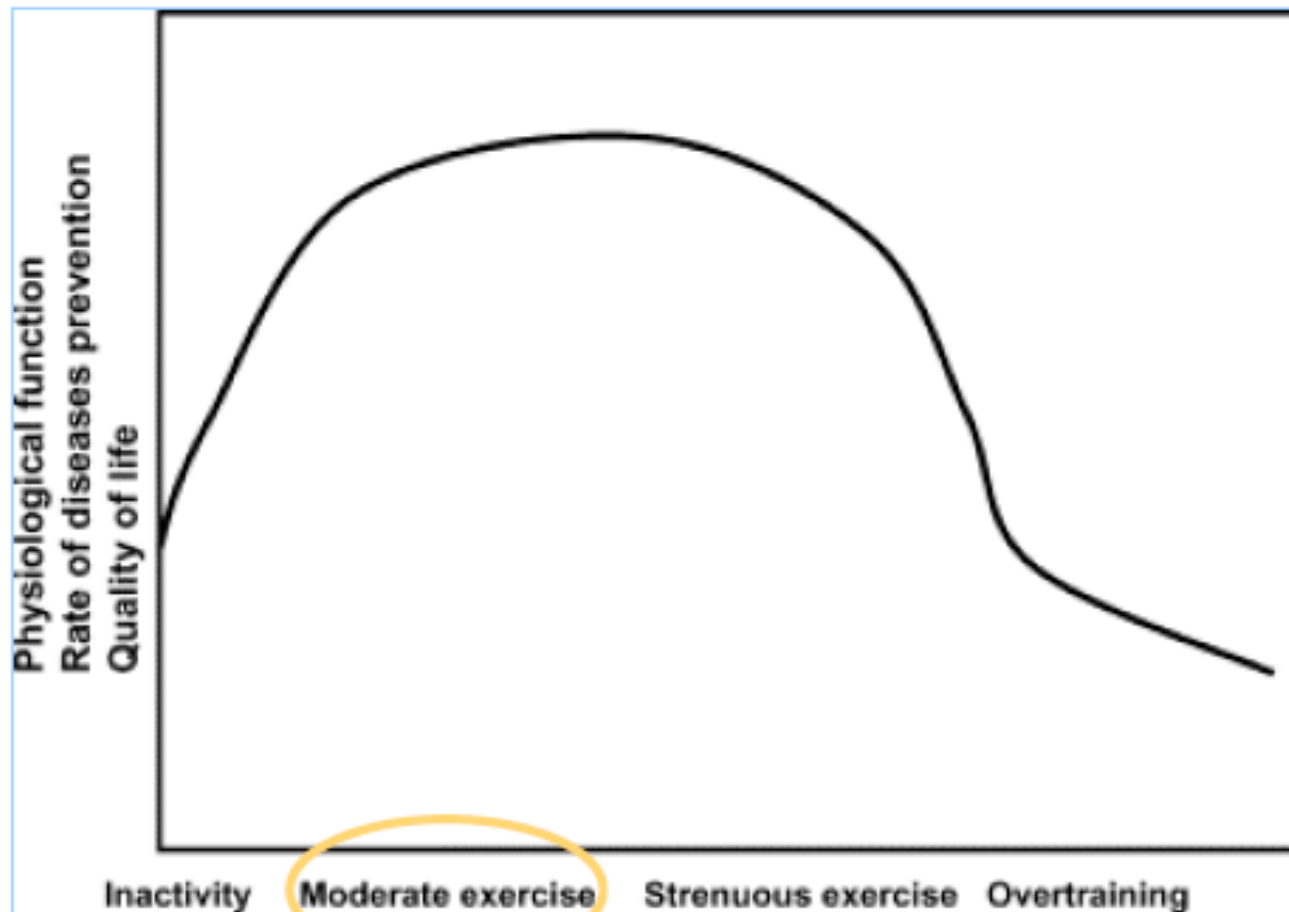
L'esercizio fisico prolungato e vigoroso, soprattutto in individui non allenati, produce danno muscolare

I ROS generati in seguito ad esercizio fisico moderato svolgono un importante ruolo fisiologico nell'adattamento del muscolo all'esercizio stesso.

Ormesi

- **L'ormési, (dal greco *ormao*), significa *stimolare*; è una relazione dose/risposta caratterizzata da un effetto bifasico: molti organismi/sistemi biologici esposti ad un'ampia gamma di stimoli mostrano risposte opposte a seconda della dose; l'ormesi viene considerata una funzione adattativa.**
- **Le risposte ormetiche sono caratterizzate da una modesta stimolazione della funzione interessata (endpoint) a basse dosi (30-60% maggiore del controllo) e dall'inibizione della stessa alle alte dosi.**
- **La curva dose/risposta può essere raffigurata da una U diritta o rovesciata a seconda dell'endpoint considerato: è dritta se viene valutato un danno all'organismo (alterazione di funzioni fisiologiche, mortalità o incidenza di malattie), è rovesciata se si considerano funzioni quali accrescimento o sopravvivenza.**

Ormesi



Radak et al.
2007

Esercizio Fisico: causa o protezione allo Stress Ossidativo ?

I ROS generati in seguito ad esercizio fisico moderato (50-60%VO₂max) sono considerati utili in quanto agiscono come molecole-segnale per aumentare le difese cellulari antiossidanti.

L'azione protettiva dei ROS in risposta ai danni ossidativi si esercita attraverso:



Modulazione dell'espressione di diversi enzimi antiossidanti (iper-regolazione di catalasi, Mn-SOD e glutathione perossidasi)

ROS ED ESERCIZIO FISICO

Bassi livelli di ROS in seguito ad esercizio fisico moderato modulano importanti processi fisiologici quali:

- ingresso del glucosio**
- rilascio del calcio dal reticolo sarcoplasmatico**
- biogenesi mitocondriale**
- differenziamento delle fibre muscolari ossidative**

CONCLUSIONI

L'esercizio fisico intenso (>70% VO₂max) soprattutto quando sporadico, può innescare uno stress di tipo ossidativo causando danni strutturali e reazioni di tipo infiammatorio a livello muscolare

Quando viene praticato ad intensità moderata e con regolarità, l'esercizio fisico aumenta l'espressione di sistemi antiossidanti così da poter essere considerato esso stesso un potente antiossidante.