

Jonathan Fusi, Emanuele Guidotti, Augusto Innocenti, Leonardo Tocchini, Emiliano Ricciardi, Marco Rossi, Fabio Galetta, Gino Santoro, Ferdinando Franzoni

Dipartimento di Medicina clinica e sperimentale e Dipartimento di Patologia chirurgica, medica, molecolare e dell'area critica, Università di Pisa

L'attività fisica regolare previene lo stress nitrosativo indotto dall'invecchiamento in atleti anziani

Riassunto

L'invecchiamento è associato a una maggiore suscettibilità al danno tissutale mediato da radicali liberi. Una delle più importanti classi di radicali generati nei sistemi viventi è rappresentata dai radicali liberi dell'azoto (RNS), responsabili del danno cellulare definito come stress nitrosativo. È stato dimostrato che l'attività fisica regolare migliora i sistemi antiossidanti dell'organismo, contribuendo a prevenire e contrastare lo stress ossidativo. L'obiettivo del presente studio è quello di valutare se l'attività fisica sia in grado di contrastare lo stress nitrosativo indotto dall'invecchiamento. A tale scopo sono stati reclutati 30 atleti master di sesso maschile (età media $70,8 \pm 6,1$ anni, $VO_2\max$ $59,07 \pm 8,5$ ml/kg/min) e 30 soggetti di controllo (età media $71,5 \pm 4,3$ anni, $VO_2\max$ $25,6 \pm 8,2$ ml/kg/min) sani, ma con stile di vita sedentario. La capacità antiossidante plasmatica nei confronti del perossinitrito, uno dei principali RNS, è stata valutata mediante tecnica gascromatografica *Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay* (TOSCA). I risultati ottenuti dimostrano che gli atleti anziani presentano una più alta attività scavenger plasmatica nei confronti del perossinitrito rispetto ai soggetti di controllo ($22,94 \pm 1,85$ vs $15,41 \pm 1,24$ units/ml, $p < 0,001$). Negli atleti è stata inoltre osservata una correlazione diretta tra la capacità scavenger del plasma e il $VO_2\max$ ($r = 0,44$, $p < 0,05$). Tali risultati confermano che l'attività fisica regolare condotta per molti anni è in grado di determinare una miglior risposta allo stress nitrosativo indotto dal perossinitrito.

Parole chiave: attività fisica - stress ossidativo - radicali liberi - perossinitrito

Abstract

Ageing is associated with an increased susceptibility to free radical-induced tissue damage. One of the most important class of free radicals generated in living systems is represented by reactive nitrogen species (RNS), responsible for the so-called nitrosative stress. It has been shown that physical activity is able to induce up-regulation of antioxidant systems contributing to prevent oxidative stress. Aim of the present study was to assess whether regular physical activity is able to counteract age-induced nitrosative stress. Thirty male endurance athletes (age 70.8 ± 6.1 years, $VO_2\max$ 59.07 ± 8.5 ml/kg/min) and thirty age-sex-matched sedentary controls (age 71.5 ± 4.3 years, $VO_2\max$ 25.6 ± 8.2 ml/kg/min) were studied. Plasma free radicals antioxidant capacity against peroxynitrite, one of the most important RNS, was evaluated as Total Oxyradical Scavenging Capacity (TOSC) units. Results. Plasma TOSC values against peroxynitrite was higher in athletes than in sedentary controls ($22,94 \pm 1,85$ vs $15,41 \pm 1,24$ units/ml, $p < 0.001$). In the athletes group, TOSC values were related to $VO_2\max$ ($r = 0.44$, $p < 0.05$). In conclusion, these results suggest that regular physical activity is associated with increased antioxidant defences in elderly athletes.

Key words: physical activity - oxidative stress - free radicals - peroxynitrite

Introduzione

L'invecchiamento è uno dei fattori di rischio indipendenti più importanti per le patologie cardiovascolari. Esso è associato a una maggiore suscettibilità al danno tissutale mediato da radicali liberi causata da una progressiva

perdita delle naturali capacità antiossidanti con conseguente aumento dello stress ossidativo¹.

I radicali liberi sono molecole instabili e altamente reattive prodotte nei sistemi organici dalla fosforilazione ossidativa o come risposta agli stati infiammatori. Sebbene

esista una moltitudine di radicali liberi, quelli derivanti dall'ossigeno o dall'azoto, definiti complessivamente RONS (*Reactive Oxygen and Nitrogen Species*), rappresentano la più grande classe di radicali generati nei sistemi viventi ².

Normalmente esiste un delicato equilibrio tra la produzione di fattori ossidanti, rappresentati dai radicali liberi dell'ossigeno (ROS), e la loro eliminazione attraverso un elaborato sistema di difese antiossidanti, composto sia da enzimi deputati alla conversione dei radicali liberi sia da molecole antiossidanti in grado di neutralizzarli, gli *scavenger*. Quando questo equilibrio viene alterato in favore dell'espressione dei radicali liberi, si instaura una condizione denominata *stress ossidativo* che, alterando la struttura e la funzionalità di proteine, lipidi e acidi nucleici, induce danno cellulare ^{3,4}. Allo stesso modo anche i radicali liberi dell'azoto (RNS) sono in equilibrio con un sistema tampone formato da *scavenger* e come per i ROS quando questo equilibrio viene meno si instaura una condizione di danno cellulare che, proprio in relazione al tipo di specie coinvolte, è descritto come *stress nitrosativo*. In vivo l'alterazione dell'equilibrio RNS/scavenger è stata associata a processi infiammatori, neurotossicità e ischemia. Inoltre, frequentemente lo stress nitrosativo coesiste con lo stress ossidativo e le due condizioni si sovrappongono ⁵. Tra gli RNS il radicale maggiormente associato alle patologie neurodegenerative e cardiovascolari è stato individuato nel perossinitrito (ONOO⁻) ⁶⁻⁸.

È stato dimostrato che l'attività fisica, sebbene da un lato determini un aumento della produzione di RONS, soprattutto attraverso l'incremento dei processi ossidativi mitocondriali, dall'altro stimola fenomeni adattativi di *up-regulation* dei sistemi antiossidanti dell'organismo. Tale fenomeno concorre nel mantenere l'equilibrio tra produzione di RONS e sistemi scavenger contribuendo a prevenire e contrastare lo stress ossidativo ^{9,10}. La capacità dell'attività fisica di migliorare la risposta scavenger dell'organismo umano nei confronti dello stress ossidativo è stata evidenziata in un precedente lavoro nei confronti di due specie di ROS: i radicali perossilici (ROO⁻) e idrossilici (OH⁻) ¹¹.

L'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare come l'attività fisica sia in grado di contrastare lo stress nitrosativo indotto dall'invecchiamento, confrontando l'attività antiossidante plasmatica rispetto al perossinitrito in un gruppo di anziani sportivi amatoriali e un gruppo di controllo composto da sedentari della stessa età.

Materiali e metodi

Soggetti

Trenta podisti master (maschi, età media di 70,8±6,1 anni) appartenenti al Marathon Club di Pisa e praticanti attività di endurance da molti anni (media 28,4±10,5 anni) sono stati arruolati nello studio. Essi praticavano almeno 5 sedute settimanali di allenamento per un totale di circa

7 ore alla settimana, oltre a una maratona o mezza maratona competitiva almeno una domenica al mese.

Trenta volontari sani (età media 71,5±4,3 anni) con stile di vita sedentario sono stati selezionati dall'ambulatorio cardiologico del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università di Pisa per formare il gruppo di controllo.

Tutti i soggetti erano sani ed esenti dai principali fattori di rischio cardiovascolare sulla base di un'accurata anamnesi, una visita clinica completa e un ECG basale e da sforzo. Nessuno era fumatore o assumeva farmaci o qualsiasi tipo di supplementazione vitaminica.

Gli atleti e i controlli presentavano un massimo consumo di ossigeno (VO₂max), valutato mediante test ergospirometrico (QUARK PFT ERGO, Cosmed, ITALIA) rispettivamente maggiore di 50 ml/kg/min e inferiore a 35 ml/kg/min.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico di Area Vasta Nord Ovest (CEAVNO) per la Sperimentazione clinica e tutti i soggetti hanno firmato consenso scritto all'esecuzione dello studio.

Disegno sperimentale

Dopo incannulamento della vena antecubitale, i soggetti sono stati sottoposti a un prelievo ematico (50 ml) in condizioni ambientali controllate (temperatura di 22-24°C) a distanza di almeno 48h dall'ultimo impegno sportivo. Il campione ottenuto e raccolto in provette contenenti acido dipotassio-etilendiaminotetracetico (EDTA, 10 µl/CC) è stato immediatamente centrifugato a 3.000 g per 10 min per ricavare campioni di plasma suddivisi in aliquote da 500 µl e conservati in Eppendorf a -80°C per le successive analisi. La valutazione della capacità antiossidante plasmatica è stata eseguita mediante saggio TOSCA (*Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay*) ¹².

In breve, il saggio si basa sulla genesi artificiale di derivati del perossinitrito a 35°C a partire dalla decomposizione del SIN-1 (*3-morpholinosydnonimine N-ethylcarbamide*) in un tampone fosfato di potassio 100 mM (pH 7,4) con 0,1 mM di DTPA (*diethylene-triamine-pentaacetic acid*) ⁸. Le reazioni con KMBA (*α-cheto-γ(methylthio)butyric acid*) 0,2 mM sono state effettuate in vials da 10 ml sigillate con valvole a tenuta di gas Mininert® (Supelco, Bellefonte, PA) in un volume finale di 1 ml ¹⁶. Il plasma analizzato è stato diluito 1/100 in tampone fosfato di potassio 100 mM (pH 7.4) in un volume finale di 1 ml (10 µl plasma + 990 µl tampone fosfato di potassio). La produzione di etilene è stata misurata tramite analisi gascromatografica di un'aliquota di 200 µl presa dallo spazio di testa dei vials a intervalli di tempo regolari durante tutta la durata della corsa. L'analisi è stata effettuata con un gascromatografo Hewlett-Packard (HP 7820A Series, Andover, MA) equipaggiato con una colonna capillare Supelco DB-1 (30 × 0,32 × 0,25 mm) e un detector ionizzatore di fiamma (FID). Le temperature del forno, dell'iniettore e del FID erano rispettivamente 35, 160 e 220

°C. Come gas carrier è stato usato l'idrogeno (a un flusso di 1 ml/min). I valori TOSCA sono stati calcolati dall'equazione: $TOSCA = 100 - (\int SA / \int CA \times 100)$, dove $\int SA$ e $\int CA$ rappresentano gli integrali delle aree per il campione e la reazione di controllo, rispettivamente. I risultati sono stati espressi in unità TOSCA per ml di plasma. Un valore TOSCA di 0 corrisponde a un campione senza capacità scavenger (nessuna inibizione della formazione di etilene rispetto alla reazione di controllo, $\int SA / \int CA = 1$), mentre un valore TOSCA di 100 corrisponde alla massima efficienza del campione analizzato.

La linearità della curva dose-risposta tra il plasma (in ml) e la risposta antiossidante (valore TOSCA) è stata testata e sono stati ottenuti buoni coefficienti di correlazione (generalmente superiore a 0,9) per le diverse dosi di plasma utilizzate per testare la validità dei nostri esperimenti. Ogni esperimento è stato eseguito due volte. Il coefficiente di variazione (CV) del metodo è < 5%.

Analisi statistica

I risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard. Le differenze tra le due popolazioni sono state valutate con il test t di Student. Le differenze sono state considerate statisticamente significative quando $p < 0,05$. Per valutare eventuali correlazioni tra le variabili è stata utilizzata la regressione lineare con analisi univariata e multivariata.

Risultati

I due gruppi studiati sono risultati sovrapponibili per età, peso, altezza, BMI, pressione sistolica e diastolica, glicemia, colesterolo totale e colesterolo LDL (Tab. I). Come atteso, gli atleti presentavano una frequenza cardiaca significativamente più bassa ($53,9 \pm 5,2$ vs $65,3 \pm 9,2$, $p < 0,001$) e un $VO_2\max$ significativamente più elevato

($59,07 \pm 8,5$ vs $25,6 \pm 8,2$, $p < 0,001$) rispetto ai controlli sedentari. Inoltre, è stato rilevato che il gruppo degli atleti presentava una concentrazione plasmatica di colesterolo HDL significativamente più elevata rispetto al gruppo di controllo ($59,7 \pm 11,3$ vs $43,4 \pm 8,7$, $p < 0,01$) (Tab. I).

Come riportato in Figura 1 nel gruppo degli atleti è stata rilevata una capacità antiossidante per il perossinitrito significativamente maggiore rispetto al gruppo di controllo (TOSCA value: $22,94 \pm 1,85$ vs $15,41 \pm 1,24$ units/ml, $p < 0,001$).

L'analisi di correlazione tra le variabili ha inoltre evidenziato una correlazione diretta nell'intera popolazione studiata tra la capacità antiossidante verso il perossinitrito e il $VO_2\max$ ($r = 0,44$, $p < 0,05$) (Fig. 2). Nessuna correlazione è stata trovata tra le altre variabili misurate.

Discussione

Il nostro gruppo ha precedentemente dimostrato che l'attività fisica è in grado di migliorare la risposta dell'organismo umano nei confronti dello stress ossidativo indotto dai ROS, in particolare dai radicali perossilici (ROO^\cdot) e idrossilici (OH^\cdot)¹¹. Tuttavia, per nostra conoscenza, non ci sono dati sull'efficacia dell'esercizio fisico nel miglioramento delle capacità dell'organismo umano di contrastare lo stress nitrosativo. Il presente lavoro documenta che l'attività fisica regolare è efficace anche nel ridurre lo stress nitrosativo indotto dall'invecchiamento. Il perossinitrito è stato correlato a varie patologie a carico dell'apparato cardiovascolare e del sistema nervoso centrale⁶⁻⁸. Nell'organismo umano esso è prevalentemente generato attraverso un processo di diffusione controllata tra l'ossido nitrico (NO) e il superossido ($O_2^{\cdot-}$) secondo la seguente reazione:



Tabella I. Caratteristiche cliniche della popolazione di studio (media \pm SD).

	Atleti	Controlli
Età (anni)	70,8 \pm 6,1	71,5 \pm 4,3
Altezza (cm)	172,1 \pm 5,8	173,5 \pm 6,2
Peso (kg)	75,9 \pm 5,4	77,2 \pm 6,9
BMI (kg/m ²)	23,8 \pm 2,1	25 \pm 1,6
FC (bpm)	53,9 \pm 5,2*	65,3 \pm 9,2
PAS (mmHg)	126,3 \pm 4,2	128,2 \pm 5,4
PAD (mmHg)	78,2 \pm 5,2	79,7 \pm 5,8
Glicemia (mg/dL)	93,0 \pm 9,1	92,2 \pm 10,0
Colesterolemia totale (mg/dL)	185,9 \pm 21,3	187,4 \pm 17,0
Colesterolemia HDL (mg/dL)	59,7 \pm 11,3 ¹	43,4 \pm 8,7
Colesterolemia LDL (mg/dL)	111,8 \pm 12,8	117,5 \pm 10,2
$VO_2\max$ (ml/kg/min)	59,07 \pm 8,5	25,6 \pm 8,2

* $p < 0,001$; ¹ $p < 0,01$ vs sedentari.

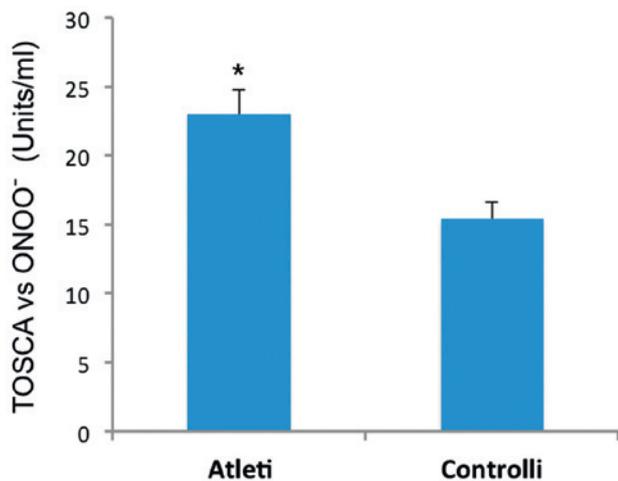


Figura 1. Attività antiossidante plasmatica verso perossinitrite nel gruppo degli atleti e dei controlli sedentari. * $p < 0,001$.

Tale reazione è una delle più rapide conosciute in chimica, tanto da superare la dismutazione catalizzata dall'enzima superossido dismutasi, uno degli antiossidanti endogeni più rappresentati¹³.

Il perossinitrito, in relazione alle sue proprietà chimiche, è considerato un importante ossidante biologico e un mediatore centrale di molti processi patologici sia a carico dell'apparato cardiovascolare che del sistema nervoso centrale¹⁴. Infatti, data la sua natura radicalica, può interagire con tutte le componenti cellulari, compreso il DNA, alterandone la struttura e conseguentemente la funzione. A livello cellulare una delle maggiori sedi di produzione del perossinitrito è rappresentata dal mitocondrio¹⁵ il quale costituisce la principale fonte di $O_2^{\cdot-}$ che si combina con NO in relazione alla facile diffusione di quest'ultimo dal citosol verso questa sede^{6,16}. La successiva reazione del perossinitrito con le compo-

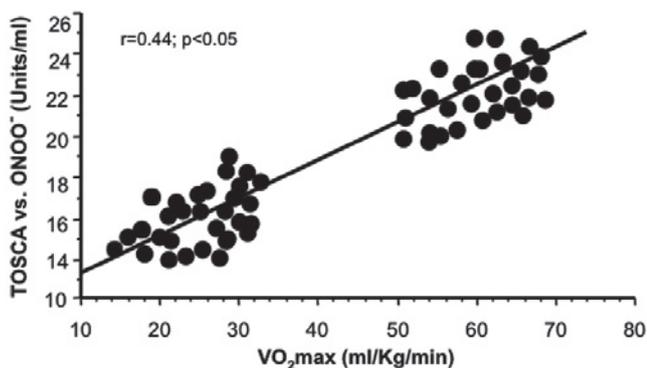


Figura 2. Analisi di correlazione tra massimo consumo di ossigeno e attività antiossidante plasmatica verso perossinitrite nell'intera popolazione di studio.

nenti mitocondriali altera irreversibilmente l'attività dei complessi I e II della catena di trasporto degli elettroni e dell'ATPasi modificando di conseguenza la bioenergetica mitocondriale e l'omeostasi del calcio, promuovendo in definitiva l'ulteriore formazione di $O_2^{\cdot-}$ ^{6,17,18}.

I dati raccolti in questo studio hanno evidenziato, per la prima volta, che l'attività antiossidante plasmatica per i derivati del perossinitrito è significativamente superiore in un gruppo di anziani che svolgono da molti anni attività podistica amatoriale ad alto livello rispetto a soggetti di controllo sedentari. Dai risultati ottenuti si può quindi presumere che l'esercizio fisico sia in grado di contrastare gli effetti dannosi indotti dallo stress nitrosativo associato all'invecchiamento. Questa evidenza è supportata dalla correlazione diretta tra la capacità di scavenger del plasma verso i perossinitriti e il VO_2 max, mostrando come lo stato di forma fisica e di allenamento e quindi il grado di fitness siano il principale correlato della miglior risposta allo stress nitrosativo.

Del resto l'attività fisica viene universalmente riconosciuta come un importante fattore di prevenzione primaria e secondaria. L'esercizio fisico regolarmente eseguito, infatti, non solo è un fondamentale fattore di riduzione del rischio di insorgenza e progressione dell'ipertensione arteriosa, delle dislipidemie, del diabete e dei disordini metabolici in genere, ma si è rivelata anche essere estremamente importante per l'impatto diretto sulla mortalità¹⁹⁻²³.

Tuttavia si suppone che questi effetti possano essere ottenuti pienamente soltanto quando i RONS siano prodotti in quantità fisiologica o di poco superiore²⁴. L'eccessiva produzione di RONS può essere il risultato di una grande varietà di stressors che vanno dall'esposizione a sostanze inquinanti all'esagerato o inappropriato apporto di nutrienti²⁵.

Più in generale, ogni situazione nella quale si riscontri un aumento del consumo di ossigeno può condurre a uno stato acuto di stress ossidativo. Tale condizione si può quindi manifestare anche durante un esercizio fisico intenso e/o prolungato²⁶. Quindi, da un lato l'esercizio fisico determina un aumento della produzione di RONS, soprattutto attraverso l'incremento dei processi ossidativi mitocondriali, ma dall'altro esso stimola fenomeni adattativi rispetto agli insulti ossidativi proprio grazie all'incrementata produzione delle specie reattive. Una ripetuta esposizione dei sistemi cellulari a un'incrementata produzione di RONS derivante dall'esercizio fisico conduce, infatti, a una upregulation dei sistemi antiossidanti dell'organismo^{9,10}. È proprio l'alterazione dell'equilibrio ossidoriduttivo associata a un ambiente più ridotto che sembrerebbe comportare un adattamento protettivo verso i RONS durante le sessioni di allenamento sequenziali, così come in caso di esposizione a condizioni non associate all'esercizio fisico.

I risultati ottenuti con il presente lavoro sono quindi a favore dell'ipotesi secondo cui l'esercizio fisico regolare migliori la capacità antiossidante plasmatica e

riduca lo stress ossidativo e nitrosativo indotto dall'invecchiamento. Presumibilmente l'incremento dell'attività antiossidante in seguito a un allenamento fisico è frutto di un processo di adattamento secondo i principi dell'ormesi: in risposta a una ripetuta esposizione a tossine o stressors di varia origine in quantità limitata l'organismo va incontro a un adattamento favorevole che risulta in un miglioramento della performance fisica e dello stato di salute generale^{27 28}. Il livello intermedio di RONS prodotti, che risulta perciò ottimale, conduce apparentemente a una condizione di equilibrio e di vantaggio per la salute generale, laddove invece una produzione troppo bassa o troppo elevata porta a un'alterazione delle capacità di difesa dell'organismo o a un esteso danno ossidativo e infiammazione.

Sebbene l'esatta comprensione del rapporto esistente tra RONS ed esercizio fisico rimanga ancora aperta a interpretazioni e approfondimenti, è ormai evidente che sia l'esercizio fisico aerobico²⁹ che quello anaerobico³⁰ possono potenzialmente determinare uno stress ossidativo e nitrosativo acuto mediante meccanismi biochimici di vario tipo. Differenti protocolli di esercizio possono indurre diversi livelli di produzione di RONS in quanto il danno ossidativo da essi indotto ha dimostrato essere dipendente da intensità e durata dell'esercizio stesso³¹. Si deve comunque tener conto che anche altri fattori tra i quali l'età³², il grado di allenamento¹⁰ e la dieta³³ rivestono un ruolo determinante nell'eventuale alterazione dell'equilibrio tra difese antiossidanti ed elementi pro-ossidanti.

Da un punto di vista molecolare è necessario considerare che gli effetti vantaggiosi dell'attività fisica regolare potrebbero essere mediati in parte dall'aumentata biodisponibilità di NO conseguente a esercizio fisico e in parte da un'attivazione RONS-mediata delle vie di trascrizione genica che determinano in ultima analisi una maggiore produzione di enzimi antiossidanti. I RONS, infatti, sembrano in grado di agire da segnale di attivazione di una serie di molecole che a loro volta attivano fattori di trascrizione nucleare sensibili allo stato redox come il Nuclear Factor kB (NF-kB). Le regioni geniche promoter di vari enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi, iNOS (*Inducible Nitric Oxide Synthase*) e glutamilcisteina sintetasi contengono siti di legame per NF-kB e sono perciò potenziali target per l'up-regulation indotta dall'esercizio fisico mediante la via NF-kB con i RONS come secondi messaggeri^{26 34 35}.

In conclusione, data la dimostrazione di correlazione tra attività fisica, meccanismi di trascrizione genica e attività antiossidante plasmatica, è auspicabile che le future ricerche in questo campo conducano a individuare con maggiore precisione e completezza i meccanismi molecolari alla base dell'adattamento dell'attività antiossidante indotto dall'attività fisica, ottenendo una migliore quantificazione del grado di attività sportiva (e di conseguenza dell'attività antiossidante) necessaria affinché si generi un effetto vantaggioso per la salute.

Bibliografia

- Beckman K, Ames B. *The free radical theory of aging matures*. *Physiol Rev* 1998;78:547-81.
- Halliwell B. *Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease*. *Am J Med* 1991;91:14S-22S.
- Sies H. *Oxidative stress: introductory remarks*. In: Sies H, ed. *Oxidative Stress*. London: Academic Press 1985, pp. 1-7.
- Darley-Usmar V, Starke-Reed P. *Antioxidants: strategies for interventions in aging and age-related diseases. A workshop sponsored by the National Institute on Aging and by the Office of Dietary Supplements*. *Antioxid Redox Signal* 2000;2:375-7.
- Klatt P, Lamas S. *Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress*. *Eur J Biochem* 2000;267:4928-44.
- Szabò C, Ischiropoulos H, Radi R. *Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics*. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:662-80.
- Peluffo G, Radi R. *Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology*. *Cardiovasc Res* 2007;75:291-302.
- Levrant S, Vannay-Bouchiche C, Pesse B, et al. *Peroxynitrite is a major trigger of cardiomyocyte apoptosis in vitro and in vivo*. *Free Radic Biol Med* 2006;41:886-95.
- Elosua R, Molina L, Fito M, et al. *Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women*. *Atherosclerosis* 2003;167:327-34.
- Fatouros IG, Jamurtas AZ, Villiotou V, et al. *Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining*. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36:2065-72.
- Franzoni F, Plantinga Y, Femia FR, et al. *Plasma antioxidant activity and cutaneous microvascular endothelial function in athletes and sedentary controls*. *Biomed Pharmacother* 2004;58:432-6.
- Regoli F, Winston GW. *Quantification of total oxidant scavenging capacity (TOS-CA) of antioxidants for peroxynitrite, peroxyl radicals and hydroxyl radicals*. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;156:96-105.
- Radi R, Cassina A, Hodara R, et al. *Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria*. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1451-64.
- Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, et al. *Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles*. *Arch Biochem Biophys* 1996;328:85-92.
- Bringold U, Ghafourifar P, Richter C. *Peroxynitrite formed by mitochondrial NO synthase promotes mitochondrial Ca²⁺ release*. *Free Radic Biol Med* 2000;29:343-8.
- Radi R, Rodriguez M, Castro L, et al. *Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite*. *Arch Biochem Biophys* 1994;308:89-95.
- Radak Z, Chung HY, Goto S. *Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging*. *Biogerontology* 2005;6:71-5.
- 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.
- Shephard RJ, Balady GJ. *Exercise as cardiovascular therapy*. *Circulation* 1999;99:963-72.
- Boule NG, Haddad E, Kenny GP, et al. *Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mel-*

- litus: a meta-analysis of controlled clinical trials.* JAMA 2001;286:1218-27.
- ²¹ Williams PT. *Vigorous exercise, fitness and incident hypertension, high cholesterol, and diabetes.* Med Sci Sports Exerc 2008;40:998-1006.
- ²² Blair SN, Kohl HW III, Barlow CE, et al. *Changes in physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy and unhealthy men.* JAMA 1995;273:1093-8.
- ²³ Myers J, Prakash M, Froelicher V, et al. *Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing.* N Engl J Med 2002;346:793-801.
- ²⁴ Reid MB. *Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't.* J Appl Physiol 2001;90:724-31.
- ²⁵ Goldstein S, Mere'nyi G. *The chemistry of peroxynitrite: implications for biological activity.* Methods Enzymol 2008;436:49-61.
- ²⁶ Volvaard NB, Shearman JP, Cooper CE. *Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance.* Sports Med 2005;35:1045-62.
- ²⁷ Beckman JS, Beckman TW, Chen J, et al. *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.* Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:1620-4.
- ²⁸ Ferrer-Sueta G, Radi R. *Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals.* ACS Chem Biol 2009;4:161-77.
- ²⁹ Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, et al. *Free radicals and tissue damage produced by exercise.* Biochem Biophys Res Commun 1982;107:1198-205.
- ³⁰ Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, et al. *Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise.* Eur J Appl Physiol 2003;89:14-20.
- ³¹ Bloomer RJ, Davis PG, Consitt LA, et al. *Plasma protein carbonyl response to increasing exercise duration in aerobically trained men and women.* Int J Sports Med 2007;28:21-5.
- ³² Roubenoff R. *Age-related loss of associations between acute exercise-induced IL-6 and oxidative stress.* Am J Physiol Endocrinol Metab 2006;291:E340-9.
- ³³ Watson TA, Callister R, Taylor RD, et al. *Antioxidant restriction and oxidative stress in short-duration exhaustive exercise.* Med Sci Sports Exerc 2005;37:63-71.
- ³⁴ Hemmrich K, Suschek CV, Lerzynski G, et al. *iNOS activity is essential for endothelial stress gene expression protecting against oxidative damage.* J Appl Physiol 2003;95:1937-46.
- ³⁵ Franco AA, Odom RS, Rando TA. *Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle.* Free Radic Biol Med 1999;27:1122-32.

CORRISPONDENZA

Ferdinando Franzoni
f.franzoni@int.med.unipi.it