



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di MEDICINA MOLECOLARE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Biomedicina

INDIRIZZO: Medicina Rigenerativa

CICLO XXVIII

**L'ESERCIZIO FISICO E L'ELETTRO-STIMOLAZIONE,  
STRATEGIE PER CONTRASTARE IL DECLINO MUSCOLARE  
NEGLI ANZIANI.**

PHYSICAL EXERCISE AND ELECTRO-STIMULATION, STRATEGIES TO  
COUNTERACT MUSCLE DECLINE IN SENIORS.

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Stefano Piccolo

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Vincenzo Vindigni

**Dottorando:** Simone Mosole



# INDICE

SOMMARIO	5
SUMMARY	9
1. INTRODUZIONE	13
1.1. IL MUSCOLO SCHELETRICO	13
1.1.1. Funzioni e Struttura del muscolo scheletrico	13
1.1.2. Ultrastruttura del muscolo scheletrico	15
1.2. CONTRAZIONE MUSCOLARE E E-C COUPLING	16
1.2.1. Modelli di contrazione muscolare del muscolo scheletrico	16
1.2.2. E-C Coupling	18
1.3. TIPI DI FIBRE	20
1.3.1. Transizioni tra tipi di fibra	25
1.4. ALLENAMENTO	26
1.4.1. Vie di segnalazione cellulare implicate nell'allenamento	27
1.4.2. Vie di trasduzione del segnale Calcio/CaM –dipendenti	29
1.4.3. Proteine chinasi Ca <sup>2+</sup> calmodulina dipendenti	30
1.4.4. Il sistema Calcineurina-NFAT	33
1.5. AGING	36
1.5.1. Effetti della sarcopenia	41
1.5.2. Strategie di prevenzione/trattamento della sarcopenia	41
1.5.2.1. Esercizio fisico	42
1.5.2.2. Alimentazione	43
1.5.3. Problemi di applicabilità dell'esercizio fisico negli anziani	44
2. SCOPO DELLA TESI	47
3. MATERIALI E METODI	49
3.1. MATERIALI	49
3.2. METODI	51
3.2.1. Soggetti dello studio	51
3.2.2. Protocollo di elettrostimolazione	52
3.2.3. Protocollo di Leg Press	53
3.2.4. Biopsie Muscolari	53
3.2.5. Polilisinazione dei vetrini	53
3.2.6. Preparazione delle sezioni criostatiche di muscolo del vastus lateralis	54

3.2.7.	Colorazione istologica: Ematossilina-Eosina (EE)	54
3.2.8.	Colorazione istochimica: ATPasi	55
3.2.9.	Analisi morfometriche	55
3.2.10.	Protocolli di immunofluorescenza	56
3.2.10.1.	Catene pesanti delle miosine (rapide e lente)	56
3.2.10.2.	N-CAM	57
3.2.10.3.	SERCA2	57
3.2.10.4.	NFATc1	57
3.2.10.5.	Controlli negativi	58
3.2.11.	Western Blot	58
3.2.11.1.	Preparazione degli omogenati	58
3.2.11.2.	Dosaggio proteico mediante saggio con BCA	59
3.2.11.3.	SDS-PAGE	59
3.2.11.4.	Immunoblot e sviluppo	60
3.2.12.	PCR quantitativa	61
3.2.13.	Statistica	63
4.	RISULTATI	65
4.1.	L'ESERCIZIO FISICO PROLUNGATO NELL'ANZIANO	65
4.1.1.	Analisi Demografica	65
4.1.2.	Valutazione dell'attività fisica e della mobilità	66
4.1.3.	Analisi morfometriche	68
4.1.4.	Analisi delle catene pesanti della miosina (MHC)	71
4.1.5.	Fibre coesprimenti sia miosine di tipo Rapido che Lento	71
4.1.6.	Fibre di tipo lento ed esercizio	75
4.2.	ESERCIZIO FISICO CONTRO ELETTROSTIMOLAZIONE NELL'ANZIANO	76
4.2.1.	Test funzionali	76
4.2.2.	Analisi morfologiche e morfometriche delle biopsie	78
4.2.3.	Attivazione dei pathway molecolari da parte dell'ES e dell'LP	80
4.2.3.1.	Espressione endogena basale diNFATc1 ed effetti dei training sulla traslocazione	80
4.2.3.2.	Analisi dell'attivazione del pathway della CamkII pre e post allenamento	81
4.2.4.	Effetti dell'ES e dell'LP sulla composizione proteica dell'SR	83
4.2.5.	Studio dell'espressione in situ di SERCA2	85

4.2.6. Effetto dei protocolli di allenamento su PGC1a	88
5. DISCUSSIONE	91
5.1. EFFETTI DELL'ESERCIZIO FISICO PROLUNGATO NEI MUSCOLI DEGLI ANZIANI	91
5.2. ESISTE UN'ALTERNATIVA ALL'ESERCIZIO FISICO?	95
6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	101
BIBLIOGRAFIA	103



## SOMMARIO

L'invecchiamento è un processo multifattoriale caratterizzato da un declino costante e inarrestabile della struttura, delle funzioni e di conseguenza delle prestazioni muscolari. Uno degli effetti più evidenti dell'invecchiamento sugli esseri umani è la riduzione della massa muscolare, nota come sarcopenia, che si verifica in misura diversa da individuo ad individuo e che porta a capacità funzionali ridotte (forza e resistenza). Fattori che contribuiscono al progredire di questo stato sono la diminuzione sia del numero e delle dimensioni delle miofibre che della quantità di motoneuroni che innervano le fibre muscolari. Esami istologici effettuati su muscoli di anziani hanno dimostrato che la denervazione può contribuire all'atrofia e in aggiunta l'immobilità e una vita di tipo sedentario ne accelera il processo, mentre l'esercizio fisico protegge in parte dagli effetti dell'invecchiamento. Diversi studi hanno dimostrato che l'esercizio fisico regolare può prolungare l'aspettativa di vita e rallentare gli effetti dell'invecchiamento. A livello molecolare il calcio, e di conseguenza il Reticolo Sarcoplasmatico, svolge un ruolo fondamentale nei processi metabolici e strutturali di adattamento muscolare attraverso l'attivazione di vie di segnalazione specifiche, in risposta al tipo di stimolo ricevuto. Questo lavoro di tesi si focalizza per l'appunto sui benefici dell'esercizio fisico e se questi possono essere comparati a quelli ottenuti se viene utilizzato un protocollo di allenamento indotto dall'elettrostimolazione. Questo potrebbe essere utile in campo riabilitativo in quanto l'esercizio fisico, specialmente negli anziani, non è sempre applicabile a causa di problemi sia di natura patologica che psicologica.

Per determinare gli effetti dell'invecchiamento e correlarli a diversi stili di vita sono stati studiati i muscoli vastus lateralis di tre distinti gruppi di persone (a) anziani sani sedentari (b) anziani sani con un'attività fisica costante da almeno 30 anni (c) giovani sportivi. In questi soggetti è stato caratterizzato il muscolo in relazione all'età e al tipo di esercizio fisico per determinare gli effetti dell'allenamento volontario sull'avanzare della sarcopenia durante l'invecchiamento. Dai dati ottenuti attraverso una serie di test funzionali è risultato che gli anziani fisicamente attivi presentano caratteristiche più simili a quelle dei giovani rispetto a quelli del gruppo sedentario della medesima età. Questa è una prova del fatto che gli anziani fisicamente attivi sono un gruppo molto performante ed è possibile paragonarli a atleti master della medesima età. Analisi morfologiche e istologiche hanno mostrato che gli anziani sedentari presentano più fibre denervate rispetto agli altri due gruppi e che gli anziani fisicamente attivi presentano una percentuale di fibre slow significativamente superiore, che però non dipende dal tipo di esercizio svolto. Inoltre sono state rilevate in tutti e tre i gruppi fibre che coesprimono sia la miosina rapida che quella lenta e nello specifico il gruppo degli anziani sedentari ne presenta

una percentuale più alta rispetto agli altri due. Tuttavia, le sezioni seriali di anziani sedentari mostrano la presenza di fibre coesprimenti di piccole dimensioni e angolate (denervate); pertanto, questo fatto suggerisce che si tratta di fibre di tipo lento che coesprimono isoforme fast di miosina attraverso programmi miogenici predefiniti. Al contrario, le fibre muscolari coesprimenti negli anziani fisicamente attivi sono di dimensioni simili alle miofibre innervate di tipo “puro” solo rapido o solo lento. In base ai risultati ottenuti alti livelli di esercizio fisico sembrano avere effetti benefici sulla reinnervazione di fibre muscolari, con conseguente conservazione della funzione muscolare, della dimensione e della struttura, ritardando così il declino funzionale e la perdita di indipendenza che sono comuni nelle persone più anziane.

Tuttavia, alcune condizioni patologiche tipiche degli anziani e anche alcune situazioni psicologiche limitano la capacità di svolgere attività fisica. Si rende quindi necessario trovare una valida alternativa all'esercizio fisico che però ne mantenga le proprietà benefiche e soprattutto che sia sicuro; queste caratteristiche possono essere tutte ritrovate nell'elettrostimolazione (ES). Per determinare se questo tipo di terapia può essere efficace anche nell'anziano è stato messo a punto uno studio degli effetti dell'ES sul muscolo umano di età avanzata, messi a confronto con quelli indotti da un programma di allenamento di forza volontario (Leg Press, LP), per un periodo di nove settimane. In entrambi i gruppi di anziani, dopo i due allenamenti, è stato rilevato un miglioramento dei parametri funzionali, ma solo i soggetti trattati con l'ES hanno avuto un aumento della forza isometrica massima dei muscoli vastus lateralis. L'elettrostimolazione, a differenza della LP, ha mantenuto la dimensione media complessiva delle fibre invariata, mentre si è verificato un aumento del diametro e del numero delle fibre rapide e una diminuzione di quelle di tipo lento. Da notare, nessun segno di fibrosi e/o di infiltrazioni di cellule infiammatorie è stato rilevato nei muscoli trattati per entrambi i tipi di allenamento. Inoltre, analisi di ultrastruttura non hanno visualizzato nessuna alterazione della struttura muscolare prima e dopo il trattamento.

In seguito a entrambi i trattamenti di ES e LP è stata rilevata l'attivazione sia del pathway della calcineurina/NFAT sia delle chinasi calcio calmodulina dipendenti (CaMKII) entrambi punti chiave per il rimodellamento muscolare. La valutazione quantitativa di tutte le proteine che compongono il Reticolo Sarcoplasmatico, mostra un aumento significativo di SERCA2 e Sarcalumenina e una diminuzione di CASQ1 dopo ES, mentre dopo LP non sono stati riscontrati cambiamenti significativi dei livelli proteici. Analisi di PCR quantitativa (qPCR) sono state effettuate al fine di chiarire se il livello di RNA di Sarcalumenina SERCA2 e CASQ sono regolati dall'elettrostimolazione. Nessuno dei geni viene up-regolato o down-regolato in modo statisticamente significativo dal training tramite ES suggerendo una regolazione a livello

post trascrizionale. Il muscolo vastus lateralis è una miscela di diversi tipi di fibre muscolari, di conseguenza, l'incremento quantitativo medio di SERCA2 e Sarcalumenina negli omogenati totali può essere attribuito a tutte le fibre o ad una specifica sottopopolazione di fibre (cioè fibre a contrazione lenta o intermedia di tipo ossidativo le fibre IIA). Per verificare se l'aumento di SERCA2 è a carico delle fibre rapide nei muscoli trattati tramite elettrostimolazione, è stato messo a punto un protocollo di immunofluorescenza per valutare la co-espressione di miosina del tipo rapido e SERCA2. Dopo l'ES il numero di fibre miste SERCA2/miosina rapida è significativamente aumentato, mentre è rimasto invariato dopo LP. Dall'analisi dell'intensità della fluorescenza di miosina rapida è risultato che alcune fibre a contrazione rapida presentano un segnale di miosina rapida più bassa rispettivamente nelle sezioni post ES e post LP e circa il 50% di tali fibre erano anche SERCA2 positive. Da queste osservazioni possiamo concludere che le fibre miste per miosina rapida / SERCA2 sono una popolazione eterogenea e che una parte di queste fibre probabilmente esprime le isoforme sia rapida che lenta della miosina.

In conclusione con questo lavoro di tesi sono stati messi a punto protocolli sperimentali che hanno permesso di identificare alcuni cambiamenti favorevoli indotti dall'allenamento fisico nell'anziano. Inoltre grazie alla stabilizzazione della traslocazione nucleare di NFATc1 che permane anche dopo diversi giorni dall'ultima sessione di allenamento, si può assegnare a quest'ultimo il ruolo di biomarcatore di sedentarietà (NFATc1 citoplasmatico) e di "attivazione" muscolare" (sua traslocazione nei mionuclei), sia essa indotta da ES o LP. Infine per la prima volta è stato dimostrato che l'ES è in grado di neuromodulare con effetti benefici la qualità del muscolo dell'anziano, la mobilità e le prestazioni funzionali. Quindi l'ES può essere un valido approccio per contrastare l'atrofia e i problemi muscolari dati dal processo di invecchiamento sia per anziani sani che soggetti a condizioni patologiche croniche, avendo come fine ultimo un miglioramento dello stile di vita.



## SUMMARY

Aging is a multifactorial process characterized by a constant and relentless decline of the structure, functions and consequently of muscle performance. One of the most obvious effects of aging in humans is the reduction of muscle mass, known as sarcopenia, which its development changes from individual to individual and which leads to reduced functional capacity (strength and resistance). Factors that contribute to the progress of this state are the decrease in both the number and size of myofibers and the amount of motoneurons that innervate the muscle fibers. Histological examinations carried out on the muscles of the elderly have demonstrated that denervation can contribute to atrophy and in addition the immobility and a life of sedentary accelerates the process, while the physical exercise protects in part from the effects of aging. Several studies have shown that regular exercise can prolong life expectancy and slow the effects of aging. At the molecular level calcium, and consequently the sarcoplasmic reticulum, plays a vital role in metabolic processes and structural adaptation of muscle through the activation of specific signaling pathways, in response to the type of stimulus received. This thesis focuses precisely on the benefits of physical exercise and whether these can be compared to those obtained by using a training protocol induced by electrostimulation. This could be useful in rehabilitation as exercise, especially in the elderly, it is not always applicable due to pathological and psychological problems.

To determine the effects of aging and to correlate them with different lifestyles were studied the vastus lateralis muscle of three distinct groups of people (a) healthy sedentary seniors (b) healthy seniors with at least 30 years of regular exercise (c) young athletes. In these subjects muscle was characterized in relation to age and type of exercise to determine the effects of the voluntary exercise on the progress of sarcopenia during aging. From the data obtained through a series of functional tests was showed that the physically active seniors have characteristics most similar to young compared to the sedentary group of the same age. This is evidence of the fact that physically active seniors are a very powerful and performing group and it's possible to compare them to master athletes of the same age. Morphological analysis and histological studies have shown that the sedentary seniors present more denervated fibers than the other two groups, and that the physically active seniors have a significantly higher percentage of slow fibers, which, however, does not depend by the type of exercise done. Also it was detected in all three groups fibers that coexpress both myosin fast and slow and specifically the group of the sedentary seniors presents an higher percentage of coexpressing fibers than the other two groups. However, the serial sections of sedentary seniors showed the presence of coexpressing

fibers of small dimensions and angled (denervated); therefore, this fact suggests that these fibers are slow fibers that coexpress fast myosin isoforms through default myogenic programs. On the contrary, the coexpressing muscle fibers in the physically active seniors are similar in size to the innervated "pure" muscle fibers, only fast or only slow. Based on the results obtained high levels of exercise appear to have beneficial effects on reinnervation of muscle fibers, resulting in conservation of muscle function, size and structure, thus delaying the functional decline and loss of independence which are common in older people.

However, some pathological conditions and also some psychological situations, typical of the elderly, limit the ability to perform physical activity. It is therefore necessary to find an alternative to physical exercise that can maintain the beneficial properties, and above all that can be safe; these features can all be found in electrostimulation (ES). To determine whether this type of therapy can be effective in the elderly was also developed a study to define the effects of ES on aged human muscle, compared with a group of seniors the performed a voluntary strength training program (Leg Press, LP), for a period of nine weeks. In both groups of seniors, after the two workouts, it was noted an improvement in functional parameters, but only those who received the ES treatment presented an increase in the maximum isometric strength of the muscles vastus lateralis. Electrostimulation, unlike the LP, has kept unchanged the overall average size of the fibers, while there was an increment of the diameter and the number of fast fibers and a decrement of both parameters in slow type fibers. Of note, no sign of fibrosis and/or infiltration of inflammatory cells was detected in the treated muscles for both types of training. In addition, analysis of ultrastructure not viewed any alteration of muscle structure before and after treatment.

After both treatments of ES and LP was recorded an activation of both the pathway of calcineurin/NFAT and calcium calmodulin dependent kinase (CaMKII), both key points for muscle remodeling. The quantitative evaluation of all the proteins that constitute the sarcoplasmic reticulum, shows a significant increment in protein levels of SERCA2 and Sarcalumenin and a decrement CASQ1 after ES, while after LP there were no significant changes. Analysis of quantitative PCR (qPCR) were made in order to clarify whether the level of Sarcalumenin SERCA2 and CASQ RNA are regulated by electrostimulation. None of the genes is up-regulated or down-regulated in a statistically significant way by the ES training, suggesting a regulation at the post transcriptional level. The vastus lateralis muscle is a mixture of different types of muscle fibers, consequently, the increase in the average quantity of SERCA2 and Sarcalumenin in total homogenates can be attributed to all the fibers or to a specific subpopulation (ie, slow twitch fibers or intermediate oxidative fibers IIA). To see if the

increase in SERCA2 is against fast fibers in muscles treated by electrostimulation, it was developed a protocol immunofluorescence to assess the co-expression of myosin fast and SERCA2. After the ES the number of mixed fiber SERCA2/fast myosin is significantly increased, but was unchanged after LP. From the analysis of the intensity of fluorescence of fast myosin it was found that certain fast-twitch fibers exhibit a lower signal of fast myosin respectively in sections post ES and post LP and about 50% of such fibers were also positive SERCA2. From these observations we conclude that the mixed fibers for fast myosin/SERCA2 are a heterogeneous population and a part of these fibers probably expresses both isoforms of myosin.

In conclusion, in this thesis were developed experimental protocols that have allowed to identify some favorable changes induced by physical exercise in the seniors. Moreover, thanks to the stabilization of the nuclear translocation of NFATc1 that remains even after several days last training session, it can be assign to the role of biomarker of inactivity (NFATc1 cytoplasmic) and “activation " muscle” (myonuclear translocation), whether induced from ES or LP . Also for the first time it was shown that the ES is able to neuro-modulate with beneficial effects for the quality of the muscle, the mobility and the functional performances of the seniors. Thus the ES may be a viable approach to counter the problems and the atrophy of the muscle caused by the aging process both for healthy seniors and subjects to chronic health conditions, having as ultimate goal to improve lifestyle.



# 1.INTRODUZIONE

## 1.1. IL MUSCOLO SCHELETRICO

Il muscolo scheletrico rappresenta un classico esempio biologico di relazione tra struttura e funzione. Sia a livello macroscopico che microscopico, il muscolo scheletrico è perfettamente capace di generare forza e di permettere il movimento.

Il corpo umano contiene più di 600 muscoli scheletrici, divisi equamente tra la parte destra e sinistra del corpo, specializzati per specifiche funzioni. Alcune delle proprietà sono irreversibilmente determinate fin dai primi stadi di sviluppo di un essere vivente, come la struttura anatomica di ogni muscolo, compresi forma muscolare, organizzazione spaziale orientamento della componente fascicolare e le connessioni con specifici tendini, ossa e nervi. D'altro canto, altre proprietà muscolari, come la massa muscolare, possono variare in seguito a variazioni delle condizione fisiologiche e patologiche, come mostrato da estremi casi di aumento della massa muscolare nei bodybuilder e da casi di estrema diminuzione della massa muscolare nei soggetti affetti da cachessia.

### 1.1.1. Funzioni e Struttura del muscolo scheletrico

L'intero muscolo scheletrico viene considerato un organo del sistema muscolare. Ogni organo o muscolo è composto da tessuto muscolare, tessuto connettivo, tessuto nervoso e dal tessuto vascolare. L'insieme di questi elementi porta ad una grande variabilità del muscolo scheletrico in termini di dimensioni, forma e composizione. Questi spaziano da filamenti estremamente sottili come il muscolo dello stapedium dell'orecchio a masse enormi come i muscoli della coscia. Alcuni muscoli scheletrici sono di forma larga mentre altri sono stretti. In alcuni muscoli le fibre sono parallele all'asse longitudinale del muscolo, in alcuni convergono in punto specifico e in altri sono oblique.

Questa eterogeneità strutturale del tessuto muscolare scheletrico consente di svolgere diverse funzioni tra cui:

- La determinazione del movimento
- Il mantenimento della postura
- La stabilizzazione delle articolazioni
- La produzione di calore

- La protezione di strutture ossee ed organi interni
- Il movimento di liquidi e sostanze

Il muscolo scheletrico (Fig. 1) è avvolto da uno strato di tessuto connettivo denso, chiamato epimysium e che è la naturale continuazione del tendine. Un muscolo è composto da numerosi fasci di fibre muscolari, chiamati fascicoli, che sono separati l'uno dall'altro da uno strato di tessuto connettivo chiamato perimysium. L'Endomysium è lo strato di tessuto connettivo che separa ogni singola fibra muscolare dalle altre. Le cellule muscolari mature vengono chiamate fibre muscolari o miofibre. Ogni miofibrilla è un sincizio multinucleato formato dalla fusione di cellule muscolari immature chiamate mioblasti.

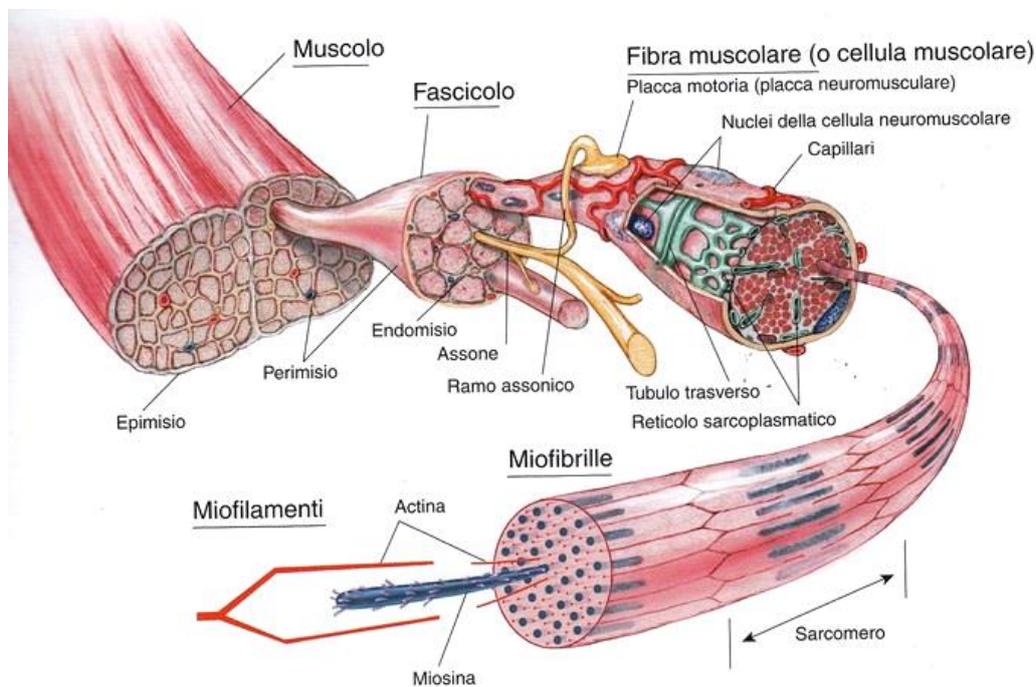


Fig. 1 Struttura del muscolo scheletrico

Il sarcoplasma, il citoplasma di ogni miofibrilla, è ampiamente occupato dall'apparato contrattile della cellula. Questo è composto da miofibrille che a loro volta sono composte da sarcomeri, i quali sono le unità contrattili della cellula. I sarcomeri contengono proteine, come l'alfa actinina, che sono i maggiori costituenti della banda Z e actina e miosina che sono i maggiori costituenti dei filamenti sottile e spesso.

Col termine sarcoplasma, localizzato tra le miofibrille, si intende invece il network intermiofibrillare, che contiene mitocondri, lipidi, glicogeno, tubuli-T e il reticolo

sarcoplasmatico. I tubuli-T sono responsabili della conduzione di segnali elettrici dalla superficie della cellula alle aree interne delle miofibre. Il reticolo sarcoplasmatico ha come compito l'accumulo e il rilascio intracellulare di calcio necessario per la contrazione muscolare. I segnali elettrici trasferiti attraverso i tubuli T stimolano il reticolo sarcoplasmatico a rilasciare il calcio.

### 1.1.2. Ultrastruttura del muscolo scheletrico

L'ultrastruttura del muscolo è caratterizzata da un complesso arrangiamento di interazione proteina-proteina. Il sarcomero è l'unità base del muscolo, formato da due sistemi trasversi di filamenti: il filamento spesso (miosina) e quello sottile (actina) (Fig.2). Mentre l'actina e la miosina sono i principali elementi contrattili del sarcomero, altre proteine agiscono come scaffold, controllano la composizione dell'ultrastruttura, regolano la contrazione muscolare e trasmettono la tensione tra i sarcomeri e quindi all'intera miofibrilla.

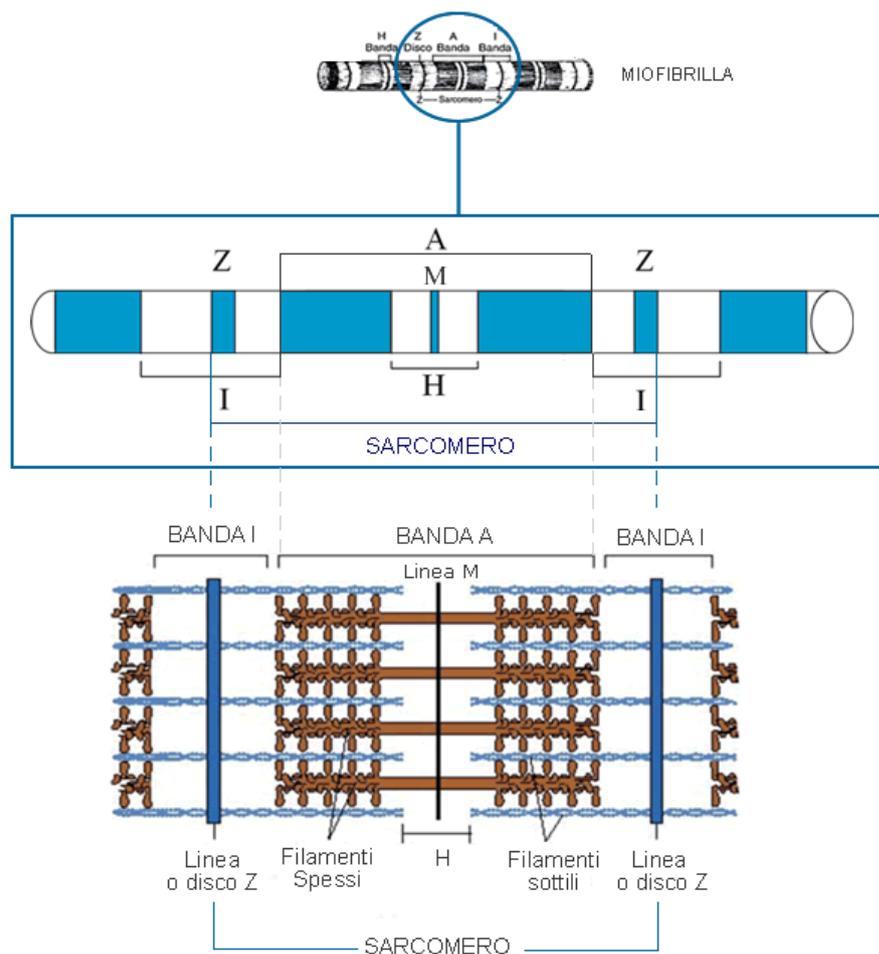


Fig. 2 Struttura e composizione del sarcomero

I filamenti sottili sono costituiti da due catene proteiche di actina avvolte a spirale e tenute insieme allineate correttamente dalla nebulina, una proteina anelastica che si attacca alle linee Z. L'actina è una proteina a struttura globulare che presenta un sito di legame per la miosina. In condizioni di riposo i siti attivi delle molecole di actina sono parzialmente bloccati dalla tropomiosina, una proteina regolatrice il cui posizionamento è a sua volta regolato dal cambiamento conformazionale calcio-dipendente di un'altra proteina ad essa associata, la troponina. I filamenti spessi sono invece costituiti da sei fascetti di miosina e da una proteina elastica, la titina, la quale si estende dalla linea M alla linea Z e ha la doppia funzione di favorire il corretto allineamento dei filamenti spessi all'interno del sarcomero e di conferire elasticità alla fibra per tornare alla sua lunghezza originaria una volta terminata la contrazione; ogni miosina a sua volta è divisa in catene proteiche, due catene pesanti e quattro catene leggere.

Un'estremità dei filamenti di miosina è rigonfia e prende il nome di testa della miosina e ha due funzioni: si attacca ai filamenti di actina permettendo l'accorciamento del sarcomero e inoltre funge da enzima necessario alla scissione dell'ATP in ADP+Pi (fosfato inorganico), poiché la contrazione necessita di energia.

La disposizione alternata dei due tipi di filamenti nella miofibrilla dà origine a una sequenza ripetitiva di bande chiare e scure a diverso indice di rifrazione, che conferisce alla fibra il tipico aspetto striato. Il sarcomero è delimitato da due strie di natura proteica, le strie, o linee, Z. Ai lati di tali strie vi è una banda chiara detta banda I (isotropa alla luce polarizzata), costituita da filamenti di actina. Andando verso l'interno è possibile notare una banda scura detta banda A (anisotropa alla luce polarizzata) costituita da filamenti di actina e filamenti di miosina interposti tra di loro. Al centro della banda A vi è una banda più piccola detta banda H. Al centro di quest'ultima è presente una linea scura, la linea M, costituita da proteine che interconnettono i filamenti di miosina (Fig.2).

Quando le fibre muscolari vengono stimolate, i filamenti di miosina, grazie alle teste, si legano ai filamenti di actina creando dei ponti trasversali. Le teste della miosina spingono verso l'interno i filamenti di actina, accorciando così il sarcomero.

## 1.2. CONTRAZIONE MUSCOLARE E E-C COUPLING

### 1.2.1. Modelli di contrazione muscolare del muscolo scheletrico

La contrazione muscolare è un processo ciclico multi-step che coinvolge la testa globulare della miosina, l'actina e l'idrolisi dell'ATP. L'originale modello "sliding filament" afferma che la

contrazione muscolare avviene quando I filamenti spessi scorrono sui filamenti sottili, questo movimento accorcia l'intero sarcomero con nessuna modificazione di lunghezza da parte dei filamenti. Questo modello di contrazione muscolare è stato sviluppato in seguito per includere il ruolo dell'idrolisi dell'ATP nel "Lymn-Taylor cycle". Il modello è stato in seguito rifinito usando osservazioni strutturali e spettroscopiche, le quali mostrano il movimento si actina e miosina che nasce dalla testa della miosina che agisce come una leva (ipotesi del braccio a leva). La testa della miosina si sottopone ad una serie di ordinate cambiamenti conformazionali che dipendono dalla presenza di ATP, ADP e di fosfato inorganico (Pi). Il ciclo inizia con il legame tra miosina ed actina nella conformazione "rigor". Il legame dell'ATP riduce l'affinità della miosina per l'actina, causando la separazione delle due proteine. La miosina quindi idrolizza L'ATP, e questo porta alla conformazione "cocked", fase di preparazione al cambio conformazionale per il "power stroke". La debole associazione del complesso miosina-ADP-Pi con l'actina porta in concomitanza al rilascio del Pi ad un aumento di affinità della miosina per l'actina. Questo è immediatamente seguito da un grande cambiamento conformazionale della miosina (power stroke), e simultaneamente al rilascio dell'ADP, il ritorno alla conformazione di partenza "rigor"(Fig.3). (Holmes KC and Geeves MA, 2000)

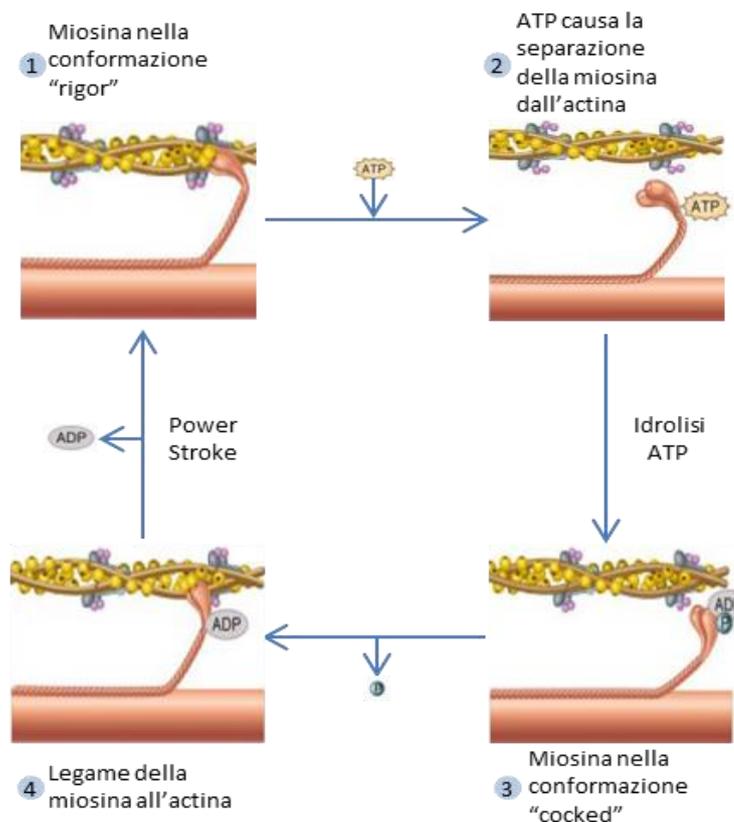


Fig. 3 Passaggi della contrazione muscolare

Questa serie di reazioni risulta nella generazione della forza richiesta per il movimento del filamento, causato dall'accorciamento del sarcomero, e quindi per la contrazione del muscolo.

### 1.2.2. E-C Coupling

La contrazione muscolare è controllata dalla concentrazione di calcio. Durante la contrazione muscolare, le funzioni del reticolo sarcoplasmatico (SR) sono quelle di regolatore dinamico del calcio, che garantisce un feedback automatico sul controllo dell'alterazione e del mantenimento dei livelli di calcio mioplasmatici dell'SR.

Le interazioni tra le regioni terminali dell'SR e la membrana tubulare trasversa, così come l'involucro delle miofibrille per tutta la lunghezza della sezione longitudinale dell'SR, sono i punti focali per il controllo del rilascio e dell'uptake del calcio durante la contrazione muscolare. Dato il suo ruolo centrale nel controllare il ciclo del calcio, il reticolo sarcoplasmatico (Fig.4) ha sviluppato un particolare e elaborato set di proteine regolatorie del calcio che permettono un rilascio quasi istantaneo di calcio durante l'eccitazione muscolare, un lento reuptake e un lungo stoccaggio del calcio rispettivamente durante il rilassamento e l'inattività del muscolo. Nello specifico, i processi di stoccaggio del calcio, il rilascio e reuptake sono bilanciati dall'azione concertata di tre grandi classi di proteine dell'SR che permettono di regolamentare il calcio: (1) proteine luminali leganti il calcio (calsequestrina, proteina legante il calcio istidina ricca di aminoacidi acidi, giuntina, e sarcalumenina) per lo stoccaggio di calcio; (2) canali di rilascio di calcio dall'SR (tipo 1 recettore della rianodina o RyR1 e recettori per l'inositolo-tri-fosfato o recettori IP<sub>3</sub>); e (3) pompe del reticolo Sarco (endo) plasmatico Ca<sup>2+</sup> - ATPasi (SERCA) per il reuptake del calcio.

La membrana dei tubuli T presenta dei canali per il Ca<sup>2+</sup> di tipo L sensibili al voltaggio, detti recettori per la diidropiridina (DHPRs), i quali sono collegati fisicamente ai canali per il rilascio del Ca<sup>2+</sup>, RyRs, localizzati nella membrana delle adiacenti cisterne terminali. Quando l'onda di depolarizzazione raggiunge i DHPR ne cambia la conformazione determinando l'apertura dei RyRs e il rilascio del calcio che avvia la contrazione.

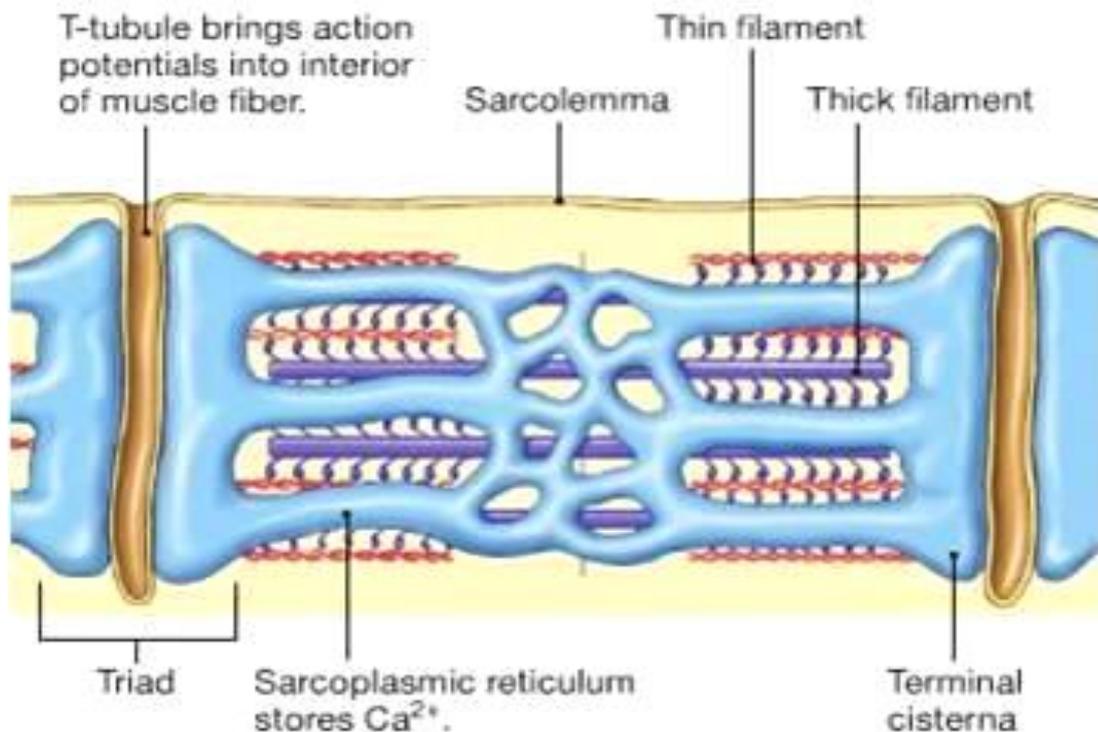


Fig. 4 Struttura del reticolo sarcoplasmatico

Quando una fibra muscolare scheletrica di un vertebrato è attivata da un impulso nervoso, il potenziale d'azione si estende dalla regione della giunzione neuromuscolare lungo tutta la fibra. Quest'ultimo quando arriva nella rete tubolare trasversale, induce il rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  dalle cisterne terminali dell' SR. Successivamente, il rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  attiva la forza di contrazione attraverso il legame con la troponina C. Tale reazione provocherà lo spostamento di un'altra proteina, la Tropomiosina che, rivestendo normalmente il filamento sottile di actina, ritirandosi andrà a favorire la formazione dei legami (Cross bridge) tra i recettori dello stesso filamento sottile (actina), e le teste del filamento più spesso (miosina). Il primo segnale relativo al processo di accoppiamento è una corrente verso l'esterno, che si presume provenire da un movimento di cariche intramembrana della membrana T-tubolare. È una corrente molto piccola che può essere misurata solo quando tutti i canali ionici sono bloccati e gli ioni più permeabili sono rimossi.

Il rilassamento muscolare invece si ha quando lo ione viene rimosso dal citoplasma ad opera della pompa SERCA, una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasi presente nella membrana dei tubuli longitudinali, che trasporta il  $\text{Ca}^{2+}$  all'interno del RS contro gradiente di concentrazione e da proteine del citoplasma come la parvalbumina.

Nel lume del RS l'accumulo del calcio a fine contrazione è facilitato dalla presenza di proteine capaci di legare lo ione con elevata capacità e bassa affinità. La proteina legante  $\text{Ca}^{2+}$  più

abbondante del RS è la calsequestrina (CASQ), una glicoproteina acida solubile localizzata nel RS giunzionale in prossimità del RyR, col quale interagisce per mezzo di due proteine transmembrana, la triadina (TrD) e la giuntina (JnC). In presenza di calcio la CASQ polimerizza in forme insolubili ad elevata capacità di legare il catione bivalente (~ 50 ioni  $\text{Ca}^{2+}$ / mole CASQ): in questo modo facilita l'accumulo dello ione evitando che ci sia un aumento di  $\text{Ca}^{2+}$  libero intraluminale tale da inibire l'azione della SERCA. Oltre a fungere da tampone per il calcio, la CASQ regola l'apertura e quindi l'attività del RyR in base ai livelli di calcio luminale: in presenza di alti valori di calcio luminale la CASQ si lega alla TrD contrastando l'azione inibitoria che questa esercita sul canale.

### 1.3. TIPI DI FIBRE

I muscoli scheletrici hanno l'abilità di ottimizzare la loro risposta in base al tipo di funzione richiesta attraverso il reclutamento selettivo di differenti popolazioni di fibre, le quali possono offrire un ampio intervallo di performances da quelle di corta durata e ad alto potere di contrazione a quelle di lunga durata ma con basso potere di contrazione. Da questo punto di vista, la plasticità muscolare, definita come modifica della composizione del muscolo rispetto al tipo di fibre, può essere vista come una risposta adattativa a cambiamenti prolungati dello stile di vita muscolo attraverso la modifica delle (i) le proprietà strutturali e funzionali delle singole fibre o (ii) o della proporzione delle diverse popolazioni di fibre all'interno di un muscolo o di un gruppo di muscoli.

La diversità nella risposta contrattile (rapide vs. lente) e nel metabolismo (aerobico vs. anaerobico) sono gli aspetti più prominenti dell'eterogeneità dei tipi di fibre muscolari. Sulle basi della capacità contrattile e del metabolismo possono essere identificate tre popolazioni di fibre:

- lente, fibre resistenti alla fatica con basso potere meccanico e un metabolismo aerobico molto attivo;
  - rapide facilmente soggette alla fatica con alto potere meccanico e un metabolismo prevalentemente glicolitico;
  - rapide intermedie sono fibre che combinano alto potere meccanico e resistenza alla fatica.
- Ognuno dei tipi di fibre appena descritti corrispondono ad uno specifico tipo di unità motoria, ognuno con un specifico pattern durante la scarica del motoneurone, che può essere identificata sia durante la stimolazione dell'unità motoria che durante la sua scarica.

I differenti tipi di fibre, non si differiscono solo per le proprietà contrattili e per le attività metaboliche, ma anche in base alla composizione dei componenti subcellulari, come ad esempio il sarcolemma, il reticolo sarcoplasmatico (SR), le giunzioni neuromuscolari (NMJ) ed i mitocondri.

La più accreditata classificazione dei tipi di fibra è basata sull'espressione delle isoforme della catena pesante della miosina (MyHC)(Fig.5). Nei muscoli striati di mammifero sono state identificate 11 isoforme delle catene pesanti della miosina, codificate da geni diversi appartenenti alla stessa famiglia (isogeni): alcune isoforme sono espresse in modo specifico in determinati muscoli (MyHCII<sub>m</sub>, MyHCII<sub>com</sub>, MyHCI<sub>ton</sub>, MyHCI<sub>α</sub>, MyHCI<sub>α</sub>, MyHC<sub>emb</sub>, MyHC<sub>neo</sub>), altre invece presentano una distribuzione tissutale più estesa (MHCII<sub>β</sub>, MHCII<sub>α</sub>, MyHCII<sub>d</sub>, MyHCII<sub>b</sub>). In ogni tipo di fibra, le isoforme di MyHC sono il fattore determinante della performance contrattile e rappresentano la proteina più abbondante (circa 50% dell'intero contenuto proteico). (Pette D and Staron RS, 2000)

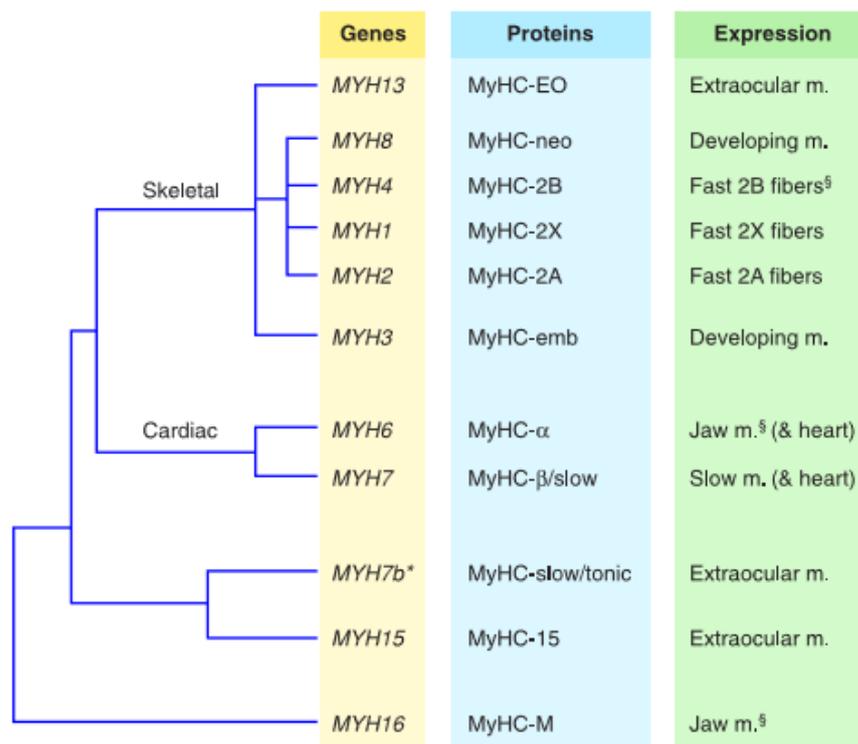


Fig. 5 Isoforme delle catene pesanti di miosina identificate in fibre extrafusali adulte di muscoli scheletrici di mammiferi.

Inoltre, le isoforme di MyHC possono essere facilmente identificate con anticorpi specifici o mediante elettroforesi su gel, fornendo così un modo affidabile e conveniente per classificare le

singole fibre muscolari. Anche se in molte fibre è espressa una sola isoforma di MyHC, in un numero significativo di fibre, spesso indicate come ibride o fibre miste, vengono coesprese due o più isoforme di MyHC (Stephenson GM, 2001). Ad esempio, le analisi tramite l'ibridazione in situ hanno mostrato che più del 30% delle fibre dell'extensor digitorum longus (EDL) di ratto contengono isoforme di tipo 1-2a o 2A-2X o 2X-2B (Denardi C, 1993). In alcuni muscoli, le fibre coesprimono diversi tipi di MHC rappresentano la maggioranza, come per esempio in muscoli extraoculari (McLoon LK, 2011; Zhou Y, 2010). In altri muscoli, le fibre ibride diventano particolarmente abbondanti quando avvengono le transizioni tra tipi di fibre (rapide to lente o lente to rapide). Ad esempio, la coesistenza di isoforme di miosine di tipo 1 e 2A è spesso rilevata nelle fibre dei muscoli scheletrici umani dopo allenamenti di resistenza (Klitgaard H, 1990).

Il fenotipo contrattile delle fibre dipende, oltre che dall'isoforma di MyHC presente nei filamenti spessi, anche dall'espressione qualitativa di altre proteine miofibrillari e reticolari. In particolare le caratteristiche funzionali delle fibre sono influenzate dall'estensione e dalle proprietà del reticolo sarcoplasmatico, il quale rappresenta il principale determinante delle cinetiche di contrazione e rilasciamento delle fibre dal momento che controlla sia il rilascio del calcio dalle cisterne terminali, sia il suo riassorbimento attraverso i tubuli longitudinali.

## RyR

Il RyR, insieme alla inositolo 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) recettore, formano una super famiglia di canali cationici intracellulari. Il RyR esiste da solo (nel muscolo scheletrico e cardiaco), o in combinazione con i recettori IP<sub>3</sub> nel reticolo endoplasmatico (ER) delle membrane dei muscoli lisci e delle cellule non muscolari compresi vasi sanguigni, neuroni e linfociti. Ci sono tre geni codificanti RyR nei mammiferi: RyR1 è espresso preferenzialmente nel muscolo scheletrico, RyR2 nel muscolo cardiaco e RyR3 nel muscolo liscio, e in misura limitata nel muscolo scheletrico, neuroni e in altri tipi di cellule, o da solo o associato a RyR1 e/o RyR2.

I canali del RyR hanno bassa attività basale a riposo e un'alta probabilità di essere attivati durante E-C coupling. L'attività basale determina la fuoriuscita di Ca<sup>2+</sup> dal SR a riposo e l'efficacia dell'attivazione RyR durante l'accoppiamento CE (Meissner, 1994). L'attività basale è determinata (a) dagli effetti integrati di molte proteine e ligandi che si legano al RyR e (b) dalla modifica covalente da reazioni redox e di fosforilazione.

## Casq

La calsequestrina è la principale proteina legante il  $\text{Ca}^{2+}$  all'interno del reticolo sarcoplasmatico delle fibre muscolari scheletriche. Queste proteine trattengono  $\text{Ca}^{2+}$  in quantità sufficiente a consentire contrazioni ripetitive che è essenziale per il mantenere il movimento, la respirazione e il battito cardiaco. La calsequestrina è strutturata come un polimero lineare nel lume cisterne terminali del SR e sembra essere ancorata alla membrana di fronte al gap giunzionale tra cisterne terminali e le invaginazione della membrana superficiale o trasversale (t-tubulo). La proteina non è incorporata direttamente nella membrana, ma è ancorata alla membrana attraverso proteine intra-membrana come ad esempio triadina, junctina e il recettore della rianodina. Per molti anni alla calsequestrina è stata associata una funzione di semplice buffer per il calcio a capacità elevata e bassa affinità. Questo ruolo era sufficientemente importante per giustificare le molte indagini che hanno rivelato la proprietà di legare il  $\text{Ca}^{2+}$  della proteina e la sua struttura ad alta risoluzione. Tuttavia, un ruolo molto più complesso per calsequestrina è emerso negli ultimi dieci anni, è diventato evidente che la proteina gioca anche un ruolo importante nel regolare l'attività del canale di rilascio del  $\text{Ca}^{2+}$ . Questa regolazione coordina il tasso di rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  dal SR aumentando o diminuendo la capacità di trattenere il  $\text{Ca}^{2+}$ , e quindi di ottimizzare il rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  conservando il  $\text{Ca}^{2+}$  all'interno del compartimento. (Schiaffino S and Reggiani C, 2011; Rossi P, 2006)

Nei muscoli scheletrici la calsequestrina esiste in due isoforme, CASQ1 e CASQ2. Le fibre rapide, caratterizzate da un più elevato contenuto della proteina luminale, esprimono solo la CASQ1, mentre le fibre lente esprimono entrambe le isoforme. La grande abbondanza di CASQ nelle fibre rapide permette di immagazzinare nel RS elevate quantità di calcio mantenendone bassa la concentrazione, cosicché non appena si ha un aumento dei livelli citosolici di calcio questo viene rapidamente risequestrato all'interno del reticolo. Al contrario, nelle fibre lente il RS in condizioni di riposo è saturo di calcio, per cui nella fase di accumulo l'elevata concentrazione luminale dello ione ne rallenta il riassorbimento attraverso l'inibizione della pompa.

## Serca

La sarco / endoplasmatico  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasi (SERCA) appartiene ad una famiglia di pompe ioniche di tipo P. La famiglia crescente di isoforme SERCA è codificata da 3 ATP2A1-3 geni localizzati su 3 diversi cromosomi, codificanti per le isoforme SERCA1, SERCA2 e SERCA3 rispettivamente; la diversità è ulteriormente generata dallo splicing alternativo. (Periasamy M, 2007; Dally S, 2010)

Nel muscolo scheletrico dell'adulto predominano le isoforme SERCA1a e SERCA2a, differentemente espresse nei diversi tipi di fibre: la SERCA1a prevale nelle fibre rapide, mentre la SERCA2a nelle fibre lente. Nelle fibre rapide il calcio viene pompato nel RS più rapidamente che nelle fibre lente, per cui le fibre rapide hanno scosse più rapide, che durano solo 7,5 ms, a differenza delle fibre lente le cui contrazioni possono durare anche dieci volte di più. La maggiore velocità di recupero del calcio riscontrata nelle fibre rapide è dovuta alla maggiore velocità di idrolisi dell'ATP della SERCA1 rispetto alla SERCA2, ma anche alla presenza di un RS più sviluppato e caratterizzato da una maggiore densità di pompe per il calcio rispetto alle fibre lente.

La Sarco / reticolo endoplasmatico  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasi (SERCA) è l'unico trasportatore di  $\text{Ca}^{2+}$  attivo nell'SR, la regolazione della sua funzione è un meccanismo chiave dell'omeostasi del  $\text{Ca}^{2+}$  e dipende dal tipo di cellula e dal suo stato di differenziazione. Inoltre, nelle cellule muscolari, SERCA svolge un duplice ruolo: controlla la riserva di  $\text{Ca}^{2+}$  dell'SR che può essere mobilitato durante la contrazione muscolare, e diminuisce la concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  citosolico per consentire il rilassamento muscolare.

L'affinità per il calcio della SERCA è ridotto di due proteine intrinseche di membrana espresse nel reticolo sarco(endoplasmatico: il fosfolambano (PLN) e la Sarcolipina (SLN) (MacLennan DH, 2003). SLN e PLN sembrano legarsi allo stesso sito che regola la SERCA, però in un complesso ternario, PLN occupa il sito di regolamentazione e di SLN si lega al lato esposto di PLN e alla SERCA. Sia SLN e PLN abbassano l'affinità apparente per il calcio sia di SERCA1a e SERCA2a.

Da analisi di Western blotting condotte su singole fibre umane di vastus lateralis al fine di caratterizzare il pattern di espressione delle due proteine in relazione alle isoforme di MHC e di SERCA, è emerso che il PLN è presente in tutti i tipi di fibre mentre la SLN è espressa solo nelle fibre positive per la SERCA1a, incluse quelle aventi entrambe le isoforme della pompa. (Fajardo et al.,2013)

Muscoli lenti e rapide differiscono nel relativo ruolo della glicolisi e fosforilazione ossidativa. I muscoli lenti sono in grado di generare tutti gli ATP di cui hanno bisogno dai processi ossidativi mitocondriali; in realtà, il loro consumo di ATP durante la contrazione non è così alto, e questo contribuisce alla loro capacità di mantenere l'attività contrattile per lungo tempo senza mostrare stanchezza. I muscoli rapide si basano sul processo glicolitico per generare molto rapidamente ATP, e questo pone un limite alla durata della loro attività contrattile. La diversità nelle proprietà metaboliche, inizialmente osservate tra muscoli rossi e bianchi, è stata estesa a livello fibra dallo sviluppo dell'istochimica.

### 1.3.1. Transizioni tra tipi di fibra

I muscoli scheletrici hanno una notevole capacità di subire cambiamenti adattativi in risposta all'uso e al disuso, compresi i cambiamenti in base alla dimensione delle fibre (ad esempio, ipertrofia muscolare) e al tipo di fibre (ad esempio, transizioni da fibre rapide a lente), e cambiamenti correlati alla forza muscolare e alla resistenza alla fatica (Pette D, 1997). Il ruolo dell'esercizio nel rimodellamento delle proprietà dei tipi di fibre è un tema centrale della fisiologia generale e delle scienze dello sport ed è emerso come un tema caldo nel campo delle malattie metaboliche e diabete. Diversi fattori, in particolare l'attività del nervo, il carico meccanico, e fattori circolanti, tra cui diversi ormoni, sono noti per influenzare la composizione dei tipi di fibre in un muscolo.

Nei muscoli degli arti e del tronco di mammifero, la transizione del tipo di fibra o il passaggio di espressione da una forma di isoforma di miosina ad un altro, avviene in modo ben ordinato secondo la regola del "vicino più prossimo"  $1 \leftrightarrow 2A \leftrightarrow 2X \leftrightarrow 2B$  (Ausoni S, 1990; Termin A, 1989) (Fig. 4). Come accennato in precedenza, anche i parametri funzionali come tasso ATPasi o velocità massima accorciamento cambiano seguendo fasi progressive dal più lento (1 o lente) a rapide 2A, a rapide 2X e alla più veloce isoforma rapide 2B. Una transizione lente-to-rapide segue la direzione  $1 \rightarrow 2A \rightarrow 2X \rightarrow 2B$  e può essere indotta da stimolazione elettrica ad alta frequenza fasica, ri assemblando il firing pattern dei motoneuroni rapide, attraverso lo scarico muscolare causato da sospensione degli arti posteriori, disuso, microgravità e da condizioni patologiche come l'ipertiroidismo. Una transizione rapide-to-lente procede nella direzione opposta  $2B \rightarrow 2X \rightarrow 2A \rightarrow 1$ , e può essere indotta da una stimolazione elettrica cronica a bassa frequenza, ri assemblando il firing pattern dei motoneuroni lente, attraverso il sovraccarico muscolare, l'allenamento muscolare, e da condizioni patologiche come l'ipotiroidismo. Quando gli stessi fattori operano su diversi muscoli in una data specie animale, i cambiamenti reali che si verificano in un dato muscolo sono dettati da (i) la composizione delle fibre dei muscoli e (ii) l'esistenza di differenze intrinseche tra i muscoli che limitano la gamma dei possibili adattamenti. Questo può portare anche a cambiamenti in direzioni opposte della stessa MyHC / fibra tipo in diversi muscoli in risposta alla stessa condizione.

Oltre alla composizione iniziale del tipo di fibre in un muscolo, fattori intrinseci possono limitare la transizione da un tipo di fibre ad un altro e determinare una sorta di "range adattativo" per ciascun muscolo. Per esempio, muscolo rapide è più facile che transisca nella direzione  $2B \leftrightarrow 2X \leftrightarrow 2A$  mentre un muscolo lente nella direzione  $1 \leftrightarrow 2A \leftrightarrow 2X$  (Ausoni S, 1990). Il concetto di un limitato "range adaptive" contempla tre fattori: (i) la differenza di specie, ad esempio, la stimolazione cronica a bassa frequenza è più efficace nell'indurre l'espressione

miosina lente nei muscoli rapide del coniglio rispetto a quelli dei piccoli roditori come il ratto o topo (Pette D, 1992 ), (ii) il tempo necessario per la risposta adattativa e (iii) gli effetti dati dalla sommatoria di due o più stimoli che possono indurre transizioni tra tipi di fibre. Ad esempio, l'effetto combinato di ipertiroidismo e scarico meccanico (entrambi provocano una transizione delle fibre da lente rapide) può indurre una overespressione di MyHC-2B nei muscoli lente (Caiozzo VJ, 1998).

#### 1.4. ALLENAMENTO

Negli esseri umani, come negli animali, l'allenamento è una pratica volta a migliorare le prestazioni fisiche. L'obiettivo dei programmi di allenamento fisico è quello di sviluppare specifiche abilità o muscoli e migliorare le prestazioni complessive durante esercizi di durata e intensità variabile. In base agli obiettivi, i protocolli di allenamento possono essere suddivisi in due tipi principali: (a) allenamento di resistenza, mirato ad aumentare la resistenza alla fatica e (b) l'allenamento di forza, finalizzati a migliorare la forza e la potenza esplosiva.

L'allenamento di resistenza ha lo scopo di ritardare la stanchezza e prolungare la durata dell'allenamento. I protocolli sono generalmente basati su alti livelli di attività e di moderata intensità, permettendo in questo modo di ottenere alti livelli di attività per il metabolismo aerobico. L'allenamento di resistenza stimola la biogenesi mitocondriale che è mediato sia dall'attivazione che da un aumento della espressione di un co-attivatore della trascrizione, PGC1 $\alpha$ . Inoltre migliora la circolazione e l'apporto di ossigeno. Studi effettuati su atleti che effettuano allenamenti di resistenza mostrano un pattern delle fibre muscolari più portato verso le fibre di tipo 1 (lente) e di tipo 2B (rapide ossidative).

L'allenamento di forza, come detto in precedenza, ha lo scopo di aumentare la forza e la potenza esplosiva o, in alcuni casi , è solo finalizzato a sviluppare la massa muscolare (body building). I protocolli sono basati sul sollevamento del carico, utilizzando pesi liberi e macchine di peso fisso. In questo caso vengono utilizzati protocolli di allenamento volti ad ottenere la massima resistenza con il minor numero di ripetizioni. Questo tipo di allenamento ipertrofizza le fibre di tipo 2 determinando un incremento della massa del muscolo il quale acquisisce la capacità di generare maggiore forza durante la contrazione. La sintesi di proteine miofibrillari, inclusa la miosina, è potenziata: tra le isoforme della miosina avviene un calo significativo di espressione del tipo misto 2X e un aumento del tipo glicolitico 2A. (Blaauw B, 2013)

#### 1.4.1. Vie di segnalazione cellulare implicate nell'allenamento

Se gli adattamenti fisiologici indotti dai diversi tipi di allenamento sono stati ampiamente caratterizzati, gli eventi molecolari ad essi sottesi invece non sono ancora del tutto chiari (Nader GA,2005). Le due principali vie di segnalazione indotte dall'allenamento e coinvolte nella regolazione del trofismo e del fenotipo muscolare sono rappresentate dalle vie trascrizionali dell'IGF-1 e dalle vie  $Ca^{2+}$ -dipendenti.

Come descritto in precedenza durante un allenamento di forza si verifica nel muscolo una ipertrofia delle fibre aventi un metabolismo di tipo glicolitico e di conseguenza una isoforma di miosina di tipo 2A.

Questo processo nel muscolo scheletrico adulto è associato all'aumento dell'espressione di IGF-1 (insulin-like growth factor 1) ad opera del fegato o dei condroblasti. Il legame di IGF-1 col suo recettore attiva diverse chinasi intracellulari, incluso PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase). Quest'ultima fosforila le membrane fosfolipidiche creando un sito di legame lipidico per Akt sulla membrana della cellula.

La proteina citoplasmatica Akt, o PKB-protein kinase B, è una serina-treonina chinasi una volta traslocata sulla membrana della cellula facilita la sua stessa fosforilazione e attivazione da parte della chinasi PDK-1 (Fig. 6). Uno dei bersagli di Akt è mTOR (Mammalian Target of Rapamycin), una serina-treonina chinasi che, una volta attivata, promuove la sintesi di nuove proteine attraverso due distinte vie: l'attivazione di p70S6K e l'inibizione di 4E-BP1 (detto anche PHAS-1), rispettivamente un regolatore positivo e un regolatore negativo della sintesi proteica. L'AKT fosforila anche GSK3- $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3- $\beta$ ), inibendo la sua attività di blocco del fattore di iniziazione della traduzione eIF-2B (eukaryotic initiation factor 2B), con conseguente stimolazione della sintesi proteica attraverso una via indipendente dalla quella mediata da mTOR.

Se da un lato l'attivazione di AKT stimola la sintesi delle proteine, dall'altro è in grado di inibirne la degradazione mediante l'inattivazione dei FOXOs. I FOXOs sono una famiglia di fattori di trascrizione che controllano l'espressione di diversi geni coinvolti nella progressione dell'atrofia muscolare ("atrofici"), tra cui l'atrofina-1 o MAFbx (*Muscle Atrophy F box*) e il MuRF-1 (*Muscle Ring Finger-1*) che codificano per due ubiquitina ligasi E3 muscolo-specifiche.(Lecker SH, 2004). Nella forma attiva defosforilata i FOXOs si trovano nel nucleo, legati alle sequenze regolatrici dei loro geni target, quando invece vengono fosforilati dall'AKT traslocano nel citoplasma perdendo le loro funzioni trascrizionali.

A fronte di quanto riportato in letteratura (Nader GA,2005), la definizione di AKT quale “coordinatore” dei processi di sintesi e di degradazione proteica sembra essere del tutto appropriata, dal momento che la sua attivazione o inattivazione, successiva all’integrazione di una serie di segnali anabolici e catabolici, rappresenta uno degli eventi determinanti che portano alla crescita o alla perdita di massa muscolare.

La sintesi proteica è regolata a più livelli: non solo PI3K e AKT ma anche mTOR e i suoi target sono in grado di integrare una varietà di segnali provenienti dall’esterno e dall’interno della cellula, da semplici stimoli nutrizionali quale l’apporto di amminoacidi in grado di attivare direttamente mTOR, segnali ormonali (insulina, IGF-1, androgeni, ormoni tiroidei GH), segnali legati allo stato energetico, stress ambientali (ipossia), e secondi messaggeri (IP<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup>).

L’incremento della massa muscolare è dovuto, seppur in misura minore rispetto all’ipertrofia, anche all’iperplasia, ossia alla generazione di nuove fibre muscolari. Nel muscolo scheletrico adulto, il processo di miogenesi avviene a partire dalla popolazione di *cellule satelliti* residenti nel tessuto (Corbel SY, 2003). Le cellule satelliti sono cellule mononucleate multipotenti che, normalmente quiescenti, si attivano e danno origine a nuovi mioblasti in risposta a condizioni di stress (traumi muscolari), giocando quindi un ruolo importante nei processi di rigenerazione muscolare. Dal momento che il danno delle miofibre rappresenta lo stimolo più importante in grado di attivare i processi riparativi, alcuni autori (Goldspink G, 2005) suggeriscono che l’attivazione delle cellule satelliti riscontrata con alcuni tipi di allenamento fisico possa essere una conseguenza delle deformazioni e delle microlesioni muscolari indotte dallo stimolo meccanico applicato.

Inoltre, poiché nelle fibre muscolari il rapporto nuclei/citoplasma è costante, l’aumento delle dimensioni cellulari che si verifica nell’ipertrofia è accompagnato da un aumento del numero di nuclei, necessari per la sintesi proteica. Ciò lascia supporre che anche l’ipertrofia richieda l’attivazione delle cellule satelliti le quali proliferano, differenziano e si fondono alle fibre pre-esistenti generando nuovi nuclei (Hawke TJ e Garry DJ, 2001).

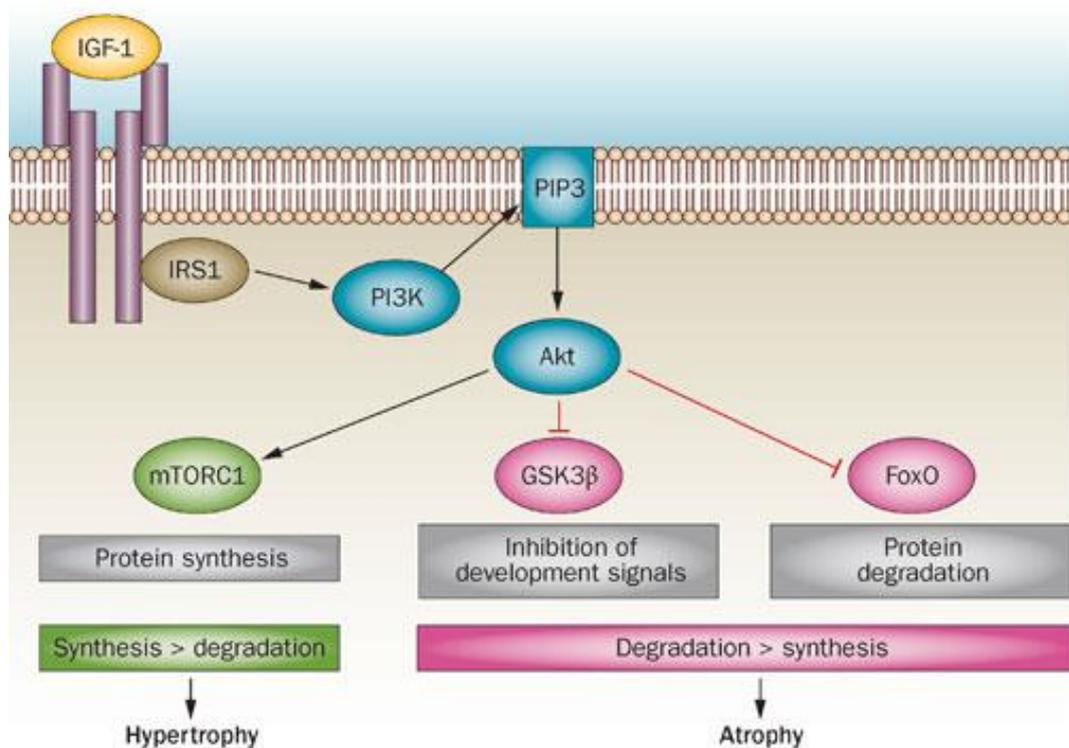


Fig. 6 AKT si colloca al centro di una rete di segnali in cui la sua attivazione regola positivamente la sintesi proteica e la sua inattivazione consente l'espressione, indotta dai FOXOs di geni associati all'atrofia (atrofici). La stimolazione del muscolo scheletrico con agenti anabolici come l'IGF-1 determina l'attivazione dell'AKT che promuove la sintesi proteica mediante l'attivazione di mTOR e S6K1 e l'inattivazione di proteine repressorie della sintesi come GSK3- $\beta$ . Al contrario stimoli catabolici, come i glucocorticoidi, inattivano l'AKT con conseguente defosforilazione e traslocazione nucleare dei FOXOs che promuovono la trascrizione degli atrofici.

#### 1.4.2. Vie di trasduzione del segnale Calcio/CaM -dipendenti

Nel muscolo scheletrico l'aumento transitorio del calcio citosolico indotto dall'esercizio fisico, oltre a dare avvio all'attività contrattile, rappresenta un importante segnale intracellulare per la plasticità muscolare, in grado di attivare specifici programmi trascrizionali che promuovono la crescita muscolare, la biogenesi mitocondriale e lo switching fra tipi di fibre. Le vie di trasduzione del segnale e, a valle di queste, i fattori di trascrizione attivati dal calcio e coinvolti nella regolazione genica del fenotipo muscolare, sono stati solo parzialmente identificati. Dal momento che la fosforilazione è un modo rapido, conveniente e reversibile per modulare la funzione delle proteine (Cohen P, 2000), probabilmente uno dei più importanti meccanismi di trasduzione del segnale del calcio è rappresentato dalle vie di segnalazione delle fosfatasi (calcineurina) e delle chinasi calcio-calmodulina dipendenti (CaMKs).

La calmodulina (CaM) è una proteina legante calcio presente in tutte le cellule eucariotiche e coinvolta in diversi processi di segnalazione intracellulare  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendenti. La sua struttura tridimensionale, dalla caratteristica forma a manubrio, è costituita da due domini globulari collegati da un connettore centrale flessibile che consente alla calmodulina di avvolgersi attorno alle proteine bersaglio (Means AR, 2000). Ciascuna delle due porzioni terminali possiede due siti di legame ad alta affinità per il  $\text{Ca}^{2+}$ , formati dallo stesso motivo strutturale elica-ripiegamento-elica, detto “EF hand”, caratteristico di molte proteine leganti calcio (Kretsinger RH, 1987). Quando il  $\text{Ca}^{2+}$  è legato a tutti e quattro i siti, la calmodulina va incontro a un cambiamento conformazionale che la rende adatta ad interagire con i suoi substrati target di cui regola allostericamente l’attività (Figura 7).

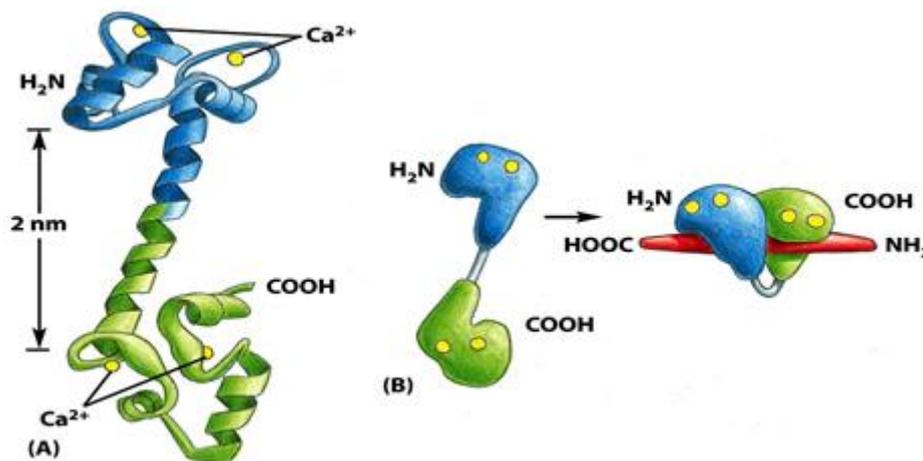


Fig. 7 Rappresentazione della struttura (A) e del meccanismo di attivazione (B) della calmodulina. (Tratta da Molecular Biology of the Cell 5/e, Garland Science 2008).

#### 1.4.3. Proteine chinasi $\text{Ca}^{2+}$ calmodulina dipendenti

Le proteine chinasi  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina dipendenti (CaMKs) sono delle serina/treonina chinasi in grado di influenzare l’espressione genica cellulare mediando gli effetti del complesso  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina. Le CaMKs vengono classicamente distinte in due gruppi: quelle unifunzionali, che fosforilano un unico substrato (CaMKIII), e quelle multifunzionali, capaci di fosforilare diversi substrati (CaMKI, CaMKII e CaMKIV). I due tipi sono entrambi espressi nel muscolo scheletrico dove regolano diverse funzioni fisiologiche calcio-dipendenti ma, in particolare, le multifunzionali CaMKII e CaMKIV sembrano giocare un ruolo importante nella plasticità muscolare (Fluck M, 2000). Studi recenti su uomo (Rose AJ, 2007b) e su modelli di ratto (Rose

AJ, 2007) hanno dimostrato che l'espressione e l'attività della CaMKII aumenta rapidamente durante l'allenamento fisico.

Da un punto di vista strutturale, la CaMKII è un complesso omo- o etero-multimerico costituito da 12 subunità assemblate in due anelli esamerici coplanari. Ciascuna subunità è un polipeptide di circa 50-60 kDa contenente un dominio catalitico N-terminale, un dominio regolatorio centrale e un dominio di associazione C-terminale responsabile della multimerizzazione dell'enzima. Esistono quattro isoforme di subunità di CaMKII ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\lambda$ ), codificate da quattro geni distinti, e ciascuna isoforma presenta a sua volta delle varianti di *splicing*. Mentre il dominio catalitico e il dominio regolatorio sono altamente conservati tra i tipi di subunità, il dominio di associazione rappresenta la regione di maggiore variabilità, responsabile della differente espressione tessuto-specifica e della diversa localizzazione subcellulare delle varie isoforme di CaMKII.

L'attività enzimatica della chinasi dipende dai livelli intracellulari di calcio e di  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (Figura 8). In assenza di calcio, una sequenza autoinibitoria contenuta nel dominio regolatorio impedisce stericamente l'accesso del substrato e dell'ATP al sito catalitico della chinasi la quale pertanto risulta inattiva. Il legame del complesso  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina su una regione presente nel dominio regolatorio rimuove l'autoinibizione dal dominio catalitico attivando allostericamente l'enzima (Hook SS and Means AR, 2001). Lo step successivo nell'attivazione completa della CaMKII prevede una reazione intersubunità di autofosforilazione in cui ciascuna subunità fosforila la subunità adiacente. Ogni subunità possiede infatti un sito catalitico ad attività chinasi, rappresentato dal dominio N-terminale, e un sito di fosforilazione, rappresentato dal residuo di treonina 286 (nell'isoforma  $\alpha$ , o da Thr<sup>287</sup> nell'isoforma  $\beta$ ) localizzato nel dominio regolatorio centrale. Quando il complesso  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM si lega alla chinasi determina un cambiamento conformazionale che, oltre ad allontanare la regione autoinibitoria dal dominio catalitico, determina anche l'esposizione della Thr<sup>286</sup> che viene resa accessibile alla fosforilazione. Quindi, affinché la reazione di autofosforilazione abbia inizio, sono necessarie due molecole di  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM: una per attivare la subunità che funge da chinasi e l'altra per esporre la Thr<sup>286</sup> della subunità adiacente che funge da substrato. L'autofosforilazione ha due importanti conseguenze: 1) l'affinità dell'enzima per la CaM aumenta grazie a un processo di *CaM trapping* in cui la CaM rimane intrappolata e tarda a dissociarsi; 2) l'enzima acquista un'attività indipendente dal complesso  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM (attività autonoma) (Miller SG e Kennedy MB, 1986). Questi due eventi rendono la CaMKII capace di rimanere attiva anche quando le concentrazioni citosoliche di calcio tornano ai livelli basali, e quindi di continuare a fosforilare i propri substrati indipendentemente dalle oscillazioni intracellulari dello ione. Tale

attività Ca-indipendente perdura finché non interviene qualche fosfatasi a rimuovere il gruppo fosfato dal residuo di treonina e a far tornare l'enzima nella sua forma inattiva.

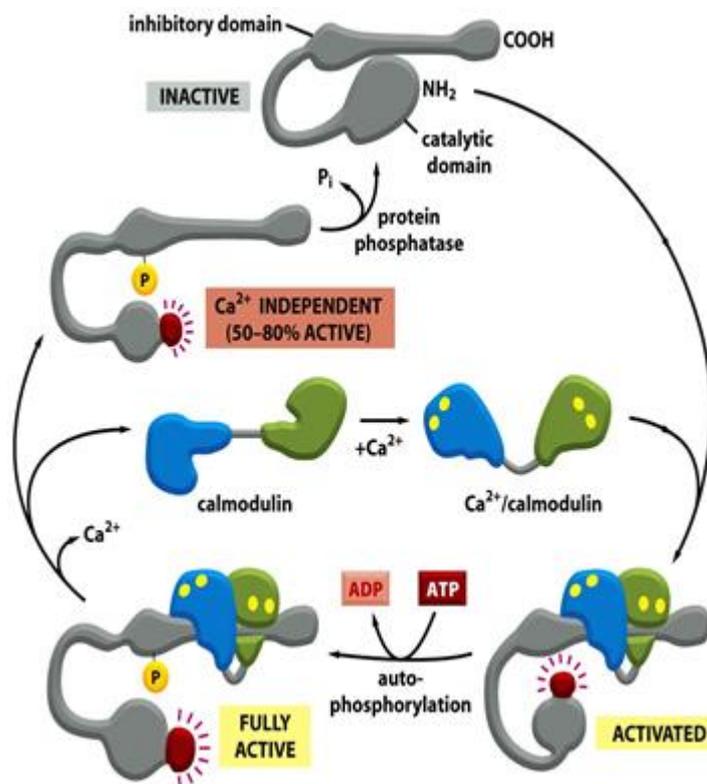


Fig. 8 Rappresentazione schematica del meccanismo di attivazione di CaMKII. Per semplificazione è qui rappresentato il meccanismo di attivazione di una singola subunità del complesso multimerico: nello stato inattivo il dominio catalitico è stericamente inibito dalla regione auto inibitoria; il legame del complesso  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  induce un cambiamento conformazionale che rimuove l'inibizione attivando l'enzima; l'autofosforilazione completa l'attivazione della chinasi; la chinasi fosforilata rimane attiva anche in assenza di  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (forma autonoma); l'enzima torna nello stato inattivo quando viene defosforilato da una fosfatasi. (Tratta da Molecular Biology of the Cell 5/e, Garland Science 2008).

L'importanza della CaMKII nei processi di rimodellamento muscolare è dovuta alla sua capacità di regolare l'espressione genica delle miofibre attraverso l'attivazione di alcuni fattori di trascrizione.

Uno dei più importanti bersagli della CaMKII è rappresentato dal fattore di trascrizione miogenico nucleare SRF (*Serum Response Factor*) (Fluck M, 2000) il quale nella forma fosforilata si lega al DNA attivando la trascrizione di geni, come il PGC-1 $\alpha$  (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1 alpha*), importanti per la crescita e il metabolismo energetico delle miofibre. Studi su uomo (Rose AJ, 2007b) hanno dimostrato che un allenamento di resistenza aumenta la fosforilazione di SRF del 60%, suggerendo che gli adattamenti metabolici (aumento della capacità ossidativa delle fibre muscolari) indotti da

questo tipo di allenamento possano derivare da un aumento della biogenesi mitocondriale e da un *up-regulation* di enzimi ossidativi conseguenti all'attivazione della via CaMKII-SRF. La CaMKII è in grado di controllare anche l'attività trascrizionale di MEF2 (*Myocyte Enhancer Factor2*), una famiglia di fattori di trascrizione altamente espressi nel muscolo scheletrico di cui regolano la differenziazione, la crescita e l'ipertrofia (Naya FJ & Olson E, 1999). In condizioni basali, l'attività di MEF2 è bloccata da HDAC4 (istone deacetilasi di tipo IV) il quale forma col fattore di trascrizione un complesso che ne impedisce il legame alle sequenze promotrici. In risposta a un aumento del calcio citosolico, la CaMKII fosforila HDAC4 determinandone la dissociazione da MEF2 che legandosi al DNA attiva la trascrizione di geni target associati all'ipertrofia e ai cambiamenti verso un fenotipo lento delle fibre muscolari. Recentemente (Sacchetto et al., 2007) è stato dimostrato che la rimozione dell'effetto inibitorio di HDAC4 è mediato anche dall'inattivazione, per fosforilazione, da parte della CaMKII, di GSK3 $\beta$  (glicogeno sintasi chinasi 3).

Oltre alla funzione di regolazione dell'espressione genica, la CaMKII è coinvolta anche in altri processi cellulari che si suppone vengano modulati dall'esercizio fisico, contribuendo al miglioramento delle prestazioni muscolari. Ad esempio nel ratto è stato osservato un miglioramento dell'omeostasi del calcio nei muscoli allenati (Inashima S, 2003), probabilmente dovuto a un aumento dell'attività della SERCA conseguente a una maggiore fosforilazione del PLN, noto substrato della CaMKII.

#### 1.4.4. Il sistema Calcineurina-NFAT

La calcineurina (Cn) è una proteina eterodimerica costituita da una subunità catalitica (calcineurina A) e una subunità regolatoria (calcineurina B) legante calcio. La subunità A è composta da un dominio N-terminale catalitico ad attività fosfatasi e un dominio C-terminale regolatorio contenente a sua volta tre domini: il dominio di legame per la calcineurina B, il dominio di legame per la calmodulina e il dominio di autoinibizione. La calcineurina è una serina/treonina fosfatasi Ca<sup>2+</sup>/calmodulina-dipendente: in assenza di calcio, la regione autoinibitoria inibisce stericamente il sito catalitico dell'enzima che risulta inattivo; il legame della Ca<sup>2+</sup>/CaM induce un cambiamento conformazionale che determina la rimozione del dominio autoinibitorio dal sito catalitico e l'attivazione di questo.

La calcineurina è espressa in numerosi tessuti dove è coinvolta nella regolazione di diversi processi biologici. Nel muscolo scheletrico ha un ruolo importante nei meccanismi di *signaling* implicati nella regolazione genica dei processi di ipertrofia muscolare e di *switching* tra tipi di

fibre indotti dall'esercizio fisico. La via di trasduzione del segnale di Cn maggiormente studiata è rappresentata dal sistema calcineurina-NFAT (Fig. 9).

NFAT (fattore nucleare che attiva i linfociti T) è il nome di una famiglia di fattori di trascrizione inizialmente descritti nei linfociti T. Dei cinque membri appartenenti alla famiglia, quattro (NFATc1-c4) sono regolati dai livelli citoplasmatici di calcio (Rao A, 1997). Nel muscolo a riposo, quando il calcio citosolico è ai livelli basali, le proteine NFAT sono localizzate nel citoplasma, nella forma inattiva fosforilata. Un incremento del calcio intracellulare, indotto dall'esercizio fisico, attiva la calcineurina la quale defosforila rapidamente residui multipli di serina e treonina presenti nell'N-terminale di NFAT. Il conseguente cambiamento conformazionale a cui il fattore di trascrizione va incontro porta all'esposizione di una sequenza di localizzazione nucleare (NLS) che gli consente di legarsi ad un'importina e di migrare nel nucleo. A livello nucleare, in presenza di cofattori trascrizionali come MEF2 (*Myocyte Enhancer factor 2*) e GATA4 e 2 derivati dall'attivazione di altre cascate di segnale, NFAT si lega al DNA promuovendo la trascrizione di specifici geni.

Numerosi studi riconoscono ai fattori di trascrizione della famiglia NFAT il ruolo di sensori dell'attività nervosa che, a livello delle fibre muscolari, convertono i diversi pattern di attività elettrica in specifici programmi di espressione genica. Essi sono quindi coinvolti nella specificazione del tipo di fibra e nei cambiamenti fenotipici indotti dalle variazioni dell'attività neuromuscolare. La sensibilità all'attività nervosa varia tra i 4 membri della famiglia NFAT che quindi rispondono diversamente ai differenti tipi di attività elettrica: la stimolazione dell'EDL di ratto con un treno di impulsi di 20Hz, che mima l'attività dei motoneuroni lente, determina la traslocazione nucleare di tutte e quattro le isoforme; al contrario un'attività elettrica ad alta frequenza (100Hz), simile a quella dei motoneuroni rapide, induce la migrazione nel nucleo delle sole isoforme c2, c3 e c4 mentre NFATc1 rimane localizzato nel citoplasma. (Calabria E, 2009) Queste osservazioni suggeriscono che NFATc2, c3 e c4 sono attivi anche nei muscoli rapide dove probabilmente contribuiscono alla trascrizione dei geni rapide, ma comunque tutte le isoforme, e in particolare NFATc1, sono implicate nell'attivazione di un programma trascrizionale di tipo lento. L'attività trascrizionale di NFATs è dunque maggiore nelle fibre lente dove la stimolazione a bassa frequenza e pressoché continua dei motoneuroni lente assicura in media una maggiore presenza, seppur moderata (senza picchi elevati), di calcio intracellulare, importante per l'attivazione della via Cn-NFAT. Il ruolo della calcineurina e del suo bersaglio NFAT nel determinare la trasformazione del tipo di fibre da rapide a lente è stato dimostrato da diversi studi. Ad esempio, i muscoli rapide di topi transgenici sovraespressanti la Cn presentano un contenuto di fibre lente maggiore rispetto al normale (Naya FJ, 2000) mentre, di contro, topi knock-out per la Cn mostrano una drastica riduzione del numero di fibre lente sia

nei muscoli lenti che nei muscoli rapide (Parsons SA, 2003). Simili osservazioni sono state fatte anche in esperimenti in cui l'attività della Cn è stata inibita con ciclosporina A (Chin ER, 1998), FK506 (Serrano AL, 2001), VIVIT (McCullagh KJ, 2004): l'inibizione della fosfatasi e dell'interazione col suo bersaglio determina una transizione delle miofibre verso un fenotipo veloce, con una marcata diminuzione dell'espressione di enzimi ossidativi e dell'isoforma lente della catena pesante della miosina (MyHC1) a favore di una maggior espressione di MyHC 2X e 2B.

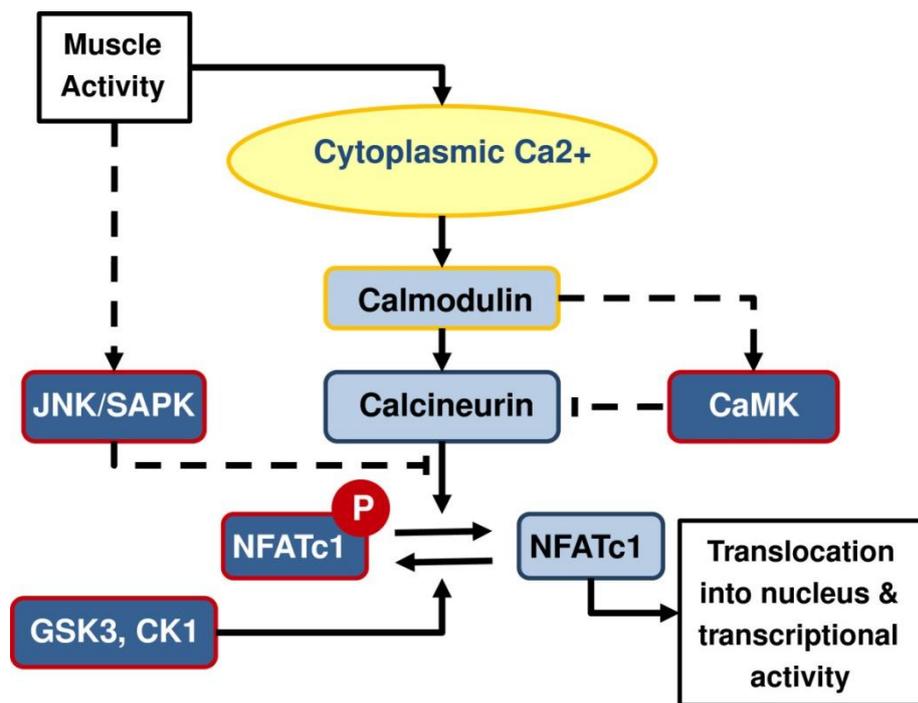


Fig.9 Rappresentazione schematica della via di segnalazione della calcineurina. L'esercizio e l'attività neuromuscolare induce un incremento di calcio citosolico per influsso dallo spazio extracellulare attraverso i canali di tipo L per il  $Ca^{2+}$  e per efflusso dal RS attraverso il sistema dei TT-DHPR-RyR. Il legame del Ca-CaM alla subunità A della calcineurina attiva la fosfatasi che defosforila una regione ricca di serine (SRR) di NFAT inducendone la migrazione dal citoplasma al nucleo. Nel nucleo NFAT, in cooperazione con altri fattori di trascrizione tra cui MEF2, attiva un programma di espressione genica caratterizzato da un aumento della biogenesi mitocondriale e un up-regulation di enzimi ossidativi e proteine contrattili lente. La Cn sembrerebbe indurre l'ipertrofia muscolare anche attraverso un meccanismo di regolazione negativa, inibendo l'espressione della miostatina.

Gli effetti trascrizionali della Cn non sono mediati soltanto dal fattore di trascrizione NFAT ma altre vie di trasduzione del segnale attivate dalla Cn e indipendenti da NFAT sono implicate nella risposta ipertrofica e nell'espressione del programma lento indotto dalla fosfatasi. Il controllo dell'espressione genica da parte della Cn sarebbe mediato da vie di segnalazione distinte che portano da un lato alla regolazione positiva di geni lenti e ipertrofici e dall'altro alla regolazione negativa di atrogeni e geni rapide (Gundersen K, 2011). Studi recenti (Muthuri SK,

2007) hanno riconosciuto nella miostatina un possibile effettore negativo a valle della via CaM-calcineurina. La miostatina è un membro della famiglia dei fattori di crescita trasformanti  $\beta$  (TGF $\beta$ ) che regola negativamente la crescita muscolare inducendo da un lato l'*up-regulation* di atrogeni e dall'altro la *down-regulation* di fattori di regolazione miogenica come MyoD e miogenina. Muscoli di topi transgenici esprimenti elevati livelli della forma attiva o inattiva della calcineurina mostrano livelli di mRNA di miostatina rispettivamente più bassi e più alti. Ciò ha suggerito che la Cn attivata potrebbe inibire l'espressione della miostatina. Tali conclusioni hanno trovato conferma anche da altri esperimenti in cui si è osservato che l'espressione della miostatina aumenta nei topi trattati con ciclosporina A (Sakuma K, 2005) e che nei topi mutanti nulli per il gene miostatina i livelli di Cn mRNA sono più alti rispetto ai wild-type (Muthuri SK, 2007). Dalla letteratura sembra comunque che l'attivazione della calcineurina da sola non sia sufficiente a indurre ipertrofia muscolare ma sia necessario il coinvolgimento combinato di più vie di segnalazione e cofattori trascrizionali (Dunn SE, 1999).

## 1.5. AGING

L'invecchiamento è un processo fisiologico continuo e inevitabile, correlato a molteplici fattori e cause. Più in generale si può affermare che tale processo è caratterizzato dalla minor capacità dei tessuti a rigenerarsi con cause sia ambientali che a livello del genoma.

La velocità e le modalità dell'invecchiamento dipendono da individuo a individuo; ma durante questo processo avvengono varie modifiche funzionali e fisiologiche comuni a tutti, le principali sono:

- riduzione della massa magra corporea (muscoli, organi) associata ad una diminuzione dell'acqua corporea e ad un aumento del tessuto adiposo;
- diminuzione degli impulsi nervosi, della capacità e dell'attività respiratoria e dell'attività di alcuni enzimi;
- modificazioni a carico dell'apparato digerente: si ha una riduzione della produzione dei succhi digestivi e dell'acido cloridrico, inoltre si ha anche un diminuito assorbimento intestinale dovuto al decremento della superficie di assorbimento;
- alterazione della funzionalità renale;
- modificazione del gusto in quanto si riduce sostanzialmente il numero di papille gustative (ne restano solo il 35%) con conseguente perdita della sensibilità a certi sapori, in particolare il dolce ed il salato

Focalizzandosi sul muscolo scheletrico l'invecchiamento provoca una progressiva perdita di massa e di forza muscolare, conosciuta col nome di Sarcopenia; questa ha come conseguenze una riduzione delle capacità funzionale e un incremento nel rischio di sviluppo di malattie metaboliche. Il termine Sarcopenia (dal greco sarx= e penia=perdita) fu coniato da Rosenberg ed è determinato da due fattori: la quantità iniziale di massa muscolare e la velocità con la quale declina durante l'invecchiamento.

La diminuzione della massa muscolare è più evidente nella zona addominale. A livello fenotipico, il muscolo scheletrico anziano è caratterizzato da una perdita di fibre muscolari, atrofia delle fibre muscolari e presenza di raggruppamenti isotipici (raggruppamenti di fibre dello stesso tipo). Diversi meccanismi giocano un ruolo fondamentale nell'etiologia della perdita muscolare legata all'età.

- Stile di vita sedentario o disuso muscolare. Il ridotto o nullo carico di lavoro (*unloading*) provoca l'attivazione di un processo di trascrizione di geni di tipo catabolico in cui viene *up-regolata* l'espressione di enzimi che hanno un ruolo fondamentale nella degradazione delle proteine muscolari. Tra questi sistemi proteolitici, il sistema che si presuppone abbia un ruolo principe nella riduzione delle dimensioni delle fibre muscolari (atrofia) è quello dell'ubiquitina-proteosoma (Lecker SH, 1999), come dimostrato dall'aumento dell'espressione delle due ubiquitina-ligasi MAF-box e MURF1 evidenziato in diversi tipi di atrofia muscolare, inclusa quella da disuso. Oltre a provocare l'atrofia, la mancanza di attività fisica è in grado di alterare l'espressione delle isoforme di MHC inducendo una trasformazione delle fibre verso un fenotipo veloce 2X con una perdita di fibre a contrazione lenta che predispone il muscolo alla debolezza e alla fatica.
- Cambiamento nel metabolismo proteico (deficit tra sintesi proteica e degradazione) che porta a una complessiva riduzione del contenuto proteico delle miofibre e a una condizione di atrofia muscolare. Diversi studi hanno dimostrato che la velocità di sintesi proteica negli anziani diminuisce di circa il 30% rispetto ai giovani (Yarasheski KE, 2003), mentre il catabolismo aumenta, soprattutto in mancanza di attività fisica.
- Alterazione dei livelli ormonali. Durante l'invecchiamento i livelli di ormoni anabolici circolanti, importanti per il mantenimento del metabolismo delle proteine muscolari e per altre funzioni dell'organismo (ormoni sessuali, ormone della crescita GH, IGF-1, insulina, ormoni tiroidei, corticosteroidi, ecc.) diminuiscono e nel caso degli ormoni per il muscolo scheletrico influenzano negativamente l'indice di massa muscolare.
- Perdita delle funzioni neuromuscolari. La perdita di massa muscolare avviene principalmente attraverso la perdita di unità motorie (UM) e l'atrofia muscolare causata

dalle fibre che rimangono. Una UM è la base dell'unità funzionale contrattile del sistema neuromuscolare che consiste in un motoneurone alpha (MN), ospitato nella spinal cord, un nervo motore e tutte le singole fibre muscolari innervate da quel nervo. Per tutta la durata della vita le UM sono costantemente in fase di rimodellamento, e questo succede fino a quando il processo di denervazione sovrasta quello di re-innervazione (età avanzata) e provoca una perdita di integrità delle MU susseguita da perdita di funzionalità. La perdita di MU inizia con la perdita di integrità della UM e procede verso il sito della giunzione neuromuscolare. La perdita di UM nella vecchiaia passa spesso inosservata da un prospettiva funzionale a causa di rimodellamenti (reinnervazione collaterale) con relativo mantenimento della massa muscolare e della forza. Questo processo, aiuta a mantenere la massa muscolare in modo tale che, in seguito alla morte di un MN nel midollo spinale, o degenerazione assonale, quelle fibre muscolari orfane, che non fanno più parte di un UM funzionale si atrofizzino e diventino non funzionali, a meno che, non vengano reinnervate tramite una fibra nervosa di un assone adiacente, intatto e funzionale. Questa re-innervazione collaterale determina un accrescimento delle UM che spesso sono di tipo lente. Negli esseri umani, la perdita di fibre muscolari sembra essere uguale tra fibre muscolari di tipo veloce (tipo II) e lento (tipo I). Al contrario, nei modelli animali ci sono prove che suggeriscono che le unità motorie di tipo lente sono più protette da questi fenomeni rispetto a quelle rapide. (Power GA, 2013).

- Espressione genica alterata L'analisi del profilo di espressione genica del muscolo scheletrico di uomini sani anziani (62-75 anni) rispetto ai giovani (20-34 anni) ha dimostrato una elevata espressione di geni tipici di una risposta da stress o danni danno cellulare, e una diminuzione di espressione di geni che codificano per le proteine di riparazione del DNA e proteine checkpoint del ciclo cellulare. (Su J, 2015)
- Apoptosi. L'apoptosi è un meccanismo regolato della morte delle cellule, caratterizzata da eventi molecolari, biochimici e morfologici, ed è considerato come un meccanismo possibile nel processo di invecchiamento del muscolo scheletrico. Diversi stimoli apoptotici, quali lo stress ossidativo, il calcio e il TNF- $\alpha$ , possono essere considerati come iniziatori della segnalazione apoptotica nel muscolo scheletrico degli anziani. Ci sono due vie dell'apoptosi che determinano la sintesi di segnali extracellulari o intracellulari che promuovono la morte delle cellule, il collasso del citoscheletro promuovendo il restringimento delle cellule e la distruzione dell'involucro nucleare e la frammentazione del DNA. La via estrinseca è attivata da recettori pro-apoptotici sulla superficie delle cellule. La via intrinseca di apoptosi è invece regolata da parametri

mitocondriali. L'apoptosi mediata dai mitocondri può essere avviata attraverso il rilascio di proteine pro-apoptotiche nel cytosol a causa di disfunzioni mitocondriali senili. Tuttavia, i mitocondri contengono anche proteine anti-apoptotiche. Le proteine mitocondriali pro ed anti-apoptotiche appartengono alla famiglia della B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) e variazioni dell'equilibrio tra queste può determinare l'inizio dell'apoptosi. Gli effetti dello stress ossidativo dovuto all'età del muscolo scheletrico possono determinare non solo questo squilibrio tra la sintesi e la degradazione, ma anche la disfunzione mitocondriale e l'apoptosi attraverso l'attivazione di alcune importanti vie di segnalazione, con conseguente riduzione nel muscolo della massa e della forza. Dati di letteratura indicano che, durante l'invecchiamento, l'aumento dell'apoptosi nelle cellule di muscolo scheletrico coinvolge la caspasi-2 e la c-Jun N-terminal kinase (JNK) che sono mediate dalla via intrinseca di segnalazione, la quale è attivata dal calcio e dallo stress ossidativo, ma non è noto come JNK medi l'apoptosi indotta da ROS. L'invecchiamento è anche associato ad una maggiore frammentazione e taglio del DNA da parte della caspasi-3 nel muscolo scheletrico del ratto. Infine, è stato dimostrato che TNF- $\alpha$  è uno dei segnali primari che inducono l'apoptosi nelle cellule muscolari, e che l'aumento della sintesi di TNF- $\alpha$  nel muscolo scheletrico senile può agire come un segnale di attivazione dei recettori di morte sulla superficie della membrana cellulare. Inoltre, le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sembrano avere un ruolo come secondo messaggero per TNF- $\alpha$  nel muscolo scheletrico, attivando il fattore nucleare (NF- $\kappa$ B) direttamente o indirettamente. Quest'ultimo è un fattore di trascrizione pleiotropico che va a modulare la risposta immunitaria, l'infiammazione, la sopravvivenza delle cellule e proliferazione. L'invecchiamento va anche ad agire sulla via di segnalazione di TNF- $\alpha$  per NF- $\kappa$ B e, inoltre, proteine quali IKK $\gamma$ , I $\kappa$ Ba e p65, che sono responsabili dell'attivazione di NF- $\kappa$ B da parte del TNF- $\alpha$ , risultano aumentate nel muscolo soleo dell'anziano. In studi recenti, è stato osservato che la concentrazione di NF- $\kappa$ B è quattro volte superiore nei muscoli umani degli anziani rispetto a quelli dei giovani, e questo provoca un deficit di segnalazione degli anabolizzanti nel muscolo di anziani debilitati. Tuttavia, l'esatto meccanismo attraverso cui il NF- $\kappa$ B agisce durante l'invecchiamento muscolare è ancora da chiarire. (Blaauw B, 2013)

- Aumento del tessuto adiposo Il tessuto adiposo bianco (White Adipose Tissue, WAT) elabora diversi peptidi ad azione regolatoria che prendono il nome di citochine. Con l'avanzare dell'età l'aumento del WAT contribuisce ad elevare il tasso ematico di alcune citochine, in particolare TNF- $\alpha$  e IL-6, i cui livelli circolanti possono aumentare da 2 a 4 volte nel corso dell'invecchiamento (Krabbe KS, 2004). Questo porta

l'organismo di un soggetto anziano verso una situazione d'inflammation cronica che oltre ad agire negativamente sul metabolismo di vari distretti (sistema vascolare, immunitario, ormonale e osseo), inibisce la sintesi proteica muscolare favorendo lo sviluppo della sarcopenia (Krabbe KS, 2004; Grimble RF, 2003). Lo scenario descritto assume maggiore gravità in condizioni di obesità o sovrappeso, in cui l'eccesso del WAT aumenta ulteriormente la produzione di TNF- $\alpha$  e IL-6 favorendo ancor più le alterazioni a carico del muscolo scheletrico (Bastard JP, 2006; Rosen CJ, 2006).

- Stress ossidativo La progressiva riduzione del numero e dell'efficienza mitocondriale è stata proposta quale meccanismo capace di indurre sarcopenia (Zacker RJ, 2006). Nel corso dell'invecchiamento, infatti, la produzione mitocondriale di specie radicaliche (Reactive Oxygen/ Nitrogen Species, RONS) aumenta e le difese antiossidanti sono sempre meno efficienti. Questo comporta crescenti fenomeni di stress ossidativo e perossidazione lipidica che danneggiano le fibre muscolari (Marzani B, 2004). I danni cellulari da RONS colpiscono prevalentemente le fibre muscolari di tipo I (ossidative) (Rossi P, 2008), data la maggior presenza di mitocondri, ma non si esclude che tali danni possano interessare anche le fibre di tipo II.

Anche altri fattori possono andare ad aggravare l'avanzamento della sarcopenia:

- Malnutrizione Spesso gli anziani presentano uno stato nutrizionale alterato, in eccesso o più frequentemente in difetto, che aggrava la sarcopenia. La malnutrizione calorico-proteica (MCP), insieme ai deficit di minerali e vitamine, rappresenta la forma di carenza nutrizionale più frequente nell'età senile, dovuta a una inadeguata assunzione di nutrienti o a un loro ridotto assorbimento. Le cause sono da ricondurre principalmente a fattori fisiologici correlati all'età (diminuzione dell'appetito, rallentato svuotamento gastrico, problemi di masticazione, ecc.) e fattori connessi a patologie insorgenti (difficoltà di deglutizione, insulino-resistenza, assunzione di farmaci, ecc.), a cui spesso si aggiungono anche problematiche di tipo socio-economico.

Dall'altro lato, anche un apporto calorico eccessivo e il conseguente aumento del tessuto adiposo bianco rappresenta un importante fattore di rischio in grado di favorire lo sviluppo della sarcopenia. Particolarmente pericoloso è l'aumento del grasso addominale a cui si associa un' aumentata secrezione di citochine pro-infiammatorie, in particolare IL-6 e TNF- $\alpha$ , che, come visto precedentemente, conducono il soggetto anziano ad una condizione di inflammation cronica, responsabile di importanti alterazioni metaboliche a carico di diversi distretti (sistema vascolare, immunitario, ormonale e osseo) tra cui anche i muscoli scheletrici su cui promuove effetti catabolici e di insulino-resistenza.

- Problemi di deambulazione. Problemi a livello deambulatorio, causati sia da malattie sia da problemi di natura meccanica, provocano un avanzamento più rapido della sarcopenia a causa di un errato “utilizzo” o dell’inutilizzo di un determinato muscolo.

#### 1.5.1. Effetti della sarcopenia

Nei soggetti anziani non allenati il declino della prestazione muscolare è particolarmente evidente con conseguenze che interessano l'autonomia funzionale motoria e il metabolismo di altri tessuti. La forza diminuisce di circa il 40% passando dai 30 agli 80 anni (Manno R, 2004), fino a dimezzarsi negli ultra novantenni (Intiso D, 2007), e questo è stato correlato direttamente con la perdita della massa muscolare. La perdita di forza interessa sia i grossi gruppi muscolari, sia i muscoli distali degli arti (Young A, 1985; Kallman D, 1990), influenzando negativamente la capacità deambulatoria e la velocità del passo, riducendo l'abilità di effettuare movimenti e gesti tipici dell'attività quotidiana: salire e scendere le scale, sollevare oggetti, alzarsi dalla sedia (Bassey EJ, 1992). Viene meno anche la capacità di reazione muscolare ed il controllo motorio, con aumento del rischio di cadute per instabilità posturale. La diminuzione di forza è quindi causa di disabilità che nelle forme più gravi necessita di assistenza ed è stata associata anche ad un più elevato rischio di mortalità (Metter EJ, 2002). In correlazione alla sarcopenia, è stato inoltre dimostrato che la potenza anaerobica (watt/kg peso) decade al ritmo di 1% all'anno e a 70 anni è circa il 50% in meno rispetto ad un giovane di 20 anni (Grassi B, 1991). La sarcopenia contribuisce poi ad abbassare il dispendio energetico a riposo e la sensibilità periferica all'insulina, facilitando l'accumulo di grasso sottocutaneo e viscerale. La sarcopenia condiziona in misura importante anche l'invecchiamento dell'osso, favorendo l'insorgenza dell'osteoporosi in età senile. La perdita della massa muscolare e della forza di contrazione riducono, infatti, il carico meccanico sullo scheletro, fondamentale per stimolare l'attività metabolica del tessuto minerale. La diminuzione della massa muscolare nell'anziano si ripercuote, infine, anche sulla termoregolazione, rendendo i soggetti meno capaci di adattarsi alle variazioni della temperatura ambientale. (Cherubini A, 2002; Kenney WL, 1995)

#### 1.5.2. Strategie di prevenzione/trattamento della sarcopenia

L'approccio attualmente usato per prevenire o rallentare la progressione della perdita di massa muscolare nell'anziano prevede la combinazione di un'adeguata nutrizione e di una regolare attività fisica. Trattamenti alternativi basati sulla somministrazione di ormoni anabolici sono ancora in fase di sperimentazione (Park SW, 2014).

### 1.5.2.1. Esercizio fisico

Nonostante i benefici scientificamente dimostrati, l'allenamento di forza negli anziani continua a ricevere scarse considerazioni e solo in pochi centri specializzati entra a far parte delle linee guida ufficiali di trattamento per la sarcopenia. L'allenamento di forza è l'unico in grado di contrastare efficacemente la perdita di massa muscolare, agendo specificamente sulle fibre muscolari di tipo II e producendo risposte anaboliche di adattamento non ottenibili con gli allenamenti aerobici. Diversamente dal lavoro aerobico, gli esercizi muscolari di forza inducono ipertrofia, aumentando forza e potenza contrattile (Campbell AJ, 1997; Latham N, 2003); stimolano, inoltre, la capacità neuro-motoria specifica di reclutamento delle fibre muscolari di tipo II e questo consente sia un miglioramento dell'output muscolare di forza, sia d'intervenire positivamente nel rallentare i fenomeni di denervazione descritti. Gli allenamenti di forza negli anziani possono essere eseguiti in totale sicurezza se ben programmati, ed è stato dimostrato che attraverso stimoli di appropriata intensità si possono produrre guadagni di massa muscolare e di forza comparabili con quelli ottenibili negli individui più giovani (Borst SE, 2004; Roth SM, 2001). In letteratura esistono alcuni lavori con protocolli di training che mostrano risultati piuttosto interessanti. Condizionare l'espressione di forza negli anziani attraverso esercizi e metodologie specifiche ne consente poi l'utilizzo funzionale in varie attività che la richiedono (deambulazione, velocità del passo, spostamento di carichi, ecc.). Programmi di allenamento con i pesi riducono di oltre il 30% il rischio di cadute, come dimostrato in studi a lungo termine (2 anni), modificando significativamente uno degli aspetti che maggiormente caratterizza il quadro di "fragilità" dell'anziano. Complessivamente i benefici migliori si osservano sui soggetti che già mostrano forti segni di sarcopenia.

#### Precauzioni e controindicazioni

Pur essendo sicuri e scientificamente validati, gli allenamenti con i pesi devono, tuttavia, essere individualizzati nei soggetti portatori di patologie croniche come diabete e malattie cardiovascolari (Nied RJ, 2002). Pazienti con insufficienza cardiaca, disfunzioni valvolari o neuropatie devono essere attentamente valutati prima di essere sottoposti a training di forza anche se di bassa intensità. Assoluta controindicazione a sforzi di forza-potenza vedono, invece, l'angina instabile, aritmie e ipertensione incontrollate, cardiomiopatia ipertrofica, alcune forme di retinopatia.

#### 1.5.2.2. Alimentazione

L'alimentazione in età geriatrica deve essere curata enfatizzando soprattutto l'introduzione di nutrienti come proteine, calcio, vitamina D e B12, importanti nel trattamento della sarcopenia. Per le proteine in particolare, negli ultimi anni è stata ipotizzata l'inadeguatezza delle attuali RDA in ragione dell'aumentato catabolismo proteico che comunemente si osserva negli anziani (Latham N, 2003). Studi hanno, infatti, dimostrato come un apporto giornaliero di proteine pari a 0,8 g/kg di peso produca un bilancio azotato negativo nei soggetti sedentari e solo marginalmente positivo nei soggetti attivi (Yarasheski KE, 1995). Da diversi autori e da istituzioni internazionali (International Society of Sports Nutrition) arriva dunque la raccomandazione di considerare appropriate introduzioni proteiche superiori (1,2-1,4 g/kg/giorno), da adattare in relazione al carico di lavoro, assicurando sulla sicurezza dell'intervento (Campbell B, 2007). L'apporto energetico, in particolare da carboidrati, dovrà essere adeguato per poter gestire diverse situazioni ponderali: tendenza alla diminuzione del peso oppure ricerca di una riduzione della percentuale di grasso. Integratori e supplementi prodotti dietetici a base di proteine sono stati valutati negli anziani al fine di poterne sfruttare gli effetti positivi sullo sviluppo della massa muscolare e della forza. In tal senso si è dimostrata efficace l'assunzione di proteine in polvere immediatamente al termine di training di forza piuttosto che in tempi successivi (2 ore dopo) (Esmarck B, 2001). Rispetto all'utilizzo di proteine, effetti superiori sullo stimolo della sintesi proteica sembrano essere ottenibili con supplementi a base di aminoacidi essenziali (Essential Amino Acids, EAA), anche in assenza di esercizio fisico. Si stanno, inoltre, valutando miscele di EAA arricchite di leucina: un aminoacido che stimola la sintesi proteica agendo direttamente sui meccanismi biomolecolari di regolazione. Diversamente dai giovani, infatti, nei soggetti anziani la presenza di una maggiore concentrazione di leucina in un supplemento a base di EAA (41% contro il 26% normalmente presente in questi aminoacidi) sembra essere fondamentale per avere significative risposte di stimolo sulla sintesi proteica muscolare (Katsanos CS, 2006). Alcuni lavori hanno dimostrato i benefici derivanti dall'utilizzo di creatina in soggetti anziani, specialmente quando accompagnato da lavoro muscolare (Rawson ES, 1999, 2000). L'assunzione cronica di creatina (settimane) sembra stimolare la proliferazione delle cellule satelliti e dei mio nuclei nei muscoli sottoposti ad allenamenti di forza. Un interessante studio è quello pubblicato nel 2007 da Tarnopolsky et al. nel quale la supplementazione con creatina è stata associata all'assunzione di acido linoleico coniugato (Coniugated Linoleic Acid, CLA), una sostanza nota in letteratura per la sua efficacia nel ridurre la massa grassa in soggetti adulti in sovrappeso. Nello studio durato sei mesi, i volontari (soggetti con età media di circa 70 anni) sono stati sottoposti a un

programma di esercizio contro resistenza (macchine isotoniche) due volte a settimana. I risultati mostrano come, rispetto al placebo, la supplementazione con creatina+ CLA negli anziani abbia favorito un significativo miglioramento della massa magra, riducendo la massa grassa; un risultato che offre ulteriori prospettive per ciò che concerne la modulazione anti-età della composizione corporea. Anche l'impiego di supplementi a base di acidi grassi omega-3 può essere valutato; il tentativo è quello di ridurre i fenomeni d'inflammation cronica e conseguentemente prevenire le alterazioni strutturali e funzionali dei tessuti nel corso dell'invecchiamento.

### 1.5.3. Problemi di applicabilità dell'esercizio fisico negli anziani

Gli anziani sono incoraggiati a mantenere uno stile di vita attivo, in quanto l'attività fisica regolare apporta numerosi benefici per la salute fisica e mentale. Tuttavia, non sempre l'attività fisica può essere applicata a questa categoria di persone a causa di varie limitazioni di natura sia fisica che psicologica:

- Limitazioni sensoriali: non si limitano solo a deficit nei cinque sensi (come ad esempio problemi alla vista) ma si espandono anche a problemi causati da neuropatie periferiche o disfunzioni vestibolari.
- Malattie al sistema nervoso centrale
- Debolezze muscoloscheletriche
- Fattori psicologici: paura di cadere, depressione, pigrizia, etc

Questi fattori sono però molto interconnessi fra di loro come mostrato nella Fig. 10 e il loro insieme portano a una limitazione dell'attività fisica e quindi ad un aggravamento degli effetti dell'invecchiamento.

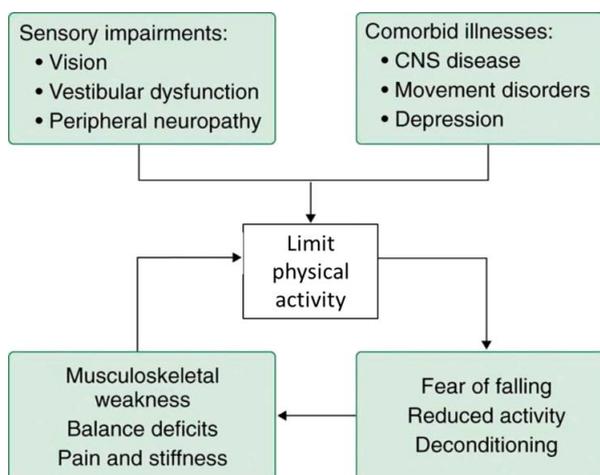


Fig. 10 Limitazioni all'attività fisica nell'anziano

Quindi dati questi presupposti attualmente c'è un considerevole interesse per le strategie terapeutiche atte a arginare l'avanzamento del declino muscolare associato all'invecchiamento. Una modalità di allenamento alternativa all'esercizio fisico volontario è rappresentata dall'elettrostimolazione neuromuscolare (ES), una tecnica che mediante l'impiego di impulsi elettrici trasmessi al sistema nervoso motorio provoca una contrazione muscolare del tutto simile a quella volontaria.

Infatti la natura elettrochimica della trasmissione dell'impulso neuromotorio ha consentito l'applicazione di correnti elettriche adeguate in termini di frequenza (Hz), intensità (mA) e durata (msec). L'elettrostimolazione, sfruttando tale principio fisico, è in grado di contrarre, sottraendole alla volontà, le fibre muscolari ed indurre analgesia "spegnendo" l'impulso doloroso trasportato dai nervi periferici (TENS: transcutaneous electrical nerve stimulation). L'evoluzione tecnologica ha consentito la creazione di apparecchiature sempre più ridotte in dimensioni, mantenendone la potenza erogatrice, e sempre più "intelligenti" nella gestione dell'energia erogata per la presenza dei computer all'interno degli elettrostimulatori stessi, creando i presupposti per l'elettrostimolazione domiciliare mediante apparecchiature sicure e maneggevoli.

L'uso dell'elettrostimolazione ha attualmente numerosi campi di applicazione. In primo luogo già dagli anni novanta viene utilizzata in campo sportivo come coadiuvante nel mantenimento/potenziamento delle performances muscolari e per defaticare il muscolo al termine dello sforzo. Un secondo uso è nel campo dell'estetica con il duplice scopo di favorire l'effetto drenante della pompa muscolare sul ristagno di liquidi e di "modellamento muscolare" ottenuto con la contrazione dei muscoli opportuni. Infine l'elettrostimolazione viene utilizzata anche come strumento per la riabilitazione, in particolare per recuperare il tono ed il trofismo muscolare, ovvero la "contrattilità" ed il "volume" dei muscoli di individui colpiti da traumi che inducono la paralisi muscolare. L'elettrostimolazione, attivando il muscolo mediante la stimolazione delle placche neuromotorie, recupera in tempi rapidi il tono muscolare consentendo un ritorno alle attività ed in seguito il muscolo può recuperare trofismo.

Più recentemente il suo impiego è stato proposto nel trattamento delle disfunzioni muscolari associate a varie condizioni patologiche (arteriopatie, nefropatie, insufficienza cardiaca congestizia, diabete di tipo II, obesità, ecc.) con l'obiettivo, a seconda del caso, di aumentare la massa muscolare, potenziare la funzionalità contrattile o migliorare il metabolismo energetico. Gli studi clinici finora condotti, però, non hanno offerto un quadro completo degli effetti fisiologici acuti e cronici e dei possibili campi di applicazione dell'ES. In particolare, occorrono

indagini più approfondite per definire il protocollo e i parametri di stimolazione più adatti a ciascun tipo di condizione da trattare e allo specifico obiettivo da raggiungere.

Questa versatilità dell'elettrostimolazione ha suscitato molto interesse in un gruppo di ricercatori dell'Istituto di Medicina Fisica e Riabilitazione "Wilhelminenspital" di Vienna (Kern H, 2014) che ha messo a punto recentemente un protocollo di ES e ne ha valutato, mediante dei test funzionali, gli effetti sull'anziano, confrontandoli con quelli ottenuti da un programma di allenamento fisico volontario. Grazie a questo progetto è stato possibile effettuare alcuni studi su questo tipo alternativo di allenamento, i cui risultati saranno analizzati in questa tesi.

## 2. SCOPO DELLA TESI

Come descritto in precedenza durante il processo di invecchiamento il muscolo scheletrico umano subisce numerose modifiche sia a livello macroscopico che microscopico, che portano ad una condizione di degenerazione muscolare chiamata sarcopenia. Questa situazione fisiologica e, quindi, inevitabile, porta però con se numerosi svantaggi tra cui perdita di massa muscolare, forza e mobilità.

La popolazione più colpita da questa situazione è sicuramente quella anziana; infatti la gli effetti della sarcopenia si traducono in un maggior rischio di cadute, disabilità e perdita di indipendenza con pesanti ripercussioni sui costi che la società deve sostenere. Dai molteplici studi presenti in letteratura l'esercizio fisico sembrerebbe essere il miglior rimedio per questa situazione del muscolo scheletrico; ma purtroppo non è semplice da utilizzare soprattutto nella popolazione anziana in quanto numerosi ostacoli di natura diagnostica, fisica e psicologica impediscono l'esercizio fisico volontario. Per questi motivi si è deciso di rivolgere l'attenzione verso un tipo di allenamento alternativo a quello volontario: l'elettrostimolazione (ES). Molti sono i lavori pubblicati che descrivono gli effetti benefici dell'elettrostimolazione sul muscolo scheletrico, tuttavia la maggior parte di questi studi è stata condotta o su animali o su uomini di età adulta ed atleti mentre, ad oggi, sono ancora pochi i dati riguardanti gli effetti dell'elettrostimolazione sul muscolo di soggetti di età avanzata e dallo stile di vita sedentario. Inoltre i risultati degli studi presenti in letteratura non sono confrontabili per via dell'impiego di protocolli di ES differenti uno dall'altro per i parametri di stimolazione e per la durata e la frequenza dell'allenamento.

Questo lavoro di tesi si focalizza per l'appunto sui benefici dell'esercizio fisico e se questi possono essere comparati a quelli ottenuti se viene utilizzato un protocollo di allenamento indotto. Per far questo in primo luogo sono stati studiati i muscoli vastus lateralis di tre distinti gruppi di persone (a) anziani sani sedentari (b) anziani sani con un'attività fisica costante da almeno 30 anni (c) giovani sportivi. In questa prima parte si vuole caratterizzare il muscolo in relazione all'età e all'esercizio e studiare lo stato generale del muscolo per determinare gli effetti dell'allenamento volontario sull'avanzare della sarcopenia durante l'invecchiamento.

La seconda parte della tesi ha lo scopo di studiare gli effetti dell'elettrostimolazione sul muscolo umano di età avanzata, confrontandoli con quelli ottenuti da un programma di allenamento muscolare volontario. Nello specifico questa parte si pone come fine quello di valutare

l'applicabilità dell'elettrostimolazione come strumento per il recupero muscolare nelle persone anziane, al posto dell'esercizio volontario. In particolare:

1. valutare il profilo di sicurezza del protocollo di elettrostimolazione utilizzato
2. individuare gli adattamenti muscolari indotti dall'elettrostimolazione
3. valutare il coinvolgimento delle vie di segnalazione cellulare calcio-dipendenti: chinasi Ca-Calmodulina dipendenti (CaMKs) e Calcineurina

Per dare una risposta a questi obiettivi è stato reclutato un gruppo di anziani sedentari sani suddiviso in due sottogruppi omogenei per età peso e altezza, ognuno dei quali ha subito o un training di tipo volontario (Leg Press) o involontario (Elettrostimolazione, ES), per un periodo di tempo pari a nove settimane. (vedere sezione materiali e metodi)

Tutti i volontari sono stati sottoposti a due prelievi di tessuto muscolare, rispettivamente 14 giorni prima dell'inizio dello studio e 5 giorni dopo la sua conclusione. Per tutto il periodo di allenamento, i volontari hanno mantenuto come d'accordo il loro stile di vita abituale.

Tutte le analisi sono state eseguite sui campioni biotici pre e post allenamento prelevati sia dai volontari sottoposti al programma di ES che da quelli che hanno seguito il programma di allenamento di forza con LP in modo da poter confrontare i risultati relativi ai due tipi di allenamento, volontario e involontario, e contribuire al progetto di studio intrapreso nel nostro laboratorio per la valutazione dell'ES come strategia di allenamento dell'anziano in alternativa al tradizionale allenamento di forza volontario.

Con questo studio si vuole quindi trovare una soluzione alla degenerazione muscolare nell'anziano senza però utilizzare i metodi "classici" dell'esercizio volontario, in quanto non sempre applicabile, cercando di trovare nuove strategie alternative per la recovery muscolare. Questo porterebbe numerosi vantaggi sia dal punto di vista sociale che economico in quanto si renderebbero più autonomi gli anziani alleviando anche il costo economico che l'invecchiamento della popolazione porta sulla società.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1. MATERIALI

2-mercaptoetanolo (Sigma Aldrich)

Acido acetico

Acqua milliQ

Acrilammide 40% p/v (Bio-Rad)

Alcool denaturato

Alimentatore: Electrophoresis Power Supply (Apelex)

Anticorpo primario monoclonale mouse anti-NFATc1 (Thermo Scientific)

Anticorpo primario monoclonale mouse anti-MHC rapide (Sigma Aldrich)

Anticorpo primario policlonale goat anti-SERCA2 (Santa Cruz Biotechnology)

Anticorpo primario policlonale rabbit anti-phospho CaMKII (Cell Signaling)

Anticorpo primario anti MHC lente (Abcam)

Anticorpo secondario donkey anti-goat coniugato con AlexaFluor 488 (Life Techonologies)

Anticorpo secondario donkey anti-rabbit coniugato con AlexaFluor 488 (Life Techonologies)

Anticorpo secondario donkey anti-mouse coniugato con AlexaFluor 594 (LifeTechonologies)

Anticorpo secondario goat anti-mouse coniugato con AlexaFluor 488 (Life Techonologies)

Anticorpo secondario goat anti-mouse coniugato con AlexaFluor 594 (Life Techonologies)

Anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con la perossidasi di rafano (Sigma Aldrich )

Balsamo del Canada (Sigma Aldrich)

Bisacrilammide 2% p/v (Sigma Aldrich)

Blocking Buffer: PBS 10% in FBS

Cassetta di sviluppo (Hypercassette™ Amersham Biosciences)

Centrifuga 5417R (Eppendorf)

Criostato CM1850 (Leica)

Cuvette trasparenti ai raggi UV 12..5mm x 12.5mm x 45mm (Sarstedt)

EGTA (Ethylene Glycol tetracetic Acid) (Sigma Aldrich)

Ematossilina di Mayer (Sigma Aldrich)

Eosina B (Sigma Aldrich)

Eppendorf provette da 0.5ml, 1.5ml, 2ml (Eppendorf)

Etanolo 99,6% (Sigma Aldrich)

FBS (Siero Fetale di Bovino) (Life Techonologies)

Kit BCA: Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific)  
Kit ECL: Pierce ECL Western Blotting Substrate (ThermoScientific)  
Lastre fotografiche (Amersham Hyperfilm™)  
Marcatori di peso molecolare (Bio-Rad)  
Metanolo (Sigma Aldrich)  
Micropipette P2, P10, P20, P100, P200, P1000 (Gilson)  
Microscopio a epifluorescenza DMR (Leica)  
Montante contenente DAPI (ProLong Gold antifade reagent with DAPI, Life Technologies)  
Nitrocellulosa (Sartorium Stedim Biotech)  
OCT: gel per inclusione di tessuti a freddo (Kalttek)  
Omogeneizzatore automatico con pestello in Teflon  
Origin B  
PBS (Phosphate Buffer Saline) NaCl 0.8 g/L KCl 0.2 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.4 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/L  
Penna idrofobica (Liquid Blocker Super Pap Pen, NewcomerSupply)  
Photoshop  
Pipettatore automatico  
Pipette sierologiche in polistirene da 2, 5, 10, 25, 50 ml (Sarstedt)  
Polilisina(Sigma Aldrich)  
Ponceau Red  
SDS (Sodio Dodecil Solfato) (Sigma Aldrich)  
Software per acquisizione immagini LAS AF (Leica)  
Soluzione di sviluppo  
Soluzione di fissaggio  
Soluzione L (tampone *running*): Tris 1.5M (HCl pH 8.8), 0.4% SDS  
Soluzione M (tampone *stacking*): Tris 0.5M (HCl pH 6.8), 0.4% SDS  
Soluzione O3x: glicerina 10% p/v, 2-mercaptoetanol 5% v/v, SDS 2.3% p/v, Tris 62.5mM (HCl pH6.8), Blu di Bromofenolo 0.1%  
Spettrofotometro (Eppendorf)  
Stufetta a 37°C  
Tampone di corsa: Tris 25mM, glicina 192mM, SDS 0.1% (pH 8.3)  
Tampone di trasferimento: metanolo 20%, Tris 25mM, glicina 192mM  
APS (soluzione G): ammonio persolfato 10% p/v  
TEMED (tetrametiletilendiamina) (Bio-Rad)  
Triton X-100 (Fluka)  
Tubi da 15ml e 50ml (Falcon)

Tween 20 (Sigma Aldrich)

Vasca di trasferimento (HSI)

Vasca per elettroforesi: Mini-Protean Tetra System (Biorad)

Vetrino copriooggetto rettangolari da microscopia 24mm x 40mm (Prestige)

Vetrini portaoggetto rettangolari da microscopia (ThermoScientific)

Xilolo (Sigma Aldrich)

## 3.2. METODI

### 3.2.1. Soggetti dello studio

Soggetti dello studio su gli effetti dell'esercizio prolungato

L'approvazione da parte del comitato nazionale per l'etica medica è stata ottenuta prima dell'inizio dello studio (EK08-102-0608). Per la prima parte dello studio, con l'eccezione di 2 soggetti femminili nel gruppo sedentario, i soggetti reclutati erano volontari maschi. Tutti i soggetti hanno ricevuto informazioni dettagliate sullo studio e hanno dato consenso informato. Tre gruppi sono stati arruolati: giovani uomini (n = 5; 22-33 anni, 10 biopsie); anziani con una vita sedentaria (n = 6; 67-74 anni, 10 biopsie), e gli anziani con una lunga storia di attività sportive ad alto livello (n = 7; dai 65 to79 anni, 10 biopsie). Tutti i soggetti erano sani e hanno dichiarato di non avere alcun tipo di problema deambulatorio o malattia. Tutti i soggetti hanno dichiarato di non aver prescrizioni per terapie anti-infiammatorie relative a neuropatie o miopatie. Gli anziani sedentari sono stati arruolati in base alla loro dichiarazione di non aver svolto alcuna attività / allenamento fisica di routine negli ultimi 10 anni.

Soggetti dello studio su effetti dell'elettrostimolazione

Per lo studio sono state reclutate 26 persone (12 uomini e 14 donne) di età compresa tra i 65 e gli 84 anni (età media  $\pm$  deviazione standard 73.1 $\pm$ 6.9 anni), sane e dallo stile di vita sedentario. Il reclutamento è avvenuto previo consenso informato, dopo aver spiegato le modalità e le finalità dello studio. I soggetti in studio sono stati quindi divisi in due gruppi: 8 persone (4 femmine e 4 maschi) hanno seguito un allenamento di forza volontario (Leg Press con pedana vibrante) mentre le restanti 18 (10 femmine e 8 maschi) sono state sottoposte a un programma di elettrostimolazione dei quadricipiti. I due gruppi sono stati divisi in modo tale da non esserci differenze di età, peso e altezza.(Tab 1)

	LP n=8 (4 maschi e 4 femmine)	ES n=18 (8 maschi e 10 femmine)
<b>Età (Anni)</b>	71,6±6,7	70,6±2,8
<b>Altezza (cm)</b>	171,1±10,5	170,6±15,2
<b>Peso (kg)</b>	84,0±15,8	76,8±11,6

Tab. 1 Demografia soggetti della seconda parte dello studio. I due gruppi sono stati suddivisi in modo tale da avere la stessa età, altezza e peso. Nessuna significatività Test t student  $P < 0,05$

### 3.2.2. Protocollo di elettrostimolazione

I soggetti sono stati sottoposti a un allenamento neuromuscolare regolare tramite ES (corrente gonfiore) per un periodo di 9 settimane, cominciando con due sedute a settimana per le prime tre settimane e poi passando a tre sedute la settimana per le successive 6 settimane, per un totale di 24 sessioni di allenamento ( $3 \times 10$  minuti ogni sessione). La stimolazione tramite ES è stata eseguita con due elettrodi alimentati a batteria (Krenn et al., 2011), a casa, dagli stessi soggetti dopo aver dato loro istruzioni dettagliate. I due elettrodi di gomma conduttiva ( $9 \text{ cm} \times 14 \text{ cm}$ ,  $126 \text{ cm}^2$ ) sono stati applicati alla pelle, tramite una spugna bagnata, sulla parte anteriore della coscia su entrambi i lati (sinistra/destra). Le coppie di elettrodi, un paio per la coscia sinistra e l'altro per la destra, sono state collegate a due canali dell'elettrostimolatore. Questo ha permesso la stimolazione indipendente dei muscoli della coscia destra e sinistra, che vengono stimolati alternando le due gambe. Per ogni ripetizione (cioè, la contrazione muscolare provocata dall'ES) è stato usato un treno di impulsi elettrici (onda rettangolare, bifasica, larghezza  $0,6 \text{ ms}$ ) di  $3,5 \text{ s}$  ( $60 \text{ Hz}$ ). Due contrazioni consecutive, sulla stessa coscia, erano separate da intervalli di  $4,5 \text{ s}$ . In questo studio, sono stati applicati dispositivi di stimolazione a tensione costante. I soggetti sono stati istruiti per aumentare l'intensità di stimolazione fino a raggiungere il livello massimo di tolleranza sensoriale. Con questa intensità tutti i soggetti hanno raggiunto la completa estensione del ginocchio. La corrente e la tensione applicata sono state registrate dal dispositivo di stimolazione per ciascuna sessione di addestramento. La corrente di stimolazione media è stata pari a  $128 \pm 16 \text{ mA}$  e la tensione di  $39 \pm 14 \text{ V}$ .

### 3.2.3. Protocollo di Leg Press

Il programma di allenamento è stato eseguito tramite una macchina per leg press lineare a motore controllata da un computer (Patent Nr.: AT 505 722 A1 2009-03-15, Faculty of Physical Education and Sports, Comenius University, Bratislava). Questo tipo di macchina è in grado di operare in modalità isometrica, isocinetica e vibrazionale. In contrasto con la gravità viene indotta la WBV (Whole body vibration, è un termine generale per una qualsiasi vibrazione o frequenza che viene trasferita ad un corpo umano), la vibrazione viene applicata attraverso la pressione esercitata contro la pedana vibrante (con lo sforzo massimo volontario) da parte dei soggetti sottoposti al training. I pazienti sono stati sottoposti ad un allenamento isocinetico di leg press mantenendo una posizione seduta per allenare i muscoli estensori della coscia e i muscoli flessori ed estensori del ginocchio di entrambe le gambe. In totale sono state completate 27 sessioni: 3 sessioni a settimana per un periodo di 9 settimane, ciascuna composta da 3 serie di 5 minuti.

### 3.2.4. Biopsie Muscolari

Le biopsie muscolari sono state raccolte dal muscolo vastus lateralis a 15-20cm dallo spazio articolare del ginocchio, mediante un ago Bergström inserito perpendicolarmente alla direzione fibre. Le biopsie prima dell'allenamento sono state raccolte 10 giorni dopo la valutazione iniziale (test funzionali) al momento dell'inclusione nello studio, i protocolli di allenamento sono iniziati 14 giorni dopo. Le biopsie post-training sono state raccolte 5 giorni dopo l'ultima sessione di allenamento. La valutazione funzionale è stata effettuata quattro giorni dopo l'ultima sessione di allenamento. Circa 50-70 mg di tessuto sono stati prelevati da entrambe le gambe dei soggetti. Dopo l'incisione della fascia, un segmento cilindrico del muscolo (circa mezzo pollice) viene rimosso. I campioni sono stati congelati, dopo il prelievo, in isopentano raffreddato in azoto liquido a -170°C.

### 3.2.5. Polilisinazione dei vetrini

Per evitare danni e perdite di cellule durante le procedure di colorazione è importante che i tessuti aderiscano bene al vetrino portaoggetti. A tale scopo i vetrini vengono preventivamente rivestiti con un film di polilisina che, conferendo una carica positiva alla superficie del vetrino, migliora l'adesione dei tessuti per attrazione elettrostatica. La procedura prevede che i vetrini vengano prima puliti, immergendoli in alcool denaturato per 5 minuti, quindi asciugati su carta

assorbente, e successivamente immersi per 5 minuti in una soluzione di polilisina al 10% in acqua milliQ e lasciati asciugare all'aria.

### 3.2.6. Preparazione delle sezioni criostatiche di muscolo vastus lateralis

Le biopsie muscolari sono appoggiate su una goccia di OCT, una particolare resina che a temperatura ambiente ha una consistenza gelatinosa mentre a basse temperature tende a solidificare fungendo da supporto solido per il campione da sezionare. I campioni congelati sono tagliati al criostato, impostato a una temperatura di  $-21^{\circ}\text{C}$ , in fette seriali trasversali dello spessore di 8 micron. Le sezioni vengono raccolte su vetrini polilisinati e conservate a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'utilizzo.

### 3.2.7. Colorazione istologica: Ematossilina-Eosina (EE)

La colorazione EE è comunemente utilizzata per la valutazione morfologica dei preparati istologici. L'Ematossilina è un colorante basico che avendo affinità per le molecole cariche negativamente si lega al DNA marcando i nuclei di blu. L'Eosina invece è un colorante acido che interagisce con le proteine citoplasmatiche formando un complesso di colore rosa. Prima dell'uso i due coloranti, sciolti in acqua, vengono filtrati per eliminare eventuali precipitati/agglomerati. Tutti i passaggi del procedimento di colorazione sono condotti all'interno di torrette che presentano delle scanalature in cui possono essere inseriti più vetrini in modo da poterli trattare simultaneamente.

Le sezioni criostatiche di muscolo vasto laterale sono immerse in Ematossilina di Mayer per 15 minuti. Dopo un lavaggio di 1 minuto in acqua milliQ per rimuovere l'eccesso di colorante, le fette vengono sciacquate sotto acqua corrente di rubinetto per circa 10 minuti fin quando l'acqua non è pulita, facendo attenzione a regolare la pressione dell'acqua per evitare di danneggiarle. Successivamente si effettua la colorazione di contrasto, per 1 minuto, con una soluzione acquosa di Eosina B allo 0.5% acidificata al momento con una goccia di acido acetico 1% per aumentarne le caratteristiche basofile. Dopo un breve lavaggio in acqua milliQ per eliminare l'eccesso di colorante, le sezioni vengono disidratate immergendole per 1 minuto in etanolo a concentrazione crescente ( $70^{\circ}$ ,  $95^{\circ}$  e  $100^{\circ}$ ) e infine nello xilolo. Alla fine, per rendere il preparato stabile nel tempo, il vetrino viene montato lasciando cadere sulle sezioni qualche goccia di Balsamo del Canada diluito in xilolo e facendovi delicatamente scivolare sopra il

vetrino copri-oggetto, evitando la formazione di bolle d'aria. Le immagini delle sezioni così colorate sono acquisite utilizzando un microscopio ottico collegato a una videocamera

### 3.2.8. Colorazione istochimica: ATPasi

Il metodo della calcio ATPasi utilizza soluzioni con diversi valori di pH , per distinguere i tipi di fibre muscolari. Le fibre muscolari possono essere generalmente classificati come di tipo 1 (lente ossidativo) e tipo 2 (rapide glicolitico). Il modo di colorazione è il seguente: il pH di pre-incubazione inattiva l'enzima miosina -ATPasi di specifici tipi di fibre. Il restante enzima attivo è attaccato ad un atomo di calcio che viene sostituito da un cobalto e infine precipitato sotto forma di composto insolubile nero dal solfuro di ammonio. In base al pH delle soluzioni utilizzate si coloreranno in maniera differente le varie popolazioni di fibre che compongono il muscolo in analisi. Per queste biopsie è stato utilizzato un pH di 4.35 in modo tale da colorare di nero le fibre di tipo lente. Le sezioni da 8 um sono state incubate per esattamente cinque minuti a temperatura ambiente con la soluzione a pH 4.35 (12.5 mL Barbitol Acetate Solution, 2.5 mL 1N HCl, 32.5 mL H<sub>2</sub>O) e sottoposte a un ciclo di lavaggio con H<sub>2</sub>O milliQ. Nello step successivo le criosezioni sono state esposte per 25 minuti all'ATP solution, in seguito lavate per tre volte con una soluzione 1% di Calcium Chloride e trattate per 10 minuti con una soluzione al 2% di Cobalt Chloride. Dopo 5 lavaggi con una soluzione di Sodium Barbitol (1:20 of 0.1M mother solution) e 5 di H<sub>2</sub>O milliQ le sezioni sono state incubate per 20-30 secondi in una soluzione 2% v/v di ammonium sulfide. In seguito un breve lavaggio in acqua milliQ per eliminare l'eccesso di colorante, le sezioni vengono disidratate e montate come descritto nel protocollo della colorazione tramite ematossilina ed eosina.

### 3.2.9. Analisi morfometriche

Per valutare i parametri morfometrici delle fibre muscolari le sezioni una volta colorate, mediante ematossilina/eosina o ATPasi, sono state fotografate in modo tale da avere una coverage del 100%. Successivamente di ogni fibra sono stati valutati diversi parametri tra cui: la forma delle fibre, la presenza di infiltrati e le dimensioni. Queste ultime sono state ricavate attraverso la misurazione del diametro minimo di tutte le fibre.

### 3.2.10. Protocolli di immunofluorescenza

L'immunofluorescenza è una tecnica microscopica che permette di localizzare, in modo altamente specifico, determinate proteine presenti nel campione tramite una reazione immunitaria antigene-anticorpo, evidenziata mediante l'uso di sonde fluorescenti. Questa tecnica porta un enorme vantaggio soprattutto se si utilizza del materiale di origine umana in quanto, a differenza di quello dei modelli animali, è molto più difficile da reperire e le quantità sono molto basse; infatti l'uso dell'immunofluorescenza permette di avere anche con basse quantità di materiale una grande mole di informazioni sulla localizzazione, distribuzione e, in certi casi quantità, del target studiato.

Per ognuno dei protocolli sottostanti sono state utilizzate sezioni criostatiche seriali (8 µm di spessore) delle biopsie muscolari di vastus lateralis. Ognuna delle sezioni è stata raccolta e conservata a -20°C su vetrini polilisinati (come descritto in precedenza). Al momento dell'uso le fette vengono idratate per 5 minuti con PBS1x e poi processate secondo uno dei protocollo qui sotto riportati.

#### 3.2.10.1. Catene pesanti delle miosine (rapide e lente)

Per ottenere dati sulle catene pesanti delle miosine (MHC), le sezioni sono state permeabilizzate con 0.1% Triton (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in PBS per 15 minuti. Dopo tre lavaggi con PBS 1x, le interazioni proteiche non specifiche sono state bloccate mediante un'incubazione con 10% di siero fetale bovino in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente (RT). Le sezioni sono state poi incubate per 1 ora a RT con un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo delle MHC veloce (Novocastra, Milano, Italia) diluito 1:10 in PBS. Le sezioni sono state poi lavate in PBS per tre volte e, in seguito, incubate con anticorpo secondario anti-mouse AlexaFluor 488 (1: 200; LifeTechnologies) per 1 ora a temperatura ambiente e al buio (per evitare il fotobleaching della sonda fluorescente). Le sezioni, a questo punto) sono state lavate di nuovo con PBS1x per tre volte, lo stesso procedimento effettuato per le MHC rapide è stato ripetuto per le MHC lente, cambiando però il secondario e usando un anti-mouse AlexaFluor 594 (1:200, LifeTechnologies). Dopo questa incubazione le sezioni sono state nuovamente lavate con PBS1x per 3 volte. infine, i vetrini sono stati montati utilizzando il montante ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Life Technologies, Carlsbad, CA), per marcare i nuclei delle fibre. Le immagini sono state acquisite con un microscopio Zeiss collegato ad una macchina fotografica Leica DC 300F.

### 3.2.10.2. N-CAM

Per il rilevamento dell'espressione di N-CAM nelle miofibre, le sezioni sono state fissate in metanolo per 15 minuti a 20°C e incubate per 1 ora a temperatura ambiente con una soluzione al 10% di siero di capra necessaria per bloccare le interazioni aspecifiche tra le proteine e gli anticorpi utilizzati. In seguito le sezioni vengono incubate 1 ora a temperatura ambiente usando un anticorpo policlonale di coniglio diretto contro N-CAM (cat AB5032; Chemicon, Millipore) diluito 1: 200 in PBS. Le sezioni vengono poi lavate 3 volte, da 5 minuti ciascuna, con PBS e poi incubate per 1 ora a RT con l'anticorpo secondario coniugato con Cy3 diretto contro IgG di coniglio (Chemicon, Millipore) diluito 1: 200 in siero di capra 10% in PBS. Dopo un altro lavaggio con PBS, i vetrini sono stati montati utilizzando ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Life Technologies).

### 3.2.10.3. SERCA2

Sezioni criostatiche seriali (8 µm) dal muscolo del vasus lateralis sono state reidratate con PBS1x, e successivamente con Triton 0.1% in PBS1x per 15 minuti. In seguito a 3 lavaggi con PBS1x le sezioni vengono incubate per 30 minuti con la soluzione di saturazione (10% siero fetale di bovino) per evitare le interazioni aspecifiche proteina/anticorpo. A questo punto le sezioni vengono incubate contemporaneamente, per un'ora a temperatura ambiente, con un anticorpo diretto contro la miosina Rapide (Mouse monoclonale 1:50 AbCam) e uno diretto contro SERCA2 (Goat policlonale 1:200 Santa Cruz) diluiti in PBS1x. Dopo 3 cicli di lavaggio da 5 minuti ciascuno con PBS1x, le sezioni vengono incubate con due anticorpi secondari, ognuno diretto contro le IgG di ognuno dei due primari: anti-goat AlexaFluor 488 e anti-mouse AlexaFluor 594 (1:200 LifeTechnologies).

Le sezioni sono state infine montate usando il ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Life Technologies). In questo caso le foto sono state effettuate tramite un microscopio ad epifluorescenza Leica DMR con camera Leica DFC 365 Fx; le foto sono state prese in maniera tale da avere una copertura di tutta la superficie di una sezione.

### 3.2.10.4. NFATc1

Per il protocollo di immunofluorescenza per NFATc1 le sezioni criostatiche (8 µm) di vastus lateralis sono state fissate in metanolo per 15 minuti a 20°C, successivamente lavate con pbs per

eliminare l'eccesso di metanolo. Tramite una soluzione di Triton 0,1% in PBS1x le fette sono state permeabilizzate per 15 minuti e poi sottoposte a 3 cicli di lavaggio da 5 minuti ciascuno con PBS1x. Dopo una saturazione (10% FBS in PBS1x) di un'ora a temperatura ambiente le sezioni sono state incubate con l'anticorpo anti-NFATc1 (anticorpo monoclonale, 1:100, Thermo Scientific). Dopo 3 cicli di lavaggio con PBS1x le sezioni sono state incubate per un'ora a temperatura ambiente e al buio con l'anticorpo secondario (anti mouse Alexa Fluor 594 1:200) e dopo altri 3 cicli di lavaggio montate con ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Life Technologies). Le foto sono state effettuate tramite un microscopio ad epifluorescenza Leica DMR con camera Leica DFC 365 Fx; le foto sono state prese in maniera tale da avere una copertura di tutta la superficie di una sezione.

#### 3.2.10.5. Controlli negativi

Ognuna delle immunofluorescenze eseguite è stata associata ad un controllo negativo. I controlli negativi sono stati eseguiti eliminando la fase di incubazione con gli anticorpi primari di incubazione del campione, ma mantenendo ogni protocollo in tacto per quanto riguarda il trattamento pre incubazione.

#### 3.2.11. Western Blot

Il Western Blot è una tecnica biochimica che permette di determinare la presenza, la quantità e il peso molecolare di una proteina all'interno di un campione, mediante una reazione specifica antigene-anticorpo. Tramite questa tecnica si sono voluti analizzare i livelli di espressione proteica di varie proteine che compongono il reticolo sarcoplasmatico del muscolo scheletrico umano. Prima di essere utilizzato il campione è stato processato come descritto nei capitoli descritti in seguito.

##### 3.2.11.1. Preparazione degli omogenati

Ciascun campione viene posto in un'ependorf da 1.5 mL, disperso in 300µl di una soluzione contenente SDS al 3% e EGTA 1mM, e lasciato riposare per 30minuti. L'omogeneizzazione viene eseguita con un pestello di plastica motorizzato a 1200 giri/secondo per 5 minuti, ripetendo l'operazione per tre volte. Successivamente l'omogenato viene fatto bollire per 5

minuti per completare la solubilizzazione del campione. Quindi viene centrifugato a 900 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente, in modo da separare la frazione insolubile che si deposita sul fondo. Il surnatante, costituito dalla frazione solubilizzata, viene prelevato e conservato a -20°C fino al momento dell'uso.

### 3.2.11.2. Dosaggio proteico mediante saggio con BCA

La concentrazione di proteine totali presenti in ciascun omogenato è determinata utilizzando il kit commerciale basato sul metodo dell'acido bicinonico (BCA). Il valore della concentrazione proteica di ciascun campione viene estrapolato da una retta di taratura costruita misurando l'assorbanza a 562 nm di diluizioni crescenti di una proteina a concentrazione nota. Come standard proteico è stata usata la BSA (albumina di siero bovino) necessaria per costruire la retta di taratura. In altre eppendorf, di numero pari al doppio dei campioni da saggiare, viene messa una quantità definita di omogenato. In tutte le provette, compresa quella per il bianco per tarare lo spettrofotometro, sono aggiunti 2,5 µl di soluzione SDS 3% con EGTA 1mM e la quantità di acqua milliQ necessaria per raggiungere un volume di 12,5µl. Infine si aggiungono in ogni eppendorf 100 µl di reattivo, preparato al momento miscelando nel rapporto di 50:1 le due soluzioni reattive A e B contenute nel kit. Il tutto viene incubato a 37°C per 30 minuti, al termine dei quali il contenuto di ciascuna provetta viene prelevato e posto in una cuvetta per la lettura allo spettrofotometro a 562 nm. Dai valori medi di assorbanza misurata per ciascun campione si ricava la sua concentrazione proteica attraverso la retta di taratura ottenuta con la BSA.

### 3.2.11.3. SDS-PAGE

L'SDS-PAGE è una tecnica elettroforetica denaturante su gel di poliacrilammide che consente di separare le proteine esclusivamente in base al loro peso molecolare e indipendentemente dalla loro forma e dalla loro carica netta. Sono stati allestiti dei minigel (dimensioni 8cm x 7cm) dello spessore di 1mm colando tra due lastre di vetro le soluzioni di preparazione relative ai due gel. Viene colata per prima la soluzione di preparazione del running, un gel al 10% di poliacrilammide preparato in un tampone (soluzione L) a pH 8.8, e viene depositato sopra uno strato di acqua per rendere perfettamente piana la superficie superiore. Trascorso il tempo necessario per la polimerizzazione, l'acqua è stata eliminata e si versa la miscela di preparazione dello stacking, un gel al 4% di poliacrilammide preparato in un tampone

(soluzione M) a pH 6.8. Una volta caricati i campioni e il marker di pesi molecolari la corsa viene condotta a un voltaggio costante di 60V per la prima ora, e una volta che le proteine sono entrate nel running, lo si porta a 100V. Una volta terminata la corsa le proteine sono state trasferite su membrane di nitrocellulosa per le successive analisi (O.V. 200 mA). Il giorno dopo la membrana è stata lavata velocemente in acqua milliQ, colorata con il Ponceau Red per verificare che il trasferimento sia avvenuto correttamente, e infine decolorata con un breve lavaggio in acqua milliQ in cui il colorante è solubile.

#### 3.2.11.4. Immunoblot e sviluppo

Le membrane una volta decolorate dal ponceau red sono state trattate con una soluzione al 10 % (v/v) di latte scremato in PBS-Tween 0,05 % per 3 ore e sono state incubate con l'anticorpo primario contro la P-CaMKII (1:1000 Cell Signaling) diluito in PBS-Tween 0,05 % contenente anche un 2% (v/v) di latte scremato per 2 ore a 20°C. Per il caso della P-CamkII come anticorpo secondario è stato usato un anticorpo con legato la perossidasi di rafano(1:5000 in PBS-Tween). In questo caso specifico i segnali sono stati visualizzati utilizzando il substrato Pierce ECL Western Blotting (Thermo Scientific) immunoblot. La reazione è stata visualizzata mediante lo sviluppo di una lastra fotografica che, una volta impressionata dalla luce rilasciata, permette di individuare la banda di interesse.

Nel caso delle altre proteine analizzate in questo studio (SERCA1, SERCA2, Sarcalumenin, Calsequestrin 1 e Calsequestrin 2)le membrane decolorate sono state bloccate con la soluzione al 10 % (v/v) di latte scremato in PBS1x per 1 e successivamente incubate con i vari anticorpi primari (vedere tabella xx per le diluizioni) diluiti in PBS1x contenente il 2% (v/v) di latte scremato per 2 ore a 20°C. La rilevazione delle proteine marcate è stata effettuata tramite un anticorpo secondario marcato con fosfatasi alcalina e visualizzate utilizzando il sistema del 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro-blu di tetrazolio. I vari Mr apparenti delle proteine sono stati estrapolati da un grafico di mobilità relativa contro il logaritmo dell'Mr di proteine standard.

La comparazione quantitativa dell'espressione delle proteine è stata determinata tramite densitometria (Scion image software) degli immunoblots.

Proteine	Diluizione
SERCA1	1:1000
SERCA2	1:1500
Sarcalumenina	1:200
Calsequestrina 1	1:2000
Calsequestrina 2	1:2000

Tab. 2 Lista delle protein dell'SR analizzate e diluizioni degli anticorpi primari usati in immunoblot

### 3.2.12. PCR quantitativa

La tecnica della RT-PCR è una variante della tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR). Questa tecnica consiste nella sintesi di una molecola di DNA a doppio filamento a partire da uno stampo di RNA. La molecola di DNA sintetizzata mediante il processo di retrotrascrizione è definita cDNA. Mediante l'impiego della RT-PCR è possibile convertire in DNA un intero trascrittoma (insieme di tutto il trascritto di una cellula) di uno specifico tessuto di un individuo in una specifica fase del suo sviluppo. Per tale motivo, la RT-PCR è una tecnica che viene sfruttata in laboratorio per studiare l'espressione genica, perché consente di sottoporre ad ulteriori analisi il cDNA sintetizzato. Il prodotto della retrotrascrizione dell'RNA, anche detta Reazione First-strand, può essere amplificato mediante PCR classica, oppure essere quantificato mediante real-time PCR quantitativa (qPCR).

L'RNA è stato isolato a partire da una serie di sezioni criostatiche di biopsie del vastus lateralis usando TRIzol®. Il TRIzol® è un reagente completo, pronto all'uso per l'isolamento di RNA totale di alta qualità o l'isolamento simultanea di RNA, DNA, proteine da una alta varietà di campioni biologici. Questa soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato è stato progettata per isolare frazioni separate di RNA, DNA e proteine da campioni di cellule e tessuti di origine umana, animale, vegetale, lievito, o di origine batterica, entro un'ora.

Una volta estratto L'RNA è stato quantificato attraverso l'utilizzo di un lettore nanodrop che permette di ricavare, oltre la concentrazione del campione, anche il grado di purezza (rapporto OD 260/280).

A questo punto 300 ng di RNA sono stati retrotrascritti in cDNA usando il kit SuperScript® VILO™ cDNA (Invitrogen) e conservato a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

Per questo studio sono stati disegnati primer specifici per i geni: GAPDH, da usare come gene per la normalizzazione dei dati, e i geni ATP2A2 (SERCA2), Sarcalumenin e Casq1 che sono i target di questa q-PCR. I primer sono stati disegnati attraverso l'utilizzo del software Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA; <http://frodo.wi.mit.edu/>) mentre la loro specificità termodinamica è stata controllata attraverso i programmi BLAST per l'allineamento delle sequenze [U.S. National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD, USA] e Vector NTI® (Invitrogen).

Tutti i primer sono stati costruiti in modo tale da evitare l'amplificazione derivante dalla contaminazione di DNA genomico. La reazione di qPCR è stata effettuata in duplice copia utilizzando un termociclatore iQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) usando il SYBR Green necessario per la quantificazione del DNA.

I parametri di PCR utilizzati sono 30s di denaturazione iniziale a 95 °C seguiti da 40 cicli da 10s di denaturazione a 95°C e 30s alla temperatura di annealing specifica per ogni primer (trovata eseguendo delle curve di temperatura per ogni coppia di primer):

Primer	T Annealing (°C)
ATP2A2	57
Sarcalumenin	57
GAPDH	59
Casq1	61

Tab. 3 Lista delle temperature di annealing utilizzate per ogni primer

Tutti I campioni sono stati analizzati contemporaneamente con controlli negativi di RT.

La curva di melting è stata generate dal software iQ5 alla fine del ciclo finale di ogni campione per confermare la specificità del prodotto amplificato. Il livello di mRNA di GAPDH è stato usato come gene di riferimento. La normalizzazione è stata eseguita attraverso il metodo del delta Ct.

$$\Delta Ct = 2^{-(Ct_{GOI} - Ct_{HK})}$$

Dove CtGOI si riferisce al ciclo soglia (il ciclo in cui la curva relativa al campione interseca la linea di soglia) del gene di interesse mentre CtHK a quello del gene utilizzato come normalizzatore o housekeeping. I dati sono stati espressi come  $media \pm SEM$ .

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
ATP2A2	5'- ACAGCTATGACTGGCGATGG -3'	5'-AGCGGATGAACTGTTTCATGT-3'
Sarcalumenina	5'- AGCTGATTGGCATTGAGGTT -3'	5'- GACCCACATCCAGCTTTGTT -3'
Casq1	5'-GGAGCACAGGAGATCAACCC-3'	5'-GGGTCAATCCAGATGATGCT-3'
GAPDH	5'- CACCATCTTCCAGGAGCGAG -3'	5'- TTCACACCCATGACGAACAT -3'

Tab. 4 Lista delle sequenze forward e reverse dei primer utilizzati

### 3.2.13. Statistica

Per ciascun gruppo di dati sono stati valutati tre parametri: numerosità, normalità di distribuzione, mediante il test della simmetria, e omogeneità delle varianze, mediante il test F. Dal momento che nessuno dei casi considerati soddisfaceva contemporaneamente i tre requisiti richiesti per poter applicare il test t di Student, il confronto dei dati tra i pre e i post di ciascun gruppo preso in considerazione è stato eseguito per mezzo del test di Wilcoxon per dati accoppiati a due code. I livelli di significatività sono stati fissati per  $p \leq 0.05$  e per  $p \leq 0.01$ , indicati rispettivamente con uno o due asterischi riportati in alto alla rappresentazione grafica tramite box plot (realizzati col programma Origin B) delle variazioni riscontrate prima e dopo allenamento.



## 4. RISULTATI

### 4.1. L'ESERCIZIO FISICO PROLUNGATO NELL'ANZIANO

#### 4.1.1. Analisi Demografica

Le caratteristiche demografiche e cliniche dettagliate dei soggetti arruolati sono descritte nella tabella 5. Tutti i soggetti che hanno fatto parte dello studio erano sani e hanno dichiarato di non avere alcun impedimento motorio o malattia neuromuscolare. Tuttavia, valutazioni cliniche e funzionali e analisi elettromiografica, eseguite nel gruppo degli anziani allenati, hanno rilevato in alcuni dei soggetti alcuni problemi di natura neuropatica o miopatica.

Soggetti	Demografia			Caratteristiche Cliniche	
	Gamba della biopsia (n = 10)	Sesso	Età (Anni)	Elettrofisiologia	Altre malattie
<b>Giovani Atleti</b>					
1	L/R	M	22	N.D.	no
2	L/R	M	24	N.D.	no
3	L/R	M	25	N.D.	no
4	L/R	M	27	N.D.	no
5	L/R	M	33	N.D.	no
<b>Anziani Sedentari</b>					
6	L/R	M	77	N.D.	no
7	L	F	74	N.D.	no
8	L/R	F	67	N.D.	no
9	L/R	F	71	N.D.	no
10	L/R	M	72	N.D.	no
11	L	M	70	N.D.	no
<b>Anziani</b>					

fisicamente attivi					
12	L/R	M	68	NCV: N; EMG: N	no
13	R	M	69	NCV: M; EMG: N	no
14	R	M	67	N.D.	no
15	L/R	M	68	N.D.	no
16	L/R	M	65	NCV: N; EMG: no myop/neur	
17	L	M	79	NCV: M; EMG: no sl.myop.	
18	L	M	66	NCV: D; EMG: N	no

Tab. 5 Demografia dei soggetti dello studio. L = Sinistra, R = Destra; NCV= velocità di conduzione del nervo; N.D. = non determinato; EMG = elettromiografia; N= normale; M= moderata; D =percepibile; myop/neur = modificazioni sia neurogeniche che miopatiche, di natura leggera; sl.myop = miopatie leggere.

#### 4.1.2. Valutazione dell'attività fisica e della mobilità

Quantità e tipo di esercizio fisico svolto dai soggetti attivi sono riportati nella Tabella 6. Quattro dei cinque giovani hanno praticato un allenamento di forza mentre il quinto ha svolto un training di resistenza. I soggetti hanno dichiarato di esercitare dalle 4.0 alle 7.5 ore a settimana di allenamento negli ultimi 5 anni. Gli anziani fisicamente attivi hanno dichiarato di allenarsi dalle 4,5 alle 24,0 ore a settimana. Dai dati ottenuti alcuni anziani si sono allenati più tempo rispetto ai giovani; tuttavia, la grande differenza apparente tra i tempi medi ( $11,7 \pm 2,8$  vs  $5,3 \pm 0,6$  ore settimanali  $\pm$  SE, rispettivamente) non era significativa. Gli anziani sedentari non hanno eseguito alcun esercizio sopra le normali attività della vita di tutti i giorni nel corso dei 20 anni precedenti. Per consentire un confronto della specifica forza muscolare sviluppata nei tre gruppi, è stata misurata la forza sviluppata dal quadricipite. La media (TSD) della forza di contrazione del ginocchio nei giovani ammontava a  $3,21 \pm 0,2$  Nm/kg; negli anziani fisicamente attivi era  $2,17 \pm 0,1$  Nm/kg (un calo del 32% rispetto ai giovani) mentre negli anziani sedentari era di  $1,57 \pm 0,2$  (un calo del 51% rispetto ai giovani). Dopo aver testato le prestazioni fisiche e di mobilità tramite una serie di test funzionali è risultato che gli anziani fisicamente attivi presentano caratteristiche più simili a quelle dei giovani rispetto a quelli del gruppo sedentario.

della medesima età. Questa è una prova del fatto che gli anziani fisicamente attivi sono un gruppo molto performante ed è possibile paragonarli a atleti master della medesima età.

Soggetti	Training	Ore di Allenamento	Anni di attività	Forza Nm/kg
<b>Giovani Atleti</b>				
1	Forza	4	>5	2,95
2	Forza	4,5	>5	2,93
3	Resistenza	4,5	>5	2,69
4	Forza	7,5	>10	4,1
5	Forza	6	>5	3,36
<b>Media±SE</b>		5,3±0,6		3,21±0,2
<b>Anziani sedentari</b>				
6	-	-	-	1,46
7	-	-	-	1,76
8	-	-	-	1,51
9	-	-	-	1,15
10	-	-	-	1,29
11	-	-	-	2,24
<b>Media±SE</b>				1,57±0,2
<b>Anziani fisicamente attivi</b>				
12	Forza	4,5	>20	1,98
13	Misto	6,9	>20	1,35
14	Misto	16	>20	2,09
15	Resistenza	16	>20	2,49
16	Resistenza	8	>20	2,33
17	Resistenza	6	>30	2,48

<b>18</b>	Forza	24,5	>20	2,49
<b>Media±SE</b>		11,7±2,8		2,17±0,1

Tab. 6 attività ricreative per ogni soggetto: **1, 2, 4 e 5**: sollevamento pesi; **3**: staffetta; **4**: scattista; **12**: sollevamento pesi; **13**: ciclismo e allenamento di resistenza; **14**: tennis calcio, sci (inverno) and ciclismo (estate); **15**: ciclismo, nuoto, sollevamento pesi e sci (inverno); **16**: pattinaggio in linea, nuoto, ciclismo (estate), sci (inverno); **17**: corsa 100-800 metri; **18**: decathlon, hockey su ghiaccio, sci alpino e ice gliding (inverno), nuoto (estate).

Significatività statistica: <sup>a</sup> non significativo vs. senior physically active,  $p > 0.05$ ; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs. sedentary seniors, but not vs. senior sportsmen; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  vs. young men and senior physically active; <sup>d</sup>  $p < 0.05$  vs. sedentary seniors, but not vs. young men.

#### 4.1.3. Analisi morfometriche

Sulla base della nostra esperienza con biopsie muscolari da pazienti paraplegici a causa di danni alla colonna vertebrale sia con atrofia derivante da lesioni del motoneurone centrale o atrofia estrema causata dalla mancanza di innervazione secondaria fino a completa lesioni del motoneurone periferico, vengono identificate come denervate le fibre muscolari con un diametro inferiore a 30  $\mu\text{m}$  (Kern H, 2004, 2008, 2010; Boncompagni S, 2007; Zampieri S, 2010). La nostra interpretazione di definire questo tipo di fibre come denervate è rafforzata dal fatto che la metà di queste piccole fibre in realtà presentano un diametro inferiore ai 25  $\mu\text{m}$  e che molte hanno una forma molto angolata. In questo studio, sezioni seriali di biopsie muscolari dei giovani rivelano che miofibre aventi un diametro inferiore a 30  $\mu\text{m}$  sono infrequenti (0,4%; Tab. 7) e che quelle con un diametro inferiore a 25  $\mu\text{m}$  sono ancor meno abbondanti (0,2% ; Tab. 7); la stragrande maggioranza delle fibre muscolari in queste sezioni sono prevalentemente rotondo (Fig. 11 A, B). Le sezioni muscolo degli anziani sedentari (Fig. 11 C, D) e anziani fisicamente attivi (Fig. 11 E, F) si rivelano più abbondanti di fibre muscolari con diametri inferiori a 30 e 25  $\mu\text{m}$  (Tab. 7), e alcune di queste presentano un forma angolata molto marcata (Fig. 11, frecce bianche). Inoltre, la figura 11 mostra che, negli anziani sedentari, le fibre piccole e angolate mostrano una espressione accentuata di N-CAM, un marcatore di denervazione accettato (Dickson G, 1987). Le biopsie prese da anziani sedentari contengono la più alta percentuale di fibre muscolari denervate aventi un diametro inferiore a 30  $\mu\text{m}$  (6,5%) e di quelle aventi un diametro inferiore a 25  $\mu\text{m}$  (2,6%). Queste percentuali sono significativamente superiori a quelli degli altri 2 gruppi, mentre le percentuali di fibre denervate non sono significativamente diverse tra i giovani e gli anziani fisicamente attivi (Tab. 7). Inoltre, l'anticorpo diretto contro N-CAM ha marcato in maniera molto debole le biopsie di anziani attivi, mentre nelle sezioni dei giovani

il segnale era praticamente assente (Fig. 12). Infatti, in uno studio precedente, è stata osservata solo la presenza di una fibra N-CAM positiva tra le 10,000 analizzate nelle biopsie di giovani (Kern H, 2011).

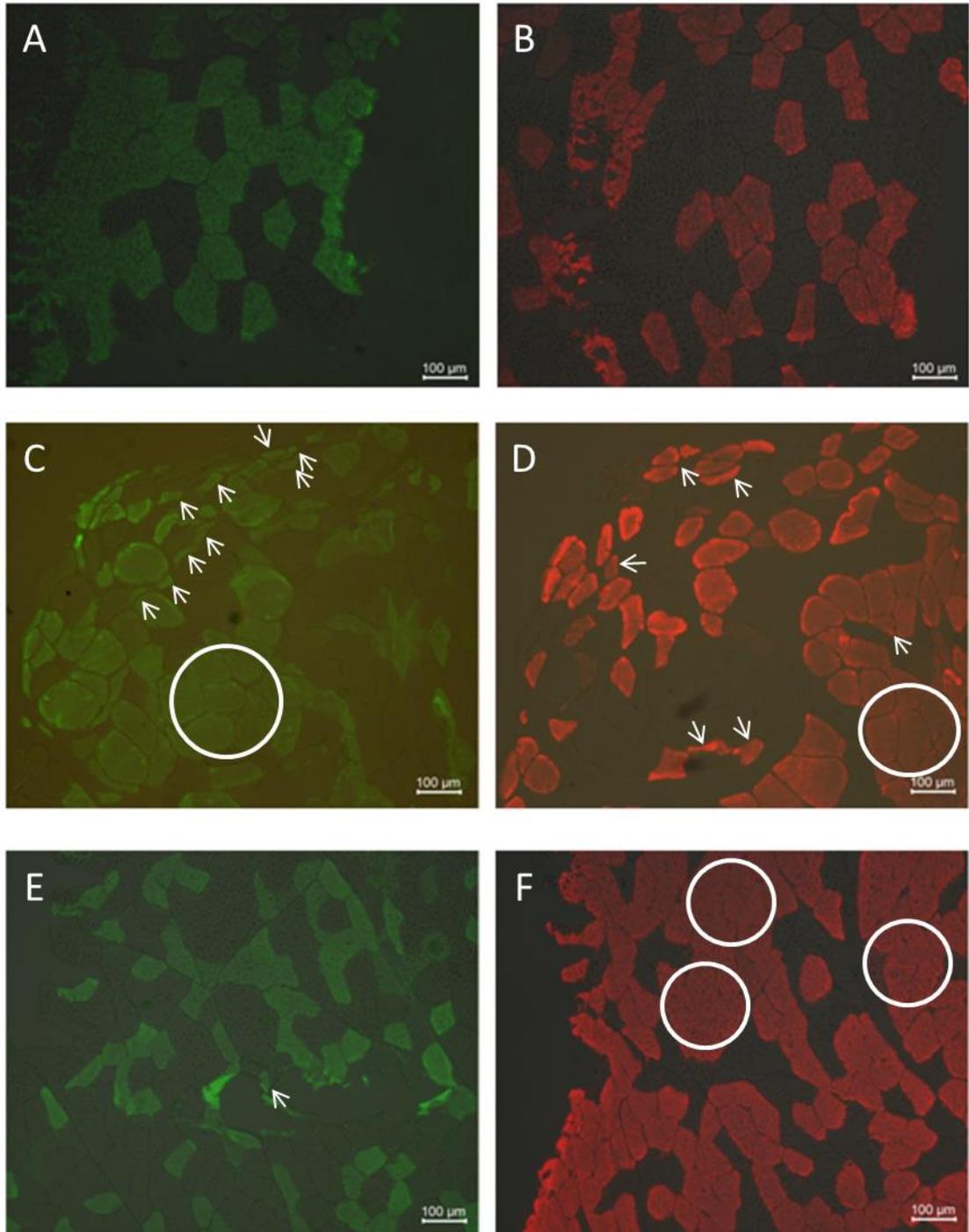


Fig. 11 (A-F) Immunofluorescenza contro le catene pesanti della miosina (MHC) rapide (A, C, E) and lente (B, D, F) in sezioni seriali di biopsie di giovani (A, B), anziani sedentari (C, D) e anziani fisicamente attivi (E, F). le frecce bianche indicano fibre piccole e angolate; i cerchi bianchi mostrano fiber-type grouping. Gli anziani fisicamente attivi

presentano poche fibre di piccole dimensioni ma più raggruppamenti isotipici rispetto agli anziani sedentari. Le dimensioni delle fibre nelle biopsie degli anziani fisicamente attivi sono comparabili a quelle dei giovani.

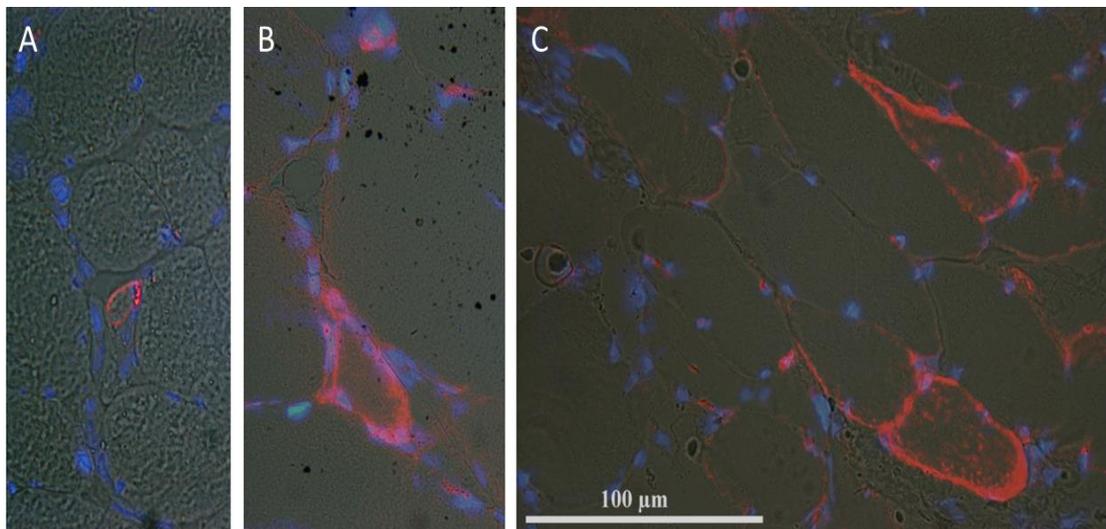


Fig. 12 N-CAM (Neural cell adhesion molecule), marker di denervazione e di rigenerazione non neurale, viene espresso nelle miofibre delle biopsie ottenute dagli anziani. (A-C) fibre piccole, angolate e positive per l’N-CAM (rosso) sono state identificate nelle biopsie muscolari degli anziani sedentari. Sulla base dei loro aspetti morfologici peculiari, delle loro dimensioni e della loro espressione di N-CAM, queste fibre possono essere definite come denervate. I nuclei sono marcati con DAPI (blu). Scale bar = 100 µm.

Diametri delle miofibre					
		<30 µm		<25 µm	
Soggetti	#Biopsie	%	ANOVA	%	ANOVA
<b>Giovani Atleti</b>	10	0,4 *	si	0,2 *	si (vs Anziani Sedentari)
<b>Anziani Sedentari</b>	10	6,5 †	si	2,6 †	si (vs Anziani Attivi)
<b>Anziani Attivi</b>	10	1,8 *	no	0,4 *	no (vs Giovan Atleti)

Tab. 7 Percentuali di fibre aventi diametro inferiore a 30 µm e 25 µm per ognuno dei 3 gruppi. I valori sono espressi come percentuali rispetto al numero totale delle fibre dei muscoli analizzati. Le parentesi si riferiscono ad entrambe le colonne. \*† Simboli diversi significano che c’è significatività statistica,  $p < 0.05$  ANOVA.

#### 4.1.4. Analisi delle catene pesanti della miosina (MHC)

Analisi di immunofluorescenza hanno rivelato proteine MHC sia di tipo rapide che lente in sezioni seriali di biopsie muscolari dei giovani uomini (Fig, 11 A, B), con le fibre rapide leggermente più abbondanti rispetto alle fibre lente (Tab. 8). È interessante notare che questo modello di distribuzione del tipo di fibra non è molto diverso da quella osservato nello stesso muscolo degli anziani sedentari, anche se quest'ultimo presenta una popolazione di fibre lente leggermente più abbondante rispetto ai giovani (Fig 11 C, D; Tab. 8), Tuttavia, negli anziani attivi (Fig, 11 E, F), la presenza di fibre di tipo lente è maggiore rispetto alle agli altri due gruppi (68,5%); l'incremento è significativo sia contro i giovani (42% fibre lente) sia rispetto gli anziani sedentari (46% fibre lente) (Tab. 8). I raggruppamenti isotipici, definiti come aggregati di fibre composti da una fibra centrale contornata da fibre dello stesso tipo, erano quasi assenti nei giovani uomini; tuttavia, i raggruppamenti isotipici sono presenti in quantità maggiore nei soggetti anziani, soprattutto nelle sezioni degli anziani fisicamente attivi; in questo ultimo caso la maggior parte dei raggruppamenti isotipici sono di tipo lente, mentre quelli negli anziani sedentari sono principalmente di tipo rapide. Le percentuali di raggruppamenti isotipici sono determinate in base al conteggio del numero di fibre muscolari nella biopsia che sono circondate da fibre dello stesso tipo e dividendo tale numero per il numero totale di fibre. Per evitare problemi legati alla presenza di molte diverse isoforme di MHC rapide, è stato utilizzato un anticorpo anti-MHC rapide che non discrimina tra le isoforme rapide; pertanto, i raggruppamenti di fibre si descrivono come solo "lente" o solo "rapide". Le sezioni muscolari dei giovani presentano pochi raggruppamenti isotipici, e quelli che sono stati rilevati sono principalmente di tipo rapide (1 %; Fig 11; Tab. 8). Negli anziani sedentari, anche se sono presenti entrambi i raggruppamenti isotipici di tipo rapide e lente, i raggruppamenti isotipici di tipo rapide (3,0%) sono più numerosi del tipo lente (0,5%) (Tab. 8). Degno di nota è il fatto che le biopsie prese da anziani fisicamente attivi hanno la più alta percentuale di raggruppamenti isotipici di tipo lente, con una media del 7,9%, raggiungendo quasi il 25% in casi estremi, in cui il 93% del totale delle fibre era del tipo lente (Tab. 8). E' opportuno sottolineare che gli anziani fisicamente attivi con la presenza di neuropatie o miopatie elettromiografiche non sono i soggetti con il maggior contenuto di fibre lente e raggruppamenti isotipici di tipo lente.

#### 4.1.5. Fibre coesprimenti sia miosine di tipo Rapido che Lento

Fibre muscolari coesprimenti sia MHC rapide che lente sono sparse in tutte le biopsie analizzate, e non ci sono differenze significative tra i vari gruppi in termini di numerosità (Tab.

8). Tuttavia, le sezioni seriali di anziani sedentari mostrano la presenza di fibre coesprimenti di piccole dimensioni e angolate (denervate) (Fig. 13 C, D, frecce bianche); pertanto, questo fatto suggerisce che si tratta di fibre di tipo lente che coesprimono isoforme rapide di MHC attraverso programmi miogenici predefiniti. Al contrario, le fibre muscolari negli anziani fisicamente attivi che sono positive sia per MHC rapide (verde) che lente (rosso) le sono di dimensioni simili alle miofibre di tipo “puro” solo rapide o solo lente (Fig. 13 C). In Figura 13 C, è interessante notare che, anche se alcune fibre sono verdi e altre sono di colore rosso, non tutte le fibre hanno la stessa intensità di colore. Ciò potrebbe indicare che queste fibre contengono alcune combinazioni variabili di MHC rapide e lente tali da essere più simili ad una fibra di tipo puro rispetto ad una coesprimente.

<b>Composizione del muscolo</b>					
<b>Fibre Muscolari</b>			<b>Raggruppamenti Isotipici</b>		
<b>Fibre Coesprimenti (%)</b>	<b>Rapide (%)</b>	<b>Lente(%)</b>	<b>Rapidi (%)</b>	<b>Lenti (%)</b>	
Giovani					
0,0	56,3	43,8	0,0	0,0	
1,4	54,8	45,2	0,0	0,0	
1,4	52,5	47,5	0,0	0,0	
0,0	64,8	35,2	6,7	0,0	
0,7	60,1	39,9	0,8	0,3	
0,4	64,0	36,0	0,6	0,0	
0,0	53,6	46,4	0,0	0,0	
0,9	54,4	45,6	0,5	0,0	
0,0	59,7	40,3	0,4	0,0	
0,2	60,0	40,0	0,7	0,0	
<b>media</b>	<b>0,5*</b>	<b>58,0*</b>	<b>41,9*</b>	<b>0,9*</b>	<b>0,03*</b>
Anziani sedentari					
0,0	56,6	43,4	0,5	0,0	

3,3	53,1	46,9	1,8	0,9	
4,2	51,6	48,4	2,2	0,9	
0,0	80,3	19,7	15,8	0,0	
3,5	59,5	40,5	2,1	0,0	
1,9	59,7	40,3	1,9	0,0	
3,5	59,1	40,9	4,7	0,0	
0,0	48,4	51,6	0,0	0,9	
0,0	32,5	67,5	0,0	1,5	
1,5	37,3	62,7	1,0	0,4	
<b>media</b>	<b>1,7*</b>	<b>53,8*</b>	<b>46,1*</b>	<b>3*</b>	<b>0,4*</b>
Anziani fisicamente attivi					
2,2	6,9	93,1	0,0	25,2	
0,4	46,5	53,5	0,3	1,1	
0,1	25,9	74,1	0,2	12,6	
0,8	33,5	66,5	0,0	5,1	
1,0	23,5	76,5	0,0	9,9	
0,2	20,7	79,3	0,0	10,9	
0,1	35,4	64,6	0,1	2,8	
0,3	38,1	61,9	0,2	2,1	
0,2	57,4	42,6	0,2	0,4	
0,6	26,7	73,3	0,0	8,4	
<b>media</b>	<b>0,5*</b>	<b>31,4†</b>	<b>68,5†</b>	<b>0,1*</b>	<b>7,8†</b>

Tab. 8 Composizione della popolazione di fibre muscolari ottenuta tramite immunofluorescenza (MHC Rapide e Lente) per ognuno dei tre gruppi analizzati. I valori sono espressi come percentuali rispetto al numero totale delle fibre dei muscoli analizzati. Le parentesi si riferiscono ad entrambe le colonne. I gruppi aventi simboli differenti sono statisticamente diversi,  $P < 0,05$  AVOVA.

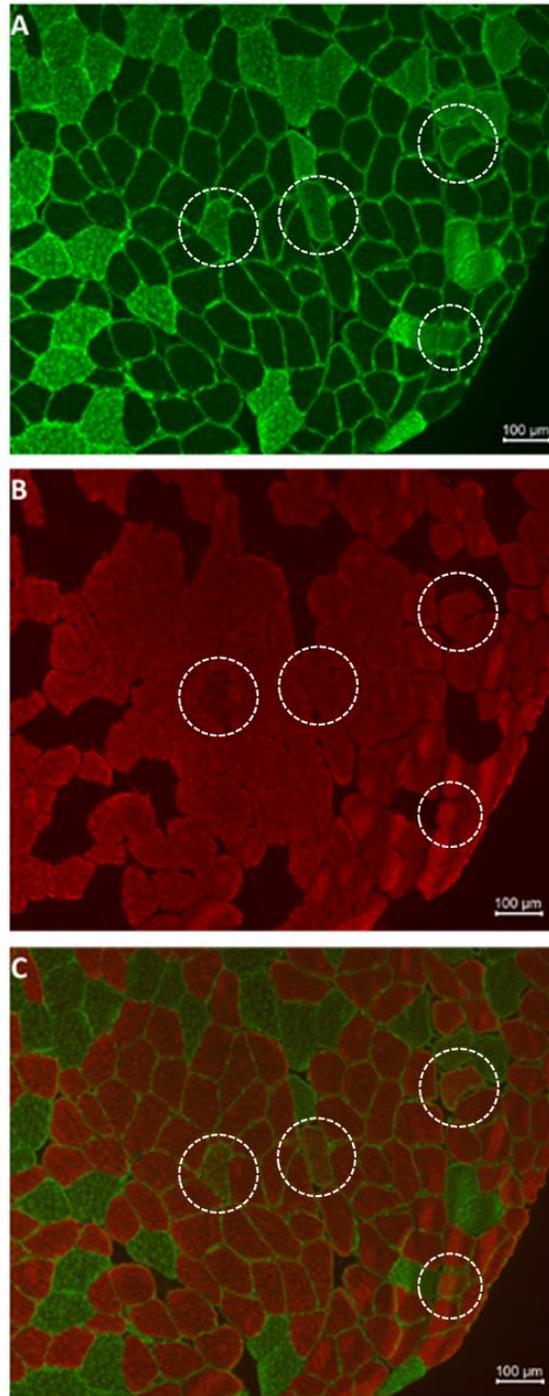


Fig. 13 analisi di immunofluorescenza delle MHC Rapide e Lente per determinare la presenza di fibre coesprimenti per entrambe le miosine. Nella sovrastante sezione derivata da un anziano fisicamente attivo (A-C) le fibre Rapide e la laminina sono state marcate in verde (A); le fibre Lente sono state marcate in rosso (B). Le fibre muscolari che coesprimono entrambe le MHC sono marcate con varie tonalità di giallo/arancione (cerchi bianchi in C) in proporzione alla predominanza di una delle due miosine. Il numero di fibre coesprimenti è ben lontano rispetto a quello appartenente ad una unità motoria.

#### 4.1.6. Fibre di tipo lento ed esercizio

Nelle sezioni di muscolo degli anziani fisicamente attivi si nota la presenza di una forte correlazione tra le percentuali di fibre lente e raggruppamenti isotipici lenti ( $R^2 = 0,82$ ; Fig. 5), ma non vi è alcuna correlazione tra le percentuali di fibre lente e il tipo prevalente di allenamento intrapreso dagli anziani fisicamente attivi (Fig. 14). Infatti, i simboli che indicano se i soggetti avevano eseguito principalmente l'allenamento della forza, allenamento di resistenza, o una combinazione di entrambi i corsi di di forza e resistenza (mista) sono distribuiti in modo casuale tra biopsie muscolari poco o altamente trasformate. L'età dei senior non è correlata con le percentuali di fibre lente e raggruppamenti isotipici lenti in tutti e due i gruppi di anziani come mostrato in seguito: 1) gli anziani sedentari, età rispetto percentuale di fibre lente,  $R^2 = 0,12$ ; età contro percentuale di raggruppamenti isotipici lenti,  $R^2 = 0,02$ ; e 2) gli anziani fisicamente attivi, di età contro la percentuale di fibre lente,  $R^2 = 0,25$ ; età contro percentuale di raggruppamenti isotipici lenti,  $R^2 = 0,27$ .

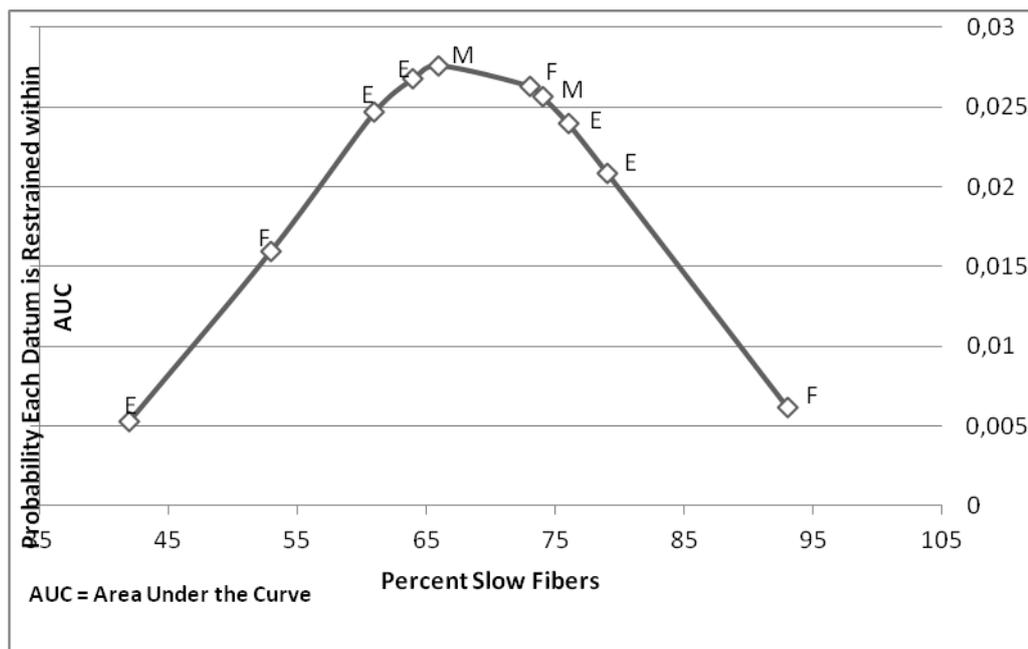


Fig. 14 le percentuali di fibre lente nelle biopsie muscolari raccolte dagli anziani fisicamente attivi sono indipendenti dal tipo di esercizio fisico (E, endurance; S, strength; or M, mixed) eseguito dai singoli individui. I dati estrapolati sono disposti in modo randomico, rispetto al tipo di esercizio, all'interno della distribuzione normale prodotta quando la percentuale di fibre lente viene plottata contro la probabilità che ogni dato cada all'interno dell'area sottesa alla curva.

## 4.2. ESERCIZIO FISICO CONTRO ELETTROSTIMOLAZIONE NELL'ANZIANO

### 4.2.1. Test funzionali

Per valutare la mobilità, la fragilità e il rischio di cadere, è raccomandata l'analisi del comportamento in condizioni difficili attraverso test funzionali come TUGT e SPPB (Freiberger E, 2013; Viana JU, 2013),

- *time up and go test* in cui veniva misurato il tempo impiegato per alzarsi da una sedia, percorrere 3 metri e tornare indietro a sedersi, il più velocemente possibile,
- *breve circuito per valutare la funzionalità degli arti inferiori* che comprendeva la valutazione dell'andatura (ampiezza del passo), la valutazione della capacità di mantenere l'equilibrio per 10s e la misurazione del tempo impiegato per alzarsi dalla sedia il più velocemente possibile per 5 volte con le braccia incrociate sul petto,
- *test delle scale* in cui veniva misurato il tempo impiegato per salire e scendere 12 scalini in sicurezza e il più velocemente possibile,
- *test dei 10 metri* in cui veniva misurato il tempo impiegato per percorrere una distanza di 10 metri a passo svelto senza correre,
- *test della forza isometrica massima* Una misurazione isometrica su un dinamometro con flessione dell'anca di 90° e flessione del ginocchio di 60° (estensione completa del ginocchio =0°) è stata eseguita tre volte per ogni gamba per valutare la forza degli estensori del ginocchio sinistro e destro.

Tramite il protocollo di elettrostimolazione, abbiamo migliorato (cioè, abbreviato) il tempo TUGT (-16,4%  $\pm$  6,1CI,  $p < 0,0005$ ) e aumentato il SPPB Score (+ 11,2%  $\pm$  6,8CI,  $p < 0,005$ ) (Tabella 1), con una conseguente maggiore mobilità negli anziani reclutati per questo studio. Per gli adulti più anziani, la possibilità di salire da una sedia e sedersi cinque volte consecutivamente è un parametro per misurare il grado di indipendenza (Corrigan D, 2001, Freiberger E, 2013) ed è considerato come un indice di forza muscolare (Bohannon RW, 1997). Dal momento che il test è specifico per la forza e la potenza muscolare dei muscoli della parte bassa del corpo, il significativo miglioramento pre-post-test (-23,9%  $\pm$  8,6CI,  $p < 0,005$ ), del 5xChair Rise Test indica un effetto dell'allenamento di ES (Tab. 9). La coppia isometrica massima, un fattore importante per l'andatura e la funzione fisica e un fattore chiave contro sarcopenia (Cruz-Jentoft AJ, 2013) sviluppato dai quadricipiti (+ 6,0%  $\pm$  4,9CI,  $p < 0,05$ ), era significativamente migliorato dal training di ES (Tab. 9). La capacità di salire le scale in modo sicuro e veloce è una prestazione essenziale di forza eccentrica e concentrica delle estremità inferiori per la vita quotidiana (Rejeski WJ, 1995). La diminuzione significativa del tempo del

5×Chair Rise Test (-21,1% ± 10,8CI, p <0,05) nei soggetti trattati con ES indica una migliore prestazione e sicurezza per l'ADL (Activities of Daily Living) (Tab. 9). La velocità del passo è rilevante per l'adattamento degli anziani nella comunità ed è un predittore importante per l'insorgenza di disabilità, infatti, è comunemente utilizzato da fisioterapisti e altri medici (Guralnik JM, 2000; Bohannon RW, 2011) e inoltre è conosciuto come buon predittore per la fragilità (Cruz-Jentoft AJ, 2013; Viana JU, 2013). L'aumento significativo del test dei 10m, che consiste nella più veloce velocità di deambulazione, (+ 5,3% ± 4,6 CI, p <0,05 e + 4,9% ± 3,7CI, p <0,05, rispettivamente) supporta i cambiamenti funzionali ed è un buon indicatore di prevenzione di fragilità e cadute (Tab. 9).

Gli stessi test funzionali sono stati eseguiti anche sui pazienti che hanno effettuato l'allenamento fisico volontario tramite la leg press. Anche in questo caso si sono verificati dei miglioramenti delle prestazioni fisiche post allenamento (10m rapideest speed, 5x chair-rise, Stair-Test e Dynamic Balance), ma a differenza dell'allenamento tramite ES, i pazienti non hanno avuto alcun miglioramento della forza isometrica massima dei muscoli del vastus lateralis. Questo può significare che il protocollo di allenamento volontario, dal punto di vista dei test funzionali, porta ad un miglioramento dei movimenti fatti durante il corso di una giornata. Questi effetti possono essere spiegati col fatto che questo protocollo di leg press riesce a migliorare la mobilità del soggetto senza però potenziare il muscolo o che tramite una sorta di effetto placebo riesce a migliorare la mobilità degli anziani.

<b>Test Funzionali</b>					
		<b>Gruppo (LP)</b>	<b>T-test (P)</b>	<b>Gruppo (ES)</b>	<b>T-test (P)</b>
10m rapideest speed (m/s)	Pre-Training	1,72 ± 0,30	<u>P&lt;0,001</u>	1,76 ± 0,33	<u>0,006</u>
	Post- Training	1,88 ± 0,36		1,91 ± 0,38	
5x chair-rise (s)	Pre-Training	13,20 ± 4,02	<u>P&lt;0,001</u>	13,72 ± 6,63	<u>0,012</u>
	Post- Training	9,45 ± 3,53		9,30 ± 3,46	
Timed up go test (s)	Pre-Training	7,42 ± 1,79	<u>0,049</u>	7,61 ± 1,99	<u>P&lt;0,001</u>
	Post- Training	6,72 ± 2,51		5,98 ± 1,40	
Stair-Test (s)	Pre-Training	11,76 ± 2,50	<u>P&lt;0,001</u>	12,15 ± 4,02	<u>P&lt;0,001</u>
	Post- Training	9,77 ± 3,07		9,43 ± 2,90	
Torque/Weight (Nm/kg)	Pre-Training	1,27 ± 0,40	0,0941	1,38 ± 0,66	<u>0,014</u>
	Post- Training	1,37 ± 0,40		1,56 ± 0,77	

Dynamic Balance (mm)	Pre-Training	17,58 ± 3,53	<u>0,0183</u>	14,85 ± 3,69	0,076
	Post- Training	16,39 ± 2,75		14,12 ± 2,99	

Tab. 9 Riassunto dei risultati ottenuti dai test funzionali ottenuti prima e dopo le due tipologie di allenamento. Per ogni categoria di test è stato eseguito un test T per verificare la variazione è stata significativa o meno ( $\alpha=0,05$ )

#### 4.2.2. Analisi morfologiche e morfometriche delle biopsie

In seguito agli effetti funzionali ottenuti tramite il protocollo di elettrostimolazione (per la demografia dei soggetti vedere paragrafo 3.2.1 della sezione metodi), si è voluto esaminare se erano associabili a dei miglioramenti muscolari a livello morfologico. L'elettrostimolazione ha mantenuto la dimensione media complessiva delle fibre invariata (Fig. 15, Tab. 10), mentre si è verificato un aumento significativo del diametro delle fibre rapide e una diminuzione di quelle di tipo lente (Fig 15; Tab. 10). Sono stati osservati anche cambiamenti nella distribuzione del tipo di fibre, anche se non in modo statisticamente significativo (Tab. 10). Da notare, nessun segno di fibrosi e/o di infiltrazioni di cellule infiammatorie è stato rilevato nei muscoli trattati (Fig. 15). Inoltre, analisi di ultrastruttura non hanno visualizzato nessuna alterazione della struttura muscolare prima e dopo il trattamento, nè differenze nella frequenza e posizione delle unità di rilascio del calcio (CRU) e dei mitocondri tra i due gruppi di campioni.

Anche nel gruppo di pazienti trattati tramite il protocollo leg press (LP) (per la demografia dei soggetti vedere paragrafo 3.2.1 della sezione metodi) sono stati osservati cambiamenti nella distribuzione delle fibre e non sono presenti danni muscolari o segni di fibrosi e/o infiltrazioni di cellule infiammatorie; ma a differenza dell'ES si verifica una diminuzione del diametro delle fibre. Questo dato in concomitanza con il dato dal test della forza massima isometrica, va a rafforzare l'ipotesi che i miglioramenti delle performances dei pazienti sottoposti a questo specifico protocollo di leg press siano dovuti o ad un effetto placebo o ad un semplice miglioramento della mobilità dovuto all'introduzione nella routine di questi anziani di movimenti non abituali.

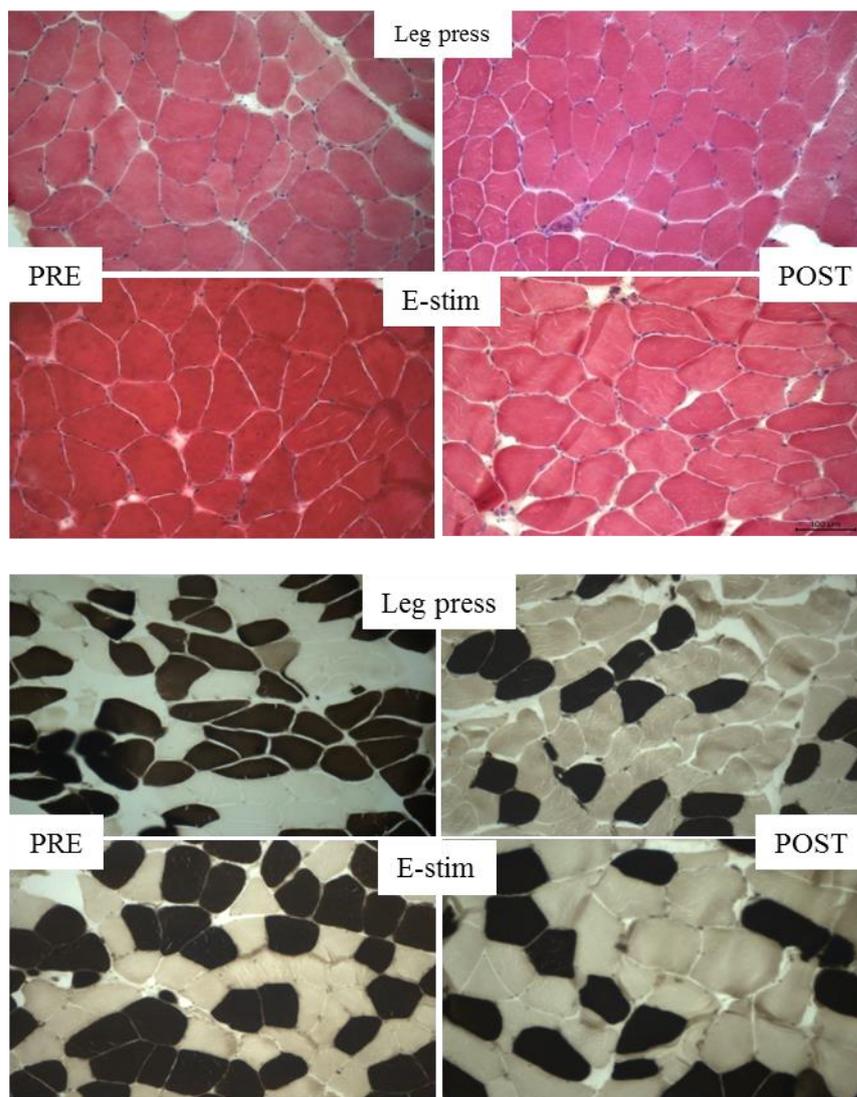


Fig. 15 Morfologia dei muscoli e distribuzione dei tipi di fibre. Tutte le biopsie da noi collezionate non presentano nessun danno da fibrosi e da infiammazione sia prima che dopo le sessioni di allenamento. I trattamenti hanno provocato delle modificazioni della composizione muscolare. Scale Bar = 100 $\mu$ m.

	Allenamento	Diametro medio delle miofibre ( $\mu$ m $\pm$ SE)		t test	Tipo di fibre (%)	
		Lente	Rapide		Lente	Rapide
<b>Pre</b>	LP	*57,07 $\pm$ 18,20	**48,94 $\pm$ 16,31	p<0,001*	57%	43%
	ES	°50,30 $\pm$ 14,78	°°46,53 $\pm$ 14,04	p<0,001**	55%	45%
<b>Post</b>	LP	*52,42 $\pm$ 16,22	**46,29 $\pm$ 16,17	p<0,001°	52%	48%
	ES	°48,48 $\pm$ 16,66	°°47,54 $\pm$ 15,79	p<0,001°°	51%	49%

Tab. 10 Analisi della composizione dei tipi di fibre prima e dopo le sessioni di allenamento di ES e LP. È stata rilevato un aumento significativo del diametro e del numero di fibre rapide dopo il trattamento di ES, mentre non si hanno miglioramenti di dimensioni dopo la LP ma solo un aumento del numero di fibre rapide.

#### 4.2.3. Attivazione dei pathway molecolari da parte dell'ES e dell'LP

I pathways delle chinasi e delle fosfatasi sono essenziali per la risposta adattativa del muscolo a multipli stimoli contrattili. Numerosi studi hanno recentemente designato il fattore Cn-NFAT (calcineurin–nuclear factor of activated T-cells) come pathway di segnalazione per la regolamentazione del passaggio da un tipo di fibra ad un altro dipendente dall'attività fisica nei muscoli scheletrici adulti dei mammiferi. In questo lavoro di tesi la traslocazione di NFATc1 dal citoplasma della fibra al nucleo (noto anche come NFATc o NFAT2) e la fosforilazione di CaMKII sono stati scelti per monitorare se ES e LP attivano pathway molecolari nel muscolo scheletrico. Anche se è ampiamente accettato che NFATc1 agisce come un sensore dell'attività del nervo, non si sa se l'ES essendo un training di tipo non volontario possa stimolare la traslocazione nucleare di NFATc1.

##### 4.2.3.1. Espressione endogena basale di NFATc1 ed effetti dei training sulla traslocazione.

Al fine di verificare l'attivazione della via, i campioni sono stati sottoposti a uno studio di localizzazione subcellulare di NFATc1, in quanto la traslocazione dal citoplasma al nucleo del fattore di trascrizione rappresenta un indice del suo stato di attivazione. Nella figura 16 sono mostrate alcune sezioni rappresentative di biopsie umane ottenute da muscoli del vastus lateralis prima (controllo) e dopo l'allenamento. La localizzazione di NFATc1 nelle fibre è eterogeneo in tutti i campi esaminati: in alcune fibre, sparse in tutta la sezione, è possibile notare una colorazione del citoplasma (asterischi di pannelli b, h), con un caratteristico pattern puntinato, mentre le altre fibre del campo sono negative. Il mioplasma delle fibre positive e negative per NFATc1 sono rilevabili anche in sezioni longitudinali (non mostrate). A livello del sarcolemma, alcune fibre mostrano regioni focali che si colorano intensamente per NFATc1 (freccie in pannelli e, m). Questi punti con maggiore intensità di fluorescenza sono localizzati lungo la periferia delle fibre e co-localizzano con i nuclei della fibra identificati tramite colorazione col DAPI (blu). Questi nuclei sono classificati come nuclei NFATc1-positivi (vedi anche pannelli OQ); alcuni esempi sono evidenziati dalle freccie negli ingrandimenti f, n. In altre zone colorazione rosso è periferico e circonda il nucleo, invece di co-localizzare con esso (punte di freccia pannelli c, i) questi nuclei sono classificati come negativi (pannelli rz). Infine in altre

fibre la colorazione a livello della periferia nucleare è molto debole e anche in questo caso i nuclei sono stati contati come negativi.

Dopo i protocolli di ES e LP la colorazione a livello del sarcolemma si diversifica. Le caratteristiche più evidenti sono l'aumento di segnale positivo a livello della periferia nucleare e a livello del sarcolemma. Queste osservazioni qualitative indicano che è possibile rilevare molti nuclei positivi per NFATc1 dopo l'allenamento e che a livello della periferia delle fibre è presente un aumento di segnale positivo per NFATc1. La valutazione quantitativa di queste osservazioni è stata eseguita confrontando la frazione di nuclei positivi per NFATc1 sul numero di nuclei totali sia per le sezioni muscolari prima che dopo l'allenamento. Tutti i nuclei, indipendentemente dalla isoforma della miosina della fibra, sono stati inclusi nell'analisi. Come mostrato nella Tabella 11 dopo entrambi i tipi di allenamento (ES e LP) si verifica un aumento significativo (dal 3% al 59,1% dopo ES e dal 3% al 58,8% dopo LP) dei nuclei positivi per NFATc1. Presi insieme questi dati mostrano che NFATc1 trasloca in nuclei su ES e LP e suggeriscono fortemente che la via CAN-NFAT viene attivata sia dall'esercizio volontario che involontario.

#### 4.2.3.2. Analisi dell'attivazione del pathway della CamkII pre e post allenamento

Per determinare se i protocolli di ES e LP hanno attivato o meno la via della CaMKII sono stati messi a punto una serie di esperimenti di western blot per valutare il livello di espressione della forma attivata dell'enzima ovvero la forma fosforilata (p-CaMKII). In figura 17 sono mostrati i profili proteici degli omogenati totali derivanti dalle biopsie prelevate prima e dopo le sessioni di allenamento; per ogni lane sono stati caricati 5µg di proteine e come si può notare dal confronto qualitativo i pattern proteici sono molto simili. Inoltre è stato caricato insieme agli omogenati da analizzare anche un campione comune, a tutti i gel, da usare come normalizzatore durante le analisi successive. Lo sviluppo tramite ECL dell'anticorpo anti-P-CaMKII riconosce una singola banda attorno ai 50 kDa che risulta compatibile con il peso molecolare previsto per le subunità fosforilate della CaMKII. L'analisi di densitometria quantitativa ha mostrato un aumento significativo della P-CaMKII negli omogenati ottenuti dopo il periodo di allenamento sia per l'ES che per la LP (Fig. 17). Sulla base di questi risultati è possibile affermare che entrambi i tipi di allenamento hanno attivato il pathway delle chinasi.

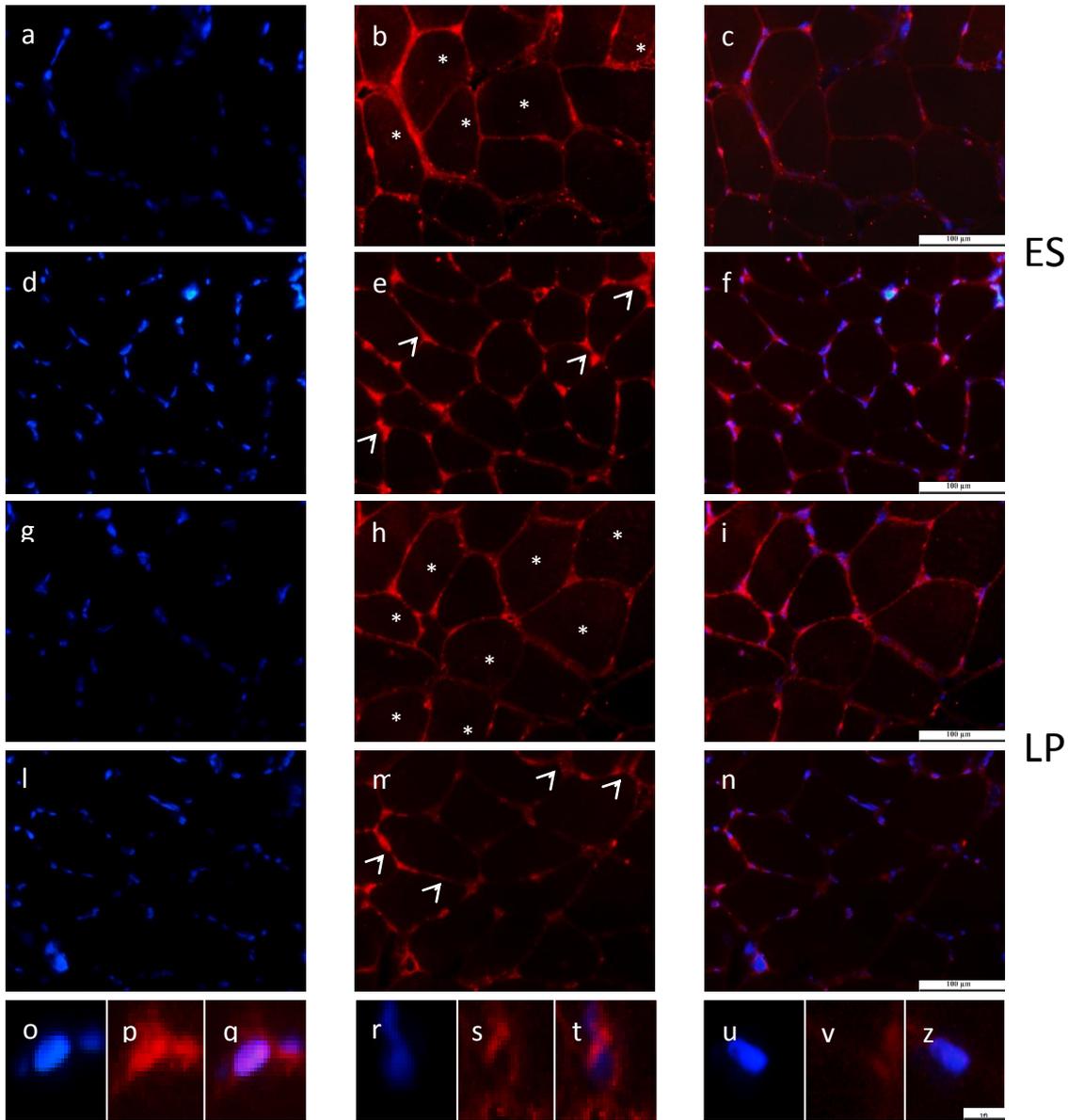


Fig. 16 Immunofluorescenza per la determinazione dell'espressione endogena di NFATc1 nei muscoli pre e post allenamento. Son mostrate in figura sezioni trasversali rappresentative sia per il training tramite ES (a-f) che tramite LP (g-n). In rosso è stato marcato l'NFATc1 mentre I nuclei sono stati rilevaqi tramite DAPI (blu). Gli asterischi indicano fibre con marcatura mioplasmatica per NFATc1 mentre le frecce bianche I nuclei positivi per NFATc1. Scale Bar = 100  $\mu$ m. o-z sono esempi di: nucleo positivo (o-q) e di due nuclei negativi (r-z). Scale Bar = 10  $\mu$ m.

	Nuclei NFATc1 Positivi	Nuclei NFATc1 negativi	Nuclei Totali	% Nuclei NFATc1 positivi
<b>Pre-training</b>	68	2325	2393	2,8
<b>Post LP</b>	636	440	1076	59,1**
<b>Post ES</b>	1187	831	2018	58,8**

Tab. 11 Analisi quantitative di nuclei positivi per NFATc1 delle sezioni trasversali dei muscoli pre e post allenamento. Le analisi sono state eseguite su una sottopopolazione casuale per ognuno dei due trattamenti; per l'ES n=5 soggetti e per la LP n=4 pazienti, per ognuna delle sezioni prese in esame sono state prese e analizzate 5 foto randomiche. \*\* i simboli mostrano una differenza significativa contro il gruppo pre allenamento (ANOVA con correzione di Bonferroni  $p < 0.05$ ).

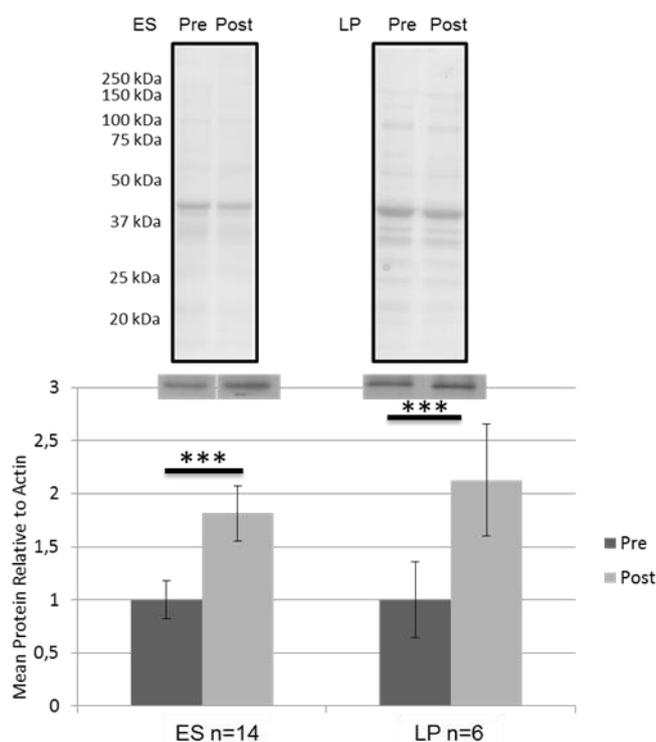


Fig. 17 Valutazione Quantitativa dell'espressione della p CaMKII negli omogenati totali delle biopsie pre e post allenamento. Il pannello mostra il profilo proteico degli omogenati totali (10  $\mu$ g per lane), di due soggetti prima e dopo le sessioni di allenamento, e sotto a questi due immunoblots raffiguranti lo sviluppo dell'anticorpo anti p CaMKII (tra i 75 e i 45 Kda). Il grafico rappresenta l'analisi di densitometria di tutti i gel effettuati (media $\pm$ SE n=6). L'actina è stata usata per normalizzare il carico delle proteine mentre come normalizzatore tra gel è stato usato un campione comune a tutti i gel. \*\*\* i simboli indicano significatività statistica ANOVA con correzione di Bonferroni  $P < 0,001$ .

#### 4.2.4. Effetti dell'ES e dell'LP sulla composizione proteica dell'SR

Per studiare se i protocolli di ES e LP modulano l'espressione delle proteine leganti il calcio del reticolo sarcoplasmatico, sono stati messi a punto dei protocolli per l'analisi delle proteine principali che compongono l'apparato del reticolo sarcoplasmatico. Dati interessanti sono stati ottenuti utilizzando anticorpi diretti contro SERCA1-2 calsequestrina 1-2 e Sarcalumenin come

mostrato in figura 18. La valutazione quantitativa di tutte le proteine, tramite densitometria, mostra un aumento significativo di SERCA2 e Sarcalumenina e una diminuzione di CASQ1 dopo ES. L'espressione delle altre proteine sondate (CASQ2 and SERCA1) non è cambiata. Lo stesso pannello di anticorpi è stato analizzato nei muscoli allenati con il training volontario (LP) ma in questo caso per ognuna delle proteine non sono stati riscontrati cambiamenti significativi dei livelli proteici dopo l'allenamento. Il muscolo vastus lateralis è una miscela di diversi tipi di fibre muscolari, di conseguenza, l'incremento quantitativo medio di SERCA2 e Sarcalumenin negli omogenati totali può essere attribuito a tutte le fibre o ad una specifica sottopopolazione di fibre (cioè fibre a contrazione lenta o intermedia di tipo ossidativo le fibre IIA). Il meccanismo potrebbe essere spiegata attraverso una up-regolazione dei geni di SERCA2 e Sarcalumenina o attraverso l'inibizione della degradazione delle proteine.

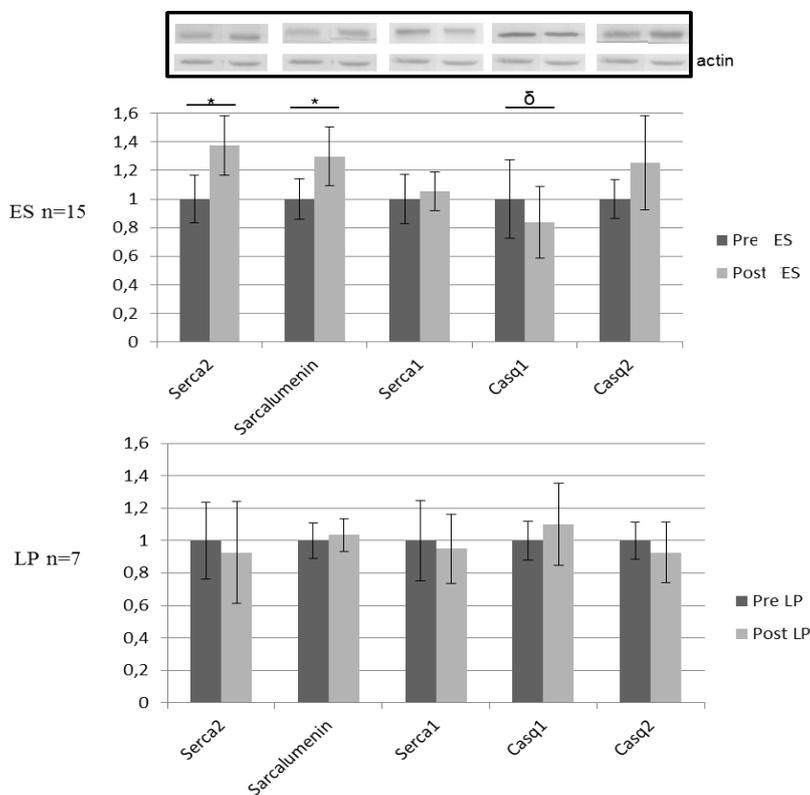


Fig. 18 Valutazione quantitativa dell'espressione delle proteine leganti calcio negli omogenati totali delle biopsie pre e post allenamento (media $\pm$ SE). Il pannello A rappresenta lo sviluppo dell'immunoblot ottenuto usando gli anticorpi specifici per le protein studiate. L'actina è stata usata per normalizzare il carico delle proteine mentre come normalizzatore tra gel è stato usato un campione comune a tutti i gel. L'analisi statistica è stata effettuata tramite un test parametrico: il Wilcoxon test (W significativo \* per  $p < 0.05$ ) mentre per la Sarcalumenina che aveva distribuzione normale è stato usato il test T di Student ( $\delta p < 0.05$ ).

RNA analisi. Analisi di PCR quantitativa (qPCR) sono state effettuate al fine di chiarire se il livello di RNA di Sarcalumenina SERCA2 e CASQ sono regolati dall'elettrostimolazione.

Come mostrato in figura 19 nessuno dei geni viene up-regolato o down-regolato in modo statisticamente significativo dal training tramite ES suggerendo una regolazione a livello post trascrizionale. In questo caso non sono stati analizzati i livelli di mRNA delle biopsie dei pazienti LP in quanto durante le analisi di espressione proteica, non è stata rilevata alcuna differenza statisticamente significativa tra i campioni pre e quelli post training.

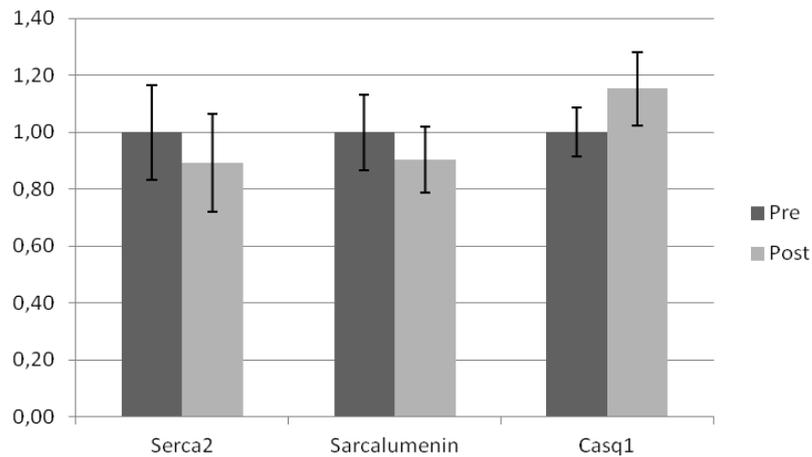


Fig. 19 Analisi dei livelli di RNA dei geni delle proteine dell'SR leganti il calcio nei campioni pre e post ES (media±SE n=14) i livelli di mRNA sono stati normalizzati utilizzando GAPDH attraverso il metodo del delta Ct. Nessuna significatività statistica Wilcoxon test (W significativo \* per  $p < 0.05$ ).

#### 4.2.5. Studio dell'espressione in situ di SERCA2

Come mostrato in precedenza l'ES aumenta il diametro delle fibre a contrazione rapida e diminuisce il diametro delle fibre a contrazione lenta (vedere paragrafo morfometria). L'espressione di rapide-MHC non è sempre legata all'espressione di proteine dell'SR tipica delle fibre a contrazione veloce, soprattutto nei muscoli misti come nel caso del vastus lateralis. Negli esseri umani, per esempio, SERCA2 è espressa nelle fibre di tipo lento (Lamboley CR, 2013), ma anche nelle fibre rapide ossidative. A causa di questo complesso contesto non è possibile prevedere in quali fibre l'espressione di SERCA2 aumenta, come osservato negli omogenati totali. Diverse possibilità sono plausibili: una è che l'aumento di SERCA2 e Sarcalumenin potrebbe verificarsi nelle fibre a contrazione veloce (cioè quelle che aumentano di diametro dopo l'ES, o in fibre ossidative rapide che sono intermedie tra le pure fibre lente o rapide) un altro è che l'aumento di SERCA2 sia a carico delle fibre di tipo lente. Per verificare se l'aumento di SERCA2 è a carico delle fibre rapide nei muscoli trattati tramite elettrostimolazione, sezioni muscolari ottenute prima e dopo gli allenamenti sono state analizzate tramite immunofluorescenza per valutare la co-espressione di MHCII (isoforma

veloce) e SERCA2; per determinare se è un effetto dettato dal tipo di allenamento anche le sezioni dei muscoli trattati con LP sono state analizzate ma in questo caso come controllo. Anche se sia SERCA2 che la Sarcalumenina sono over-espressi nei muscoli trattati con l'ES, SERCA2 è stato scelto per questa analisi perché l'espressione della Sarcalumenina nei muscoli di controllo è distribuita in maniera più omogenea tra fibre del VL (non illustrato) mentre SERCA2, è più specifica per le fibre di tipo lente. Nella figura 20 è mostrato un gruppo rappresentativo di sezioni muscolari colorati attraverso un protocollo di tripla immunofluorescenza: anti-MHCII (rosso), SERCA2 (verde), laminina (verde). I segnali dovuti alla fluorescenza di SERCA2 e MHCII marcano ciascuno di essi circa un 50% delle fibre totali sia prima che dopo ES e LP, mentre il segnale verde del sarcolemma (laminina) è rilevabile in tutte le fibre, come previsto. In qualche caso sono state trovate alcune fibre colorate sia in rosso che in verde (si veda ad esempio figura 20 pannelli f, n asterischi). Questa osservazione conferma che a questo livello di rilevamento, la maggior parte delle fibre a contrazione veloce (rosso) non esprime SERCA2 (verde, ad esempio pannelli h), e che una piccola popolazione di (SERCA2/MHCII) fibre miste è presente sia prima che dopo i trattamenti di ES e LP. L'analisi quantitativa è stata eseguita attraverso una conta manuale di tutti i tipi di fibra riscontrati; sono state considerate come miste solo le fibre che mostravano una inconfondibile e innegabile fluorescenza per entrambe le sonde citoplasmatiche (Tab. 12). Circa 800 fibre sono state contate manualmente per ciascuna sezione da due operatori indipendenti. Nei muscoli prima dell'allenamento sono state trovate il 1,4% e il 2,9% di fibre coesprimenti sia SERCA2 che MHCII rispettivamente per il gruppo ES e per il gruppo LP. Questi risultati sono in accordo con le analisi biochimiche effettuate su singole fibre (Lamboley CR, 2013) nelle quali è stata descritta una piccola percentuale (meno del 5%) di fibre miste MHCII/MHCI/SERCA1/SERCA2. Dopo l'ES il numero di fibre miste SERCA2/MHCII è significativamente aumentato (4,9% in media), mentre è rimasto invariato dopo LP. La morfologia delle fibre miste era eterogenea, alcuni erano piccole e angolare (Fig. 20 pannelli a, c) altre erano grandi di forma arrotondata (Figura 20 pannelli d, f). Le fibre miste non mostravano nuclei centrali come indicato dalla controcolorazione DAPI dei nuclei (non mostrato). Presi insieme questi risultati mostrano che una popolazione di fibre a contrazione rapida che esprimono SERCA2 dopo 9 settimane aumenta di numero nei muscoli elettrostimolati ma rimane invariato dopo il trattamento con LP. Un'altra osservazione sulla natura eterogenea delle fibre miste è che alcune presentano un'intensità di fluorescenza di anti MHCII più bassa delle fibre rapide circostanti, (si veda ad esempio la fibra centrale della figura 20 pannello d). Dall'analisi dell'intensità della fluorescenza di MHCII è risultato che l'1,9%, 1,1% di fibre a contrazione rapida presentano un segnale MHCII inferiore rispettivamente nelle

sezioni post-ES e post LP (le fibre che presentano meno del 50% del segnale di MHCII sono state incluse), circa il 50% di tali fibre erano anche SERCA2 positive. Da queste osservazioni possiamo concludere che le fibre miste per MHCII / SERCA2 sono una popolazione eterogenea e che una parte di queste fibre probabilmente esprime le isoforme sia MHCII che MHCI della miosina.

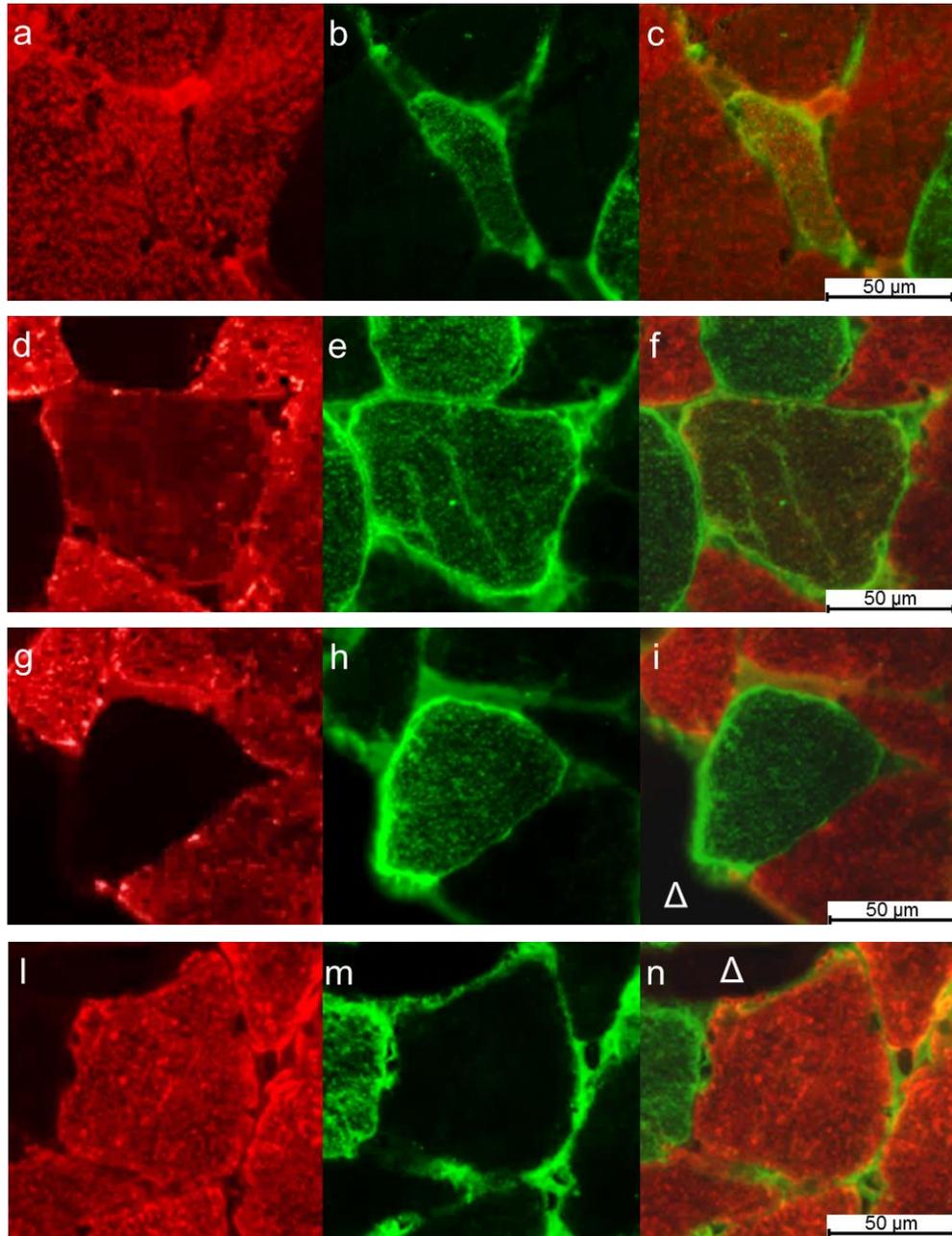


Fig. 20 immunofluorescenza per l'identificazione e per l'analisi morfologica di fibre miste MHCII/SERCA2 delle sezioni muscolari pre e post allenamento. MHCII è stata marcata in rosso mentre SERCA2 e laminina in verde. La popolazione di fibre che esprimono entrambe le proteine è eterogenea come mostrato negli esempi c e f. Δ indica spazi vuoti.

	MHCII/SERCA2 mixed fibers (##±SE)					Rapide & Lente coesprimenti fibers		
	Fibre Totali	Fibre Rapide (MHCII)	MHCII/SERCA 2 mixed fibers	% mixed/Rapide	% mixed/Total	Fibre coesprimenti	% FES/rapide	% FES/Total
<b>Pre-ES (n=9)</b>	823±119,3	488,2±71,3	12,6±4,8	2,6±0,8	1,4±0,4	4,9±2,0	1,1±0,3	0,6±0,2
<b>Post ES (n=9)</b>	936,3±101,2	618,4±83,2	47,4±14,1	7,4±1,5 *	4,9±1,4 *	18,4±4,4	2,9±0,5 *	1,9±0,4 *
<b>Pre-LP (n=5)</b>	769±114,0	438,8±99,7	23,4±4,8	5,6±0,6	2,9±0,4	7,8±1,9	1,9±0,5	1,0±0,2
<b>Post LP (n=5)</b>	557,8±85,8	300,4±122,5	13,8±5,0	4,1±0,9	2,4±0,7	5,8±1,8	1,8±0,5	1,1±0,3

Tab. 12 Valutazione quantitativa delle fibre miste per MHCII/SERCA2 e delle coesprimenti Rapide/Lente nelle sezioni trasversali delle biopsie pre e post allenamento. (media±SE n=9 per l'ES e n=5 per la LP). \* i simboli mostrano una differenza significativa contro il gruppo pre allenamento (ANOVA con correzione di Bonferroni p< 0.05).

#### 4.2.6. Effetto dei protocolli di allenamento su PGC1a

Il prossimo step di questo lavoro si focalizzerà sullo studio dell'effetto dei protocolli di allenamento su PGC1a. PGC - 1 $\alpha$  è un coattivatore trascrizionale che regola i geni coinvolti nel metabolismo energetico e inoltre regola la biogenesi mitocondriale e la funzione. Già in Kern 2014 sono stati studiati i cambiamenti di mRNA di PGC1a durante il protocollo di ES ed è stato visto che avviene una diminuzione di questi ultimi, ma non si sono ancora studiati gli effetti sulla sintesi proteica di questo cofattore. Inoltre visto che tra le sue attività è presente l'attivazione del pathway della calcineurina è sembrato fin da subito un valido obiettivo da esaminare (Summermatter S, 2012). Il primo passo è stato quello di mettere a punto i protocolli di immunofluorescenza e di analisi quantitativa per verificare se in seguito ai protocolli di allenamento si verifica una traslocazione nel nucleo come nel caso dell'NFATc1. Inoltre è stato messo a punto anche un protocollo di western blot per determinare se il calo dell'mRNA sia dovuto ad un aumento della sintesi proteica o ad una regolazione pre traduzionale. Come nel caso dell'NFATc1 sono stati individuate tre situazioni nelle prove di immunofluorescenza nella 21 A è stato individuato un nucleo positivo per PGC1a mentre gli altri due casi sono stati definiti come negativi. Inoltre da analisi di prova di western blot, su tessuto di origine umana, sono state delle bande che possono essere collegate al peso del PGC1a. Il passo successivo sarà

quello di applicare questi protocolli ai gruppi di anziani e determinare gli effetti degli allenamenti su PGC1a.

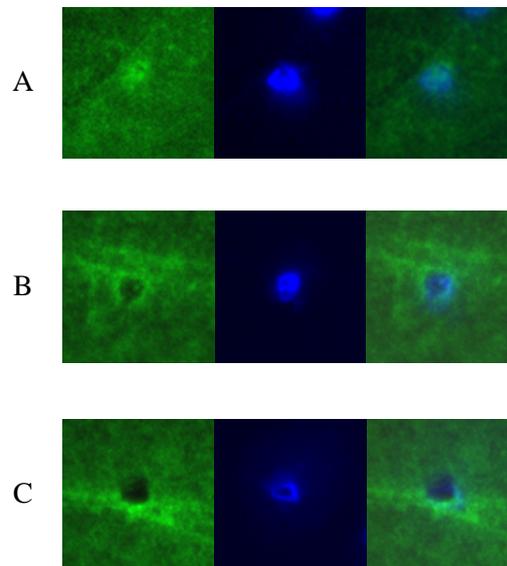


Fig. 21 Immunofluorescenza per la determinazione dell'espressione endogena di PGC1a nei muscoli di vastus lateralis umano.. In verde è stato marcato il PGC1a mentre i nuclei sono stati rilevati tramite DAPI (blu). A-C sono esempi di: nucleo positivo (A) e di due nuclei negativi (B-C). Scale Bar = 10 μm.



## 5. DISCUSSIONE

Questo elaborato di tesi è stata suddiviso in due parti in quanto si vogliono analizzare gli effetti dell'esercizio fisico e di un esercizio fisico indotto tramite elettrostimolazione in due differenti gruppi di anziani. La prima parte considera gli effetti dell'esercizio fisico effettuato in un arco di tempo molto lungo sul muscolo scheletrico di anziani rispetto a due controlli: un gruppo di giovani sportivi e un gruppo di anziani sedentari. La seconda parte invece si concentra sulla convalida o meno dell'elettrostimolazione come terapia alternativa all'esercizio fisico volontario in un gruppo di anziani sedentari.

### 5.1. EFFETTI DELL'ESERCIZIO FISICO PROLUNGATO NEI MUSCOLI DEGLI ANZIANI

Negli ultimi anni la ricerca geriatrica ha focalizzato la sua attenzione sui meccanismi dei potenziali effetti benefici dell'esercizio fisico. In diversi studi è stato, infatti, osservato che l'esercizio fisico si associa ad un miglioramento della performance fisica negli anziani. Un punto ancora povero di risposte riguarda l'effetto di uno stile di vita basato su attività sportive a livello amatoriale. Nella prima parte di questo lavoro di tesi, sono stati messi a confronto i parametri muscolari di un gruppo di giovani (che effettuano principalmente allenamenti di forza) con quelli di due gruppi di anziani mobili sani (Tab. 6 risultati): uno composto da persone che conducono una vita sedentaria e il secondo costituito da sportivi amatoriali che hanno un passato di almeno trent'anni di attività fisica. Il muscolo degli anziani fisicamente attivi risulta essere più simile a quello dei giovani in termini di forza generata e di dimensioni delle fibre muscolari rispetto ai muscoli degli anziani sedentari, indicando che l'attività fisica prolungata aiuta a salvaguardare le caratteristiche positive dei muscoli dell'età giovanile. Dalle analisi morfologiche è possibile affermare che la composizione del muscolo degli anziani allenati in termini di tipo di fibre e di raggruppamenti isotipici suggerisce che processi di denervazione/reinnervazione svolgono un ruolo nel mantenimento della salute dei muscoli. La forza di contrazione dei muscoli della coscia misurata negli anziani attivi è significativamente superiore a quella degli anziani sedentari mentre risulta statisticamente simile a quella del gruppo dei giovani sportivi (Tab. 6). Anche se rispetto ai giovani gli anziani fisicamente attivi hanno un decremento del 32% della forza di contrazione dei muscoli della coscia (nonostante che i due gruppi avessero dedicato tempi simili all'allenamento), questo non è sorprendente perché è ben documentato che i record mondiali degli atleti master (cioè di classi di età sempre più mature) sono via via inferiori rispetto a quelli dei giovani 20-30 detentori del record assoluto (Coggan AR, 1990; Trappe S, 2001; Wright VJ, 2008; Gava P, 2013).

Per esplorare i meccanismi che hanno ritardato il deterioramento dei muscoli degli anziani fisicamente attivi e con un lungo passato di attività sportive amatoriali, sono state analizzate tramite immunofluorescenza le biopsie muscolari prelevate dai gruppi sperimentali e sono state confrontate le quantità relative di 1) fibre piccole ed angolate (cioè fibre muscolari denervate); 2) marcatori molecolari per il tipo rapido o lento di fibra muscolare (una misura della plasticità muscolare residua); e 3) raggruppamenti isotipici (che documentano cicli di denervazione/reinnervazione selettiva di gruppi di fibre muscolari). Dai dati raccolti risulta che le biopsie dei giovani sportivi contengono un basso numero di fibre muscolari denervate o di raggruppamenti isotipici; le biopsie degli anziani sedentari un numero elevato rispetto ai giovani e agli anziani fisicamente attivi di fibre denervate e pochi raggruppamenti isotipici di tipo rapido; infine, gli anziani fisicamente attivi presentano una percentuale maggiore di fibre di tipo lento, fino al 90%, e queste sono principalmente raggruppate in raggruppamenti isotipici lenti.

Questo particolare aumento di fibre lente rispecchia il fatto ben noto che l'immobilizzazione e il disuso motorio spingono le fibre muscolari verso l'atrofia e verso un fenotipo di tipo rapido (Mitchell WK, 2012). La causa per cui questi parametri sono significativamente più elevati negli anziani fisicamente attivi rispetto a quelli con una vita sedentaria, non è da ricercare nel fattore età; inoltre, la mancanza di correlazione tra il tipo di allenamento e le percentuali di fibre lente dimostra che il tipo di attività non è il principale fattore determinante. È interessante notare che, le fibre muscolari coesprimenti MHC sia di tipo rapido che lento (cioè di un marcatore di trasformazione in atto delle caratteristiche molecolari differenziali dei diversi tipi di fibre muscolari) sono state osservate in quantità molto basse nei tre gruppi studiati e che non sono state trovate differenze statistiche. E' possibile che il fenomeno di coespressione di entrambe le miosine osservato sia effettivamente basso in quanto in realtà o è un evento raro (nei giovani sportivi), o perché la denervazione che si verifica è prontamente seguita da eventi di reinnervazione che limitano la durata della fase intermedia di coespressione di due o più tipi di MHC (anziani sedentari e attivi). Sulla base delle nostre conoscenze, questa è la prima prova che la trasformazione delle fibre muscolari, almeno di quelle raggruppate in isotipi, non può essere la conseguenza diretta sulle fibre muscolari dei decenni di attività ad alto livello. Questo spiega inoltre perché questi eventi (infrequenti, ma cumulativi) di denervazione non siano descritti nella letteratura geriatrica dell'elettromiografia clinica standard. Le fibre coesprimenti dei muscoli degli anziani sedentari, presentavano piccole dimensioni (<30  $\mu\text{m}$ ) e spesso una forma angolata molto accentuata; alcune erano anche positive per l'anticorpo anti-NCAM, un marcatore accettato di denervazione (Dickson G, 1987; Kern H, 2011). Fibre muscolari con queste caratteristiche sono state descritte nei muscoli transitoriamente o permanentemente in assenza di carico (immobilizzazione e sospensione degli arti o soggiorni in assenza di gravità,

come nel caso estremo dei soggiorni prolungati in volo spazio), per lesioni del midollo spinale e denervazione periferica (Kern H, 2008; D'Antona G, 2003). Per questi motivi le fibre “piccole e angolate” sono state ritenute come denervate. Inoltre, poiché è noto che le fibre muscolari di tipo lento sintetizzano MHC di isoforma rapida quando sono denervate sia durante lo sviluppo che in età adulta o avanzata (Schiaffino S, Reggiani C, 2011; Carraro U, 1987), si può ipotizzare che le fibre muscolari coesprimenti da noi osservate nei muscoli degli anziani sedentari siano fibre di tipo lento “denervate” che riesprimono le MHC di tipo rapido del programma miogeno di *default*. Al contrario, quando sono state rilevate miofibre coesprimenti entrambe le isoforme di MHC nei muscoli degli anziani fisicamente attivi, queste presentavano caratteristiche simili per dimensioni e forma alle fibre di tipo puro e, quindi, potrebbero essere il risultato di cicli di denervazione/reinnervazione, un meccanismo ben noto e solidamente documentato dai modelli sperimentali di cross-reinnervazione tra muscoli di tipo diverso (Schiaffino S, Reggiani C, 2011; Pette D, 1999). Inoltre, la loro distribuzione e numerosità non è in accordo con l'ipotesi che possano appartenere ad unità motorie (tipicamente distribuite uniformemente a scacchiera nell'ambito delle popolazioni di fibre muscolari che costituiscono i fascicoli) sottoposte a transizione causata dall'elevato livello di esercizio, anche se negli esseri umani che svolgono intensi allenamenti fisici volontari il meccanismo non è ancora del tutto chiaro (Mitchell WK, 2012).

E' probabile che le fibre muscolari che vanno incontro a fenomeni di trasformazione (ovvero le fibre che coesprimono proteine MHC sia rapide che lente) contribuiscono all'incremento dei raggruppamenti isotipici di tipo lento, come suggerito dalla correlazione positiva tra le crescenti percentuali del numero di fibre di tipo lento e i raggruppamenti isotipici lenti nelle sezioni criostatiche di anziani fisicamente attivi. Pertanto, si può ipotizzare che date le dimensioni normali delle fibre coesprimenti queste siano state in precedenza fibre denervate di tipo rapido che sono state reinnervate da assoni di motoneuroni di tipo lento e che siano in fase di transizione da una isoforma di MHC all'altra prima di esprimere esclusivamente MHC di tipo lento. Questo è suggerito dalla “legge dell'ordine di reclutamento” che impone che le unità motorie lente (e quindi, le relative fibre muscolari) siano attivate più frequentemente rispetto alle unità motorie rapide (Henneman E, 1965). Infatti, gli  $\alpha$ -motoneuroni più attivi sono quelli di tipo lento, e potrebbe essere questo più alto livello di attività che mantiene i motoneuroni, le fibre muscolari, e il loro contenuto di MHC. Pertanto, con l'aumento di raggruppamenti isotipici lenti risulta evidente che la plasticità del muscolo permane sia negli anziani sedentari e (soprattutto) negli anziani fisicamente attivi. Inoltre, i processi di denervazione/reinnervazione possono essere più frequenti di quanto evidenziato in questo lavoro perché quando le fibre temporaneamente denervate fossero quelle di un'unità motoria di tipo lento, una volta

reinnervate dall'assone terminale di un altro  $\alpha$ -motoneurone di tipo lento continuerebbero la loro espressione genica sfuggendo al rilevamento. Si può infine ipotizzare che la mancanza di "raggruppamenti isotipici grouping" di tipo rapido negli anziani attivi possa essere una prova diretta della reinnervazione selettiva di miofibre denervate da parte degli  $\alpha$ -motoneuroni di tipo lento. In sintesi, l'ipotesi di lavoro è che le fibre muscolari coesprimenti MHC rapida e lenta siano o miofibre lente denervate co-esprimenti le isoforme di MHC rapida per un programma miogenico di *default* (D'Antona G, 2003; Carraro U, 2002; Midrio M, 2006), o siano fibre rapide denervate che vengono reinnervate da assoni di motoneuroni lenti (Schiaffino S, Reggiani C, 2011; Carraro U, 1981; Pette D, 1999). Questa ipotesi necessita di ulteriori studi, in particolare, analisi di espressione *in situ* di MHC, in un numero di soggetti più numerosi e in diversi tipi muscolari. Inoltre, le biopsie muscolari di questo gruppo variavano da quelle con basso numero di fibre coesprimenti entrambe le miosine e di raggruppamenti isotipici a quelle con fibre muscolari quasi completamente lente. Nonostante queste limitazioni, la significatività clinica delle nostre osservazioni è confermata dal fatto che le proprietà muscolari del gruppo di anziani che effettuano attività fisica ad alti livelli sono più simili a quelle dei giovani sportivi che a quelle degli anziani sedentari. Nello specifico, rispetto ai loro omologhi sedentari, gli anziani fisicamente attivi sviluppano maggiore forza isometrica muscolare, presentano una morfologia muscolare più conservata e una migliore mobilità (Zampieri S, 2012; Kern H, 2013). Nel loro insieme, i risultati suggeriscono che, al di là degli effetti diretti dell'invecchiamento sulla struttura e la funzione delle fibre muscolari, i cambiamenti che si verificano nel tessuto muscolare del gruppo sedentario sembrano essere in parte il risultato di una denervazione distribuita su tutta la superficie trasversa del muscolo. Negli anziani fisicamente attivi, l'aumento della percentuale di raggruppamenti isotipici di tipo lento è ragionevolmente il risultato dell'effetto positivo dall'attività fisica a lungo termine sui motoneuroni. Poiché i motoneuroni lenti sono attivati giornalmente molto più frequentemente dei motoneuroni rapidi, ciò aumenta la probabilità che la reinnervazione periferica si verifichi a causa dello "sprouting" degli assoni lenti. Ovviamente, numerosi fattori e meccanismi contribuiscono alla salute a lungo termine dei muscoli o al loro deterioramento, ma questo studio suggerisce che l'esercizio a lungo termine potrebbe permettere l'adattamento alle conseguenze della denervazione correlata all'età e di preservare la struttura e la funzione muscolare salvando le fibre muscolari che vanno incontro all'atrofia e al deterioramento con il reclutamento da parte delle unità motorie lente delle fibre muscolari denervate. Abbiamo dimostrato che uno stile di vita che comprenda attività fisiche costanti e ad alto livello è molto efficace per migliorare le prestazioni funzionali e la riorganizzazione dei tipi di fibra muscolare negli anziani. In particolare, questi livelli di esercizio fisico sembrano avere effetti benefici sulla reinnervazione di fibre muscolari, con

conseguente conservazione della funzione, della dimensione e della struttura muscolare, ritardando così il declino funzionale e la perdita di indipendenza che sono comuni nelle persone più anziane. L'attivazione frequente delle unità motorie (lente, preferenzialmente) risparmia cioè motoneuroni e associate fibre muscolari da un più precoce invecchiamento.

## 5.2. ESISTE UN'ALTERNATIVA ALL'ESERCIZIO FISICO?

Come dimostrato nella parte precedente di questo lavoro e negli altri studi presenti in letteratura l'allenamento e l'esercizio fisico regolare può attenuare i segni patologici predittivi della sarcopenia, aumentando la forza muscolare e di conseguenza diminuendo il rischio di cadute. Tuttavia, alcune condizioni patologiche (ad esempio, osteoartrite, amiotrofia associata, distrofie muscolari, traumi e lesioni) ed anche alcune situazioni psicologiche (paura di cadere, depressione, etc.) limitano la capacità di svolgere attività fisica. Date queste premesse si rende necessario trovare una valida alternativa all'esercizio fisico volontario che però ne mantenga le proprietà benefiche, che sia semplice da applicare e soprattutto che sia sicuro. Queste caratteristiche possono essere tutte ritrovate nell'elettrostimolazione muscolare (ES). Per determinare se questo tipo di terapia/riabilitazione sia efficace anche nell'anziano è stato realizzato uno studio degli effetti dell'ES sul muscolo umano di età avanzata, messi a confronto con quelli indotti da un programma di allenamento di forza volontario (Leg Press, LP). Articoli di letteratura dimostrano che la stimolazione elettrica è una tecnica molto efficace nel ripristinare in pazienti con denervazione permanente alcune funzioni muscolari, come ad esempio la massa muscolare e la contrattilità tetanica (Kern H, 2004,2008,2010; Carraro U, 2005; Ashley Z, 2007; Maddocks M, 2013). Dati queste premesse, lo studio attuale si è concentrato sull'obiettivo di verificare se l'ES può essere utilizzata, come sostituto dell'esercizio fisico, nel migliorare la funzione muscolare in soggetti anziani sedentari. Si sono valutate le prestazioni funzionali di un gruppo di soggetti sottoposti ad ES ed analizzati alcuni parametri di massa e struttura del muscolo scheletrico; i risultati sono stati confrontati con quelli di un secondo gruppo di anziani che sono stati allenati per lo stesso periodo di tempo con esercizi volontari (LP). Vista la difficoltà di reclutare soggetti (in particolare, volontari per il prelievo di biopsie muscolari) si è deciso per uno studio verticale, utilizzando le condizioni pre allenamento come controllo da confrontare con a quelle ottenute dopo i protocolli di allenamento. I risultati qui raccolti indicano che l'ES, analogamente all'esercizio fisico volontario, attenua il declino funzionale associato all'invecchiamento, migliora la forza muscolare e la massa, mantenendo la dimensione complessiva delle fibre muscolari (decescente durante l'invecchiamento), e garantendo l'adattamento all'esercizio muscolare. Tutti i test funzionali hanno mostrato miglioramenti significativi dopo nove settimane di allenamento sia

basato sull'ES che sulla LP, contrastando la perdita di mobilità età-dipendente, migliorando le prestazioni funzionali e i marcatori di stile di vita. Da segnalare che gli anziani allenati tramite ES presentano risultati funzionali simili a quelli valutati tramite test (TUGT e 5×Chair Rise) ottenuti in uno studio precedente in anziani ( $70,6 \pm 6,1$ anni) che avevano effettuato un allenamento di resistenza volontario per la durata di sei settimane (Fragala MS, 2014).

A tutti i pazienti dello studio è stato insegnato come modificare l'intensità della stimolazione elettrica erogata dall'elettrostimolatore fino a raggiungere il livello massimo di tolleranza sensoriale. I dati raccolti dimostrano che i soggetti hanno utilizzato una intensità di corrente molto simile. Nessuno di loro ha dichiarato l'insorgenza di eventi problematici durante le sessioni di allenamento, e sia i maschi che le femmine hanno riportato un leggero dolore clinicamente non rilevante a riposo prima dell'ES. Nei test funzionali, i maschi sono risultati generalmente più forti e più rapide rispetto alle donne eccetto che per il test della sedia (le donne sono state più rapide) e la prova della scala (pari). Sia gli uomini che le donne sono migliorati in tutte le prove, ma le donne hanno riportato un guadagno in percentuale quasi due volte maggiore rispetto agli uomini. Questo può essere spiegato tenendo conto che gli elettrodi che sono stati utilizzati in questo studio hanno coperto un'area più grande della coscia femminile rispetto a quella del sesso maschile e di conseguenza sono stati attivati più aree motorie di stimolazione. Ciò provoca la contrazione di un volume maggiore di muscolo del quadricipite similmente all'osservazione riportata da Maffiuletti et al. (2008). Da queste considerazioni è possibile affermare che, durante le terapie di elettrostimolazione, mirate a potenziare il muscolo sia in termini di forza che di funzione, è preferibile utilizzare elettrodi di dimensioni superiori a  $100 \text{ cm}^2$  per coprire grandi porzioni del muscolo e allo stesso tempo creare minor disagio per la minore intensità di corrente all'interfaccia elettrodo-pelle (Kern H, 2014).

Una delle cause della debolezza muscolare nell'anziano è riconducibile alla diminuzione della massa muscolare, ma la diminuzione della produzione di ATP associata alla riduzione dell'espressione di GLUT 4 e l'aumento conseguente dell'assunzione di glucosio è una concausa importante. Nel muscolo degli anziani sono state osservate anche delle disfunzioni nel ciclo del calcio: e cioè nel processo di eccitazione e di contrazione (dovute al calo di espressione di DHP-R) provocano una diminuzione della forza generata con una conseguente diminuzione dell'utilizzo di  $\text{Ca}^{2+}$  esterno. Oltre a questi effetti sono stati riscontrati un drastico calo del recupero intra-reticolo sarcoplasmatico del calcio da parte dell'SR2 (Payne AM, 2004) e del tasso di rilassamento muscolare (Hunter S, 1999 ; Rif. Klitgaard H, 1989) rispetto ad un gruppo di controllo di giovani. Dati questi presupposti, si è voluto indagare più a fondo gli effetti dell'ES sui muscoli degli anziani. In particolare si è voluto indagare se, oltre a miglioramenti

funzionali, questo protocollo riabilitativo alternativo all'esercizio fisico volontario portava anche miglioramenti a livello dell'SR e se attivava specifiche vie di rimodellamento muscolare.

Effetti degli allenamenti sui “pathways” del calcio

Come mostrato nella sezione dei risultati dopo i trattamenti di ES e di LP si verificano due fenomeni importanti: una massiccia traslocazione nucleare di NFATc1 e un aumento significativo di p-CamKII. Queste risposte cellulari sono chiari segni dell'attivazione di due vie molecolari mediate dal calcio coinvolte nel rimodellamento e nell'adattamento muscolare, la via della calcineurina-NFAT e della  $Ca^{2+}$  / proteina chinasi calmodulina-dipendente (CaMKII), note per essere attivate dall'esercizio fisico. Ora possiamo dire che ciò è valido anche per l'attività contrattile indotta dalla Stimolazione Elettrica (ES). E' noto che la traslocazione nucleare dell'NFATc1 è coinvolta nell'ipertrofia muscolare e nei “fiber type switching” (cambiamenti delle caratteristiche contrattili e molecolari tra tipi di fibre muscolari) causate dall'esercizio. L'aumento dell'espressione sia *in vitro* che *in vivo* di NFATc1 sottolinea che la traslocazione nucleare è promossa sia nell'ipertrofia muscolare indotta da IGF-1 (Musarò A, 1999; Semsarian C, 1999) e sia nella trasformazione delle fibre da un fenotipo rapido a quello lento. NFATc1 è espresso in entrambi i tipi di fibre rapide e lente. Viene co-espresso con MyoD allo scopo di mantenere la composizione isotipica della popolazione di fibre muscolari reprimendo l'attivazione dei geni MyoD-dipendenti (Ehlers ML, 2014). In assenza di NFATc1 i muscoli di topo non effettuano alcun tipo di “ fiber type switching” in risposta all'esercizio (Ehlers ML, 2014). Nel soleo e nel *vastus lateralis* umano la traslocazione nucleare di NFATc1 è indotta dall'esercizio di resistenza/vibrazione effettuato tre volte alla settimana, durante un periodo di 60 giorni di “unloading” muscolare a letto (Salanova M, 2011).

I dati da noi raccolti dimostrano che si realizza una traslocazione nucleare massiccia di NFATc1 sia dopo il protocollo di ES che di LP. Questo è un dato inconfutabile e una dimostrazione a livello molecolare che entrambi i protocolli di allenamento usati in questo lavoro di tesi possono contribuire alla attivazione di risposte muscolari mimando i “pathway” molecolari attivati dal classico esercizio fisico volontario. Dalla letteratura si evince che NFATc1 ha altre funzioni oltre a quelle prima descritte (attivazione della trasformazione del muscolo verso un fenotipo lento): come repressore dei geni contrattili di tipo rapido nei muscoli lenti se venga utilizzato un pattern di attività elettrica che induca la conversione verso un fenotipo lento (Rana ZA, 2009), e come inibitore dell'attivazione di geni rapidi myo-D-dipendenti (Ehlers ML, 2014).

Non sono state osservate nei tessuti muscolari da noi analizzati down-regolazioni dei geni lenti dell'SR (SERCA1, CASQ1e RYR1) dopo l'ES: questo indica che l'elettrostimolazione, così

come utilizzata e per il tempo utilizzato, non attiva la funzione inibitoria di NFATc1 sulle proteine dell'SR.

Una spiegazione plausibile di questo risultato è che il protocollo ES è stato progettato per allenare la componente rapida del muscolo mimando nel modo più fedele possibile un protocollo di attivazione muscolare simile a quello di un motoneurone rapido. Pertanto è possibile che gli eventi di traslocazione di NFATc1 possano essere dovuti all'incremento delle attivazioni delle fibre muscolari rapide, che sono certamente attivate nella stimolazione elettrica delle tessuto muscolare. Un punto interessante sarà quello di chiarire se la traslocazione nucleare di NFATc1 dopo ES o LP è specifico o meno per tipo di fibra. Non abbiamo una risposta diretta a questa domanda, ma se si considera che la composizione della popolazione delle fibre del muscolo *vastus lateralis* umano è circa 60% miofibre lente e il 40% miofibre rapide dimostrato dai risultati dalle analisi morfometriche eseguite sui muscoli dei gruppi di anziani analizzati, e che circa il 60% dei nuclei sono NFAT positivi dopo entrambi i protocolli di allenamento, è possibile che la maggior parte dei nuclei attivati durante i protocolli di allenamento siano di fibre muscolari lente.

Uno dei punti più interessanti relativi alle analisi NFATc1 è che le biopsie muscolari sono state prelevate diversi (tra 5-7) giorni dopo l'ultima sessione di allenamento (sia ES che LP). Ciò indica che la traslocazione di NFATc1 non è un evento transitorio strettamente fissato dalla periodo di aumentata tensione muscolare indotta dall'esercizio fisico, ma è stabile per quasi una settimana dopo la sospensione dei due tipi di allenamento. Se consideriamo anche il fatto che meno del 5% dei nuclei presentano traslocazione di NFATc1 nelle biopsie muscolari prelevate precedentemente all'inizio dell'allenamento muscolare sia mediante ES che LP, possiamo concludere che NFATc1 può essere considerato un ottimo biomarcatore di sedentarietà negli anziani, mentre la marcatura di una elevata percentuale di mionuclei documenta una elevata storia recente di attività muscolare superiore alla media del precedente periodo. Questa osservazione originale può essere in correlazione con il significativo aumento dell'espressione di mRNA di IGF-1, precedentemente descritta in questi stessi muscoli (Musrò A, 1999), una forte evidenza a favore dell'attivazione del "pathway" IGF1/Akt, che è noto inibire l'esportazione nucleare di NFATc1. (Shen T, 2007; Crabtree GR, 2009).

L'attivazione del "pathway" della CaMKII, riconosciuto dall'aumento di CaMKII fosforilata dopo ES e LP, indica l'attivazione di un "pathway" importante coinvolto nell'accrescimento e nella plasticità muscolare in risposta all'esercizio volontario. CaMKII è un componente della giunzione neuromuscolare (Choen TJ, 2007) e un elemento fondamentale dell'attività neuromuscolare. La CaMKII agisce sulla SERCA e sul fosfolambano, come dimostrato nei

muscoli lenti puri (Sacchetto R., 2000) e nell'uomo viene attivata dall'esercizio fisico (Rose AJ, 2003). In risposta alle attività dei motoneuroni periferici la CaMKII fosforila HDAC4 promuovendo l'attivazione del fattore di trascrizione miogenico MEF2 (Cohen TJ, 2009) e, dopo l'allenamento, quest'ultimo è coinvolto nelle modificazioni degli istoni e negli incrementi di mRNA codificanti per GLUT4 (McGee SL, 2009; Richter EA, 2013).

I nostri risultati suggeriscono che sia l'ES che la LP attraverso la fosforilazione della CaMKII potrebbero aumentare i livelli di espressione di importanti proteine funzionali che diminuiscono durante il processo di invecchiamento, attivando il fattore di trascrizione miogenico MEF2 che potenzia l'espressione di geni strutturali che contrastano l'atrofia muscolare.

#### Modulazione del Reticolo Sarcoplasmatico (SR)

I risultati qui riportati delle analisi eseguite sui muscoli degli anziani sottoposti all'allenamento tramite ES indicano che le proteine del reticolo sarcoplasmatico SERCA2 e Sarcalumenina sono aumentate, mentre i livelli dei relativi RNA non subiscono alterazioni, suggerendo una regolazione post-trascrizionale. Questa ipotesi è supportata dal fatto che in questi stessi muscoli ha l'inibizione della degradazione proteica a causa della down-regolazione di Murf1 e Atrogin1, due geni del sistema ubiquitina-proteasoma, (Kern H, 2014), in accordo con il riportato effetto diretto dell'ES sui tassi di sintesi proteica nel muscolo scheletrico. Uno studio recente (Gueugnau M, 2014) paragona il proteoma del *vastus lateralis* di donne adulte attive dopo la menopausa e donne anziane. Tra le diverse proteine leganti  $Ca^{2+}$  che subiscono modificazioni, gli autori segnalano che la SERCA2 e la Sarcalumenina sono downregolate mentre CASQ1 viene up-regolata nei muscoli delle anziane. Dall'analisi delle espressioni proteiche è interessante notare che abbiamo trovato una significativa tendenza opposta dopo ES. Entrambe le modifiche delle proteine dell'SR, la up-regolazione di SERCA2 / Sarcalumenina e la down-regolazione di CASQ1, sono a dimostrazione del fatto che l'elettrostimolazione contrasta alcuni dei cambiamenti delle proteine muscolari legati all'invecchiamento. Il vantaggio funzionale della up-regolazione di SERCA2 consiste in una diminuzione della fuoriuscita di  $Ca^{2+}$  dall'SR e in una maggiore sensibilità durante il reuptake del calcio (Lamboley CR, 2014) che può anche portare a un completo rilassamento nelle fibre miste nonostante l'alta sensibilità al calcio delle proteine contrattili lente, come proposto dagli stessi autori. L'aumento di Sarcalumenina osservato dopo ES non è segno di adattamento all'affaticamento muscolare, questa affermazione è supportata dal fatto che muscoli di topo non esprimenti la Sarcalumenina presentano una minor sensibilità alla fatica dei wild-type e questo fatto sembra essere collegato al fatto che la SERCA2 svolge il ruolo di chaperone migliorando il mantenimento del  $Ca^{2+}$  da parte dell'SR. Questo effetto benefico sul potenziamento

dell'espressione proteica di SERCA2 e Sarcocalumina da parte della ES rispecchia i miglioramenti delle proteine che regolano il ciclo del calcio dell'SR da parte dell'esercizio fisico. In particolare SERCA2a viene up-regolata in modelli murini sia tramite allenamenti di resistenza e che di tipo aerobico (Ferreira JCB, 2010; Thomas MM, 2010; Kinnunen S, 2012). Nel muscolo *vastus lateralis* umano SERCA viene down-regolata negli anziani sedentari in confronto ai giovani sportivi, mentre negli anziani allenati può essere paragonata a quella presente nei muscoli dei giovani (Kiltgaard H, 1989). Mettendo insieme tutti i risultati ottenuti è possibile affermare che l'elettrostimolazione è un valido strumento riabilitativo del muscolo scheletrico dell'anziano in quanto riesce ad imitare gli effetti dell'esercizio fisico andando ad agire anche sulla modulazione delle proteine leganti calcio, nello specifico andando ad agire su quelle adibite al rilassamento muscolare.

#### Rimodellamento del muscolo da parte di ES

A causa dell'aumento dell'espressione proteica di SERCA2, si è voluto determinare se questo aumento fosse a carico delle fibre lente o se ci fosse stato qualche sorta di rimodellamento del tipo di fibre muscolari. Dalle conte effettuate per definire il numero delle fibre MHCII/SERCA2 si è notato un aumento di queste ultime dopo l'allenamento con elettrostimolazione. Questo dato è un indice importante del fatto che dopo ES provoca un rimodellamento del tipo di fibra muscolare, ma non è possibile definire il fenotipo originale di questo tipo di fibre muscolari miste a causa della variabilità nella distribuzione dei tipi di fibra muscolare e della composizione del SR di tutti i muscoli da noi analizzati. Già dalle analisi morfologiche è stato osservato, in questi muscoli, un aumento del numero e delle dimensioni delle fibre rapide; questo dato potrebbe indicare che le fibre muscolari miste per MHCII/SERCA2 siano in realtà fibre rapide 2A ossidative, che come si evince dalla letteratura aumentano negli esseri umani dopo allenamenti di resistenza (Kiltgaard H, 1990). L'incremento delle fibre ossidative rapide è vantaggioso per le prestazioni dei muscoli in quanto presentano caratteristiche peculiari: sono fibre muscolari rapide, ma presentano tra queste il sottotipo con la più lenta velocità di contrazione, che utilizzano un metabolismo di tipo ossidativo, generando un buon quantitativo di forza, pur essendo resistenti alla fatica. Questi dati non escludono che un aumento di SERCA2, possa essere avvenuta anche nelle fibre lente pure (tipo 1) in quanto le analisi di espressione proteica sono state effettuate utilizzando omogenati totali e non singole fibre muscolari.

## 6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Uno dei risultati più interessanti è la stabilizzazione della traslocazione nucleare di NFATc1 che permane anche dopo diversi giorni dall'ultima sessione di allenamento. Combinata con il fatto che nelle biopsie muscolari prelevate prima dell'inizio dell'allenamento muscolare meno del 5% dei nuclei presentano traslocazione di NFATc1, questo peculiare comportamento permette di assegnare a NFATc1 il ruolo di biomarcatore di sedentarietà (NFATc1 citoplasmatico) e di "attivazione" muscolare" (sua traslocazione nei mionuclei), sia essa indotta da ES o LP. Il protocollo di esercizio volontario LP pur attivando le stesse vie molecolari dell'elettrostimolazione, non induce gli stessi effetti sui componenti del reticolo sarcoplasmatico e sul rimodellamento muscolare. Dato che il "pathway" della CaMKII è coinvolto nell'incremento degli mRNA di GLUT4, sarà di grande interesse acquisire più informazioni sugli effetti positivi che l'ES potrebbe avere sulla regolazione del metabolismo del glucosio. Inoltre intendiamo applicare le tecniche messe a punto, per determinare l'attivazione di PGC1 $\alpha$  nelle biopsie dei muscoli degli anziani prima e dopo trattamenti di ES e LP.

I risultati che abbiamo raccolto permettono di affermare che ES è in grado di modulare le caratteristiche funzionali, strutturali e molecolari del muscolo dell'anziano in assenza di effetti avversi. L'elettrostimolatore è uno strumento di facile uso domiciliare che può essere utilizzato in completa sicurezza sia da anziani sani che da soggetti sofferenti condizioni patologiche croniche. In conclusione, gli effetti benefici sulla mobilità possono consentire all'anziano di svolgere in modo autonomo le tipiche attività quotidiane con più facilità e sicurezza.



## BIBLIOGRAFIA

- Ashley Z, Salmons S, Boncompagni S, Protasi F, Russold M, Lanmuller, H, et al. (2007). Effects of chronic electrical stimulation on long-term denervated muscles of the rabbit hind limb. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 28, 203–217.
- Ausoni S, Gorza L, Schiaffino S, Gundersen K, Lomo T. Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J Neurosci* 1990; 10: 153-160.
- Bassey EJ, Fiatarone M, O'Neill EF, et al. Leg extensor power and functional performance in very old men and women. *Clin Sci* 1992;82:321-7.
- Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Euro Cytokine Netw* 2006;17:4-12.
- Blaauw B, Schiaffino S, Reggiani C. Mechanisms Modulating Skeletal Muscle Phenotype *Compr Physiol.* 2013; 3(4):1645-87.
- Bohannon RW, and Williams Andrews A. Normal walking speed: a descriptive meta-analysis. *Physiotherapy* 2011; 97, 182–189.
- Bohannon, RW. Isometric strength data. *Arch.Phys.Med.Rehabil.* 1997; 78, 566–567.
- Boncompagni S, Kern H, Rossini K, et al. Structural differentiation of skeletal muscle fibers in the absence of innervation in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:19339Y44
- Borst SE. Interventions for sarcopenia and muscle weakness in older people. *Age Ageing* 2004;33:548-55.
- Caiozzo VJ, Baker MJ, Baldwin KM. Novel transitions in MHC isoforms: Separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *J Appl Physiol* 85: 2237-2248, 1998.
- Calabria E, Ciciliot S, Moretti I, Garcia M, Picard A, Kenneth A. Dyar, Pallafacchina G, Tothova J, Schiaffino S, Murgia M. NFAT isoforms control activity-dependent muscle fiber type specification. *PNAS* 2009; 32:13335-13340.
- Campbell AJ, Robertson MC, Gardner MM, et al. Randomised controlled trial of a general practice programme of home based exercise to prevent falls in elderly women. *BMJ.* 1997;315:10659.

Campbell B, Kreider RB, Ziegenfuss T, et al. International Society of Sports Nutrition Position Stand: Protein and Exercise. *J Int Soc Sports Nutr* 2007;4:8.

Carraro U, Catani C, Dalla Libera L. Myosin light and heavy chains in rat gastrocnemius and diaphragm muscles after chronic denervation or reinnervation. *Exp Neurol* 1981;72:401-12

Carraro U. Modulation of trophism and fiber type expression of denervated muscle by different patterns of electrical stimulation. *Basic Appl Myol* 2002;12:263-73

Carraro, U., Rossini, K., Mayr, W., and Kern, H. Muscle fiber regeneration in human permanent lower motoneuron denervation: relevance to safety and effectiveness of ES-training, which induces muscle recovery in SCI subjects. *Artif. Organs* 2005; 29,187–191.

Cherubini A, Rossi R, Senin A. *Attività fisica ed invecchiamento*. Napoli: EdiSES 2002, p. 282.

Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R, Williams RS. A Cn-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev* 1998; 12:2499-2509.

Coggan AR, Spina RJ, Rogers MA, et al. Histochemical and enzymatic characteristics of skeletal muscle in master athletes. *J Appl Physiol* 1990; 68:1896-901

Cohen TJ, Barrientos T, Hartman ZC, Garvey SM, Cox GA, Yao TP. The deacetylase HDAC4 controls myocyte enhancing factor-2-dependent structural gene expression in response to neural activity. *FASEB J.* 2009;23: 99-106.

Cohen TJ, Waddell DS, Barrientos T, Lu Z, Feng G, Cox GA, Bodine SC, Yao TP. The histone deacetylase HDAC4 connects neural activity to muscle transcriptional reprogramming. *J. Biol. Chem.* 2007;282:33752-33759.

Cohen P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends Biochem Sci* 2000; 25, 596–601.

Corbel SY, Lee A, Yi L, Duenas J, Brazelton TR, Blau HM & Rossi FM. Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nat Med* 2003; 9, 1528-32.

Corrigan D, and Bohannon R.W. Relationship between knee extension force and stand up performance in community-dwelling elderly women. *Arch. Phys.Med.Rehabil.* 2001; 82, 1666–1672.

- Crabtree GR, Schreiber SL. SnapShot: Ca<sup>2+</sup>-calcineurin-NFAT signaling. *Cell*. 2009;138(1):210-210.
- Cruz-Jentoft AJ. Perspective: protein and exercise for frailty and sarcopenia: still learning. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* 2013; 14, 69–71.
- D'Antona G, Pellegrino MA, Adami R, et al. The effect of ageing and immobilization on structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol (Lond)* 2003;552:499Y511
- Dally S, Corvazier E, Bredoux R, Bobe R, Enouf J. Multiple and diverse coexpression, location, and regulation of additional SERCA2 and SERCA3 isoforms in nonfailing and failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48: 633-644.
- DeNardi C, Ausoni S, Moretti P, Gorza L, Velleca M, Buckingham M, Schiaffino S. Type 2X-myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and development ally regulated gene. *J Cell Biol* 1993 123: 823-835.
- Dickson G, Gower HJ, Barton CH, et al. Human muscle neural cell adhesion molecule (N-CAM): Identification of a muscle-specific sequence in the extracellular domain. *Cell* 1987;50:1119Y30
- Dunn SE, Burns JL, Michel RN. Calcineurin is requie for skeletal muscle hypertrophy. *J Biol Chem* 1999; 274(31):21908-12.
- Ehlers ML, Celona B, Black BL. NFATc1 controls skeletal muscle fiber type and is a negative regulator of MyoD activity. *Cell Rep.* 2014; 8(6):1639-48.
- Esmarck B, Andersen JL, Olsen S et al. Timing of postexercise protein intake is important for muscle hypertrophy with resistance training in elderly humans. *J Physiol* 2001; 535:301-11.
- Fajardo VA, Bombardier E, Vigna C, Devji T, Bloemberg D, Gamu D, Gramolini AO, Quadriatero J, Tupling AR. Co-expression of SERCA isoforms, phospholamban and sarcolipin in human skeletal muscle fibers. *PLoS One.* 2013; 8(12):e84304.
- Ferreira JCB, Bacurau AV, Bueno CR Jr, Cunha TC, Tanaka LY, Jardim MA, Ramires PR, Brum PC. Aerobic exercise training improves Ca<sup>2+</sup> handling and redox status of skeletal muscle in mice. *Exp. Biol. Med.* 2010; 235:497–505
- Fluck M, Waxham MN, Hamilton MT & Booth FW. Skeletal muscle Ca(2)-independent kinase activity increases during either hypertrophy or running. *J Appl Physiol* 2000; 88, 352–8.

Fragala MS, Fukuda DH, Stout JR, Townsend JR, Emerson NS, Boone CH, et al. Muscle quality index improves with resistance exercise training in older adults. *Exp. Gerontol.* 2014; 53,1–6.

Freiberger E, Blank WA, Salb J, Geilhof B, Hentschke C, Landendoerfer P, et al. Effects of a complex intervention on fall risk in the general practitioner setting: a cluster randomized controlled trial. *Clin. Interv. Aging* 2013; 8, 1079–1088.

Gava P, Kern H, Carraro U. Age-related decline of muscle power in track and field master athletes indicates a lifespan of 110 years. *Eur J Transl Myol Basic Appl Myol* 2013;23:45

Goldspink G. Impairment of IGF-I gene splicing and MGF expression associated with muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37(10): 2012-22.

Grassi B, Cerretelli P, Narini M, et al. Peak anaerobic power in master athletes. *Eur J Appl Physiol* 1991;62:394-9.

Grimble RF. Inflammatory response in the elderly. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6:21-9.

Gueugneau M, Coudy-Gandilhon C, Gourbeyre O, Chambon C, Combaret L, Polge C, Taillandier D, Attaix D, Friguet B, Maier AB, Butler-Browne G, Béchet D. Proteomics of muscle chronological ageing in post-menopausal women. *BMC Genomics.* 2014;15:1165.

Gundersen K. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biological Reviews* 2011; 86:564-600.

Guralnik JM, Ferrucci L, Pieper CF, Leveille SG, Markides KS, Ostir GV, et al. Lower extremity function and subsequent disability: consistency across studies, predictive models, and value of gait speed alone compared with the short physical performance battery. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2000; 55, M221–M231.

Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol.* Aug; 91(2):534-51. Henneman E, Somjen G, Carpenter DO. Functional significance of cell size in spinal motoneurons. *J Neurophysiol* 2001; 1965;28:560Y80

Holmes KC and Geeves MA. The structural basis of muscle contraction. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 2000 355, 419-431

Hook SS and Means AR. Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 471-505.

Hunter SK, Thompson MW, Ruell PA, Harmer AR, Thom JM, Gwinn TH, Adams RD. Human skeletal sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> uptake and muscle function with aging and strength training. *J Appl Physiol* (1985). 1999;86(6):1858-1865.

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.

Intiso D, Paziienza L, Di Rienzo F, et al. Rehabilitation determinants in geriatric patients. *J Gerontol* 2007; 55:110-6.

Kallman Da, Plato CC, tobin JD. The role of muscle loss in the agerelated decline of grip strength: cross-sectional and longitudinal perspectives. *J Gerontol* 1990;45:M82-8.

Katsanos CS, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, et al. A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 2006; 291:E381-7.

Kenney WL, Buskirk ER. Functional consequences of sarcopenia: effects on thermoregulation. *J. Gerontol* 1995;50:70-85.

Kern H, Barberi L, Löfler S, Sbardella S, Burggraf S, Fruhmann H, Carraro U, Mosole S, Sarabon N, Vogelauer M, Mayr W, Krenn M, Cvecka J, Romanello V, Pietrangelo L, Protasi F, Sandri M, Zampieri S, Musaro A. Electrical stimulation counteracts muscle decline in seniors. *Front Aging Neurosci*. 2014;6:189.

Kern H, Boncompagni S, Rossini K, et al. Long-term denervation in humans causes degeneration of both contractile and excitation-contraction coupling apparatus that can be reversed by functional electrical stimulation (FES). A role for myofiber regeneration? *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:919-31

Kern H, Carraro U, Adami N, et al. One year of home-based daily FES in complete lower motor neuron paraplegia: Recovery of tetanic contractility drives the structural improvements of denervated muscle. *Neurol Res* 2010;32:5-12

Kern H, Hofer C, Modlin M, et al. Stable muscle atrophy in long-term paraplegics with complete upper motor neuron lesion from 3- to 20-year SCI. *Spinal Cord* 2008;46:293-304

- Kern H, Loeffler S, Burggraf S, et al. Electrical stimulation counteracts muscle atrophy associated with aging in humans. *Eur J Transl Myol Basic Appl Myol* 2013;23:105-8
- Kern H, Pelosi L, Coletto L, et al. Atrophy/hypertrophy cell signaling in muscles of young athletes trained with vibrational-proprioceptive stimulation. *Neurol Res* 2011;33:998-1009
- Kern, H. Functional electrical stimulation on paraplegic patients. *Eur. J. Transl. Myol.* 2014b; 24,75–157.
- Kern H, Carraro U, Adami N, Biral D, Hofer C, Forstner C, et al. Home-based functional electrical stimulation rescues permanently denervated muscles in paraplegic patients with complete lower motor neuron lesion. *Neurorehabil. Neural Repair* 2010; 24,709–721.
- Kern, H., Hofer, C., Mödlin, M., Mayr, W., Vindigni, V., Zampieri, S., et al. Stable muscle atrophy in long-term paraplegics with complete upper motor neuron lesion from 3- to 20-year SCI. *Spinal Cord* 2008; 46, 293–304.
- Kern H, Boncompagni S, Rossini K, Mayr W, Fanò G, Zanin ME, et al. Long-term denervation in humans causes degeneration of both contractile and excitation-contraction coupling apparatus that can be reversed by functional electrical stimulation (ES). A role for myofiber regeneration? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004; 63,919–931.
- Kinnunen S, Mänttari S. Specific effects of endurance and sprint training on protein expression of caldesmon and SERCA in mouse skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 2012;33(2):123-130.
- Klitgaard H, Ausoni S, Damiani E. Sarcoplasmic reticulum of human skeletal muscle: age-related changes and the effect of training. *Acta Physiol. Scand.* 1989;137: 23–31.
- Klitgaard H, Bergman O, Betto R, Salviati G, Schiaffino S, Clausen T, Saltin B. Co-existence of myosin heavy chain I and IIa isoforms in human skeletal muscle fibres with endurance training. *Pflugers Arch* 1990; 416: 470-472.
- Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol* 2004; 39:687-99.
- Krenn M, Haller M, Bijak M, Unger E, Hofer C, Kern H, Mayr W. Safe neuromuscular electrical stimulator designed for the elderly. *Artif Organs.* 2011;35(3):253-6.

- Kretsinger RH. Calcium coordination and the calmodulin fold: divergent versus convergent evolution. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1987;52:499-510.
- Lamboley CR, Murphy RM, McKenna MJ, Lamb GD. Endogenous and maximal sarcoplasmic reticulum calcium content and calsequestrin expression in type I and type II human skeletal muscle fibres. *J Physiol* 2013;591.23:6053–6068.
- Lamboley CR, Murphy RM, McKenna MJ, Lamb GD. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> uptake and leak properties, and SERCA isoform expression, in type I and type II fibres of human skeletal muscle *J Physiol* 2014;592.6:1381–1395.
- Latham N, Anderson C, Bennett D, et al. Progressive resistance strength training for physical disability in older people. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;(2):CD002759.
- Lecker SH, Solomon Vered, Mitch William E and Golberg Alfred L. Muscle Protein breakdown and the Critical Role of the Ubiquitin-Proteasome pathway in Normal and Disease States *J.Nutr.* 1999; 129: 227S-237S.
- Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J.* 2004; 18(1):39-51.
- MacLennan DH, Asahi M, Tupling AR. The regulation of SERCA-type pumps by phospholamban and sarcolipin. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 986: 472-480
- Maddocks M, Gao W, Higginson IJ, and Wilcock A. Neuromuscular electrical stimulation for muscle weakness in adults with advanced disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2013 1,1–30.
- Maffiuletti NA, Herrero AJ, Jubeau M, Impellizzeri FM, and Bizzini M. Differences in electrical stimulation thresholds between men and women. *Ann. Neurol.* 2008; 63,507–512.
- Manno R. Strength ability in aged people. *Ital J Sports Sci* 2004;11:16-22.
- Marzani B, Pansarasa O, Marzatico F. “Oxidative stress” and muscle aging: influence of age, sex, fiber composition and function. *Basic Appl Myol* 2004;14:37-44.
- McCullagh KJ, Calabria E, Pallafacchina G, Ciciliot S, Serrano AL, Argentini C, Kalkhovde JM, Lømo T, Schiaffino S. NFAT is a nerve activity sensor in skeletal muscle and controls activity-dependent myosin switching. *Proc natl Acad Sci USA* 2004;101:10590-10595.

McGee SL, Fairlie E, Garnham AP, Hargreaves M. Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2009;587(Pt 24):5951-5958.

McLoon LK, Park HN, Kim JH, Pedrosa-Domellof F, Thompson LV. A continuum of myofibers in adult rabbit extraocular muscle: Force, shortening velocity, and patterns of myosin heavy chain colocalization. *J Appl Physiol* 111: 1178-1189, 2011.

Meissner G. Ryanodine receptor/Ca<sup>++</sup> release channels and their regulation by endogenous effectors. *Ann. Rev. Physiol.* 1994; 56, 485–508.

Metter EJ, Talbot LA, Schragger M, et al. Skeletal muscle strength as a predictor of all-cause mortality in healthy men. *J Gerontol* 2002;57:B359-65.

Midrio M. The denervated muscle: Facts and hypotheses. A historical review. *Eur J Appl Physiol* 2006;98:1Y21

Miller SG and Kennedy MB. Regulation of brain type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca<sup>2+</sup>-triggered molecular switch. *Cell* 1986; 44, 861–870.

Mitchell WK, Williams J, Atherton P, et al. Sarcopenia, dynapenia, and the impact of advancing age on human skeletal muscle size and strength: A quantitative review. *Front Physiol* 2012;3:260 .

Musarò A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature.* 1999; 400(6744):581-585.

Muthuri SK, Chin ER & Michel RN. Myostatin as a Putative Downstream Gene Target of Calcineurin Signaling Associated with Muscle Growth Remodeling. *FASEB* 2007; 21, 895-14.

Nader GA. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the “AKT” together *IJBCB* 2005; 37, 1985-1996.

Naya FJ, Mercer B, Shelton J, Richardson JA, Williams RS, Olson EN. Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by Cn in vivo. *J Biol Chem* 2000; 275:4545-4548.

Naya FJ, Olson E. MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11(6):683-8.

- Nied RJ, Franklin B. Promoting and prescribing exercise for the elderly. *Am Fam Physician* 2002;65:419-26
- Parsons SA, Wilkins BJ, Bueno OF & Molkentin JD. Altered skeletal muscle phenotypes in calcineurin Aalpha and Abeta gene-targeted mice. *Molecular and Cellular Biology* 2003; 23, 4331-4343.
- Payne AM, Delbono O. Neurogenesis of excitation-contraction uncoupling in aging skeletal muscle. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 2004;32(1):36–40.
- Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 2007; 35: 430-442.
- Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol* 1997; 170: 143–223
- Pette D, Vrbová G. What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity? *Muscle Nerve* 1999;22:666-77
- Pette D, Vrobova G. Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1992; 20.
- Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech*. 2000;50(6):500-9.
- Power GA, Dalton BH, Rice CL. Human neuromuscular structure and function in old age: A brief review. *JSHS* 2013; 2: 215-226.
- Rana ZA, Gundersen K, Buonanno A. The ups and downs of gene regulation by electrical activity in skeletal muscles. *J Muscle Res Cell Motil*. 2009;30(7-8):255-260.
- Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:707-747.
- Rawson ES, Clarkson PM. Acute creatine supplementation in older men. *Int. J. Sports Med* 2000;21:71-5.
- Rawson ES, Wehnert ML, Clarkson PM. Effects of 30 days of creatine ingestion in older men. *Eur J Appl Physiol* 1999;80:13944.

- Rejeski WJ, Ettinger WH Jr, Schumaker S, James P, Burns R, and Elam JT. Assessing performance-related disability in patients with knee osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 1995; 3, 157–167.
- Richter EA, Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev.* 2013;93(3):993-1017.
- Rose AJ, Hargreaves M. Exercise increases Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II activity in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2003;553(Pt 1):303-309.
- Rose AJ, Alsted TJ, Kobbero JB & Richter EA. Regulation and function of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II of fast-twitch rat skeletal muscle. *J Physiol* 2007; 580,993–1005.
- Rose AJ, Frosig C, Kiens B, Wojtaszewski JF & Richter EA. Effect of endurance exercise training on Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II expression and signalling in skeletal muscle of humans. *J Physiol* 2007b; 583, 785–95.
- Rosen CJ, Bouxsein ML. Mechanisms of Disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2:35-43.
- Rossi AE, Dirksen RT. Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle Nerve.* 2006; 33(6):715-31.
- Rossi P, Marzani B, Giardina S, et al. Human skeletal muscle aging and the oxidative system: cellular events. *Curr Aging Sci* 2008; 1:182-91.
- Roth SM, Ivey FM, Martel GF, et al. Muscle size responses to strength training in young and older men and women. *J Am Geriatr Soc* 2001;49:1428-33.
- Sacchetto R, Bovo E, Salviati L, Damiani E, Margreth A. Glycogen synthase binds to sarcoplasmic reticulum and is phosphorylated by CaMKII in fast-twitch skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys.* 2007; 459(1):115-21.
- Sacchetto R, Damiani E, Pallanca A, Margreth A. Coordinate expression of Ca<sup>2+</sup>-ATPase slow-twitch isoform and of beta calmodulin-dependent protein kinase in phospholamban-deficient sarcoplasmic reticulum of rabbit masseter muscle. *FEBS Lett.* 2000; 481(3):255-260.
- Sakuma K, Nakao R, Aoi W, Inashima S, Fujikawa T, Hirata M, Sano M & Yasuhara M. Cyclosporin A treatment upregulates Id1 and Smad3 expression and delays skeletal muscle regeneration. *Acta Neuropathol* 2005; 110,269-80.

- Salanova M, Bortoloso E, Schiffl G, Gutschmann M, Belavy DL, Felsenberg D, Furlan S, Volpe P, Blottner D. Expression and regulation of Homer in human skeletal muscle during neuromuscular junction adaptation to disuse and exercise. *FASEB J*. 2011;25(12):4312-4325.
- Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 2011;91:1447Y531
- Semsarian C, Wu MJ, Ju YK, Marciniak T, Yeoh T, Allen DG, Harvey RP, Graham RM. Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent calcineurin signaling pathway. *Nature*. 1999; 400(6744):576-581.
- Serrano AL, Murgia M, Pallafacchina G, Calabria E, Coniglio P, Lømo T, Schiaffino S. Cn controls nerve activity-dependent specification of slow skeletal muscle fibers but not muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:13108-13113.
- Park SW. Sarcopenia and Neurosurgery. *J Korean Neurosurg Soc* 2014; 56 (2): 79-85.
- Shen T, Cseresnyés Z, Liu Y, Randall WR, Schneider MF. Regulation of the nuclear export of the transcription factor NFATc1 by protein kinases after slow fibre type electrical stimulation of adult mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol*. 2007;579(Pt 2):535-551.
- Stephenson GM. Hybrid skeletal muscle fibres: A rare or common phenomenon ? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28: 692-670.
- Su J, Ekman C, Oskolkov N, Lahti L, Ström K, Brazma A, Groop L, Rung J, Hansson O. A novel atlas of gene expression in human skeletal muscle reveals molecular changes associated with aging. *Skelet Muscle*. 2015; 5:35.
- Summermatter S, Thurnheer R, Santos G, Mosca B, Baum O, Treves S, Hoppeler H, Zorzato F, Handschin C. Remodeling of calcium handling in skeletal muscle through PGC-1 $\alpha$ : impact on force, fatigability, and fiber type. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012; 302(1):C88-99.
- Tarnopolsky MA. Clinical use of creatine in neuromuscular and neurometabolic disorders. *Subcell Biochem*. 2007;46:183-204.
- Termin A, Staron RS, PetteD. Changes in myosin heavy chain isoforms during chronic low-frequency stimulation of rat fast hindlimb muscles. A single-fiber study. *Eur J Biochem* 1989; 186: 749-754.

Thomas MM, Vigna C, Betik AC, Tupling AR, Hepple RT. Initiating treadmill training in late middle age offers modest adaptations in Ca<sup>2+</sup> handling but enhances oxidative damage in senescent rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010; 298(5):R1269-1278.

Trappe S. Master athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2001;11: S196-207

Viana JU, Silva SL, Torres JL, Dias JM, Pereira LS, and Dias RC. Influence of sarcopenia and functionality indicators on the frailty profile of community-dwelling elderly subjects: across-sectional study. *Braz.J.Phys. Ther.* 2013; 17, 373–381.

Wright VJ, Perricelli BC. Age-related rates of decline in performance among elite senior athletes. *Am J Sports Med* 2008;36:443Y50

Yarasheski KE, Zachwieja JJ, Campbell JA, et al. Effect of growth hormone and resistance exercise on muscle growth and strength in older men. *Am J Physiol* 1995;268:E268-76.

Yarasheski KE. Exercise, aging, and muscle protein metabolism. *J Gerontol A Biol Sci Med Sc* 2003; 58:M918-22.

Young A, Stokes M, Crowe M. The size and strength of the quadriceps muscles of old and young men. *Clin Physiol* 1985;5:145-54.

Zacker RJ. Health-related implications and management of sarcopenia. *JAAPA* 2006;19:24-9.

Zampieri S, Doria A, Adami N, et al. Subclinical myopathy in patients affected with newly diagnosed colorectal cancer at clinical onset of disease: Evidence from skeletal muscle biopsies. *Neurol Res* 2010;32:20Y25

Zampieri S, Rossini K, Carrao U, et al. Morphometry of skeletal muscle in sedentary elderly and senior sportsmen. *Eur J Transl Myol Basic Appl Myol* 2012;22:13

Zampieri S, Valente M, Adami N, et al. Polymyositis, dermatomyositis and malignancy: A further intriguing link. *Autoimmun Rev* 2010; 9: 449-53

Zhou Y, Liu D, Kaminski H. Myosin heavy chain expression in mouse extraocular muscle: More complex than expected. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 6355-6363.