



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Anatomia e Fisiologia Umana

SCUOLA DI DOTTORATO: SCIENZE MEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI

INDIRIZZO: NEUROSCIENZE

CICLO XXII

**STUDIO DELLE PROPRIETA' CONTRATTILI E MOLECOLARI
DELLE SINGOLE FIBRE MUSCOLARI SCHELETRICHE
UMANE**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Antonio Tiengo

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Corrado Angelini

Supervisore: Ch.mo Prof. Carlo Reggiani

Dottoranda : Pasqua Cancellara

INDICE

| | |
|--|-----------|
| ABSTRACT | 1 |
| RIASSUNTO | 3 |
| INTRODUZIONE | 5 |
| 1. Caratteristiche generali del muscolo scheletrico | 5 |
| 1.1 La miosina | 8 |
| 1.1.1 Isoforme delle catene pesanti della miosina (MHC) | 10 |
| 1.1.2 Isoforme delle catene leggere della miosina (MLC) | 11 |
| 1.2 Tipi di fibre e proprietà contrattili | 12 |
| Tensione isometrica | 16 |
| 2. Plasticità muscolare | 17 |
| 2.1 Risposte muscolari in seguito a stimoli fisiologici | 17 |
| 2.2 Sarcopenia | 20 |
| 2.3 Allenamento | 25 |
| 2.4 Ipertrofia | 28 |
| 2.5 Atrofia | 31 |
| 2.5.1 Atrofia da Disuso | 33 |
| 2.5.2 Modificazioni del muscolo scheletrico in condizioni di alta quota | 35 |
| SCOPO DELLO STUDIO | 41 |
| MATERIALI E METODI | 45 |
| 1. Soggetti e struttura dello studio | 45 |
| 1.1 Prima fase: confronto tra soggetti di età diverse | 45 |
| 1.2 Seconda fase: soggetti sottoposti a resistance training o allenamento di potenza | 46 |
| Programma di resistance training | 46 |

| | |
|--|-----------|
| Dieta | 47 |
| 1.3 Terza fase: soggetti sottoposti ad attività fisica in alta quota | 48 |
| Componenti della spedizione | 49 |
| 2. Campionamento di biopsie muscolari umane | 50 |
| 3. Meccanica delle fibre muscolari | 52 |
| 3.1 Soluzioni utilizzate | 55 |
| 3.2 Analisi dei parametri meccanici e dimensionali delle fibre muscolari | 56 |
| 4. Analisi molecolari | 58 |
| 4.1 Determinazione proteica | 58 |
| 4.2 Elettroforesi | 59 |
| Separazione MHC | 59 |
| Separazione MLC | 62 |
| 4.2.1 Colorazione dei gel | 63 |
| 4.2.1.1 Colorazione all'argento o Silver Staining | 63 |
| 4.2.1.2 Colorazione con Coomassie Blu | 64 |
| 4.2.1.3 Conservazione dei gel | 65 |
| 4.2.1.4 Analisi densitometrica dei gel | 66 |
| 4.3 Western Blot | 66 |
| 4.3.1 Elettroforesi | 66 |
| 4.3.2 Trasferimento su nitrocellulosa | 67 |
| 4.3.3 Sviluppo | 69 |
| 4.4. Immunocitochimica | 70 |
| 4.4.1 Analisi con microscopia Video-Confocale (ViCo) | 72 |
| RISULTATI | 75 |
| 1. La forza di contrazione delle fibre muscolari umane | 75 |
| 1.1 Valori di Tensione, Forza e CSA | 75 |
| 1.2 Valori di Forza, Tensione e CSA in soggetti divisi in tre fasce di età | 76 |
| 1.2.1 Tensione e CSA totali | 76 |
| 1.2.2 Tensione e CSA per tipi di fibre | 78 |
| 1.3 Valori di Forza e CSA in soggetti sottoposti a resistance training | 81 |

| | |
|---|-----------|
| 1.3.1 Tensione e CSA: variazioni complessive | 81 |
| 1.3.2 Tensione e CSA per tipo di fibre | 82 |
| 1.3.3 Tensione e CSA per soggetto | 83 |
| 1.3.4 Forza totale, per tipi di fibre e per soggetto | 84 |
| 1.3.5 Variazione dei parametri meccanici nei gruppi normoproteico ed iperproteico | 85 |
| Variazioni totali | 86 |
| Variazioni di Forza, Tensione e CSA per tipi di fibre | 87 |
| 1.3.6 Variazione dei parametri meccanici considerando i soggetti sottoposti a resistance training divisi in base al sesso | 90 |
| 1.4 Valori di Forza e CSA in un gruppo di alpinisti | 91 |
| 1.4.1 Variazioni di Tensione e CSA su tutte le fibre | 91 |
| 1.4.2 Variazioni di CSA nelle fibre classificate per tipo | 92 |
| 1.4.3 Tensione e CSA delle fibre muscolari suddivise per soggetto | 93 |
| 2. Analisi elettroforetica | 94 |
| 2.1. Elettroforesi su singole fibre e su campioni multi-fibra | 94 |
| 2.2 Analisi elettroforetiche su campioni di soggetti divisi in tre fasce di età | 94 |
| 2.2.1 Analisi densitometrica su biopsie di soggetti divisi in tre fasce di età | 95 |
| 2.3 Analisi elettroforetiche in soggetti sottoposti a resistance training | 96 |
| 2.3.1 Analisi densitometrica in biopsie di gran dorsale di soggetti sottoposti a resistance training | 97 |
| 2.3.2 Valutazione del nuclear domain | 100 |
| 2.4 Analisi elettroforetiche in un gruppo di alpinisti prima e dopo il soggiorno in quota | 101 |
| 2.4.1 Analisi densitometrica nelle biopsie di vasto laterale di un gruppo di alpinisti | 101 |
| 2.4.2 Separazione elettroforetica delle catene leggere (MLC) in un gruppo di alpinisti | 103 |
| Identificazione mediante Western Blot | 104 |
| 2.4.3 Densitometria delle catene leggere (MLC) in un gruppo di alpinisti | 104 |

| | |
|---|------------|
| DISCUSSIONE | 107 |
| Variazioni dei parametri contrattili e molecolari delle singole fibre muscolari umane in relazione all' invecchiamento | 108 |
| Variazioni dei parametri contrattili dopo resistance training | 110 |
| Effetto della dieta iperproteica | 112 |
| Aspetti molecolari e fibre type transition | 114 |
| Variazioni dei parametri contrattili e molecolari nelle fibre muscolari dopo attività ad alta quota | 116 |
| Conclusioni | 119 |
| BIBLIOGRAFIA | 121 |
| APPENDICE | 135 |
| Pubblicazioni | 135 |
| 1) Masticatory myosin unveiled: first determination of contractile parameters of muscle fibers from carnivore jaw muscles | 135 |
| 2) Effects of local vibrations on skeletal muscle trophism in elderly people: Mechanical, cellular, and molecular events | 135 |

ABSTRACT

The skeletal muscle fibers show a great functional heterogeneity regarding the parameters of the contractile response, the metabolic pathways involved in the generation of the ATP, the resistance to fatigue. This functional heterogeneity is the base of the ability of the skeletal muscles to respond to very diversified functional demands such as the maintenance of the posture for long time with low energy expenditure or the generation of fast and powerful movements.

Fibers with the most suitable characteristics can be recruited in different situations. The specialization of the fibers is not permanent, as the fibers show a plasticity or malleability, they can modify their functional or structural properties to better respond to the functional demands.

Therefore adult skeletal muscle is a highly malleable tissue which can respond positively to pharmacological, environmental, and mechanical stimuli with remarkable adaptations.

In this work we investigated how single muscle fibers change their properties, altering both mechanical and morphological parameters such as isometric tension (P_o), cross sectional area (CSA), and molecular aspects regarding MHC isoforms switches and fiber type transitions.

For this purpose our work presents three distinct tasks that correspond to three different stimuli induced in skeletal human muscle to characterize plasticity changes at single muscle fiber level.

- The first purpose was to identify the impairment at single muscle fiber level with regard to age and, specifically, with regard to sarcopenia, associated with progressive loss of skeletal muscle mass and strength. In view of contrasting results present in several studies about this focus, we compared three groups of healthy subjects divided according to their age: the *young-adult group*, the *middle-age group* and the *elderly group*. The following parameters were determined in single muscle fibres and compared in the three groups: isometric tension (P_o), cross sectional area (CSA), and myosin content.
- In the second step of this work we have investigated the effects of *resistance training* at single muscle fiber level. *Strength or resistance training* is frequently used to improve

muscle mass and performance. Although there are many studies on the relation between training protocols and fibre adaptations in lower limb muscles, there are relatively few data available on changes of fibre type, size and performance in upper limb muscles. This study aimed to analyse at muscle fibre level the effect strength training of shoulder muscles in 18 healthy subjects (9 men and 9 women) who trained three times a week for 2 months. These subjects were further divided in 2 groups assuming different amount of proteins. Single muscle fibres were dissected from biopsy samples and subject to mechanical and molecular analysis as above described.

- Finally in the last part of the study we considered the effect of training performed at high altitude. In this study we examined single muscle fibres taken from biopsy of seven male volunteers before and upon the return from the Himalayan Expedition during which they were chronically exposed to high altitude environment living spending about 30 days above 5000 m. Single muscle fibres were subject to mechanical and molecular analysis as above described.

RIASSUNTO

Le fibre muscolari scheletriche mostrano una notevole eterogeneità funzionale per quanto concerne i parametri contrattili, le vie metaboliche coinvolte nella generazione di ATP, nonché la capacità di resistere alla fatica. Questa eterogeneità funzionale è alla base dell'abilità del muscolo scheletrico di rispondere a richieste funzionali di diversa natura, quali il mantenimento della postura nel lungo termine con un minimo dispendio di energia, che compensa invece un più alto consumo energetico per la generazione e il mantenimento di movimenti rapidi e potenti.

In differenti situazioni verranno dunque reclutate quelle fibre che avranno le caratteristiche più idonee al caso. La specializzazione delle fibre, tuttavia, non è permanente poichè esse mostrano una notevole capacità plastica che permette loro di modificare le proprietà strutturali e funzionali per meglio rispondere alle richieste funzionali che possono presentarsi. Pertanto il muscolo scheletrico adulto si presenta come un tessuto altamente malleabile in grado di rispondere a stimoli di varia natura, farmacologici, ambientali, meccanici, con adattamenti sorprendenti.

Il lavoro riportato in questa tesi mira a comprendere come singole fibre muscolari modificano le loro proprietà, alterando sia parametri meccanici e morfologici quali, rispettivamente, la tensione isometrica (P_0) e l'area della sezione traversa (CSA), che gli aspetti molecolari riguardanti i processi di *switch* delle isoforme delle catene pesanti della miosina (MHC) e le conseguenti transizioni dei tipi di fibre.

A tal proposito la nostra ricerca si è sviluppata in tre fasi, in ciascuna delle quali è stato valutato l'effetto indotto sul muscolo scheletrico umano da un diverso stimolo, al fine di caratterizzare i cambiamenti di plasticità a cui le singole fibre vanno incontro.

- Il primo compito affrontato è stato quello di identificare eventuali alterazioni a livello di singola fibra in seguito al processo di invecchiamento e, in modo specifico, al processo di sarcopenia, associato ad una progressiva perdita di massa e forza muscolare. Poichè la letteratura mostra dati contrastanti riguardo i cambiamenti a livello di singole fibre durante il processo di senescenza, in questa prima fase è stato operato un confronto tra tre gruppi di soggetti suddivisi in relazione all'età in: *young-*

adult group, middle age group e elderly group. Singole fibre muscolari sono state sottoposte ad analisi meccaniche e molecolari.

- Successivamente sono stati studiati gli effetti di un allenamento di forza a livello di singole fibre. Questo tipo di allenamento viene utilizzato per aumentare la massa muscolare e migliorarne la *performance*. Sebbene la letteratura riporti numerosi studi sull'adattamento in seguito a programmi di *resistance training* (allenamento di forza) riguardanti i muscoli degli arti inferiori, pochi sono gli studi effettuati sui muscoli degli arti superiori. Per valutare l'effetto di un allenamento di forza su muscoli della spalla sono stati reclutati 18 soggetti (9 uomini e 9 donne) sottoposti ad allenamento 3 volte a settimana per due mesi. Questi sono stati ulteriormente divisi in due gruppi in base ad un differente apporto proteico. Singole fibre muscolari prelevate dai campioni biotici sono state poi sottoposte ad analisi meccaniche e molecolari come nel caso dei campioni riguardanti la prima fase dello studio.
- Infine, nell'ultima parte della ricerca, sono stati valutati gli effetti di un allenamento svolto in condizioni di alta quota, durante una spedizione sul monte Manaslu (Himalaya). Sono state isolate singole fibre a partire da biopsie di 7 volontari, uomini, prelevate prima e dopo la spedizione, durante la quale per circa 30 giorni hanno vissuto ad elevate altitudini (5000 m), e sottoposte ad analisi meccaniche e molecolari.

INTRODUZIONE

1. Caratteristiche generali del muscolo scheletrico

Il movimento, generato dall'apparato neuromuscolare è forse la caratteristica che più distingue gli animali dai vegetali. Il muscolo consente all'uomo non solo di camminare e di muoversi, ma anche di parlare e scrivere, le forme più complesse ed evolute di comunicazione. L'uomo prende la decisione volontaria di parlare, camminare, stare in piedi o sedersi; i muscoli che attuano tali decisioni sono i muscoli scheletrici. Una cellula muscolare che agisce sullo scheletro per produrre movimento svolge un ruolo specifico che impone alla cellula gran parte delle sue stesse proprietà (*Berne and Levy, Principi di Fisiologia*). Inoltre, i muscoli scheletrici rappresentano circa il 40% del peso corporeo: sono quindi l'organo più grande con un significativo impatto su ogni forma di metabolismo.

Ogni muscolo scheletrico è formato da un ventre muscolare, in cui si trovano le fibre, e due tendini connettivali con cui il muscolo si inserisce sulle ossa. Esternamente è avvolto da una guaina di connettivo fibroso, l'epimisio, che si addentra nel ventre muscolare avvolgendo fasci di fibre (perimisio) e singole fibre (endomisio). Nel connettivo interposto tra le fibre muscolari decorrono vasi sanguigni e fibre nervose motorie e sensitive.

Il muscolo scheletrico, come quello cardiaco, è caratterizzato da una muscolatura striata che deve il suo nome alla presenza, all'esame microscopico, di una precisa organizzazione delle proteine contrattili in miofibrille, la quale risulta evidente dal ripetersi di unità arrangiate in serie, i sarcomeri (Fig. 1 e 3).

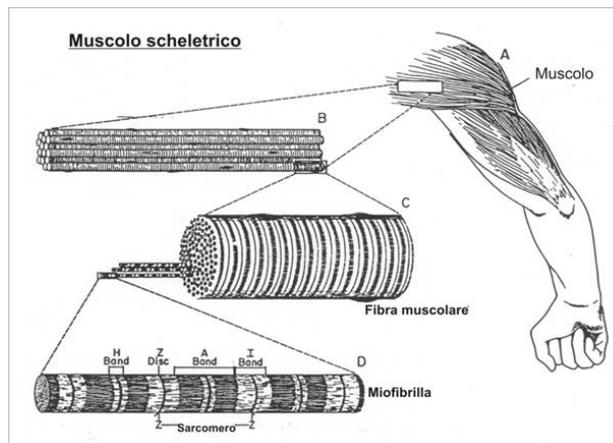


Fig. 1 Rappresentazione schematica dell'organizzazione del muscolo scheletrico: A: muscolo, B: fascio di fibre muscolari, C: singola fibra muscolare, D: miofibrilla (modificato da Bloom Fawcett, A testbook of Histology).

La **fibra** costituisce l'unità fondamentale del muscolo. Una fitta rete di capillari circonda ogni singola fibra muscolare, garantendo apporto di ossigeno e nutrienti, e rimozione di anidride carbonica e cataboliti. Le esigenze nutrizionali dei muscoli variano in funzione del livello di attività e, di conseguenza, diversi meccanismi a breve termine, come la vasodilatazione nei distretti attivi, o a lungo termine, come l'incremento del numero di capillari nei muscoli allenati, regolano la distribuzione del flusso sanguigno in base alle specifiche necessità metaboliche del tessuto muscolare.

La fibra è una cellula plurinucleata, deriva embriologicamente dalla divisione multipla di cellule progenitrici che danno origine a mioblasti la cui fusione porta alla formazione di cellule sinciziali multinucleate. È lunga da pochi mm a molti cm e di diametro variabile, 10-100 μm ; circondata da una membrana, il sarcolemma, che racchiude una matrice fluida, il sarcoplasma in cui sono presenti i nuclei, gli organelli sarcoplasmatici, granuli di glicogeno e le miofibrille che costituiscono la componente contrattile del muscolo. Le miofibrille sono circondate da un sistema di membrane costituite da vescicole e tubuli che danno origine al reticolo sarcoplasmatico. Le miofibrille, che si presentano con un diametro compreso tra i 0,5 e i 2 μm , sono a loro volta costituite da miofilamenti o protofibrille di due tipi: miofilamenti più spessi con un diametro di 12 nm e miofilamenti più sottili aventi diametro all'incirca di 4 nm. La presenza dei filamenti spessi e sottili determina l'alternanza, lungo le miofibrille, di zone a diverso indice di rifrazione; la zona monorifrangente o banda I (isotropa) contiene solo i

filamenti sottili, la zona birifrangente o banda A (anisotropa) contiene al contrario entrambi i tipi di filamenti; al centro della banda A è presente una zona otticamente meno densa detta banda H che contiene i soli filamenti spessi; al centro della banda H si può osservare una linea trasversale più scura denominata banda M. Al centro della banda I è presente una stria trasversale chiamata linea Z. La porzione di fibra compresa tra due linee Z successive prende il nome di *sarcomero* e rappresenta l'unità contrattile della fibra muscolare (Fig. 2). I filamenti spessi sono costituiti da molecole di miosina e da un complesso di proteine leganti la miosina: la titina, la proteina C e le proteine della linea M.

I filamenti sottili sono costituiti da molecole di actina, tropomiosina, troponina, nebulina e tropomodulina. Nel sarcomero i filamenti si dispongono in modo regolare così che ogni filamento spesso risulta circondato da sei filamenti sottili.

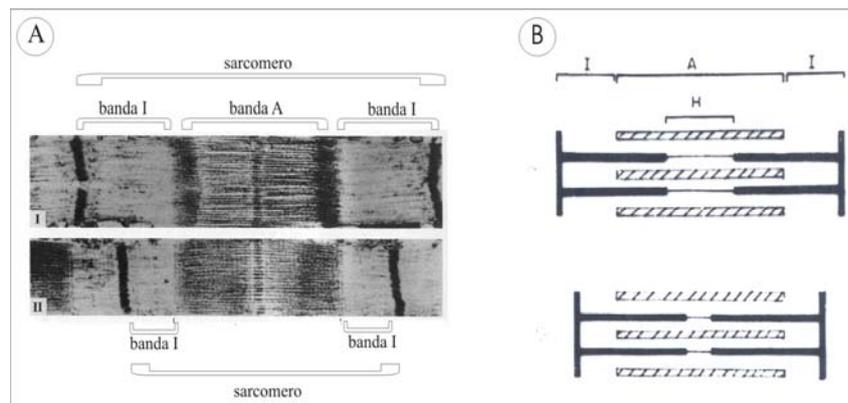


Fig. 2 Rappresentazione del sarcomero: A-fotografia al microscopio elettronico (I:rilassato, II:contratto), B-rappresentazione schematica (tratto da Rosati-Colombo, I tessuti).

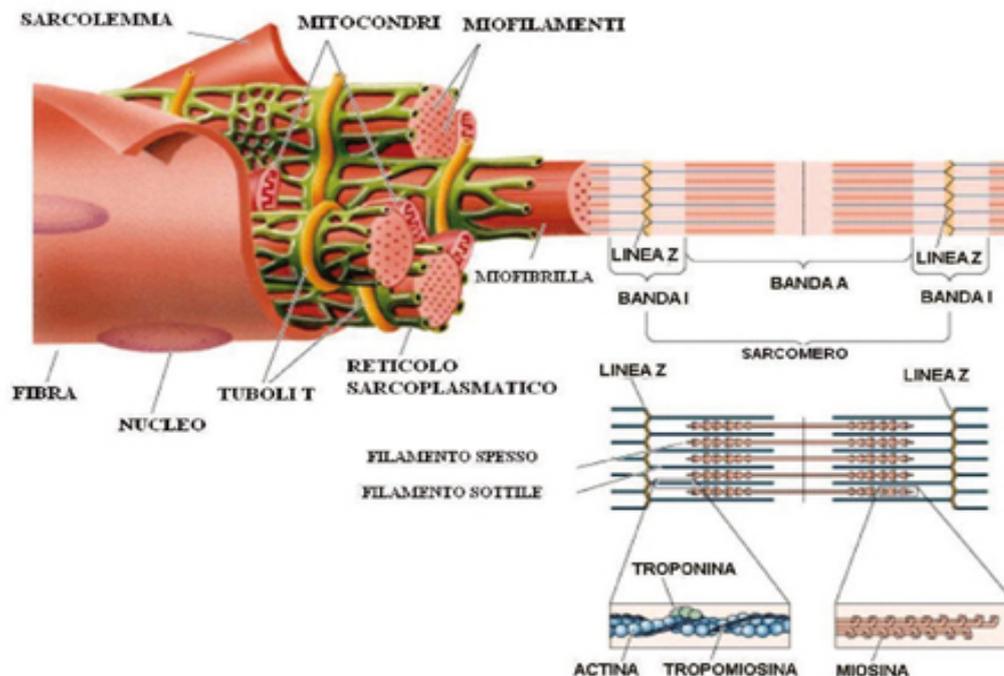


Fig. 3 Rappresentazione dell'organizzazione cellulare di una fibra muscolare scheletrica. L'interno di ogni *fibra muscolare* appare, al microscopio, costituito da fasci paralleli di *miofibrille* le quali sono, a loro volta, composte da unità proteiche elementari (*miofilamenti*), disposte secondo uno schema regolare che si ripete per tutta la lunghezza della miofibrilla. Un'unità di questo schema ripetitivo viene detta *sarcomero*.

1.1 La miosina

È il motore molecolare più conosciuto; i motori molecolari sono proteine capaci di convertire l'energia chimica in energia meccanica (trasduzione chemio-meccanica) attraverso un cambiamento strutturale (*working stroke*). Il *working stroke*, amplificato da un'organizzazione ordinata di un insieme di motori molecolari, può dar luogo a microscopici, ed anche macroscopici, movimenti visibili delle cellule o di parti di esse. La *miosina sarcomerica* o *di classe II* è la proteina più abbondante del muscolo e come motore molecolare soddisfa le richieste energetiche per la contrazione muscolare; questa proteina va a costituire, in centinaia di unità (300 circa), il filamento spesso. Negli organismi multicellulari le miosine di classe II sono presenti non solo nelle cellule muscolari ma anche nelle piastrine, cellule epiteliali gastroenteriche e neuroni. La miosina di classe II è un eteroesamero, costituita da sei subunità

che interagiscono non covalentemente fra loro. In particolare troviamo due catene pesanti della miosina (*myosin heavy chains – MHCs*) formate da una coda ad α -elica e da una testa globulare che costituisce il dominio motorio in quanto possiede attività ATPasica ed è in grado di legarsi ai monomeri di actina dei filamenti sottili. Il peso di ciascuna catena pesante si aggira attorno ai 220 kD. In corrispondenza della regione di passaggio fra testa e coda (talvolta riportata come collo, “*neck*”) sono associate quattro catene leggere della miosina (*myosin light chains – MLCs*) che possono essere convenzionalmente raggruppate due a due. Il peso di ogni coppia di MLC varia fra i 15 e i 30 kD e si distinguono catene leggere “essenziali” o alcaline e catene leggere “regolatorie” o fosforilabili. I filamenti spessi dei muscoli striati sono lunghi 1,6 μm e sono composti da due porzioni simmetriche, ciascuna contenente circa 300 molecole di miosina (Reggiani *et al.*, 2000) (Fig. 4).

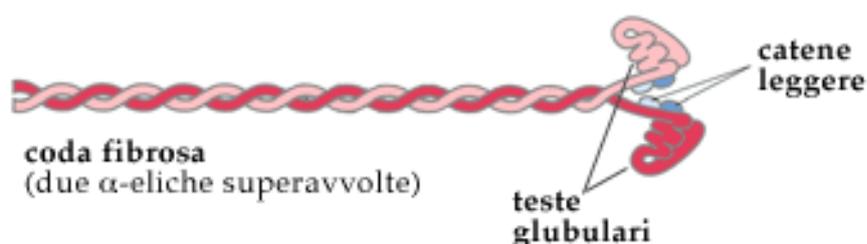


Fig. 4 Rappresentazione schematica di una molecola di miosina costituita da due catene pesanti (MHC) e da due paia di catene leggere (MLC).

Le catene pesanti della miosina (MHC), così come le catene leggere (MLC) essenziali e regolatorie, sono codificate da una famiglia di multigeni e comprendono pertanto diverse isoforme. Varie combinazioni di queste subunità danno luogo ad un ampio numero di *isomiosine* (Schiaffino and Reggiani, 1996). Il segreto della straordinaria capacità della miosina di rispondere a richieste funzionali molto diverse tra loro risiede proprio nell’esistenza di isoforme multiple di MHC ed MLC.

Sebbene sia possibile la co-espressione di due o più geni MHC e sia anche frequente durante lo sviluppo o i cambiamenti nei pattern di attività, secondo la regola generale ciascuna cellula esprime solo un gene MHC associato a due geni MLC. Ciò crea una popolazione eterogenea di fibre muscolari, ciascuna contenente una specifica combinazione di isoforme MHC ed MLC.

Tuttavia l'esistenza di *fibre ibride* contenenti differenti isoforme proteiche miofibrillari è abbastanza frequente e potrebbe invece rappresentare la regola piuttosto che l'eccezione: multiple isoforme delle MHC sono regolarmente coespresse durante lo sviluppo, durante le trasformazioni indotte da stimolazioni elettriche, e durante cambiamenti nello stato ormonale e nell'attività fisica. La co-espressione di differenti isoforme MHC di tipo *fast* rappresenta una condizione stabile nel muscolo maturo umano, come determinato da analisi a livello proteico e di mRNA. Anche la coesistenza di isoforme *slow* e *fast* può essere osservata nei normali muscoli, e la proporzione relativa delle MHC *fast* verso le *slow* potrebbe variare indipendentemente dalle variazioni delle isoforme MLC. Poiché la diversità di isoforme è associata ad una diversità funzionale, il *continuum* del fenotipo molecolare potrebbe dar luogo ad un *continuum* delle proprietà funzionali (Bottinelli et al., 1994). Queste condizioni offrono la possibilità di studiare gli aspetti della trasduzione chimico-meccanica di diverse isoforme semplicemente analizzando il comportamento di singole fibre muscolari.

Nelle fibre del muscolo scheletrico, la proporzione delle diverse isoforme della miosina è il principale determinante della prestazione contrattile e da essa dipendono parametri come la velocità massima di contrazione (V_0 o V_{max}) che indica la velocità alla quale la fibra si accorcia quando non viene applicato nessun carico, la forza isometrica (P_0) determinata, secondo la teoria del *cross-bridges*, dal numero (per unità di *cross-sectional area*) di ponti actino-miosinici presenti ad un dato tempo moltiplicati per la forza sviluppata da un singolo *cross-bridge* (Schiaffino and Reggiani, 1996), la potenza massima (W_{max}), la spesa energetica in termini di consumo di ATP durante la contrazione. Per questa ragione la correlazione fra l'espressione delle diverse isoforme della miosina e le prestazioni contrattili della fibra muscolare è stata oggetto di diversi studi data la sua rilevanza nelle neuroscienze, in gerontologia o nella medicina e fisiologia dello sport (Bottinelli e Reggiani 2000).

1.1.1 Isoforme delle catene pesanti della miosina (MHC)

Nel genoma umano come in quello di tutti i mammiferi sono stati individuati nove geni che codificano per le MHC sarcomeriche di classe II. I geni MHC sono distribuiti in due *clusters* principali: il primo contiene i geni MHC- β /*slow* ed MHC- α ed è localizzato nell'uomo sul cromosoma 14; il secondo *cluster* comprende i geni MHC-emb, MHC-neo, MHC-eo e geni

delle tre MHC fast adulte ed è localizzato sul cromosoma 17 (*Schiaffino and Reggiani, 1996*). Queste isoforme sono state caratterizzate sia a livello proteico che di mRNA. Quattro geni codificano per le isoforme MHC 1 o β -*slow*, MHC 2A, MHC 2X e MHC 2B, predominanti nel muscolo scheletrico adulto in differenti specie di mammiferi, ed espresse nelle fibre muscolari degli arti e del tronco. Tra queste MHC 1 o β -*slow* è anche espressa a livello del miocardio ventricolare. Le proporzioni relative con le quali si presentano queste isoforme variano da muscolo a muscolo, sulla base della funzione e della posizione dello stesso (per esempio negli arti inferiori è maggiormente espressa l'isoforma MHC 1 seguita dall'MHC 2A mentre sono rare le fibre MHC 2X; negli arti superiori le isoforme 2A e 2X sono relativamente più espresse). L'isoforma MHC 2B generalmente non è espressa nei muscoli scheletrici umani. Altri due geni codificano per le isoforme MHC-emb e MHC-neo che sono espresse solamente durante lo sviluppo, nella vita adulta soltanto durante la rigenerazione e, in alcune specie, nei muscoli masticatori. Le restanti tre isoforme presentano una distribuzione tissutale limitata: MHC- α è espressa nel cuore e in alcune specie nei muscoli mandibolari; MHC-eo nei muscoli extraoculari e della laringe ed infine l'isoforma MHC-m nei muscoli mandibolari dei carnivori e primati non umani (*Reggiani and Mascarello, 2004*).

Le sequenze amminoacidiche delle catene pesanti delle miosine sarcomeriche presentano una elevata omologia, tuttavia contengono delle regioni, quali il COOH-terminale e la sequenza ad α -elica nella regione del *neck*, le cui sequenze divergono significativamente. A livello della testa della miosina ci sono due *loops* di superficie localizzati in prossimità del sito di legame con l'ATP e con l'actina che sono scarsamente conservati in lunghezza e in sequenza amminoacidica e ciò potrebbe essere rilevante per la determinazione dell'attività ATPasica e della velocità di accorciamento della molecola di miosina.

1.1.2 Isoforme delle catene leggere della miosina (MLC)

Nei muscoli striati di mammifero sono state identificate cinque isoforme delle catene leggere essenziali della miosina (MLC); le fibre di muscoli scheletrici *fast* contengono due isoforme, MLC 1*fast* (MLC 1f) e MLC 3*fast* (MLC 3f); le fibre di muscoli scheletrici *slow* esprimono altre due isoforme, MLC 1*slow/ventricular* (MLC 1s/v o MLC 1s/b) che è espressa nel miocardio ventricolare, e l'isoforma MLC 1*slow-a* (MLC 1sa) espressa anche nel muscolo

liscio e in tessuti non muscolari. Una quinta isoforma, MLC 1emb/atrial è espressa durante lo sviluppo del muscolo scheletrico e nel cuore a livello atriale. Queste isoforme originano da geni diversi, ad eccezione delle catene MLC 1f e MLC 3f che originano da un singolo gene mediante il meccanismo di *splicing* alternativo.

Le catene leggere regolatorie sono chiamate anche fosforilabili. Queste proteine subiscono modifiche post-translazionali poiché sono fosforilate in un residuo di serina da parte della chinasi MLC Ca^{2+} /Calmodulina dipendente. Si è visto che la fosforilazione da parte di queste proteine è essenziale per l'interazione actina-miosina nel muscolo liscio. D'altra parte la contrazione dei muscoli striati è attivata dall'interazione troponina-tropomiosina, quindi la fosforilazione delle catene leggere MLC avrebbe solo un ruolo modulatorio incrementando la produzione di forza durante attivazione a bassi livelli di calcio, il che suggerirebbe una funzione modulatoria per potenziare la *performance* e l'efficienza di contrazione (González et al., 2002). Nei muscoli scheletrici di mammifero sono presenti due isoforme delle MLC regolatorie, MLC 2fast (MLC 2f) ed MLC 2slow (MLC 2s).

1.2 Tipi di fibre e proprietà contrattili

Il muscolo scheletrico si presenta come un tessuto eterogeneo: l'eterogeneità è una proprietà di tutti i muscoli, essenziale per la loro funzione. I muscoli scheletrici sono tenuti a rispondere ad un ampio *range* di richieste funzionali in ciascuna specie animale, spesso diverse in differenti specie animali. Tale flessibilità funzionale trova le sue basi: (1) in un potente e accurato controllo del sistema nervoso e (2) nella disponibilità in ciascun muscolo di numerosi tipi di fibre con distinti aspetti e compiti funzionali (resistenza alla fatica, velocità di contrazione etc.). Le proprietà contrattili ed energetiche del muscolo scheletrico sono state per anni studiate *in vivo*, ed è sempre risultato difficile identificare il ruolo specifico delle fibre nella modulazione della *performance* muscolare. Negli ultimi anni è stato possibile dissezionare singole fibre a partire da biopsie muscolari umane e studiarle riproponendo *in vitro* condizioni fisiologiche analoghe alla situazione *in vivo* (Reggiani e Bottinelli, 2000).

Alla stesso tempo lo sviluppo della biologia molecolare ha permesso di ottenere una cospicua mole di informazioni sulle proteine del muscolo e sui relativi geni, rendendo pertanto possibile l'analisi della composizione delle isoforme delle proteine muscolari nelle stesse fibre sottoposte precedentemente a studi funzionali.

L'espressione di differenti isoforme proteiche e quindi l'esistenza di fenotipi distinti di fibre muscolari rappresenta la principale determinante della *performance* muscolare *in vivo*.

L'importanza di focalizzare l'attenzione a livello di singola fibra e di estendere lo studio non solo agli animali ma all'uomo è legata, tra le diverse ragioni, all'interesse della ricerca medica e fisiologica applicata. Inoltre l'uomo è caratterizzato da una postura e una locomozione peculiari, lo sviluppo del sistema nervoso acquisisce aspetti peculiari non comparabili con nessun'altra specie animale. Negli ultimi anni infatti stanno emergendo vari esempi di differenze esistenti tra muscoli umani e muscoli di piccoli mammiferi. Un primo esempio è dato dall'isoforma della catena pesante della miosina 2B, espressa nei muscoli dei piccoli mammiferi come ratto, topo, coniglio, ma assente nell'uomo (*Smerdu et al., 1994; Ennion et al., 1995*). Altra differenza è data dalla presenza di regole meno rigide riguardanti la coespressione tra le proteine miofibrillari: isoforme *slow* delle catene leggere (MLC) spesso coesistono con le isoforme *fast* delle catene pesanti (MHC) e viceversa (*Larsson e Moss, 1993*). Ciò comporterebbe una maggiore variabilità dell'espressione genica nel muscolo umano.

La **diversità** tra le fibre muscolari coinvolge molti aspetti della struttura e funzione del muscolo; la determinazione di parametri funzionali in una popolazione di singole fibre umane mostra ranges ampi e continui di variabilità. La generazione di tale diversità è basata sulla regolazione genica attraverso due principali meccanismi:

- 1- *meccanismo qualitativo*: la maggioranza delle proteine muscolari esistono in forme simili ma non identiche e prendono il nome di **isoforme**; queste possono derivare dallo stesso gene, attraverso un meccanismo di *splicing* alternativo, o da geni differenti ma appartenenti alla stessa famiglia (isogeni). La presenza di isoforme rappresenta il primo meccanismo che genera diversità tra le fibre muscolari.
- 2- *meccanismo quantitativo*: espressione differenziale dello stesso gene in quanto molti geni possono subire il processo di **up-regulation** e **down-regulation** sulla base di vari fattori come un pattern di scarica neuronale, un carico meccanico, stimoli ormonali e via di seguito. La proporzione tra i prodotti di questi geni viene in questo modo modificata portando alla comparsa di nuovi aspetti funzionali e strutturali.

Il numero di possibili combinazioni generato dai due meccanismi risulta comunque limitato da richieste strutturali, da regole di espressione che definiscono associazioni preferenziali tra le

isoforme proteiche. Per questa ragione il numero di possibili combinazioni tende a diminuire e sono invece presenti dei fenotipi di fibre muscolari più frequenti. Un tipo di fibra è in conclusione il risultato di uno specifico profilo di espressione genica che, per alcuni geni indica un *up* o *down-regulation*, per altri una selettiva espressione di una isoforma (Reggiani and Mascarello, 2004).

La comparsa di specifici tipi di fibre si realizza nel momento in cui ha luogo la trasformazione delle miofibre, in primo luogo nella fase di sviluppo, quando emergono i vari tipi di fibre muscolari. Durante lo sviluppo prenatale si assiste a tre (ondate) cicli di fusione di mioblasti nel muscolo dell'uomo (Draeger et al., 1987), e non si evidenzia nessuna differenza tra le fibre fino alla ventesima settimana dopo la quale comincia a comparire il fenotipo adulto ed entro un anno circa tutte le fibre postnatali sono completamente differenziate. Infine nel corso della vita postnatale il fenotipo della fibra muscolare può ancora essere modificato nei suoi aspetti strutturali e funzionali in seguito ad una varietà di stimoli di varia natura.

Quando vanno incontro a delle trasformazioni le fibre muscolari si muovono da un fenotipo all'altro (*type transition*), ciò implica pertanto l'esistenza, all'interno di queste cellule, di regole che coordinano l'espressione di vari geni e modulano varie funzioni (produzione e consumo di energia, metabolismo del calcio etc). Le trasformazioni fenotipiche sono state studiate più in dettaglio negli animali, in particolar modo negli animali di piccola taglia (Pette e Staron, 1997).

Tra i determinanti dei tipi di fibre il pattern di scarica neuronale ha un ruolo centrale; come conseguenza tutte le fibre di una unità motoria, ovvero tutte le fibre innervate dallo stesso motoneurone e riceventi lo stesso pattern di stimolazione, esibiscono lo stesso fenotipo, sono pertanto fibre dello stesso tipo.

La **classificazione funzionale** più semplice dei tipi di fibre si basa sui parametri seguenti:

- parametri di risposta contrattile, i quali sono determinati dalla composizione proteica delle miofibrille e del reticolo sarcoplasmatico. Le fibre muscolari si definiscono *slow* o *fast* sulla base della loro velocità di contrazione, la velocità cioè a cui sviluppano tensione durante la contrazione e a cui scompare durante il rilasciamento.
- L'abilità di sostenere il consumo energetico dovuto all'attività contrattile con adeguata produzione di ATP. Le fibre possono essere resistenti alla fatica o non resistenti sulla

base della loro capacità di mantenere la *performance* contrattile durante ripetute stimolazioni.

Alla luce di questi due criteri si identificano tre tipi di miofibre:

1. **S**: *slow e resistenti* a fatica esprimenti l'isoforma *MHCI* (fibre di tipo 1)
2. **FR**: *fast e resistenti* a fatica esprimenti l'isoforma *MHC 2A* (fibre di tipo 2A)
3. **FF**: *fast e non resistenti* a fatica esprimenti l'isoforma *MHC 2X* (fibre di tipo 2X).

Tra tutte le proteine la cui espressione varia da un tipo di fibra ad un altro, le isoforme della catena pesante della miosina sono generalmente considerate il *marker* molecolare del tipo di fibra: i tipi di fibre sono spesso indicati con il nome dell'isoforma di miosina che è espressa. La miosina è infatti la più abbondante proteina muscolare e determina anche il consumo energetico nonché le proprietà e le *performances* meccaniche delle fibre muscolari.

Le fibre di I tipo sono di colore più scuro per la ricchezza di mioglobina, presentano piccolo diametro, bassi valori di ATPasi miofibrillare e un ampio corredo di enzimi ossidativi; tali fibre, responsabili del tono muscolare, si contraggono lentamente e hanno notevole resistenza alla fatica.

Le fibre di II tipo (chiare), invece, sono atte a contrazioni rapide e strenue, come quelle nel salto in alto e nella corsa su brevi distanze. Tali fibre hanno uno sviluppato reticolo sarcoplasmatico che consente il rapido rilascio di ioni calcio, presentano un metabolismo prevalentemente anaerobico, e generano forza, o *tensione muscolare*, più velocemente delle fibre di tipo I.

La base molecolare della contrazione è l'interazione tra miosina ed actina associata all'idrolisi dell'ATP. Studi condotti sulla determinazione dell'attività ATPasica hanno rilevato che miosine isolate da muscoli *fast* di mammifero hanno valori di attività massima più alti rispetto ai valori delle miosine isolate da muscoli *slow* (Barany, 1967). La determinazione della velocità di idrolisi di ATP in singole fibre *skinned* rende possibile un confronto diretto con l'output meccanico; tale confronto assume grande interesse poiché l'idrolisi dell'ATP fornisce energia per il lavoro meccanico. I muscoli e le fibre esprimenti isoforme MHC *fast* consumano ATP ad una velocità maggiore rispetto a muscoli e fibre caratterizzate da isoforme MHC *slow*. Nello specifico, la velocità massima di contrazione (V_0), ovvero la velocità di contrazione a carico zero, è circa tre volte più alto nelle fibre *fast* rispetto alle *slow* e il consumo di ATP

durante la contrazione aumenta in relazione diretta alla velocità di accorciamento. La diversità di isoforme MHC genera grandi variazioni nei valori di velocità (V_0), di potenza al picco (W_{max}), di tensione isometrica (P_0), di velocità ottimale (V_{opt}), nella velocità di idrolisi dell'ATP (Reggiani et al., 2000).

Tensione isometrica

Come gli altri parametri meccanici, la tensione isometrica sviluppata dalle singole fibre muscolari scheletriche umane, mostra un ampio ambito di variabilità. Questo parametro presenta inoltre un debole livello di correlazione con la composizione in MHC delle fibre muscolari, in accordo con quanto osservato nei piccoli mammiferi (Bottinelli et al. 1994). Nell'uomo le fibre muscolari di tipo 1 mostrano generalmente valori di tensione isometrica più bassi rispetto alle fibre intermedie di tipo 2A e veloci 2X mentre ciò non è riscontrabile in modo definitivo per le fibre 2A rispetto alle 2X (Bottinelli et al., 1996). Un importante elemento evidenziato in letteratura riguarda la presenza di rilevanti differenze di P_0 che sono state riscontrate e riportate da vari gruppi di ricerca e che possono dipendere da diversi fattori. Tra questi bisogna considerare i metodi utilizzati per il calcolo dell'area della sezione trasversale (CSA) delle fibre, che nella maggioranza dei casi viene calcolata assumendo una forma circolare della CSA (Stienen et al., 1996; Bottinelli et al., 1996), mentre in altri casi viene assunta una forma ellittica (Larsson e Moss, 1993). Secondo importante fattore è rappresentato dal fenomeno di rigonfiamento o *swelling* che si manifesta nelle fibre skinnate e quindi sottoposte a spellamento prima delle analisi meccaniche. Alcuni autori riportano nei loro articoli l'area della sezione trasversale non corretta per lo *swelling*, altri invece la correggono riducendola del 20% con conseguente aumento del valore di tensione isometrica. Vi sono altri fattori che contribuiscono alla differenze dei valori di P_0 , tra cui la temperatura di lavoro, la forza ionica, la composizione delle soluzioni attivanti e la concentrazione di fosfato. Infine un altro fattore da non trascurare è dato dalla omogenea distribuzione delle proteine miofibrillari nell'intero volume della fibra analizzata. Alcuni studi suggeriscono la possibilità che le variazioni della CSA e del contenuto proteico delle miofibrille possano risultare non strettamente interconnesse (Larsson et al., 1996). In questo caso la normalizzazione della forza

sulla CSA risulterebbe insufficiente nel determinare l'ammontare di forza sviluppata in base al contenuto miosinico della fibra.

2. Plasticità muscolare

2.1 Risposte muscolari in seguito a stimoli fisiologici

Le differenze morfologiche, biochimiche e funzionali tra i tipi di fibre muscolari sono una conseguenza dei diversi pattern di espressione genica fibra-specifici. L'esistenza di svariate isoforme delle proteine miofibrillari, e soprattutto della miosina, è non solo alla base della eterogeneità funzionale delle fibre e dei muscoli scheletrici, ma anche della loro **plasticità**, cioè della capacità del tessuto muscolare di modificare la propria prestazione adattandola a mutevoli esigenze funzionali. Una delle caratteristiche più sorprendenti delle fibre muscolari differenziate del muscolo scheletrico, infatti, è l'alto grado di plasticità come risposta adattativa a richieste fisiologiche e non (*Meissner et al., 2006*).

La regolazione della prestazione contrattile si basa sui meccanismi a breve termine, ai quali presiede il controllo nervoso, e sui processi di plasticità muscolare, per la regolazione in tempi lunghi. Da una parte, quindi, i meccanismi nervosi di programmazione del movimento sono in grado, mediante il reclutamento e la regolazione della frequenza di scarica dei motoneuroni, di aggiustare istantaneamente la capacità di sviluppare forza di contrazione. Dall'altra, invece, in risposta a ripetuti o prolungati cambiamenti delle richieste funzionali, il tessuto muscolare si comporta come un tessuto fortemente plastico, capace di modificarsi profondamente sia in senso quantitativo che in senso qualitativo. I diversi cambiamenti possono interessare l'apparato miofibrillare, il reticolo sarcoplasmatico, e le proteine coinvolte nella regolazione della concentrazione del calcio intracellulare nonché i sistemi enzimatici coinvolti nel metabolismo energetico. Tuttavia, in condizioni fisiologiche, attraverso meccanismi trascrizionali e post-trascrizionali, i rapporti stechiometrici tra le diverse componenti proteiche, quali ad esempio il rapporto miosina/actina o catene pesanti/leggere della miosina, vengono mantenuti costanti e sono essenziali per mantenere l'integrità strutturale e funzionale del

sarcomero. La popolazione delle **fibre** cosiddette “**miste**”, in cui sono coespresse differenti isoforme MHC, è un segno tipico dell’equilibrio dinamico che caratterizza il muscolo scheletrico ed è rappresentativo della capacità delle fibre di trasformarsi da un tipo all’altro. Un periodo critico nel corso del quale il muscolo scheletrico va incontro a transizioni importanti nel pattern d’espressione delle proteine miofibrillari corrisponde al passaggio tra il fenotipo embrionale-neonatale e quello adulto. Quest’ultimo, poi, non rappresenta un pattern definitivo, al contrario, è ancora capace di rispondere ad ulteriori adattamenti soprattutto durante l’invecchiamento. Tuttavia, se si esclude l’invecchiamento fisiologico, le più importanti condizioni associate ad una trasformazione del pattern di espressione comprendono l’aumento o la diminuzione dell’attività muscolare, che può risultare, a sua volta, da cambiamenti del pattern di stimolazione nervosa, da cambiamenti del carico meccanico o da entrambi. Il **meccanismo di adattamento** delle proprietà funzionali ormai consolidato si basa su processi di trasformazione del contenuto in MHC delle fibre; studi recenti, tuttavia, indicano la possibilità che, in condizioni particolari (invecchiamento e *unloading*), possa esserci una modulazione della prestazione dovuta a cambiamenti delle proprietà dello stesso tipo cellulare. Ad esempio è possibile che variazioni di velocità del muscolo possano dipendere da un incremento del contenuto relativo in fibre rapide, ma anche da un aumento della velocità dello stesso tipo cellulare in assenza di variazioni delle isoforme MHC espresse (*Widrick et al., 1997; Widrick et al., 1999*).

Sulla base di quanto detto possiamo dunque affermare che, quando esposte a diversi stimoli fisiologici collegati a determinate richieste funzionali, le fibre muscolari sono capaci di mostrare una considerevole plasticità che induce *shift* tra i tipi di fibre, processo che si riflette a livello molecolare in uno *switch* delle isoforme proteiche caratterizzanti le singole miofibre. E' così possibile che la singola fibra muscolare modifichi il proprio fenotipo da veloce glicolitico a lento ossidativo e viceversa, e ciò dipende prevalentemente dagli stimoli a cui la cellula è sottoposta. Il processo di trasformazione avviene come risposta a diverse condizioni, sia fisiologiche, come un aumento dell'attività fisica o l'invecchiamento, che patologiche, come l'insorgenza di malattia.

I cambiamenti del livello di attività contrattile sono il più importante fra tutti gli stimoli in grado di avviare una trasformazione o switch del tipo di fibra ed è fondamentale l'apporto dato dalle concentrazioni intracellulari di calcio come secondo messaggero che collega lo stimolo

alla risposta intracellulare (Tothova et al 2006). Le vie di trasduzione del segnale e i fattori di trascrizione essenziali per la regolazione genica di uno *shift* fra tipi di fibre non sono ancora stati definitivamente identificati. Tuttavia, è noto che nelle fibre muscolari lente la concentrazione di calcio intracellulare è significativamente più alta che nelle fibre veloci. L'importanza dei cambiamenti delle concentrazioni intracellulari di calcio come "trigger" per le trasformazioni dei tipi di fibre è stata dimostrata sulle catene pesanti della miosina (MHC), sia a livello proteico che trascrizionale, nei miociti primari di coniglio (Meissner et al., 2000). La calcineurina infatti, una fosfatasi calcio-calmodulina dipendente, è importante per l'espressione genica del tipo di fibra *slow*; essa può defosforilare il fattore di trascrizione NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), il quale può poi traslocare nel nucleo ed attivare in cooperazione con altri fattori di trascrizione quali MyoD e MEF-2D l'espressione genica (fig. 5). Questa via di segnale induce *up-regulation* del promotore del gene della isoforma *slow* della miosina (MHC1), attiva nel processo di transizione delle fibre *fast-slow*, non è tuttavia in grado di down-regolare i promotori dei geni delle miosine *fast* (Meissner et al., 2006).

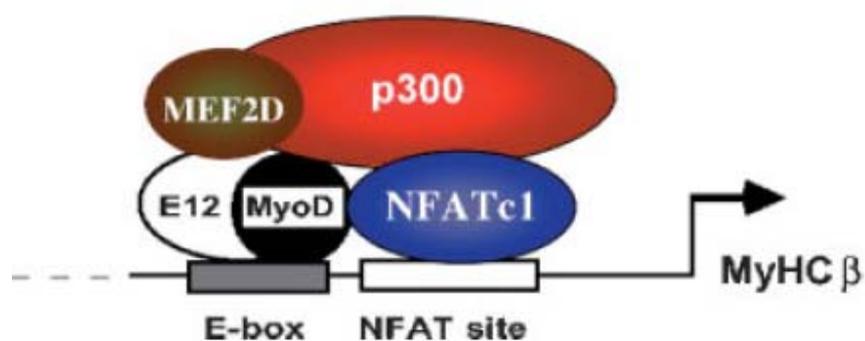


Fig. 5: Schema del complesso formato dai fattori di trascrizione e dai coattivatori a livello dei corrispettivi siti presenti nel promotore del gene MHC β .

La transizione fra i vari tipi di fibra implica cambiamenti funzionali (dovuti principalmente alla differente espressione di MHC e MLC) e biochimici (espressione variabile di enzimi del metabolismo ossidativo o glicolitico) che risultano in una diversa resistenza alla fatica, velocità di contrazione, sfruttamento delle risorse energetiche della cellula. Le differenze funzionali, biochimiche e morfologiche fra i vari tipi di fibra sono la conseguenza diretta del pattern

d'espressione genica fibra-specifico che determina le caratteristiche del motore molecolare che produce la forza, vale a dire dei diversi isotipi di miosina.

A seguito di queste risposte il tessuto muscolare può essere ottimizzato per generare un movimento rapido e potente, oppure per resistere all'affaticamento.

2.2 Sarcopenia

L'invecchiamento è un processo complesso associato ad una progressiva perdita delle funzioni neuromuscolari e caratterizzato dall'insorgenza di alterazioni fisiche e metaboliche correlate all'accumulo di danni ossidativi in diversi tessuti.

In relazione a ciò con il termine *sarcopenia*, coniato da Irwin Rosenberg nel 1988, si indica una condizione non patologica che include una perdita di forza e di massa muscolare che si manifesta con il progredire dell'età, associata ad un declino della capacità funzionale a livello delle singole fibre. Le modificazioni muscolari correlate all'età sono infatti responsabili di una progressiva perdita di autonomia da parte del soggetto anziano, irrimediabilmente esposto al rischio di cadute e traumi con conseguenti possibili fratture. L'impatto e il costo sociale delle alterazioni miopatiche e neuropatiche da invecchiamento è facilmente comprensibile se si considera l'allungamento della vita media e la diminuzione della natalità nei paesi economicamente più evoluti. Fatte tali considerazioni, se si valuta da una parte che l'atrofia da invecchiamento rappresenta la più frequente forma di atrofia, si comprende l'importanza di un sempre maggiore approfondimento delle modificazioni muscolari conseguenti all'invecchiamento, nonché dei meccanismi molecolari che ne sono a monte.

L'origine delle alterazioni muscolari, e quindi dell'**atrofia da invecchiamento**, è sicuramente multifattoriale essendo legato oltre che ad un effetto proprio della senescenza, anche a diversi altri processi, quali il disuso, la diminuzione delle unità motorie, le modificazioni ormonali (*Larsson et al., 1978*). La denervazione rappresenta un'altra causa di perdita della massa muscolare nell'anziano. Modificazioni quantitative della massa muscolare e riduzioni numeriche delle unità motorie sono state correlate alla perdita di motoneuroni- α , seguita da incompleta reinnervazione e degenerazione parziale delle singole fibre denervate, sia nei piccoli mammiferi che nell'uomo (*Larsson e Ansved, 1995; Faulkner et al., 1995*).

Variazioni ormonali legate all'età rappresenterebbero un altro fattore patogenetico dell'atrofia da invecchiamento. Oltre a modificazioni della secrezione degli ormoni sessuali e del testosterone in particolare, il processo di senescenza è collegato ad alterazioni nella secrezione di altri ormoni coinvolti nel metabolismo muscolare tra cui l'insulina, l'ormone della crescita, gli ormoni tiroidei, corticosteroidi e altri. Non si esclude inoltre che alterazioni della trasmissione neuromuscolare possano derivare anche da variazioni della liberazione di neurotrasmettitori e fattori neurotrofici, legate ad alterazioni della secrezione autocrina.

Le dimensioni del muscolo e le funzioni neuromuscolari cambiano fortemente nel corso della vita, mostrando nei primi due decenni incrementi rapidi dovuti alla crescita e poi più tardi a partire dal quarto-quinto decennio riduzioni graduali dovuti all'età. Mentre lo stadio iniziale di sviluppo vede notevoli aumenti nel numero di fibre muscolari prima della nascita, più tardi la crescita si manifesta soprattutto con un aumento delle dimensioni delle cellule muscolari postmitotiche. Il periodo della vita adulta che spazia dai 20 anni ai 30 è caratterizzato dal picco massimo della funzione muscolo-scheletrica, nell'età media dei 40 e 50 anni si assiste ad un rallentamento della funzione muscolare, tuttavia cambiamenti nella forza assoluta del muscolo sono modesti fino a circa la sesta decade di vita. Tra 20 e 80 anni si assiste ad una complessiva riduzione della massa muscolare (Fig. 6) di circa il 40%, con effetti negativi sulla mobilità, produzione di forza, funzioni respiratorie e metaboliche.

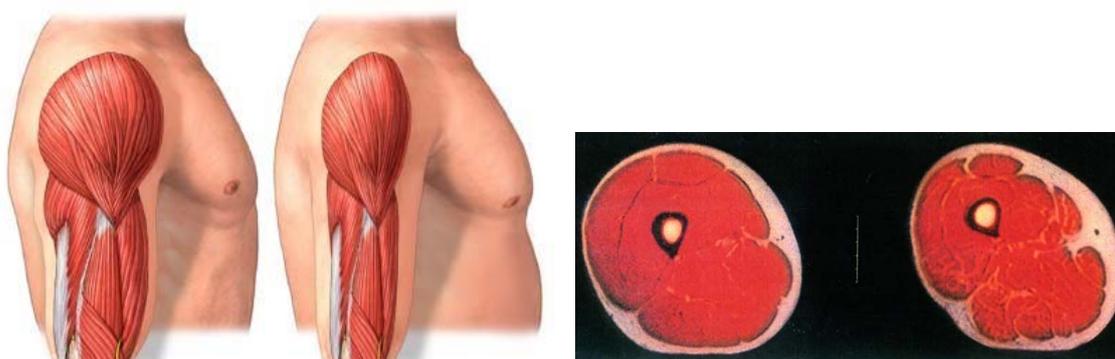


Fig. 6 Evidente riduzione della massa muscolare (atrofia) ed aumento della massa grassa in seguito al processo di invecchiamento.

Si ritiene quindi, in base a quanto esposto, che il processo di sarcopenia sia il risultato sia di fattori intrinseci, che coinvolgono cambiamenti a livello molecolare e cellulare, che estrinseci quali ad esempio nutrizione ed esercizio (Fig. 7). Sebbene sia un processo “fisiologico” che rientra tra i normali cambiamenti associati alle fasi tardive della vita, è importante anche riconoscere che altri fattori quali uno stile di vita sedentario, malnutrizione e malattie contribuiscono ad aggravare la capacità muscolare (*Vandervoort, 2001*).

Uno tra i principali fattori che potrebbero giocare un ruolo chiave nella genesi e nel mantenimento della sarcopenia è l’accumulo di specie reattive dell’ossigeno (ROS); il primo scienziato che ipotizzò una correlazione tra **danno ossidativo** e senescenza fu Harman nel 1956. Studi successivi hanno evidenziato un accumulo di ROS ed una significativa riduzione dei meccanismi antiossidanti endogeni in muscoli scheletrici umani di anziani, con un conseguente aumento del danno ossidativo a livello di DNA e lipidi (*Fanò et al. 2001*); è stata inoltre individuata nelle cellule satelliti di soggetti anziani una riduzione dell’attività degli enzimi *scavenger* (*Fulle et al., 2005*). Alterazioni strutturali e funzionali dei meccanismi di riparo in cellule satelliti potrebbero pertanto costituire una delle cause del processo sarcopenico. Esperimenti condotti su miotubi derivati da cellule satelliti umane hanno evidenziato, oltre ad alterazioni morfologiche, che nei soggetti anziani la ridotta capacità rigenerativa del muscolo non è dovuta ad un ridotto numero di cellule satelliti quiescenti ma, molto probabilmente, ad un’alterazione del loro programma differenziativo (*Beccafico et al., 2007; Ryall et al., 2008; Brooks and Faulkner 1994*).

Un ulteriore argomento di notevole interesse è legato al ruolo dei **mitocondri** nel muscolo scheletrico poiché svolgono funzioni vitali per la cellula contribuendo all’omeostasi del calcio, alla sintesi dell’eme e del colesterolo, partecipando al processo di apoptosi e alla produzione di ATP; durante la contrazione muscolare inoltre, la fosforilazione ossidativa, resa possibile dalla catena di trasporto degli elettroni mitocondriale, rappresenta un processo fondamentale che assicura alla cellula adeguati consumi energetici in base alle esigenze della stessa (*Huang and Hood, 2009*). Secondo diversi studi presenti in letteratura una ridotta funzione mitocondriale potrebbe contribuire alla disfunzione muscolare e alla ridotta capacità aerobica legate all’età. Il prevalente aumento di mutazioni a carico del DNA mitocondriale ed una diminuita abbondanza dello stesso si pensa possano essere le cause alla base della disfunzione mitocondriale nel corso della senescenza (*Melov et al., 1995; Barazzoni et al., 2000*). Secondo dati riportati in

letteratura l'attività degli enzimi ossidativi e il contenuto dei trascritti di mRNA codificanti per proteine mitocondriali sono ridotti nei muscoli sarcopenici. Si è evidenziata infatti una riduzione, nei soggetti anziani, della quantità di diverse proteine mitocondriali tra cui significativi erano i livelli di COX3 e COX4; tuttavia la quantità di trascritti presenti dei tre fattori di trascrizione che regolano la biogenesi mitocondriale, *peroxisome-proliferator receptor coactivator 1 α* (PGC-1 α), *nuclear respiratory factor 1* (NRF-1) ed infine *mitochondrial transcription factor A* (TFAM), non cambia con l'età. Riassumendo questi dati hanno dimostrato che la riduzione del DNA mitocondriale nel muscolo e l'aumento dell'ossidazione al DNA relativi all'età sono associati a ridotti livelli di trascritti e proteine mitocondriali. Tali cambiamenti, inoltre, sono strettamente legati ad una diminuita capacità della produzione di ATP mitocondriale nel muscolo scheletrico (*Short et al., 2005*). Ulteriori studi hanno mostrato l'accumulo di alterazioni epigenetiche nel corso del processo di invecchiamento. In particolare si è riscontrato un aumento della metilazione del DNA a livello del promotore del gene COX7A1 (gene nucleare che codifica il polipeptide 1 della subunità 7A, una subunità della citocromo c ossidasi o COX, che rappresenta il complesso IV nella catena respiratoria) in concomitanza con una riduzione della sua espressione nel muscolo scheletrico di soggetti anziani (*Ronnet et al., 2008*).

L'invecchiamento e il disuso sono le due principali condizioni che inducono atrofia del muscolo scheletrico nell'uomo. In entrambi i casi, la forza muscolare si riduce e col tempo si assiste ad un rallentamento dei movimenti. Sebbene una possibile spiegazione per tali alterazioni della *performance* muscolare è da ricondurre alla perdita della massa muscolare (atrofia) e del numero di fibre (*Narici et al., 1997*), recenti evidenze suggeriscono che un contributo significativo potrebbe derivare dai cambiamenti qualitativi, legati cioè a variazioni nelle proprietà delle fibre muscolari. Da studi condotti su singole fibre si è visto che i valori di massima velocità di accorciamento (V_0) e di forza specifica (P_0/CSA) delle fibre di tipo 1 e 2A del muscolo vasto laterale erano significativamente più bassi nei soggetti anziani rispetto ai giovani, con una maggiore riduzione nelle fibre di tipo 1 che nelle 2A (*Larsson et al., 1997*); valutando la distribuzione dei tipi di fibre e delle isoforme MHC si è riscontrata, inoltre, una riduzione delle fibre di tipo 2A ed un aumento delle 2X suggerendo dunque uno *shift* verso il fenotipo *fast* nei soggetti anziani. È stata evidenziata una riduzione della *cross sectional area* (CSA) delle fibre di tipo 1 (22%), ed in misura minore delle fibre di tipo 2A (12%). Infine si è

evidenziata una significativa riduzione della concentrazione di miosina solo nelle fibre di tipo 1 di soggetti anziani. (Bottinelli et al., 2003). I cambiamenti dei parametri V_o e P_o/CSA legati all'età e al disuso, che si evidenziano in fibre contenenti la stessa isoforma MHC, non possono dunque essere spiegati dai processi che inducono modificazioni delle proprietà contrattili delle fibre muscolari scheletriche sulla base di regolazioni geniche differenziali delle isoforme delle catene pesanti della miosina.

Altri studi effettuati sempre su fibre muscolari umane e sempre operando un confronto tra soggetti giovani ed anziani hanno mostrato risultati contrastanti rispetto a quelli di cui sopra. Infatti, non sono state evidenziate differenze significative nei valori di CSA, né nei valori di tensione isometrica (P_o) e velocità (V_o), né tantomeno differenze nella concentrazione proteica di miosina presente a livello di singole fibre (Trappe et al., 2003). Sulla base di questi ultimi risultati risulta che gli aspetti delle funzioni contrattili siano preservati con l'età; la perdita di massa muscolare rappresenterebbe, pertanto, la componente critica per la riduzione nella funzione muscolare, e risulterebbe quindi da una combinazione di atrofia delle fibre muscolari e perdita del numero di fibre.

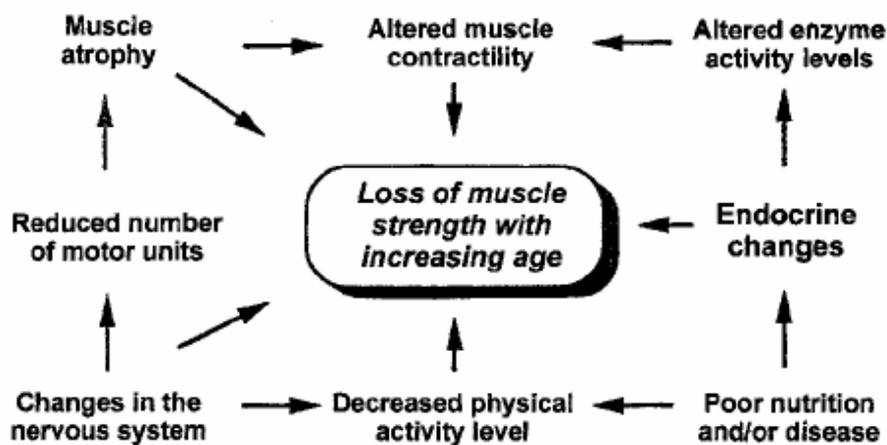


Fig. 7 Fattori multipli che causano la perdita di forza muscolare con l'avanzare dell'età. Alcuni di questi fattori fanno parte dei normali processi biologici che si manifestano con l'invecchiamento (es. perdita di unità motorie), mentre altri fattori reversibili dipendono da specifici stili di vita.

Un'**attività fisica** prolungata può aumentare la forza, la funzione e la massa muscolare in soggetti anziani anche nella nona decade di vita, incrementando anche la capacità mitocondriale (*Fiatarone et al., 1990; Parise et al., 2005*). Ancora il *resistance training* può ridurre i markers di stress ossidativo, ed aumentare l'attività degli enzimi anti-ossidanti in soggetti anziani. Si è visto su soggetti anziani che dopo un periodo di esercizio fisico i cambiamenti età-relati del profilo trascrizionale erano reversibili e restituivano un profilo di espressione "più giovanile" (*Melov et al., 2007*).

Ci sono evidenze riguardanti il bilancio tra sintesi proteica e degradazione nel muscolo scheletrico secondo cui la sintesi proteica sarebbe favorita ancor di più dall'*intake* proteico e da un supplemento di amino acidi dopo l'esercizio fisico, in quanto si è visto avere un effetto sinergico sull'aumento della sintesi proteica muscolare indotta dalla contrazione. Inoltre dai dati riportati in uno studio sembrerebbe che le prime 2 ore di recupero dall'attività fisica siano importanti per una netta sintesi proteica e quindi per il conseguente effetto ipertrofico (*Esmarck et al., 2001*).

2.3 Allenamento

Gli effetti benefici di una regolare attività fisica su una varietà di condizioni patologiche come l'obesità, malattie cardiovascolari, o il diabete sono indiscusse. Questi effetti positivi sono molto probabilmente legati ad adattamenti che si manifestano nel muscolo scheletrico come risposta all'esercizio fisico, e che permettono al muscolo stesso di utilizzare i substrati per la produzione di ATP più efficientemente, diventando pertanto più resistente alla fatica.

Gli **adattamenti** delle fibre muscolari scheletriche all'esercizio fisico si manifestano, ad esempio, tramite l'espressione di specifiche proteine contrattili ed un aumento nell'attività e nel contenuto dei mitocondri, ovvero della capacità ossidativa. I cambiamenti nella composizione delle isoforme delle catene pesanti della miosina (MHC) nel muscolo, in seguito ad esercizio fisico, contribuiscono notevolmente alla eterogeneità muscolare oltre che costituire un importante meccanismo adattativo. L'esatto meccanismo molecolare che sottende tali adattamenti rimane elusivo (*Holloszy and Booth, 1976*). Una migliore comprensione delle *pathways* di segnale coinvolte in questi processi potrebbero aiutare ad individuare nuovi approcci per il trattamento di patologie metaboliche e cardiovascolari. Probabilmente sono

coinvolte svariate vie di segnale, quali diverse *pathways* di attivazione Ca^{2+} -dipendente coinvolte nella regolazione dell'ipertrofia (Dunn et al., 2000) e nell'espressione genica delle isoforme MHC, attivazione di sistemi di proteasi coinvolte nella regolazione del turnover delle isoforme proteiche MHC, e l'attivazione di cellule come precursori muscolari, da parte di fattori endocrini, paracrini e autocrini.

Considerando la classificazione tradizionale delle fibre muscolari, le fibre *fast* 2B (nelle specie animali che le possiedono) e *fast* 2X dipendono principalmente da *pathways* glicolitiche per la produzione di ATP, mentre le fibre di tipo *fast* 2A e 1 o *slow* si affidano quasi esclusivamente a vie ossidative (Smerdu et al., 1994). L'esercizio fisico induce un incremento a livello mitocondriale e cambiamenti nell'espressione delle isoforme delle catene pesanti della miosina (MHC), provocando in questo modo uno *switch* dal tipo 2B al 2X e al 2A e, in rari casi, anche al tipo 1. In studi condotti su modelli murini sottoposti ad esercizio è stato evidenziato un incremento delle fibre di tipo 2A/2X; tale incremento, dovuto allo *shift* 2X verso 2A, è risultato maggiore in topi transgenici aventi la proteina AMPK cronicamente attivata, mentre non è stata rilevata nessuna transizione verso il tipo di fibra 1. Viceversa la calcineurina indurrebbe transizione dal tipo 2 verso il tipo di fibra *slow* (MHC1) (Rockl et al., 2007).

L'aumentata attività contrattile, in seguito ad allenamento fisico, accende diverse vie di segnale per attivare un vasto set di geni, portando a **cambiamenti fenotipici** nel muscolo scheletrico, che includono transizioni di fibre, una biogenesi mitocondriale potenziata, ed angiogenesi, e che permettono di ottenere una capacità fisiologica in grado di rispondere a determinate richieste funzionali. PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α*), un co-attivatore trascrizionale, è stato identificato come un importante regolatore della termogenesi, del metabolismo del glucosio, della biogenesi mitocondriale e della specializzazione del tipo di fibre muscolari (Knutti et al., 2001). L'overespressione muscolo-specifica di PGC-1 α in topi transgenici dà luogo ad una biogenesi potenziata e ad una maggiore formazione di fibre *slow* (MHC1); inoltre l'allenamento fisico induce l'espressione e del messaggero e della proteina PGC-1 α sia nei ratti che nell'uomo. Il trascritto e la proteina di questo co-attivatore trascrizionale, sono entrambi altamente espressi nelle fibre *slow* di tipo 1 ossidative e nelle fibre *fast* ossidative di tipo 2A rispetto alle fibre *fast* glicolitiche (Lin et al., 2002). I promotori del gene PGC-1 α mostrano, nell'uomo, nel topo e nel ratto, un'identità di sequenza dell'80-90%, suggerendo una regolazione conservata del gene stesso. L'attività e

l'espressione di questo gene viene up-regolata dalla proteina chinasi p38 MAPK, costituendo una via di segnale importante nel processo di adattamento del muscolo scheletrico (*Akimoto et al., 2005*).

Cambiamenti nel pattern di espressione delle isoforme MHC e nella *cross sectional area* (CSA) nelle cellule muscolari scheletriche, in risposta a diversi protocolli di allenamento, sono alla base delle modificazioni di forza e potenza a cui il muscolo va incontro (*Bottinelli et al., 1999*). Diversi studi condotti sull'uomo hanno riportato che uno **strength training** (detto anche *resistance training* o allenamento di forza) porta alla presenza di una bassa percentuale di fibre *fast 2X*, un concomitante aumento di fibre di tipo 2A e ibride 2A/2X, ed un aumento della CSA, indice di un effetto ipertrofico, in tutti i tipi di miofibre ed è pertanto utilizzato per migliorare lo sviluppo di forza e velocità (*Liu et al., 2003*). Inoltre, le fibre muscolari di tipo 2A nel muscolo scheletrico umano presentano un profilo enzimatico ed una velocità di contrazione che rende tali fibre più adatte per *performance* di forza rispetto alle fibre contenenti l'isoforma MHC 1 (*Kesidis et al., 2008*).

L'**endurance training** (allenamento di resistenza), invece, induce simili transizioni di fibre, *fast to slow* (da 2X a 2A, ed in rari casi 1), tuttavia i valori di CSA rimangono invariati.

Il vantaggio fisiologico delle transizioni delle isoforme MHC è probabilmente legato alla più grande efficienza di trasduzione dell'energia meccanica associata alle fibre 2A rispetto alle 2X. Gli incrementi nella proporzione delle fibre di tipo 1 potrebbero dipendere dai regimi (protocolli) di allenamento i quali possono indurre danni significativi a cui seguirebbe una rigenerazione di fibre ed una rigenerazione del nervo periferico (*Staron et al., 1991*). Pertanto, l'assenza di danno a livello cellulare, determinato dall'assenza dell'espressione di isoforme embrionali di miosina (MHC) a livello delle singole fibre, potrebbe spiegare il caso in cui, come altri studi riportano, non si abbiano variazioni delle fibre di tipo 1 in seguito a protocolli di allenamento (*Putman et al., 2004*).

Ovviamente è da tenere presente che gli effetti sulle transizioni MHC potrebbe variare in base ai diversi metodi di allenamento e ai diversi muscoli presi in esame.

2.4 Ipertrofia

L'ipertrofia sembra essere il risultato di un aumentato tasso di sintesi proteica che contribuisce ad un aumento assoluto nella quantità di elementi contrattili nella cellula muscolare. Numerosi studi hanno evidenziato una risposta ipertrofica per tutti e tre i maggiori tipi di fibre (1, 2A, 2X) in seguito a **resistance training**, sia in soggetti giovani non precedentemente allenati, che in soggetti anziani (*Hikida et al., 2000*). L'ipertrofia indotta da esercizio fisico, comunque, sembra colpire in misura maggiore le fibre muscolari *fast* rispetto alle fibre di tipo 1 (*Campos et al., 2002*).

Supposto che l'intensità dell'esercizio fisico sia sufficiente, possono manifestarsi cambiamenti acuti nel turnover proteico del muscolo scheletrico, portando all'aumento sia della sintesi proteica che della degradazione (*Phillips et al., 1997*). In assenza di *intake* nutrizionali, tuttavia, la degradazione proteica potrebbe eccedere la sintesi nelle prime fasi del recupero dall'esercizio. È stato mostrato che la sintesi proteica muscolare indotta dall'esercizio può essere stimolata da un aumentato *intake* di proteine ed amino acidi immediatamente prima e dopo il *resistance training* (*Borsheim et al., 2004; Carrol et al., 2005*). Un supplemento di proteine e la successiva disponibilità in circolo di amino acidi insieme ad un programma di *resistance training* è associata ad aumenti nel siero di insulina e IGF-1, nonché del messaggero di IGF-1 muscolare, i quali portano ad aumentare la sintesi proteica muscolare. L'attivazione del recettore dell'insulina stimola la via di segnale PI3K-Akt/PKB-mTOR che è noto avere profondi effetti sulla sintesi proteica. Inoltre amino acidi essenziali, la leucina in particolare, sono in grado di incrementare l'attività di mTOR e della protein chinasi p70S6 e di iperfosforilare 4E-BP1, suggerendo che il *signaling* degli amino acidi e dell'insulina non operano singolarmente ma potrebbero cooperare per ottimizzare la risposta anabolica nel muscolo scheletrico (*Rasmussen et al., 2000*). Studi condotti a tal proposito hanno rivelato che la somministrazione di IGF-1 ha indotto ipertrofia dei miotubi, evidenziato dall' aumento del diametro e delle proteine totali, mediante attivazione della via di traduzione del segnale PI3K-AktT-mTOR (*Rommel et al., 2001*). La proteina mTOR (*mammalian target of Rapamycin*) è una molecola di 290 KDa, così chiamata perché inibita dal macrolide *rapamicina*; è una serin-treonin chinasi, promuove la sintesi di nuove molecole proteiche mediante la fosforilazione di

due diversi substrati: 4E-BP1 (*initiation factor 4E binding protein*), e p70S6k (*Gingras et al., 2001*), proteine necessarie per attivare il processo di sintesi proteica.

L'attività della proteina mTOR e dei suoi target è modulata da numerosi stimoli, quali fattori di crescita (IGF-1), nutrienti, stress ambientali (ipossia) (*Inoki et al., 2005*), ormoni (insulina, T₃, GH, testosterone) (*Hayashi e Proud, 2007; Kenessey e Ojamaa, 2006*) e secondi messaggeri (IP₃, Ca²⁺) (*Conus et al. 1998*) (Fig. 8). Va sottolineato che la comprensione dei meccanismi molecolari che inducono la genesi dell'ipertrofia muscolare è il presupposto necessario per lo sviluppo di farmaci e strategie terapeutiche da affiancare ai normali piani di riabilitazione motoria nel trattamento dell'ipotrofia del muscolo scheletrico, conseguente a patologie miasteniche o a disuso.

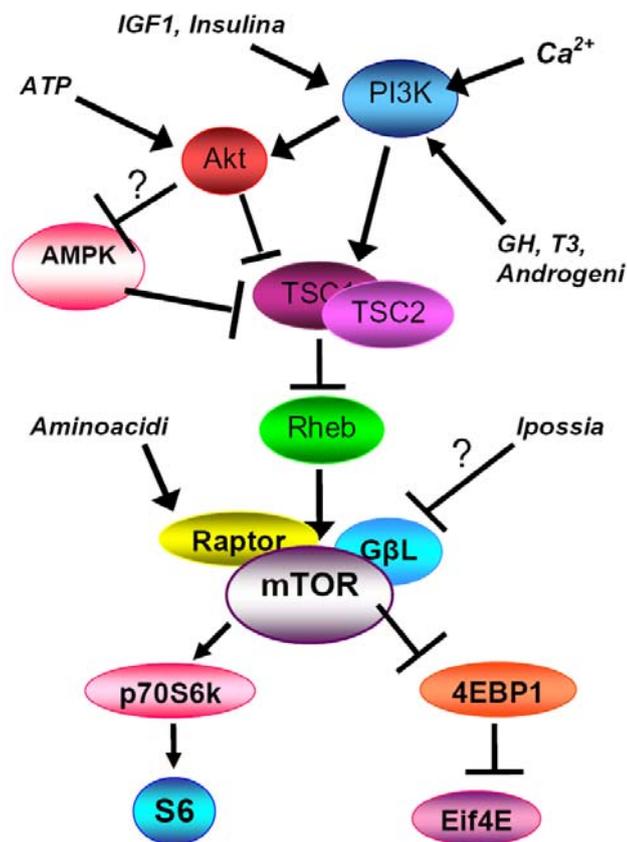


Fig. 8 L'attività della proteina mTOR e dei suoi target, p70S6k e 4EBP1, è modulata da numerosi stimoli, quali fattori di crescita (IGF-1), nutrienti, stress ambientali (ipossia), ormoni (insulina, T3, GH, testosterone) e secondi messaggeri (IP3, Ca²⁺).

Dati riportati in letteratura (*Goldspink et al., 2005*) suggeriscono che il processo che conduce all'ipertrofia muscolare potrebbe essere innescato da contrazioni rapide ed improvvise responsabili di microlesioni a carico delle fibrocellule muscolari. A ciò seguirebbero processi riparativi ad opera delle **cellule muscolari satellite**, cellule mononucleate multipotenti che rimangono in uno stato di quiescenza finché stimoli, tra cui anche stress meccanici, non ne determinino l'attivazione (*Hawhe et al., 2001*). Una volta attivate, le *cellule satellite* proliferano, generando mioblasti che differenziano e, fondendosi con le fibre muscolari lese, rigenerano cellule multinucleate. L'aumento del numero di nuclei permetterebbe a tali cellule di incrementare notevolmente la sintesi proteica, producendo nuove proteine contrattili (actina e miosina) e più recettori per agenti stimolanti quali gli androgeni (ormoni dalla nota azione anabolica). Questo insieme di processi contribuirebbe all'accrescimento della massa muscolare che si sviluppa in seguito ad allenamento. Tra i promotori dell'attivazione delle *cellule satellite* un posto di rilievo spetterebbe al fattore di crescita locale, MGF (*Mechano Growth Factor*), isoforma dell'IGF-1 espressa dalle cellule muscolari in risposta a stimoli meccanici (*Musarò et al., 2004*). Il suddetto fattore di crescita favorirebbe la riparazione del tessuto muscolare microleso, attraverso un'azione autocrina responsabile dell'attivazione delle *cellule satelliti* (*Goldspink et al., 2005*) e del conseguente aumento dell'area della sezione trasversa del muscolo. La perdita di massa muscolare che si osserva nell'invecchiamento (*Owino et al., 2001*) e in patologie, come la distrofia muscolare di Deuchenne, sarebbe, invece, caratterizzata dalla incapacità di produrre MGF in risposta a stimoli meccanici (*Goldspink e Yang, 2001*) (*Goldspink, 2005*).

È stato valutato in un recente studio il tasso di fosforilazione della proteina Akt e di diversi dei suoi targets nei muscoli scheletrici umani di soggetti sottoposti a *resistance training*. Dopo 8 settimane di allenamento l'ipertrofia muscolare riscontrata è stata associata ad un aumento nella quantità di proteine Akt, GSK-3 β ed mTOR fosforilate. L'aumento di Akt era inoltre associato ad una riduzione del fattore di trascrizione FOXO-1, attivo nell'atrofia. Questo studio ha dimostrato per la prima volta che il fattore FOXO-1 è ridotto nei muscoli scheletrici ipertrofici dell'uomo quando confrontati con i livelli *pretraining*, il che supporta le osservazioni riscontrate in roditori e in cellule, soggetti al processo ipertrofico (*Latres et al., 2005*). Il programma di allenamento, a cui i soggetti di questo studio sono stati sottoposti, ha indotto aumenti funzionali nella forza e nella resistenza muscolare (*Léger et al., 2006*).

In conclusione l'aumentata sintesi proteica muscolare risulta probabilmente da un'aumentata trascrizione e da una potenziata stabilità dell'mRNA (*Willoughby et al., 2007*). Le proteine sarcomeriche che vengono sintetizzate per prima sono quelle che compongono la “*machinery*” contrattile, come è evidenziato dai cambiamenti nell'espressione dei messaggeri e delle proteine relative alle isoforme delle catene pesanti della miosina (MHC) (*Willoughby and Nelson, 2002*). Ciò porta a livello macro ad un effettivo incremento di forza e massa (ipertrofia) muscolare.

2.5 Atrofia

L'atrofia è un processo complesso che si manifesta nel muscolo scheletrico come risultato di una varietà di cause quali invecchiamento, danni alle connessioni neurali, disuso o immobilità, digiuno, nonché come conseguenza di molte patologie: diabete, sepsi, acidosi o cancro. L'ampia varietà di condizioni che possono indurre tale processo implica l'esistenza di differenti *triggers* molecolari e di *pathways* di segnale che inducono debolezza muscolare. Tuttavia ci sono innumerevoli similarità tra le risposte intracellulari che mediano i processi atrofici.

A prescindere da quale sia la causa, l'atrofia del muscolo scheletrico è generalmente caratterizzata da una riduzione del contenuto proteico, del diametro delle fibre della produzione di forza, e della resistenza alla fatica.

La regolazione dinamica della massa del muscolo scheletrico dipende dal bilancio complessivo dei rapporti tra sintesi e degradazione proteica, due processi biochimici che sembrano essere coordinati da complessi *networks* di vie di segnale.

Nel processo di ipertrofia, il tasso di sintesi delle proteine contrattili muscolari è molto più alto del tasso di degradazione che risulta in un aumento della dimensione delle fibre del muscolo esistenti. Al contrario l'aumento del processo di **degradazione proteica** è la causa primaria della rapida perdita delle proteine muscolari che si evidenzia durante l'atrofia (*Lecker et al., 1999*). Significativi passi avanti sono stati compiuti recentemente nella comprensione delle *pathways* di segnale che mediano il processo atrofico nel muscolo scheletrico, come di quelle che mediano il processo opposto dell'ipertrofia. È ormai chiaro cioè che l'attività o l'inattività della via di segnale IGF-1/Insulin/Akt/FOXO determina se un muscolo aumenterà la sintesi

proteica, e quindi la crescita (ipertrofia), o andrà incontro alla degradazione proteica e atrofia. Nello specifico la stimolazione di IGF-1 induce ipertrofia del muscolo scheletrico mediante l'attivazione della via fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K)-Akt. IGF-1 attiva anche mTOR e p70S6K (Rommel *et al.*, 2001); mTOR può essere attivato direttamente da amino acidi, causando una successiva stimolazione dell'attività della proteina p70S6K. Pertanto mTOR sembra avere un ruolo centrale nell'integrare una varietà di segnali di crescita. Akt attiva mTOR mediante fosforilazione, e la fosforilazione di entrambe queste proteine risulta aumentata nell'ipertrofia muscolare (vedi sopra). Al contrario, quando l'attivazione di questa pathway si riduce, i fattori di trascrizione FOXO-1 e 3 risultano attivati, portando all'induzione dell'espressione di due ubiquitin ligasi E3 muscolo specifiche: atrogin-1 e MuRF-1 (Sandri *et al.*, 2004). L'espressione di queste due ultime proteine risulta aumentata in modo significativo in diversi tipi di atrofia muscolare, dimostrando il ruolo predominante della via ubiquitina-proteasoma durante la progressione del processo che induce debolezza muscolare. Un ruolo importante nel processo atrofico è svolto dalla cascata della via di segnale del fattore di trascrizione NFκB e, ulteriori studi su miotubi in coltura e modelli murini hanno dimostrato che anche la miostatina è un potente regolatore della massa muscolare scheletrica; il meccanismo mediante il quale l'inattivazione della miostatina induce crescita muscolare rimane ancora controverso. McFarlane e collaboratori hanno mostrato in miotubi in coltura ed in muscoli scheletrici di topo che il trattamento con miostatina era associato ad una riduzione delle dimensioni (volume) delle fibre e all'induzione delle ubiquitine ligasi E3 muscolo-specifiche, atrogin-1 e MuRF-1. Questo studio ha evidenziato che gli effetti atrofici osservati erano mediati da defosforilazione ed inibizione di Akt e conseguente attivazione di FOXO-1. Sebbene negli ultimi anni, con l'applicazione delle tecnologie genomiche volte a studiare il profilo di espressione genica globale, siano stati studiati più in dettaglio i *networks* molecolari che sono alla base di diversi tipi di atrofia, il fine meccanismo che controlla la debolezza muscolare e la perdita di capacità funzionale rimane ancora non completamente compreso. I differenti tipi di atrofia potrebbero coinvolgere l'azione coordinata di un ampio numero di geni organizzati in *networks* complessi ed i risultati derivanti da studi di espressione individuali risultano insufficienti per la comprensione completa di uno stato così complesso. Per questo motivo i risultati di un approccio di integrazione di dati riguardanti un fenomeno complesso come l'atrofia muscolare potrebbe non solo essere usato per conferma e

rafforzamento dei risultati derivanti da singoli studi, ma anche per il completamento di comuni vie di trasduzione del segnale, la definizione del ruolo di geni centrali e la speranza di individuare nuovi componenti molecolari e pathways di segnale.

2.5.1 Atrofia da Disuso

Diversi studi hanno indagato vari effetti fisiologici del “*detraining*” successivi al *resistance training* riportando, in seguito ad analisi fatte su biopsie muscolari umane prelevate prima, subito dopo il periodo di allenamento, nonché al termine del periodo di *detraining*, riduzioni nella forza massimale, nella massa muscolare, nella sintesi proteica e nel “*neural drive*” al muscolo. Pertanto la condizione di *detraining* è generalmente associata ad un declino nella funzione fisiologica del muscolo (*Colliander and Tesch, 1992; Kraemer et al., 2002*).

In particolare è compromessa la forza dei muscoli locomotori, con una perdita sempre più progressiva a livello dei muscoli degli arti inferiori (*Ferrando et al., 1997*). L’abbandono dell’attività fisica produce, a livello molecolare, uno *shift* verso il fenotipo *fast 2X* che potrebbe addirittura raggiungere livelli eccedenti quelli presenti prima dell’allenamento. E’ stato supposto che il gene codificante per l’isoforma *fast* umana della catena pesante della miosina MHC 2X sia un gene di “*default*” che viene espresso preferenzialmente in assenza di attività contrattile del muscolo (*Andersen et al., 2005*).

L’atrofia muscolare sicuramente più studiata è quella da diminuzione dell’attività muscolare (genericamente definita *unloading*) legata al disuso, immobilizzazione o microgravità come si verifica nel volo spaziale. In presenza di *unloading* il muscolo scheletrico presenta una serie di adattamenti fisiologici alla modificata condizione di carico, che comprendono una riduzione del tempo di contrazione-rilasciamento, una riduzione della tensione isometrica e della potenza ed un aumento della velocità di accorciamento e dell’attività ATPasica. L’atrofia da ridotta attività o riduzione del carico è stata studiata soprattutto nei piccoli mammiferi, e solo di recente nell’uomo.

Sono stati infatti condotti studi, sebbene i modelli sperimentali umani siano limitati, per poter studiare i cambiamenti, a livello macro ed a livello micro, a cui il muscolo va incontro in questa condizione. A tal proposito sono stati applicati i modelli del “*bed rest*”, dell’esposizione

alla microgravità nello spazio, dell'immobilizzazione volontaria o dopo intervento chirurgico (Edgerton et al., 1995).

Nell'uomo il carico posturale dipendente dalla gravità (1G, forza gravitazionale terrestre), agendo sulla muscolatura degli arti inferiori in posizione eretta, sembra essenziale per il mantenimento della normale funzione dei muscoli antigravitari. Nello spazio (0 G) e in presenza di riduzione di carico posturale, i muscoli antigravitari vanno incontro a rimodellamenti funzionali e strutturali consistenti, ciò sia nello spazio che in qualsiasi altro modello sperimentale adottato per simulare la microgravità e per ottenere una diminuzione della forza peso che agisce sui muscoli.

Gran parte delle informazioni ottenute sull'atrofia da *unloading* si devono all'applicazione del modello sperimentale di microgravità simulata più utilizzato, il "*bed rest*". Il *bed rest* è un modello di studio a terra utilizzato comunemente dalla comunità scientifica internazionale per simulare gli effetti fisiologici dell'assenza di gravità sull'organismo, poiché è in grado di combinare lo spostamento dei fluidi dalle regioni declivi verso il capo con la riduzione del carico posturale alle ossa e ai muscoli. Si tratta di un allettamento di volontari sani per un periodo variabile (normalmente dai 7 ai 120 giorni) a seconda del protocollo sperimentale. La metodica *bed rest* viene utilizzata, in particolare, per lo studio del sistema muscolo scheletrico. Consente continuità sperimentale ed è facilmente ripetibile e relativamente poco costoso. Uno tra i vari studi condotti a riguardo, ha valutato come 5 settimane di *bed rest* possano alterare l'espressione delle isoforme MHC nel muscolo scheletrico umano sia a livello proteico che a livello trascrizionale mediante analisi effettuata su biopsie prelevate dal muscolo vasto laterale di soggetti reclutati per questo studio. I risultati hanno portato a dimostrare che il *bed rest*, coprendo un periodo di 37 giorni, può indurre cambiamenti significativi nelle isoforme MHC a livello di mRNA, con un aumento nel numero di fibre che esprimono mRNA per l'isoforma MHC 2X ed una concomitante riduzione nel numero di cellule muscolari esprimenti l'mRNA codificante l'isoforma MHC 1, senza tuttavia significativi cambiamenti a livello proteico, producendo pertanto un significativo incremento nella proporzione di fibre "*mismatched*". Questi dati potrebbero riflettere l'esistenza di un processo di transizione incompleto a causa di un turnover molto più lungo delle isoproteine MHC rispetto ai corrispondenti trascritti; pertanto ne segue anche una lenta incorporazione delle isoproteine appena formate nelle miofibrille (Anderson and Schiaffino, 1997). I risultati di questo studio in conclusione hanno evidenziato

che, sebbene 5 settimane di bed rest non siano sufficienti ad evocare un significativo cambiamento nell'espressione delle isoforme MHC a livello proteico, sono tuttavia in grado di indurre uno *shift* dell'espressione genica, portando ad un relativo aumento nella trascrizione di mRNA per l'isoforma MHC 2X (Andersen et al., 1999).

Il maggior impatto del disuso sui muscoli antigravitari, con percentuale più alta di fibre di tipo 1, farebbe pensare alla possibilità di un'atrofia selettiva delle fibre lente, tonicamente attive e quindi potenzialmente più responsive e sensibili all'inattività. Tuttavia, i dati riportati in letteratura non consentono di confermare questa previsione (Hikida et al., 1989; Hather et al., 1992). Secondo Berg e Tesch (1996), infatti, 42 giorni di *bed rest* non sembrano determinare significative differenze nel grado di atrofizzazione delle fibre di tipo 1 e di tipo 2. Una tendenza all'aumento delle fibre veloci e alla diminuzione delle fibre lente sembra delinarsi nei risultati fino ad ora pubblicati, ma non esiste prova statisticamente significativa che tale fenomeno sia reale. Per quanto riguarda i parametri contrattili, studi condotti su singole fibre scheletriche isolate, prelevate con agobiopsia da muscoli prima e dopo *bed rest*, indicano una diminuzione di CSA, di forza e Wmax ma non sono concordi nell'indicare una effettiva riduzione di tensione isometrica (Larsson et al., 1996; Bangart et al., 1997). Sono state riscontrate significative riduzioni di CSA e forza da Widrick e collaboratori (1997) dopo 17 giorni di *bed rest* nelle fibre di tipo 1 di soleo ma non di tensione isometrica; viceversa dopo 42 giorni Larsson e collaboratori, in singole fibre di muscolo vasto laterale, hanno riscontrato una significativa riduzione dei valori di tensione isometrica, attribuita in questo caso ad una diminuzione del contenuto miofibrillare delle fibre (Larsson et al., 1996).

2.5.2 Modificazioni del muscolo scheletrico in condizioni di alta quota

Come visto finora, molti fattori possono influenzare e modificare il fenotipo muscolare. L'**ipossia** è uno di questi; si definisce con il termine ipossia la carenza di O₂ a livello tissutale. Ci sono condizioni in cui il livello di pressione parziale di ossigeno (PO₂), a cui le miofibre sono soggette, è basso a causa dell'ambiente o delle generali condizioni del corpo e in circostanze simili l'ipossia può indurre cambiamenti nelle fibre muscolari. Due situazioni sono particolarmente significative: le malattie cardio-respiratorie da un lato e il soggiorno a altitudini elevate dall'altro.

La caduta della disponibilità di ossigeno porta alla perdita della capacità contrattile accompagnata da deplezione di ATP e glicogeno e all'accumulo del lattato e del fosfato inorganico. Inoltre, l'aumento della produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) può contribuire rapidamente all'alterazione strutturale e contrattile dei muscoli ipossici (*Howlett et al., 2007*).

Allo stesso tempo però l'ipossia guida un processo che porta ad una risposta adattativa delle fibre muscolari; questa risposta può interferire fortemente con la modulazione del fenotipo muscolare (massa, metabolismo e tipo di fibra). I cambiamenti muscolari osservati nell'uomo sono stati riprodotti in ratti dove l'adattamento ad ipossia cronica (2-3 mesi) è stato caratterizzato da atrofia, transizione di tipi di fibre da *slow* a *fast* e *shift* verso un metabolismo glicolitico (*Itoh et al., 1990*).

La **risposta all'ipossia** è criticamente controllata a livello trascrizionale. In particolare le risposte cellulari e molecolari all'ipossia sono sotto il controllo dei *fattori inducibili dell'ipossia (HIFs)*, una famiglia di fattori di trascrizione pleiotropici, eterodimerici, attivati dalla riduzione dell'ossigeno, che up-regolano la trascrizione di diversi geni codificanti per le proteine coinvolte nella risposta all'ipossia (*Weir et al., 2005*). Quando i livelli di ossigeno cadono, l'eterodimero HIF-1 viene stabilizzato e si accumula nella cellula; la proteina trasloca poi nel nucleo dove recluta i coattivatori trascrizionali, per legarsi agli elementi di risposta all'ipossia e transattivare l'espressione di geni coinvolti nella risposta.

I mitocondri vengono considerati dei potenziali sensori dell'ossigeno dal momento che l'ipossia aumenta la generazione mitocondriale di ROS, i quali regolano una varietà di risposte/processi, incluso l'attivazione di HIF-1. Alcuni aspetti della risposta all'ipossia mediati da HIF sono simili ai cambiamenti osservati nei muscoli esposti ad ipossia cronica. In entrambi i casi l'organismo, incluso il muscolo scheletrico, tende a massimizzare l'accumulo di ossigeno e a minimizzarne il consumo. In altre parole, la trascrizione mediata da HIF induce uno *shift* metabolico con lo scopo di minimizzare il bisogno di ossigeno, mentre un aumento nell'accumulo di ossigeno è ottenuto tramite l'incremento dell'attività pro-angiogenetica e la diminuzione della distanza di diffusione ottenuta dall'aumento del rapporto capillari/CSA delle fibre (*Hoppeler et al., 2001*). Studi effettuati su topi knockout per la subunità α di HIF-1 supportano l'ipotesi che HIF-1 sia coinvolto nella regolazione a lungo termine della struttura e funzione del muscolo.

Durante esposizione ad ipossia a lungo termine, il muscolo scheletrico si adatta alla ridotta pressione parziale di ossigeno PO_2 grazie a cambiamenti delle dimensioni e del metabolismo cellulare e ad adattamenti a livello capillare (Ferretti et al., 1990; Calbet et al., 2009; Degens et al., 2008; Richardson et al., 1995). Alcuni dati riportati in letteratura a tal proposito mostrano, sia negli uomini che nei ratti, una ridotta capacità ossidativa accompagnata da un aumento nella capacità glicolitica (De Palma et al., 2007; Abdelmalki et al., 1996). Secondo altri lavori, tuttavia, la capacità ossidativa sembrerebbe invariata (Leon-Velarde et al., 1993) e addirittura aumentata dopo esposizione ad ipossia (Gimenez et al., 1977). Una spiegazione per queste discrepanze potrebbe derivare dal fatto che gli adattamenti all'ipossia sono muscolo specifici ed anche specifici in base alle zone/regioni all'interno di uno stesso muscolo (Deveci et al., 2001). È stato riportato infatti che muscoli lenti e rapidi rispondono diversamente all'esposizione all'ipossia (Faucher et al., 2005). Anche in un muscolo, con una distribuzione non uniforme di tipi di fibre, l'adattamento capillare alla condizione ipossica sembra dipendere dalla regione di quel muscolo (Deveci et al., 2001). I risultati di uno studio condotto per chiarire tali cambiamenti adattativi hanno mostrato che gli adattamenti muscolari all'ipossia cronica sono regione specifici e non specifici in relazione al tipo di fibre. È stato evidenziato un 10% di atrofia delle miofibre, indipendentemente dal tipo e dalla regione muscolare; nella regione ossidativa interna al muscolo preso in considerazione (muscolo plantare), l'atrofia e l'angiogenesi hanno indotto un miglioramento della capillarizzazione. Nella regione superficiale e glicolitica invece non si è evidenziata angiogenesi ma, a dispetto di quanto ci si aspettasse, un aumento del 25% della capacità ossidativa indice pertanto di una biogenesi mitocondriale. L'assenza di cambiamenti della capacità ossidativa a livello della parte interna (ed ossidativa) del muscolo indica che la perdita di mitocondri sia stata proporzionale al grado di atrofia. L'idea generale è che in molte specie, il supporto capillare alle fibre muscolari sia legato alla capacità ossidativa delle stesse. Questa relazione è modulata dall'intorno/ambiente metabolico di una fibra: una fibra presente in una regione ossidativa possiede un supporto capillare maggiore rispetto a quello di un'altra cellula circondata da un ambiente di miofibre glicolitiche (Degens et al., 1992).

Concludendo gli **adattamenti** indotti dall'ipossia ed evidenziati in questi studi (Wust et al., 2009) hanno mostrato atrofia muscolare, angiogenesi nelle porzioni ossidative ed interne del muscolo, ed una capacità ossidativa incrementata a livello delle regioni più glicolitiche e

superficiali. Si è ipotizzato che l'aumentata capacità ossidativa potrebbe assicurare un'adeguata generazione aerobica di ATP durante l'ipossia mantenendo in questo modo il flusso di ossigeno. Sono ancora sconosciute le *pathways* di trasduzione alla base di questi cambiamenti adattativi regione specifici.

I cambiamenti nel muscolo scheletrico di soggetti (alpinisti) che hanno vissuto per un periodo abbastanza lungo (2-3 mesi) ad elevata altitudine sono considerati un importante modello di risposta all'ipossia. L'ipossia porta ad una riduzione della *cross sectional area* (CSA) del muscolo e quindi ad una riduzione delle dimensioni delle fibre. L'**ipossia da altitudine** aumenta indirettamente la densità capillare a causa della riduzione della CSA delle miofibre, ma riduce la quantità di mitocondri presenti. È stata riportata una riduzione del 30% di questi organelli, e pertanto una riduzione delle capacità ossidative del muscolo (*Hoppeler et al., 2001*).

Le risposte biochimiche e patofisiologiche dovute all'esposizione ad altitudine dipendono in primo luogo dal livello di altitudine e dalla conseguente severità dell'ipossia (*Lenfant and Sullivant, 1971*). Un'altitudine di 5500 m è la più alta a cui sia l'uomo che gli animali sarebbero capaci di acclimatarsi (*Talbot and Dill, 1936; West, 1991*). Al di sopra di questa altezza si manifestano deperimenti che alla lunga potrebbero portare al decesso di soggetti cronicamente esposti a tale severa ipossia. Adattamenti cellulari e tissutali sono cruciali per un'acclimatazione in seguito ad altitudine prolungata. Per **acclimatazione** si fa riferimento a tutti i meccanismi di risposta adattativi fisiologici e metabolici che l'organismo umano è in grado di attuare, che si sviluppano su tempi diversi (adattamenti acuti e adattamenti cronici) in seguito a agli stimoli indotti dall' alta quota, e che migliorano la tolleranza all'ipossia. La rapidità di risposta alla quota è individuale e dipende da vari fattori quali l'altitudine raggiunta ed il tempo impiegato a raggiungerla, l'esperienza precedente, l'alimentazione e l'idratazione, lo stato di salute e la quantità di esercizio fisico che si effettua appena arrivati in quota. Esiste un'enorme variabilità di risposta individuale e il processo di acclimatazione può essere più o meno rapido o completo in soggetti diversi.

Da recenti studi molecolari è emerso che l'ipossia attiva l'espressione di geni codificanti non solo per proteine coinvolte nella risposta ventilatoria (dopamina decarbossilasi), vascolare (fattore di crescita vascolare endoteliale, VEGF), e policitemia (eritropoietina, EPO) all'esposizione ad alta quota, ma anche per diversi enzimi della via anaerobica glicolitica

(Semenza et al., 1994; Gassman and Wenger, 1997; Semenza, 2000). Utilizzando ratti esposti ad una altitudine simulata di 5500 m tramite l'utilizzo di una camera a bassa pressione (ipobarica) per circa 90 giorni, non si sono però evidenziati cambiamenti nelle vie glicolitiche anaerobiche. I livelli di lattato nel sangue a riposo e l'aumento durante esercizi sub massimali erano comparabili sia in ratti (Gonzalez et al., 1991) che nell'uomo (Edwards et al., 1936) dopo acclimatazione. L'attività della *pathway* anaerobica non aveva subito cambiamenti né prima né dopo il processo di acclimatazione a 5500 m.

Il mantenimento di un normale metabolismo aerobico ad un'altezza di 5500 m è il risultato di risposte adattative dei sistemi ventilatorio, cardiovascolare ed ematologico. Comunque, la tensione tissutale dell'ossigeno, in ratti acclimatati ad alta quota, rimane significativamente al di sotto dei valori di controllo. I ratti esposti ad alta quota hanno incrementato il consumo di ossigeno durante attività fisica sub massimale; questo aumento è stato ottenuto aumentando l'estrazione di ossigeno tissutale piuttosto che da incrementi nelle risposte cardiopolmonari all'ipossia (Gonzalez et al., 1993). La capacità del metabolismo aerobico limita l'adattamento a lungo termine ad alta quota, ed i processi anaerobici danno poco o nessun contributo adattativo addizionale durante il processo di acclimatazione. Come sopra accennato, l'ipossia attiva l'espressione di numerosi geni che codificano tra le varie proteine, anche per enzimi glicolitici la cui attività aumenta in ratti cronicamente esposti a livelli di altitudine inferiori a 5500 m (Bouverot, 1985). L'aumento dei livelli di tali enzimi non è stato associato ad un'aumentata capacità delle vie glicolitiche, valutato sulla base del massimo tasso di lattato prodotto. L'assenza di profondi cambiamenti nella *pathway* glicolitica è in accordo col fatto che a 5500 m il normale consumo di ossigeno e il metabolismo aerobico vengono mantenuti. L'insieme di queste evidenze suggerisce che i **processi di adattamento** riguardanti il consumo di ossigeno e il metabolismo aerobico, a riposo e in seguito ad esercizio fisico, dominano l'adattamento all'ipossia cronica nei mammiferi (Ou and Leiter, 2004). Dati riportati in letteratura da Terrados (1990) sulla base di uno studio condotto sull'uomo hanno mostrato che, analizzando i muscoli degli arti inferiori, l'allenamento condotto in condizioni di ipossia ipobarica ha aumentato la capacità di lavoro e l'attività dell'enzima citrato sintasi (catalizza la prima reazione del ciclo di Krebs, localizzato a livello della matrice mitocondriale, viene solitamente quantificato per valutare l'attività mitocondriale) molto più rispetto ad un allenamento effettuato in condizioni normossiche. Sulla base delle conclusioni di questo, e di altri studi che

supportano tali evidenze, l'ipossia viene considerata lo stimolo importante per gli aumenti, indotti da esercizio fisico, dell'attività di enzimi mitocondriali (*Bigard et al., 1991; Desplanches et al., 1993*). Ciò suggerisce e supporta la validità dell'allenamento in ambiente ipossico quale quello dato dall'alta quota (*Takahashi et al., 1995*).

SCOPO DELLO STUDIO

Il tessuto muscolare scheletrico manifesta una spiccata plasticità che trova corrispondenza in un ampio spettro di caratteristiche morfologico-funzionali delle singole fibre muscolari che lo costituiscono. Gli estremi di questo spettro risiedono nella condizione ipertrofica, che generalmente si manifesta in seguito a cronico sovraccarico funzionale, e nella condizione atrofica, che si può manifestare in seguito a disuso, immobilizzazione forzata, invecchiamento, alterata gravità o in presenza di svariate condizioni patologiche muscolari (distrofie) e non muscolari (cardiopatie, bronco pneumopatie croniche ostruttive, nefropatie etc.).

La possibilità del muscolo di soddisfare le diverse esigenze funzionali è significativamente legata all'eterogeneità delle proprietà contrattili ed energetiche delle fibre muscolari che lo compongono. La presenza di diversi fenotipi delle fibre muscolari, identificati *in vitro*, e la loro distribuzione caratteristica nei muscoli rappresenta uno dei principali determinanti della variabilità della prestazione muscolare *in vivo* (Thorstensson et al., 1976; Saltin e Gollnick, 1983; Harridge et al., 1996).

L'esistenza di svariate isoforme delle proteine miofibrillari, e soprattutto della miosina, non è solo alla base dell'eterogeneità funzionale delle fibre e dei muscoli scheletrici, ma anche della loro plasticità, cioè della capacità del tessuto muscolare di modificare la propria prestazione adattandola a mutevoli esigenze funzionali. A monte della plasticità muscolare vi sono processi di regolazione a lungo termine. In risposta a ripetuti o prolungati cambiamenti delle richieste funzionali, il tessuto muscolare si comporta come un tessuto fortemente plastico, capace di modificarsi profondamente sia in senso qualitativo che in senso quantitativo.

La larga popolazione delle fibre cosiddette "miste", ossia di quelle fibre che mostrano una co-espressione di differenti isoforme delle MHCs, è un caratteristico segno dell'equilibrio dinamico che caratterizza il muscolo scheletrico ed è rappresentativo delle capacità delle fibre di trasformarsi da un tipo all'altro.

L'attività di ricerca svolta in questo studio si articola in tre diverse fasi, volte tutte ad indagare gli effetti che diversi ed opposti stimoli inducono a livello muscolare, valutando pertanto il grado di plasticità muscolare e la sua capacità di adattarsi a diverse esigenze e richieste funzionali, modulando e modificando, a livello molecolare, la composizione delle isoforme proteiche, ed in particolar modo delle catene pesanti della miosina (MHC), il motore

molecolare della contrazione, e di conseguenza parametri meccanici e proprietà contrattili in singole fibre muscolari scheletriche umane. In ciascuna delle tre fasi è stata indagata la risposta muscolare ad uno stimolo differente, con lo scopo quindi di cogliere e interpretare le differenze di risposta muscolare in relazione alle diverse situazioni che il muscolo si trova ad affrontare, e pertanto alla sua capacità di modellarsi in relazione al suo grado di plasticità.

In modo particolare il programma sperimentale è stato articolato come segue:

- 1- Il primo studio affrontato ha visto un confronto tra soggetti divisi in diverse fasce di età.
- 2- Successivamente sono stati analizzati campioni muscolari di soggetti sottoposti ad allenamento di forza (*resistance training*).
- 3- Infine è stato effettuato uno studio su campioni muscolari provenienti da un gruppo di alpinisti, effettuando un confronto pre-post spedizione.

1- Il presupposto da cui siamo partiti è legato ai non chiari cambiamenti delle singole fibre muscolari che si manifestano con l'invecchiamento, il quale risulta essere associato ad una progressiva perdita delle funzioni neuromuscolari. In relazione a ciò il termine sarcopenia indica una perdita di forza e di massa muscolare che si manifesta con il progredire dell'età. Sebbene una probabile spiegazione per tali alterazioni della *performance* muscolare sia ascrivibile alla perdita di massa muscolare, studi recenti suggeriscono che un contributo significativo potrebbe derivare dai cambiamenti nelle proprietà delle fibre muscolari.

A questo proposito sono stati pubblicati lavori che mostrano risultati contrastanti (come descritto in dettaglio nell'Introduzione).

Sulla base dell'incerto coinvolgimento delle proprietà contrattili delle singole fibre muscolari nella perdita della forza muscolare legata all'invecchiamento, sono stati confrontati, in questa prima fase, tre gruppi di soggetti sani divisi in tre fasce di età: *young-adult group* (da 20 a 55 anni), *middle-age group* (da 56 a 70 anni) ed *elderly group* (oltre 70 anni). Sono stati utilizzati fasci muscolari ottenuti da biopsie del muscolo vasto laterale, determinati parametri contrattili mediante studi di meccanica e caratterizzate le singole fibre a livello molecolare identificando le isoforme della miosina mediante analisi elettroforetiche (come descritto nel capitolo Materiali e Metodi).

I risultati ottenuti vogliono contribuire a chiarire la controversia presente ed individuare le risposte muscolari ad eventuali cambiamenti indotti dall'invecchiamento per porre una base reale per indagini future legate a differenti condizioni quali il disuso, l'immobilizzazione muscolare e patologie età-relate.

2- Il secondo passo è stato studiare la plasticità muscolare in seguito ad uno stimolo indotto da esercizio fisico, in particolare da un allenamento di forza (*resistance training*), responsabile di solito di un aumento e un miglioramento della massa e della *performance* muscolare. Cambiamenti del pattern di espressione delle MHC e della *cross sectional area* (CSA) in risposta a diversi protocolli di allenamento sono alla base delle modificazioni di forza e potenza a cui il muscolo va incontro. Risultati riportati in letteratura evidenziano uno *switch* delle fibre muscolari dal tipo MHC 2X al tipo MHC 2A, ed in rari casi verso il tipo MHC 1 (Goodyear et al., 2007). Molti sono gli studi presenti in letteratura riguardanti gli effetti dell'allenamento e nello specifico dei vari tipi di allenamento sulla *performance* muscolare e sull'adattamento indotto a livello di singole fibre che interessano però soprattutto i muscoli degli arti inferiori. Scarsi al contrario sono i dati riguardanti i muscoli degli arti superiori. Sulla base di tale premessa, si spiega il perché voler indagare gli effetti di un allenamento di forza prendendo in considerazione i muscoli della spalla.

Come descritto nel capitolo Materiali e Metodi, sono stati utilizzati fasci muscolari ottenuti da biopsie del muscolo gran dorsale di 18 soggetti giovani sottoposti ad un programma di *resistance training* per un periodo complessivo di 8 settimane.

Gli esercizi svolti erano tutti mirati a potenziare i muscoli della spalla. Sono stati determinati, anche in questo caso, i parametri contrattili e caratterizzate le singole fibre. Sempre su singole fibre, sono stati condotti studi di immunocitochimica per valutare eventuali aumenti del numero di nuclei (iperplasia) dopo *resistance training*.

3. Nello studio successivo è stato operato un confronto delle proprietà contrattili e molecolari di singole fibre muscolari in un gruppo di alpinisti prima e dopo la spedizione, al fine di valutare sia la presenza di eventuali *switch* delle isoforme MHC che cambiamenti delle proprietà contrattili delle singole fibre muscolari, in seguito ad un esercizio fisico di fatica effettuato in ambiente ad alta quota. Sono stati analizzati fasci muscolari a partire da biopsie

del muscolo vasto laterale ed effettuate le analisi di cui prima, ed anche studi di identificazione e valutazione della distribuzione delle isoforme delle catene leggere MLC.

MATERIALI E METODI

1. Soggetti e struttura dello studio

L'attività di ricerca svolta si articola in tre fasi diverse ma tutte e tre volte ad indagare, a livello molecolare, gli effetti che diversi stimoli e condizioni hanno sulle fibre muscolari umane e sulla loro prestazione contrattile. A tal proposito lo studio effettuato è stato articolato come descritto in dettaglio nello Scopo del lavoro.

1.1 Prima fase: confronto tra soggetti di età diverse

La fase iniziale di questo progetto ha operato un confronto tra tre gruppi di soggetti sani ed in buona salute divisi secondo diverse fasce di età come segue, al fine di individuare le risposte muscolari ad eventuali cambiamenti indotti dall'invecchiamento:

- *Young-adult group* (da 20 a 55 anni, n=7)
- *Middle age group* (da 56 a 70 anni, n=6)
- *Elderly group* (età superiore ai 70 anni, n=6).

Nella Tabella 1 sono riportati tutti i soggetti appartenenti ai tre gruppi con le relative età (le sigle M ed F indicano il sesso dei soggetti). Il numero totale di singole fibre analizzate per questa prima fase è 218, (*young adult*=114; *middle age*=48; *elderly*=56).

| YOUNG | | MIDDLE-AGE | | ELDERLY | |
|-------|-----------|------------|-----------|---------|-----------|
| SP 1 | (37 anni) | SP 5 | (60 anni) | M 6 | (72 anni) |
| SP 2 | (51 anni) | F 8 | (68 anni) | M 2 | (79 anni) |
| SP 3 | (51 anni) | F 9 | (67 anni) | F 20 | (75 anni) |
| SP 7 | (32 anni) | F 12 | (65 anni) | F 21 | (71 anni) |
| SP 8 | (22 anni) | M 22 | (69 anni) | F 22 | (75 anni) |
| S 1 | (45 anni) | M 20 | (70 anni) | M 21 | (74 anni) |
| S 2 | (37 anni) | | | | |

Tabella 1 Suddivisione dei soggetti in tre gruppi e relative età.

1.2 Seconda fase: soggetti sottoposti a *resistance training* o allenamento di potenza

Per studiare gli effetti indotti da un allenamento di forza sul muscolo scheletrico della parte prossimale dell'arto superiore, sono stati reclutati 18 volontari (9 donne e 9 uomini) aventi un'età media di $24,9 \pm 5,3$ anni; prima di procedere con lo studio, ciascun soggetto ha firmato il consenso informato.

Programma di *resistance training*

I 18 volontari sono stati sottoposti ad un programma di *resistance training* il quale prevedeva 3 allenamenti a settimana per un periodo complessivo di 8 settimane. Nelle prime 4 settimane l'allenamento è stato effettuato al 75% 1RM, al 75% cioè della loro forza massimale e comprendeva (per ogni esercizio) 2-3 serie (2 nella prima settimana e 3 nelle tre successive), ciascuna con 9-11 ripetizioni ed 1 min di riposo. Nelle ultime 4 settimane i soggetti si sono allenati all'85% della loro forza massimale effettuando 3-4 serie (3 nella prima settimana e 4 nelle restanti) ma con un minor numero di ripetizioni (6-8) e 2 min di riposo. Gli esercizi svolti, tutti mirati a potenziare i muscoli della spalla sono di seguito elencati: 1) lat machine avanti presa supina, 2) Pulley, 3) Hammer Curl, 4) Barbell bench press, 5) Dumbbell press (Fig. 9 e 10).



Fig. 9 Esempi esplicativi dei tipi di esercizi effettuati per l'allenamento. Da sinistra verso destra sono mostrati rispettivamente: Pulley e Hammer curl.



Fig. 10 Da sinistra verso destra: Barbell bench press (panca piana) e Dumbbell press.

Dieta

I 18 soggetti inoltre hanno seguito, durante le 8 settimane di allenamento, uno specifico programma dietetico. Sulla base di due tipi di diete, equilibrata ed iperproteica, è stato identificato il gruppo normoproteico (NP) il quale ha osservato la dieta equilibrata, ed il gruppo iperproteico (IP) che giornalmente introduceva una maggior quantità di proteine (1,8 gr di proteine per Kg di peso, assunzione di proteine 90% in polvere).

Nella seguente tabella (Tabella 2) sono riportati schematicamente i 18 soggetti divisi in relazione al sesso e al programma dietetico seguito, con indicazione del peso corporeo.

| UOMO | DIETA | DONNA | DIETA |
|--------------------|--------------|--------------------|--------------|
| S1 (70 Kg) | IP | S3 (67 Kg) | NP |
| S2 (94 Kg) | NP | S4 (59 Kg) | IP |
| S6 (75 Kg) | NP | S5 (53 Kg) | IP |
| S7 (98 Kg) | IP | S8 (63 Kg) | NP |
| S9 (77 Kg) | IP | S10 (54 Kg) | NP |
| S11 (74 Kg) | IP | S13 (66 Kg) | NP |
| S12 (76 Kg) | NP | S15 (60 Kg) | NP |
| S14 (73 Kg) | NP | S17 (63 Kg) | IP |
| S16 (81 Kg) | IP | S18 (63 Kg) | IP |

Tabella 2 Elenco dei 18 soggetti sottoposti a *resistance training* e suddivisi in base al sesso e al tipo di dieta.

Per gli esperimenti di meccanica, sono state analizzate le singole fibre derivanti dalle biopsie ottenute dal muscolo gran dorsale in alcuni dei 18 volontari, ed in particolare dei soggetti S1, S3, S4, S5, S6, S9, S14, S15, S18, con un totale di 120 fibre totali analizzate prima dell'inizio del programma di allenamento e dei regimi dietetici e 140 fibre totali isolate dopo *resistance training*. Tutte le singole fibre sono successivamente state caratterizzate mediante analisi elettroforetica.

1.3 Terza fase: soggetti sottoposti ad attività fisica in alta quota

Per quest'ultima fase abbiamo studiato gli effetti dell'alta quota grazie ad un gruppo di alpinisti impegnati nella salita al Manaslu. Il Manaslu (Fig. 11), alto 8,163 m, (conosciuto anche come *Kutang*) è l'ottava montagna più alta del mondo e si trova nelle catena montuosa dell' Himalaya. Il nome Manaslu deriva dal sanscrito *manasa*, che significa "*montagna dello spirito*".

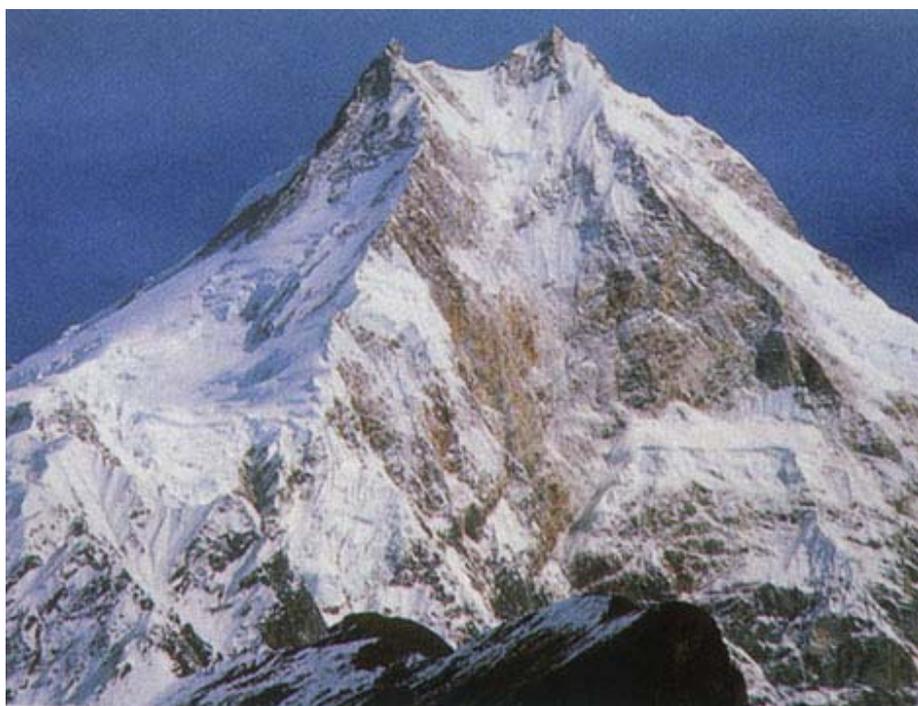


Fig. 11 Foto della vetta del Manaslu

Questa montagna localizzata in territorio Nepalese viene raggiunta con un trekking di avvicinamento di 247 Km su terreno impervio in una vallata selvaggia ricca di flora e fauna. L'itinerario di questa spedizione ha ripercorso i passi della storica prima ascensione che risale al 9 maggio 1956: "la via giapponese sul versante nord-est". Questa via è considerata di difficoltà medio/difficile, percorsa ed aperta solo ad alpinisti.

Lungo la salita per l'ascensione vengono posti 3 Campi di cui il primo è il Campo Base con Casa Interamnia posto a circa 5000 m che prevede l'attraversamento di un lungo ghiacciaio.

L'ascensione è avvenuta in stile alpino senza l'ausilio di ossigeno ed il pernottamento è avvenuto in tenda data la mancanza di rifugi o altri ripari.

Componenti della spedizione



Fig. 12 Foto dei componenti della spedizione.

La spedizione al Manaslu (INTERAMNIA 8000 - MANASLU 2008) della durata di circa 40 giorni, era composta da 7 alpinisti (Fig. 12) tutti di sesso maschile con un'età media di 39 ± 15 anni (Tabella 3). I componenti erano tutte persone qualificate, con grande esperienza, allenati ed abituati a scalate e spedizioni.

Il gruppo era composto da:

- 1 Capospedizione
- 1 Responsabile medico e tecnico della spedizione
- 1 Responsabile alla logistica
- 3 Alpinisti
- 1 Responsabile ricerca scientifica e della relativa logistica del Campo Base

La vetta non è mai stata raggiunta per condizioni meteo ostili, tuttavia gli alpinisti hanno soggiornato per circa 30 giorni ad una altitudine superiore ai 5000 m e per brevi periodi oltre i 6000 m.

| Soggetto | Età | Peso (kg) |
|-----------------|------------|------------------|
| SP1 | 37 | 103.0 |
| SP2 | 51 | 70.9 |
| SP3 | 51 | 82.0 |
| SP5 | 60 | 73.0 |
| SP6 | 23 | 96.5 |
| SP7 | 32 | 67.0 |
| SP8 | 22 | 62.7 |

Tabella 3 Elenco dei componenti della spedizione e indicazione dell'età e del peso.

2. Campionamento di biopsie muscolari umane

Per determinare le proprietà contrattili e molecolari del muscolo e delle singole fibre sono stati utilizzati fascetti muscolari a partire da biopsie umane. Le biopsie sono state prelevate dal muscolo vasto laterale sia nel caso dei soggetti divisi per fasce di età che nel caso degli alpinisti. Dal muscolo gran dorsale sono state ottenute le biopsie dei soggetti caratterizzanti la seconda parte del progetto e sottoposti ad un allenamento di forza.

Nei primi due casi i prelievi sono stati effettuati presso l'Università di Chieti, nell'ultimo presso l'Università di Pavia; tutti i campioni sono stati poi trasferiti nel nostro Laboratorio di Biofisica Muscolare.

I prelievi bioptici sui soggetti caratterizzanti la prima fase e sul gruppo di alpinisti, prima e dopo la spedizione, sono stati eseguiti utilizzando un ago semiautomatico (Precisa 13 Gauge; Hospital Service, Roma, Italy) dopo anestesia locale con lidocaina (0.5%, w/v). Ciascun campione bioptico, con un peso approssimativamente di 4 mg, corrispondente ad un cilindro avente un diametro pari a 0,8 mm ed una lunghezza di circa 4 mm, è stato immerso in soluzione skinning mista a glicerolo (50% v/v) e conservato a -20°C.

I prelievi riguardanti i 18 volontari soggetti ad un allenamento di forza, sono stati eseguiti dopo aver sottoposto i pazienti ad anestesia locale con 2 cc di xylocaina 2% e sterilizzazione con betadina; per i prelievi bioptici sono stati utilizzati aghi PRECISA Needle 1410 (HS Hospital Service S.p.A, Latina, Italy) (Fig. 13) aventi diametro di 14 Gauge e una cannula di inserzione lunga 100mm (Hopper 1993).

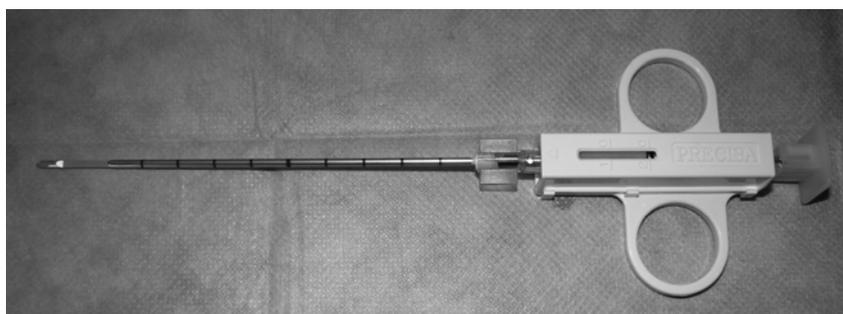


Fig. 13 PRECISA Needle 1410.

La quantità di ciascuna biopsia variava da 1,8 mg (ad es. il soggetto 9) a 5,6 mg (soggetto 18); il peso medio era di 2,8 mg. Ciascun campione aveva le dimensioni di un cilindro di circa 0,7-0,9 mm di diametro, con una CSA di circa 0,5 mm² ed una lunghezza di circa 8 mm. I campioni bioptici sono stati immersi in soluzione skinning e glicerolo (50% v/v) e conservati a -20°C fino all'inizio degli esperimenti.

3. Meccanica delle fibre muscolari

I campioni di biopsia vengono conservati ad una temperatura di -20°C , in una soluzione di skinning (2) e glicerolo fino al momento dell'analisi. Il glicerolo serve per aumentare la densità e la viscosità della soluzione in modo tale da evitare la formazione di cristalli di ghiaccio, che degraderebbero la struttura muscolare. Il giorno dell'analisi i campioni vengono trasferiti in una piastra Petri con una base di silicone, che permette di ancorare le biopsie alla base della Petri con l'ausilio di aghi da entomologia. La capsula è riempita di soluzione skinning (Fig. 14). La soluzione viene sostituita varie volte fino ad eliminare ogni traccia di glicerolo e quindi sostituita con la soluzione skinning a cui viene aggiunta ATP. Le fibre in presenza dell'ATP perdono lo stato di *rigor* e questo rende più agevole il loro isolamento.

Si dissociano dalle biopsie dei fascetti di fibre e da questi si sfilano poi le fibre una ad una. La dissociazione delle singole fibre viene effettuata con l'ausilio di uno stereomicroscopio da dissezione (Konus Cristal 98, con ingrandimenti da 10 a 60X) per mezzo di pinzette e forbici da microchirurgia. Le fibre muscolari isolate e fissate alla petri vengono lasciate immerse per 30 minuti nella soluzione skinning a cui è stato aggiunto Triton 100X all'1% per completare la solubilizzazione delle membrane.

La parte di biopsia rimanente viene immersa in un adeguato volume di soluzione Laemmli (1) e conservato a -20°C per essere utilizzato in successive analisi elettroforetiche.

Alle estremità delle fibre isolate vengono montate delle clip di alluminio (Fig. 14).

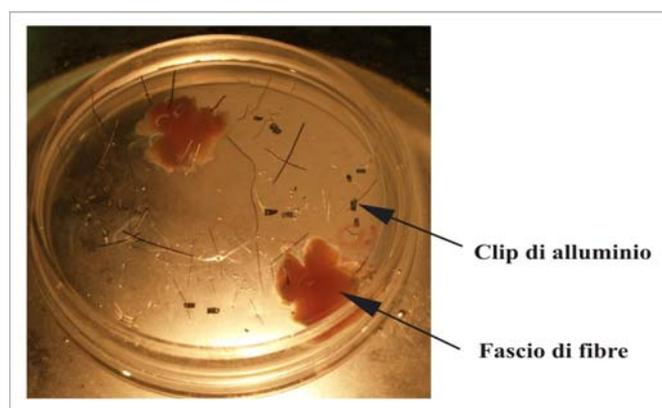


Fig. 14 Biopsia di muscolo in piastra Petri.

Usando uno stereomicroscopio (Axiovert 10, Zeiss, Germania) le fibre sono montate orizzontalmente, grazie alle clips, tra un trasduttore per il rilevamento della forza (AME-801 SensorOne, Sausalito, California) e un motore elettromagnetico (SI, Heildeberg, Germania) che permette di realizzare micromovimenti della fibra (Fig. 16) che sono parte del set-up sperimentale. Il set-up sperimentale è formato inoltre da una piastra di alluminio termostata su cui si sollevano piccole piattaforme forate nella parte centrale e coperte da un vetrino; sono cellette o camere rettangolari poste in fila parallele. Un secondo vetrino è posizionato a circa 2,5 mm sopra ciascuna piattaforma, creando uno spazio in cui una goccia di soluzione (70 μ l) viene mantenuta per tensione superficiale (Fig. 15).

La piastra di alluminio termostata o porta celle è stata costruita in modo che possa scorrere avanti e indietro per permettere all'operatore di muovere le singole fibre da una camera all'altra.

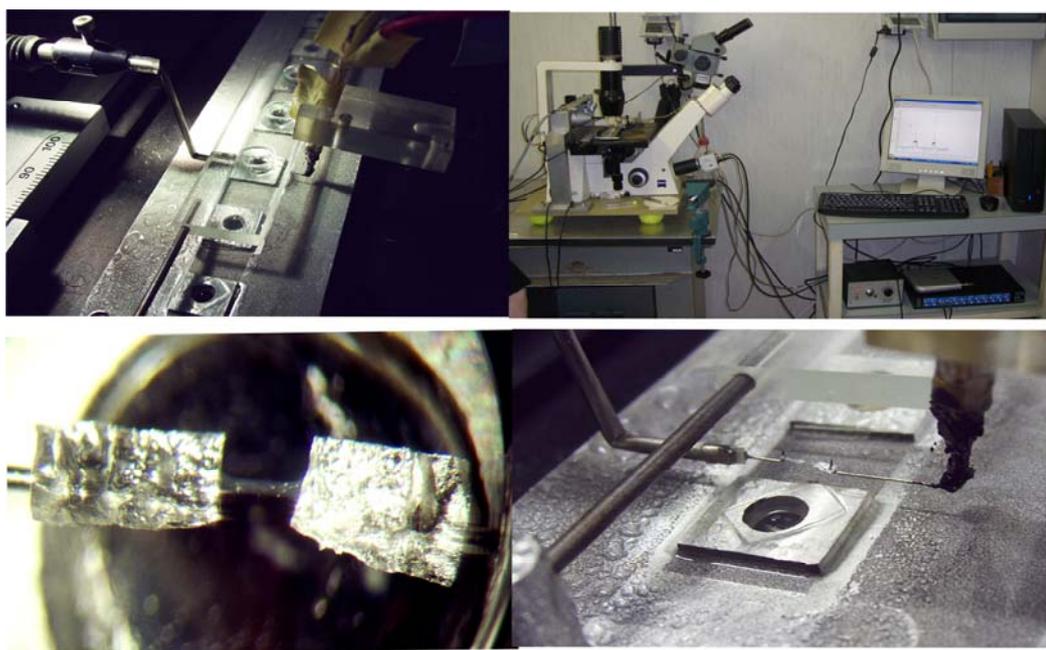


Fig. 15 Apparecchiature utilizzate per gli studi di meccanica delle singole fibre. Nel pannello in alto a destra è visibile il microscopio rovesciato con il piano di alluminio posizionato sul piano portaoggetti. Nel pannello in alto a sinistra è ben visibile il piano di alluminio con i supporti dell'altezza di 0.5mm, sui quali è incollato il vetrino copri oggetto con una goccia e sopra a questa un secondo vetrino copri oggetto. Si vedono anche le fessure del piedistallo attraverso cui è possibile osservare la fibra al microscopio. La telecamera collegata al microscopio invia le immagini al computer posto di fianco.

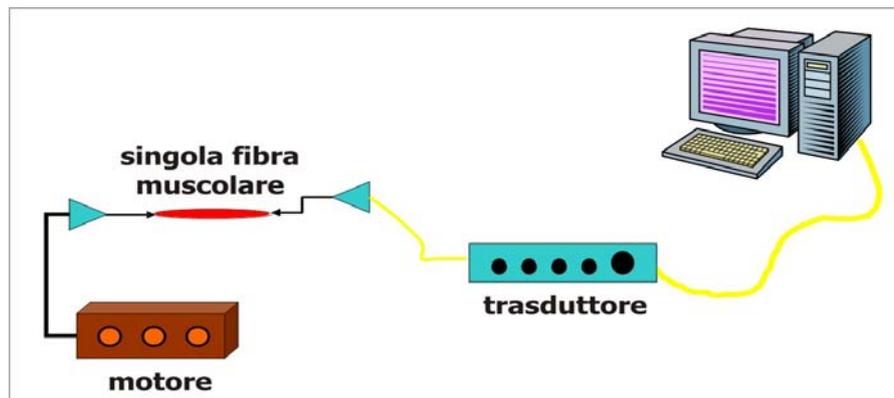


Fig. 16 Disegno che illustra l'apparato utilizzato per il rilevamento della forza sviluppata dalle fibre muscolari. Le fibre con le clips applicate, vengono collegate attraverso gli uncini ad un motore da una parte, e ad un trasduttore dall'altra. Ogni variazione della lunghezza o della forza della fibra viene inviata ad un computer, che permette di elaborare i risultati ottenuti.

Quando la fibra si trova nella prima celletta contenente la soluzione skinning, viene misurata la sua lunghezza e quindi la fibra viene allungata di circa il 20%. Tramite un microscopio invertito a contrasto di fase (Axiovert 25, Zeiss, Germania) viene poi misurato il diametro. Inoltre, tramite una telecamera (CCD B&W CAMERA, MONACOR®) collegata al microscopio invertito e ad un computer, viene acquisita una foto della fibra (Fig. 15) attraverso il programma Pinnacle Studio Version 9. Questa foto verrà analizzata tramite il programma Image J per determinare il diametro della fibra e la lunghezza dei sarcomeri.

Si misura quindi la forza generata dalla singola fibra durante l'attivazione massimale. La fibra dalla soluzione skinning viene trasferita nella celletta successiva che contiene una goccia di soluzione di pre-attivazione a bassa concentrazione di EGTA (3) e qui lasciata equilibrare per almeno 2 minuti. Quindi viene attivata massimamente, trasferendola nella terza cella contenente la soluzione di attivazione con il Calcio (pCa 4,6) (4). La fibra si contrae e comincia a generare forza. Quando la forza sviluppata dalla fibra raggiunge il valore massimo (plateau), con l'ausilio del motore si impone alla fibra un rapido movimento di accorciamento e riallungamento (1ms) in modo da azzerare la tensione e poter studiare la cinetica di risviluppo della forza in condizioni di attivazione massimale. La fibra viene quindi riportata nella soluzione di pre-attivazione. Questa operazione viene ripetuta quattro-cinque volte in maniera tale da avere più misure di forza da cui calcolare poi, rispettivamente, un valore medio.

L'output del trasduttore di forza (volt) è convertito mediante il convertitore A/D in segnali digitali, che vengono inviati al computer dove sono registrati dal programma Spike 2. Lo stesso programma viene anche impiegato per la analisi dei dati registrati.

Finita l'analisi meccanica, la fibra viene tolta dal set-up, vengono rimosse le clips dalle sue estremità. La fibra viene solubilizzata con 20µl di soluzione Laemmli e conservata a -20°C per ulteriori analisi elettroforetiche.

3.1 Soluzioni utilizzate

(1) Soluzione Laemmli

| | |
|---------------------|---------|
| Tris pH 6,8 | 62,5 mM |
| Glicerolo | 10% |
| SDS | 2,3% |
| β-mercaptoetanololo | 5% |

(2) Soluzione skinning

| | |
|---------------------------------|--------|
| K propionato | 100 mM |
| Mg acetato | 5 mM |
| K-EGTA | 5 mM |
| DTT | 1 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 5 mM |

(3) Soluzione di pre-attivazione

| | |
|----------------------|--------|
| KCl | 100 mM |
| Imidazolo | 20 mM |
| Cloruro di Mg | 5 mM |
| DTT | 1 mM |
| EGTA | 0,5 mM |
| Na ₂ -ATP | 5 mM |

(4) Soluzione di attivazione

| | |
|----------------------|--------|
| KCl | 100 mM |
| Imidazolo | 20 mM |
| Cloruro di Mg | 5 mM |
| DTT | 1 mM |
| EGTA | 5 mM |
| Na ₂ -ATP | 5 mM |
| CaCl ₂ | 5 mM |

Sono stati aggiunti degli inibitori proteasici (10µM di E64 e 40µM di Leupeptina) in tutte e quattro le soluzioni.

3.2 Analisi dei parametri meccanici e dimensionali delle fibre muscolari

Mediante l'utilizzo dei programmi Spike 2 ed Image J sono stati analizzati i seguenti parametri: la forza sviluppata, il diametro e la lunghezza dei sarcomeri di ciascuna fibra muscolare. Nella figura seguente è riportato un esempio del tracciato ottenuto durante un esperimento (Fig. 17).

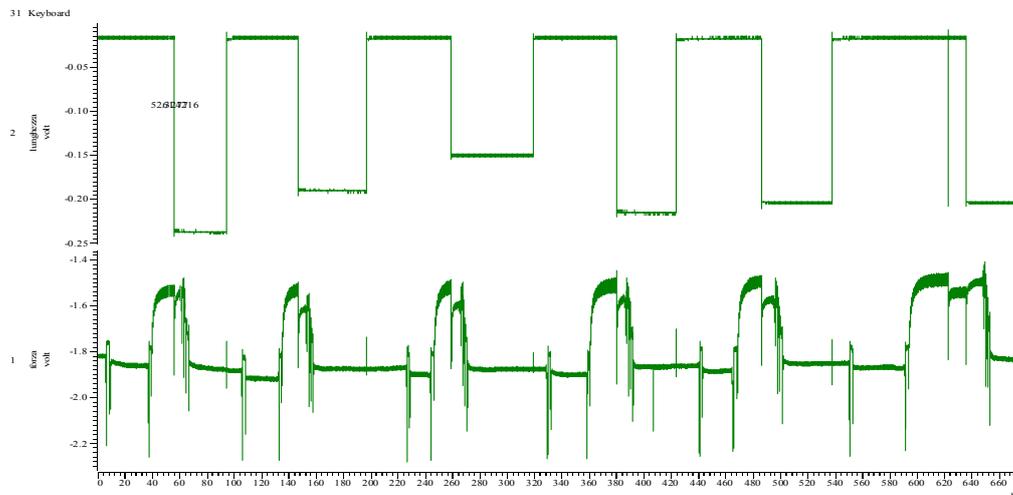


Fig. 17 Grafico che rappresenta le variazioni di lunghezza (sopra) e di forza (sotto) di una singola fibra muscolare, ottenuto con il set up sopra descritto.

La linea in alto rappresenta le variazioni di lunghezza che la fibra subisce, mentre il grafico in basso descrive le variazioni di forza.

Grazie all'uso di due cursori vengono determinati più valori di forza (cioè si analizzano più picchi) in modo da calcolare un valore medio. Questo valore medio viene diviso per un fattore di calibrazione che permette di convertire l'unità di misura da Volt a milliNewton (mN). Successivamente tale valore (F_o) viene diviso per l'area della sezione della specifica fibra ($CSA = \text{cross sectional area}$) espressa in mm^2 , ottenendo così la tensione (tensione isometrica o P_o); in questo modo è possibile confrontare fibre con CSA diverse. Tutti questi valori sono stati riportati in un foglio di lavoro (non mostrato).

Il programma Image J, invece, ha permesso di analizzare le immagini delle varie fibre (acquisite con una definizione di 600x800 pixels) per determinare il diametro della fibra e la lunghezza dei sarcomeri.

Per questo scopo è stata effettuata in precedenza, tramite l'uso di un micrometro, la taratura del sistema di acquisizione di immagine in modo tale da stabilire un fattore di conversione pixels/ μm da usare per tutte le misure. Il fattore di conversione ottenuto è 2,98 pixels/ μm .

Per determinare il diametro si prendono in considerazione, come punto iniziale e come punto finale, i punti più esterni della fibra. Si effettuano almeno tre misure in varie zone della fibra e poi si fa la media tra questi valori e si convertono in μm (Fig. 18). I valori così ottenuti sono riportati nel foglio di lavoro (non mostrato).

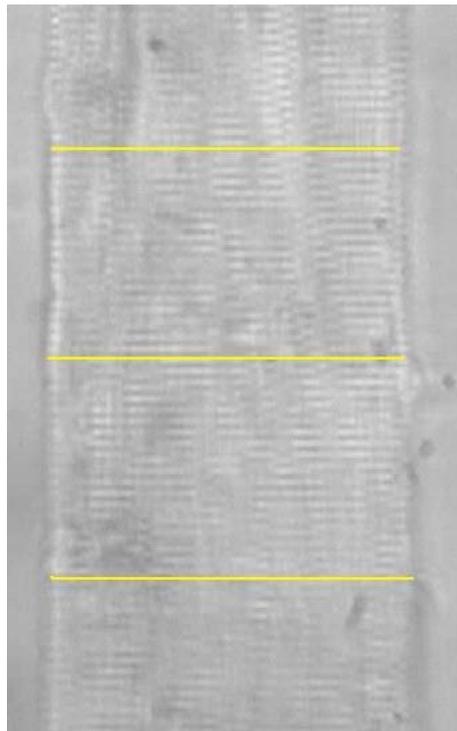


Fig. 18 Singola fibra umana con le 3 misure di diametro.

4. Analisi molecolari

4.1 Determinazione proteica

Sui vari campioni delle biopsie muscolari e delle singole fibre (di vasto laterale e gran dorsale) analizzate precedentemente e conservati in soluzione Laemmli viene determinata la concentrazione proteica secondo il metodo di Folin-Lowry (*Lowry et al, 1951*) che sfrutta la reazione degli ioni rameici che in ambiente alcalico danno luogo alla formazione di un composto colorato in viola-porpora reagendo con le proteine, in particolare con i gruppi carboamidici delle proteine per formare un complesso Cu-proteina.

Successivamente per aggiunta del reattivo Folin-Ciocalteu, si ha la riduzione dell'acido fosfomolibdico a blu di tungsteno e di molibdeno, sia ad opera del complesso Cu-proteina, che degli amminoacidi aromatici (tiroxina, triptofano) della proteina stessa.

In particolare il protocollo prevede la preparazione di 8 eppendorf con concentrazione crescente nota (0, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 μg) di BSA (albumina di siero bovino) per costruire la curva di taratura. In altre eppendorf, tante quante i campioni da esaminare, si pongono 3-4 μl del campione. In ogni eppendorf si mettono 20 μl di soluzione SDS 7% ed H_2O per raggiungere un volume di 200 μl . Si preparano le soluzioni A (1 g di Na_2CO_3 in 50 ml di NaOH 0,1N), Ba (Tartrato di sodio 2%) e Bb (CuSO_3 1%). La soluzione A deve essere sempre fatta fresca. Si aggiunge quindi in ciascuna eppendorf 1ml di soluzione D (50 ml di soluzione A con 0,5 ml di soluzione Ba e 0,5 ml di soluzione Bb). Si attendono 10 minuti. Si aggiungono poi sempre in ogni eppendorf 100 μl di reattivo Folin-Ciocalteu (SIGMA) e si attendono 30 minuti ponendo i campioni al buio. Successivamente 1 ml di ogni eppendorf viene prelevato e posto in una cuvetta per la misurazione con lo spettrofotometro a 750 nm. Con il programma GraphPad Prism dalla concentrazione nota di BSA ricaviamo la concentrazione dei campioni in esame. Nelle analisi elettroforetiche successive vengono caricati 20 μg di ciascun campione.

4.2 Elettroforesi

Separazione MHC

L'elettroforesi è una metodologia che permette la separazione di molecole cariche (proteine o acidi nucleici) che migrano in un campo elettrico con velocità diverse a seconda del loro peso molecolare. Gli acidi nucleici, caricati negativamente, migreranno in direzione dell'anodo; le proteine si muoveranno in relazione alla loro carica netta. Per valutare la differente composizione miosinica (MHC) nelle singole fibre muscolari, in questa tesi viene utilizzata la metodica SDS-PAGE. In tal modo si possono identificare le singole fibre muscolari e la composizione in isoforme MHC in campioni composti da molte fibre (intere biopsie o grandi frammenti).

L'*SDS-PAGE* è una tecnica elettroforetica su gel di poliacrilammide in presenza dell'agente denaturante anionico sodio dodecil solfato (SDS). In questo sistema la velocità di migrazione delle proteine varia in funzione esclusivamente del loro peso molecolare e non dipende dalla carica netta delle stesse, proprio perché, a differenza di sistemi elettroforetici che non prevedono l'uso di detergenti ionici, l'SDS conferisce a tutte le proteine del campione una carica uniforme che permetterà loro di migrare verso l'anodo.

Per consentire una separazione più definita delle bande elettroforetiche, si utilizzano dei gel di tipo discontinuo. Il primo gel che le proteine incontrano durante la migrazione è detto *stacking* ed è costituito da una trama di poliacrilammide che forma un setaccio molecolare più grande che permette al materiale proteico di concentrarsi ed entrare contemporaneamente nel secondo gel, detto gel di corsa o *resolving* che, possedendo una maglia più fitta, permette la reale separazione.

I gel vengono preparati facendo percolare le soluzioni di preparazione in uno "stampo" costituito da due lastre di vetro (dimensioni: 18x16 cm) separate da degli spaziatori aventi lo spessore di 1 mm. Gli spaziatori vengono collocati su tre lati contigui delle lastre e si permette la loro adesione per mezzo di una sottile pellicola di grasso di silicone per alto vuoto (Fig. 19). In questa maniera si evita qualsiasi perdita di liquido durante la polimerizzazione del gel e si ottiene uno spessore costante dello stesso.

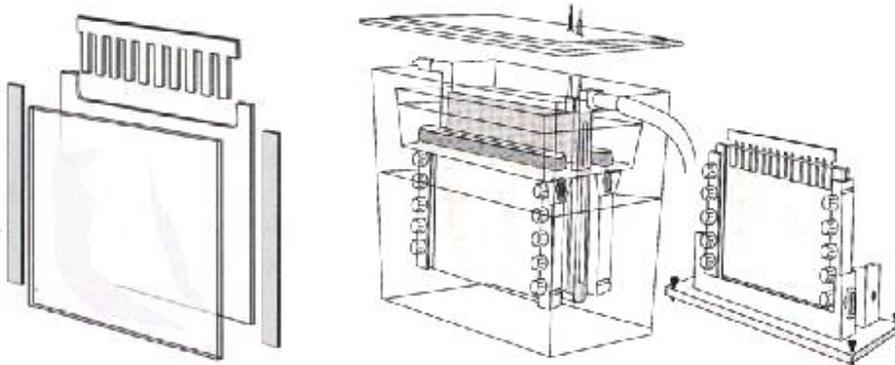


Fig. 19 Assemblaggio dell'apparato per elettroforesi su gel di poliacrilammide.

La prima ad essere preparata è la soluzione relativa al *resolving gel* seguendo il protocollo proposto da Talmadge e Roy (1993). Si utilizza un gel di poliacrilammide all'8% (Tabella 4).

| | |
|--------------------------|--------|
| Acilammide:Bisacilammide | 8% |
| Tris pH 8.8 | 200 mM |
| Glicina | 100 mM |
| Glicerolo | 30% |
| SDS | 0,4% |
| Ammonio persolfato | 0,1% |
| TEMED | 0,05% |

Tabella 4 Composizione finale *resolving gel*.

Si versa la soluzione tra i vetri fino a 2,5 cm dal bordo superiore delle lastre e si aggiunge un leggero strato d'acqua che isola la soluzione dall'ossigeno atmosferico e, comprimendo il bordo superiore del gel, se ne rende perfettamente orizzontale il fronte che si crea. Si attende per un'ora affinché la polimerizzazione sia completa.

Nel frattempo si preparano i buffer di corsa *Upper* e *Lower* partendo da una soluzione madre (Tabella 5), diluendola rispettivamente di cinque e dieci volte.

| | |
|---------|-----------|
| Tris | 30,275 gr |
| Glicina | 28,151 gr |
| SDS | 2.5 gr |

Tabella 5 Composizione della soluzione madre dei tamponi di corsa.

Una volta pronti, i buffer vanno posti in frigo fino al momento dell'uso.

Trascorso il tempo necessario per la polimerizzazione del gel di corsa si elimina l'acqua per mezzo di carta da filtro e si versa la soluzione del gel di *stacking* (Tabella 6).

| | |
|----------------------------|-------|
| Acrilammide:Bisacrilammide | 4% |
| Tris pH 6,7 | 70 mM |
| EDTA | 4 mM |
| Glicerolo | 30% |
| SDS | 0,4% |
| Ammonio persolfato | 0,1% |
| TEMED | 0,05% |

Tabella 6 Composizione finale *stacking* gel.

Per creare i pozzetti nei quali caricare i campioni in seguito, si inseriscono immediatamente dei pettini nel lato superiore, fra i due vetri. Anche in questo caso si attende un'ora per consentire la polimerizzazione del gel.

Nel frattempo si preparano i campioni per la corsa. Ogni campione viene preparato in modo da poter caricare in ogni pozzetto un volume totale di 20 μ l diluendo il campione proteico nel *loading buffer*. Quest'ultimo è costituito dalla soluzione Laemmli a cui si aggiungono 0,1 ml Blu di Bromofenolo 0,5% (SIGMA). Di solito ogni campione viene preparato caricando circa 10-20 μ g di proteina totale per le biopsie e 0,5-1 μ g per le singole fibre. Le eppendorf con i vari campioni vengono messe in un bagnetto termostatico a 90° C per cinque minuti in modo da permettere al β -mercaptoetanolo di rompere i legami disolfuro e all'SDS di legarsi efficacemente alle proteine e denurarle caricandole negativamente.

Una volta polimerizzato anche lo *stacking gel* si tolgono i pettini e si lavano i pozzetti con il buffer di corsa in modo da rimuovere qualsiasi residuo di acrilammide non polimerizzata. In seguito vengono caricati i campioni precedentemente preparati, avendo cura di lasciare bianchi (solo con soluzione Laemmli) i pozzetti alle due estremità, per evitare artefatti dovuti al campo elettrico non uniforme.

Infine, si aggiunge nella parte inferiore della vaschetta per l'elettroforesi il buffer di corsa *Lower*, mentre nella parte superiore si versa il buffer di corsa *Upper*. A questo punto, per

migliorare la risoluzione delle bande relative all'MHC viene aggiunto nel buffer di corsa *Upper* un agente riducente (β -mercaptoetanololo) alla concentrazione finale dello 0,12% (800 μ l) (Kohn e Myburghs 2006).

La vaschetta per l'elettroforesi viene collegata ad un alimentatore e l'intera corsa viene condotta in stanza refrigerata a 4° C. Per ottimizzare la risoluzione delle bande relative alle isoforme MHC dell'adulto, si adottano diversi parametri di corsa. Per quanto riguarda il muscolo umano, la corsa viene condotta a 70 V per la prima ora e in seguito a 170 V costanti per circa quaranta ore totali oppure a 240 V per 24 ore; il tempo di corsa prolungato e un più basso voltaggio, tuttavia, consentono una miglior risoluzione.

Separazione MLC

Per la determinazione delle isoforme delle catene leggere è stato utilizzato un gel di poliacrilammide alla concentrazione del 12% (Tabella 7) invece che dell'8%.

È stato preparato un buffer di corsa unico (Tris 50mM, Glicina 380 mM, SDS 0,1%) mantenuto a 4°C. Si è proceduto in modo del tutto analogo a quanto descritto sopra. Cambiavano i parametri di corsa: è stato mantenuto costante l'amperaggio impostando 32 mA (16 mA per gel), per un tempo complessivo di circa 4 ore al fine di ottenere la separazione delle isoforme MLC aventi un peso molecolare di circa 20 kDa.

| | |
|------------------------------------|--------|
| Acrilammide:Bisacrilammide (200:1) | 12% |
| Tris pH 9.3 | 750 mM |
| Glicerolo | 10% |
| SDS | 0,1% |
| Ammonio persolfato | 0,03% |
| TEMED | 0,15% |

Tabella 7 Composizione finale *resolving* gel.

| | |
|-----------------------------------|--------|
| Acrilammide:Bisacrilammide (20:1) | 3% |
| Tris pH 6.7 | 125 mM |
| Glicerolo | 10% |
| SDS | 0,1% |
| Ammonio persolfato | 0,03% |
| TEMED | 0,15% |

Tabella 8 Composizione finale *stacking* gel.

4.2.1 Colorazione dei gel

4.2.1.1 Colorazione all'argento o *Silver Staining*

Dopo la corsa elettroforetica i gel vengono disassemblati dai vetri di supporto, si elimina lo *stacking*, e si procede con la colorazione con Bio-Rad *Silver Staining* plus per evidenziare le proteine nel gel. Il principio di colorazione si basa sull'interazione tra argento e gruppi -SH delle proteine. La colorazione con *silver* è una tecnica molto potente e sensibile per visualizzare con precisione anche bassissime quantità di proteina all'interno di un gel (fino a 1 ng circa di proteina per banda), che si basa sulla precipitazione di sali d'argento in ambiente basico. Il nitrato di argento (vedi componenti elencati in tabella 8) si lega alle proteine e il sodio carbonato basifica l'ambiente e permette la riduzione da parte della formaldeide dell'argento legato alle proteine. Lo ione argento viene così selettivamente ridotto in forma metallica ed il prodotto insolubile rimane saldamente ancorato alle proteine. Il procedimento è analogo a quello dello sviluppo fotografico.

Dapprima è necessario porre il gel in una soluzione fissativa (metanolo 50%, acido acetico 10%, glicerolo 5%, acqua 35%) e lasciarlo in lenta agitazione per almeno un'ora, trascorsa la quale si procede con almeno tre lavaggi in acqua deionizzata di circa 10 minuti l'uno. Al termine dei lavaggi si immerge il gel nella soluzione di colorazione. La soluzione, preparata fresca, è composta dalla miscela di due soluzioni di partenza le cui composizioni sono riportate nella Tabella 9.

| SOLUZIONE A | | | SOLUZIONE B | |
|-------------|-----------------------|------|-------------------|----|
| Soluzione 1 | Nitrato d'argento | 2% | NaCO ₃ | 5% |
| | Nitrato d'ammonio | 2% | | |
| Soluzione 2 | Acido tungstosilicico | 10% | | |
| Soluzione 3 | Formaldeide | 2,8% | | |

Tabella 9 Composizione delle soluzioni di partenza per il *silver staining*.

Di ognuna delle due soluzioni se ne preparano 100 ml portando a volume con acqua deionizzata; si miscelano le due soluzioni al momento e vi si immerge il gel fino alla comparsa delle bande dell'intensità desiderata. Per bloccare la colorazione si toglie la soluzione di colorazione e si versa una soluzione di acido acetico al 5% (Fig. 20).

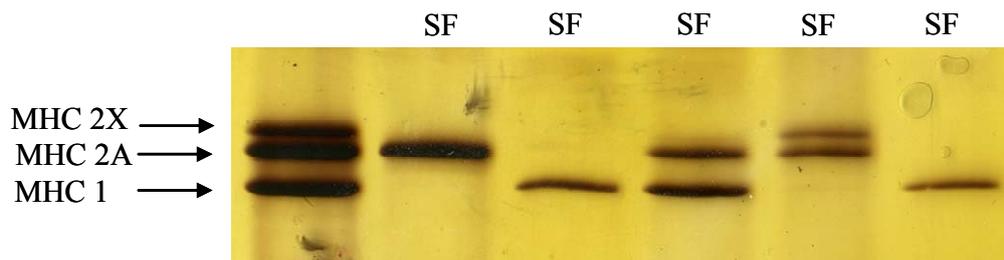


Fig. 20 Gel di poliacrilammide e colorazione con silver stain. Pattern di migrazione delle catene pesanti della miosina (MHC). Da sinistra: campione multi-fibra (MHC 1, 2A, 2X), e singole fibre o SF (MHC 2A; 1; 1 2A; 2A 2X; 1).

4.2.1.2 Colorazione con *Coomassie Blu*

La colorazione con il *Coomassie Blue* di solito viene scelta quando (ha una sensibilità 100 volte minore rispetto al silver) i campioni sottoposti ad elettroforesi sono campioni muscolari pluricellulari o multi-fibra e non singole fibre, in quanto questa colorazione, rispetto al *Silver Stain* è meno sensibile. Il Comassie blu si lega alle proteine attraverso legami ionici tra i gruppi sulfonici del colorante e i gruppi amminici delle proteine oltre che attraverso forze di van der Waals.

Il gel pertanto viene immerso nella soluzione Comassie Blue (Comassie Blue 0,05%, Metanolo 50%, Acido acetico 10%). Dopo almeno un'ora è possibile porre il gel nella soluzione *Destain* (Metanolo 40% e Acido acetico 7%) per procedere alla fase di decolorazione ed evidenziare così le posizioni che hanno assunto le differenti isoforme della catena pesante della miosina durante la separazione avvenuta per mezzo della corsa elettroforetica (Fig. 21).

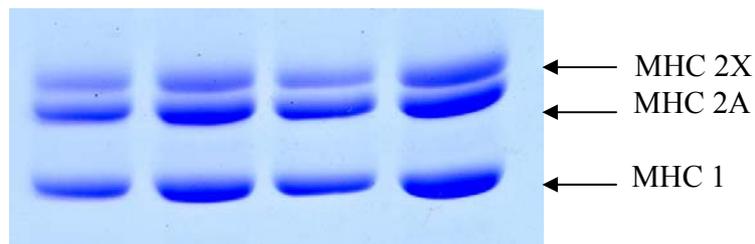


Fig. 21 Gel di poliacrilammide e colorazione con Comassie Blu; separazione delle isoforme MHC di campioni multi-fibra di muscolo.

4.2.1.3 Conservazione dei gel

Per essere conservati, i gel vengono disposti su di un supporto rigido fra due fogli di Gel Dryer Cellophane e fatti seccare. Una volta asciutti si può procedere con l'acquisizione delle immagini e le loro analisi (Fig. 22).

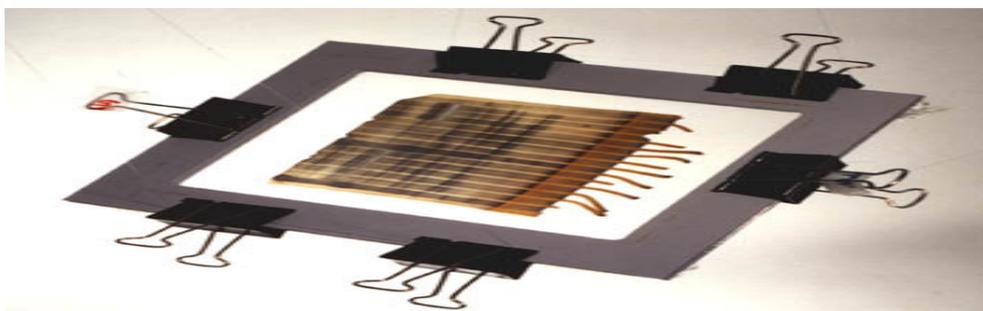


Fig. 22 Supporto per la conservazione dei gel.

4.2.1.4 Analisi densitometrica dei gel

I gel vengono quindi digitalizzati utilizzando lo scanner (EPSON PERFECTION V350 PHOTO) con una risoluzione di 360 dpi. Le varie bande vengono quantificate con il programma Adobe Photoshop e viene definito un valore BAP (*Brightness Area Product*) dato dal prodotto della luminosità per l'area della banda stessa.

Ogni campione viene analizzato in due corse elettroforetiche differenti e si tabulano i valori di BAP per le varie isoforme della catena pesante della miosina. Da questi dati, per ogni muscolo di ciascun soggetto, si ricava la percentuale di ciascuna isoforma sul totale delle MHC presenti.

4.3 Western Blot

4.3.1 Elettroforesi

Le tecniche di “*blotting*” delle proteine implicano il trasferimento delle bande proteiche dal gel di poliacrilammide su un mezzo più stabile e immobilizzante, quale risulta essere la membrana di nitrocellulosa, che è in grado di legare le proteine e di lasciare esposti i loro siti antigenici. Una volta avvenuto il trasferimento sulla membrana si possono condurre una serie di procedure che sarebbero molto difficili o addirittura impossibili sul gel. Tali procedure includono l'identificazione delle proteine con l'utilizzo di anticorpi o di colorazioni specifiche. Le proteine vengono trasferite dal gel alla membrana di nitrocellulosa con il metodo dell'elettroblotting (*Semi-Dry system*, BIO RAD), descritto per la prima volta da Towbin e Gordon (*Towbin and Gordon, 1984*), con il quale le proteine passano dal gel alla membrana attraverso elettroforesi, utilizzando un gel di poliacrilammide all'8% nel caso di identificazione delle isoforme MHC, e al 12 % nel caso si debbano identificare proteine con peso molecolare minore come l'actina, le isoforme delle catene leggere della miosina (MLC) etc..

4.3.2 Trasferimento su nitrocellulosa

Al termine della separazione elettroforetica delle proteine, viene tolto lo stacking gel e le proteine vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa (*Nitrocellulose Hybond ECL-Amersham code: RPN3103H*) utilizzando tre tamponi di trasferimento: Soluzione Anodo 1 (Tris 0,3M pH 10.4, Metanolo), Soluzione Anodo 2 (Tris 25mM pH 10.4, Metanolo), Soluzione Catodo (*6-amino-n-hexanoic acid*, Tris 25mm pH 10.4, Metanolo); i parametri utilizzati per il trasferimento sono i seguenti: 110 mA, 23 V, 1 W (0.65 mA/cm²). Il gel viene posto nell'apparato di trasferimento (Fig. 23) formato da una piastra elettrica orizzontalmente posta che funge da anodo, e si passa così alla preparazione del *sandwich*: si posiziona la membrana a stretto contatto con il gel sul lato verso l'elettrodo positivo, entrambi tra strati di carta da filtro della dimensione del gel (*Whatman Filter*) precedentemente immersi nelle tre soluzioni di trasferimento; nello specifico, l'ordine di assemblaggio è il seguente: si dispongono sul supporto per il trasferimento 9 fogli di carta da filtro immersi poco prima nella soluzione Anodo 1, su questi altri 6 imbevuti della soluzione Anodo 2, quindi la nitrocellulosa, che è stata bagnata in acqua MILLIQ e poi fatta equilibrare immergendola nella soluzione Anodo 2 prima di posizionarla sul gel. Infine sul gel si dispongono gli ultimi 12 fogli di carta da filtro immersi nella soluzione Catodo. Prima di connettere l'apparato si fa scorrere una pipetta di vetro sul *sandwich* per rimuovere eventuali bolle ed assicurarsi un passaggio di corrente omogeneo. (Fig. 23). Si chiude poi l'apparecchiatura con la piastra che funge da catodo ed il coperchio. Si collega il tutto ad un alimentatore EPS 601® (*Amersham Pharmacia Biotech*). Viene applicato poi un campo elettrico in modo che le proteine possano migrare fuori dal gel verso l'elettrodo positivo legandosi alla membrana di nitrocellulosa. I parametri di corsa utilizzati sono i seguenti: 23 V costanti (di poco inferiore a 25 V: è il massimo potenziale elettrico supportato dal Trans-Blot®) e 96 mA costanti per un totale di 7 ore di trasferimento.



Fig. 23 Apparato per Western blot: trasferimento delle proteine dal gel di poliacrilammide alla nitrocellulosa e assemblaggio del sandwich.

Al termine del trasferimento si disassembla il *sandwich*. Si separano e conservano il gel elettroforetico e la nitrocellulosa. Il gel viene immerso nella soluzione fissativa (Metanolo 50%; Acido Acetico 10%; Glicerolo 5%) per un eventuale colorazione con il *silver* per valutare la bontà del trasferimento (colorazione descritta precedentemente). La nitrocellulosa, invece, viene lavata velocemente in acqua e poi messa su una vaschetta e colorata. Per verificare l'avvenuto trasferimento, la membrana viene infatti colorata con il *red ponceau* (*Ponceau S*: SIGMA 0,1% peso/volume; Acido Acetico 5%) per 10 min, quindi si decolora in TBS (tris 0,02M, NaCl 0,05M, pH 7.4-7.6).

Il filtro di nitrocellulosa viene poi immerso per circa 1 ora nella *blocking solution* [5% BSA (albumina di siero bovino) in TTBS (0,1% Tween 20 inTBS)] per bloccare i siti di riconoscimento aspecifico per l'anticorpo e, dopo aver effettuato 3 lavaggi da 15 minuti ciascuno con il tampone di lavaggio TTBS, viene incubato a circa 30°C per circa 1 ora con l'anticorpo primario, che riconosce e lega in modo specifico solo la proteina di interesse, (ad esempio, *Monoclonal Anti-Skeletal Myosin fast* diluito 1:1000, Sigma; *Monoclonal Anti-Skeletal Myosin slow* diluito 1:4000, Sigma; *Polyclonal Anti-Actin* diluito 1:1000, Santa Cruz Biotechnology; *Polyclonal MLC (FL-172)* diluito 1:500 Santa Cruz Biotechnology) diluito in *blocking solution*.

Terminata l'incubazione vengono effettuati 3 lavaggi di 15 min ciascuno con il tampone di lavaggio (TTBS). Quindi si procede incubando con l'anticorpo secondario, per 1 ora (*Goat anti mouse IgG peroxidase conjugate*, Sigma; *anti-rabbit IgG peroxidase conjugate*, Sigma

diluizione usata 1:80000) e dopo ancora 3 lavaggi si procede alla rilevazione del segnale utilizzando l'ECL detection kit (*ECL Western blotting detection reagents and analysis system: Amersham*). Le varie fasi dell'intera metodica sono schematizzate nella Fig 24.

4.3.3 Sviluppo

L'anticorpo secondario è legato ad un enzima, la perossidasi di rafano (*HRP: horseradish peroxidase*) che permette di evidenziare la presenza della banda di interesse mediante una reazione chemiluminescente visualizzata attraverso lo sviluppo su lastra radiografica. Questo enzima permette, nello specifico, la conversione di un substrato solubile in uno non solubile in stretta prossimità della proteina da rilevare. Nel nostro caso praticamente il complesso enzimatico della perossidasi catalizza la conversione del substrato ECL (*Enhanced Chemi Luminescence*) creando un reagente che emette luce. Questa chemiluminescenza impressiona poi una lastra fotografica permettendo di rilevare la presenza della proteina riconosciuta dall'anticorpo primario e messa in evidenza dall'anticorpo secondario.

La fase di sviluppo fotografico viene condotta in camera oscura. Si preparano 10 ml di ECL miscelando 5 ml del reagente A e 5 ml di reagente B del kit commerciale (*ECL Western blotting detection reagents and analysis system: Amersham*). Si versa l'ECL sopra la membrana di nitrocellulosa posizionata in una vaschetta vuota in modo da bagnare la parte dove sono state trasferite le proteine. Si lascia incubare per 1 minuto a temperatura ambiente. Si dispone quindi la nitrocellulosa sgocciolata tra due fogli di carta da lucido semitrasparente all'interno di una cassetta di sviluppo (*Hypercassette™: Amersham code: RPN1643*). Sopra la nitrocellulosa si pone quindi una lastra fotografica (*Hyperfilm™ ECL: Amersham code: RPN3103H*) Di solito si parte con un tempo di esposizione di almeno 30 secondi, per poi aumentare se si ritiene necessario. Una volta tolta la lastra fotografica dalla cassetta, va immersa in un contenitore con la soluzione di sviluppo (20% della soluzione commerciale *GBX Developer and replenisher: Kodak*) fino a raggiungere il contrasto desiderato quindi si trasferisce in soluzione di fissaggio (20% della soluzione commerciale *GBX Fixer e replenisher: Kodak*) per almeno 5 minuti.

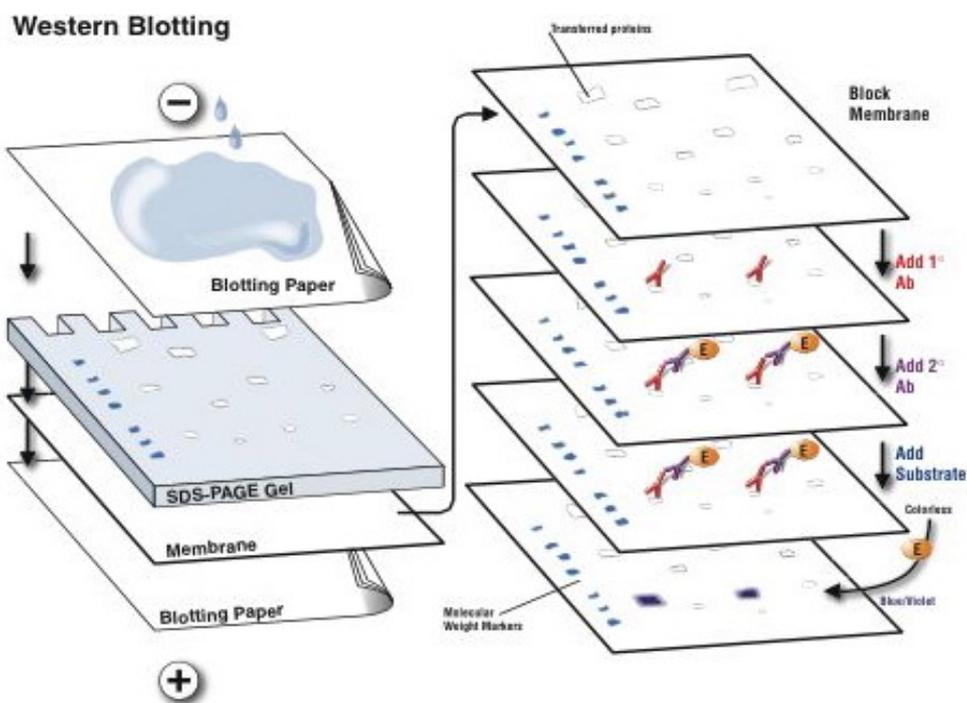


Fig. 24 Schema delle varie fasi della metodica del Western blot: trasferimento delle proteine su nitrocellulosa e rilevazione con anticorpi.

4.4 Immunocitochimica

E' una tecnica che utilizza anticorpi marcati (cioè contenenti marcatori, che sono materiali facilmente rilevabili, ad esempio coloranti, fluorescenti, ecc.) come specifici reagenti per localizzare alcuni costituenti (antigeni) all'interno dei tessuti.

L'immunofluorescenza, nello specifico, utilizza anticorpi coniugati a traccianti fluorescenti che si legano a strutture cellulari in modo altamente specifico, consentendo la valutazione qualitativa e quantitativa delle strutture bersaglio. L'immunofluorescenza genera immagini per emissione di luce permettendo così la localizzazione di antigeni in compartimenti subcellulari. Tale metodica richiede l'utilizzo di fluorocromi, di anticorpi specifici e di particolari metodiche di fissazione e permeabilizzazione cellulare, nonché microscopi particolari. I fluorocromi sono molecole che, colpite da radiazioni di una determinata energia, ne assorbono una parte e restituiscono una radiazione di energia inferiore e quindi di lunghezza d'onda superiore. Tra i problemi legati all'utilizzo di fluorocromi c'è la tendenza a decadere

progressivamente d'intensità nel corso dell'osservazione. Il decadimento o *bleaching* è legato a cause diverse tra le quali la progressiva ossidazione delle molecole di fluorocromo e il rilascio di radicali liberi dovuti all'energia eccitante. Ogni fluorocromo inoltre ha un suo tempo di decadimento e possiede una particolare intensità di emissione luminosa.

E' stata utilizzata questa tecnica per studiare singole fibre muscolari isolate, come descritto precedentemente nel paragrafo Campionamento muscolare, dai nostri frammenti di biopsie muscolari umane. In particolare, l'obiettivo è stato la visualizzazione dei nuclei.

Le singole fibre sono disposte su piastre da 24 pozzetti in ciascuno dei quali è stata precedentemente preparata una base di silicone in modo da poter fissare le fibre con aghi da entomologia. Si effettua un primo lavaggio con PBS (NaCl 0,138 M; KCl 0,201 M; Na₂HPO₄ 2,13 M; KH₂PO₄ 0,0015 M) a temperatura ambiente versandolo lentamente per non far staccare le fibre che vengono fissate con paraformaldeide al 4% (Sigma) per 20 min a temperatura ambiente. Successivamente dopo 2 lavaggi con PBS a temperatura ambiente da 5 min ciascuno le fibre vengono permeabilizzate per 20 min a 4°C utilizzando PBS con l'aggiunta di Triton X-100 (Sigma). Si procede poi con 2 lavaggi da 15 min con PBS e successivamente le fibre vengono incubate con una soluzione di PBS e 1% siero per bloccare i siti specifici per circa 30 min.

A questo punto le fibre muscolari vengono incubate overnight a 4°C in una cameretta umida con l'anticorpo primario anti α -actinina (1:2000; Sigma) in PBS e 1%BSA.

Terminata l'incubazione con l'anticorpo primario si procede effettuando 3 lavaggi da 15 min con PBS. Segue l'incubazione a temperatura ambiente al buio per 2 ore con l'anticorpo secondario Alexa 568 goat anti mouse (1:200; Molecular Probes), diluito in PBS e 1% BSA.

Le fibre vengono poi sottoposte a 2 primi lavaggi da 15 min con soluzione di bloccaggio al buio e a temperatura ambiente. Per marcare i nuclei, le fibre sono state incubate con Hoestch (25 μ g/ml; SIGMA) diluito in PBS, per 10 minuti al buio. Si effettuano quindi un paio di lavaggi sempre da 15 min ciascuno con PBS sempre al buio ed a temperatura ambiente. A questo punto bisogna trasferire le fibre, poste ancora sulla piastra da 24 pozzetti, sul vetrino porta oggetti polilisinati e mantenere il più possibile lontano dalla luce.

Per quanto riguarda la preparazione dei vetrini portaoggetti occorre passare velocemente il vetrino in acqua MILLIQ, lo si asciuga su carta assorbente e si mettono 13 μ l di MOW (moviol) su vetrino portaoggetti polilisinato, il vetrino va poi appoggiato al rovescio sulla

goccia e lo si lascia ad asciugare al buio tutta la notte. Le immagini sono state visualizzate mediante microscopia video-confocale (ViCo) ed analizzate utilizzando il programma Nikon intensi-light per la valutazione del *nuclear domain*. Il *nuclear domain* viene definito come il volume teorico del citoplasma associato ad un singolo nucleo. Questo perché ciascuna fibra muscolare può contenere centinaia di nuclei, ciascuno dei quali regola i prodotti genici di un finito volume all'interno della fibra muscolare.

Al fine di valutare il *nuclear domain*, e di conseguenza la variazione del numero di nuclei associati ad un dato volume della fibra, è stato misurato il volume della fibra grazie alla marcatura con actinina tramite il programma del ViCo e su questo volume sono stati contati tutti i nuclei marcati con il colorante Hoestch.

4.4.1 Analisi con microscopia Video-Confocale (ViCo)

La microscopia video-confocale (ViCo) offre, senza l'uso di sorgenti laser, analisi ad alta risoluzione. Si ottengono informazioni su una zona del campione a fuoco senza il disturbo dei fluorofori fuori fuoco grazie all'illuminazione multi puntuale, ottenuta per mezzo di una griglia multifori (*pinholes*) posta tra la sorgente ed il campione.

Il microscopio ViCo è costituito da un microscopio ad epifluorescenza (Eclips i-Series 80i: Nikon) nel quale, nel piano focale intermedio lungo il cammino ottico di illuminazione, è stato inserito un dispositivo (griglia) per la modulazione spaziale del fascio. Per mezzo di questa griglia si può realizzare l'illuminazione a campo-ristretto (multipuntuale) del campione. Un sensore di immagini (CCD) permette, poi, di raccogliere la successione di immagini uv lungo l'asse w (Fig. 25).

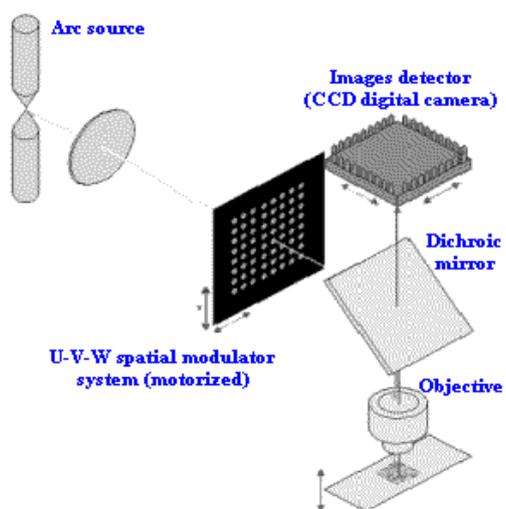


Fig. 25 Schema del principio di funzionamento della microscopia ViCo.

RISULTATI

1. La forza di contrazione delle fibre muscolari umane

1.1 Valori di Tensione, Forza e CSA

Come descritto nei Materiali e Metodi, singole fibre muscolari umane sono state dissezionate manualmente a partire da biopsie muscolari e trasferite sul set-up sperimentale per l'analisi dei parametri contrattili. La forza sviluppata è stata misurata in condizioni isometriche durante l'attivazione massimale quando la fibra era immersa nella soluzione di attivazione come descritto in dettaglio nel capitolo Materiali e Metodi.

Prima dell'attivazione massimale, quando la fibra era appena montata sul set-up, grazie ad una telecamera si acquisiva anche una foto che veniva poi analizzata mediante il programma Image J, con la procedura descritta nel capitolo Materiali e Metodi, per determinare con più precisione il diametro della singola fibra. Dalla misura del diametro si otteneva poi il valore di CSA (cross sectional area) espresso in mm^2 . Dal rapporto fra forza di contrazione e CSA veniva infine calcolata la tensione.

Sono stati dunque valutati i valori di CSA, di tensione e di forza sviluppati dalle singole fibre prelevate:

- da biopsie muscolari provenienti dal vasto laterale dei soggetti di diversa età che sono stato oggetto della prima fase dello studio volto ad individuare le risposte muscolari ad eventuali cambiamenti indotti dall'invecchiamento e divisi in tre gruppi sulla base della fascia d'età: *young group*, *middle group* ed *elderly group*.
- da biopsie prelevate dal muscolo gran dorsale di soggetti sottoposti a *resistance training* per la muscolatura della spalla caratterizzanti la seconda fase del lavoro avente come scopo l'individuazione di alterazioni di plasticità muscolare indotte da esercizio fisico.

- da biopsie di muscolo vasto laterale di un gruppo di alpinisti prima e dopo un periodo di attività in alta quota e che, pertanto, hanno caratterizzato la terza fase di studio sulla plasticità muscolare.

1.2 Valori di Forza, Tensione e CSA in soggetti divisi in tre fasce di età

1.2.1 Tensione e CSA totali

I risultati ottenuti hanno mostrato un aumento dei valori di tensione nel gruppo di età intermedia (*middle age*) sia rispetto al gruppo *young-adult* che al gruppo *elderly*; l'aumento della tensione del gruppo intermedio risulta essere statisticamente significativo rispetto al valore della tensione del gruppo *young-adult*. (Fig. 26).

Nella Fig. 27 sono riportati i confronti dei valori medi dell'area della sezione trasversa misurati nei tre gruppi, dai quali si nota una riduzione statisticamente significativa di questo parametro in relazione all'età; la CSA è notevolmente ridotta nel gruppo di soggetti con età intermedia (*middle age*) e nel gruppo degli anziani (*elderly*). Poiché il valore di tensione isometrica risulta minore nei soggetti giovani rispetto ai soggetti di età intermedia, mostrando quindi un andamento opposto a quello visto per i valori di CSA, abbiamo valutato anche il parametro Forza (Fo) non normalizzata sulla CSA da cui risulta (Fig. 28) in realtà che il gruppo *young-adult* ha valori di forza significativamente maggiori rispetto agli altri due gruppi, mostrando un andamento analogo a quanto visto per la *cross sectional area*. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test one way Anova seguito dal test Dunnett's Multiple Comparison ($P < 0,05$).

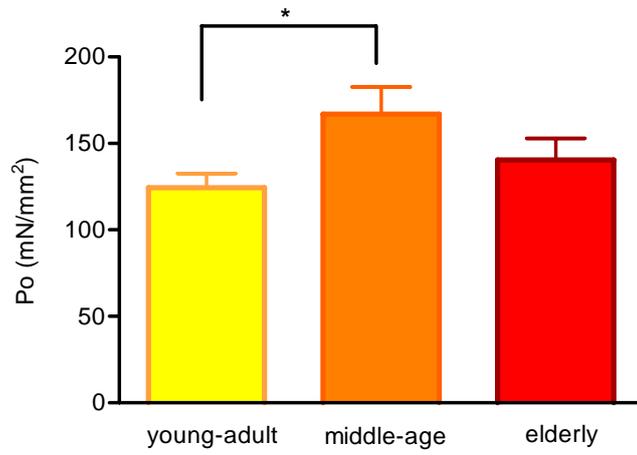


Fig. 26 Variazioni di tensione isometrica (P_o) in fibre muscolari di soggetti divisi in base all'età: young-adult (20-55 anni), middle age (56-70 anni), elderly (>70 anni).

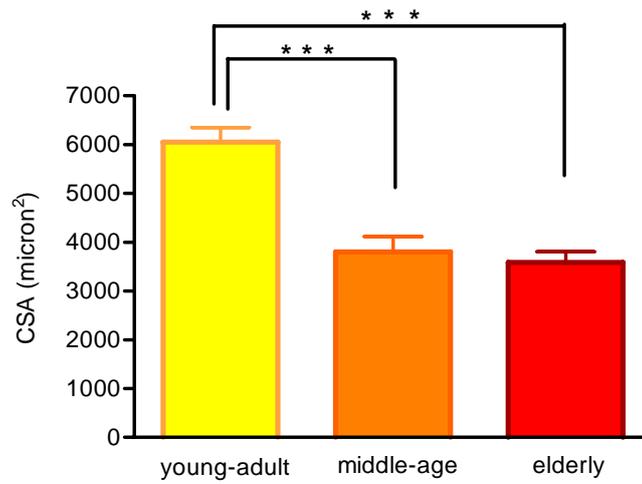


Fig. 27 Variazioni della cross sectional area (CSA) in fibre muscolari di soggetti divisi in base all'età: young-adult (20-55 anni), middle-age (56-70 anni), elderly (>70 anni).

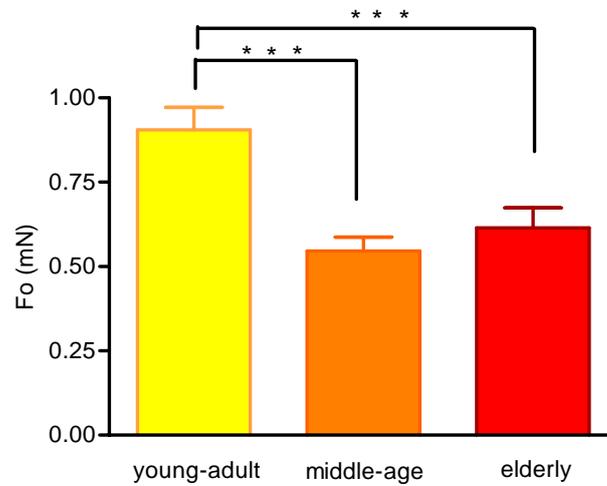


Fig. 28 Variazioni di forza assoluta (F_o) in fibre muscolari di soggetti divisi in base all'età: young-adult (20-55 anni), middle-age (56-70 anni), elderly (>70 anni).

1.2.2 Tensione e CSA per tipi di fibre

Considerando, per ciascuno dei tre gruppi di soggetti, i parametri meccanici di tensione sviluppata e di CSA in base ai diversi tipi di miofibre classificati secondo il contenuto in isoforme della miosina (MHC 1, MHC 2A, MHC 2A 2X, MHC 2X) determinato mediante analisi elettroforetica, non abbiamo riscontrato, per nessun tipo di fibre muscolari, variazioni significative nei valori di tensione nel confronto tra i diversi gruppi presi in esame, ad eccezione delle fibre slow, che inaspettatamente mostrano valori di tensione più alti nel gruppo con età intermedia rispetto al gruppo dei giovani. Fibre di tipo 2X sono state identificate solo nel gruppo dei soggetti giovani (Fig. 29).

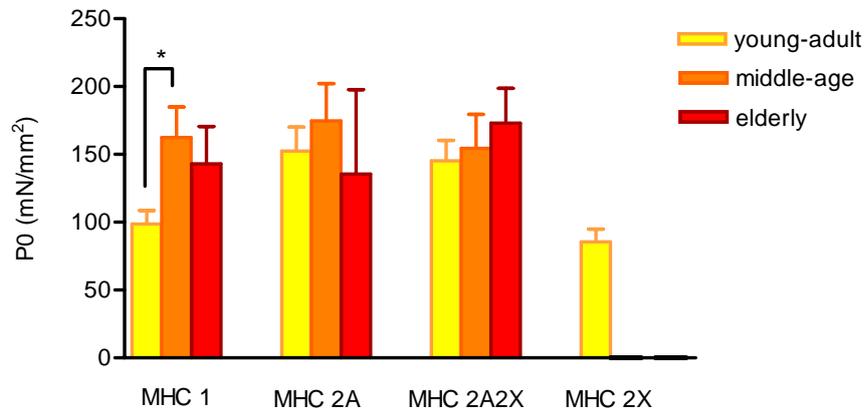


Fig 29 Variazioni di tensione isometrica (P_0) per tipo di fibre in base all'età: young-adult (20-55 anni), middle-age (56-70 anni), elderly (>70 anni).

Per quanto riguarda i valori della *cross sectional area* (CSA) si evidenzia (Fig. 30), col progredire dell'età, una riduzione generalizzata della CSA per i vari tipi di fibre che diventa statisticamente significativa tra gruppo *middle-age* ed *elderly* rispetto al gruppo *young-adult* sia per le fibre contenenti MHC 1, che per le fibre esprimenti MHC 2A; mentre risulta statisticamente significativo la riduzione di CSA nel gruppo *elderly* rispetto al gruppo *young-adult* per le fibre di tipo 2A 2X. Un comportamento età-dipendente, simile a quello mostrato dalla *cross sectional area*, si ottiene per i valori di forza che mostra una riduzione in tutti i tipi di fibre considerate, riduzione significativa per le fibre *slow* nel confronto tra gruppo *young-adult* e *middle-age*, e per le fibre 2A tra gruppo *young-adult* ed *elderly* (Fig. 31). L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test one way Anova seguito dal test Dunnett's Multiple Comparison ($P < 0,05$).

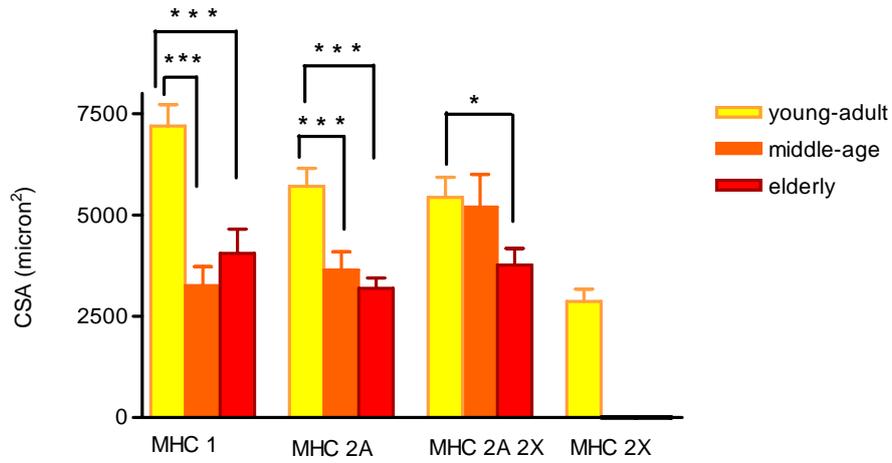


Fig. 30 Variazioni di cross sectional area (CSA) per tipo di fibre in base all'età: young-adult (20-55 anni), middle-age (56-70 anni), elderly (>70 anni).

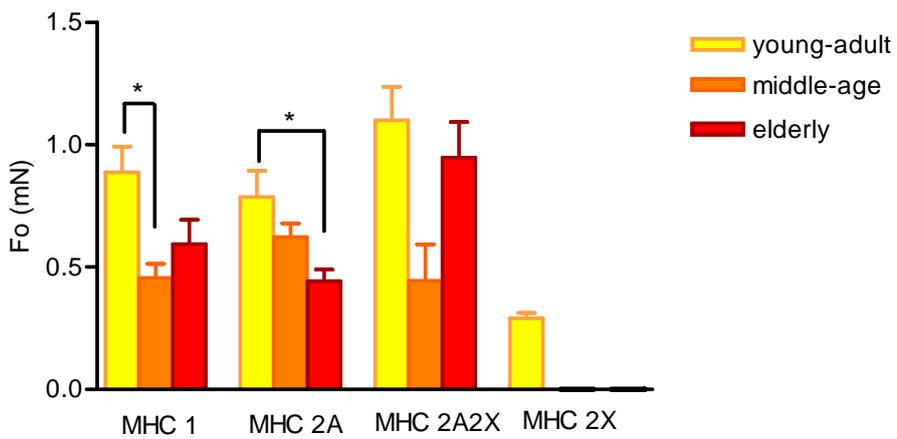


Fig. 31 Variazioni forza per tipo di fibre in base all'età: young-adult (20-55 anni), middle-age (56-70 anni), elderly (>70 anni).

1.3 Valori di Forza, Tensione e CSA nelle fibre di soggetti sottoposti a *resistance training*

1.3.1 Tensione e CSA: variazioni complessive

Per gli studi di meccanica sono state utilizzate le biopsie di 9 dei 18 soggetti sottoposti a *resistance training*, prelevate ovviamente sia prima che dopo le 8 settimane di allenamento. Nello specifico i valori di meccanica derivano dai seguenti soggetti: S1, S3, S4, S5, S6, S9, S14, S15, S18. Il confronto generale tra tutti i valori di tensione isometrica prima e dopo l'allenamento, di tutti i soggetti e le rispettive fibre analizzate, mostra un lieve aumento di tensione dopo esercizio fisico, ma le differenze di valori non sono significative (Fig 32). Risulta significativo ($P=0,012$), per contro, l'incremento dopo *resistance training* dei valori di CSA, indice dunque di un effetto ipertrofico (Fig. 33).

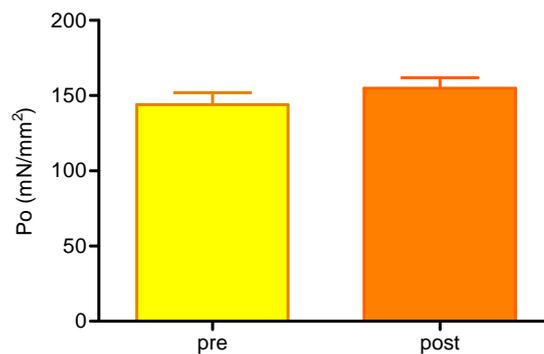


Fig. 32 Variazioni di tensione isometrica (P_o) su tutte le fibre dei soggetti sottoposti a *resistance training*

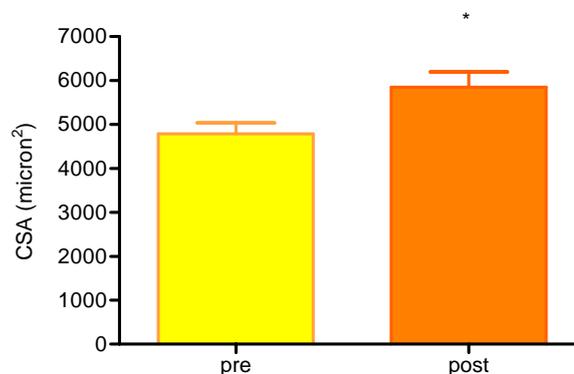


Fig. 33 Variazioni di cross sectional area (CSA) su tutte le fibre dei soggetti sottoposti a *resistance training*

1.3.2 Tensione e CSA per tipo di fibre

Nel caso dei soggetti sottoposti a *resistance training* sono stati presi in considerazione i seguenti tipi di fibre muscolari, classificati in base al contenuto di MHC 1, MHC 2A, MHC 2A2X. Come evidenziato dalla figura (Fig. 34) i valori di tensione aumentano dopo l'allenamento di forza sia nelle fibre slow (MHC 1) che nelle fibre miste contenenti MHC 2A2X. La tensione sviluppata dalle fibre intermedie (MHC 2A) al contrario si riduce. Tuttavia tali variazioni non sono risultate statisticamente significative.

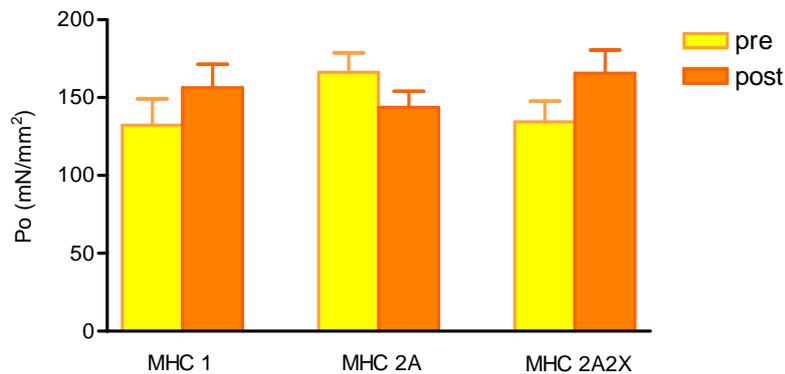


Fig. 34 Variazioni di tensione isometrica (Po) per tipo di fibre in soggetti sottoposti a *resistance training*

L'area della sezione trasversale (CSA) aumenta in tutti i tipi di fibre considerate, in seguito a *resistance training* (Fig. 35). Tuttavia, come per i valori di tensione, anche le variazioni relative alla CSA non sono risultate avere rilevanza statistica (t test di student, $P < 0,05$).

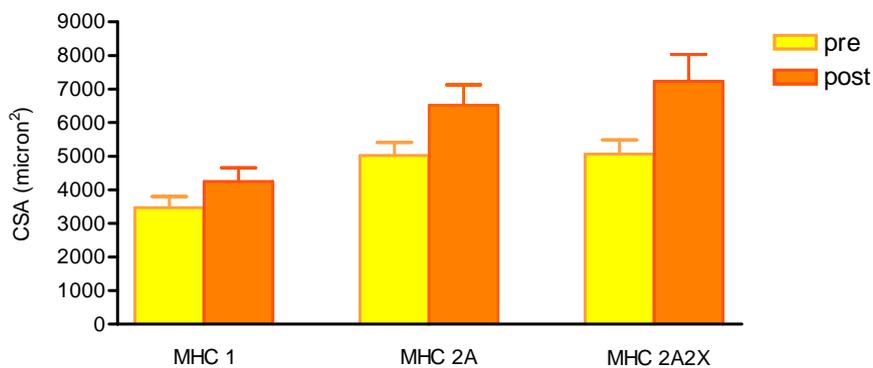


Fig. 35 Variazioni di cross sectional area (CSA) per tipo di fibre in soggetti sottoposti a *resistance training*

1.3.3 Tensione e CSA per soggetto

Sono state valutate le tensioni sviluppate da tutte le fibre analizzate per ciascun soggetto e, come mostra il grafico (Fig. 36) si evidenzia nel post-training un trend generale di aumento della tensione, non statisticamente significativo, in quasi tutti i soggetti presi in considerazione, ad eccezione dei soggetti S1, S5 ed S6.

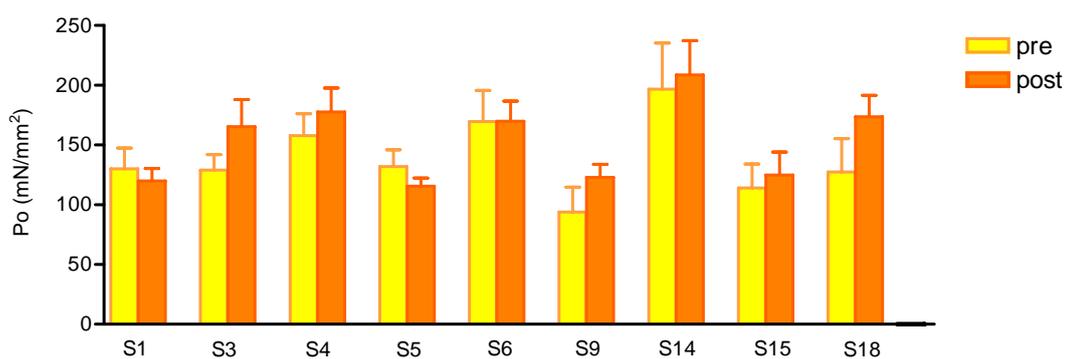


Fig. 36 Variazioni di tensione isometrica (P_o) in ciascun soggetto sottoposti a *resistance training*

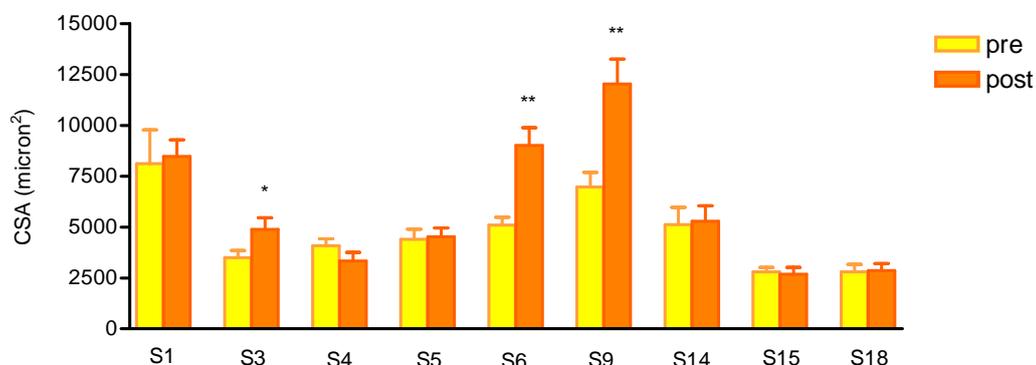


Fig. 37 Variazioni di cross sectional area (CSA) in ciascun soggetto sottoposto a *resistance training*

Analoga considerazione può esser fatta per i valori di CSA dove però per tre soggetti, nello specifico i soggetti S3, S6 ed S9, l'aumento della sezione trasversa dopo il *resistance training* è stato molto grande e statisticamente significativo (Fig. 37). Per l'analisi dei dati si è utilizzato un t test di student con $P < 0,05$.

1.3.4 Forza totale, per tipi di fibre e per soggetto

Misurando i parametri di CSA e di tensione isometrica (P_o), solo per il primo parametro abbiamo riscontrato un effetto ipertrofico, ovvero un notevole aumento dell'area della sezione trasversa nella condizione post-training (Fig. 33); al contrario, i valori di tensione isometrica risultano pressochè invariati (Fig. 32). Dal momento che il valore di tensione isometrica è dato dal rapporto tra il valore di forza sviluppato dalla singola fibra durante una contrazione isometrica e il suo valore di CSA (ottenendo in questo modo un valore di forza per unità di area, che ci consente di operare dei confronti tra fibre aventi diametro e dimensioni diverse) abbiamo considerato anche i parametri di forza (F_o), affiancandoli ai precedenti valori, in modo da valutare se effettivamente l'allenamento a cui i 18 volontari si sono sottoposti inducesse variazioni anche nelle proprietà contrattili oltre che a livello di massa muscolare.

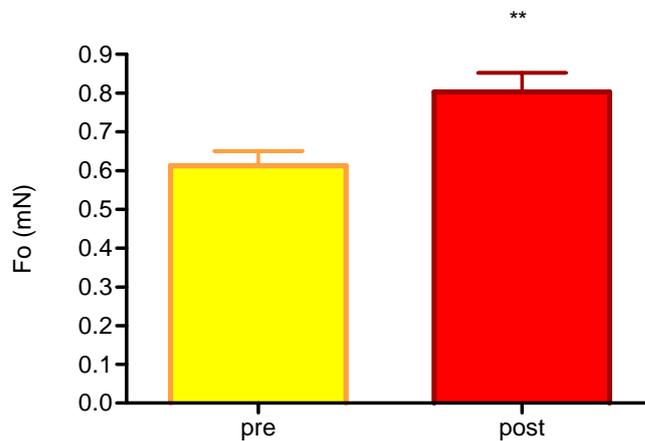


Fig. 38 Variazioni di forza totale in soggetti sottoposti a *resistance training*

Come riporta il grafico della Fig. 38, nei soggetti allenati il valore medio di tutte le singole fibre analizzate ha un incremento di forza molto significativo ($P=0,001$) rispetto al valore riscontrato prima che i soggetti fossero sottoposti all'allenamento. Pertanto in realtà si ha un aumento parallelo sia nella CSA (massa muscolare) che nella forza sviluppata. L'incremento di entrambi i parametri spiega il valore pressochè costante della tensione isometrica.

Considerando la classificazione in tipi di fibre, aumenti significativi di forza si sono riscontrati nelle fibre *slow* contenenti MHC 1 e nelle fibre miste contenenti MHC 2A e MHC2X (Fig. 39).

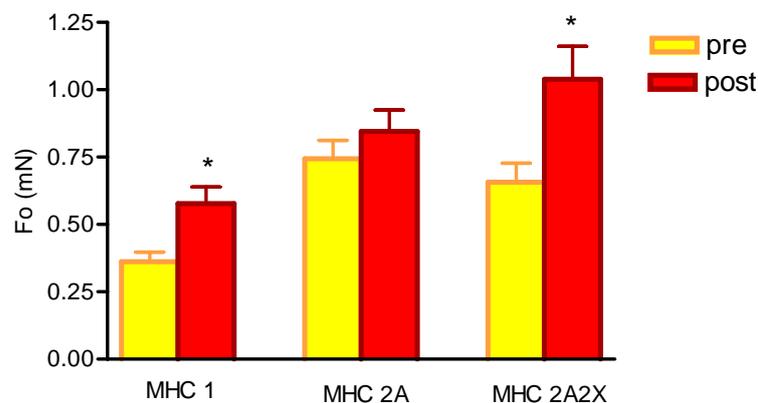


Fig. 39 Variazioni di forza per tipo di fibra in soggetti sottoposti a *resistance training*

Considerando i volontari singolarmente, e quindi il valore medio dei valori di forza di tutte le fibre di ogni soggetto si evidenzia un trend di aumento di forza, significativo per i soggetti S3, S6, S9 ed S18 (Fig 40); tale andamento è confrontabile con i valori di CSA di ciascun soggetto (Fig 37). La significatività è stata analizzata utilizzando il test t di student con $P < 0,05$.

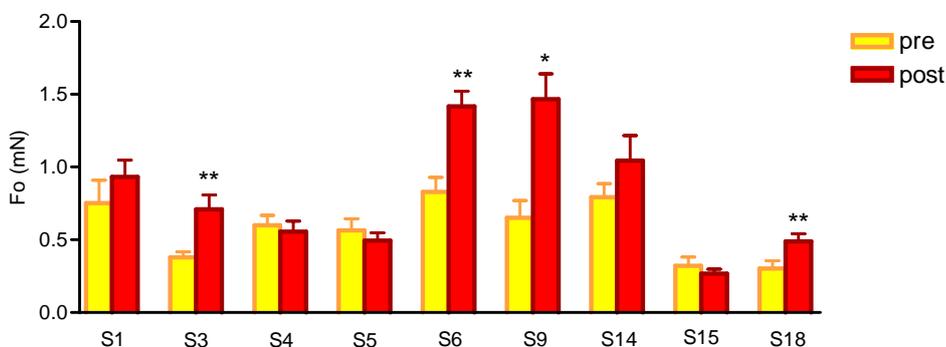


Fig. 40 Variazioni di forza in ciascun soggetto sottoposto a *resistance training*

1.3.5 Variazione dei parametri meccanici nei gruppi normoproteico ed iperproteico

Poiché i nostri 18 volontari erano divisi in due gruppi in base al tipo di dieta assegnata loro, nel corso delle 8 settimane di *resistance training* è stato valutato se l'assunzione di una maggiore quantità di proteine (nel gruppo iperproteico) potesse o meno avere un effetto aggiuntivo e potenziare la risposta del muscolo ad un allenamento di forza. Sono stati, a tal

scopo, analizzati i dati di meccanica ottenuti considerando quali soggetti avessero seguito una normale dieta equilibrata e quali invece la dieta con maggior apporto proteico. Ed è stato quindi operato tale confronto valutando i valori di tensione isometrica totale (P_o), di forza (F_o) e di *cross sectional area* (CSA), sia prima che dopo l'allenamento, per tutti i tipi di fibre (Fig. 41 e 42), e per classificazione dei tipi di fibre numericamente più significativi (MHC 1 e MHC 2A) (Fig. 43, 44, 45, 46). Considerando che sono stati utilizzati negli esperimenti di meccanica biopsie di 9 dei 18 volontari, come precedentemente descritto, i gruppi normoproteici (NP) e iperproteici (IP) erano così costituiti:

IP: S1, S4, S5, S9, S18

NP: S3, S6, S14, S15

Variazioni totali

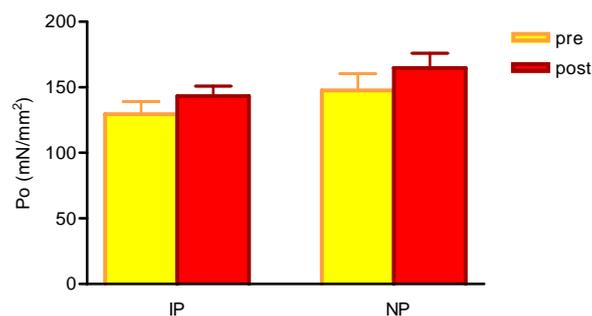


Fig 41 Variazioni di tensione isometrica (P_o) totale in fibre muscolari di soggetti sottoposti a *resistance training* suddivisi nei gruppi normoproteico (NP) ed iperproteico (IP)

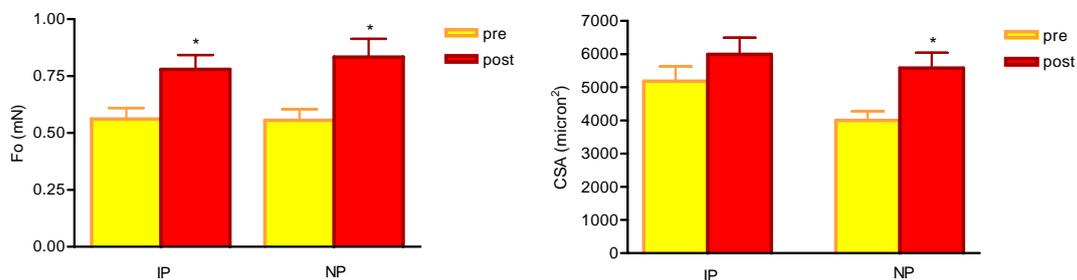


Fig. 42 Variazioni di forza (F_o) e cross sectional area (CSA) totali in fibre muscolari di soggetti sottoposti a *resistance training*, suddivisi nei gruppi normoproteico (NP) ed iperproteico (IP)

Dai grafici ottenuti non si evidenziano significative differenze di tensione isometrica (P_o) tra la condizione precedente e quella successiva all'allenamento, né nel gruppo dei normoproteici né in quello degli iperproteici. Il valore di tensione sviluppato dal gruppo IP è minore di quello sviluppato dal gruppo NP; tuttavia occorre tener presente che anche il valore di P_o da cui partono entrambi i gruppi prima dell'inizio del programma di *resistance training* (controlli) è diverso, il che può dipendere da varie ragioni, quali un differente background genetico, una diversa esperienza sportiva e via di seguito, che spiegherebbero l'esistenza di variabilità individuale (Fig 41).

Più marcati sono invece gli incrementi nei valori di forza (F_o) e di CSA in entrambi i gruppi, in particolar modo la forza è aumentata in modo significativo sia nel gruppo iperproteico ($P=0,0245$) che nel normoproteico ($P=0,0353$) dove i valori di forza di partenza in entrambi i gruppi sono paragonabili; per quanto riguarda la *cross sectional area* si evidenzia un incremento in tutti e due i gruppi ma significativo solo nei normoproteici. Anche in questo caso analoghe considerazioni si devono fare riguardo ai valori controllo dei due gruppi pre-allenamento, poichè, prima che i protocolli sperimentali avessero inizio, le singole fibre dei soggetti inglobati nel gruppo iperproteico mostravano già in partenza dimensioni di CSA maggiori delle fibre appartenenti ai soggetti del gruppo normoproteico (Fig. 42). La significatività è stata analizzata utilizzando un test t di student con $P<0,05$.

Variazioni di forza, tensione e CSA per tipi di fibre

Sono stati scomposti i valori totali per valutare le variazioni che l'allenamento da solo (gruppo NP) ed associato ad un maggior apporto proteico (gruppo IP) induceva su di un tipo di fibre specifico. Sono state considerate le fibre slow (MHC 1) e le intermedie (MHC 2A). Nel primo caso si osserva in entrambi i gruppi un aumento, non significativo, di tensione isometrica (P_o), con un valore più alto per i NP post rispetto agli IP post. Tuttavia la percentuale di incremento di P_o , dopo 8 settimane di dieta e *resistance training*, è maggiore per il gruppo IP (+25%) rispetto al gruppo NP (+10%) se si considera la diversa condizione di partenza che hanno le fibre slow dei due gruppi in termini di tensione isometrica. (Fig. 43)

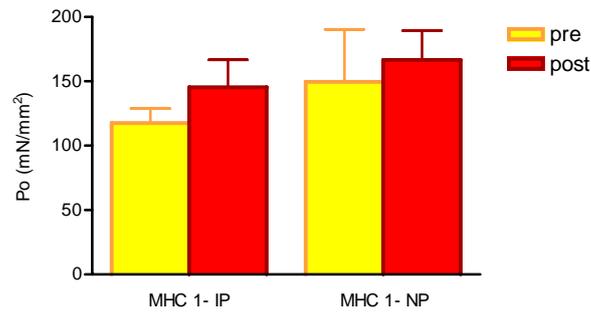


Fig 43 Variazioni di tensione isometrica (P_o) in fibre *slow* (MHC 1) di soggetti sottoposti a *resistance training* suddivisi nei gruppi normoproteico (NP) ed iperproteico (IP)

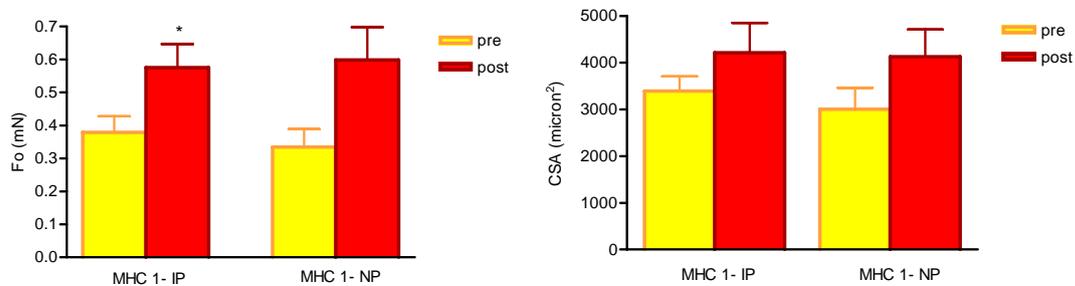


Fig. 44 Variazioni di forza e cross sectional area (CSA) in fibre *slow* (MHC 1) di soggetti sottoposti a *resistance training* suddivisi nei gruppi normoproteico (NP) ed iperproteico (IP).

Il valore di forza che raggiungono le fibre *slow* nei due gruppi dopo le 8 settimane di allenamento e dieta sono paragonabili, e significativo è l'aumento nel gruppo iperproteico rispetto alla condizione di partenza. Il gruppo IP parte con valori di CSA maggiori rispetto al gruppo NP, tuttavia alla fine dello studio si raggiungono per entrambi dimensioni simili delle fibre 1 (Fig. 44). Le variazioni di CSA non hanno mostrato significatività dopo aver effettuato il t test di student.

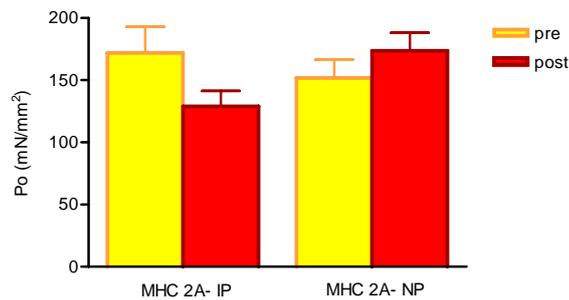


Fig. 45 Variazioni di tensione isometrica (Po) in fibre intermedie (MHC 2A) di soggetti sottoposti a *resistance training* suddivisi nei gruppi normoproteico (NP) ed iperproteico (IP)

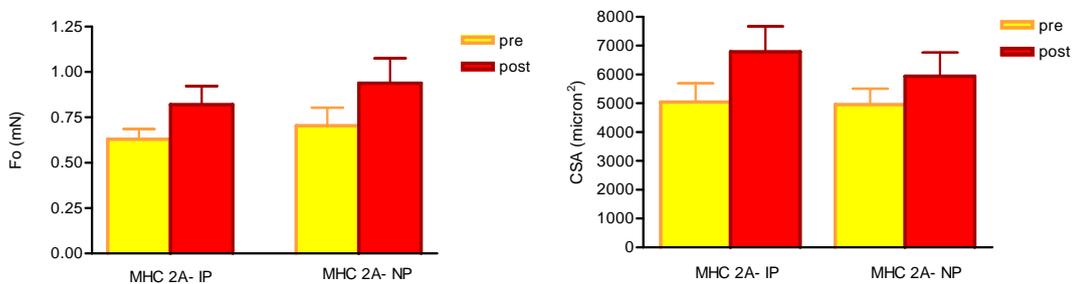


Fig. 46 Variazioni di forza e cross sectional area (CSA) in fibre intermedie (MHC 2A) di soggetti sottoposti a *resistance training* suddivisi nei gruppi normoproteico (NP) ed iperproteico (IP)

Per le fibre intermedie 2A sia i valori di tensione che di forza (Fo) e di CSA non sono cambiati significativamente. Tuttavia, mentre per il gruppo normoproteico (NP) c'è un generale trend di aumento nei tre parametri considerati, nel gruppo iperproteico (IP) invece le fibre 2A sviluppano, dopo 8 settimane, una tensione (Po) minore rispetto alla condizione di partenza, mentre i valori di Fo e di CSA risultano aumentati. Una possibile spiegazione a questo comportamento anomalo potrebbe essere dovuto al fatto che l'aumento delle dimensioni delle fibre, e quindi l'aumentata ipertrofia, sia di gran lunga maggiore dell'aumento della forza sviluppata dalle stesse fibre, e considerando che il valore di tensione isometrica (Po) è il risultato del rapporto Fo/CSA, avendo un valore al denominatore che supera abbondantemente quello del numeratore, ne consegue che il risultato, nel nostro caso il valore di tensione isometrica, risulti diminuito. L'effetto ipertrofico delle fibre che ne è derivato ha sovrastato l'aumento di forza delle stesse (Fig. 45 e 46).

1.3.6 Variazione dei parametri meccanici considerando i soggetti sottoposti a resistance training divisi in base al sesso

Le variazioni dei parametri meccanici indotte dal *resistance training* sono state valutate anche scomponendo i dati ottenuti in due gruppi divisi a seconda del sesso, per individuare differenze presenti già in partenza, prima dell'inizio del protocollo di allenamento, e seguire come e se l'allenamento potesse influenzare in modo diverso la performance muscolare di singole fibre in uomini e in donne. L'istogramma che riporta i valori di tensione isometrica (P_o) non mostra differenze significative tra i due gruppi, solo un lieve aumento nelle donne in seguito ad allenamento (Fig. 47); per quanto riguarda i valori di *cross sectional area* delle singole fibre si nota che le donne, le quali partono già da valori inferiori rispetto agli uomini, non mostrano un evidente effetto ipertrofico (Fig. 48); al contrario i valori di CSA aumentano in modo significativo negli uomini. Infine la forza aumenta significativamente in entrambi i gruppi, pur avendo gli uomini, in partenza, valori di forza maggiori delle donne (Fig. 47).

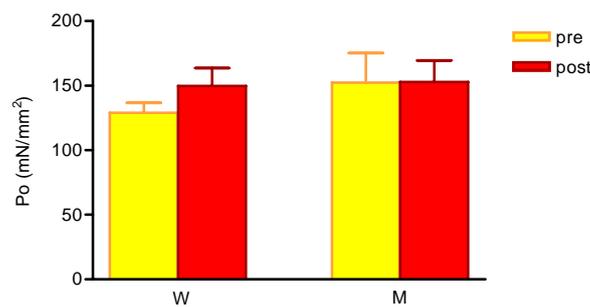


Fig. 47 Variazioni tensione isometrica (P_o) di soggetti sottoposti a *resistance training* suddivisi in base al sesso: M, uomini, W, donne.

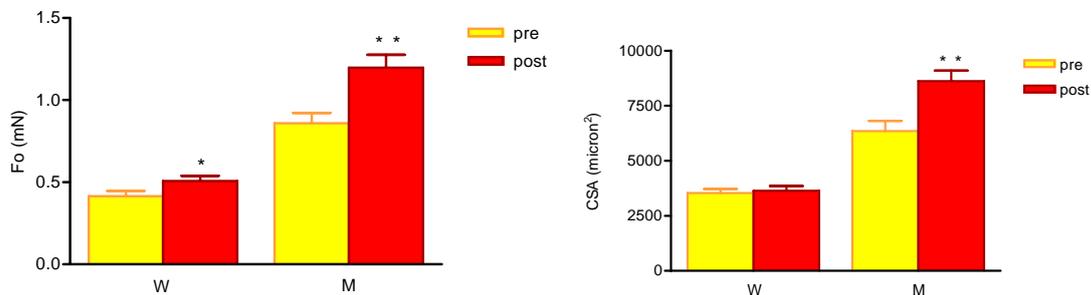


Fig. 48 Variazioni di forza e cross sectional area (CSA) di soggetti sottoposti a *resistance training* suddivisi in base al sesso: M, uomini, W, donne.

1.4 Valori di Tensione e CSA in un gruppo di alpinisti

1.4.1 Variazioni di Tensione e CSA su tutte le fibre

Nella terza fase di questo studio si è proceduto all'analisi di singole fibre muscolari e relative biopsie di un gruppo di soggetti che hanno trascorso un lungo periodo di attività in alta quota. Il confronto tra tutti i valori di tensione di questi soggetti prima e dopo la spedizione non mostra, analogamente alla situazione precedente riportata in Fig. 32, variazioni statisticamente significative nei valori di tensione tra le due situazioni pre-allenamento e post-allenamento, ma solo un leggero trend di aumento di tensione dei soggetti alla fine della spedizione (Fig. 49). Invece, i valori della *cross sectional area* aumentano significativamente dopo la spedizione in alta quota, rispetto alla condizione di partenza (Fig. 50). La significatività è stata analizzata utilizzando un test t di student con $P < 0,05$. Il significativo aumento di CSA senza significative variazioni di tensione implica un incremento dei valori di forza isometrica sviluppata dalle fibre (F_0 , non mostrata).

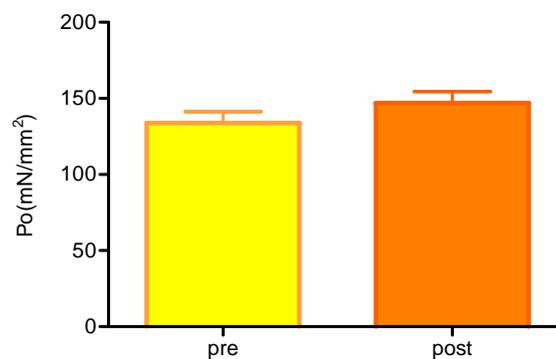


Fig. 49 Variazioni di tensione isometrica (P_0) nelle fibre muscolari di un gruppo di soggetti sottoposti ad attività in alta quota

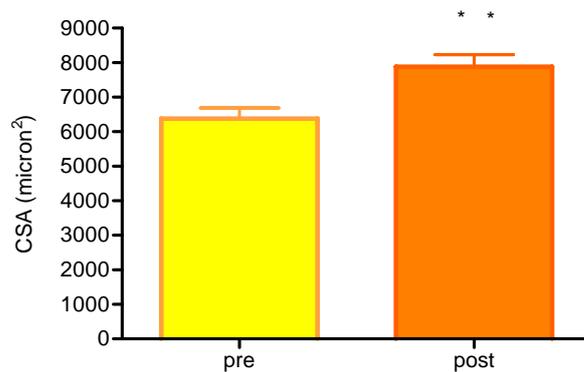


Fig. 50 Variazioni di cross sectional area (CSA) nelle fibre muscolari di un gruppo di soggetti sottoposti ad attività in alta quota

1.4.2 Variazioni di CSA nelle fibre classificate per tipo

Per quanto riguarda i valori di CSA è stato riscontrato un aumento significativo per le fibre *slow* (MHC 1) ed intermedie (MHC 2A), incrementi anche nelle fibre 2X e miste 1-2A anche se non statisticamente significative (t test di student, $p < 0,05$) (Fig. 51).

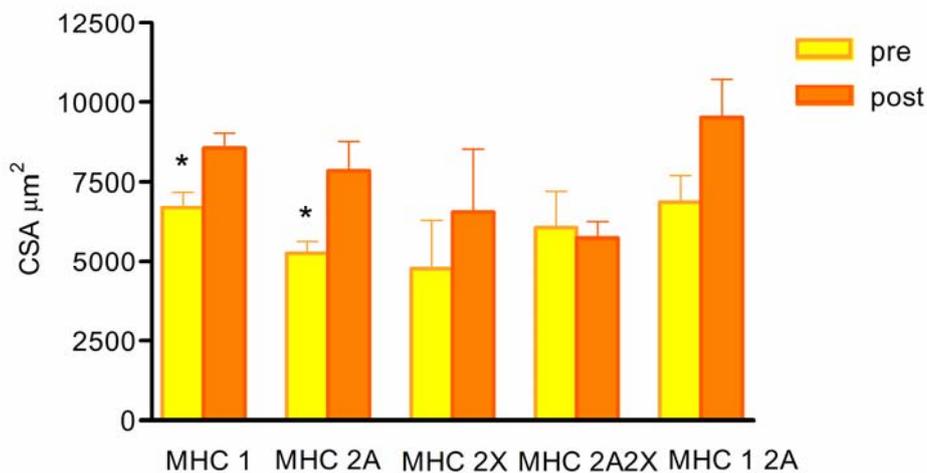


Fig. 51 Variazioni di *cross sectional area* (CSA) per tipo di fibre in un gruppo di soggetti che hanno trascorso un periodo di attività ad alta quota

1.4.3 Tensione e CSA delle fibre muscolari suddivise per soggetto

I valori di tensione delle fibre muscolari suddivise per ciascuno dei soggetti che hanno soggiornato ad alta quota mostrano una tendenza all'incremento senza raggiungere la significatività nel confronto pre-post spedizione (Fig. 52), così come i valori di CSA mostrati in Fig. 53, con l'eccezione di un significativo incremento evidenziato nel soggetto SP8.

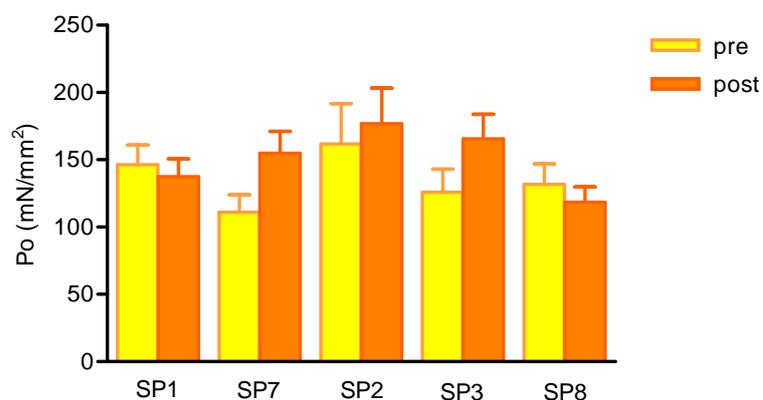


Fig. 52 Variazioni di tensione isometrica (P_o) in ciascuno dei soggetti che hanno trascorso un periodo di attività ad alta quota

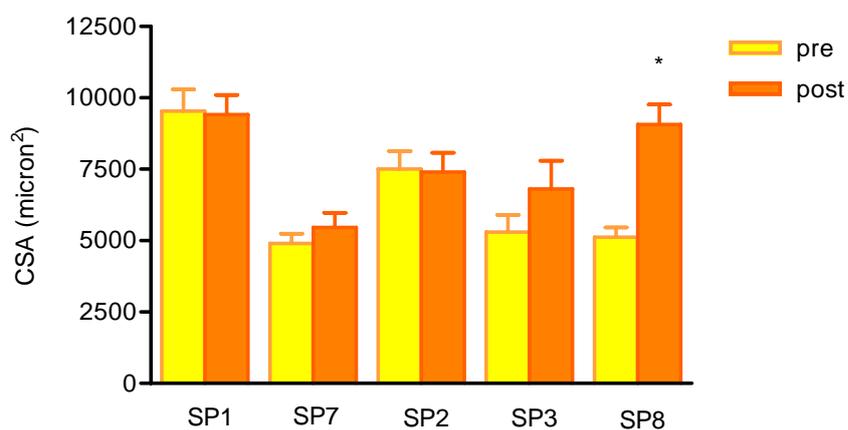


Fig. 53 Variazioni di cross sectional area (CSA) in ciascuno dei soggetti che hanno trascorso un periodo di attività ad alta quota

2. Analisi elettroforetica

2.1. Elettroforesi su singole fibre e su campioni multi-fibra

L'analisi elettroforetica effettuata su singole fibre umane isolate a partire da biopsie muscolari ha permesso di identificare la composizione di isoforme MHC in ciascuna cellula e quindi di caratterizzare i tipi di fibre presenti in ciascun soggetto al fine di valutare la composizione muscolare e gli eventuali cambiamenti molecolari, e conseguenti transizioni di fibre, come risposta muscolare ai vari stimoli di plasticità considerati in questo studio.

L'analisi elettroforetica è stata condotta anche su campioni multi-fibra cioè frammenti di biopsie muscolari contenenti segmenti di centinaia di fibre al fine di analizzare la distribuzione delle isoforme della catena pesante della miosina (MHC) e quindi una stima della distribuzione dei tipi di fibre presenti in ciascuna biopsia. Successivamente, i gel sono stati sottoposti ad analisi densitometrica per ottenere una quantificazione delle percentuali dei tipi di fibra presenti in ciascuna biopsia, dopo corsa elettroforetica e colorazione con Comassie Blu.

2.2 Analisi elettroforetiche su campioni di soggetti divisi in tre fasce di età

L'immagine riportata di seguito (Fig. 54) mostra un esempio di gel ottenuto dopo corsa elettroforetica con migrazione e separazione delle isoforme delle catene pesanti della miosina (MHC) al fine di caratterizzare singole fibre muscolari umane, affiancate da campioni muscolari multi-fibra utilizzati come riferimento per il riconoscimento delle bande miosiniche. I campioni considerati e riportati nella figura appartengono ai soggetti classificati e suddivisi sulla base dell'età, al fine di determinare se il processo di invecchiamento e la conseguente sarcopenia inducano alterazioni qualitative, oltre che quantitative, a livello di composizione muscolare.

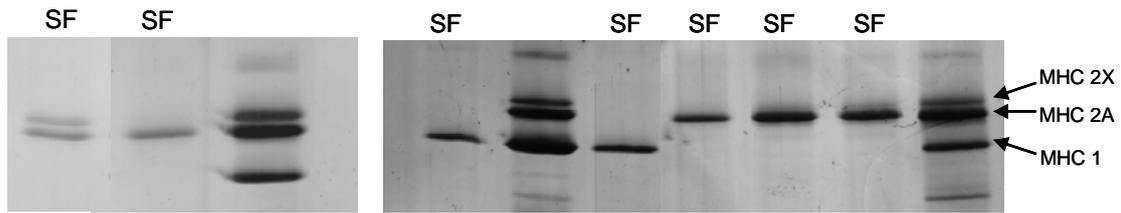


Fig. 54 Caratterizzazione elettroforetica di singole fibre di biopsie prelevate da muscolo vasto laterale umano da soggetti di diverse età: young-adult (20-55 anni) middle age (56-70 anni), elderly (>70 anni).

2.2.1 Analisi densitometrica su biopsie di soggetti divisi in tre fasce di età

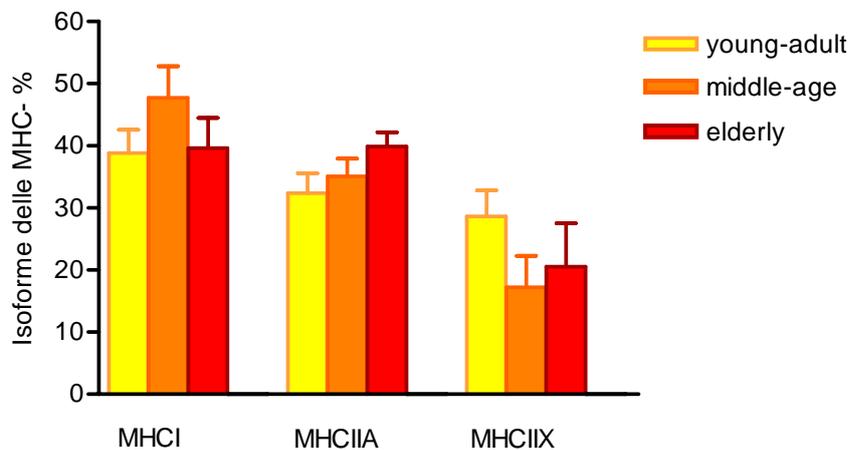


Fig. 55 Densitometria delle isoforme delle catene pesanti della miosina (MHC) di muscolo vasto laterale da soggetti di diverse età: young adult (20-55 anni), middle age (56-70 anni), elderly (>70 anni).

Il grafico mostra la distribuzione percentuale delle isoforme delle catene pesanti di miosina presenti nelle biopsie muscolari, ottenuta mediante analisi densitometrica, in cui le varie bande vengono quantificate definendo un valore BAP (Brightness Area Product) che dipende dalla luminosità e dall'area della banda miosinica stessa (come descritto in dettaglio nella sezione Materiali e Metodi). Ciascuna isoforma viene espressa come percentuale sul totale delle MHC presenti nel campione analizzato.

Come mostra l'istogramma (Fig. 55) non ci sono differenze quantitative significative tra le tre fasce di età (1 way Anova seguito dal test Dunnett's Multiple Comparison, $p < 0,05$).

2.3 Analisi elettroforetiche in soggetti sottoposti a *resistance training*

Analogamente a quanto descritto nel paragrafo precedente, sono state effettuate ulteriori nuove analisi elettroforetiche per caratterizzare singole fibre umane, che erano state isolate da biopsie di muscolo gran dorsale per le analisi di meccanica, e successivamente conservate per poter effettuare studi proteici. L'analisi è stata condotta su singole fibre muscolari di ciascun volontario sottoposto ad allenamento di forza per indagare eventuali switch isotipici indotti da esercizio fisico. Poichè le analisi meccaniche sono state condotte a partire da biopsie di 9 dei 18 volontari partecipanti allo studio, le singole fibre caratterizzate per tipo di MHC derivano pertanto dalla metà dei soggetti.

Qui di seguito è riportata un'immagine di gel dopo corsa elettroforetica in cui si osserva nella prima lane a sinistra il pattern di migrazione di un frammento muscolare utilizzato come riferimento per l'identificazione delle singole fibre che riportate nelle restanti lanes del gel (Fig. 56).

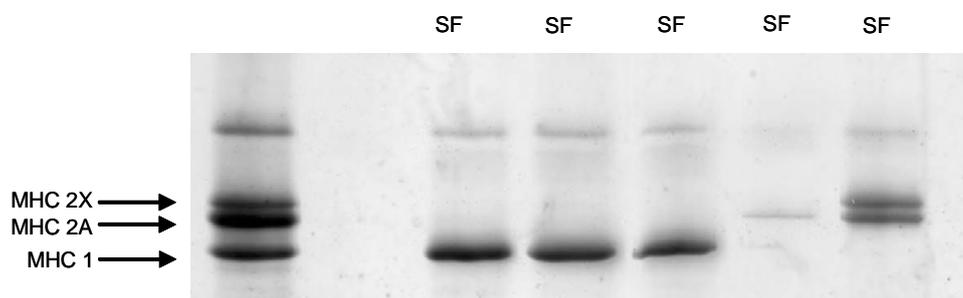


Fig. 56 Caratterizzazione elettroforetica di singole fibre di biopsie prelevate da muscolo gran dorsale umano di soggetti sottoposti a *resistance training*

Il grafico in basso (Fig. 57) mostra la distribuzione in percentuale dei vari tipi di fibre muscolari, isolate e identificate elettroforeticamente prima e dopo il *resistance training*, dal muscolo gran dorsale di tutti i soggetti dalle cui biopsie sono state isolate singole fibre per condurre esperimenti di meccanica.

Si osserva una riduzione di circa il 7% del numero di fibre rapide intermedie (2A) ed una riduzione più lieve delle fibre ibride (2A-2X); aumentano le fibre *slow* (1) anche se in modo

modesto, come pure le fibre ibride 1- 2A, mentre compaiono dopo le 8 settimane di allenamento anche alcune fibre miste di tipo 1-2A-2X assenti nella situazione pre allenamento.

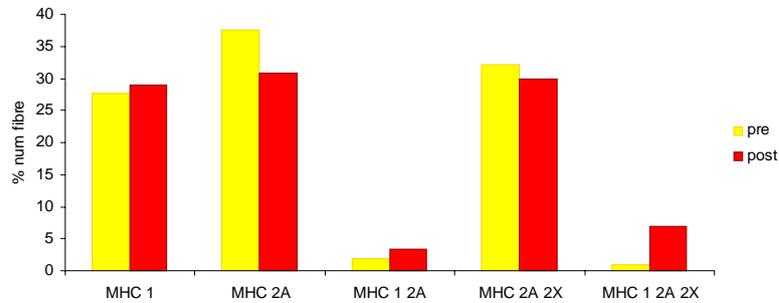


Fig. 57 Percentuale del numero di singole fibre isolate da biopsie pre e post di soggetti sottoposti a *resistance training*.

2.3.1 Analisi densitometrica in biopsie di gran dorsale di soggetti sottoposti a *resistance training*

Si riporta di seguito l'immagine (Fig. 58) del pattern di migrazione delle catene MHC ottenuto a partire da fasci muscolari delle biopsie di alcuni soggetti prima e dopo essere stati sottoposti ad allenamento di forza. Dopo corsa elettroforetica e colorazione con Comassie Blu è stato possibile discriminare le bande miosiniche corrispondenti, dall'alto verso il basso alle catene pesanti MHC 2X, 2A, 1.

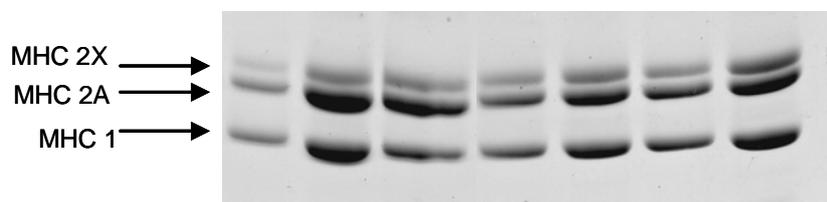


Fig. 58 Elettroforesi di campioni biotici (gran dorsale) di soggetti sottoposti a *resistance training*.

Si è quindi proceduto all'analisi densitometrica, come descritto nel precedente capitolo di Materiali e Metodi, ottenendo informazioni circa la variazione della distribuzione percentuale delle isoforme delle catene pesanti della miosina di tutti i soggetti prima e dopo le 8 settimane di allenamento. Per ciascuna isoforma viene indicata la percentuale sul totale delle MHC presenti nel campione analizzato. Si osserva, dopo 8 settimane, un significativo ($p=0,0066$) aumento nella percentuale della isoforma MHC 2A e riduzione della isoforma MHC 2X ($p=0,0100$) nei campioni muscolari (fig. 59). L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il t test di student ($p<0,05$).

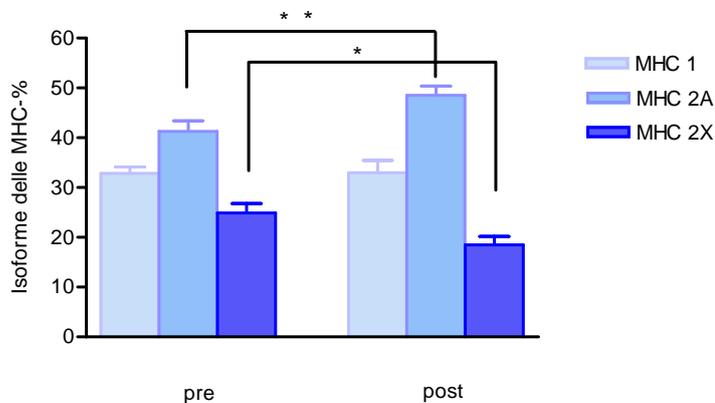


Fig. 59 Densitometria delle isoforme delle catene pesanti della miosina (MHC) di muscolo gran dorsale proveniente da soggetti sottoposti a *resistance training*

È stata valutata la variazione della distribuzione percentuale delle isoforme delle catene pesanti della miosina (MHC) anche per ciascun soggetto (Fig. 60a, 60b) da cui emergono profili di distribuzione diversi risultanti probabilmente da specificità individuali dovute ad un background diverso fra i 18 soggetti.

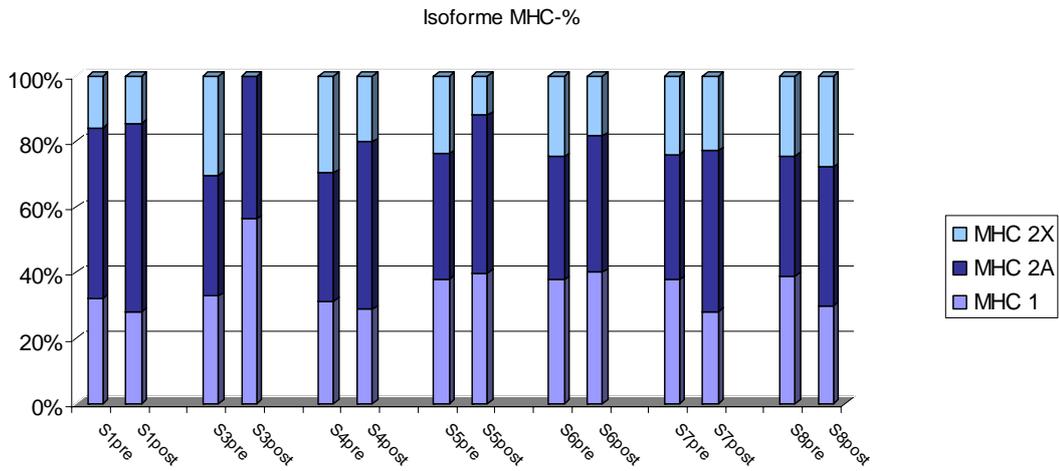


Fig. 60a Densitometria delle isoforme delle catene pesanti della miosina (MHC) di muscolo gran dorsale per 7 soggetti sottoposti a *resistance training*

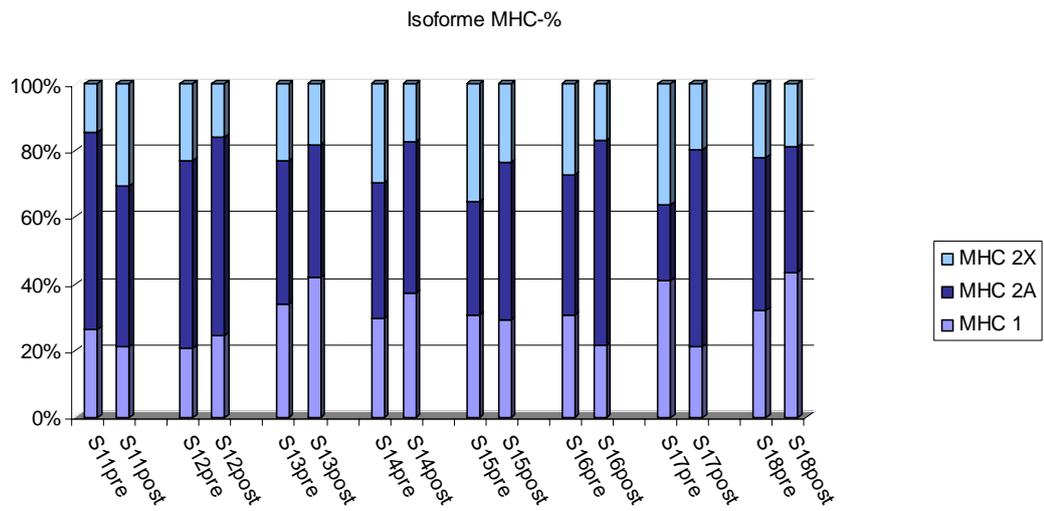


Fig. 60b Densitometria delle isoforme delle catene pesanti della miosina (MHC) di muscolo gran dorsale per altri 8 soggetti sottoposti a *resistance training*

2.3.2 Valutazione del *nuclear domain*

A partire da alcune delle biopsie muscolari prelevate sia prima dell'inizio del protocollo di allenamento che dopo le 8 settimane ed utilizzate per isolare singole fibre e condurre studi meccanici, ulteriori singole fibre sono state dissezionate per essere utilizzate in studi di immunocitochimica con lo scopo di valutare un possibile aumento nel numero di nuclei per unità di volume presenti in singole cellule indotto dal *resistance training*. Tale analisi è stata effettuata utilizzando il microscopio video-confocale (Vi-Co), dopo incubazione delle singole fibre con l'anticorpo anti α -actinina, che permette di evidenziare la linea Z di ciascun sarcomero, e con il colorante Hoescht specifico per la colorazione nucleare in modo da valutare il numero di nuclei presenti all'interno di singole cellule (come riportato in dettaglio in Materiali e Metodi).

La valutazione del *nuclear domain* (definito come il numero di nuclei presenti in un dato volume di citoplasma, pari a un milione di μm^3) in un numero considerevole di fibre pre ($n=47$) e post ($n=32$) ha evidenziato un significativo incremento nelle miofibre derivanti da biopsie effettuate dopo allenamento, ad indicare quindi un effettivo aumento del numero di nuclei (iperplasia) in seguito a *resistance training* (Fig. 61).

Nella Fig. 62 sono invece riportate immagini ad ingrandimento diverso di una stessa fibra osservata al microscopio confocale, dove netta è la visualizzazione dei nuclei dopo colorazione con Hoestch (blu).

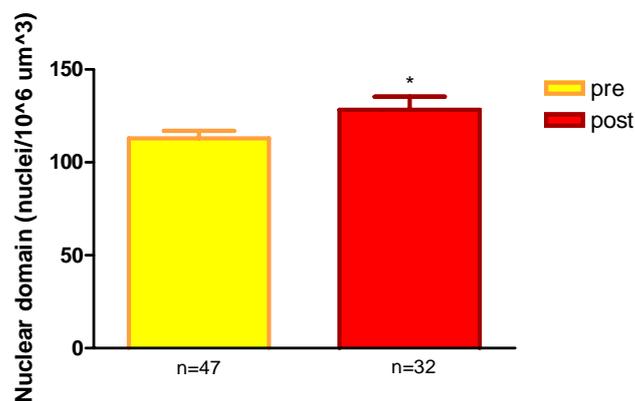


Fig. 61 Valutazione del Nuclear Domai in singole fibre muscolari umane.

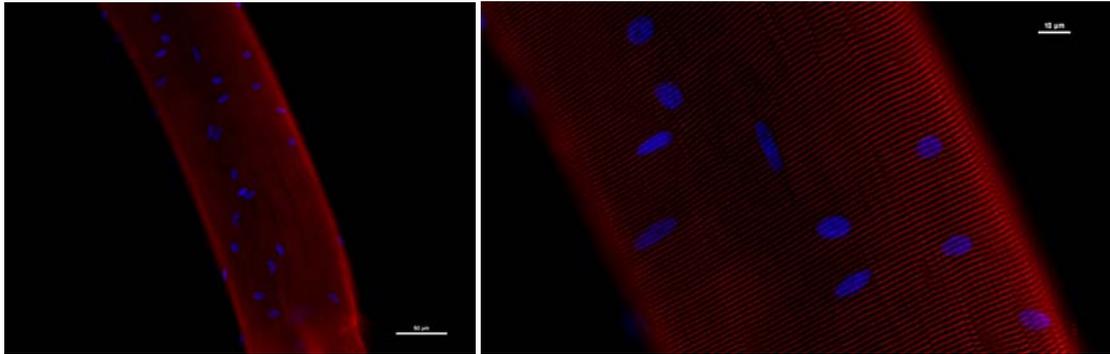


Fig. 62 Immagine al microscopio confocale: α -actinina e colorazione nucleare DAPI in singole fibre muscolari umane.

2.4 Analisi elettroforetiche in un gruppo di alpinisti prima e dopo il soggiorno in quota

Analogamente alla procedura sperimentale descritta per i gruppi di soggetti appartenenti alle prime due fasi di questo studio, anche per il gruppo di alpinisti sottoposti ad esercizio ad alta quota sono state effettuate caratterizzazioni elettroforetiche delle singole fibre (Fig. 63) di cui precedentemente sono stati misurati i parametri contrattili attraverso esperimenti di meccanica.

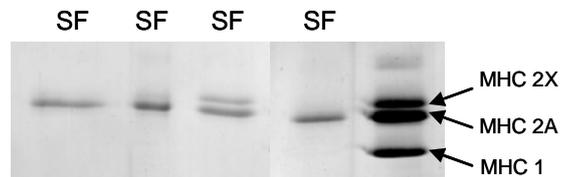


Fig. 63 Caratterizzazione elettroforetica di singole fibre di muscolo vasto laterale di biopsie prelevate da un gruppo di soggetti prima e dopo permanenza ad alta quota

2.4.1 Analisi densitometrica nelle biopsie di vasto laterale di un gruppo di alpinisti

Dopo la caratterizzazione delle singole fibre si è proceduto alla separazione elettroforetica delle biopsie muscolari (Fig. 64), alla successiva colorazione con *Coomassie blue*, e quindi all'analisi densitometrica dei gel ottenuti. Lo scopo era sempre quello di valutare eventuali switch isotipici delle catene pesanti della miosina (MHC) in seguito all'effetto combinato di ipossia da alta quota ed attività fisica.

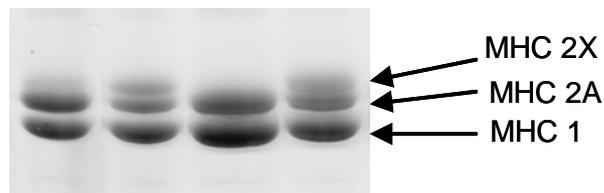


Fig. 64 Elettroforesi di campioni biotici di vasto laterale di soggetti esposti ad alta quota

La distribuzione percentuale dei vari tipi di fibra pre e post spedizione, evidenziata per ciascun alpinista dal grafico di seguito riportato (Fig. 65), indica un trend generale di aumento della isoforma *slow* della miosina dopo la spedizione per tutti i soggetti, a cui si accompagna una riduzione delle isoforme fast MHC 2A e 2X.

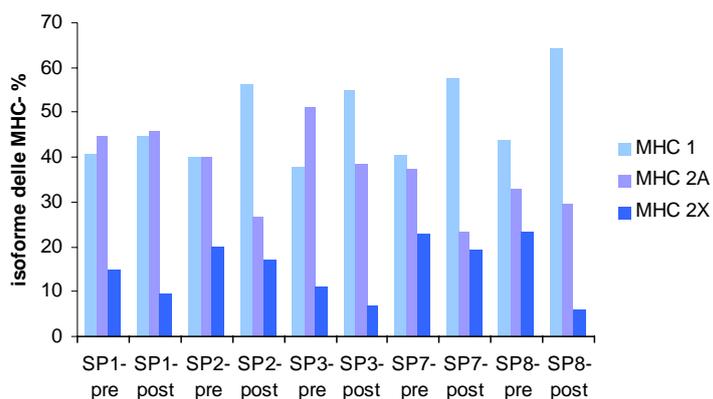


Fig. 65 Distribuzione delle isoforme delle catene pesanti della miosina (MHC) in campioni di muscolo vasto laterale per ciascun soggetto prima e dopo soggiorno ad alta quota

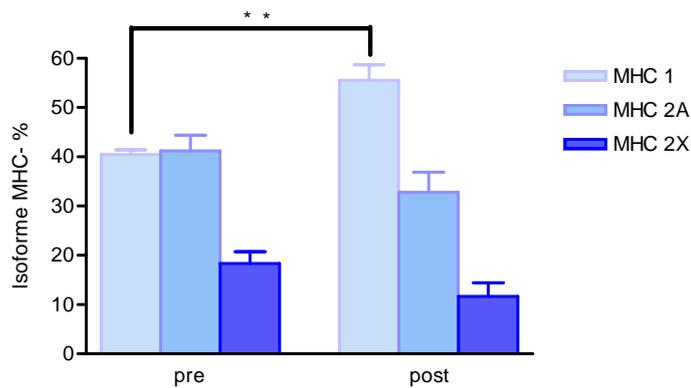


Fig. 66 Distribuzione media delle isoforme delle catene pesanti della miosina (MHC) nel muscolo vasto laterale di un gruppo di soggetti prima e dopo soggiorno ad alta quota

La distribuzione percentuale totale delle catene pesanti di tutti i soggetti mostra sempre un aumento significativo dell'isoforma *slow* e riduzioni non significative delle isoforme MHC 2A e 2X (Fig.66).

2.4.2 Separazione elettroforetica delle catene leggere (MLC) in un gruppo di alpinisti

Abbiamo successivamente studiato anche l'espressione delle isoforme delle catene leggere della miosina (MLC). Come riportato nell'introduzione, ciascuna delle due catene pesanti della miosina si associa a due catene leggere MLC (20-16 kD), una alcalina o essenziale, e l'altra regolatoria o fosforilabile. Le isoforme alcaline sono la MLC1s, la MLC1f e LMC3f. Le isoforme regolatorie sono MLC2s e MLC2f. Le biopsie muscolari degli alpinisti sono state ulteriormente analizzate per identificare il pattern di migrazione delle diverse isoforme *slow* e *fast* delle catene leggere della miosina (MLC) dopo colorazione con *Coomassie Blu*, come mostrato in Fig. 67, soffermandoci poi sulle isoforme regolatorie MLC2s e MLC2f. Queste ultime due isoforme vengono fosforilate e il processo di fosforilazione correla con il potenziamento della forza, evidenziato da studi *in vitro* su singole fibre skinned. Pertanto potrebbero avere una possibile funzione modulatoria nel potenziamento della performance e dell'efficienza di contrazione.

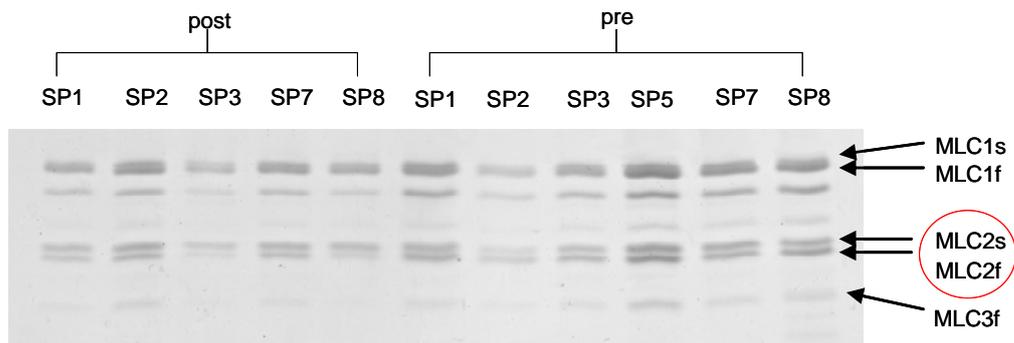


Fig. 67 Separazione elettroforetica delle isoforme delle catene leggere della miosina (MLC) in biopsie di muscolo vasto laterale di un gruppo di soggetti prima e dopo soggiorno ad alta quota

Identificazione mediante Western Blot

Dopo aver ottenuto la separazione elettroforetica delle varie isoforme, si è provveduto al riconoscimento delle due isoforme regolatorie mediante western blot (Fig. 68).

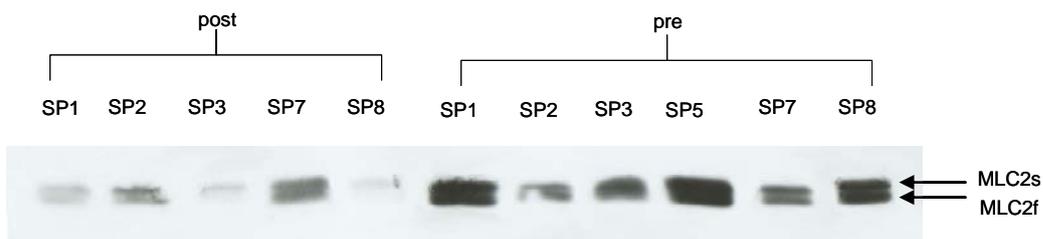


Fig. 68 Identificazione mediante western blot delle isoforme delle MLC regolatorie in biopsie di muscolo vasto laterale di un gruppo di soggetti prima e dopo soggiorno ad alta quota

2.4.3 Densitometria delle catene leggere (MLC) in un gruppo di alpinisti

Anche per le isoforme delle catene leggere della miosina (MLC) è stata effettuata analisi densitometrica; è stato possibile così ottenere un confronto della co-espressione delle isoforme MLC con le isoforme MHC, e valutare anche per catene leggere possibili switch tra i due gruppi pre e post-spedizione. Analogamente a quanto evidenziato per le isoforme MHC (Fig. 66), la distribuzione delle isoforme proteiche regolatorie MLC evidenzia, in tutti i soggetti, un incremento nella percentuale dell'isoforma *slow* MLC2s ed una concomitante riduzione delle isoforme *fast* MLC2f (Fig. 69) dopo la spedizione. Considerando la distribuzione totale (Fig.

70), sia l'aumento nella percentuale dell'isoforma *slow* che la riduzione della *fast* risulta statisticamente significativo. Sulla base dei dati riportati, è stata dunque riscontrata una correlazione tra la distribuzione delle isoforme MLC e quella delle MHC.

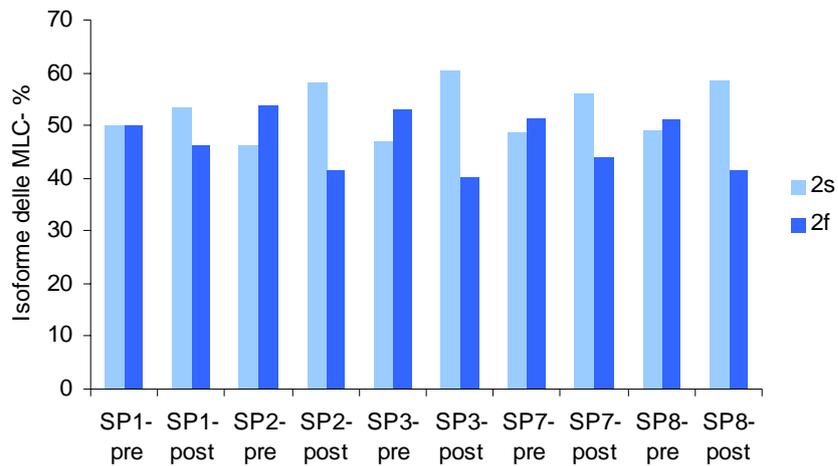


Fig. 69 Distribuzione delle isoforme delle catene leggere regolatorie della miosina (MLC) in biopsie di muscolo vasto laterale per ciascun soggetto prima e dopo soggiorno ad alta quota.

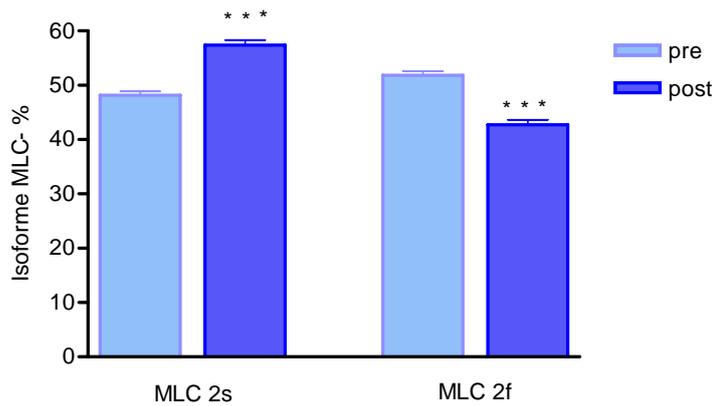


Fig. 70 Distribuzione media delle isoforme *slow* e *fast* delle catene leggere regolatorie della miosina (MLC) in muscolo vasto laterale di un gruppo di soggetti prima e dopo soggiorno ad alta quota.

DISCUSSIONE

La ricerca presentata in questa tesi è nata al fine di studiare il comportamento e i cambiamenti a cui il muscolo umano può essere soggetto se sottoposto a determinate situazioni/condizioni e le differenti risposte di adattamento a seconda del tipo di stimolo. Gli studi sperimentali condotti hanno indagato questi cambiamenti partendo da singole fibre muscolari scheletriche isolate da biopsie umane. L'importanza dello studio a livello di singole fibre è una diretta conseguenza delle caratteristiche del muscolo. Esso infatti è un tessuto non solo versatile ma anche complesso e, nonostante l'apparente uniformità, presenta un elevato grado di variabilità poichè composto da fibre eterogenee per dimensioni, metabolismo, funzioni contrattili. Le differenze esistenti tra le fibre muscolari sono conseguenza di diversi profili di espressione genica fibra-specifici (*Meissner et al, 2006; Polla et al.,2009; Reggiani and Mascarello, 2004*); ciò si riflette a livello macroscopico nei diversi aspetti della struttura e funzione del muscolo.

Il passaggio da studi *in vivo* delle proprietà contrattili del muscolo alla possibilità, negli ultimi anni, di poter dissezionare e caratterizzare singole fibre *in vitro* riproponendo condizioni fisiologiche analoghe alla situazione *in vivo* (*Reggiani e Bottinelli, 2000*), ha aperto la strada verso una possibile comprensione ed identificazione del ruolo specifico delle fibre nella modulazione della *performance* muscolare.

Le caratteristiche plastiche delle fibre muscolari le rendono capaci di rimodellarsi a seconda degli stimoli (fisiologici e patologici) a cui sono sottoposte. Di conseguenza sono soggette a trasformazioni muovendosi da un fenotipo all'altro (*type transition*) mediante l'importante processo di *switch* delle isoforme proteiche caratterizzanti le singole fibre, il che implica l'esistenza, all'interno di queste cellule, di regole che coordinano l'espressione di vari geni e modulano varie funzioni (*Pette e Staron, 1997*).

Come ampiamente descritto nell'introduzione, l'abilità di una fibra muscolare di generare forza, di accorciarsi, e produrre un lavoro meccanico è principalmente determinato dalla composizione proteica miofibrillare, e soprattutto dalla composizione di isoforme della miosina presenti, e delle isoforme delle catene pesanti della miosina (MHC) in primo luogo, poichè esse rappresentano il maggior determinante delle proprietà contrattili del muscolo.

Abbiamo studiato le risposte del tessuto muscolare nelle tre diverse condizioni descritte in dettaglio nei precedenti capitoli, ottenendo alla fine delle procedure sperimentali informazioni riguardanti il processo di senescenza, l'adattamento ad allenamenti di forza e ad attività effettuata in condizioni di alta quota.

Variazioni dei parametri contrattili e molecolari delle singole fibre muscolari umane in relazione all'invecchiamento

Innanzitutto, dal momento che ad oggi non sono stati ancora chiaramente compresi i meccanismi che regolano la sarcopenia e il conseguente invecchiamento, abbiamo valutato i cambiamenti presenti a livello di singole fibre in muscoli sarcopenici confrontandoli con le caratteristiche delle fibre di muscoli provenienti da soggetti giovani.

Dal confronto effettuato tra i tre gruppi *young-adult*, *middle-age* ed *elderly* i dati ottenuti dalla nostra ricerca indicano che i soggetti aventi età intermedia mostrano valori di tensione isometrica (P_o) maggiori sia rispetto al gruppo *young-adult* che al gruppo *elderly* (Fig. 25). I valori di CSA e di forza tuttavia (Fig. 26 e 27) si riducono significativamente in relazione all'età dal gruppo *young-adult* al gruppo *elderly* come era stato ipotizzato. Considerando i vari tipi di fibre presenti per ciascun gruppo non abbiamo individuato variazioni significative di tensione isometrica in relazione all'età (Fig. 28); mentre sembra che l'invecchiamento porti a riduzioni significative sia per l'area della sezione trasversa (CSA) che per i valori di forza nelle fibre *slow* e nelle fibre MHC 2A (Fig 29 e 30). Da notare che abbiamo identificato fibre di tipo 2X solo nel gruppo *young-adult*, mentre la valutazione dei cambiamenti del contenuto di isoforme MHC della miosina in relazione all'età invece non ha mostrato differenze. Tali dati sembrerebbero confermare i risultati riportati da Trappe e collaboratori (2003), i quali non hanno riscontrato variazioni nei valori di tensione normalizzata sulla CSA né per le fibre *slow* né per le fibre intermedie nel confronto tra soggetti giovani ed anziani; ciò ha portato Trappe a concludere che la perdita di massa muscolare, dovuta ad una combinazione di atrofia e perdita del numero di fibre, sia invece la componente critica del processo sarcopenico e del declino delle funzioni muscolari. L'assenza di variazioni significative nei parametri di tensione isometrica (P_o) suggerirebbe che le componenti meccaniche che regolano le proprietà contrattili nelle fibre muscolari *slow* e *fast* non siano alterate dall'età; ciò implica che le

proteine miofibrillari responsabili del processo di contrazione muscolare rimangono intatte e funzionali in soggetti anziani. Inoltre la similarità dei valori contrattili nel corso dell'età potrebbe far supporre che il volume delle fibre sia regolato in modo da alterare l'architettura ultrastrutturale, ma preservare la densità del materiale contrattile. Analogamente ai nostri dati circa il contenuto di miosina anche i risultati evidenziati dal lavoro di Trappe non hanno mostrato differenze nella quantità di proteina presente che sembra rimanga inalterata con l'età. Potrebbero manifestarsi modificazioni minori a livello dei ponti acto-miosinici (*cross-bridges*), tuttavia non evidenziabili dai nostri esperimenti (Trappe et al., 2006). I dati fin qui riportati sono in disaccordo con quanto evidenziato dallo studio di Bottinelli e dei suoi collaboratori (2003) secondo cui i valori di tensione isometrica sia delle fibre di tipo 1 che 2A sono significativamente più bassi nel gruppo di soggetti anziani rispetto ai soggetti giovani con una riduzione maggiore per le *slow*. Bottinelli e collaboratori hanno riscontrato atrofia più pronunciata nelle fibre *slow* rispetto alle fibre intermedie 2A, mentre nessuna riduzione significativa per le fibre di tipo 2X. Inoltre hanno rilevato una riduzione del contenuto dell'isoforma MHC 2A in soggetti anziani a fronte di un aumento dell'isoforma MHC 2X. Infine hanno trovato una relazione lineare tra la perdita di forza e la concentrazione di miosina. Secondo i dati riportati da questo studio, quindi, la riduzione delle funzioni muscolari, e la conseguente debolezza che si presenta con l'età potrebbe non dipendere solo da un meccanismo quantitativo (riduzione della massa), ma anche da un meccanismo qualitativo legato ad alterazioni delle proprietà contrattili del muscolo che porterebbero alla perdita della capacità intrinseca delle fibre muscolari di sviluppare forza.

Occorre però accennare ad ulteriori esempi di risultati contrastanti presenti in letteratura e riguardanti i cambiamenti indotti dall'invecchiamento. Sebbene in soggetti anziani ci si aspetterebbe la comparsa di un fenotipo più lento sulla base della denervazione preferenziale delle unità motorie *fast* (Campbell et al., 1973; Lexell, 1995), sono stati osservati in realtà, nei diversi articoli pubblicati sull'argomento, sia un fenotipo più lento, sia un fenotipo più veloce ed anche nessun cambiamento (Klitgaard et al, 1990; Aoyagi and Shephard, 1992). Questa apparente mancanza di consistenza nei risultati trova spiegazione se si considera che con l'età la funzione del muscolo scheletrico può essere compromessa sia dal disuso che da una parziale denervazione delle fibre, processi che hanno effetti opposti sul fenotipo muscolare, in quanto

il primo determinerebbe uno *shift* verso un fenotipo più *fast*, mentre la denervazione altererebbe soprattutto le unità motorie *fast*.

Variazioni dei parametri contrattili dopo resistance training

Hettinger and Muller, nel periodo tra 1950 e il 1960, portarono avanti una serie di esperimenti volti a determinare lo stimolo minimo richiesto per aumentare la massa muscolare e per determinare i vari fattori, quali l'età o il sesso che potessero alterare l'effetto del training. Nel corso dei loro studi notarono che vi era un'ampia variabilità nella suscettibilità di soggetti diversi e muscoli diversi all'allenamento, variabilità questa che ancora continua ad intrigare i ricercatori (*Jones et al., 1989*).

Nella valutazione della risposta adattativa muscolare in seguito a stimolo ipertrofico indotto nel nostro studio da *resistance training*, il valore di tensione isometrica totale (Po) non ha mostrato differenze significative (Fig. 31); al contrario l'aumento dell'area della sezione trasversa (CSA) (Fig. 32) di tutti i soggetti è risultato essere significativo. Poiché all'effetto ipertrofico non ha corrisposto un evidente aumento di Po, abbiamo valutato anche la forza non normalizzata (Fig. 37) che ha mostrato un aumento significativo nel post training; pertanto la forza assoluta sviluppata dalle fibre aumenta parallelamente alle dimensioni delle stesse in seguito ad allenamento, mentre il valore di tensione isometrica (Po) non risulta aumentato poiché dipende dal rapporto tra forza assoluta e CSA della fibra.

Considerando i diversi tipi di fibra abbiamo evidenziato un trend di aumento per la tensione (Po) sia per le fibre contenenti MHC 1 che per le fibre miste contenenti MHC 2A 2X, le 2A invece mostrano una leggera riduzione dopo il *training* (Fig. 33); questi andamenti trovano una spiegazione considerando i valori di CSA e di forza assoluta: si ha un trend in aumento anche per la CSA ed un aumento della forza che risulta significativa nel caso delle fibre di tipo 1 e delle miste, poiché l'aumento della forza risulta maggiore di quello della CSA ciò ha portato a lievi aumenti di Po (F/CSA); discorso opposto vale per le fibre intermedie in cui l'incremento di CSA è maggiore di quello della forza anche se non significativo, e ne risulta una riduzione, anche se non significativa, della Po dopo *resistance training*. Analogamente a quanto evidenziato dai nostri risultati, numerosi dati in letteratura hanno riportato un effetto

ipertrofico per i tre tipi di fibre (MHC 1, 2A, 2X) e tra questi, la risposta ipertrofica sembra modificare in misura maggiore le fibre di tipo 2A (Campos et al., 2002) rispetto alle *slow*. Sia nell'uomo che negli animali le fibre contenenti l'isoforma MHC 2A sono intrinsecamente più forti delle fibre *slow*, studi effettuati su muscoli umani indicano una differenza fino a due volte tra i due tipi di fibre (Jones et al., 1989). Avendo le fibre 2A una capacità di sviluppare forza maggiore delle *slow*, dopo allenamento tali fibre dovrebbero preferenzialmente andare incontro ad ipertrofia o dovrebbe aumentare la frequenza di tali fibre nel muscolo. Sebbene diversi studi hanno evidenziato negli atleti la presenza di una maggiore quantità di fibre di tipo 2A, tale evidenza è risultata contraddittoria in lavori su allenamenti a breve termine. Anche nei casi in cui è stata individuata una selettiva ipertrofia, le differenze sono risultate essere troppo esigue per affermare la disparità di cambiamenti all'interno del muscolo. I valori evidenziati nel nostro studio dunque si inseriscono adeguatamente nel contesto riportato in letteratura. Infatti ulteriori recenti studi indicano che dopo alcune settimane di *resistance training* la *cross sectional area* dei tre maggiori tipi di fibre (1, 2A, 2X) risultava significativamente aumentata (Campos et al., 2002; Haddad et al. 1998; Hostler et al. 2001). Occorre sottolineare, per rendere ragione delle possibili differenze e variazioni riscontrate in letteratura, che i protocolli di allenamento sono assai diversi tra loro (numero di set, durata del periodo di riposo tra i diversi esercizi, durata dell'esercizio stesso) e diversi tipi di allenamento (*resistance* o *endurance*) possono stressare il muscolo in modo diverso ottenendo dunque delle variazioni, anche in misura graduale, della risposta (Campo set al., 2002).

Abbiamo voluto vedere come variassero i parametri in ciascuno dei soggetti sottoposti ad allenamento e abbiamo riscontrato una notevole diversità di risposta da un soggetto all'altro nonostante siano stati sottoposti ad uno stesso stimolo di forza. Ciascun soggetto parte ovviamente da una diversa condizione prima dell'allenamento, ma dopo il *training* non si evidenzia una risposta simile in tutti: in particolare per esempio una significativa risposta ipertrofica è stata raggiunta solo per 3 dei 9 soggetti allenati, al contrario le fibre analizzate dei restanti soggetti non hanno mostrato un effettivo aumento (Fig 36). Anche la forza assoluta è aumentata in modo significativo solo in quattro soggetti.

L'analisi individuale ci porta a far considerazioni in merito alle differenze di risposta ottenute, le quali potrebbero essere legate in primo luogo ad un diverso *background* genetico e quindi

ad una diversa capacità intrinseca a ciascun individuo di rispondere ad un dato stimolo. Altri fattori da considerare potrebbero essere diverse esperienze sportive e nutrizione. Infine, fattore importante da considerare è il sesso di ciascun individuo; come hanno dimostrato i dati raccolti, le donne partono da condizioni di forza e dimensioni diverse e rispondono in modo differente anche perché geneticamente diverse, con regolazioni coinvolte nelle risposte non totalmente paragonabili a quelle presenti nell'uomo, basti pensare al ruolo dei fattori ormonali.

Effetto della dieta iperproteica

La sintesi proteica che di per sé aumenta in seguito ad esercizio fisico, può subire un ulteriore incremento dall'assunzione di proteine ed amino acidi in concomitanza all'allenamento (*Carroll et al., 2005*); le proteine sarcomeriche per prime sintetizzate sono quelle che compongono la *machinery* contrattile, come evidenziano cambiamenti nell'espressione delle isoforme delle catene pesanti della miosina (MHC), sia a livello di mRNA che a livello proteico (*Willoughby et al., 2007*).

Pertanto, un ulteriore dato da prendere in considerazione è il fatto che in questo studio i nostri soggetti sono stati divisi nei gruppi NP e IP a seconda del maggior *intake* proteico.

Entrambi i gruppi dopo l'allenamento mostrano aumenti di Po anche se non significativi.

Più marcati sono invece gli incrementi nei valori di forza e di CSA in entrambi i gruppi, in particolar modo la forza è aumentata in modo significativo sia nel gruppo iperproteico che nel normoproteico dove i valori pre o di partenza in entrambi i gruppi sono paragonabili; per quanto riguarda la *cross sectional area* si evidenzia un incremento in tutti e due i gruppi ma significativo solo nei normoproteici. Bisogna considerare i valori controllo (pre) dei due gruppi, poichè le singole fibre dei soggetti inglobati nel gruppo iperproteico mostravano già in partenza dimensioni di CSA maggiori di quelle appartenenti ai soggetti del gruppo normoproteico, e l'effetto di dieta ed allenamento non ha indotto un incremento delle dimensioni delle fibre (Fig. 41). La conclusione che possiamo trarre è che dai dati ottenuti vediamo un effettivo aumento dopo il programma di allenamento sia come effetto ipertrofico che come forza sviluppata, non sembra però che il maggior *intake* proteico abbia un significativo effetto sinergico con l'allenamento, poichè l'analisi mostra che l'incremento ottenuto nel gruppo normoproteico è paragonabile o addirittura leggermente maggiore rispetto

ai valori raggiunti dal gruppo iperproteico; pertanto la maggior assunzione proteica, considerando la totalità dei soggetti, non differenzia, nel nostro caso, il gruppo IP dal NP da noi considerato (Fig. 40, 41). I nostri dati non si trovano in accordo con quelli riportati da Willoughby e collaboratori secondo cui 10 settimane di un programma di *resistance training* associata ad aumentato *intake* proteico e amino acidi migliora la forza e la massa muscolare, nonché gli indicatori del metabolismo anabolico, più efficientemente di un placebo isocalorico a base di carboidrati (Willoughby et al, 2007). Un ulteriore studio riportato in letteratura (Ballard et al., 2005) ha inoltre evidenziato come 12 settimane di *resistance training* associate all'assunzione di proteine sia anche più efficiente nella riduzione della massa grassa e nell'aumento di quella magra (massa muscolare).

Siamo andati ad osservare in modo specifico le variazioni delle fibre di tipo 1 e di tipo 2A. Le fibre *slow* mostrano un andamento simile a quanto visto per i valori totali dei due gruppi sopra descritti, sia per la tensione isometrica (P_o) che per la *cross sectional area* (CSA) e la forza assoluta (Fig. 42 e 43).

Per quanto riguarda le fibre intermedie (MHC 2A), abbiamo osservato un comportamento anomalo nel gruppo iperproteico (IP) rispetto a quanto ci saremmo aspettati; i valori di tensione isometrica (P_o) sviluppati nel post *training* da queste fibre si riducono anche se non significativamente, mentre la *cross sectional area* e la forza assoluta sviluppata aumentano. Poiché la tensione isometrica (P_o) è il risultato del rapporto tra forza e CSA ed essendo l'aumento di quest'ultima maggiore dell'aumento di forza, ne deriva una diminuzione nel valore di tensione isometrica (Fig. 44 e 45). L'effetto ipertrofico delle fibre che ne è derivato ha sovrastato l'aumento di forza delle stesse.

Considerando la variabile legata al sesso si è notato che le donne dopo 8 settimane di allenamento hanno migliorato i loro valori di tensione isometrica sviluppata senza però un evidente effetto ipertrofico; l'aumento della tensione è dovuta ad un aumento significativo del valore di forza non normalizzata sviluppata dalle fibre muscolari. Il parallelo aumento, significativo, sia dei valori di forza assoluta che di *cross sectional area* negli uomini spiega il valore del rapporto (P_o) pressoché costante. Gli uomini inoltre mostrano sempre valori nelle condizioni di partenza maggiori rispetto alle donne. La valutazione ed il confronto tra donne e

uomini dei parametri meccanici suggerisce come un differente assetto genetico influenzi i comportamenti e le risposte adattative risultanti.

Aspetti molecolari e fibre type transition

L'analisi delle percentuali del numero di singole fibre isolate da biopsie per eseguire i nostri studi di meccanica indica un aumento della frazione di fibre *slow* (MHC 1) a fronte di una riduzione del numero di fibre intermedie (MHC 2A), a ciò si affiancano le variazioni del numero di fibre miste, indice probabilmente di uno stato di transizione verso un determinato tipo di fibra. I dati ottenuti fanno supporre una transizione verso le fibre contenenti l'isoforma *slow* della miosina, dal momento che aumenta il numero di fibre miste del tipo 1 2A e 1 2A 2X e si riduce il numero di miste *fast* del tipo 2A 2X. Questo dato concorda con quelli presenti in letteratura che riportano un aumento nel numero di fibre miste di tipo 1 2A ed una riduzione della popolazione di fibre di tipo 2A 2X in seguito ad allenamento di forza (McCarthy et al., 2002) e, più in generale, una conversione dei tipi di fibre muscolari in direzione *fast to slow* (Liu et al., 2003). Questo tipo di transizione spiega dunque le riduzioni nel numero di fibre miste contenenti isoforme MHC fast (2A 2X) ed il concomitante aumento del numero di fibre miste contenenti isoforme *slow*/intermedie, oltre che la diminuzione di fibre pure *fast* e l'aumento di singole fibre pure *slow* ed intermedie.

Ulteriori informazioni sono state ottenute dai dati riguardanti la variazione della distribuzione percentuale delle isoforme delle catene pesanti MHC tramite analisi densitometrica effettuata su tutti i 18 soggetti. L'analisi densitometrica mostra una riduzione delle catene pesanti di tipo 2X ed un aumento delle intermedie 2A, indice di uno *shift fast to slow* in accordo con quanto presente in letteratura (Putman et al., 2004; Haddad et al., 1998). Considerando l'aumento del numero di fibre *slow*, a cui abbiamo accennato sopra in relazione al numero di fibre caratterizzate dopo gli studi di meccanica, questo dato potrebbe far supporre una fase di "passaggio" (transitoria) in cui aumenterebbero le fibre miste contenenti l'isoforma MHC 1 per poi diventare fibre pure di tipo MHC 1 e/o 2A. Soffermandoci sul confronto tra le percentuali del numero di fibre e la distribuzione percentuale delle isoforme delle catene MHC ottenute da analisi densitometrica, i risultati emersi potrebbero apparire discordanti considerando l'aumento significativo delle isoforme MHC 2A nella condizione post *training*,

che emerge dall'analisi densitometrica, rispetto ad una riduzione nel numero di fibre di tipo 2A mostrato in Fig. 56. In realtà bisogna tener presente che il grafico di Fig. 56 riassume tutti i tipi di singole fibre caratterizzate dopo gli esperimenti di meccanica, e quindi derivanti solo da 9 dei 18 soggetti inglobati nello studio; inoltre sebbene sia evidente una riduzione nel numero di fibre pure 2A, è altresì vero che si evidenzia anche un aumento del numero di fibre ibride, nello specifico di tipo 1 2A e di tipo 1 2A 2X, e quindi del contenuto relativo alla isoforma MHC 2A. Di conseguenza ciò correla con quanto evidenzia l'analisi densitometrica, la quale peraltro è stata eseguita su tutti i 18 soggetti sottoposti a *resistance training*.

Nel complesso i nostri dati hanno rilevato una tendenza sull'aumento delle fibre di tipo 1 e quindi sul contenuto di isoforme MHC 1, in seguito a *resistance training*. I dati riportati dalla maggior parte di studi presenti in letteratura indicano essenzialmente un aumento delle fibre di tipo 2A in seguito a *shift* dall'isoforma MHC 2X all'isoforma MHC 2A relativamente ad un allenamento di forza o qualsiasi allenamento che sia sufficientemente duraturo e intenso, mentre è stato osservato che un allenamento di *endurance* induce trasformazioni di fibre dal tipo 2 al tipo 1 (Kesidis et al., 2008).

Un ulteriore livello di indagine è stato lo studio di come si distribuissero le isoforme MHC per ciascun soggetto, per valutare il grado di variabilità presente, in modo analogo alla variabilità riscontrata dall'analisi dei parametri contrattili.

Abbiamo notato nella maggior parte dei soggetti una riduzione dell'isoforma *fast* MHC 2X ed un aumento dell'isoforma MHC 2A ed 1, anche se l'entità di tali modificazioni, dalla condizione pre alla condizione post, varia da soggetto a soggetto.

Un ultimo risultato che richiede un commento in questa sede riguarda la colorazione dei nuclei delle singole fibre muscolari dissezionate a partire da biopsie di alcuni dei soggetti sia prima che dopo allenamento. E' apparso chiaro l'effetto ipertrofico, e quindi la risposta adattativa del muscolo, indotto da *resistance training* e il numero dei nuclei presenti è risultato essere significativamente maggiore nelle fibre post a confronto delle fibre pre.

Variazioni dei parametri contrattili e molecolari nelle fibre muscolari dopo attività ad alta quota

Nella terza fase della nostra ricerca abbiamo indagato la risposta muscolare in un gruppo di alpinisti sottoposti ad allenamento effettuato in alta quota. Come spiegato nella introduzione le attese basate sulla letteratura disponibile portavano in direzione di una perdita di forza e di massa dei muscoli e delle fibre. Invece, dalle misure dei parametri contrattili non abbiamo evidenziato nessun calo di tensione isometrica (P_o), ma al contrario i dati mostrano una tendenza, seppur molto lieve, di aumento (Fig. 48). Significativo e inaspettato è risultato l'aumento dei valori di *cross sectional area*, ad indicare un effetto ipertrofico (Fig.49) invece che atrofico come ci saremmo attesi, considerando che i soggetti hanno soggiornato in ambiente ipossico ad un'altezza di circa 5000 m per un lungo tempo. Siamo andati quindi a valutare più in dettaglio le variazioni di CSA a livello dei vari tipi di fibre. Sono stati riscontrati aumenti significativi della sezione trasversale delle fibre contenenti l'isoforma MHC 1 e caratterizzate da un metabolismo ossidativo, e delle fibre contenenti l'isoforma MHC 2A. Anche le fibre di tipo 2X e miste 1 2A hanno mostrato aumenti, non significativi, le fibre miste 2A 2X, invece, mostrano una lieve riduzione.

L'analisi effettuata soggetto per soggetto mostra un aumento di tensione sviluppata (P_o) dopo la spedizione in tre di questi, mentre nei soggetti rimanenti risulta leggermente diminuita. Analogamente alla tensione isometrica non ci sono significative variazioni nei valori di CSA dei singoli soggetti, forse per lo scarso numero di fibre, ad eccezione del soggetto S8 in cui l'aumento della *cross sectional area* è risultato significativo. Sulla base di questi risultati possiamo ipotizzare che la forza muscolare totale post spedizione non sia cambiata in modo significativo rispetto alla fase iniziale. In altri termini, non c'è stata alcuna perdita di prestazione contrattile. Inoltre i nostri dati non danno alcuna indicazione di atrofia a livello di fibra, ma in generale una tendenza alla crescita o ipertrofia.

La distribuzione percentuale dei vari tipi di fibra pre e post spedizione, evidenziata per ciascun alpinista (Fig. 64), indica un trend generale di aumento della isoforma *slow* della miosina dopo la spedizione per tutti i soggetti, a cui si accompagna una riduzione delle isoforme *fast* MHC 2A e 2X.

La distribuzione percentuale totale delle catene pesanti correla con quanto evidenziato per ciascun soggetto mostrando sempre un aumento significativo dell'isoforma MHC 1 e riduzioni non significative delle isoforme MHC 2A e 2X (Fig.65).

Dalle biopsie muscolari degli alpinisti sono state condotte ulteriori analisi per visualizzare anche il pattern di migrazione delle diverse isoforme delle catene leggere della miosina (MLC) soffermandoci sulle isoforme regolatorie (*fast e slow*) MLC2s e MLC2f, e poter poi valutare la loro distribuzione percentuale sia totale che per ciascun soggetto mediante analisi densitometrica al fine di confrontare la coespressione delle isoforme MLC con le isoforme MHC ed individuare anche per catene leggere possibili *switch* tra i due gruppi pre e post-spedizione. Queste ultime due isoforme vengono fosforilate e il processo di fosforilazione correla con il potenziamento della forza, evidenziato da studi *in vitro* su singole fibre *skinned*. Come per le isoforme MHC, anche per le isoforme regolatorie delle catene leggere MLC è stato riscontrato un incremento nella percentuale dell'isoforma *slow* MLC2s ed una concomitante riduzione delle isoforme *fast* MLC2f per ciascun soggetto (Fig. 68) dopo la spedizione. Dall'analisi densitometrica totale (Fig. 69) sia l'aumento nella percentuale dell'isoforma *slow* che la riduzione della *fast* risulta statisticamente significativo. Sulla base dei dati riportati, è stata dunque riscontrata una correlazione tra la distribuzione delle isoforme MLC e quella delle MHC.

I risultati ottenuti sono in disaccordo con quanto riportato da numerosi studi presenti in letteratura i quali riportano, sia negli uomini che nei ratti, una riduzione della componente lenta e ossidativa accompagnata da un aumento della componente rapida glicolitica (*De Palma et al., 2007; Abdelmalki et al., 1996*). I cambiamenti muscolari osservati nell'uomo sono stati riprodotti in ratti dove l'adattamento ad ipossia cronica (2-3 mesi) è stato caratterizzato da atrofia, transizione del tipo di fibre in senso *slow to fast* e *shift* verso un metabolismo glicolitico (*Itoh et al., 1990*).

Hoppeler e collaboratori (2001) indicano una riduzione della CSA delle miofibre ed un conseguente aumento indiretto della densità capillare in seguito ad ipossia da altitudine, ed una riduzione del 30% dei mitocondri, quindi delle capacità ossidative del muscolo. Tuttavia, secondo altri lavori, la capacità ossidativa dopo esercizio condotto in alta quota sembrerebbe rimanere invariata (*Leon-Velarde et al., 1993*) o addirittura aumentata (*Gimenez et al., 1977*). Una spiegazione per queste discrepanze potrebbe derivare dal fatto che gli adattamenti

all'ipossia sono muscolo specifici e forse anche diversificati in base alle zone/regioni all'interno di uno stesso muscolo (Deveci et al., 2001). Muscoli lenti e rapidi rispondono diversamente all'esposizione all'ipossia (Faucher et al., 2005). In questo studio, nella regione ossidativa interna al muscolo preso in considerazione (muscolo plantare), l'atrofia e l'angiogenesi hanno indotto un miglioramento della capillarizzazione. Nella regione superficiale e glicolitica invece non si è evidenziata angiogenesi ma, a dispetto di quanto ci si aspettasse, un aumento del 25% della capacità ossidativa, indice pertanto di una biogenesi mitocondriale. In ratti esposti ad una altitudine di 5500 m per 90 giorni, non sono state evidenziate variazioni nelle vie glicolitiche anaerobiche, e la tensione tissutale dell'ossigeno è rimasta significativamente al di sotto dei valori di controllo (Gonzalez et al., 1993). L'assenza di profondi cambiamenti nella *pathway* glicolitica è in accordo col fatto che a 5500 m il normale consumo di ossigeno e il metabolismo aerobico vengono mantenuti.

Dalle analisi effettuate su muscoli degli arti inferiori in seguito ad allenamento in condizioni ipossiche, Terrados e collaboratori (1990) hanno riportato una capacità di lavoro aumentata rispetto ad un allenamento condotto in condizioni normossiche. Da ciò si evidenzia che il normale consumo di ossigeno e i processi metabolici aerobici sono ben mantenuti ad un'altitudine di 5500 m, il che suggerisce inoltre il ruolo dominante dei processi aerobici nell'acclimatazione a tali quote (Oua et al, 2004). Pertanto tutto ciò supporterebbe i dati del nostro studio effettuati su un gruppo di alpinisti sottoposti ad esercizio ad un'altitudine simile a quella riportata dai suddetti studi.

L'opinione derivata da queste osservazioni è che le modificazioni muscolari ad un livello medio di ipossia producano uno *shift* del fenotipo muscolare nella direzione lento-ossidativo. Al contrario, l'ipossia estrema potrebbe indurre un maggiore *shift* in direzione rapida e anaerobica. In questo contesto, l'esercizio sembra modificare queste risposte migliorando l'adattamento ad una ipossia moderata (2500-4000 m) e prevenendo l'atrofia delle fibre muscolari. Sono stati infatti mostrati aumenti della massa muscolare in seguito ad *endurance training* condotto ad alta quota. *Il resistance training* non ha indotto una ipertrofia superiore a quella indotta in condizione di normossia, ha mostrato tuttavia effetti molecolari evidenti (Flueck, 2009).

Sulla base delle conclusioni di questo, e di altri studi che supportano tali evidenze, l'ipossia viene considerata lo stimolo maggiore per gli aumenti, indotti da esercizio fisico, dell'attività

di enzimi mitocondriali (*Bigard et al., 1991; Desplanches et al., 1993*). Ciò suggerisce e supporta la validità dell'allenamento in ambiente ipossico quale quello dato dall'alta quota (*Takahashi et al., 1995*).

È importante considerare sempre che, come nella maggior parte delle risposte adattative, anche l'adattamento ad una condizione ipossica dipende da numerosi fattori ed esiste un'enorme variabilità di risposta individuale e il processo di acclimatazione può essere più o meno rapido o completo in soggetti diversi.

Conclusioni

Sulla base delle osservazioni e dei risultati ottenuti dopo aver studiato le risposte plastiche a livello di singole fibre muscolari scheletriche nell'uomo, sottoponendo il muscolo a tre differenti stimoli adattativi, possiamo schematicamente riassumere le nostre conclusioni come segue.

Risposta muscolare al processo di invecchiamento: la perdita di massa muscolare, in seguito ad alterazioni di tipo quantitativo legate alla comparsa di atrofia, sembra essere la componente critica del processo sarcopenico, in quanto non sono state riscontrate alterazioni qualitative. Anzi, l'essenza di variazioni significative nei parametri di tensione isometrica (P_0) suggerirebbe che le componenti meccaniche che regolano le proprietà contrattili nelle fibre muscolari *slow* e *fast* non vengano alterate dall'età. Ciò implica che le proteine miofibrillari responsabili del processo di contrazione muscolare rimangano intatte e funzionali in soggetti anziani. Inoltre la similarità dei valori contrattili a differenti età farebbe supporre che il volume delle fibre venga regolato in modo da alterare l'architettura ultrastrutturale, ma preservare la densità del materiale contrattile.

Risposta muscolare dopo resistance training: analogamente a quanto riportato in letteratura, relativo soprattutto a studi condotti su muscoli degli arti inferiori, anche per i muscoli dell'arto superiore si evidenzia ipertrofia con parallelo aumento di forza assoluta.

Un aspetto importante è la notevole variabilità individuale della risposta adattativa a tale stimolo, riscontrata dall'analisi effettuata su ciascun soggetto; questo fenomeno si spiega

considerando in primo luogo un diverso background genetico ed una diversa capacità intrinseca a ciascun individuo di rispondere ad un dato stimolo, altri fattori quali diverse esperienze sportive, il sesso e la nutrizione possono concorrere ad influenzare tale diversità. Considerando l'*intake proteico*, invece, i nostri risultati non hanno evidenziato un significativo effetto sinergico combinato all'allenamento, l'assunzione proteica dunque non ha apportato differenze rispetto a ciò che si è ottenuto con il solo *resistance training*.

A livello molecolare si è evidenziato un generale *shift* in senso *fast to slow*.

Risposta muscolare dopo allenamento ad alta quota: non si è evidenziata alcuna perdita di prestazione contrattile, né sono stati riscontrati dati relativi all'insorgenza di atrofia muscolare. Al contrario è stata individuata una generale tendenza alla crescita (ipertrofia), con un aumento, a livello molecolare, della presenza di fibre contenenti l'isoforma MHC 1 ed una concomitante riduzione delle fibre contenenti le isoforme MHC 2A e 2X. Tali risultati portano a supporre che l'allenamento condotto in condizione di ipossia non estrema, induca a livello muscolare uno *shift* del metabolismo enzimatico verso una maggiore condizione ossidativa, supportando la validità dell'allenamento in ambiente ipossico quale quello dato dall'alta quota.

BIBLIOGRAFIA

Abdelmalki A, Fimbel S, Mayet-Sornay MH, Sempore B, Favier R (1996). **Aerobic capacity and skeletal muscle properties of normoxic and hypoxic rats in response to training.** Pflugers Arch 431: 671–679.

Andersen Lars L., Andersen Jesper L., Magnusson S. Peter, Suetta Charlotte, Madsen Jorgen L., Christensen Lasse R., Aagaard Per (2005). **Changes in the human muscle force-velocity relationship in response to resistance training and subsequent detraining.** J. Appl. Physiol 99: 87-94.

Andersen J. L., T. Gruschy-Knudsen, C. Sandri, L. Larsson, S. Schiaffino (1999). **Bed rest increases the amount of mismatched fibers in human skeletal muscle.** J. Appl. Physiol. 86(2): 455-460.

Andersen J. L., Schiaffino S. (1997). **Mismatch between myosin heavy chain mRNA and protein distribution in human skeletal muscle fibers.** Am. J. Physiol. 272 (Cell Physiol. 41): C1881-C1889.

Anthony A. Vandervoort (2001). **Aging of the human neuromuscular system.** Muscle and Nerve.

Aoyagi Y., Shephard R. J. (1992). **Aging and muscle function.** Sports Med 14, 376-396.

Ballard T, Clapper J, Specker B, Binkley T, Vukovich M (2005) **Effect of protein supplementation during a 6-mo strength and conditioning program on insulin-like growth factor I and markers of bone turnover in young adults.** Am J Clin Nutr 81: 1442–1448.

Bangart J. J., Widrick J. J., Fitts R. H. (1997). **Effect of altered loading states on muscle plasticity: what have we learned from rodents?** Med Sci Sports Exerc 28, S101-106.

Barany M. (1967). **ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening.** J. Gen. Physiol. 50: 197-218.

Barazzoni Rocco, Kevin R. Short, and K. Sreekumaran Nair (2000). **Effects of Aging on Mitochondrial DNA Copy Number and Cytochrome c Oxidase Gene Expression in Rat Skeletal Muscle, Liver, and Heart.** THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 275, No. 5.

Beccafico S., Puglielli C., Pietrangelo T., Bellomo R., Fanò G., Fulle S. (2007). **Age-dependent effects on functional aspects in human satellite cells.** Ann. N. Y. Acad. Sci. 1100: 345-352.

Berg H. E., Tesch P. A. (1996). **Changes in muscle function in response to 10 days of lower limb unloading in humans.** Acta Physiol Scand 157, 63-70.

Berne Robert M. and Matthew N. Levy. **Principi di Fisiologia.** Casa Editrice Ambrosiana.

Bigard AX, Brunet A, Guezennec CY, Monod H. (1991). **Skeletal muscle changes after endurance training at high altitude.** J Appl Physiol. 71(6):2114-21.

Bottinelli, R., Betto, R., Schiaffino, S., Reggiani, C., (1994a). **Maximum shortening velocity and coexistence of myosin heavy chain isoforms in single skinned fast fibres of rat skeletal muscle.** J Muscle Res Cell Motil 15, 413-419.

Bottinelli R., Canepari M., Pellegrino M. A., Reggiani Carlo (1996). **Force-velocity properties of human skeletal muscle fibres: myosin heavy chain isoform and temperature dependance.** J. Physiol (Lond) 495, 573-586.

Bottinelli Roberto e Carlo Reggiani (2000). **Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity.** Progress in Biophysics & Molecular Biology 73, 195±262.

Bottinelli R., Pellegrino M. A., Canepari M., Rossi R., Reggiani C. (1999). **Specific contributions of various muscle fibres types to human muscle performance: an in vitro study.** J. Electromyogr Kinesiol 9:87-95.

Borsheim E., Aarsland A., Wolfe R. R. 2004 (2004). **Effect of an amino acid, protein, and carbohydrate mixture on net muscle protein balance after resistance exercise.** Int J Sport Nutr Exerc Metab;14(3):255-71.

Bouverot, P., (1985). **Adaptation to Altitude-Hypoxia in Vertebrates.** Springer-Verlag, Berlin.

Brooks SV, Faulkner JA (1994). **Skeletal muscle weakness in old age: underlying mechanisms.** Med Sci Sports Exerc. 26(4):432-9.

Calbet JA, Radegran G, Boushel R, Saltin B (2009). **On the mechanisms that limit oxygen uptake during exercise in acute and chronic hypoxia: role of muscle mass.** J Physiol 587: 477-490.

Campbell M. J., McCornas A. J., Petito F (1973). **Physiological changes in ageing muscles.** J Neurol Neurosurg Psychiatry 36, 174-182.

Campos Gerson E: R., Thomas J. Luecke, Heather K. Wendeln, Kumika Toma, Fredrick C. Hagerman, Thomas F. Murray, Kerry E. Ragg, Nicholas A. Ratamess, William J. Kraemer, Robert S. Staron (2002). **Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones.** Eur Appl Physiol, 88: 50-60.

Carrol C., Fluckey J., Williams R., Sullivan D., Trappe T (2005). **Human soleus and vastus lateralis muscle protein metabolism with an amino acid infusion.** Am J Physiol Endocrinol Metab 288: E479-E485.

Colliander EB, Tesch PA (1992). **Effects of detraining following short term resistance training on eccentric and concentric muscle strength.** Acta Physiol Scand 144: 23-29.

Conus NM, Hemmings BA, Pearson RB (1998) **Differential regulation by calcium reveals distinct signaling requirements for the activation of Akt and p70S6k.** J. Biol. Chem.; 273(8): 4776-82.

D'Antona Giuseppe, Maria Antonietta Pelegrino, Raffaella Adami, Rosetta Rossi, Carmine Naccari Carlizzi, Monica canepari, Bengt Saltin, Roberto Bottinelli (2003). **The effect of ageing and immobilization on structure and function of human skeletal muscle fibres.** J Physiol, 552.2, pp. 499-511.

Degens H, Sanchez Horneros JM, Hopman MT (2006). **Acute hypoxia limits endurance but does not affect muscle contractile properties.** Muscle Nerve 33: 532–537.

Degens H, Turek Z, Hoofd LJ, Van't Hof MA, Binkhorst RA (1992). **The relationship between capillarisation and fibre types during compensatory hypertrophy of the plantaris muscle in the rat.** J Anat 180: 455–463.

De Palma S, Ripamonti M, Vigano A, Moriggi M, Capitanio D, Samaja M, Milano G, Cerretelli P, Wait R, Gelfi C (2007). **Metabolic modulation induced by chronic hypoxia in rats using a comparative proteomic analysis of skeletal muscle tissue.** J Proteome Res 6: 1974–1984.

Desplanches D, Hoppeler H, Linossier MT, Denis C, Claassen H, Dormois D, Lacour JR, Geysant A (1993). **Effects of training in normoxia and normobaric hypoxia on human muscle ultrastructure.** Pflugers Arch 425(3-4):263-7.

Deveci D, Marshall JM, Egginton S (2001). **Relationship between capillary angiogenesis, fiber type, and fiber size in chronic systemic hypoxia.** Am J Physiol Heart Circ Physiol 281: H241–H252.

Draeger, A., Weeds, A.G., Fitzsimmons, R.B., (1987). **Primary, secondary and tertiary myotubes in developing skeletal muscle: a new approach to the analysis of human myogenesis.** J. Neurol. Sci. 81, 19±43.

Dunn SE, Chin ER, Michel RN (2000). **Matching of calcineurin activity to upstream effectors is critical for skeletal muscle fiber growth.** J Cell Biol 151: 663-672.

Edgerton V. R., Zhou M.-Y., Ohira Y., Klitgaard H., Jiang B., Bell G., Harris B., Saltin B., Gollnick P. D., Roy R. R., day M. K., Greenisen M. (1995). **Human fiber size and enzymatic properties after 5 and 11 days of spaceflight.** L. Appl. Physiol. 78: 1733-1739.

Edwards, H.T., (1936). **Lactic acid in rest and work at high altitude.** Am. J. Physiol. 116, 367–375.

Ennion S., Sant'Ana Pereira J., Sargeant A.J., Young A., Goldspink G., (1995). **Characterization of human skeletal muscle fibres according to the myosin heavy chain they express.** J. Muscle Res. Cell Motil. 16, 35±43.

Esmarck B., J. L. Andersen, S. Olsen, E. A. Richter, M. Mizuno, M. Kjær (2001). **Timing of postexercise protein intake is important for muscle hypertrophy with resistance training in elderly humans.** Journal of Physiology, 535.1, pp.301-311.

Fanò Giorgio, Patrizia Mecocci, Jacopo Vecchiet, Silvia Belia, Stefania Fulle, M. Cristina Polidori, Giorgio Felzani, umberto Senin, leonardo Vecchiet, M. Flint Beal (2001). **Age and sex influence on oxidative damage and functional status in human skeletal muscle.** Journal of Muscle Research and Cell Motility 22: 345–351.

Faucher M, Guillot C, Marqueste T, Kipson N, Mayet-Sornay MH, Desplanches D, Jammes Y, Badier M (2005). **Matched adaptations of electrophysiological, physiological, and histological properties of skeletal muscles in response to chronic hypoxia.** Pflugers Arch 450: 45–52.

Faulkner J. A., Brooks S. V., Zerba E. (1995). **Muscle atrophy and weakness with aging: contraction-induced injury as an underlying mechanism.** J Gerontol A Biol Sci Med Sci 50 Spec No, 124-129.

Ferrando A. A., Tipton K. D., Bamman M. M., Wolfe R. R. (1997). **Resistance exercise maintains skeletal muscle protein synthesis during bed rest.** J Appl Physiol 82:807-810.

Ferretti G, Hauser H, di Prampero PE (1990). **Maximal muscular power before and after exposure to chronic hypoxia.** Int J Sports Med 11, Suppl 1: S31–S34.

Fiatarone MA, Marks EC, Ryan ND, Meredith CN, Lipsitz LA, Evans WJ (1990). **High-intensity strength training in nonagenarians. Effects on skeletal muscle.** Jama 263: 3029-3034.

Fulle S., S. Di Donna, C. Puglielli, Tiziana Pietrangelo, Sara Beccafico, Rosa Bellomo, Feliciano Protasi, Giorgio Fano` (2005). **Age-dependent imbalance of the antioxidative system in human satellite cells.** Experimental Gerontology 40 189–197.

Gassman, M., Wenger, R.H., (1997). **HIF-1, a mediator of the molecular response to hypoxia.** NIPS 12, 214–218.

Gimenez M, Sanderson RJ, Reiss OK, Banchemo N (1977). **Effects of altitude on myoglobin and mitochondrial protein in canine skeletal muscle.** Respiration 34: 171–176.

Gingras A. C., Raught B., Gygi S. P., Niedzwiecka A., Miron M., Burley S. K., Polakiewicz R. D., Wyslouch-Cieszynska A., Aebersold R., Sonenberg N.(2001). **Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1.** Genes Dev 15(21):2852-64.

González B., P. Negro, R. Hernando, R. Manso (2002). **Protein variants of skeletal muscle regulatory myosin light chain isoforms: prevalence in mammals, generation and transitions during muscle remodelling.** Eur J Physiol 443:377-386.

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

Goldspink G, Yang SY. (2001) **Effects of activity on growth factor expression.** Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab. 11 Suppl: S21-7.

Gonzalez, N., Sokari, A., Clancy, R.L., (1991). **Maximum oxygen uptake and arterial blood oxygenation during hypoxic exercise in rats.** J. Appl. Physiol. 71, 1041–1049.

Gonzalez, N.C., Clancy, R.L., Wagner, P.D., (1993). **Determinants of maximal oxygen uptake in rats acclimatized to simulated altitude.** *J. Appl. Physiol.* 75, 1608–1614.

Haddad F, Qin AX, Zeng M, McCue SA, Baldwin KM (1998). **Effects of isometric training on skeletal muscle myosin heavy chain expression.** *J Appl Physiol* 84:2036–2041.

Harridge S. D. R., Bottinelli R., Canepari M., Pellegrino M. A., Reggiani C., Esbjornsson M., Saltin B. (1996). **Whole-muscle and single-fibre contractile properties and myosin heavy chain isoforms in human.** *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 432, 913–920.

Hayashi A. A., Proud C. G. (2007). **The rapid activation of protein synthesis by growth hormone requires signaling through mTOR.** *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.;* 292(6): E1647-55.

Hather B. M., Adams G. R., Tesch P. A., Dudley G. A., (1992). **Skeletal muscle responses to lower limb suspension in humans.** *J. Appl Physiol* 72, 1493-1498.

Hawke T.J et Garry D.J (2001). **Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology.** *J Appl Physiol*, 91:534-51.

Hikida R. S., Gollnick P. D., Dudley G. A., Convertino V. A., Buchanan P. (1989). **Structural and metabolic characteristics of human skeletal muscle following 30 days of simulated microgravity.** *Aviat Space Environ Med* 60, 664-670.

Hikida RS, Staron RS, Hagerman FC, Walsh SJ, Kaiser E, Shell S., Hervey S (2000). **Effects of high intensity resistance training in untrained older men. II. Muscle fiber characteristics and nucleo-cytoplasmic relationships.** *J Gerontol* 55A:B347-B354.

Holloszy JO, Booth FW (1976). **Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle.** *Annu Rev Physiol* 38:273-291.

Hoppeler H, Vogt M. **Muscle tissue adaptations to hypoxia.** *J Exp Biol* 2001; 204: 3133–3139.

Hopper KD, Abendroth CS, Sturtz KW, Matthews YL, Stevens LA, Shirk SJ (1993). **Automated biopsy devices: a blinded evaluation.** *Radiology.* Jun;187(3):653-60.

Hostler D., Schwirian C. I., Toma K., Crill M. T., Hagerman G. R., Hagerman F. C., Staron R. S. (2001). **Skeletal muscle adaptations in elastic resistance-trained young men and women.** *Eur J Appl Physiol* 86:112–118.

Howlett R. A., Hogan M. C. (2007). **Effect of hypoxia on fatigue development in rat muscle composed of different fiber types.** *Exp Physiol*, 92: 887–994.

Huang J. H., Hood D. A., (2009). **Age-associated mitochondrial dysfunction in skeletal muscle: Contributing factors and suggestions for long-term interventions.** *IUBMB* 61(3):201-14.

Itoh K, Moritani T, Ishida K, et al., (1990). **Hypoxia-induced fibre type transformation in rat hindlimb muscles. Histochemical and electro-mechanical changes.** *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 60: 331–336.

Jones D. A., Rutherford O. M., Parker D. F., (1989). **Physiological changes in skeletal muscle as a result of strength training.** *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 74, 233-256.

Kenessey A., Ojamaa K., (2006). **Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways.** *J Biol Chem* 281(30):20666-72.

Klitgaard H., Zhou M., Schiaffino S., Betto R., Salviati G., Saltin B. (1990). **Ageing alters the myosin heavy chain composition of single fibres from human skeletal muscle.** *Acta Physiol Scand* 140, 55-62.

Knutti D., Kralli A., (2001). **PGC-1, a versatile coactivator.** *Trends Endocrinol. Metab.* 12, 360-365.

Kohn Tertius Abraham e Myburghs Kathryn Helen (2006). **Electrophoretic Separation of Human Skeletal Muscle Myosin Heavy Chain Isoforms: The Importance of Reducing Agents.** *J. Physiol. Sci.* Vol. 56, No. 5; pp. 355–360.

Kraemer WJ, Koziris L.P., Ratamess N.A., Hakkinen K., Triplet-McBride N. T., Fry A. C., Gordon S. E., Volek J. S., French D. N., Rubin M. R., Gomez A. L., Sharman M. J., Michael L. J., Izquierdo M., Newton R. U., Fleck S. J (2002). **De training produces minimal changes in physical performance and hormonal variables in recreationally strength-trained men.** *J Strength Cond Res* 16: 373-382.

Larsson L., Li X and Frontera WR (1997). **Effects of aging on shortening velocity and myosin isoform composition in single human skeletal muscle cells.** *Am J Physiol* 272, C638-649.

Larsson L., Li X., Berg H. E., Frontera W. R. (1996). **Effects of removal of weight-bearing function on contractility and myosin isoform composition in single human skeletal muscle cells.** *Pflugers Arch* 432, 320-328.

Larsson, L., Moss, R.L., (1993). **Maximum Velocity of Shortening in Relation to Myosin Isoform Composition in Single Fibres From Human Skeletal Muscles.** *J. Physiol.* 472, 595±614.

Larsson L., Ansved T. (1995). **Effects of ageing on the motor unit.** *Prog Neurobiol* 45, 397-458.

Larsson L., Sjodin B., Karlsson J. (1978). **Histochemical and biochemical changes in human skeletal muscle with age in sedentary males, age 22-65 years.** *Acta Physiol Scand* 103, 31-39.

Latres E, Amini AR, Amini AA, Griffiths J, Martin FJ, Wei Y, Lin HC, Yancopoulos GD & Glass DJ (2005). **Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway.** *J Biol Chem* 280, 2737–2744.

Léger Bertrand , Romain Cartoni, Manu Praz, S'éverine Lamon, Olivier D'eriazi, Antoinette Crettenand, Charles Gobelet, Paul Rohmer, Michel Konzelmann, Francois Luthi, Aaron P. Russell (2006). **Akt signalling through GSK-3 β , mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy.** *J Physiol* 576.3 pp 923–933

Lecker SH, Solomon V, Mitch WE & Goldberg AL (1999). **Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states.** *J Nutr* 129, 227S–237S.

Leon-Velarde F, Sanchez J, Bigard AX, Brunet A, Lesty C, Monge C (1993). **High altitude tissue adaptation in Andean coots: capillarity, fibre area, fibre type and enzymatic activities of skeletal muscle.** *J Comp Physiol [B]* 163: 52–58.

Lenfant, C., Sullivan, K., (1971). **Adaptation to high altitude.** *N. Engl. J. Med.* 284, 1298–1309.

Lin J., Wu H., Tarr P. T., Zhang C. Y., Wu Z., Boss O., Michael L. F., Puigserver P., Isotani E., Olson E. N., Lowell B. B., Bassel-Duby R., Spiegelman B. M. (2002). **Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres.** *Nature* 418, 797-801.

Liu Y., A. Schlumberger, K. Wirth, D. Schmidtbleicher, J. M. Steinacker (2003). **Different effects on human skeletal myosin heavy chain isoform expression: strength vs. combination training.** J Appl Physiol 94: 2282-2288.

Lexell J. (1995). **Human aging, muscle mass, and fiber type composition.** J Gerontol A Bio Sci Med Sci 50, 11-16.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farral A.L., Randall R.J. (1951). **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** J. Biol. Chem. 193: 265-75.

McCarthy JP, Pozniak MA, Agre JC (2002). **Neuromuscular adaptations to concurrent resistance and endurance training.** Med Sci Sports Exerc 34:511–519.

Meissner Joachim D., Patrick K. Umeda, Kin-Chow Chang, Gerolf Gros, Renate J. Scheibe (2006). **Activation of the β Myosin Heavy Chain Promoter by MEF-2D, MyoD, p300, and the Calcineurin/NFATc1 Pathway.** Journal of Cellular Physiology.

Meissner Joachim D., HansPeter Kubis, Renate J. Scheibe and Gerolf Gros (2000). **Reversible Ca^{2+} induced Fast-to-slow transition in primary skeletal muscle culture cells at the mRNA level.** Journal of Physiology, 523.1, pp. 19-28.

Melov S., J. M. Shoffner, A. Kaufman and D. C. Wallace (1995). **Marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging human skeletal muscle.** Nucleic Acids Research, Vol. 23, No. 20.

Musarò A, Giacinti C, Borsellino G, Dobrowolny G, Pelosi L, Cairns L, Ottolenghi S, Cossu G, Bernardi G, Battistini L, Molinaro M, Rosenthal N. (2004) **Stem cell-mediated muscle regeneration is enhanced by local isoform of insulin-like growth factor 1.** Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.; 101(5): 1206-10.

Narici M. V., Kayser B., Barattini P., Cerretelli P. (1997). **Changes in electrically evoked skeletal muscle contractions during 17-day spaceflight and bed rest.** Int J Sports Med 18 Suppl 4, S290-292.

Nikolaos Kesidis, Thomas I. Metaxas, Ioannis S. Vrabas, Panagiotis Stefanidis, Efstratios Vamvakuodis, Kosmas Christoulas, Athanasios Mandroukas, Dimitrios Balasas, Konstantinos Mandroukas (2008). **Myosin heavy chain isoform distribution in single fibres of bodybuilders.** Eur J Appl Physiol, 103:579-583.

Ou L. C., Leiter J. C., (2004). **Effects of exposure to a simulated altitude of 5500 m on energy metabolic pathways in rats.** *Respiratory physiology and neurobiology* 141 59-71.

Owino V, Yang SY, Goldspink G. (2001). **Age-related loss of skeletal muscle function and the inability to express the autocrine form of insulin-like growth factor-1 (IGF) in response to mechanical overload.** *FEBS Lett.*; 505(2): 259-63.

Parise G, Brose AN, Tarnopolsky MA (2005). **Resistance exercise training decreases oxidative damage to DNA and increases cytochrome oxidase activity in older adult.** *Exp Gerontol* 40: 173-180.

Pette, D., Staron, R.S., (1997). **Mammalian skeletal muscle fiber type transitions.** *Int. Rev. Cytol.* 170, 143±223.

Phillips S., Tipton K., Aarsland A., Wolf S., Wolfe R. (1997). **Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans.** *Am J Physiol* 273: E99-E107.

B Polla, G D'Antona, R Bottinelli, C Reggiani (2009). **Respiratory muscle fibres: specialisation and plasticity.** *Thorax* 2004;59:808–817.

Putman Charles T, Xinhao Xu, Ellen Gilles, Ian M. MacLean, Gordon J. Bell (2004). **Effects of strength, endurance and combined training on myosin heavy chain content and fibre-type distribution in humans.** *Eur Appl Physiol*, 92:376-384.

Rasmussen B., Tipton K., Miller S., wolf S., Wolfe R. (2000). **An oral essential amino acid carbohydrate supplement enhances muscle protein anabolism after resistance exercise.** *J. Appl Physiol* 88: 386-392.

Reggiani Carlo, Roberto Bottinelli, and Ger J. M. Stienen (2000). **Sarcomeric myosin isoforms: fine tuning of a molecular motor.** *News Physiol. Sci.* Vol 15.

Reggiani Carlo e Francesco Mascarello (2004). **Fibre type identification and functional characterization in adult livestock animals.** *Muscle Development of Livestock Animals.*

Richardson RS, Noyszewski EA, Kendrick KF, Leigh JS, Wagner PD (1995). **Myoglobin O₂ desaturation during exercise. Evidence of limited O₂ transport.** *J Clin Invest* 96: 1916–1926.

Rindi G., Manni E.. **Fisiologia Umana.** UTET.

Rockl Katja S. C., Hirshman Michael F., Brandauer Josef, Fujii Nobuharu, Witters Lee A., Goodyear Laurie J. (2007). **Skeletal muscle adaptation to exercise training. AMP-activated protein kinase mediates muscle fiber type shift.** DIABETES vol 56 DOI: 10.2337/db07-0255.

Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD & Glass DJ (2001). **Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways.** *Nature Cell Biology*; 3: 1009-1013.

Ronn T., P. Poulsen, O. Hansson, J. Holmkvist, P. Almgren, P. Nilsson, T. Tuomi, B. Isomaa, L. Groop, A. Vaag, C. Ling (2008). **Age influences DNA methylation and gene expression of COX7A1 in human skeletal muscle.** Springer, *Diabetologia* 51:1159-1168.

Ryall James G., Schertzer Jonathan D., Lynch Gordon S. (2008). **Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness.** *Biogerontology* 10.1007/s10522-008-9131-0.

Saltin B., e Gollnick P. D. (1983). **Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance.** In: *Handbook of Physiology, Skeletal Muscle*, chap. 19. Edited by: American Physiological Society, Bethesda; Maryland, USA., 555-631.

Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH & Goldberg AL (2004). **Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy.** *Cell* 117, 399–412.

Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M., Wang, G.L., (1994). **Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1.** *J. Biol. Chem.* 269, 23757–23763.

Semenza, G.L., (2000). **HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia.** *J. Appl. Physiol.* 88, 1474–1480.

Schiaffino Stefano and Reggiani Carlo (1996). **Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance.** *Physiological Reviews*, Vol. 76, No 2.

Simon Melov, Mark A. Tarnopolsky, Kenneth Beckman, Krysta Felkey, Alan Hubbard (2007). **Resistance exercise reverses aging in human skeletal muscle.** *Plos One* 2(5): e465.

Short Kevin R., Maureen L. Bigelow, Jane Kahl, Ravinder Singh, Jill Coenen-Schimke, Sreekumar Raghavakaimal, K. Sreekumaran Nair (2005). **Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans**. PNAS 5618-5623 vol.102 no.15.

Smerdu V, Karsch-Mizrachi I, Campione M., Leinwand L., Schiaffino S. (1994). **Type IIX myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibres of human skeletal muscle**. Am J Physiol 267:C1723-C1728.

Staron RS, (1991). **Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in single human muscle fibers**. Histochemistry 96:21-24.

Stienen G. J., Kiers J. L., Bottinelli R., Reggiani C. (1996). **Miofibrillar ATPase activity in skinned human skeletal muscle fibres: fibres type and temperature dependance**. J Physiol (Lond) 493, 299-307.

Takayuki Akimoto, Steven C. Pohnert, Ping Li, Mei Zhang, Curtis Gumbs, Paul B. Rosenberg, R. Sanders Williams, Zhen Yan (2005). **Exercise stimulates Pgc-1 α transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway**. The journal of biological chemistry, vol. 280, no. 20, pp. 19587-19593.

Takahasci H, Asano K, Nakayama H (1995). **Effect of endurance training under hypoxic condition on oxidative enzyme activity in rat skeletal muscle**. Appl human Sci, 15(3):111-114.

Talbot, J.H., Dill, D.B., (1936). **Clinical observations at high altitude**. Am. J. Med. Sci. 192, 626–639.

Talmadge R. J and R. R. Roy (1993). **Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms**. Journal of Applied Physiology, Vol 75, Issue 5 2337-2340.

Towbin H. and Gordon J. (1984). **Immunoblotting and dot immunobinding-current status and outlook**. J Immunol Methods 4;72(2):313-40.

Thorstensson A., Grymby G., Karlsson J. (1976). **Force-velocity relations and fiber composition in human knee extensor muscles**. J Appl Physiol 40, 12-16.

Tothova Jana, Bert Blaauw, Giorgia Pallafacchina, Rüdiger Rudolf, Carla Argentini, Carlo Reggiani, Stefano Schiaffino (2006). **NFATc1 nucleocytoplasmic shuttling is controlled by nerve activity in skeletal muscle**. Journal of Cell Science 119, 1604-1611.

Trappe Scott, Philip Gallagher, Matthew Harber, John Carrithers, James Carrithers, James Fluckey, Todd Trappe (2003). **Single muscle fibre contractile properties in young and old men and women.** J Physiol, 552.2, pp. 47-58.

Willoughby D. S., Stout J. R., Wilborn C. D. (2007). **Effects of resistance training and protein plus amino acid supplementation on muscle anabolism, mass, and strength.** Amino Acids 32: 467-477.

Willoughby D. S., Nelson M. (2002). **Myosin heavy chain mRNA expression after a single session of heavy resistance exercise.** Med Sci Sports Exerc 34:1262-1269.

Weir EK, Lo´pez-Barneo J, Buckler KJ, et al (2005). **Acute oxygen-sensing mechanisms.** N Engl J Med; 353: 2042–2055.

Wust R. C. I, R. T. Jaspers, A. F. van Heijst, M. T. E. Hopman, L. J. C. Hoofd, W. J. van der Laarse, and H Degens (2009). **Region-specific adaptations in determinants of rat skeletal muscle oxygenation to chronic hypoxia.** Am J Physiol Heart Circ Physiol 297: H364–H374.

West J.B., (1991). Acclimatization and adaptation: Organ to cell. In: Lahiri S., Cherniack N.S., Fitzgerald R.S. (Eds.). **Response and Adaptation to Hypoxia: Organ to Organelle.** Oxford University Press, New York, pp. 177–190.

Widrick J. J., Romatowski J. G., Bain J. L., Trappe S. W., Trappe T. A., Thompson J. L., Costill D. L., Riley D. A., Fitts R. H. (1997). **Effect of 17 days of bed rest on peak isometric force and unloaded shortening velocity of human soleus fibers.** Am J Physiol 273, C1690-1699.

Widrick J. J., Knuth S. T., Norenberg K. M., Romatowski J. G., Bain J. L., Riley D. A., Karhanek M., Trappe S. W., Trappe T. A., Costill D. L., Fitts R. H. (1999). **Effect of a 17 day spaceflight on contractile properties of human soleus muscle fibres.** J Physiol (Lond) 516, 915-930.

APPENDICE

Pubblicazioni

1) Masticatory myosin unveiled: first determination of contractile parameters of muscle fibers from carnivore jaw muscles.

2) Effects of local vibrations on skeletal muscle trophism in elderly people: Mechanical, cellular, and molecular events.

Masticatory myosin unveiled: first determination of contractile parameters of muscle fibers from carnivore jaw muscles

Luana Toniolo, Pasqua Cancellara, Lisa Maccatrozzo, Marco Patruno, Francesco Mascarello and Carlo Reggiani

Am J Physiol Cell Physiol 295:1535-1542, 2008. First published Oct 8, 2008;
doi:10.1152/ajpcell.00093.2008

You might find this additional information useful...

This article cites 32 articles, 13 of which you can access free at:

<http://ajpcell.physiology.org/cgi/content/full/295/6/C1535#BIBL>

This article has been cited by 1 other HighWire hosted article:

Masticatory ('superfast') myosin heavy chain and embryonic/atrial myosin light chain 1 in rodent jaw-closing muscles

P. J. Reiser, S. Bicer, Q. Chen, L. Zhu and N. Quan
J. Exp. Biol., August 15, 2009; 212 (16): 2511-2519.

[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[PDF\]](#)

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajpcell.physiology.org/cgi/content/full/295/6/C1535>

Additional material and information about *AJP - Cell Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpcell>

This information is current as of December 29, 2009 .

Masticatory myosin unveiled: first determination of contractile parameters of muscle fibers from carnivore jaw muscles

Luana Toniolo,¹ Pasqua Cancellara,¹ Lisa Maccatrozzo,² Marco Patruno,² Francesco Mascarello,² and Carlo Reggiani¹

Departments of ¹Anatomy and Physiology and ²Experimental Veterinary Sciences, University of Padova, Padova, Italy

Submitted 10 February 2008; accepted in final form 26 September 2008

Toniolo L, Cancellara P, Maccatrozzo L, Patruno M, Mascarello F, Reggiani C. Masticatory myosin unveiled: first determination of contractile parameters of muscle fibers from carnivore jaw muscles. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C1535–C1542, 2008. First published October 8, 2008; doi:10.1152/ajpcell.00093.2008.—Masticatory myosin heavy chain (M MyHC) is a myosin subunit isoform with expression restricted to muscles derived from the first branchial arch, such as jaw-closer muscles, with pronounced interspecies variability. Only sparse information is available on the contractile properties of muscle fibers expressing M MyHC (M fibers). In this study, we characterized M fibers isolated from the jaw-closer muscles (*temporalis* and *masseter*) of two species of domestic carnivores, the cat and the dog, compared with fibers expressing slow or fast (2A, 2X, and 2B) isoforms. In each fiber, during maximally calcium-activated contractions at 12°C, we determined isometric-specific tension (P_0), unloaded shortening velocity (v_0) with the slack test protocol, and the rate constant of tension redevelopment (K_{TR}) after a fast shortening-relengthening cycle. At the end of the mechanical experiment, we identified MyHC isoform composition of each fiber with gel electrophoresis. Electrophoretic migration rate of M MyHC was similar in both species. We found that in both species the kinetic parameters v_0 and K_{TR} of M fibers were similar to those of 2A fibers, whereas P_0 values were significantly greater than in any other fiber types. The similarity between 2A and M fibers and the greater tension development of M fibers were confirmed also in mechanical experiments performed at 24°C. Myosin concentration was determined in single fibers and found not different in M fibers compared with slow and fast fibers, suggesting that the higher tension developed by M fibers does not find an explanation in a greater number of force generators. The specific mechanical characteristics of M fibers might be attributed to a diversity in cross-bridge kinetics.

force; shortening velocity

MYOSIN, THE MOTOR OF MUSCLE CONTRACTION, is a hexamer composed of two heavy subunits (MyHC) and four light subunits (MyLC). MyHCs are responsible for ATP hydrolysis and interaction with actin, and the regulated expression of MyHC isoforms with distinct enzyme and motor kinetics is a major mechanism of modulation of muscle fiber contractile performance.

In mammals, at least nine distinct genes coding for MyHC isoforms are expressed in skeletal muscles (1). They are grouped in clusters located in different chromosomes and forming three distinct subfamilies. 1) The subfamily of fast isoforms comprises genes coding for three isoforms (2A, 2X, and 2B) expressed in adult fast fibers of limb and trunk muscles and genes coding for extraocular, embryonic, and neonatal

isoforms. 2) The subfamily of cardiac isoforms is composed of two genes, coding for β /slow MyHC, expressed in cardiac muscle and in slow or type 1 fibers of skeletal muscles, and for α -MyHC, expressed in cardiomyocytes and in specialized skeletal muscles (masticatory, extraocular, and laryngeal), respectively. 3) Only the gene coding for the masticatory or M MyHC belongs to the third subfamily. This isoform represents a subfamily by itself not only because of the distinct chromosomal localization but also because sequence analysis carried out in cat, dog, and human shows a large diversity compared with all other MyHC isoforms (12, 15, 19); also phylogenetic comparisons point to its close link with MyHC isoforms present in distant animals as shark or crocodile and with nonmuscle isoforms (12, 19).

Masticatory MyHC has been first identified in cat temporalis muscle, more precisely in posterior temporalis bundle where it is expressed in all fibers (23) and has been defined as “superfast” because contraction time parameters of the motor units of the cat temporalis muscle were faster than those recorded in fast motor units of the limb muscles (29). A well-developed sarcoplasmic reticulum and a high (2–3 times higher than fast fibers in limb muscles) ATPase activity have been also observed in temporalis fibers (23). The most accepted name “M” derives from the exclusive localization of the expression in the masticatory muscles (12, 22). M MyHC is expressed in muscles derived from the first branchial arch, i.e., jaw-closer muscles as masseter, temporalis, pterygoideus medialis and lateralis, and also tensor veli palatini and tensor tympani, although with pronounced interspecies differences (12, 22). It is not expressed in jaw-depressor muscles despite the common embryological origin. In carnivores, jaw-closer muscles are virtually composed only by M fibers (i.e., fibers expressing M MyHC) possibly associated with few slow fibers, whereas, in primates, slow fibers and 2A fast fibers are also present, and, in marsupials, M fibers coexist with fibers expressing α - and β -MyHC (11).

No comprehensive studies on structure and function of fibers expressing M MyHC are presently available. There are indications that M MyHC combines with specific masticatory myosin light subunits (MyLC) (18) and integrates in the sarcomeric structure together with other specific masticatory isoforms as masticatory α -tropomyosin (22) and masticatory myosin-binding protein C (10, 31, 33). Although ATPase activity has been measured and found high both in M fibers (24) and in M myosin preparations (23), more limited information is available on the mechanical properties. Preliminary

Address for reprint requests and other correspondence: C. Reggiani, Dept. of Anatomy and Physiology, Via Marzolo 3, 35131 Padova, Italy (e-mail: carlo.reggiani@unipd.it).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

results based on the determination of f_{\min} (the frequency at which the dynamic stiffness of the active fiber reaches a minimum) and reported by Hoh in his review (12) suggest that cat fibers expressing M MyHC are not faster than fibers expressing 2A or 2X MyHC. In a recent presentation at the Biophysical Society Annual Meeting, Reiser and Bicer (21) have confirmed that the raccoon M fibers are not faster but develop a significantly higher force compared with slow and fast 2A fibers.

In view of the uncertainty still existing about the physiology of the fibers expressing M MyHC, we sought to extend our work on the contractile properties of dog muscle fibers (30) to include fibers expressing M MyHC. In addition, we decided to repeat a similar analysis also in cat muscle fibers, with the aim to confirm or disprove the conclusion reached in dog using a second species of common domestic carnivore. MyHC isoforms of the cat have been electrophoretically separated (14, 28), and three isoforms, i.e., one slow and two fast, 2A and 2X, respectively, have been identified in trunk and limb muscle fibers, whereas no information is available on force and shortening velocity of the corresponding fiber types.

MATERIALS AND METHODS

Sampling of dog and cat muscles. Muscle samples were collected from adult dogs and cats euthanized in accordance with institutionally approved protocols at the Veterinary Clinics of the University of Padova. The care and use of all of the animals in this project were in accordance with institutionally approved protocols. The muscle fibers described in this study originated from the eight dogs mentioned in our recent paper (30) and from four cats.

The following muscles were dissected to obtain samples with different composition in myosin isoforms: 1) *longissimus dorsi*, *diaphragm*, *soleus* (only in cats), *tibialis anterior* (only in dogs), and *semimembranosus* taken as examples of trunk and limb muscles, 2) *temporalis* and *masseter* sampled as specific sources of M fibers.

Dissected samples were divided in small bundles immersed in ice-cold skinning solution (see *Single fiber mechanics*.) with 50% glycerol and used for muscle fiber mechanics or frozen in isopentane cooled with liquid nitrogen for protein electrophoresis.

Gel electrophoresis. Muscle samples for protein electrophoresis were solubilized in Laemmli solution (Tris 62.5 mM pH 6.8, glycerol 10%, SDS 2.3%, β -mercaptoethanol 5%, with E-64 0.1% and leupeptin 0.1% as antiproteolytic factors). After being heated for 5 min at 80°C, appropriate amounts of the protein suspension were loaded onto polyacrylamide gels (about 1 μ g of total protein/lane). For isoform

identification in single fibers, segments 1–2 mm long were solubilized in 20 μ l of Laemmli solution, and 2–3 μ l were loaded onto gels. MyHC isoforms were separated on 8% polyacrylamide slab gels according to the protocol described previously (30).

MyHC concentration determination. In a subset of fibers, MyHC concentration was measured with a method based on electrophoretic separation and densitometry, derived from those described by Geiger et al. (8) and by D'Antona et al. (6). Briefly, the MyHC concentration in individual fiber segment was obtained as the ratio between the protein content and the volume. The volume was determined as the product of the segment length by the cross-sectional area (CSA), which, to increase the precision of the measurement for this particular set of fibers, was calculated assuming an elliptical shape. Both length and CSA were measured while the fiber segment was mounted by means of small aluminum clips in the experimental set up, as described below. The two diameters of the ellipsis were measured on a horizontal plane and on a vertical plane, respectively. The diameters on the horizontal plane were calculated as described below for CSA determination for mechanical studies, i.e., from video images taken at 400 \times magnification. The vertical diameter or depth was measured by carefully focusing on the top of the fiber and then on the bottom and measuring the distance between the two focus planes as proposed by Larsson and Moss (13). When the fiber segments were removed from the set up, care was taken to cut them along the edges of the clips and immerse them in precisely controlled volumes of Laemmli solution (10 μ l) enriched with antiproteolytic factors (see above). After solubilization (5 min at 80°C), a known fraction of such volume (2–3 μ l) was run on 10–20% polyacrylamide gradient gels together with known amounts of purified myosin (M-3889; Sigma, St. Louis, MO). Gels were then silver stained (Silver stain plus; Bio-Rad, Hercules, CA), and the brightness-area product (BAP, i.e., the product of the area of the band by the average brightness, subtracted local background after black-white inversion) of the MyHC band was determined with the accuracy of 1,200 dpi. The choice of the gradient gels was aimed to visualize all MyHC as a sharp single band, whereas the choice of silver staining was aimed to optimize the sensitivity of the method. The loading of known amounts of purified myosin provided the data to obtain, for each gel, a calibration curve that allowed the determination of the amount of myosin present in the fiber segment under investigation by interpolation. An example of calibration curve is depicted in Figure 6, A and B. As can be seen, the calibration curve showed a nonlinear trend over the whole range, likely due to saturation of the silver staining. Importantly, the amounts of MyHC from individual fiber segments fell in all cases in the initial steep part of the curve, where the sensitivity is higher. MyHC isoform composition of each fiber used for MyHC quantification was determined by 8% polyacrylamide gel electrophoresis on a second fraction of the sample.

Fig. 1. Electrophoretic separation of myosin heavy chain (MyHC) isoforms expressed in dog and cat muscles. Homogenates of whole muscle samples and single fibers (SF) from cat and dog muscles were run with the same protocol, as described in MATERIALS AND METHODS. In both species, the migration rate increases from 2A MyHC to 2X MyHC, M MyHC and slow MyHC. The migration rate of M MyHC is in both species intermediate between 2X and slow MyHC although it is closer to slow MyHC in the dog than in the cat. D, diaphragm; SM, semimembranosus; T, temporalis; M, masseter; LD, longissimus dorsi. In the lane D + M, samples of diaphragm and masseter are mixed together to better define the relative positions of the bands. Note that, in canine masseter and temporalis, M MyHC coexists with slow MyHC, whereas cat temporalis and masseter samples contain only M MyHC. Three dog and two cat SF are shown, and their MyHC isoform composition is indicated in parentheses.

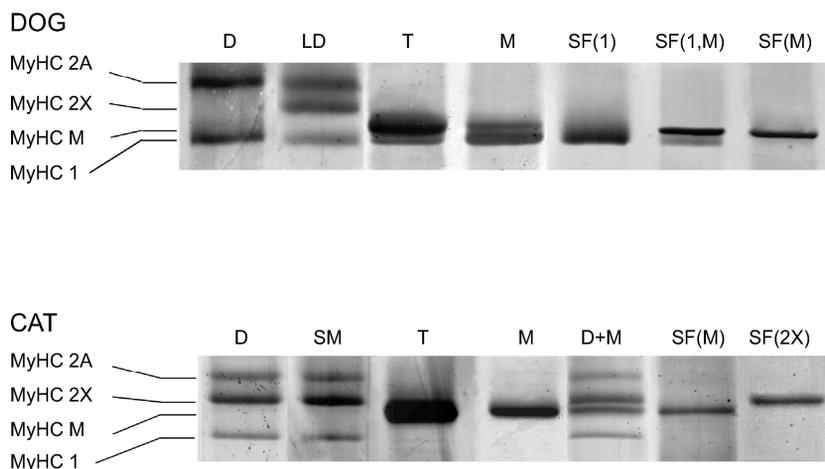


Table 1. List of single fibers dissected and successfully characterized from dog and cat skeletal muscles

| | M | 1-Slow | 2A | 2X | Hybrid |
|-------------------|----|--------|----|----|--------|
| Dog | | | | | |
| Temporalis | 34 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Diaphragm | 0 | 9 | 11 | 0 | 1 |
| Longissimus | 0 | 10 | 12 | 1 | 4 |
| Semimembranosus | 0 | 4 | 35 | 4 | 5 |
| Tibialis Anterior | 0 | 7 | 4 | 6 | 4 |
| Cat | | | | | |
| Temporalis | 53 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Masseter | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Diaphragm | 0 | 12 | 15 | 3 | 1 |
| Longissimus | 0 | 2 | 6 | 45 | 5 |
| Semimembranosus | 0 | 0 | 0 | 15 | 6 |
| Soleus | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 |

Fibers are classified on the basis of their MyHC isoform composition and of their muscle of origin. Hybrid fibers were discarded and not used for mechanical analysis or for myosin quantification.

Single fiber mechanics. Characterization of the contractile properties of single muscle fibers was carried out as recently described (30). Muscle fiber bundles were kept at -20°C in skinning solution without ATP mixed with 50% glycerol for no longer than 2 wk after sampling and, on the day of the experiment, were washed with ice-cold skinning solution containing ATP. Single fibers were manually dissected under a stereomicroscope (10–60 \times magnification) and bathed for 30 min in skinning solution containing 1% Triton X-100 to ensure membrane solubilization; fiber segments of 1–2 mm length were then cut, and light aluminum clips were applied at both ends.

Skinning, relaxing, preactivating, and activating solutions employed in single fiber experiments were prepared as previously described (3). The pH of all solutions was adjusted to 7.0 at the temperature at which solutions were used (12°C or 24°C). Protease inhibitors (E64 10 μM and leupeptin 40 μM) were added to all solutions.

The fiber segments were transferred to the experimental set up and, with the help of the aluminum clips, mounted between the force

transducer (AME-801 SensorOne, Sausalito, CA) and the electromagnetic puller (SI, Heidelberg, Germany) equipped with a displacement transducer. Each fiber segment was mounted in relaxing solution at slack length and then stretched by $\sim 20\%$ to reach a sarcomere length close to 2.8 μm and at the same time avoid any increase in resting tension that might alter the results of the slack test protocol. A sarcomere length of 2.8 μm ensures that, during maximal isometric contraction, tension is developed at the upper edge of the plateau of the tension-length relation, taking into account that series compliance is extended by $\sim 5\%$ (see Ref. 30), and that shortening during slack test takes place over the plateau. Video images were collected at high (400 \times) magnification, and on such images sarcomere length and three diameters on the horizontal plane equally spaced along the segment were measured. CSA was calculated from the average of the three diameters assuming a circular shape without corrections for fiber swelling. As recently shown (5), the assumption of a circular shape leads to an overestimation of CSA by about 20%, without differences among fiber types. From relaxing solution, each segment was transferred into the preactivating solution for at least 2 min and then maximally activated by immersion in the activating solution (pCa 4.6). Relaxation was induced by returning the segment to relaxing solution, and the cycle activation-relaxation was repeated five or six times. During activation after maximal tension was achieved, a quick release (amplitude 7–15% of segment length) was performed to make the fiber slack and measure the time to tension redevelopment. From data of displacement and time to tension redevelopment, unloaded shortening velocity (v_o) and series elasticity were calculated according Edman's procedure [slack test protocol (7)]. In a separate maximal activation, the quick release was followed within 15 ms by a relengthening to initial length, and the rate constant of the subsequent tension redevelopment (K_{TR}) was determined as described by Brenner and Eisenberg (4). For K_{TR} calculation, the curve of tension redevelopment was fitted with a single exponential. Isometric tension (P_o , i.e., isometric force normalized to CSA) was calculated from the drop of force, which followed a quick release of amplitude sufficient to make the fiber slack. At the end of the mechanical experiment, all fibers were stored in Laemmli solution for electrophoretic identification of MyHC isoforms.

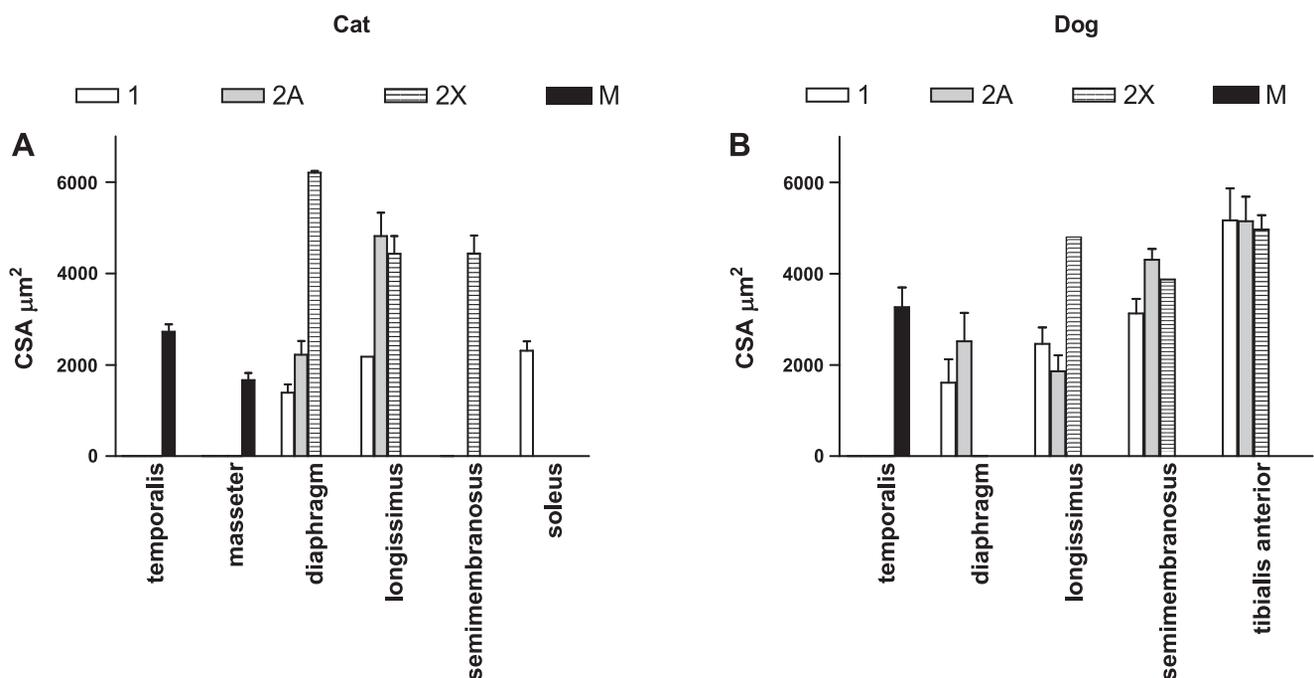


Fig. 2. Cross-sectional area (CSA) of the cat (A) and dog (B) fibers classified according to muscle of origin and MyHC isoform composition. Values are means \pm SE.

Statistical analysis. Data were expressed as means and standard errors. One-way ANOVA, followed by Newman-Keuls test, was used for comparison among fiber types. Statistical significance was set at $P < 0.05$. The Prism software (GraphPad, San Diego, CA) was utilized for linear and nonlinear fitting and statistical analysis.

RESULTS

A total of 345 fibers were dissected from cat and dog muscles and successfully characterized. Gel electrophoresis was employed to identify after the mechanical experiment which isoform was present in each muscle fiber segment. Figure 1 shows examples of MyHC isoform separation and identification in dog and cat muscles. The identification of canine MyHC isoforms was based on previously published evidence (2, 30) that shows that M MyHC migrates just above slow MyHC. Canine masseter and temporalis muscles express minor amounts of slow MyHC in addition to the predominant M MyHC (see Figure 1). For the cat, the three main isoforms

were identified in agreement with previous studies (14, 28). The band corresponding on the gels to M MyHC was identified on the basis of its unique pattern of expression since M MyHC is virtually the only isoform expressed in the posterior bundle of temporalis muscle (23) and is not expressed in any trunk or limb muscle. The electrophoretic band of the feline M MyHC was found to be above the band of the slow isoform and below the band of 2X MyHC.

The distribution of the fibers classified on the basis of their MyHC isoform composition is reported in Table 1. Only M fibers were dissected from cat masseter and temporalis, whereas, in dog temporalis, two hybrid fibers containing slow and M MyHC were found. In trunk and limb muscles, the most abundant fiber type was 2A in the dog (68% of the fibers analyzed) and 2X in the cat (52%). Both in *longissimus* and *semimembranosus* 2X fibers were predominant in the cat, whereas 2A were predominant in the dog. A few 2X fibers were found in feline diaphragm but none in canine diaphragm.

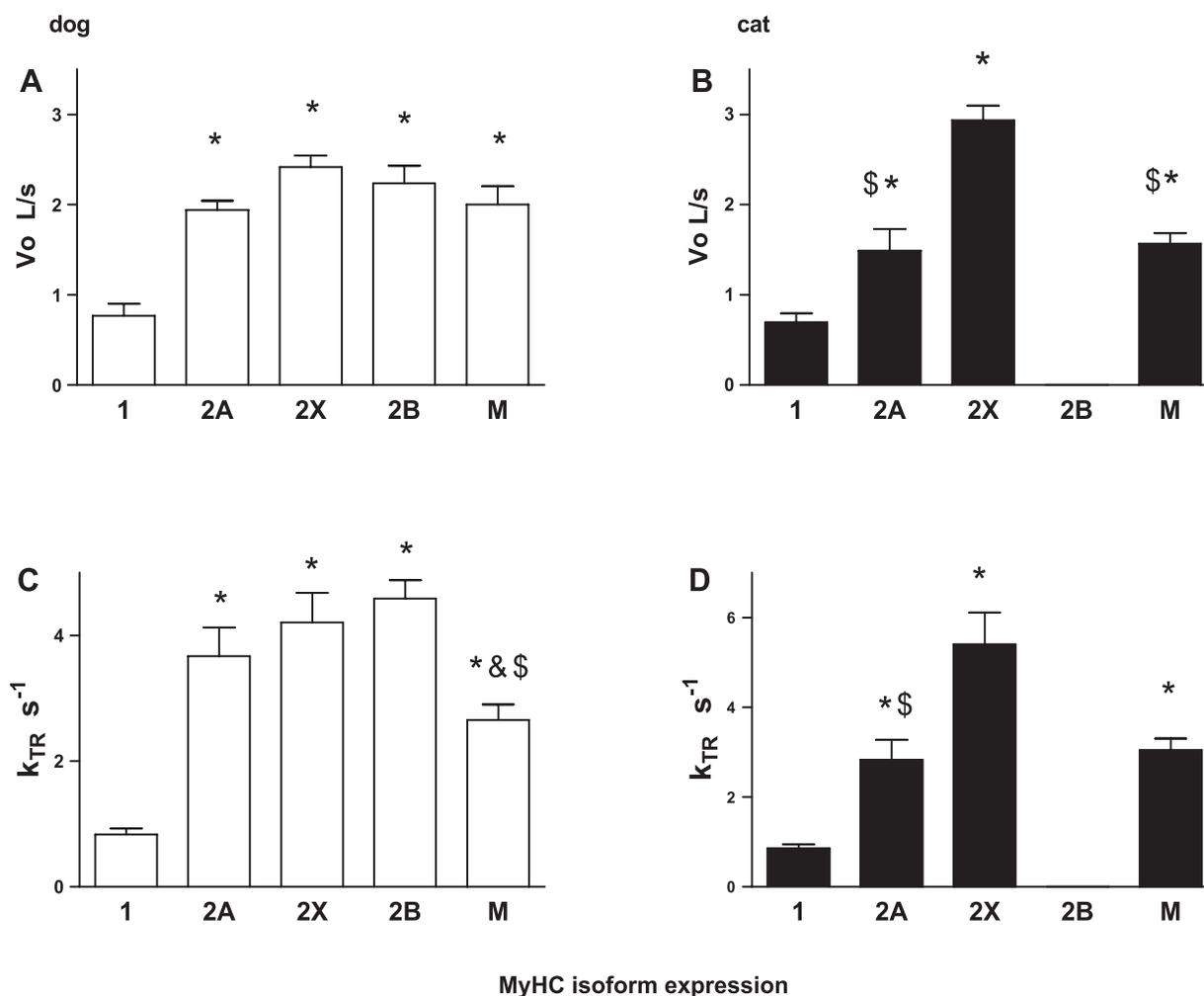


Fig. 3. Kinetic parameters of single muscle fibers from cat and dog muscles classified on the basis of their MyHC isoform composition. Histograms on the left (A, C) show dog fibers, and histograms on the right (B, D) show cat fibers. Note that values from 2B fibers are shown for the dog, where pure 2B fibers were found in laryngeal muscles and mechanically characterized, whereas no 2B fibers were found in cat muscles. The upper histograms show the average (with SE) values of unloaded shortening velocity (v_o), and the lower histograms show average values of rate constant of tension development (k_{TR}). *Significantly different from type 1 fibers. \$Significantly different from type 2X fibers. &Significantly different from type 2B fibers. Numbers of fibers for each group for dog were 21 slow fibers, 62 2A fibers, 11 2X fibers, 4 2B fibers, and 34 M fibers. Numbers of fibers for each group for cat were 17 slow fibers, 12 2A fibers, 29 2X fibers, and 50 M fibers.

Figure 2 shows the average values of CSA of the fibers studied in mechanical experiments classified on the basis of their MyHC isoform composition and muscle of origin. As can be seen, the thickness of M fibers was comparable to that of slow fibers and lower than that of fast fibers, particularly of 2X fibers.

Figure 3 shows the values of the kinetics parameters, which characterize various fiber types in dog and cat muscles at 12°C. For dog also the average values of a small group of 2B fibers dissected from laryngeal muscles are reported for the sake of comparison (see Ref. 30). No evidence of the presence of 2B fibers in cat muscles is hitherto available. In both animal species, slow fibers showed significantly lower v_o and lower K_{TR} than any fast fiber. In addition, a significant difference in v_o and K_{TR} values was found between 2A and 2X fibers in the cat but not in the dog. Importantly, in both animal species, the kinetic parameters v_o and K_{TR} of M fibers were virtually identical to those of 2A fibers.

The values of isometric tension, i.e., force normalized to CSA, P_o , are reported in Fig. 4. In both species, the isometric tension generated by M fibers was significantly greater than those of any other fiber type.

To explore the possibility that a differential sensitivity to temperature was responsible for the higher isometric tension developed by M fibers, a separate set of cat fibers was studied at 24°C. The results are shown in Fig. 5. As can be seen, M fibers developed significantly higher tension than slow and 2A fibers also at 24°C, but the difference with 2X fibers was below the statistical significance. The ratio between the isometric tension developed at 24°C and that developed at 12°C was 1.67 for M fibers, 2.10 for 2X fibers, 1.82 for 2A fibers, and 1.32 for slow fibers. A pronounced diversity in the kinetic parameter K_{TR} was present at 24°C among the four fiber types, 2X fibers showing the highest value, slow fibers the lowest, and 2A and M fibers similar intermediate values. The ratio between K_{TR} values at 24°C and those measured at 12°C ranged between 1.94 and 3.33.

In the fibers studied in mechanical experiments at 24°C, myosin concentration was determined to ascertain whether the

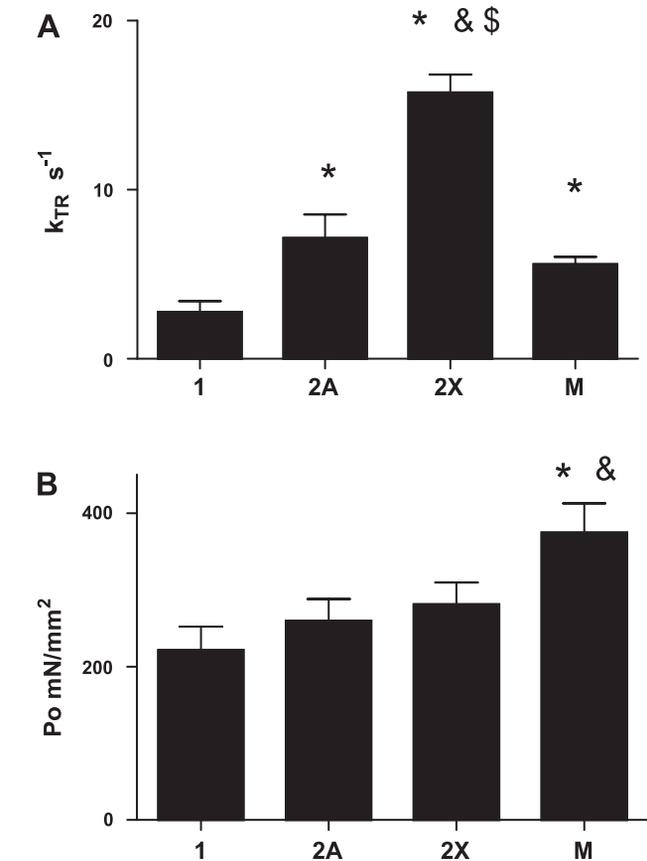


Fig. 5. Isometric tension (P_o) (B) and rate of tension redevelopment (K_{TR}) (A) measured in cat single fibers at 24°C. Values are means \pm SE. *Significantly different from type 1 fibers; \$significantly different from type M fibers. &Significantly different from type 2A fibers. M fibers, $n = 23$; 2X fibers, $n = 23$; 2A fibers, $n = 9$; slow or 1 fibers, $n = 8$.

diversity in P_o values among fiber types could be ascribed to different myosin concentrations. The results are reported in Fig. 6C and show that no significant difference was present among the four groups of fibers studied.

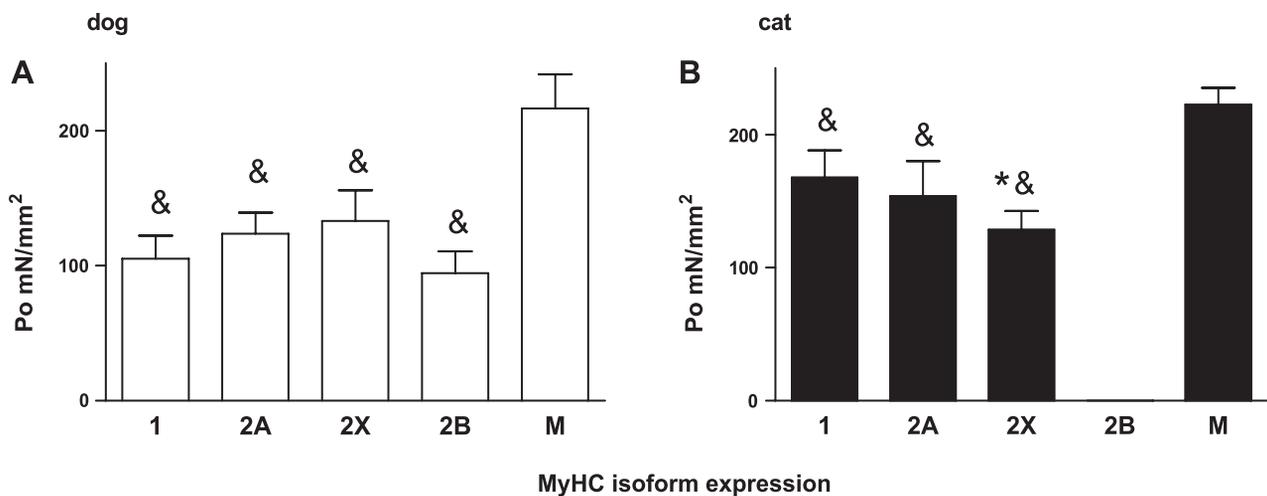


Fig. 4. Isometric tension (P_o) developed by single muscle fibers from cat and dog muscles classified on the basis of their MyHC isoform composition. A: dog fibers. B: cat fibers. Note that values from 2B fibers are shown for the dog, where pure 2B fibers were found in laryngeal muscles and mechanically characterized, whereas no 2B fibers were found in cat muscles. Values are means \pm SE. *Significantly different from type 1 fibers. &Significantly different from type M fibers. Number of fibers for each group is the same as in Fig. 3.

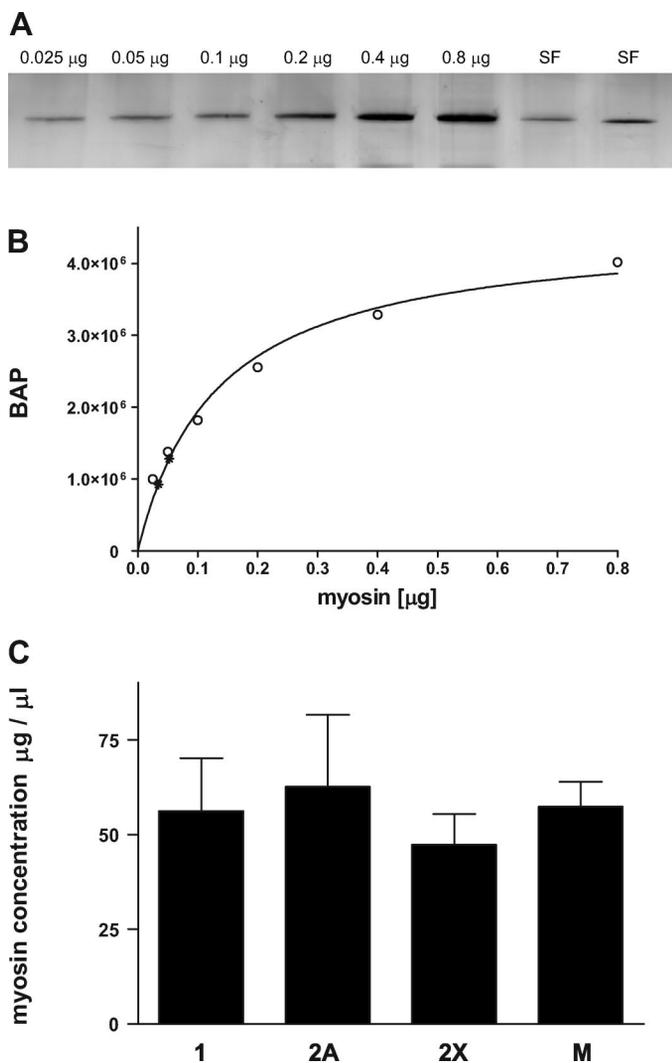


Fig. 6. Determination of myosin concentration in feline single muscle fibers. *A*: MyHC electrophoretic bands of 6 samples of purified myosins (amounts from 0.025 µg to 0.8 µg) loaded together 2 samples of single fiber preparations (SF). *B*: calibration curve obtained by plotting the densitometric measurements (BAP, brightness area product) vs. the amount of myosin loaded on the gel for the 6 samples of purified myosin. The curve was interpolated with the equation $Y = 4.5 \times 10^6 \times X / (0.13 + X)$ and used to obtain the amount of myosin present in the SF samples, which were 0.022 and 0.064 µg, respectively. Note that both SF samples (filled circles) fell inside the initial steep and almost linear region of the calibration curve. *C*: average values of myosin concentration in 4 groups of muscle fibers classified on the basis of their MyHC isoform composition. No significant difference is present among the 4 groups (M fibers, $n = 23$; 2X fibers, $n = 23$; 2A fibers, $n = 9$; slow or 1 fibers, $n = 8$).

DISCUSSION

The results obtained in the present study provide the first complete comparison between the contractile properties of the fibers expressing M MyHC and the fibers expressing common skeletal muscle isoforms, slow, 2A, and 2X in two carnivore species of great interest for biology as well as for veterinary medicine. In both species, the determination of v_o , maximum shortening velocity, with the slack test protocol showed that fibers expressing M MyHC shortened at zero load with a speed similar to that of fibers expressing 2A MyHC, the slower among the fast isoforms. The parameter K_{TR} , which reflects the rate of cross-bridge attachment and tension redevelopment,

was also similar in M fibers and 2A fibers. In contrast, the values of isometric tension, P_o , of M fibers were in both species higher than those of any other fiber type.

A second element of novelty in this study is given by the data on the contractile parameters of the fibers of cat trunk and limb muscles. Interesting comparisons can be made with muscle fibers of other species and in particular of the dog. In feline fibers, v_o increases regularly from slow to fast 2A to fast 2X as expected from previous observations in several species (17, 30). Only minor diversity in v_o values exists between corresponding fibers of the dog and the cat. According to the scaling principle (17, 30), similar values of kinetic parameters should imply an approximately similar body size. Actually, whereas the body mass of adult cats is rather consistent in all breeds, a large diversity in body mass is present among various dog breeds [see discussion in Toniolo et al. 2007 (30)]. It is thus uncertain which body size of the dog must be considered for interspecies comparison. Furthermore, although present results are far to be conclusive in this respect, cat muscles are expected to be faster because they are more rich in 2X fibers, whereas 2A fibers are predominant in dog muscles.

Muscles and muscle fibers are classified as fast or slow in relation to a number of distinct functional parameters: rate of tension rise and decline during isometric twitch, speed of shortening at low or zero load, and rate of ATP hydrolysis, just to mention a few. Jaw-closer muscles of carnivores have been defined fast or superfast muscles on the basis of the isometric twitch kinetics (29). They have also been considered fast in relation to the rate at which ATP is hydrolyzed by myosin alone (23) or by myosin integrated in skinned fibers (24). The parameters that characterize the contraction kinetics in maximally activated skinned fibers (v_o and K_{TR}) determined in the present study show, in substantial agreement with the available preliminary evidence on raccoon fibers (21) and on cat fibers (12), that M fibers are as fast as 2A fibers. A peculiar feature of M fibers is their ability to generate high specific tension (i.e., force normalized to CSA, P_o). The present results show that M fibers can achieve P_o values higher than any other fiber type at 12°C and also at 24°C. Skinned fibers become unreliable if activated at higher temperatures unless specific methods as temperature jumps after activation at low temperature are applied (20). It will be of interest to assess whether the difference in tension development is still present at physiological temperature.

The possibility that the difference in specific tension was due to a different density of the force generators, i.e., the myosin heads, was explored by determining myosin concentration in feline muscle fibers. The values obtained of myosin concentration are around 50 µg/µl, corresponding to a head concentration of 200 µM in good agreement with previously published data (8, 32). The lack of any significant difference in myosin concentration among the four groups of fiber examined gives support to an explanation on the basis of kinetic diversity. Such an explanation leaves open the question whether the difference in specific tension still exists at physiological temperature as the kinetic parameters of the cross-bridge cycle are characterized by distinct temperature sensitivity (16).

The explanation of the higher tension developed by M fibers in terms of cross-bridge kinetics can be based on the assumptions that unitary force exerted by an attached cross bridge is constant and that isometric tension is determined by the frac-

tion of strongly bound cross bridges. Huxley's 1957 cross-bridge model predicts that the fraction of cross bridges attached is given by $f/(f + g)$, whereas K_{TR} is given by $(f + g)$. The direct comparison between M fibers and 2A fibers shows that in jaw muscles the specific isometric force is 40% greater in M than that in 2A fibers while the K_{TR} is unchanged. To fit with Huxley's model, the elevated isometric force must result from an increase in cross-bridge attachment rate (f) and an equivalent diminution in the rate of cross-bridge detachment (g) so that $f/(f + g)$ rises, but K_{TR} does not change. It is worth underlining that difference in g values might be restricted to the detachment rate in isometric conditions since v_o , which is proportional to the detachment rate constant during filament sliding at zero load, displays similar values in M fibers and in 2A fibers.

An important caveat must be considered before entering in any further discussion on the explanation of the specific features of M fibers: in M fibers, not only MyHC but also other proteins are present with specific masticatory isoforms, among them MyLC, tropomyosin, and C protein (10, 18, 22). Available evidence confirms, however, that MyHC isoforms dictate both v_o and ATP consumption rate with only a minor modulatory effect of MyLC isoforms (see Refs. 17 and 25). It is, therefore, tempting to find the basis of the specific contractile parameters of M fibers in the amino acid sequence of M MyHC. In a recently published study (15), we have compared the primary structure of M MyHC with other sarcomeric MyHC isoforms in the dog, paying particular attention to those regions where the interisoform diversity is greater. Loop 1 has been shown to modulate filament sliding velocity and ADP release rate (27) and is very short in M MyHC with only 8 residues compared with 12 in slow MyHC and 14 in 2B MyHC (15). The origin of the low detachment rate constant suggested by the above discussion on the actomyosin interactions might be found in the short length of loop 1, which controls ADP release. On the actin-binding surface, loop 2 has been proposed as determinant not only for the diversity of ATPase rate between isoforms but also for the specific sensitivity of ATPase to alkali or acid preincubation (15). M MyHC exhibits a very short loop 2 (17 residues instead of 23 present in most fast MyHC), whereas loop 3 is 1 residue longer in M MyHC than in other sarcomeric MyHC isoforms.

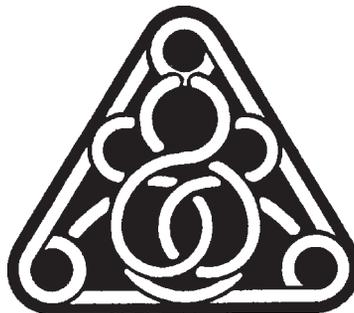
In his review article, Hoh (12) suggests, "Early during mammalian radiation, some taxa (carnivores, chiropterans, primates, most marsupial orders) retained masticatory myosin expression where high force and power in jaw closers remained functionally advantageous to their life style. Others (rodents, ungulates, rabbits) replaced masticatory myosin with functionally more appropriate isoforms normally expressed in limb muscles or the heart." It is, however, possible that the explanation is more complex since, as shown by the present results, the combination of high force and moderate velocity values should generate a peak power not much different in M fiber compared with other fast fibers. It is possible that presence or the absence of M MyHC expression depends on the combination of the evolutionary pressure related with feeding habits, the presence of mutations in the coding or regulatory part of the gene, and the specific programs of gene expression based on embryological origin (first branchial arch). In this respect, the observation that M MyHC is expressed also in muscles without any masticatory

function (*tensor veli palatini*) (22) and in satellite cells of masticatory muscles transplanted in limb muscles (9) plays in favor of a major role of the embryological origin. The mutations in human M MyHC gene documented by Stedman (26) also bring support to the view of a complex interaction of several factors, and it will be of interest to study the mechanisms that, in species as the rodents, have led the complete disappearance of M MyHC expression.

REFERENCES

1. Berg JS, Powell BC, Cheney SE. A millennium myosin census. *Mol Biol Cell* 12: 780–794, 2001.
2. Bergin M, Bicer S, Lucas CA, Reiser PJ. Three-dimensional compartmentalization of myosin heavy chain and myosin light chain isoforms in dog thyroarytenoid muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C1446–C1458, 2006.
3. Bottinelli R, Canepari M, Pellegrino MA, Reggiani C. Force-velocity properties of human skeletal muscle fibres: myosin heavy chain isoform and temperature dependence. *J Physiol* 495: 573–586, 1996.
4. Brenner B, Eisenberg E. Rate of force generation in muscle: correlation with actomyosin ATPase activity in solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3542–3546, 1986.
5. D'Antona G, Lanfranconi F, Pellegrino MA, Brocca L, Adami R, Rossi R, Moro G, Miotti D, Canepari M, Bottinelli R. Skeletal muscle hypertrophy and structure and function of skeletal muscle fibres in male body builders. *J Physiol* 570: 611–627, 2006.
6. D'Antona G, Pellegrino MA, Adami R, Rossi R, Carlizzi CN, Canepari M, Saltin B, Bottinelli R. The effect of ageing and immobilization on structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol* 552: 499–511, 2003.
7. Edman KAP. The velocity of unloaded shortening and its relation to sarcomere length and isometric force in vertebrate muscle fibres. *J Physiol* 291: 143–159, 1979.
8. Geiger PC, Cody MJ, Macken RL, Sieck GC. Maximum specific force depends on myosin heavy chain content in rat diaphragm muscle fibers. *J Appl Physiol* 87: 1894–1900, 2000.
9. Hoh J, Hughes S. Myogenic and neurogenic regulation of myosin gene expression in cat jaw-closing muscles regenerating in fast and slow limb muscle beds. *J Muscle Res Cell Motil* 9: 59–72, 1988.
10. Hoh J, Hughes S, Kang L, Rughani A, Qin A. The biology of cat jaw-closing muscle cells. *J Comp Assist Microsc* 5: 65–70, 1993.
11. Hoh JF, Kang LH, Sieber LG, Lim JHY, Zhong WW. Myosin isoforms and fibre types in jaw-closing muscles of Australian marsupials. *J Comp Physiol [B]* 176: 685–695, 2006.
12. Hoh JFY. 'Superfast' or masticatory myosin and the evolution of jaw-closing muscles of vertebrates. *J Exp Biol* 205: 2203–2210, 2002.
13. Larsson L, Moss RL. Maximum velocity of shortening in relation to myosin isoform composition in single fibres from human skeletal muscles. *J Physiol* 472: 595–614, 1993.
14. Lucas CA, Kang LH, Hoh JF. Monospecific antibodies against the three mammalian fast limb myosin heavy chains. *Biochem Biophys Res Commun* 272: 303–308, 2000.
15. Maccatrozzo L, Caliaro F, Toniolo L, Patruno M, Reggiani C, Mascarello F. The sarcomeric myosin heavy chain gene family in the dog. Analysis of isoform diversity and comparison with other mammalian species. *Genomics* 89: 224–36, 2007.
16. Nyitrai M, Rossi R, Adamek N, Pellegrino MA, Bottinelli R, Geeves MA. What limits the velocity of fast-skeletal muscle contraction in mammals? *J Mol Biol* 355: 432–442, 2006.
17. Pellegrino MA, Canepari M, D'Antona G, Reggiani C, Bottinelli R. Orthologous myosin isoforms and scaling of shortening velocity with body size in mouse, rat, rabbit and human muscles. *J Physiol* 546: 677–689, 2003.
18. Qin H, Morris BJ, Hoh JF. Isolation and structure of cat superfast myosin light chain-2 cDNA and evidence of identity of its human analogue. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 1277–1282, 1994.
19. Qin H, Hsu MKH, Morris BJ, Hoh JFY. A distinct subclass of mammalian striated myosins: structure and molecular evolution of 'superfast' or masticatory myosin heavy chain. *J Mol Evol* 55: 544–552, 2002.
20. Ranatunga KW. Endothermic force generation in fast and slow mammalian (rabbit) muscle fibers. *Biophys J* 71: 1905–1913, 1996.

21. **Reiser PJ, Bicer S.** High force generation and moderate shortening velocity in jaw-closing muscle fiber expressing masticatory ("Superfast") myosin. *Biophysical J Suppl.* S: 191A, 2007.
22. **Rowlerson A, Mascarello F, Veggetti A, Carpena E.** The fibre-type composition of the first branchial arch muscles in Carnivora and Primates. *J Muscle Res Cell Motil* 4: 443–472, 1983.
23. **Rowlerson A, Pope B, Murray, Whalen RG.** A novel myosin present in cat jaw-closing muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 2: 415–438, 1981.
24. **Saeki Y, Kato C, Satomi M, Yanagisawa K.** ATPase activity and tension development in mechanically-skinned feline jaw muscle. *Arch Oral Biol* 32: 207–210, 1987.
25. **Schiaffino S, Reggiani C.** Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 76: 371–423, 1996.
26. **Stedman HH, Kozyak BW, Nelson A, Thesier DM, Su LT, Low DW, Bridges CR, Shrager JB, Minugh-Purvis N, Mitchell MA.** Myosin gene mutation correlates with anatomical changes in the human lineage. *Nature* 428: 415–418, 2004.
27. **Sweeney HL, Rosenfeld SS, Brown F, Faust L, Smith J, Xing J, Stein LA, Sellers JR.** Kinetic tuning of myosin via a flexible loop adjacent to nucleotide binding pocket. *J Biol Chem* 273: 6262–6270, 1998.
28. **Talmadge R, Grossman E, Roy R.** Myosin heavy chain composition of adult feline (*Felis catus*) limb and diaphragm muscles. *J Exp Zool* 275: 413–420, 1996.
29. **Taylor A, Cody FWJ, Boley MA.** Histochemical and mechanical properties of the jaw muscles of the cat. *Exp Neurol* 38: 99–109, 1973.
30. **Toniolo L, Maccatrozzo L, Patruno M, Pavan E, Caliaro F, Rossi R, Rinaldi C, Canepari M, Reggiani C, Mascarello F.** Fiber types in canine muscles: myosin isoform expression and functional characterization. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1915–C1921, 2007.
31. **Wu X, Li ZF, Brooks R, Komives EA, Torpey JW, Engvall E, Gonias SL, Shelton GD.** Autoantibodies in canine masticatory muscle myositis recognize a novel myosin binding protein-C family member. *J Immunol Methods* 179: 4939–4944, 2007.
32. **Yates LD, Greaser ML.** Quantitative determination of myosin and actin in rabbit skeletal muscle. *J Mol Biol* 168: 123–141, 1983.
33. **Yu F, Stål P, Thornell LE, Larsson L.** Human single masseter muscle fibers contain unique combinations of myosin and myosin binding protein C isoforms. *J Muscle Res Cell Motil* 23: 317–326, 2002.



Effects of local vibrations on skeletal muscle trophism in elderly people: Mechanical, cellular, and molecular events

TIZIANA PIETRANGELO¹, ROSA MANCINELLI¹, LUANA TONIOLO², LINA CANCELLARA², ANTONIO PAOLI², CRISTINA PUGLIELLI¹, PIERPAOLO IODICE¹, CHRISTIAN DORIA¹, GERARDO BOSCO¹, LUIGI D'AMELIO¹, GUGLIELMO DI TANO¹, STEFANIA FULLE¹, RAOUL SAGGINI¹, GIORGIO FANO¹ and CARLO REGGIANI²

¹Dipartimento Scienze Mediche di Base ed Applicate, Istituto Interuniversitario di Miologia, Centro di Studi sull'Invecchiamento, University G. d'Annunzio Chieti-Pescara, via dei Vestini 29, I-66013 Chieti;

²Dipartimento Anatomia e Fisiologia, Università di Padova, via Marzolo 3, I-35131 Padova, Italy

Received February 23, 2009; Accepted May 7, 2009

DOI: 10.3892/ijmm_00000259

Abstract. Several studies have examined the effects of vibrations on muscle mass and performance in young healthy people. We studied the effects of vibrations on muscles of elderly male and female volunteers (65-85 years of age) diagnosed with sarcopenia. We applied mechanical vibrations locally (local vibrational training) to the thigh muscles at 300 Hz for a period of 12 weeks, starting with a session of 15 min stimulation once a week and increasing to three sessions of 15 min per week. Treated muscles displayed enhanced maximal isometric strength and increased content of fast MyHC-2X myosin. Single muscle fiber analysis did not show any change in cross-sectional area or in specific tension. Analysis of transcriptional profiles by microarray revealed changes in gene expression after 12 weeks of local vibrational training. In particular, pathways related with energy metabolism, sarcomeric protein balance and oxidative stress response were affected. We conclude that vibration treatment is effective in counteracting the loss of muscular strength associated with sarcopenia and the mode of action of vibration is based on cellular and molecular changes which do not include increase in fiber or muscle size.

Introduction

Aging is associated with progressive loss of neuromuscular function. The term sarcopenia is commonly used to describe the loss of skeletal muscle mass and strength that occurs in connection with biological aging in the elderly. The onset of sarcopenia is generally assumed to occur around 60 years of

age, with atrophy being an important symptom. The progression of sarcopenia is influenced by several factors, including genetic components, lifestyle, age-related diseases, decreases in the levels of hormones (GH, testosterone, IGF-1), loss of motor units, and decreased regenerative capacity of skeletal muscle stem cells (1,2). Atrophic conditions in the elderly are exacerbated when diseases force them to bed. The main countermeasure is regular and moderate exercise, but, besides general advice to stay active, there are no definitive indications for optimal training and/or treatment of sarcopenia (3,4).

In recent years, mechanical muscle vibration received considerable attention as a useful method of muscle stimulation in clinical therapy and sports training, but the results remain controversial. Only a few studies described specific vibrational training protocols, and this lack of information generates uncertainties regarding the most effective vibration intensities, frequencies, and application protocols. When frequency is considered, the main question is whether vibrations are applied to the whole body or to specific muscles. The body tolerates a vibration frequency in the range 20-50 Hz, whereas the level for local application to specific skeletal muscles is in the range of 300-500 Hz.

In view of the diversity of applied treatments, a precise comparison of results reported in scientific literature is difficult, and for this reason we report data on different vibrational protocols without extensive discussion. For instance, Bosco and coworkers showed positive effects of passive whole-body vibration under different conditions, reporting significant increases in muscle strength and power (5), elevations in plasma concentrations of testosterone and growth hormone (6,7), and improvement in neuromuscular properties (8). Another study showed that maximal isometric voluntary contraction increased (in young men) only when vibration was combined with squat training (7). De Ruiter and colleagues studied the effects on young men over a period of 11 weeks of whole-body vibration at 30 Hz and found that neither the strength nor the contractile properties of the knee extensor muscle improved (9). It is also worth remembering that negative effects of whole-body vibration on health were reported. Hand-arm vibration syndrome and

Correspondence to: Dr Tiziana Pietrangelo, Dipartimento Scienze Mediche di Base ed Applicate, University 'G. d'Annunzio' Chieti-Pescara, Via dei Vestini 29, I-66013 Chieti, Italy
E-mail: tiziana@unich.it

Key words: vibrations, skeletal muscle, single fibers, gene expression

Table I. Anthropometric parameters of study participants.

| | Age years | Height cm | Weight pre-training kg | Weight post-training kg | BMI pre-training kgm ⁻² | BMI post-training kgm ⁻² |
|--------|--------------|--------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------------------|--|
| Male | 75.3±6.9 | 163.0±5.0 | 76.9±6.7 | 75.3± 6.2 | 29.1±3.5 | 29.0±3.3 |
| Female | 71.0±5.7 | 159.0±5.0 | 71.6±18.8 | 66.4 ±15 | 28.3±8.1 | 28.2±7.6 |

Data reported in the Table are the anthropometric measurements of male and female elderly volunteers. The values are means ±SD.

vascular disorders (10,11), low back pain (12) and spinal health risks (13), were reported in vibration-exposed workers.

The possible involvement of the nervous system in modifications of muscle performance induced by vibration has been the focus of several studies (14). It was hypothesized that mechanical stimuli are transmitted to sensory receptors of muscles, most likely the spindles, and that receptor activation results in the reflex stimulation of motor units, as seen in the tonic vibration reflex (15). However, the tonic vibration stretch reflex was originally described as the result of a brief exposure to high-frequency stimulation applied directly to a tendon (16,17). Any activation prolonged for tens of seconds could induce a reduction in muscle spindle firing frequency and, as a consequence, a decrease in muscle activation (15). Moreover, muscle spindle firing induced by vibration excites not only motor neurons but also interneurons in the spinal cord, which reciprocally inhibit the motor neurons of antagonist muscles (18). Brunetti and coworkers studied posture stability after vibratory stimulation following anterior cruciate ligament reconstruction. These authors concluded that vibration leads to a faster and more complete recovery of equilibrium, confirming a role for vibration in proprioceptive stimulation (19). In conclusion, it remains difficult to find a rationale that is logically used to design vibration treatment and to predict treatment outcomes.

In this study, we aimed to determine whether a training program of passive muscle stimulation, in which local mechanical vibrations at high frequency (300 Hz) were applied to the lower limbs in the absence of any voluntary muscle contraction, induces an increase in muscle mass and strength in elderly subjects showing signs of sarcopenia. Isometric strength developed in maximal voluntary contractions by knee extensor muscles, and thigh circumference, were the parameters selected to evaluate the impact of local muscle mechanical vibrations in elderly male and female volunteers, and thigh circumference was used as an indicator of structural modifications. Additionally, using small fragments of tissue from needle biopsies of the *vastus lateralis* (VL) muscle (pre- and post-training), some cellular features (fiber types, fiber cross-sectional area, single fiber tension development) and gene expression profiles were analyzed.

Materials and methods

Subjects. The study involved nine elderly people (four males and five females) with diagnoses of sarcopenia according to the criteria of the Centers for Disease Control and Prevention (CDCP). Anthropometric characteristics are summarized in

Table I. The study was approved by the local ethics committee, and was performed in accordance with the 1964 Declaration of Helsinki. All individuals provided written informed consent before participating in the study.

The inclusion criteria were as follows: diagnosis of sarcopenia; normal ECG and blood pressure; and absence of bone/joint, metabolic, or cardiovascular diseases. Exclusion criteria were the presence of metabolic and/or cardiovascular diseases, evidence of hereditary or acquired muscular disease, or diagnosis of respiratory or psychiatric disorders. No subject was under treatment with testosterone or other pharmacological interventions known to influence muscle mass.

Training protocol and experimental design. The conditioning protocol consisted of application of local high-intensity vibrations on the lower limbs using the VISS apparatus. The VISS device (Vissman, Rome, Italy) is a tool capable of producing acoustic waves of different frequencies without affecting the set width. The device is not an acoustic wave generator, but rather a flux modulator, and has two components. These are a compressor delivering pressure in the range 0-400 millibar and a modulator producing an oscillatory air flux to create acoustic waves through a two-way rotating valve. The transducer develops a time-modulated sinusoidal wave (300 Hz). During application of vibration, subjects were invited to avoid isometric contractions of the treated muscle. The experimental protocol required that local mechano-acoustic vibratory stimulation was applied on the skin of the distal part of the quadriceps close to the tendon insertions of the *intermedius femoris*, *rectus femoris*, *vastus medialis*, and *vastus lateralis* muscles. The entire treatment lasted 12 weeks. The duration of each application was 15 min and the frequency chosen was 300 Hz. From weeks 1 to 8 the subjects received one application per week, whereas from weeks 9 to 12 they received three applications per week. We refer to this type of stimulation protocol as 'local high-intensity vibrational training'.

Two weeks before the training period, enrolled subjects were familiarized with the test session protocol. Isometric tests were performed a week before (pre-session) and a week after the conditioning period (post-session), to measure the bilateral maximal isometric strength of the lower limbs, the body mass index (BMI), and thigh circumference, assessed with a measuring tape at two levels on the dominant leg of each standing subject. The circumferences measured were the maximal circumference at one-third of the distance between the trochanter and the tibial-femoral joint space, and the minimum circumference above the knee. Skinfold measurements were next recorded at the anterior mid-thigh using a skinfold caliper.

Sixteen weeks after the end of the conditioning period of local high-intensity vibrational training, the isometric test was repeated to monitor lower limb strength level.

Isometric strength measurement. Bilateral isometric torque developed by the knee extensor muscles was measured during maximal voluntary contractions using a Leg Extension machine (Panatta Sport; Apiro [MC], Italy) equipped with a load cell (Globus Italia, Codognè [TV], Italy). Participants were seated with the trunk-thigh and the knee joint angles at 90°. Subjects performed maximal voluntary isometric contractions of the knee extensors three times. Isometric contractions lasted for 5 sec, and were separated by 2 min rest intervals. The highest value of torque attained was taken as the isometric contraction strength. In each subject, the variation of knee extension isometric force was expressed as a percentage of the pre-training value.

Cellular and molecular analysis of muscle biopsies. Muscle biopsies were obtained using a semi-automatic needle (Precisa 13 Gauge; Hospital Service, Rome, Italy) from the VL muscle at a level corresponding to one-third of the distance from the upper margin of the patella to the anterior superior iliac spine, after local anesthesia with lidocaine (0.5%, w/v). In each subject, several samples were collected from the same needle insertion and were divided into three groups: (i) samples immersed in skinning solution (see below) were used for dissection of single muscle fibers; (ii) samples immersed in Laemmli buffer (see below) were used for gel electrophoresis; and, (iii) samples immersed in Trizol reagent (Invitrogen, Paisley, UK) were used for extraction of RNA for analysis of transcriptional profiles.

Muscle fibers, mechanical characterization. Muscle biopsy fragments for single fiber dissection were immersed in ice-cold skinning solution with 50% (v/v) glycerol. Skinning solution is a high-potassium, high-EGTA solution which depolarizes membranes, removes calcium, and induces a rigor state, thus ensuring optimal conditions for fiber preservation. The fragments were stored at -20°C and analyzed within 2 weeks of sampling. On the day of the experiment, the skinning-glycerol mixture was washed off and replaced with ice-cold skinning solution containing ATP, to induce fiber relaxation. Single fibers were manually dissected under a stereo-microscope (x10-60 magnification). Following dissection, fibers were bathed for 30 min in skinning solution containing 1% (v/v) Triton X-100 to ensure complete membrane solubilization. Fiber segments 1-2 mm in length were cut, and light aluminum clips were applied at both ends. Skinning, relaxing, pre-activating, and activating solutions employed for single fiber experiments were prepared as described previously (20). Fiber segments were transferred to the experimental apparatus, and cross-sectional area and tension development during maximal calcium-activated isometric contractions at 12°C were measured according to a previously described procedure (21).

Electrophoretic separation and quantification of myosin heavy chain (MyHC) isoforms. MyHC isoform composition was determined in biopsy samples. Muscle biopsy fragments were stored in Laemmli solution (Tris 62.5 mM, Glycerol 10% [v/v], SDS 2.3% [w/v], β -mercaptoethanol 5% [v/v], with

E-64 0.1% [w/v] and leupeptin 0.1% [w/v] as anti-proteolytic factors; pH 6.8). After heating for 5 min at 80°C appropriate amounts of the protein suspension were loaded onto polyacrylamide gels (~1 μ g of total protein/lane). Separation of MyHC isoforms was achieved on 8% (w/v) gels (18 cm x 16 cm x 1 mm) at 70 V for 1.5 h and at 230 V for a further time according to the guidelines of Talmadge and Roy (22). After silver staining, three separate bands were detected in the 200-kDa region, corresponding to MyHC-1, -2A, and -2X, in order of migration from fastest to slowest. To quantify myosin isoform distribution, densitometric analyses of silver-stained bands were performed on at least two independent electrophoretic runs of each biopsy sample fragment. The mean values represent the measurements presented. Gel patterns were digitized with an EPSON 1650 scanner at a resolution of 1,200 dpi. Each band was characterized by a value of the Brightness-Area Product (BAP), using a constant threshold after black/white inversion employing Adobe Photoshop software. From each gel, BAP values for the bands identified as MyHC isoforms were summed and the BAP value for each isoform was expressed as a percentage of the total. The reproducibility of the procedure was confirmed by calculating isoform ratios of selected samples from gels loaded with different amounts of such samples.

Gene expression profile. A high-density oligonucleotide microarray technique was used to identify variations in gene expression induced by mechanical vibration. This technique involves RNA isolation, amplification, and labeling. The human oligonucleotide gene set consisting of 21,329 (70-mer) oligonucleotides (Operon version 2.0), designed on the basis of the Human Unigene clusters, was employed. RNA was extracted from the biopsy samples of three different elderly subjects before training, and at the end of the vibrational training period. Very pure RNA samples from each subject were amplified and labeled. Microarray co-hybridization involved simultaneous hybridization with pre-training and post-training samples and dye-swap duplicated microarrays were analyzed for each subject. Arrays were scanned, and recorded fluorescence intensities were subjected to Lowess normalization (23). The expression of each gene was defined as the log base-2 of the ratio between the intensity of cyanine-coupled aaRNA from post-training samples and that of cyanine-coupled aaRNA from pre-training samples ($\log_2 I_{\text{post-training}}/I_{\text{pre-training}}$). Differentially expressed genes were selected using a per-mutation test procedure known as the 'Significance Analysis of Microarrays' (SAM), which defines genes with a computed score larger than the threshold value as showing significant variation. The false discovery rate (FDR) associated with the given threshold was additionally calculated from permutation data.

Statistical analysis. Data were expressed as means \pm SE (Figs.) or SD (Tables). Statistical significance was set at $p < 0.05$ and was calculated using the unpaired Student's t-test, with Welch's correction. Prism5 GraphPad software (Abacus Concepts GraphPad Software, San Diego, CA) was employed for statistical analyses. Gene expression analysis was based on SAM data and variations are expressed as means with SD.

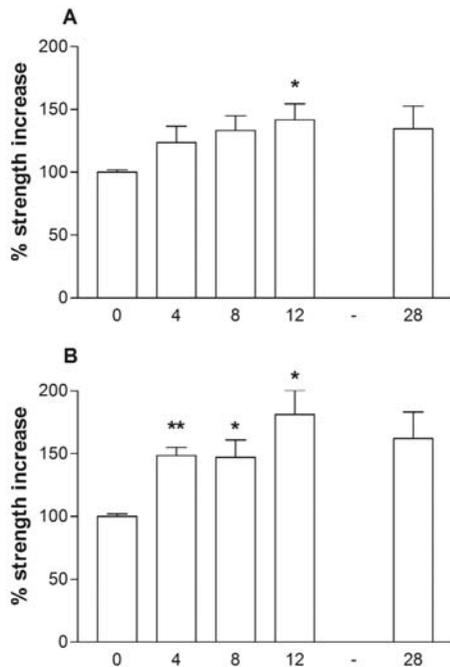


Figure 1. Variations in bilateral isometric strength of leg extensor muscles treated with local muscle vibration at 300 Hz in nine elderly male (A) and female (B) subjects. The histograms show the percentage increases in bilateral isometric strength, based on leg extension, at different times during the period of stimulation. 0 week, pre-training; 4, 8, and 12 weeks, intervals during the stimulation period when strength was measured. During the first 8 weeks, treatment was based on a single vibration application (300 Hz) of 15 min per week. From weeks 8 to 12, treatment was increased to three applications of 15 min per week (300 Hz). Treatment was interrupted after 12 weeks, and strength was measured again at week 28. Isometric strength measurements from the pre-training sessions are taken as 100%. Significant variations, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Results

Maximal isometric strength of knee extensor muscles. Isometric strength of leg extensor muscles was measured before, and after 4, 8, and 12 weeks of vibrational training. The application of local vibration to the lower part of the thighs improved isometric strength (Fig. 1). In both male and female subjects (anthropometric characteristic in Table I), the increase was appreciable, beginning at 4 weeks (females) and 8 weeks (males) of vibration training. Importantly, during the first 8 weeks of the procedure, stimulation was scheduled only once a week. This increase in strength remained at a plateau up to week 12, even though training frequency was increased to three times per week from week 8 (see Training protocol). In general, the response was better in female than in male subjects. In male subjects, isometric strength increased by ~25% at weeks 4 and 8, with a significant increase at week 12 of training ($141.7 \pm 12.7\%$, $n=4$, $p < 0.05$). Follow-up measurements after 28 weeks revealed that the increase in strength was consistently maintained ($134.5 \pm 18.0\%$) (Fig. 1A). In female subjects, the increase in bilateral isometric limb strength was higher than in males, commencing at week 4 ($148.5 \pm 6.5\%$, $n=5$, $p \leq 0.001$), and remained significant until the end of the training period ($181.2 \pm 19.3\%$, $n=4$, $p \leq 0.001$). The increase in strength at 12 weeks of stimulation was not significantly different between female and male subjects.

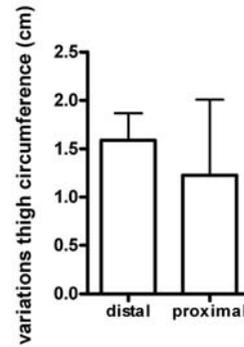


Figure 2. Variations in thigh circumference. Two thigh circumferences, one distal (just above the knee) and one proximal (at 2/3 of the knee-trochanter distance, to avoid the adductor muscles) were measured before the beginning of treatment (pre-training) and after 12 weeks of treatment (post-training). Changes are expressed in cm. As average, the distal and proximal circumferences showed small and insignificant increases after vibrational training in both male and female subjects.

Variations of leg extensor muscle mass were evaluated from the measurements of two thigh circumferences, one distal (just above the knee), and one proximal (at 2/3 of the knee-trochanter distance), to avoid the influence of adductor muscles. After vibrational training the distal circumferences showed small and insignificant increases (0.5-3 cm) in both male and female subjects, whereas, with proximal circumferences, variations ranged from a slight decrease in two female subjects to an increase (0.5-6 cm) in other subjects (Fig. 2). Moreover, skinfold measurements at the end of the training period were not significantly different from those measured before training (data not shown). In conclusion, no significant variations in muscle mass accompanied increases in muscle strength.

Muscle fiber cross-sectional area and specific tension. Single muscle fibers were isolated from biopsy fragments of the VL muscle obtained before and after vibrational training. From each biopsy, 8-9 fibers were analyzed, to yield data on a total of 80 fibers both before and after training. The average cross-sectional area (CSA) was $3667.0 \pm 310.7 \mu\text{m}^2$ in pre-training samples, and $4238.0 \pm 357.4 \mu\text{m}^2$ in post-training samples, thus, vibrational training did not significantly modify the CSA of single fibers (Fig. 3A). In specific tension measurements, the isometric strength per unit of fiber area was $177.0 \pm 14.6 \text{ mN mm}^{-2}$ in pre-training samples, and $164.0 \pm 17.4 \text{ mN mm}^{-2}$ in post-training specimens. These values were not significantly different (Fig. 3B).

Myosin isoform composition of biopsy samples. The fiber type composition of the VL muscle was determined by analyzing the proportion of slow (MyHC-1) and fast (MyHC-2A and -2X) myosin heavy chain isoforms in biopsy samples taken before and after vibrational training. Myosin isoforms can be considered as molecular markers of fiber types (24). The average values for myosin isoform distribution in males (Fig. 4A) and females (Fig. 4B) are shown. In both groups, fast MyHC-2X levels were increased after vibration training, whereas slow MyHC-1 proportions were significantly lower in post-training compared to pre-training samples. The shift in myosin isoform expression might indicate either fiber

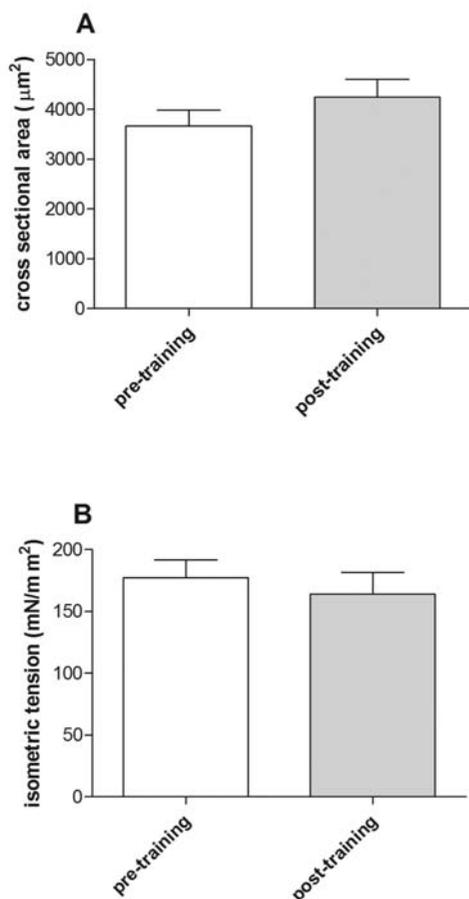


Figure 3. Single-fiber analysis, cross sectional area (A) and specific isometric tension (B). (A) Cross-sectional area (CSA) of single muscle fibers isolated from the biopsy samples from the vastus lateralis muscle before and after vibrational training of 12 weeks. (B) Measurements of specific isometric tension (force/CSA) developed in maximal calcium-activated contraction by the same fibers. In both cases, no significant difference was detected between pre- and post-training samples. For each measurement, a total of 80 fibers were analyzed.

transition (from slow to fast; 2X) or differential growth (a specific increase in the size of 2X fibers). The lack of any significant increase in fiber thickness after vibrational training (see Fig. 3) suggests that the change in myosin isoform distribution are caused by a fiber-type transition.

Gene expression profiles. Gene expression profiles from oligonucleotide microarrays were obtained from biopsy samples of three subjects before and after vibrational training. We listed the genes found significantly regulated after the vibrational training on each subject and we assessed possible changes in gene transcription analyzing these regulated genes. Genes that appeared to be significantly affected were further evaluated to elucidate the mechanisms by which vibration-trained muscles showed performance enhancement. Some genes with well-known muscle activities received particular attention, and were classified according to function. Such categories included, specifically, (i) genes of energy metabolism (Table II); (ii) genes involved in sarcomeric protein synthesis, protein degradation, and calcium homeostasis (Table III); and, (iii) genes dealing with oxidative stress (Table IV).

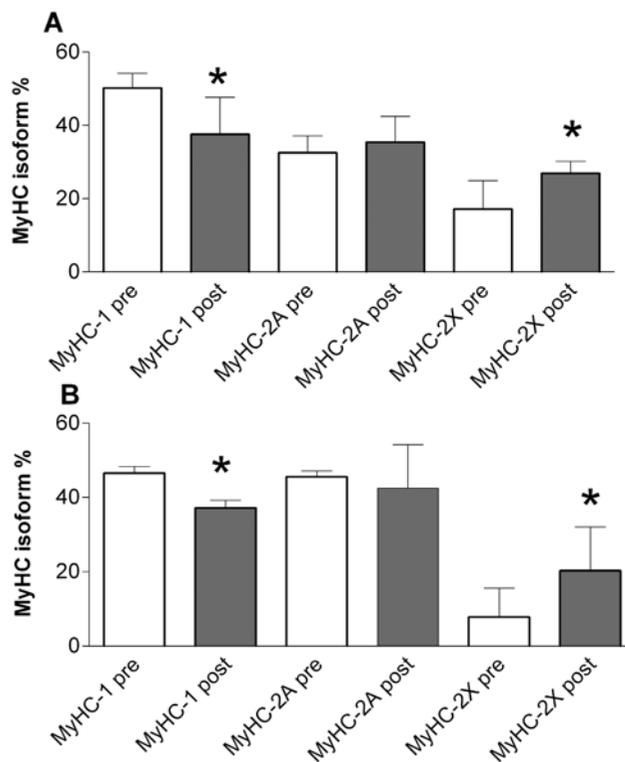


Figure 4. MyHC isoform distribution in biopsy samples collected before and after 12 weeks of vibrational training in nine elderly subjects. MyHC isoform distribution was determined by electrophoretic separation and densitometric analysis of proteins of biopsy samples from the vastus lateralis muscle. A and B show the percentage distributions of MyHC isoforms (1, 2A, and 2X) in male and female subjects, respectively. The grey columns represent the percentages of the MyHC isoform distribution post-training, and the white columns represent pre-training percentages. (A) The mean percentage of MyHC-1 decreased by 13%, whereas that of MyHC-2X increased by 12%, in elderly male subjects. (B) The mean percentage of MyHC-1 decreased by 11%, whereas that of MyHC-2X increased by 12%, in female subjects. * $p \leq 0.05$.

Genes involved in energy metabolism. Several enzymes involved in glucose and glycogen metabolism were upregulated after vibration therapy (Table II). We observed increased expression of the *phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 3* (PIK3R3) gene that encodes a binding protein in the insulin-dependent pathway leading to inhibition of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), and that thus mediates net dephosphorylation of glycogen synthase (GS), with concomitant activation of the glycogen pathway (25). It is important to remember that PI3kinase functions upstream to Akt, a signaling factor very relevant to muscle hypertrophy mechanisms (26). Moreover, *protein phosphatase regulatory subunits 3A and 3C* (PPP1R 3A and 3C), genes encoding key enzymes for glycogen conservation in muscle (25), were upregulated. Another gene showing enhanced expression was *dihydrolipoamide dehydrogenase, E3 complex of pyruvate dehydrogenase complex* (DLD), a protein of the pyruvate dehydrogenase complex that transforms pyruvate into acetyl-coenzyme A. In particular, the E3 component reduces NAD^+ to NADH (27). Yet another up-regulated gene of interest was *fatty acid CoA ligase* that is important for fatty acid activation in the cytoplasm prior to β -oxidation. *Glucan (1,4- α -), branching enzyme 1* (glycogen branching enzyme, [relevant

Table II. Changes in energy metabolism genes.

| Subject | Gene name | Mean $\log_2 I_{\text{post-training}}/I_{\text{pre-training}}$ \pm SD | GB accession | UniGene ID | Gene symbol |
|---------|--|---|--------------|------------|-------------|
| 1 | Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 3 (p55, γ) | 0.86 \pm 0.39 | NM_003629 | 88051 | PIK3R3 |
| 2 | Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3A (glycogen and sarcoplasmic reticulum binding) | 1.08 \pm 0.13 | NM_002711 | 127614 | PPP1R3A |
| 2 | Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C | 0.99 \pm 0.17 | BC012625 | 303090 | PPP1R3C |
| 2 | Dihydrolipoamide dehydrogenase (E3 component of pyruvate dehydrogenase complex, 2-oxo-glutarate complex) | 0.85 \pm 0.16 | NM_000108 | 74635 | DLD |
| 2 | Fatty-acid-coenzyme A ligase, long-chain 2 | 0.91 \pm 0.09 | NM_021122 | 154890 | FACL2 |
| 1 | Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 4 | 0.84 \pm 0.32 | NM_004696 | 23590 | SLC16A4 |
| 1 | Solute carrier family 21 (organic anion transporter), member 11 | 0.65 \pm 0.12 | NM_013272 | 14805 | SLC21A11 |
| 1 | Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 14 | 0.80 \pm 0.32 | NM_007231 | 162211 | SLC6A14 |
| 1 | Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II | 0.69 \pm 0.16 | NM_003366 | 173554 | UQCRC2 |
| 5 | Glucan (1,4- α -), branching enzyme 1 (glycogen branching enzyme, Andersen disease, glycogen storage) | -1.16 \pm 0.15 | NM_000158 | 1691 | GBE1 |

The first column specifies in which of the three different elderly subjects (individuals 1, 2, or 5) the change in expression was detected. The second column lists the common names of the different genes up- or down-regulated in the vastus lateralis muscle, when post- and pre-training expression levels were compared. The third column reports changes in expression levels of genes as means of the log base-2 of the ratios ($\log_2 I_{\text{post-training}}/I_{\text{pre-training}}$), with SD. The fourth column lists Gene Bank Accession numbers, the fifth the UniGene Identification numbers, and the sixth specific gene symbols. Genes involved in energy metabolism were classified as upregulated (positive values) or downregulated (negative values).

to Andersen's disease and glycogen storage disease]) (GBE1), which participates in glycogen synthesis, was downregulated.

Expression of specific genes encoding several transporters was enhanced, including genes encoding *solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 4* (SLC16A4) (28), a transport system implicated in both intracellular pH regulation during muscle contraction and lactate removal. The gene *solute carrier family 21 (organic anion transporter), member 11* (SLC21A11), functioning in the transport of organic anions and thyroid hormones, and in modulation of glucose phosphorylation (29), was also up-regulated. Moreover, the expression of *solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 14* (SLC6A14), a gene encoding an amino acid transporter implicated in the utilization of non-glucidic substrates for plastic cellular reorganization and as an energy source (30), was increased. Notably, we observed elevated expression of *ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II* (UQCRC2), encoding a cytochrome reductase of the mitochondrial complex III (31).

Genes involved in sarcomeric protein synthesis and degradation, and calcium homeostasis. Several genes encoding sarcomeric proteins were upregulated (Table III). These included *actin α 2* (ACTA2), one of the six actin isoforms of thin filament proteins, *destrin* (DSTN), a key enzyme in actin polymerization (32), and *myosin, light polypeptide, regulatory, non-sarcomeric* (MLCB), together with *chaperonin ADP-*

ribosylation factor-like 5 (ARL5A), and *short coiled-coil protein* (SCOCO), linked to myosin folding and myofibrillogenesis (33). In the context of protein turnover, we observed upregulation of *ubiquitin-specific protease 15* (USP15), involved in the removal of damaged proteins, and down-regulation of *ubiquitin-conjugating enzyme E2G 1* (UBE2G1), encoding a protease, and an enzyme that conjugates target proteins with ubiquitin, respectively. Moreover, expression of *calpain 3* (p94), specifically expressed in skeletal muscle, was enhanced. Calpain 3 mediates muscle remodeling by cleavage and release of myofibrillar proteins, targeting these proteins for ubiquitination and proteasomal degradation (34,35). The genes *α -actinin-2-associated LIM protein* (ALP), and *Leman coiled-coil protein* or *angiominin-like protein 2* (LCCP), encoding proteins important for sarcomeric structure (in particular, the Z line), and *Titin immunoglobulin domain protein* (TTID), encoding a big, elastic protein that stabilizes sarcomeric filaments (36-38), were additionally upregulated. Another interesting gene displaying increased expression was *Popeye protein 3* (POP3). POP genes are expressed in cardiac and skeletal muscles (39), and participate in the synthesis and stabilization of mRNA encoding tubulin (40). Genes encoding *ryanodine type 3* (RyR3), a receptor of the sarcoplasmic reticulum, and *calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein* (CHERP), an intracellular calcium-mobilizing agent (41), were additionally upregulated.

Table III. Genes encoding sarcomeric proteins.

| Subject | Gene ID | Mean $\log_2 I_{\text{post-training}}/I_{\text{pre-training}}$ \pm SD | GB accession | UniGene ID | Gene symbol |
|---------|---|---|--------------|------------|-------------|
| 2 | Actin, α 2, smooth muscle, aorta | 1.29 \pm 0.37 | NM_001613 | 195851 | ACTA2 |
| 2 | Destrin (actin depolymerizing factor) | 0.83 \pm 0.13 | NM_006870 | 82306 | DSTN |
| 1 | Myosin, light polypeptide, regulatory, non-sarcomeric (20 kD) | 0.80 \pm 0.32 | NM_006471 | 233936 | MLCB |
| 2 | ADP-ribosylation factor-like 5 | 1.09 \pm 0.20 | NM_012097 | 342849 | ARL5 |
| 2 | Short coiled-coil protein | 1.16 \pm 0.65 | NM_032547 | 286013 | HRIHFB2072 |
| 2 | Titin immunoglobulin domain protein (myotilin) | 1.07 \pm 0.26 | NM_006790 | 84665 | TTID |
| 2 | α -actinin-2-associated LIM protein | 1.35 \pm 0.70 | BC001017 | 135281 | ALP |
| 2 | Leman coiled-coil protein | 1.05 \pm 0.25 | NM_016201 | 92186 | LCCP |
| 2 | Ryanodine receptor 3 | 1.40 \pm 0.63 | NM_001036 | 9349 | RYR3 |
| 1 | Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein | 1.04 \pm 0.64 | NM_006387 | 6430 | CHERP |
| 1 | Popeye protein 3 | 0.89 \pm 0.18 | AK055600 | 303154 | POP3 |
| 2 | Ubiquitin-specific protease 15 | 0.92 \pm 0.18 | NM_006313 | 23168 | USP15 |
| 5 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2G 1 (UBC7 homolog, <i>C. elegans</i>) | -2.23 \pm 0.41 | NM_003342 | 78563 | UBE2G1 |
| 1 | Calpain 3, (p94) | 0.84 \pm 0.22 | NM_000070 | 40300 | CAPN3 |

The first column specifies in which of the three different elderly subjects (individuals 1, 2, or 5) the change in expression was detected. The second column lists the common names of the different genes up- or down-regulated in the vastus lateralis muscle, when post- and pre-training expression levels were compared. The third column reports changes in expression levels of genes as means of the log base-2 of the ratios ($\log_2 I_{\text{post-training}}/I_{\text{pre-training}}$) with SD. The fourth column lists Gene Bank Accession numbers, the fifth lists the UniGene Identification numbers, and the sixth, specific gene symbols. Genes involved in energy metabolism were classified as upregulated (positive values) or downregulated (negative values).

Table IV. Genes involved in oxidative stress.

| Subject | Gene ID | Mean $\log_2 I_{\text{post-training}}/I_{\text{post-training}}$ \pm SD | GB accession | UniGene ID | Gene symbol |
|---------|------------------------------------|--|--------------|------------|-------------|
| 2 | Nitric oxide synthase 1 (neuronal) | -1.18 \pm 0.53 | NM_000620 | 46752 | NOS1 |
| 2 | DNA polymerase epsilon p12 subunit | -1.14 \pm 0.31 | NM_019896 | 19980 | P12 |
| 2 | Peroxiredoxin 3 | -1.12 \pm 0.35 | NM_006793 | 75454 | PRDX3 |
| 2 | Thioredoxin | -1.11 \pm 0.47 | NM_003329 | 76136 | TXN |
| 2 | Methionine sulfoxide reductase A | -0.93 \pm 0.47 | NM_014772 | 64096 | MSRA |

The first column specifies in which of the three different elderly subjects (individuals 1, 2, or 5) the change in expression was detected. The second column lists the common names of the different genes up- or downregulated in the vastus lateralis muscle, when post- and pre-training expression levels were compared. The third column reports changes in expression levels of genes as means of the log base-2 of the ratios ($\log_2 I_{\text{post-training}}/I_{\text{post-training}}$), with SD. The fourth column lists Gene Bank Accession numbers, the fifth the UniGene Identification numbers, and the sixth specific gene symbols. Genes involved in energy metabolism were classified as upregulated (positive values) or downregulated (negative values).

Genes involved in oxidative stress. Oxidation of biological substrates, such as DNA, proteins, and lipids, in the elderly, is well-recognized, as oxidants are generated in the mitochondrial respiratory chain, and the deleterious function of such oxidants is particularly important in muscle fibers (1). Vibrational training caused down-regulation of the polymerase ϵ (P12) gene, encoding a low-affinity enzyme

involved in DNA duplication and repair (42) and cell cycle control (Table IV). This enzyme, an important contributor to DNA repair, is involved in the rescue of oxidized DNA, although enzyme activity is less efficient than that of other polymerases. Furthermore, expression of the *peroxiredoxin* (PRDX3) gene was decreased. PRDX3 is a specific anti-oxidant enzyme able to remove endogenous cytokine-induced

H₂O₂ (43), using electrons donated by thioredoxin (TXN), the gene for which was also downregulated. PRDX3 encodes a protein that acts as an antioxidant by facilitating the reduction of other proteins via cysteine thiol-disulfide exchange. Another gene displaying diminished expression was methionine sulfoxide reductase (MSRA), the protein product of which repairs oxidized methionine (44), one of the most important targets of protein oxidation. Moreover, downregulation of the constitutive nitric oxide synthase (NOS1) was also observed. This gene encodes a constitutive form of the enzyme that synthesizes nitric oxide from L-arginine in the presence of NADPH and O₂, and downregulation may be linked to an altered nitric oxide signaling mechanism in aged skeletal muscle (45).

Discussion

Muscle isometric strength is defined as the maximum force exerted against resistance, and decreases significantly in humans with age (46). Healthy elderly subjects typically display diminished muscle mass, reduced movement velocity and skeletal muscle strength, combining to form the diagnostic characteristics of the condition termed sarcopenia (1).

In recent years, novel 'passive training' methods were proposed for clinical treatment of muscle atrophy and in sport training, consisting of mechanical vibrations applied to specific muscles or over the entire body. A number of investigators showed that such treatments enhance muscle strength and power (8,47), plasma concentrations of testosterone and growth hormone (5), and neuromuscular functions (6). Other studies, however, have drawn opposite conclusions, claiming that no improvement of muscle performance was obtained after vibration treatment (9). In addition, negative effects of whole-body vibration on health were documented. Workers exposed to daily vibration display vascular disorders (10), increased levels of lumbar prolapse, and lower back pain (12).

In this study, the measurements of knee extensor muscle isometric torque, obtained during pre-, during (weeks 4 and 8), and at the end of training, confirmed that local high-intensity vibration increases overall muscle strength in elderly male and female subjects. Specifically, isometric strength was elevated by the fourth week of stimulation, remained high during the training period, and also for at least several weeks after cessation of training. Indeed, follow-up measurements at 16 weeks after the end of training revealed consistently high values of muscle strength, similar to the levels recorded at the end of the vibrational protocol, for both female and male volunteers, although some inter-individual variability was noted.

The sustained increase in lower limb strength suggests modifications in the properties of skeletal muscle. Measurements of thigh circumferences and skinfolds showed that the force increase was not accompanied by an increase in muscle mass. We therefore examined the mechanical properties of single fibers to determine whether the changes can be explained at the cellular level. After 12 weeks of local high-intensity vibration, neither the cross-sectional area nor the specific tension of the VL muscle fibers was changed, compared to pre-training data. Thus, the change in force of the whole extensor muscle group is not based on an alteration

in the force-developing ability of single fibers. Previous studies have shown that muscle disuse in the elderly causes a decrease in specific tension (48), whereas resistance training in body builders is associated with increased specific tension (49). Apparently, the improved strength of leg extensor muscles after vibrational training is not related to an increase in muscle fiber-specific tension. Biopsy examination, however, yielded a valuable and unexpected result. The fiber phenotype distribution of the skeletal muscle was altered. The proportion of the fast MyHC-2X isoform was increased, and the proportion of the slow MyHC-1 isoform was significantly lower, in post-training biopsies compared to pre-training biopsies. This shift in myosin isoform expression is a clear indication of changes in fiber type distribution (49). Fiber type transition from slow to 2X, as suggested by the shift in myosin isoforms, should correspond to changes in the proportions of oxidative and glycolytic fibers, because, in human muscles, slow fibers are mainly oxidative whereas 2X fibers are principally glycolytic (24). Importantly, expression profile analysis validated this metabolic feature. In fact, indications for changes in fiber type distribution were seen in the transcriptional profile. In particular, changes in two of three functional categories (metabolic genes and those encoding sarcomeric proteins) of differentially regulated genes were identified in all screened elderly subjects. Glycolytic and glycogen-dependent metabolism appeared to be stimulated in trained subjects. In this study, personal transcriptional profiles, including data on specific differentially regulated genes, were generated for each of three subjects. Initially, the results appeared inconsistent, but, when the experimental plan was considered, and, particularly, when the long-term nature of the treatment was properly weighted, the transcriptional profiles of the three elderly subjects can be best regarded as specific temporal windows on genes functioning after consolidated or stabilized metabolic (in the wide sense) modifications. We employed a microarray technique to simultaneously screen all pathways activated at a given time-point, and we were able to detect compensatory pathways activated in the cells. Metabolic genes, either up- or down-regulated, were indeed distinct between subjects, but converged into enhancement of the glycogen-synthesis/glycolysis pathway. Glycogen-synthesis is considered as a compensator for increased glucose consumption during training. This hypothesis is consistent with the increased proportion of (specifically) fast MyHC-2X fibers as these fibers employ glycolytic metabolism.

The upregulation of genes, such as actin, desmin, titin and angiomotin, encoding sarcomeric proteins, is consistent with an increase in regeneration that recruits satellite cells to proliferate and fuse into new differentiated myotubes, that are comparable to *in vivo* primary fibers. We hypothesize that new fibers are generated during the first 4 weeks of local high-intensity vibrational stimulation, based on data showing that at week 4, the bilateral isometric strength of lower limbs was significantly increased. We used a biopsy fragment from one subject to collect and grow satellite cells (50), to study whether myogenesis properties *in vitro* are influenced by local high-intensity vibrational training. We induced the differentiation program in these cells, and, after 7 days of differentiation, we used an antibody MF20 against myosins

to measure the proportion of myotubes expressing the myosin heavy chain proteins. The preliminary data reveal that, after vibrational training, the proportion of MF20-positive myotubes increased by 11.8% (from 41.3% pre-training to 53.1% post-training). These data further support the hypothesis that novel fibers stimulated by local high-intensity vibration are induced to differentiate into new, mature, fast MyHC-2X fibers.

Sarcopenic skeletal muscle shows reduced metabolic power because of several factors, such as decreased blood perfusion, increased fibrosis, and development of the atrophic state. Skeletal muscle tissue undergoes constant oxidation, and the main source of reactive oxygen species is the mitochondrion. A previous study by our group showed consistent oxidative damage in aged skeletal muscle tissue (1). Altered metabolism impairs the balance between oxidative stress and scavenger activity. In fact, several antioxidant genes were downregulated in the elderly, suggesting that ROS scavenger activity is insufficient. Peroxiredoxin is an important antioxidant enzyme that counteracts lipid peroxidation, protecting cells by removing H₂O₂ (51). Thioredoxin plays a key role in oxidation-reduction reactions (43). Methionine sulfoxide reductase A counteracts methionine oxidation of proteins (44), whereas polymerase ϵ is able to repair oxidized DNA, albeit at low efficiency (42). The downregulated constitutive NO synthase (NOS) could be responsible for lowered nitric oxide production and may disrupt nitric oxide signaling in skeletal muscle arterioles, thus impairing vasodilatation in old age (45). Also, in a study of atrophy induction by horizontal bed rest in young males, it was observed that sarcolemmal NOS1 immunofluorescence in the vastus lateralis muscle increased (52). These opposite effects may be explained by age-related variations in muscle conditioning. In fact, during aging, the bioavailability of substrates and cofactors important for NOS activity decreases (45), and this was not reversed by high intensity vibrational training applied to elderly subjects.

Only one elderly subject (subject 2, Table IV) showed downregulation of antioxidant genes mentioned above. This observation suggests that local high-intensity vibration exacerbate existing physiological and personal gene regulation conditions.

Overall, the results of our study indicate that vibrational training was accompanied by several changes at the muscle molecular level. However, the lack of correlation between marked increases in the force developed during maximal voluntary contraction on the one hand, and muscle mass, single fiber thickness, or specific tension, on the other, suggests that nervous control of contraction must also be considered as possibly influenced by our training protocol. Improved recruitment or better activation of motor units might also be invoked to explain the observed increases in muscle force. A recent study by Fattorini *et al* (14) provided evidence of long-lasting changes in proprioceptive motor control after vibrational training at 100 Hz, and such changes may be partly responsible for the improved contractile performance observed here.

In conclusion, our data validate the effectiveness of the local high-intensity vibrational training procedure to counteract sarcopenia. The technique is easy to use, requires little patient commitment or time, and can be employed on patients with joint and/or neuro-muscular disorders.

Acknowledgements

We thank Dr Bruno Loffredo for cardiological consultations and Professor Enzo Ballone for assistance with statistical analysis. This study was supported by research grants awarded to Professors R. Saggini, G. Fanò, and S. Fulle from the University 'G. d'Annunzio' of Chieti-Pescara.

References

1. Fulle S, Protasi F, Di Tano G, *et al*: The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Exp Gerontol* 39: 17-24, 2004.
2. Argiles JM, Busquets S, Felipe A and Lopez-Soriano FJ: Muscle wasting in cancer and ageing: cachexia versus sarcopenia. *Adv Gerontol* 18: 39-54, 2006.
3. Avila-Funes JA and García-Mayo EJ: The benefits of doing exercise in the elderly. *Gac Med Mex* 140: 431-436, 2004.
4. Mühlberg W and Sieber C: Sarcopenia and frailty in geriatric patients: implications for training and prevention. *Gerontol Geriatr* 37: 2-8, 2004.
5. Bosco C, Cardinale M and Tsarpela O: Influence of vibration on mechanical power and electromyogram activity in human arm flexor muscles. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 79: 306-311, 1999.
6. Bosco C, Iacovelli M, Tsarpela O, *et al*: Hormonal responses to whole-body vibration in men. *Eur J Appl Physiol* 81: 449-454, 2000.
7. Kvorning T, Bagger M, Caserotti P and Madsen K: Effects of vibration and resistance training on neuromuscular and hormonal measures. *Eur J Appl Physiol* 96: 615-625, 2006.
8. Bosco C, Colli R, Intorini E, *et al*: Adaptive responses of human skeletal muscle to vibration exposure. *Clin Physiol* 19: 183-187, 1999.
9. De Ruiter CJ, Van Raak SM, Schilperoort JV, Hollander AP and de Hann A: The effects of 11 weeks whole body vibration training on jump height, contractile and activation of human knee extensors. *Eur J Appl Physiol* 90: 595-600, 2003.
10. Bovenzi M: Exposure-response relationship in the hand-arm vibration syndrome: an overview of current epidemiology research. *Int Arch Occup Environ Health* 71: 509-519, 1998.
11. Bovenzi M, D'Agostin F, Rui F, Ambrosi L and Zefferino R: Salivary endothelin and vascular disorders in vibration-exposed workers. *Scand J Work Environ Health* 34: 133-141, 2008.
12. Lings S and Leboeuf-Yde C: Whole-body vibration and low back pain: a systematic, critical review of the epidemiological literature 1992-1999. *Int Arch Occup Environ Health* 73: 290-297, 2000.
13. Seidel H: On the relationship between whole-body vibration exposure and spinal health risk. *Ind Health* 43: 361-377, 2005.
14. Fattorini L, Ferraresi A, Rodio A, Azzena GB and Filippi GM: Motor performance changes induced by muscle vibration. *Eur J Appl Physiol* 98: 79-87, 2006.
15. Ribot-Ciscar E, Rossi-Durand C and Roll JP: Muscle spindle activity following muscle tendon vibration in man. *Neurosci Lett* 258: 147-150, 1998.
16. Eklund G and Hagbarth KE: Normal variability of tonic vibration reflexes in man. *Exp Neurol* 16: 80-92, 1966.
17. Brown MC, Enberg I and Matthews PB: The use of vibration as a selective repetitive stimulus for Ia afferent fibers. *J Physiol* 191: 31-32, 1967.
18. Crone C and Nielsen J: Central control of disynaptic reciprocal inhibition in humans. *Acta Physiol Scand* 152: 351-363, 1994.
19. Brunetti O, Filippi GM, Lorenzini M, *et al*: Improvement of posture stability by vibratory stimulation following anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 14: 1180-1187, 2006.
20. Bottinelli R, Canepari M, Pellegrino MA, *et al*: Force-velocity properties of human skeletal muscle fibers: myosin heavy chain isoform and temperature dependence. *J Physiol* 495: 573-586, 1996.
21. Toniolo L, Maccatrozzo L, Patruno M, *et al*: Fiber types in canine muscles: myosin isoform expression and functional characterization. *Am J Physiol* 292: C1915-C1926, 2007.
22. Talmadge RJ and Roy RR: Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol* 75: 2337-2340, 1993.
23. Jonnalagadda S, and Srinivasan R: Principal components analysis based methodology to identify differentially expressed genes in time-course microarray data. *BMC Bioinformatics* 9: 267, 2008.

24. Schiaffino S and Reggiani C: Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 76: 371-423, 1996.
25. Delibegovic M, Armstrong CG, Dobbie L, Watt PW, Smith AJ and Cohen PT: Disruption of the striated muscle glycogen targeting subunit PPP1R3A of protein phosphatase 1 leads to increased weight gain, fat deposition, and development of insulin resistance. *Diabetes* 52: 596-604, 2003.
26. Schiaffino S, Sandri, M and Murgia M: Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. *Physiology* 22: 269-278, 2007.
27. Smolle M, Prior AE, Brown AE, Cooper A, Byron O and Lindsay JG: A new level of architectural complexity in the human pyruvate dehydrogenase complex. *J Biol Chem* 281: 19772-19780, 2006.
28. Bishop D, Edge J, Thomas C and Mercier J: High-intensity exercise acutely decreases the membrane content of MCT1 and MCT4 and buffer capacity in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 102: 616-621, 2007.
29. Abe T, Kakyo M, Tokui T, *et al*: Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem* 274: 17159-17163, 1999.
30. Durand E, Boutin P, Meyre D, Charles MA, Clement K, Dina C and Froguel P: Polymorphisms in the amino acid transporter solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter) member 14 gene contribute to polygenic obesity in French Caucasians. *Diabetes* 53: 2483-2486, 2004.
31. Hu WH, Hausmann ON, Yan MS, Walters WM, Wong PK and Bethea JR: Identification and characterization of a novel Nogo-interacting mitochondrial protein. *J Neurochem* 81: 36-45, 2002.
32. Estornes Y, Gay F, Gevrey JC, Navoizat S, *et al*: Differential involvement of destrin and cofilin-1 in the control of invasive properties of Isreco1 human colon cancer cells. *Int J Cancer* 121: 2162-2171, 2007.
33. Panic B, Whyte JR and Munro S: The ARF-like GTPases Arl1p and Arl3p act in a pathway that interacts with vesicle-tethering factors at the Golgi apparatus. *Curr Biol* 13: 405-410, 2003.
34. Sorimachi H, Toyama-Sorimachi N, Saido TC, *et al*: Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. *J Biol Chem* 268: 10593-10605, 1993.
35. Kramerova I, Kudryashova E, Venkatraman G and Spencer MJ: Calpain 3 participates in sarcomere remodeling by acting upstream of the ubiquitin-proteasome pathway. *Hum Mol Genet* 14: 2125-2134, 2005.
36. Tskhovrebova L and Trinick J: Titin: properties and family relationships. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 679-689, 2003.
37. Labeit S, Lahmers S, Burkart C, *et al*: Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins. *J Mol Biol* 362: 664-681, 2006.
38. Bratt A, Wilson WJ, Troyanovsky B, Aase K, Kessler R, Van Meir EG and Holmgren L: Angiotensin belongs to a novel protein family with conserved coiled-coil and PDZ binding domains. *Gene* 298: 69-77, 2002.
39. Andrée B, Hillemann T, Kessler-Icekson G, Schmitt-John T, Jockusch H, Arnold HH and Brand T: Isolation and characterization of the novel popeye gene family expressed in skeletal muscle and heart. *Dev Biol* 223: 371-382, 2000.
40. Ochotorena IL, Hirata D, Kominami K, *et al*: Conserved Wat1/Pop3 WD-repeat protein of fission yeast secures genome stability through microtubule integrity and may be involved in mRNA maturation. *J Cell Sci* 114: 2911-2920, 2001.
41. Laplante JM, O'Rourke F, Lu X, Fein A, Olsen A, and Feinstein MB: Cloning of human Ca²⁺ homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP): regulated expression of antisense cDNA depletes CHERP, inhibits intracellular Ca²⁺ mobilization and decreases cell proliferation. *Biochem J* 348: 189-199, 2000.
42. Sugino A, Ohara T, Sebastian J, Nakashima N and Araki H: DNA polymerase epsilon encoded by *cdc20+* is required for chromosomal DNA replication in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* 3: 99-110, 1998.
43. Nordberg J and Arnér ES: Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31: 1287-1312, 2001.
44. Vattanaviboon P, Seeanukun C, Whangsuk W, Utamapongchai S and Mongkolsuk S: Important role for methionine sulfoxide reductase in the oxidative stress response of *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli*. *J Bacteriol* 187: 5831-5836, 2005.
45. Delp MD, Behnke BJ, Spier SA, Wu G and Muller-Delp JM: Ageing diminishes endothelium-dependent vasodilatation and tetrahydrobiopterin content in rat skeletal muscle arterioles. *J Physiol* 586: 1161-1168, 2008.
46. Doherty TJ: Invited review: Aging and sarcopenia. *J Appl Physiol* 95: 1717-1727, 2003.
47. Samuelson B, Jorfeldt L, Ahlborg B: Influence of vibration on endurance of maximal isometric contraction. *Clin Physiol* 9: 21-25, 1989.
48. D'Antona G, Pellegrino MA, Adami R, *et al*: The effect of ageing and immobilization on structure and function of human skeletal muscle fibers. *J Physiol* 552: 499-511, 2003.
49. D'Antona G, Lanfranconi F, Pellegrino MA, *et al*: Skeletal muscle hypertrophy and structure and function of skeletal muscle fibers in male body builders. *J Physiol* 570: 611-627, 2006.
50. Beccafico S, Puglielli C, Pietrangelo T, Bellomo R, Fanò G and Fulle S: Age-dependent effects on functional aspects in human satellite cells. *Ann NY Acad Sci* 1100: 345-352, 2007.
51. Rhee SG, Chae HZ and Kim K: Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signalling. *Free Radic Biol Med* 38: 1543-1552, 2005.
52. Rudnick J, Püttmann B, Tesch PA, *et al*: Differential expression of nitric oxide synthases (NOS 1-3) in human skeletal muscle following exercise countermeasure during 12 weeks of bed rest. *FASEB J* 18: 1228-1230, 2004.