

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA
SCUOLA DI MEDICINA

Corso di laurea in: Scienze Motorie



**I TIPI DI FIBRE MUSCOLARI NEI MUSCOLI
SCHELETRICI DEI MAMMIFERI E LE LORO
TRANSIZIONI**

Relatore:

Prof. Massimiliano Mantovani

Tesi di laurea di:

Zampini Mattia

Matricola n. 717457

Anno Accademico 2013/2014

INDICE:

- **INTRODUZIONE.....pag. 2**
- **LE CARATTERISTICHE ANATOMICHE DI UNA FIBRA
MUSCOLARE SCHELETRICA.....pag. 5**
- **LE SCOPERTE SCIENTIFICHE SULL'ARGOMENTO TIPI DI
FIBRE MUSCOLARI.....pag. 13**
- **CARATTERIZZAZIONE DEI QUATTRO PRINCIPALI TIPI DI
FIBRE NEI MAMMIFERI.....pag. 33**
- **LE TRANSIZIONI DEI TIPI DI FIBRE MUSCOLARI.....pag. 88**
- **CONCLUSIONI.....pag. 122**
- **BIBLIOGRAFIA.....pag. 124**
- **RINGRAZIAMENTI.....pag. 136**

INTRODUZIONE:

Ci sono due principali motivi per cui ho scelto di scrivere una tesi sui diversi tipi di fibre muscolari scheletriche dei mammiferi. Prima di tutto la curiosità, mi reputo un ragazzo molto curioso che cerca di approfondire il più possibile quello che gli interessa. Mi piace capire il perché delle cose. Anche se a volte per trovare la risposta a questa domanda bisogna scavare a fondo e scendere anche nel particolare. Durante il mio percorso di tre anni presso l'università di scienze motorie ho incontrato molte volte l'argomento di questo elaborato in materie come anatomia, fisiologia, teoria del movimento, metodologia dell'allenamento ecc..., ma nessuna descrizione dei professori o letta da me sui libri mi bastava. Capivo che era un argomento che mi attirava, avevo diverse domande da porre, a cui, almeno in quel momento, non mi era stata data una risposta soddisfacente. I libri proponevano le classiche e riduttive classificazioni, facilmente reperibili anche in internet, e niente di più. Capii allora che dovevo passare al livello successivo, dovevo e volevo entrare nel particolare di questo argomento e la tesi di laurea della triennale di scienze motorie mi è sembrata sin da subito lo strumento giusto, uno strumento che mi avrebbe condotto in una indagine personale e approfondita.

Il secondo motivo per cui ho scelto questo particolare argomento per la mia tesi di laurea è il fatto che mi piacciono le sfide. La vita è una serie di sfide, e scrivere una tesi su un argomento così vasto è stata una bella sfida a me stesso sia in termini di tempo, dalla raccolta del primo materiale alla conclusione è passato circa un anno, sia in termini di energie nervose e resistenza mentale, dato che, da una parte, ho avuto scadenze precise per quanto riguarda la consegna e, dall'altra, l'orgoglio di fare un ottimo lavoro su un argomento per me importante.

Mentre leggevo articoli scientifici e scrivevo, ho finalmente capito perché, fin

dall'inizio, questo argomento mi aveva catturato.

Sin dagli albori della storia, gli animali, come l'uomo, hanno avuto una facoltà incredibilmente importante per la loro sopravvivenza: il movimento. Senza movimento il mondo per noi avrebbe una prospettiva ben diversa. Da futuro laureato in scienze motorie conosco l'importanza che il movimento ha nei confronti dell'organismo animale, in particolare quello umano. Il movimento per l'uomo è una terapia che, nelle giuste dosi, dona la salute al nostro organismo, ci fa stare bene, ci fa vivere meglio. Ma il movimento può anche essere graduato e variato per massimizzare quelle che sono le qualità atletico-fisiche dell'organismo umano, che viene così spinto sempre più verso il limite individuale, oppure al contrario per minimizzare gli effetti dannosi di particolari situazioni di malattia o di età avanzata. In generale comunque, qualsiasi metodica di movimento venga somministrata, sono i muscoli che, contraendosi, muovono il corpo, ed essi sono costituiti da fibre muscolari con caratteristiche differenti le une dalle altre.

Come la posizione del corpo viene variata dalla contrazione dei muscoli, anche le caratteristiche dei muscoli vengono variate dal movimento.

È essenziale, secondo me, che uno scienziato motorio, colui che deve essere in grado di somministrare la giusta tipologia e dose di movimento ad altre persone, conosca quali sono le modificazioni a cui una struttura muscolare va incontro quando viene sollecitata. Da quelle che sono le mie conoscenze oggi posso dire che tutte le modificazioni cui può andare incontro un muscolo sollecitato ricadono in tre grandi categorie: 1. Modificazione diametro delle fibre muscolari che contiene, 2. Modificazioni delle caratteristiche metaboliche delle fibre muscolari che contiene, 3. Modificazione del tipo di fibra muscolare che contiene.

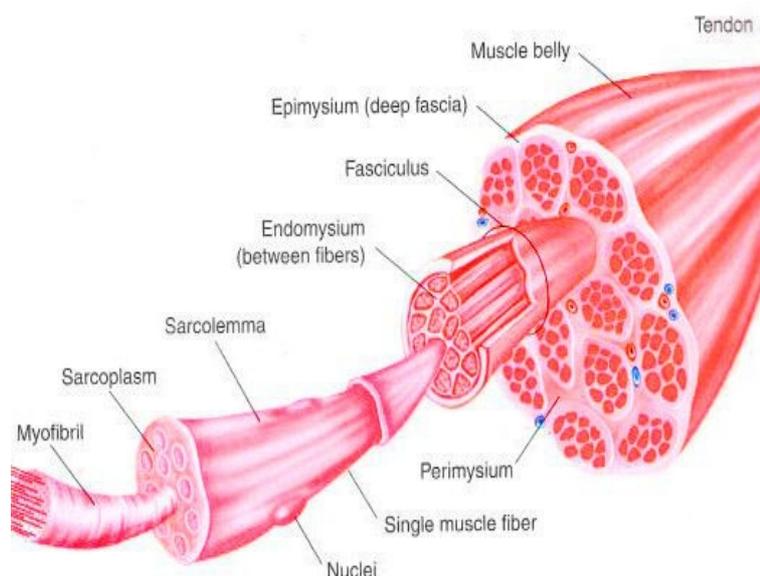
Questo elaborato, dopo aver descritto quali sono i differenti tipi di fibre muscolari presenti a livello dei muscoli scheletrici dei mammiferi (tra cui

l'uomo) e le loro principali caratteristiche, tratta della terza classe di modificazioni sopracitate, e in particolare tratta di come il movimento modifica in maniera qualitativa il muscolo, e quindi come i tipi di fibre muscolari si modificano, si trasformano con metodiche di allenamento e attività fisica differenti.

LE CARATTERISTICHE ANATOMICHE DI UNA FIBRA MUSCOLARE SCHELETRICA:

Prima di entrare nel merito degli argomenti centrali di questo elaborato, è utile riportare una sintesi di quelle che sono le caratteristiche generali di una fibra muscolare scheletrica, per agevolare la comprensione dei suddetti argomenti che verranno esposti successivamente.

La fibra muscolare scheletrica è la cellula che costituisce il tessuto muscolare scheletrico. All'interno di un muscolo scheletrico, ogni fibra muscolare è circondata da uno strato di tessuto connettivo che prende il nome di endomisio e collega tra loro tutte le fibre che insieme costituiscono i fascicoli. Questi sono a loro volta circondati da uno strato di tessuto connettivo definito perimisio, mentre l'intero muscolo è circondato dall'epimisio. Questi tre strati, alle estremità del muscolo, si fondono a formare le strutture tendinee mentre, all'interno del muscolo sono attraversati da vasi e nervi che raggiungono le singole fibre (figura 1.1).



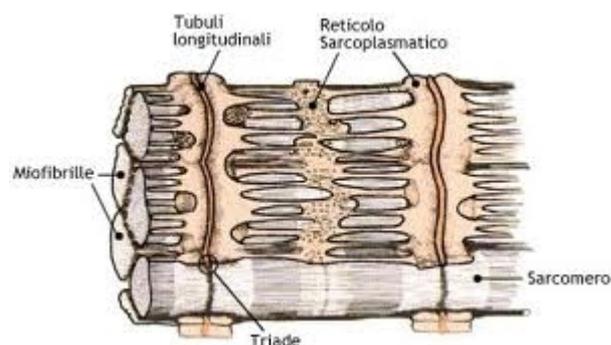
(Figura 1.1 Struttura macroscopica di un muscolo)

Ogni fibra muscolare ha una struttura allungata che può raggiungere anche la lunghezza dell'intero muscolo (30-40 cm). E' una cellula contenente centinaia di nuclei poiché, embriologicamente, è frutto dell'unione di cellule precursore mononucleate chiamate mioblasti. La struttura interna di una fibra muscolare scheletrica è costituita per circa l'80% da strutture proteiche lunghe come tutta la cellula chiamate miofibrille, contenute in un numero che varia da 100 a diverse migliaia.

Intorno a ciascuna miofibrilla si organizzano i tubuli del reticolo sarcoplasmatico, simile al reticolo endoplasmatico liscio di una generica cellula.

Il sarcolemma, la membrana plasmatica delle fibre muscolari, è caratterizzato dalla presenza di profonde invaginazioni che prendono in nome di tubuli T e che si approfondano nella cellula fino a raggiungere le miofibrille più interne.

Un complesso importante ai fini della contrazione muscolare sono le triadi, costituite da un tubulo T affiancato in entrambi i lati da rigonfiamenti del reticolo sarcoplasmatico detti cisterne (Figura 1.2).

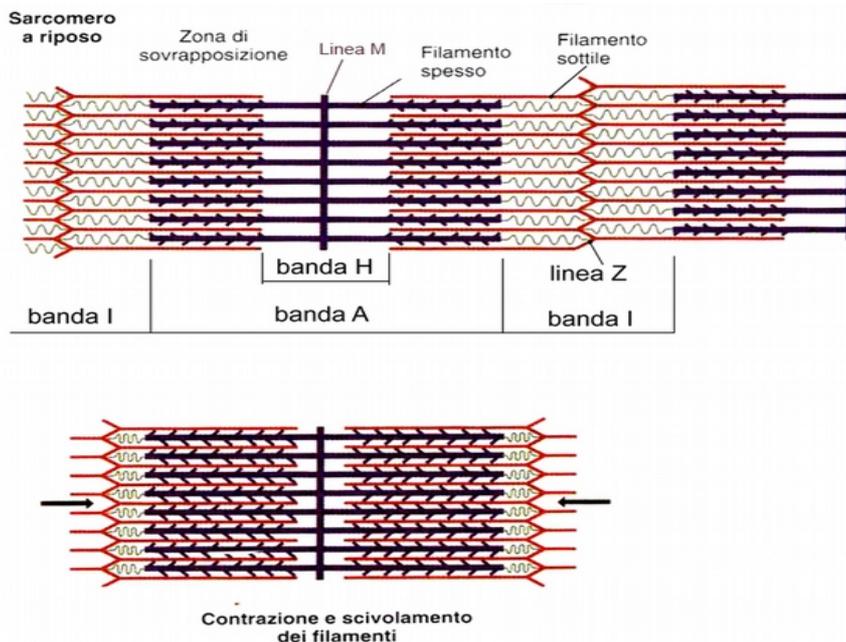


(Figura 1.2 Triadi)

Ciascuna miofibrilla è composta da unità elementari dette miofilamenti che formano uno schema regolare che si ripete. L'unità di questo schema ripetitivo viene detta sarcomero. Ciascun sarcomero contiene due tipi di filamenti, spessi e sottili. I primi sono costituiti principalmente da una proteina chiamata miosina, costituita da catene pesanti (MHC) e catene leggere (MLC), e avente

la forma simile a due “mazze da golf”, con le aste o code collegate a formare una struttura allungata, alle cui estremità sono presenti due “teste” globulari. Il secondo filamento, quello sottile, è invece costituito da molecole proteiche di G-actina organizzate in una struttura ad elica che prende il nome di F-actina. Oltre all'actina, nei filamenti sottili sono presenti due proteine regolatrici che prendono il nome di troponina e tropomiosina.

Ogni sarcomero è delimitato da due linee chiamate linee Z (o “strie Z”), mentre internamente ha una organizzazione a bande in cui la banda A è quello spazio in cui sono presenti i filamenti spessi (comprendente la linea M e la banda H), mentre la banda I è la zona dove si trovano i filamenti sottili; una terza zona è quella di sovrapposizione in cui i filamenti sottili sono sovrapposti a quelli spessi (Figura 1.3).



(Figura 1.3 Struttura del sarcomero)

La disposizione dei filamenti spessi e sottili conferisce al sarcomero un aspetto striato, a bande, e poiché tutte le miofibrille sono disposte

parallelamente all'asse maggiore della fibra muscolare, e i sarcomeri sono posti uno di fianco all'altro, l'intera fibra muscolare ha un aspetto striato, dove le diverse bande corrispondono alle bande dei singoli sarcomeri; ed ecco perché i muscoli scheletrici sono definiti anche striati.

Per quanto riguarda il fenomeno della contrazione muscolare è valida la teoria dello scorrimento dei filamenti secondo cui, a livello del singolo sarcomero, le teste delle molecole di miosina si collegano alle molecole di actina dei filamenti sottili, creando i cosiddetti ponti acto-miosinici, e, successivamente, esercitano una trazione che porta i filamenti sottili a scivolare sopra quelli spessi, avvicinando in questo modo le due linee Z del sarcomero alla linea M centrale e quindi, in generale, diminuendone la lunghezza.

Questo fenomeno è sotto il controllo del sistema nervoso centrale, infatti i neuroni motori, che fuoriescono, all'interno di un nervo, dai fori vertebrali della colonna vertebrale, entrano nei muscoli e si collegano direttamente alle fibre muscolari. Un neurone motorio che controlla un determinato numero di fibre muscolari e le fibre muscolari stesse a lui collegate formano una struttura chiamata unità motoria.

A seconda della quantità di fibre muscolari controllate, una unità motoria può essere piccola o grande. Le fibre muscolari controllate da una unità motoria sono tutte fibre muscolari dello stesso tipo poiché possiedono la medesima innervazione. Una unità motoria può essere quindi veloce o lenta a seconda del tipo di fibre contenute e quindi del tipo di motoneurone che le innerva. Esistono motoneuroni veloci e motoneuroni lenti che hanno caratteristiche morfologiche, metaboliche ed elettrofisiologiche differenti e che quindi andranno a caratterizzare anche il tipo di fibre associate.

Il punto di unione tra il neurone motorio, o α -motoneurone, e una fibra muscolare è una sinapsi specializzata chiamata giunzione neuromuscolare.

Essa è costituita da un bottone terminale sinaptico, la parte terminale del

motoneurone, in comunicazione con una porzione specializzate della fibra muscolare chiamata placca motrice. Tra di loro ce un sottile spazio chiamato fessura sinaptica in cui viene riversato dal motoneurone il neurotrasmettitore che si legherà agli specifici recettori della fibra muscolare.

Il legame del neurotrasmettitore al recettore determina l'apertura di alcuni canali ionici con relativo attraversamento del sarcolemma di alcuni ioni verso l'interno e verso l'esterno della cellula, situazione che porta ad una variazione del potenziale di membrana e alla creazione di un potenziale d'azione.

La pompa sodio-potassio (Na-K) è quella proteina di membrana in grado di riportare i due ioni, dopo il loro spostamento causato dall'apertura dei canali ionici, nelle loro sedi pre-neurotrasmettitore (sodio all'esterno della cellula e potassio all'interno); per fare ciò però utilizza energia sottoforma di ATP.

L'accoppiamento eccitazione-contrazione è tutta quella serie di processi che vanno dall'arrivo di un potenziale d'azione alla giunzione neuromuscolare fino alla contrazione muscolare.

In sintesi si possono così descrivere:

1-A livello della giunzione neuromuscolare viene rilasciato il neurotrasmettitore acetilcolina (Ach) che si lega al recettore sinaptico posto sul sarcolemma.

2-Da ciò ne consegue una variazione del potenziale di membrana della fibra muscolare che genera un potenziale d'azione, il segnale elettrico universale del sistema nervoso centrale; questo si propaga in tutto il sarcolemma penetrando nei profondi tubuli T.

3-A livello di una triade, le cisterne del reticolo sarcoplasmatico contengono una elevata concentrazione di ioni calcio Ca^{2+} ; le cisterne all'arrivo del potenziale d'azione nei tubuli T lasciano uscire una grande quantità di questi ioni.

4-Gli ioni calcio si legano al complesso regolatore troponina-tropomiosina e ne variano l'orientamento, permettendo all'actina il legame actomiosinico con le

teste della miosina.

5-Avviene, a seguito di diversi cicli di attacco e stacco della miosina dall'actina, lo scivolamento dei filamenti, e quindi la contrazione.

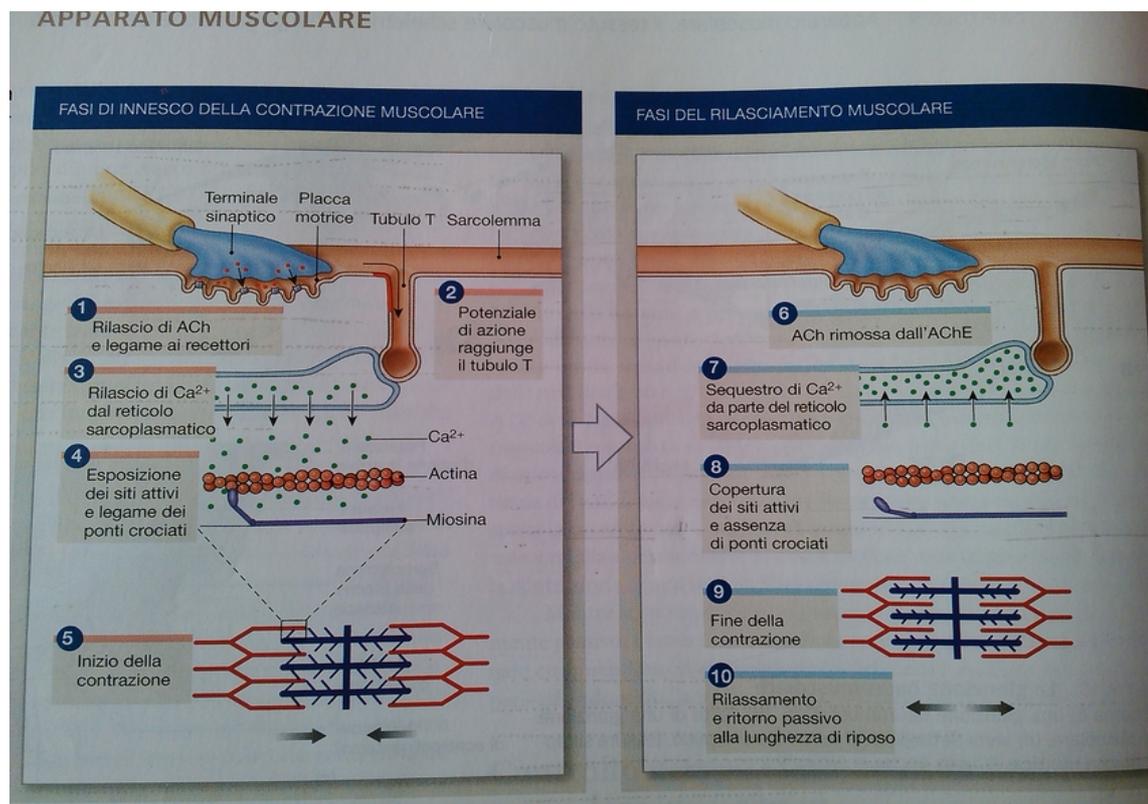
Questo processo continua fino a che:

6-Un enzima chiamato acetilcolinesterasi (AChE) elimina le molecole di neurotrasmettitore acetilcolina e la generazione del potenziale d'azione cessa.

7-Il reticolo sarcoplasmatico riassume gli ioni calcio attraverso pompe ioniche specializzate.

8-Il complesso troponina-tropomiosina ritorna alla sua conformazione iniziale e non permette più la creazione di ponti acto-miosinici.

9-Termina la contrazione e quindi la fibra torna in una situazione di rilassamento muscolare. (Figura 1.4)



(Figura 1.4 Eventi accoppiamento eccitazione-contrazione)

Per compiere la contrazione, la fibra utilizza l'energia derivata dalla scissione

di una molecola che prende il nome di ATP (adenosina trifosfato), che viene così degradato in ADP (adenosina difosfato). Questa reazione libera l'energia necessaria per svolgere tutti i processi interni della cellula, compresa la contrazione. Questa molecola però è presente in una quantità finita all'interno di ogni cellula, quindi sono necessari dei processi metabolici che, a seconda delle richieste energetiche, riescano a risintetizzare le molecole di ATP consumate. Questi processi sfruttano la degradazione delle molecole organiche che noi ingeriamo con la dieta per la creazione di ATP e sono glicolisi anaerobica e aerobica (con ciclo di Krebs) che si basa sulla degradazione di molecole di glucosio, e la β -ossidazione che si basa sulla degradazione di acidi grassi. Mentre la glicolisi anaerobica avviene a livello del citoplasma, il ciclo di Krebs avviene a livello di organuli specializzati che prendono il nome di mitocondri. Questi sono presenti in quasi tutte le cellule del nostro organismo e grazie alla loro particolare struttura sono in grado, attraverso un meccanismo definito chemiosmotico, di risintetizzare ATP aerobicamente, ovvero in presenza di ossigeno.

Un altro concetto che è utile ricordare ai fini della successiva trattazione è il cosiddetto reclutamento muscolare, ovvero come il sistema nervoso è in grado di modulare la forza che i nostri muscoli sono in grado di esprimere contro il carico esterno che gli viene applicato. Vi sono, in particolare due espedienti che il sistema nervoso utilizza per aumentare la produzione di forza di un muscolo: 1. l'aumento del numero di unità motorie stimulate sul totale delle unità motorie e, 2. l'aumento della frequenza di scarica delle singole unità motorie stimulate. In generale si dice che prima vengono attivate le unità motorie lente che hanno una soglia di reclutamento più basso, e poi, via via che aumenta la produzione di forza, vengono attivate quelle veloci, che effettivamente producono una forza isometrica maggiore. Stimolando però anche la totalità delle unità motorie non si raggiungono valori di forza maggiori

a circa l'80% della massima forza effettivamente sviluppabile. Per raggiungere il 100% della forza che un muscolo è in grado di sviluppare, non solo devono essere attivate tutte le unità motorie presenti in quel muscolo, ma devono anche essere stimulate con una frequenza massimale, ovvero tetanica. La modulazione della frequenza e quindi il raggiungimento dello stato tetanico permette di sfruttare non solo l'80% della forza ma di raggiungere il 100% della massima forza sviluppabile da quel muscolo.

Avendo ripreso queste semplici basi anatomiche riguardanti la fibra muscolare scheletrica, si può ora affrontare i capitoli successivi che entrano nel vivo della trattazione e rispondono a domande come le seguenti:

Quanti e quali sono i tipi di fibre muscolari scheletriche presenti nei muscoli dei mammiferi, tra cui l'uomo?

In quanto tempo e con che procedure sono state scoperti?

Quali sono le differenze dal punto di vista morfologico, metabolico, elettrico, meccanico tra i vari tipi di fibre presenti nei muscoli di mammiferi?

Siamo in grado di trasformare un tipo di fibra in un altro?

...

LE SCOPERTE SCIENTIFICHE

SULL'ARGOMENTO TIPI DI FIBRE MUSCOLARI:

1. LA SCOPERTA DEI 4 PRINCIPALI TIPI DI FIBRE:

Gli scienziati erano a conoscenza che i muscoli scheletrici possono essere distinti sulla base del loro colore, come rossi o bianchi, e sulla base delle loro proprietà contrattili, come veloci e lenti, già della prima metà del 19° secolo. Tuttavia è durante gli ultimi 40 anni che le nozioni sulla diversità dei tipi di fibre muscolari sono cresciute rapidamente fino a portare alla identificazione di quattro tipi di fibre principali nei muscoli scheletrici adulti di mammiferi. Fino al 1968-1970, la visione comune sulla diversità dei muscoli scheletrici di mammifero si basava ancora sulla vecchia classificazione che comprendeva muscoli dalla contrazione veloce, caratterizzati da metabolismo glicolitico e specializzati per attività di tipo fasico, generalmente indicati come muscoli bianchi, e muscoli dalla contrazione lenta, ricchi di mioglobina ed enzimi ossidativi e specializzati per attività continue, anche chiamati muscoli rossi (84).

L'approccio meccanico e quello biochimico trovarono il loro punto di unione nella relazione tra l'attività dell'ATPasi actina-attivata della miosina (Miosin-ATPasi) e la velocità di accorciamento del muscolo (9).

Uno schema più complesso emerse alla fine degli anni '60, principalmente come risultato di quattro indipendenti percorsi di ricerca: 1. Studi fisiologici e istochimici correlati di singole unità motorie; 2. Microscopie elettroniche di muscoli scheletrici veloci e lenti; 3. Nuove procedure istochimiche di analisi della miosin-ATPasi; 4. Studi biochimici sugli enzimi glicolitici e ossidativi in muscoli differenti.

Edstrom e Kugelberg (1968) stimolarono assoni motori singoli nel muscolo veloce tibiale anteriore (TA) di ratto per caratterizzare le singole unità motorie in relazione alle capacità contrattili, successivamente indussero una deplezione di glicogeno nelle fibre muscolari corrispondenti e applicarono l'esame istochimico enzimatico per l'attività dell'enzima succinato deidrogenasi (SDH), che riflette la potenzialità del metabolismo ossidativo. Usando questo approccio furono in grado di mostrare che:

1. le unità motorie sono omogenee per quanto riguarda la composizione dei tipi di fibre, e che quindi una unità motoria comprende fibre che sono tutte dello stesso tipo;
2. le unità motorie leggermente positive e quelle fortemente negative per la colorazione dell'SDH sono entrambe unità motorie veloci;
3. differiscono tra di loro in fatto di resistenza alla fatica.

Unità motorie composte da fibre negative all'SDH vanno incontro ad un rapido declino nella tensione sviluppata a seguito di stimolazioni ripetute, mentre quelle composte da fibre positive all'SDH non mostrano una caduta della tensione sviluppata per diversi minuti. Uno spettro di unità motorie con intermedie colorazioni di SDH e resistenza alla fatica furono riscontrati nel muscolo TA (tibiale anteriore).

Un simile spettro di fibre con colorazioni variabili per l'SDH e la mioglobina furono trovate nel muscolo estensore lungo delle dita (EDL), un muscolo che contiene solo unità motorie veloci (33), e, attraverso la microscopia elettronica di queste fibre, furono trovati contenuti variabili di mitocondri, con un volume mitocondriale che variava da valori <5% a valori >25% del volume totale della fibra. Sia le fibre piccole e ricche di mitocondri sia quelle grandi e povere di mitocondri del muscolo EDL di ratto mostrarono un reticolo sarcoplasmatico (SR) riccamente sviluppato, in contrasto con quello poco sviluppato che era stato riscontrato nelle fibre a contrazione lenta del muscolo soleo. D'altra parte i sarcomeri nelle fibre muscolari povere di mitocondri avevano una linea Z

sottile, mentre entrambe le fibre ricche di mitocondri del muscolo veloce e le fibre muscolari lente del muscolo soleo avevano linee Z più spesse. Fu quindi proposto che la struttura della fibra muscolare sia l'espressione di due distinti parametri fisiologici: la velocità di contrazione, collegata allo sviluppo del reticolo sarcoplasmatico (SR), e la resistenza alla fatica, collegata con il contenuto mitocondriale e lo spessore delle linee Z (113).

Un'altra corrente di pensiero che si basava sulla eterogeneità delle fibre muscolari veloci sfruttò le procedure per l'analisi istochimica dell'enzima miosin-ATPasi e ciò portò all'identificazione di due popolazioni di fibre, chiamate tipo 2A e tipo 2B che erano abbondanti nei muscoli a contrazione rapida e si distinguevano dalle fibre di tipo 1, predominanti nei muscoli a contrazione lenta (58).

Correlazioni fisiologiche-istochimiche che utilizzavano sia la colorazione alla miosin-ATPasi sia all'SDH nei muscoli di gatto confermarono l'esistenza di due tipi di unità motorie a contrazione rapida: 1. unità fast-fatigable (FF) composte da fibre di tipo 2B con colorazione debole all'SDH, e 2. unità fatigue-resistant (FR) composte da fibre di tipo 2A con colorazione forte all'SDH (24).

Un ulteriore contributo alla caratterizzazione di queste tre principali popolazioni di fibre fu il fatto di riconoscere, attraverso studi biochimici su muscoli composti principalmente da un tipo di fibra, che entrambe le fibre 2A e 2B hanno alti livelli di enzimi glicolitici, mentre hanno un complemento enzimatico ossidativo differente tra loro; questo portò alla classificazione di fibre lente ossidative (tipo 1), veloci ossidative glicolitiche (2A) e veloci glicolitiche (2B) (90).

Analisi più precise delle proprietà metaboliche furono seguentemente rese possibili dall'introduzione della microdissezione delle singole fibre che mostrò grandi variazioni delle attività enzimatiche tra le differenti popolazioni di fibre (79).

Un importante step nella caratterizzazione dei principali tipi di fibre presenti nei muscoli scheletrici dei mammiferi ha luogo tra il 1988 e il 1994 con la scoperta di un terzo tipo di fibra veloce, avente la porzione di catena pesante di miosina (MHC) differente. Di lì a poco, questi studi portarono all'identificazione delle fibre chiamate tipo 2X (112).

Tuttavia, inizialmente, non si comprendeva se questa MHC fosse una nuova isoforma o il risultato di una modificazione post-trascrizionale delle altre, fino alla prova decisiva della presenza di una distinta trascrizione genica per l'isoforma MHC-2x (37).

Le unità motorie composte da fibre di tipo 2X avevano proprietà contrattili simili a quelle delle altre unità motorie veloci, e la loro resistenza alla fatica era intermedia tra quella delle 2A e quella delle 2B.

Nei muscoli scheletrici di ratto, le fibre 2X hanno una colorazione da moderata a forte all'SDH, e la loro massima velocità di accorciamento è intermedia tra quella delle 2A e quella delle 2B (17,18,19).

Analisi immunostochimiche e di ibridazione in situ di sezioni di muscolo e studi biochimici e fisiologici su singole fibre, confermarono l'esistenza di uno spettro di tipi di fibre con una composizione di MHC pura o ibrida in accordo con questo schema: $1 \leftrightarrow 1/2A \leftrightarrow 2A \leftrightarrow 2A/2X \leftrightarrow 2X \leftrightarrow 2X/2B \leftrightarrow 2B$. Tuttavia questo modello dell'espressione genica delle MHC non è obbligatorio; per esempio sono state trovate fibre che esprimevano MHC-1 ed MHC-2x ma non la MHC-2a (25). Un profilo del tipo di fibre simile a quello presente nei muscoli scheletrici di ratto è stato osservato anche in specie di mammiferi differenti come topo, coniglio e maiale di Guinea; tuttavia nei muscoli umani la MHC-2b non è presente, anche se il corrispondente gene MYH4 è presente nel genoma, e le fibre di tipo 2B secondo la colorazione all'ATPasi sono invece 2X per quanto riguarda la composizione di MHC presente (120).

L'uomo ha però, in contrasto con il gatto e il topo, il valore più basso di attività

dell'enzima SDH nelle fibre 2X rispetto agli altri tipi di fibra.

I quattro principali tipi di fibre finora citati (1-2A-2X-2B) sono distribuiti in maniera variabile nei muscoli del corpo dei mammiferi, negli arti, nel tronco e nella testa. Le proporzioni relative di un determinato tipo di fibra possono variare a seconda della specie e della posizione anatomica. Per esempio il muscolo diaframma, un muscolo respiratorio continuamente attivo, è un muscolo veloce nel ratto e nel topo mentre è un muscolo lento nei grandi mammiferi come la mucca. Nel ratto il diaframma consiste principalmente di fibre di tipo 2X, mentre mancano fibre 2B, abbondanti nei muscoli delle gambe. In questi muscoli, i più studiati di tutto il corpo, le fibre lente di tipo 1 sono più abbondanti nel compartimento posteriore, dove vi è localizzato il muscolo lento soleo, in relazione al grande ruolo posturale che hanno questi muscoli. In molte specie, le fibre di tipo 2 sono più numerose nelle zampe anteriori rispetto a quelle posteriori; in accordo con ciò, nell'uomo i muscoli degli arti superiori sono più veloci di quelli degli arti inferiori (61).

Il ruolo centrale che riveste la miosina come motore molecolare nella fisiologia della cellula muscolare e l'esistenza di diverse isoforme di MHC (catena pesante di miosina), distribuite in maniera differente nelle varie fibre, fa sì che le stesse isoforme di MHC siano il miglior marker disponibile per la classificazione dei vari tipi di fibre muscolari. Sono presenti specifiche isoforme di MHC nei muscoli in via di sviluppo e in distretti anatomici specifici, come i muscoli della testa.

Un ampio numero di proteine, e non solo la miosina, sono espresse in diverse isoforme nei vari tipi di fibre muscolari.

Dopo queste informazioni generali riguardanti le principali scoperte scientifiche fatte sull'argomento, è venuto ora il momento di conoscere un po' più da vicino alcune delle procedure di ricerca che, negli anni, hanno permesso una separazione prima e una caratterizzazione poi dei quattro principali tipi di fibre

muscolari scheletriche dei mammiferi.

CLASSIFICAZIONE DEI VARI TIPI DI FIBRE MUSCOLARI SECONDO L'ATTIVITÀ DELL'ENZIMA M-ATPASI:

Uno dei primi e più importanti metodi che permisero di ricavare informazioni circa l'eterogeneità delle fibre muscolari fu quello basato sulle colorazioni istochimiche delle fibre per l'enzima miosin-ATPasi, a differenti valori di pH.

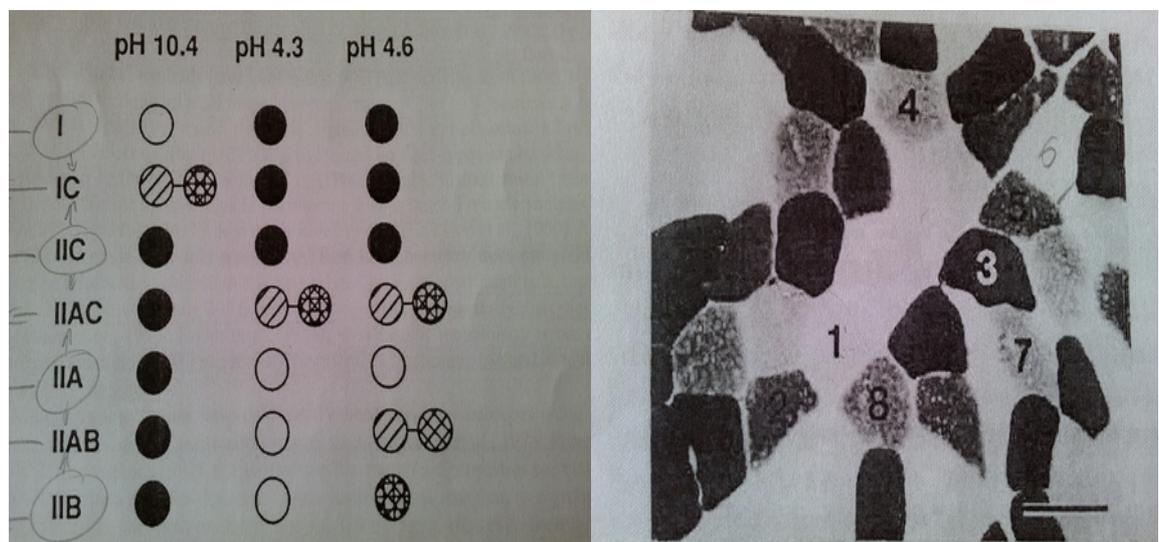
Il primo ad utilizzare questa metodica di indagine istochimica fu uno scienziato di nome Engel nel 1962. Nei suoi studi, su materiale umano ricavato tramite biopsia, utilizzò la procedura per l'analisi istochimica della m-ATPasi sviluppata da Padykula e Herman nel 1955. In questo modo riuscì a fare una prima distinzione tra tipi di fibre muscolari, individuandone due gruppi distinti. Successivamente, basandosi sulla nomenclatura che avevano utilizzato Dubowitz e Pearse nel 1960, chiamò le fibre dei due gruppi fibre di tipo 1 e fibre di tipo 2. La procedura sperimentale permetteva di valutare l'attività dell'enzima miosin-ATPasi presente nelle fibre muscolari in condizione di pH alcalino e in condizione di pH acido attraverso alcune sostanze coloranti immerse nelle fibre, che permettevano di ricavare le cosiddette colorazioni istochimiche. Quando l'enzima della fibra posta in una determinata condizione acida o alcalina risulta attivo, si dice che la sua attività è stabile in quelle determinate condizioni e la fibra si colora e diventa scura; al contrario quando la fibra nelle stesse condizioni rimane bianca significa che l'attività dell'enzima in questione risulta instabile (nulla). Vi sono anche condizioni intermedie di stabilità dell'attività enzimatica in cui la cellula raggiunge colorazioni di intensità media tra quelle intensa e quella nulla. In condizioni alcaline, le fibre di tipo 1 mostravano una bassa attività ATPasica, mentre le fibre di tipo 2 elevata. Successivamente Guth and Samaha nel 1969, utilizzando

nuovamente analisi di colorazione istochimica scoprirono che le fibre di tipo 1 (lente) non solo erano instabili (bassa attività ATPasica) in condizione di pH alcalino, ma anche stabili (alta attività ATPasica) in ambiente acido; al contrario le fibre di tipo 2 (veloci) erano stabili in ambiente alcalino e instabili in ambiente acido. Un anno dopo Brooke e Kaiser ampliarono nuovamente le scoperte che potevano essere fatte con la stessa metodica individuando dei sottotipi di fibre di tipo 2 (veloci). Questo portò alla nomenclatura che andò per la maggiore negli anni successivi, oggi superata, che comprendeva fibre di tipo 1, tipo 2A, 2B e 2C.

Questo schema di classificazione basato sulla m-ATPasi è stato ripreso, rivalutato ed espanso da Staron e Johnson anni dopo, nel 1993. I due eseguirono di nuovo le medesime analisi su campioni di fibre umani e scoprirono l'esistenza di altri tre sottotipi di fibre da aggiungere alla vecchia nomenclatura di Brooke e Kaiser e le chiamarono tipo 2AB, 2AC e 1C. Quindi l'intero range dei tipi di fibre nei muscoli di arti e tronco dei mammiferi, individuati basandosi sull'attività della miosin-ATPasi, consiste in: 1, 1C, 2C, 2AC, 2A, 2AB e 2B.

I risultati dell'analisi istochimica eseguita da Staron e Hikida l'anno precedente (1992) sono riassunti nella figura seguente:

(Figura 2.1 Colorazioni istochimiche)



Legenda:

Pallino nero=attività stabile

La miosin-ATPasi è attiva in tutte le cellule di questo muscolo.

Pallino rigato=diversi livelli di stabilità intermedia

L'enzima è attivo solo in alcune cellule del muscolo e in altre no

Pallino bianco=instabile (labile)

L'enzima non è attivo in nessuna delle cellule del muscolo.

Dalla figura si può notare come le fibre di tipo 1, a pH acido (sia 4.6 che 4.3), hanno un'attività pienamente attiva della m-ATPasi; ma le stesse a pH basico (10.4) presentano invece un'attività nulla dell'enzima in questione.

Le fibre di tipo 2A presentano un comportamento diametralmente opposto rispetto alle fibre di tipo 1 e quindi la loro m-ATPasi è pienamente attiva a pH basico (10.4) e completamente nulla a pH acidi (4.6 e 4.3).

Le fibre di tipo 2AB e 2B presentano m-ATPasi attiva e stabile a pH 10.4 e 4.6 ma instabile a 4.3 (molto acido). Le fibre tipo 2AB a pH 4.6 hanno un'attività atpasica della miosina media tra quella delle fibre 2B (stabili) e le 2A (instabili).

Nelle fibre di tipo C (1C - 2C - 2AC) si è riscontrata un'attività dell'enzima stabile in vari gradi a tutto il range di PH da 10.4 a 4.3.

Questa analisi, i cui risultati visivi sono contenuti nella tabella sopraripotata, si è rivelata qualitativamente molto importante poichè ha confermato l'esistenza di 7 tipi di fibre che, a diversi pH, si colorano istochimicamente in maniera differente tra loro, includendo quindi nel vecchio schema di Brooke e Kaiser del 1970 anche le fibre 2AB, 2AC e 1C.

È importante però comprendere che in condizioni fisiologiche, con un pH muscolare che varia da valori di 7 a riposo a valori di 6.2 dopo un esercizio molto intenso (2), tutte le fibre mantengono al 100% la loro attività ATPasica relativa alla miosina. Addirittura questo enzima rimane stabile anche quando si

superano i valori di pH fisiologico muscolare; ciò è confermato da studi istochimici in vitro che hanno mostrato quanto l'attività ATPasica della miosina inizia a essere instabile solo se si superano valori di pH acidi di 4.7 e alcalini di 10.0 (126). Quindi se le fibre muscolari non vengono messe in un ambiente abbastanza acido o alcalino da superare questi valori, tutte esibiranno attività della m-ATPasi e nessun tipo di fibra potrà essere identificato.

L'istochimica della miosin-ATPasi, quindi, non ci dà un'idea dell'effettiva attività ATPasica dei diversi tipi di fibre, confrontandole tra loro da un punto di vista quantitativo, ma bensì è stata una metodica di ricerca molto utile agli studiosi per individuare e separare i diversi tipi di fibre da un punto di vista solo qualitativo.

È stato infatti dimostrato attraverso altre procedure che negli uomini, come in altri mammiferi, le fibre veloci hanno un'attività ATPasica che è approssimativamente 2-3 volte maggiore rispetto a quella delle fibre lente (41). Alcuni studi invece sono riusciti a individuare e separare i differenti sottotipi di fibre veloci usando uno schema di classificazione basato sui livelli di enzimi metabolici, ma sembra che non ci sia una correlazione tra di essi e le caratteristiche della miosin-ATPasi.

È sempre vero che le fibre di tipo 1 sono le più ossidative, mentre le tipo 2B quelle meno ossidative, ma sembra che ci sia un grande range di livelli di attività degli enzimi metabolici all'interno di ognuno dei 7 differenti tipi di fibre individuati con le analisi istochimiche sulla m-ATPasi.

In generale quindi si può affermare che i modelli di classificazione che si basano sull'istochimica della miosin-ATPasi e sugli enzimi metabolici non sono completamente compatibili, e che il primo sia il più efficace per distinguere i sottotipi di fibre veloci.

CLASSIFICAZIONE DEI TIPI DI FIBRE SECONDO LA CATENA PESANTE DI MIOSINA MHC PRESENTE:

Un altro modello di classificazione, a tutt'oggi il più utilizzato, per distinguere univocamente i differenti tipi di fibre dei muscoli scheletrici umani e di mammiferi è quello che si basa sulle differenti isoforme di catena pesante di miosina chiamate MHC (myosin heavy chains). Oggi sappiamo che la molecola miosina è costituita infatti da 6 subunità proteiche: 2 catene pesanti di miosina, ognuna costituente una testa e una coda, e 4 catene leggere (MLC-myosin light chains) che sono posizionate a due a due in prossimità di ognuna delle due teste.



(Figura 2.2 Miosina)

La scoperta, alla fine degli anni '70, di differenze antigeniche tra le miosine di fibre di muscoli umani differenti ha aperto la strada a studi immunostochimici sulle fibre muscolari umane. Billeter nel 1980, durante una di queste analisi su sezioni di muscolo vasto laterale umano, fu il primo a stabilire una correlazione tra i tipi di fibre precedentemente individuati grazie al modello di classificazione basato sull'istochimica della miosin-ATPasi con la composizione di miosina presente nel tessuto. Le fibre di tipo 1 contenevano solo miosine lente, mentre le fibre di tipo 2A e 2B contenevano solo miosine veloci. L'esatta natura della relazione tra i due modelli di classificazione, però,

non fu del tutto chiara fino a quando, nel 1981, Wagner e Giniger dimostrarono che le porzioni a catena pesante di miosina contenevano i siti per l'idrolisi dell'ATP. Billeter e altri ricercatori, utilizzando sofisticate tecniche di immunoistochimica ed elettroforesi, rilevarono differenze tra le catene pesanti di miosina delle fibre di tipo 1, 2A e 2B del metodo istochimico. Così i tre principali tipi di fibre muscolari dei muscoli scheletri umani corrispondevano all'espressione di tre isoforme di catena pesante di miosina (MHC): le fibre di tipo 1 presentavano l'isoforma MHC-1, le fibre di tipo 2A e 2B le isoforme MHC-2a e MHC-2b rispettivamente. Nel 1986 i ricercatori Staron e Pette idearono un nuovo metodo di indagine che si basava su analisi elettroforetiche di frammenti di singole fibre, e grazie ad esso, aumentarono di molto le nostre conoscenze sulla correlazione tra i due modelli di classificazione (istochimica m-ATPasi e isoforme di MHC).

I sette tipi di fibre precedentemente identificati grazie all'istochimica della m-ATPasi contenevano in se una o più isoforme di MHC:

Le fibre tipo 1 esprimevano solo MHC-1

Le fibre tipo 2A esprimevano solo MHC-2a

Le fibre tipo 2B esprimevano solo MHC-2b

Le fibre tipo 2AB esprimevano sia MHC-2a sia MHC-2b

Le fibre C esprimevano sia MHC-1 sia MHC-2a

(125)

Le fibre di tipo 1, 2A e 2B vennero chiamate anche fibre "pure", per il fatto che contenevano solo una isoforma di MHC, mentre le fibre 1C, 2C, 2AC e 2AB vennero definite fibre "ibride", per il fatto che contenevano due isoforme di MHC ogni fibra.

La variazione nel modello di colorazione istochimica all'interno delle fibre

ibride di tipo C corrisponde ad un cambiamento nel rapporto delle quantità di MHC-1 e MHC-2a presenti. In altre parole, le fibre 1C contengono una quantità maggiore di MHC-1 rispetto alla MHC-2a che invece è presente in quantità minore, questo in accordo con le caratteristiche di colorazione istochimica di questo tipo di fibra che sono più simili a quelle presentate dalle fibre di tipo 1 (lente). Allo stesso modo le fibre 2AC presentano una quantità di MHC-2a maggiore rispetto alla MHC-1 comunque presente, mentre le fibre di tipo 2C presentano quantità pari delle due isoforme. Lo stesso discorso può essere fatto anche per le fibre ibride di tipo 2AB: se queste a pH 4,6 hanno una colorazione istochimica simile a quella delle 2A allora significa che la quantità di MHC-2a al loro interno è preponderante, mentre se hanno una colorazione istochimica più simile alle fibre 2B allora significa che hanno una quantità maggiore di MHC-2b. Si può quindi fare una ulteriore, e apparentemente non necessaria, sottoclassificazione delle fibre ibride 2AB in: 2AB, le due isoforme sono in quantità pari, 2Ab, l'isoforma MHC-2A è preponderante, 2aB, l'isoforma MHC-2B è preponderante (124).

Negli stessi anni (1988-1994) si scoprì anche dell'esistenza di un terzo tipo di MHC veloce, che si aggiungeva ai due che erano già stati scoperti (MHC-2a e MHC-2b).

Infatti nei muscoli di piccoli mammiferi (ratti) venne dimostrata l'esistenza della MHC-2x, una isoforma particolare di miosina, molto simile alla già nota MHC-2b.

Inizìò a farsi strada l'ipotesi che nell'uomo la MHC-2b, quella che era stata ritenuta fino ad allora la più veloce isoforma di miosina, non fosse altro che la MHC-2x, appena riscontrata nei muscoli di ratto.

Altri studi scoprirono che, all'aumentare della massa corporea nei mammiferi, il livello di espressione delle MHC più lente aumentava a spese di quelle veloci (60).

Perciò i muscoli di umani e altre specie di grandi mammiferi sembrano non esprimere MHC-2b. Le fibre che prima erano state classificate erroneamente come tipo 2B nei muscoli umani devono essere rinominate tipo 2X (120).

La MHC-2b rimane comunque l'isoforma di catena pesante di miosina più veloce presente nei muscoli dei mammiferi, anche se nell'uomo e in poche altre specie risulta assente. A seguito di altri studi condotti sulla famiglia multigenica che codifica per le isoforme delle catene pesanti di miosina, l'isoforma MHC-1 fu chiamata anche MHC- β /slow (l'utilizzo di uno o l'altro nome è indifferente).

Alla luce di queste scoperte la classificazione dei tipi di fibre presenti nei muscoli scheletrici di arti e tronco dei mammiferi cambiò e nel 1999 si arrivò a quella che tutt'oggi viene considerata la più corretta: (Tabella 1)

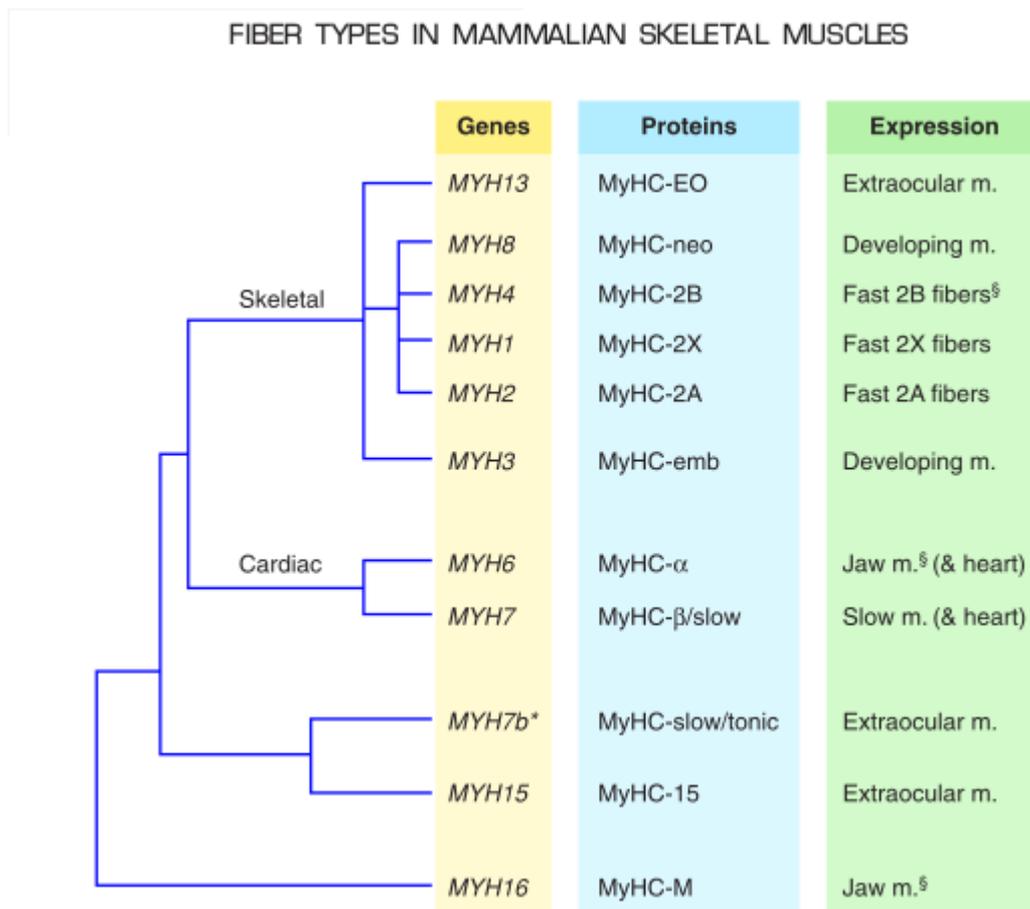
TIPO DI FIBRA	COMPOSIZIONE DI MHC
Tipo 1	Solo MHC- β /slow (MHC-1)
Tipo 2A	Solo MHC-2a
Tipo 2X	Solo MHC-2x
Tipo 2B	Solo MHC-2b
Tipo 1C (tipo 1/2A)	MHC- β /slow > MHC-2a
Tipo 2C (tipo 2A/1)	MHC- β /slow < MHC-2a
Tipo 2AX (tipo 2A/2X)	MHC-2a > MHC-2x
Tipo 2XA (tipo 2X/2A)	MHC-2a < MHC-2x
Tipo 2XB (tipo 2X/2B)	MHC-2x > MHC-2b
Tipo 2BX (tipo 2B/2X)	MHC-2x < MHC-2b

In essa si riconoscono i 4 principali tipi di fibre muscolari scheletriche nei muscoli dei mammiferi (i primi quattro nella tabella riassuntiva), anche chiamate fibre pure, aventi una sola isoforma di MHC nella loro composizione, e fibre secondarie miste o ibride che possiedono due tipi di isoforme di MHC, una più rappresentata rispetto all'altra o viceversa. Di tutti questi tipi di fibre pure o ibride, i tipi 2B, 2XB e 2BX non sono riscontrabili nei muscoli scheletrici umani. Le fibre ibride sono fibre che si trovano a metà tra due tipi di fibre pure e si possono definire anche fibre in transizione.

TIPI DI FIBRE MUSCOLARI MINORI PRESENTI IN DISTRETTI MUSCOLARI SPECIFICI:

Negli ultimi anni, numerosi studi si sono concentrati sulla famiglia antigenica che codifica le diverse proteine che costituiscono le isoforme di catena pesante di miosina. Si è stati in grado di verificare l'esistenza di 11 geni MYH che codificano per l'espressione di una isoforma ciascuno (figura 2.3). Questi geni codificano non solo per le MHC presenti nei principali muscoli scheletrici di uomo e mammiferi, già ampiamente trattate, ma anche per alcune speciali isoforme di miosina presenti soltanto in distretti corporei particolari e in tessuti in via di sviluppo o rigenerazione (116).

Infine, questi geni codificano anche per isoforme non presenti nell'uomo ma soltanto in altre specie di mammiferi (103).



(Figura 2.3 Famiglia multigenica delle catene pesanti di miosina)

In generale il modello basato sui quattro maggiori tipi di fibre (tipo 1 e tipi 2A, 2X, 2B) è stato fino ad ora il principale riferimento dello studio sulla eterogeneità e sulla plasticità delle fibre nei muscoli di mammifero. Questo modello è rappresentativo dei muscoli di tronco e arti, che sono stati sempre considerati il paradigma per lo studio della diversità delle fibre muscolari. Ci sono però altri gruppi muscolari con caratteristiche peculiari e specializzazioni peculiari che hanno tipi di fibre differenti da quelle che si riscontrano negli arti. Vi sono infatti fibre muscolari atipiche nei muscoli della testa e del collo, inclusi i muscoli extraoculari, i muscoli masticatori, quelli dell'orecchio medio, della laringe e anche nei fusi neuromuscolari.

MUSCOLI EXTRAOCULARI: EOM

I muscoli extraoculari sono sei, disposti intorno a ciascun occhio e sono responsabili della stabilizzazione e del movimento dell'occhio, compresi movimenti saccadici molto rapidi, accomodazione, riflesso vestibolo-oculare e opto-cinetico e movimenti di vergenza.

In questi muscoli le fibre più esterne sono più sottili rispetto a quelle più interne e hanno proprietà contrattili differenti. In generale, esse sono molto differenti da quelle di un tipico muscolo scheletrico. La loro tensione specifica (N/cm^2) è inferiore rispetto ad un normale muscolo degli arti. Hanno però una elevatissima velocità di contrazione che coesiste con una resistenza alla fatica relativamente alta, correlata con una elevata attività dell'enzima SDH.

Muscoli extraoculari adulti presentano le seguenti isoforme di MHC:

- MHC-slow/tonic codificata dal gene MYH7b (o MYH14)
- MHC-E0 codificata dal gene MYH13
- MHC-emb codificata dal gene MYH3
- MHC-neo codificata dal gene MYH8
- MHC-15 codificata dal gene MYH15

Nei muscoli extraoculari sono state riscontrate fibre dalla multipla innervazione, una condizione totalmente inusuale nei muscoli scheletrici di tronco e arti, dove l'innervazione multipla è ristretta alle fibre intrafusali.

Studi sull'espressione genica hanno fornito una caratterizzazione dettagliata sul modello di espressione genica dei muscoli EOM rispetto ai muscoli di arti e cuore di ratto e di topo. I muscoli EOM, come i muscoli cardiaci, non sembrano avere una dipendenza per il glicogeno come carburante metabolico ed esprimono isoforme di enzimi glicolitici non presenti nei muscoli scheletrici.

MUSCOLI DELLA LARINGE:

I muscoli della laringe sono cinque muscoli deputati a tre azioni principali: protezione delle vie aeree, respirazione e fonazione.

Ognuno di questi muscoli presenta caratteristiche peculiari e sono state descritte numerose differenze interspecie. In generale le fibre veloci sono maggiormente presenti a scapito di quelle lente, che risultano addirittura assenti in alcuni muscoli della laringe di piccoli mammiferi, come i ratti.

Numerosi tipi di fibre veloci possono essere identificati basandosi sull'espressione delle numerose isoforme di MHC presenti:

- MHC-2a
- MHC-2x
- MHC-2b

Esprese non solo nel ratto e nel topo, ma anche nel cane.

- MHC-E0
- MHC-neo
- MHC-emb

Documentate nel coniglio e nel ratto.

- MHC-slow/tonic

Ci sono prove della presenza di questa isoforma anche se non determina una relazione diretta con la presenza dell'innervazione multipla nei muscoli della laringe.

Alcune fibre muscolari di questi muscoli presentano più giunzioni neuromuscolari sparse lungo la fibra, anche se sembra che siano in contatto con un solo motoneurone. Dal punto di vista metabolico tutti i muscoli della laringe, a seconda del tipo di miosina che esprimono, sono veramente

resistenti alla fatica, e questo è in accordo con gli alti livelli di attività dell'enzima SDH riscontrati.

MUSCOLI DELL'ORECCHIO MEDIO:

I muscoli dell'orecchio medio sono due: stapedio e tensore del timpano.

Le loro fibre sono veramente sottili e spesso non è presente la linea M. Lo stapedio possiede una composizione di tipi di fibre relativamente costante e presenta:

- MHC-2a
- MHC-2x

Il tensore del timpano invece è molto variabile nella composizione dei tipi di fibre e presenta le seguenti isoforme di miosina:

- MHC-slow/tonic
- MHC-M (masticatori)
- MHC- α (masticatori)

Sono state riscontrate in numerose specie carnivore.

Invece fibre lente e 2A (MHC-1 e MHC-2a) sono state trovate in grossi mammiferi, spesso con fibre neonatali (MHC-neo).

MUSCOLI MASTICATORI E DELLA MANDIBOLA:

Sono responsabili dei movimenti della mandibola nell'assunzione del cibo e nella masticazione. Hanno una origine embriologica comune e sono: massetere, temporale, pterigoideo interno ed esterno, tensore del velo palatino, digastrico anteriore e miloioideo. Le loro caratteristiche strutturali e funzionali variano grandemente in relazione allo stile di vita, alla dieta, alle

abitudini alimentari che sono molto diverse tra le specie. Come proposto da Hoh (2002), i muscoli masticatori dei mammiferi sono da dividere in due gruppi. Il primo gruppo comprende quelle specie dove i muscoli masticatori hanno gli stessi tipi di fibre dei muscoli di arti e tronco. I ruminanti e la maggior parte dei roditori appartiene a questo gruppo. Nel ratto i muscoli che serrano la mandibola sono composti dai quattro tipi di fibre riscontrate negli arti, con una maggioranza di fibre veloci di tipo 2A e 2X, mentre questi stessi muscoli nella pecora e nel bestiame sono generalmente lente.

Il secondo gruppo include tutte quelle specie che nei loro muscoli presentano tipi di fibre addizionali o, in alcuni casi, uniche. In questo gruppo sono presenti i canguri che nei muscoli che serrano la mandibola presentano solo fibre che contengono la MHC- α /cardiac, i conigli che negli stessi muscoli presentano fibre con MHC- α /cardiac in più rispetto a fibre lente e di tipo 2A. Negli umani i muscoli che serrano la mandibola comprendono fibre che presentano le seguenti isoforme di miosina:

- **MHC-2A**
- **MHC-2X**
- **MHC- α /cardiac**
- **MHC-neo**

Carnivori, primati (escluso l'uomo) e tanti marsupiali presentano nelle fibre di questi muscoli una specifica isoforma di miosina, la MHC-M, codificata dal gene MYH16. Questa particolare isoforma di miosina è spesso chiamata miosina "superveloce"; in realtà essa è importante per dare alla fibre un comportamento contrattile caratterizzato dallo sviluppo di elevati livelli di forza e una velocità di accorciamento moderatamente veloce, ideali per raggiungere elevati livelli di potenza durante la contrazione. Come in tutti i primati, il gene

MYH16 è presente nel genoma umano ma non viene espresso a causa di una mutazione genetica. In generale quindi, il tipico schema di tipi di fibre nei muscoli masticatori umani è una combinazione di tante fibre spesse lente con una quantità di fibre sottili veloci meno abbondanti che esprimono MHC-2a, -2x, -neo, - α /cardiac.

CARATTERIZZAZIONE DEI QUATTRO PRINCIPALI

TIPI DI FIBRE NEI MAMMIFERI:

Gli studi condotti attraverso le analisi istochimiche, la microscopia ottica ecc. sono stati in grado di riconoscere nei muscoli dei mammiferi una eterogeneità marcata per quanto riguarda i tipi di fibre muscolari presenti. Questi studi hanno infatti permesso di individuare, riconoscere e distinguere i principali quattro tipi di fibre muscolari (tipo 1, 2A, 2X e 2B) e una serie di fibre "ibride" di contorno (tipo 1C, 2C, 2AX, 2XA, 2XB e 2BX) presenti nei muscoli scheletrici. Tutto ciò ha fatto sì che le ricerche successive sull'argomento si concentrassero sulle caratteristiche e sulle differenze che questi tipi di fibre hanno tra di loro. Grazie a questo, siamo oggi in grado di differenziare i quattro tipi principali di fibre muscolari (tipo 1, 2A, 2X e 2B) a seconda delle loro caratteristiche meccaniche, elettriche, strutturali e metaboliche da un punto di vista macroscopico e microscopico.

Viene quindi riportata qui di seguito una caratterizzazione, più sintetica quanto completa possibile, dei quattro principali tipi di fibre. La trattazione, per semplicità, seguirà la sequenza di eventi dalla trasmissione dell'impulso nervoso alla fibra muscolare fino alla generazione di forza e movimento, grazie l'energia ricostituita dalle principali vie metaboliche.

1. TRASMISSIONE DELL'IMPULSO NERVOSO ALLA FIBRA MUSCOLARE

ATTIVITÀ ELETTRICA:

L'abilità dei muscoli scheletrici di generare forza e movimento è utilizzata dal sistema nervoso per far compiere agli stessi compiti motori definiti. Per

semplicità, i principali compiti motori che i nostri muscoli devono compiere sono:
1. Stabilizzazione posturale delle articolazioni; 2. Attività lunghe e ripetitive come la respirazione, la locomozione o la masticazione di una cicca; 3. Azioni veloci e potenti come saltare, calciare, mordersi ecc...

L'adattamento ai compiti motori che le fibre muscolari hanno sviluppato grazie alle spinte evolutive ha portato oggi ad una eterogeneità che caratterizza tutti i vertebrati, dai pesci all'uomo. La connessione di varie fibre muscolari ad un neurone motorio con una attività specifica, un modello di scarica, non è solo finalizzato al corretto uso delle proprietà funzionali della fibra ma è il principale fattore che è in grado di modificare e rimodellare le fibre nei muscoli. I neuroni motori presentano grandi differenze per quanto riguarda il modello di scarica. Esistono infatti due classi di motoneuroni, "tonici" e "fasici", che sono stati descritti per la prima volta da Granit nel 1956. Successivamente grazie all'elettromiografia continua (EMG), è stato possibile identificare tre distinti modelli di scarica nel ratto (63). Un primo modello è tipico di unità motorie comprendenti fibre lente e resistenti alla fatica. È caratterizzato da una quantità di impulsi in un periodo di tempo standard di 24h molto elevato (300.000-500.000), con periodi di stimolazione lunghi (300-500s) e una frequenza di scarica bassa (~20 Hz). Invece unità motorie comprendenti fibre veloci mostrano una elevata frequenza di scarica e possono essere divisi in due sottogruppi: uno caratterizzato da una quantità di impulsi al giorno (24h) molto modesta (3000-10.000), elevata frequenza di scarica (70-90 Hz), e periodi di stimolazione molto corti (< 3s); queste unità motorie veloci contengono presumibilmente fibre di tipo 2B. L'altro sottogruppo, non molto differente in fatto di frequenza di scarica (50-80 Hz), ha una quantità di impulsi registrati al giorno molto più elevata (90.000-150.000) e periodi di stimolazione relativamente lunghi (60-140s); queste unità motorie contengono presumibilmente fibre di tipo 2A e 2X. (Figura 3.1)

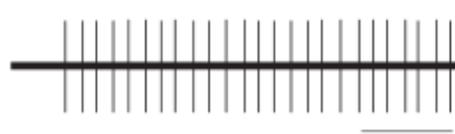
Firing patterns	Median firing frequency (Hz)	Longest train duration (s)	Impulses per 24 hrs	Time on per 24 hrs
 EDL-1	69-91	0.8-3.9	2600-11200	0.5-3 min
 EDL-2	48-83	59-141	89500-243100	23-72 min
 SOL	18-21	290-548	309500-495800	5.3-8.4 hrs

FIGURE 2. Firing patterns of three classes of motor units identified in rat fast extensor digitorum longus (EDL) and slow soleus (SOL) muscles by continuous recording in vivo. EDL-1 and EDL-2 presumably correspond to units composed of 2B and 2A muscle fibers, respectively. [Data from Henning and Lomo (330). Scheme modified from Lomo (490).]

(Figura 3.1 Modelli di stimolazione elettrica)

In generale si può dire che vi sia un collegamento perfetto tra la parte nervosa (modello di scarica) e la parte muscolare (parametri di tempo della contrazione e resistenza alla fatica) di una unità motoria.

Si può dire che l'eterogeneità delle fibre muscolari scheletriche rifletta primariamente un adattamento ai differenti modelli di attività, che possono essere quantificati in termini di frequenza di scarica e numero di impulsi per giorno. Modelli di attività elettrica differenti determinano non soltanto la specializzazione delle proprietà della membrana cellulare, delle proprietà di trasporto del calcio e della meccanica di contrazione, ma anche della struttura del citoscheletro, in relazione al carico variabile imposto al muscolo, e al metabolismo energetico, per coprire le spese energetiche con le scorte e i rifornimenti energetici.

CARATTERISTICHE DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE:

La giunzione neuromuscolare rappresenta il punto di comunicazione tra il motoneurone e la fibra muscolare. La trasmissione sinaptica a livello della giunzione neuromuscolare è molto efficiente e sicura poichè: 1. La quantità di neurotrasmettitore rilasciato ogni impulso nervoso è maggiore di quello richiesto per creare un potenziale d'azione; 2. Il numero di recettori attivati dall'acetilcolina liberata è in eccesso rispetto a quello necessario per raggiungere la soglia. Questo permette un margine di sicurezza che garantisce la trasmissione neuromuscolare sia durante impulsi veloci, ad alta frequenza sia durante una attivazione prolungata a bassa frequenza. Per garantire questa trasmissione sicura, le giunzioni neuro-muscolari hanno sviluppato specifici adattamenti strutturali e funzionali.

L'area della giunzione muscolare varia in proporzione alla grandezza della fibra. Nel muscolo soleo di ratto l'area sinaptica è maggiore rispetto a quella delle fibre veloci del muscolo EDL (140), ma la proporzione tra l'area della giunzione e la grandezza della fibra è veramente simile in entrambi i muscoli.

Nel muscolo diaframma di ratto, le fibre lente sono innervate da assoni di piccole dimensioni, mentre le fibre di tipo 2A, 2X e 2B ricevono assoni di diametro progressivamente maggiore (96). In generale, l'area assoluta della porzione terminale dell'assone cresce progressivamente dal tipo 1, 2A, 2X fino alle 2B.

Studi di microscopia elettronica mostrano che la grandezza della placca motrice non cambia in relazione al tipo di fibra (140), o è maggiore nelle giunzioni neuromuscolari delle fibre veloci rispetto alle lente (86).

Durante attivazioni ripetute, le giunzioni neuromuscolari di entrambi i tipi di fibre lente e veloci esibiscono una marcata depressione sinaptica, che è maggiore nel muscolo veloce EDL.

Una ulteriore differenza interessa l'enzima Acetilcolinesterasi (AChE), che

rimuove il neurotrasmettitore ACh dalla giunzione neuromuscolare. Nel ratto l'attività di questo enzima nei muscoli veloci è diverse volte maggiore rispetto alle fibre lente del muscolo soleo (119).

Il contenuto di AChE nelle fibre lente è circa 1/4 di quello presente nelle fibre veloci e cambia in relazione all'attività elettrica e al carico. AChE globulari di tipo G1 e G4 sono presenti nelle fibre veloci (119). Mentre nelle fibre lente sono predominanti le forme A8 e A4.

CARATTERISTICHE GENERALI DI MEMBRANA:

Studi comparativi di fibre muscolari veloci e lente hanno rivelato una significativa differenza nelle loro proprietà elettrofisiologiche. Il potenziale di riposo della membrana è più elettronegativo nelle fibre veloci rispetto alle lente nel ratto, e nell'uomo (105), con range di potenziale tra -80 e -85 mV nelle fibre lente e tra -90 e -95 mV nelle fibre veloci.

La resistenza di membrana per unità di area è più bassa nelle fibre veloci rispetto alle lente (per esempio, 358 Ω/cm^2 in fibre veloci di ratto, rispetto a 588 Ω/cm^2 in fibre lente) e la differenza è attribuita alla maggiore espressione di canali per il cloro nelle fibre muscolari veloci.

CANALI IONICI PER IL CLORO:

La conduttanza della membrana di una fibra muscolare a riposo dipende per il 70% dagli ioni cloro e solo per il 30% da quelli potassio.

La conduttanza al cloro gioca un ruolo importante nel determinare il potenziale di riposo e nello stabilizzare la membrana, oltre che a regolarne l'eccitabilità. Esistono due isoforme di canali ionici per il cloro: la CLC1 e la CLC2 (97). La conduttanza al cloro è maggiore nelle fibre veloci rispetto alle lente, e questo è dato dal livello di espressione dell'isoforma CLC1 maggiore nelle veloci, ma anche dalla maggiore inattivazione della stessa isoforma nelle lente.

CANALI IONICI PER IL POTASSIO:

Esistono diversi tipi di canali ionici per il potassio nel sarcolemma delle fibre muscolari scheletriche dei mammiferi. Il tipo di canale più rappresentato è probabilmente il canale-ATP-sensibile, un canale che si apre in risposta ad una riduzione del rapporto ATP/ADP. La densità di questo tipo di canale è maggiore nei muscoli a contrazione rapida rispetto a quelli a contrazione lenta (130). Vi sono anche canali ionici per il potassio Ca-attivati, e di questi ne esistono due tipi funzionalmente differenti. Questi canali nelle fibre veloci sono sensibili al calcio e all'acetazolamide, mentre nei muscoli lenti, come il soleo, sono meno sensibili al calcio e resistenti all'acetazolamide (130). In generale, il flusso di potassio che viene mandato fuori dalla cellula è differente tra fibre lente e veloci nel ratto: due componenti, uno veloce e uno lento, sono presenti nelle fibre lente, mentre solo la componente veloce di eliminazione è presente nelle fibre veloci.

CANALI IONICI PER IL SODIO:

L'eccitabilità della membrana è determinata dal numero di canali per il sodio e dalla frazione di essi che non viene attivata. Nei muscoli scheletrici esistono due isoforme della subunità α dei canali per il sodio voltaggio-dipendenti: Nav 1.4 e Nav 1.5 (32). Espressione dell'isoforma Nav 1.5 è ristretta soltanto a muscoli immaturi o denervati, mentre l'isoforma Nav 1.4 è espressa nei muscoli adulti sia in fibre lente sia in fibre veloci. La densità dei canali per il sodio è due o tre volte maggiore nelle fibre veloci rispetto che alle lente nell'uomo (106), come in altri mammiferi.

Una ricerca recente ha mostrato che, in muscoli di ratto, il flusso di ioni sodio massimo e la massima conduttanza al sodio aumentano dalle fibre lente alle veloci, seguendo lo schema $1 < 2A < 2X < 2B$, e la curva di attivazione dei canali del sodio voltaggio-dipendenti è spostata verso valori positivi a mano a

mano che si passa da fibre lente a fibre veloci (98).

L'inattivazione (la diminuzione della conduttanza della membrana al sodio) ha due componenti: l'inattivazione lenta ha una costante di tempo nell'ordine dei 20-30s, mentre l'inattivazione veloce è molto più veloce avendo una costante di tempo nell'ordine di 0.1-1ms e avviene a potenziali meno negativi. L'inattivazione veloce agisce a potenziali meno negativi nelle fibre lente ($V_h > -65\text{mV}$) rispetto alle veloci ($V_h < -65\text{mV}$), e vale la stessa cosa per l'inattivazione lenta ($V_s \sim -70\text{mV}$ nelle lente e $\sim -95\text{mV}$ nelle veloci).

Per concludere, la grande densità di canali per il sodio permette alle fibre veloci di sostenere alte frequenze di scarica dal motoneurone e quindi di generare risposte contrattili forti ma limitate nel tempo. Il flusso maggiore di sodio che entra nelle fibre veloci potrebbe contribuire alla loro affaticabilità, poichè esso potrebbe eccedere la capacità delle pompe sodio-potassio di far ritornare all'esterno gli ioni Na. La diversità per quanto riguarda l'inattivazione lenta potrebbe avere un importante effetto sulla resistenza alla fatica (105). Nelle fibre veloci il valore più negativo di inattivazione lenta può portare ad una perdita di eccitabilità in presenza di depolarizzazioni modeste che possono avvenire durante stimolazioni ripetute. Questo viene evitato nelle fibre lente dove il valore di inattivazione lenta è lontano dal potenziale di riposo. Quindi l'inattivazione lenta, insieme ad altri meccanismi che riducono l'eccitabilità della membrana, si pensa possa proteggere le fibre veloci da attivazioni prolungate ad alta frequenza. Al contrario, la resistenza delle fibre lente all'inattivazione lenta, combinata con la loro buona capacità di rimuovere il potassio dallo spazio extracellulare, fa sì che siano in grado di rimanere tonicamente attive a frequenze molto basse (10-20Hz) per lunghi periodi (105).

CANALI IONICI PER IL CALCIO:

Il canale per il calcio voltaggio-dipendente di tipo L (anche conosciuti come recettori per la diidropiridina) ha diverse isoforme della subunità $\alpha 1$ chiamate Cav1.1, Cav 1.2, Cav 1.3 e Cav 1.4. L'isoforma muscolare specifica Cav 1.1 gioca il ruolo di sensore di voltaggio e da inizio all'apertura dei recettori per la Rianodina (RyR) nelle cisterne terminali del reticolo sarcoplasmatico (129), mentre le isoforme Cav 1.2 e 1.3 sono presenti a livello dei cardiomiociti dove contribuiscono all'accoppiamento eccitazione-contrazione. La densità di canali per il calcio voltaggio-dipendente di tipo L per unità di volume è dalle tre alle cinque volte maggiore nelle fibre veloci rispetto alle lente.

Il calcio è in grado di entrare nella cellula muscolare attraverso canali particolari come i canali ionici tenso-attivati (SAC) o tenso-inattivati (SIC) oppure attraverso i cosiddetti canali ionici riserva-operanti. Questi ultimi attivandosi permettono l'entrata di calcio nella cellula in risposta ad una sua diminuzione a livello intracellulare, situazione frequente a seguito di forti depolarizzazioni ripetute nel tempo. Il flusso in entrata di calcio a riposo è maggiore nelle fibre lente del muscolo soleo rispetto a quelle veloci del muscolo EDL (49). La differenza è attribuita ad una maggiore presenza di canali tenso-attivati (SAC) e contribuisce a determinare una maggiore concentrazione di calcio a riposo nel citosol nelle fibre lente rispetto alle fibre veloci.

POMPA SODIO-POTASSIO:

La pompa sodio-potassio è composta da due subunità α e due subunità β . Nel ratto e nel topo, la subunità $\beta 1$ è più abbondante nelle fibre lente e nelle veloci ossidative, mentre la subunità $\beta 2$ è più abbondante nelle fibre veloci (67). La subunità $\beta 2$ non è stata riscontrata nei muscoli scheletrici umani.

Nei muscoli di ratto le fibre veloci contengono circa il 20% di pompe Na-K in

più rispetto alle lente (42). Questo dovrebbe compensare l'entrata di sodio durante i potenziali d'azione, che ci si aspetta siano maggiori nelle fibre veloci rispetto alle lente in relazione della densità maggiore di canali ionici per il sodio. L'attività della pompa Na-K è inattivata dall'attività elettrica stessa del muscolo e questo comporta un aumento della concentrazione dello ione Na intracellulare. La risposta della pompa Na-K all'attività elettrica e all'aumento della concentrazione di Na intracellulare è tre volte maggiore nelle fibre lente. Quindi, durante attività ripetitiva, la pompa Na-K è più attiva nelle fibre lente rispetto a quelle veloci (42).

2. ACCOPPIAMENTO ECCITAZIONE-CONTRAZIONE

TRASPORTO DEL CALCIO TRA IL RETICOLO SARCOPLASMATICO E LE MIOFIBRILLE:

Il calcio è il più importante messaggero intracellulare nelle fibre muscolari scheletriche, essendo in grado di avviare il processo della contrazione muscolare legandosi alla proteina regolatrice troponina. Per la sua importanza, la concentrazione di calcio libero nel citosol deve sempre essere tenuta sotto controllo. Questa funzione è svolta dal reticolo sarcoplasmatico, da sostanze tamponanti presenti nel sarcoplasma, dai mitocondri e dal sarcolemma. I muscoli scheletrici mostrano una specializzazione pronunciata nel controllo del calcio intracellulare, poichè ogni tipo di fibra ha una propria concentrazione di calcio e proprie cinetiche di spostamento dello stesso, che accompagnano il potenziale d'azione.

Le cinetiche di spostamento del calcio hanno un impatto diretto sulle proprietà meccaniche e dinamiche delle fibre muscolari. Più velocemente il calcio raggiunge, dal reticolo, le miofibrille e più velocemente si attuerà il ciclo di attacco e stacco della miosina sull'actina, e più piccoli saranno il tempo

necessario al raggiungimento del picco di tensione in una contrazione isometrica e il tempo di rilassamento (34). La quantità totale di calcio in spostamento e la sensibilità a questo ione delle miofibrille sono i due determinanti principali dell'entità di forza sviluppata durante una contrazione muscolare.

CALCIO IN CONDIZIONI DI RIPOSO E CALCIO PASSEGGERO:

La concentrazione di calcio libero nel citosol, a riposo, è più elevata nelle fibre lente rispetto alle fibre veloci (30,49). Lo spostamento del calcio dal reticolo sarcoplasmatico a seguito di un singolo potenziale d'azione è differente in fibre muscolari lente o veloci (31). Si è sostanzialmente in accordo sul fatto che le fibre veloci, rispetto alle lente, raggiungano un picco più elevato di calcio in uscita dal reticolo verso le miofibrille (77).

La diminuzione del calcio in movimento è approssimativamente due volte più veloce nelle fibre veloci rispetto alle fibre lente in ratto e topo (31,77). Le cinetiche del calcio in movimento dal reticolo alle miofibrille sono state studiate in fibre muscolari da un singolo muscolo di ratto, classificate secondo le MHC presenti, grazie ad elettroforesi. I risultati mostrano che i parametri della cinetica del calcio formano un continuum dove si possono individuare due classi principali di valori, corrispondenti una alle fibre di tipo 1 e 2A mentre l'altra alle fibre di tipo 2X e 2B.

CARATTERISTICHE DEL RETICOLO SARCOPLASMATICO:

Il reticolo sarcoplasmatico è il principale determinante delle cinetiche di contrazione e rilassamento poichè controlla sia la liberazione di calcio dalle cisterne terminali, sia il suo riassorbimento attraverso i tubuli longitudinali.

Il maggiore sviluppo del reticolo sarcoplasmatico nelle fibre veloci rispetto alle

lente fu scoperto per la prima volta grazie alla microscopia elettronica nel ratto (114) e successivamente nel topo. Si scoprì anche che il reticolo sarcoplasmatico era fortemente sviluppato sia in quelle fibre veloci povere di mitocondri (successivamente identificate come 2B), sia in quelle veloci e ricche di mitocondri (ora identificate come 2A e 2X) (114).

Il tempo per raggiungere la tensione picco e lo sviluppo in volume delle cisterne terminali sono legati da una relazione di proporzionalità inversa; infatti il brevissimo tempo impiegato dalle fibre veloci per raggiungere la tensione picco è associato ad un elevato volume delle cisterne terminali del loro reticolo.

CALCIO RILASCIATO DAL RETICOLO:

I recettori per la diidropiridina e la rianodina sono strutture collegate tra di loro in una disposizione particolare. Attivato il recettore voltaggio-dipendente per la diidropiridina (canale per il calcio voltaggio-dipendente di tipo L) grazie al passaggio del potenziale d'azione dal sarcolemma nei tubuli T, viene attivato meccanicamente anche il recettore per la rianodina (RyR) associato. In questo modo il calcio è libero di uscire dal reticolo e di muoversi verso le miofibrille.

Anche se la maggior parte delle differenze nelle cinetiche temporali del calcio in movimento evocate dal potenziale d'azione tra fibre muscolari differenti è dovuto principalmente a dei meccanismi di tamponamento e rimozione del calcio citosolico, non si può escludere che vi siano differenze per quanto riguarda la liberazione di calcio dal reticolo a seconda del tipo di fibra. Il calcio rilasciato dal reticolo sarcoplasmatico di fibre lente è meno inibito dal Magnesio (Mg) citosolico, e questo può contribuire ad una minor sensibilità alla fatica dato che un aumento delle concentrazioni di Mg intracellulare avviene durante gli stadi avanzati della fatica (127). La ragione della diversità nella proprietà di liberazione di calcio dal reticolo tra tipi di fibre non è del tutto

chiara. Si sa però che i recettori per la rianodina (RyR) sono presenti nei muscoli scheletrici in diverse isoforme: la RyR1 è la più diffusa, mentre l'espressione di RyR3, dopo una grande distribuzione durante il periodo postnatale, è ristretta a pochi muscoli, e l'isoforma cardiaca RyR2 non è mai espressa. In generale però, la differenza di calcio rilasciato dal reticolo tra tipi di fibre diverse non può essere completamente attribuita alla diversa espressione delle isoforme RyR1 e RyR3, anche se in alcuni casi può contribuire. Detto ciò la diversità in fatto di rilascio di calcio dalle cisterne tra fibre differenti può essere attribuita ad altri fattori: 1. modificazioni post-trascrizionali; 2. interazioni con altre proteine inclusi i recettori per la diidropiridina, la calmodulina, la calsequestrina; 3. La quantità di calcio disponibile nelle cisterne terminali, dato che il reticolo è riempito completamente nelle fibre lente ma non in quelle veloci.

In generale la quantità di calcio rilasciato a seguito di un singolo potenziale d'azione è maggiore nelle fibre veloci rispetto alle lente: per esempio, 350 $\mu\text{mol/l}$ volume di fibra nelle fibre veloci di ratti contro 120 μmol nelle fibre lente. Questa differenza può essere collegata all'abbondanza dei recettori della rianodina, che è maggiore del doppio nelle fibre veloci rispetto alle lente (48), e alla differente proporzione di canali RyR accoppiati ai recettori per la diidropiridina. Nelle fibre lente vi è una minore densità di recettori per la rianodina e una minore quantità di essi è collegata a recettori per la diidropiridina rispetto a fibre veloci. Il rilascio di calcio calcio-indotto potrebbe giocare un ruolo maggiore nelle fibre lente, e l'accoppiamento eccitazione-contrazione nelle stesse potrebbe essere lontanamente collegato con quello tipico del muscolo cardiaco. Anche se vi è una marcata diversità nella quantità di calcio rilasciato da un singolo potenziale d'azione, la diminuzione della quantità di calcio rilasciata a seguito di potenziali d'azione ripetuti è simile in tutti i tipi di fibre, e questo suggerisce che le cinetiche di inattivazione dei

recettori della rianodina non sono differenti in fibre differenti (10). Per esempio, alla quinta depolarizzazione ad alta frequenza di un treno di potenziali d'azione sarà rilasciato solo 1/5 della quantità di calcio rilasciata alla prima depolarizzazione nelle fibre lente e 1/6 nelle fibre veloci (10). L'attività dei canali RyR è influenzata anche da proteine intraluminari. La calsequestrina (CASQ) è la più importante proteina che lega il calcio all'interno del reticolo, più precisamente a livello delle cisterne terminali in prossimità dei RyR. Nei muscoli scheletrici la calsequestrina esiste in due isoforme: CASQ1 e CASQ2. Entrambe le isoforme si riscontrano nelle fibre lente, mentre solo la CASQ1 è presente a livello delle fibre veloci. Il contenuto di calsequestrina è maggiore nelle fibre veloci rispetto alle fibre lente.

La CASQ svolge due importanti funzioni: 1. Tampona il calcio, poichè CASQ1 può legare fino a 80 ioni Ca e il CASQ2 fino a 60; 2. Modula il rilascio di Ca a causa della sua interazione con i RyR (11).

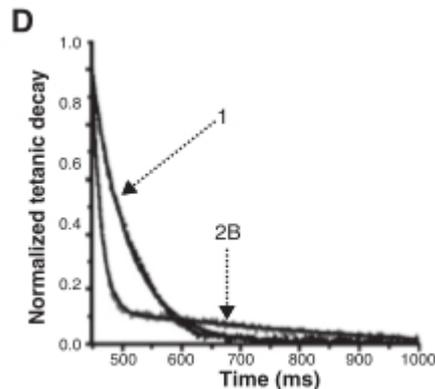
SOSTANZE TAMPONANTI IL CALCIO CITOSOLICO:

Il declino più rapido che si riscontra per quanto riguarda il calcio in movimento nelle fibre veloci rispetto alle lente è dovuto all'attività di: 1. meccanismi di rimozione del calcio (presenti nelle membrane del reticolo, nei mitocondri e nel sarcolemma); 2. sostanze nel citoplasma che tamponano il calcio.

La Parvalbumina è una sostanza citosolica in grado di tamponare ioni calcio ed è presente nelle fibre veloci in una concentrazione di circa 1 mM, mentre risulta virtualmente assente nelle fibre lente (28).

Analisi immunocitochimiche mostrano che la parvalbumina è specificatamente espressa nelle fibre di tipo 2X e 2B, e non nei tipi 1 e 2A, e il suo contenuto è in correlazione con il tipo di MHC presente e non con i livelli di SDH (succinato deidrogenasi). La parvalbumina, legandosi al calcio, diminuisce velocemente la sua concentrazione citosolica dopo l'aumento causato dal

rilascio dello ione dal reticolo ma solo nelle fibre veloci; il calcio legato a questa proteina ritorna al reticolo lentamente e solo alla fine della risposta meccanica dando origine alla cosiddetta "coda" dell'andamento del calcio in movimento presente soltanto nelle fibre veloci (74). (Figura 3.2)



(Figura 3.2 Riassorbimento calcio)

Un'altra proteina in grado di tamponare il calcio è la Troponina C (TnC). Legando il calcio è in grado di permettere la creazione dei ponti acto-miosinici e quindi di scatenare la contrazione. È presente a livello miofibrillare in due isoforme: La TnC veloce, presente nelle fibre veloci, ha 4 siti attivi per il legame con il calcio (due ad alta affinità e due a bassa affinità), mentre la TnC cardiaca-lenta è espressa nelle fibre lente e manca di un sito attivo a bassa affinità. Per questo il contributo di TnC al tamponamento degli ioni Ca nel citoplasma è maggiore nelle fibre veloci rispetto alle fibre lente.

La calmodulina infine, altra sostanza in grado di tamponare il calcio, è più abbondante nelle fibre veloci rispetto alle lente di circa due volte (28). La calmodulina contribuisce, legandosi al calcio, alla regolazione della funzione contrattile attraverso l'enzima chinasi della catena leggera della miosina (MLC-kinase). La fosforilazione della miosina per via MLC-kinase aumenta lo sviluppo di forza a concentrazioni submassimali di calcio.

Questa reazione è tipica delle fibre veloci dove l'espressione di MLC-kinase è maggiore.

CALCIO RIASSORBITO DAL RETICOLO SARCOPLASMATICO:

I tubuli longitudinali del reticolo sarcoplasmatico, che contengono le pompe Ca^{2+} -ATPasi sarcoplasmatico/endoplasmatiche (SERCA), sono il compartimento del reticolo specializzato nel riassorbimento di calcio dal citosol (62). Il riassorbimento di calcio è più veloce nelle fibre veloci rispetto alle fibre lente. Il meccanismo di trasporto attivo di calcio nel reticolo si basa sulle pompe SERCA, che esistono in diverse isoforme codificate da tre diversi geni. Il gene SERCA1 è espresso esclusivamente nelle fibre veloci di muscoli scheletrici, con due isoforme: SERCA1a è quella adulta, mentre SERCA1b la si trova nei muscoli di neonato. Il gene SERCA2 è espresso nei muscoli scheletrici lenti, nel muscolo cardiaco, nel muscolo liscio e in tessuti non muscolari. L'isoforma SERCA2a è specifica per le cellule muscolari, mentre la SERCA2b è presente in tutte le cellule. In ambito muscolare le isoforme di SERCA presentano una profonda diversità nel legare il calcio e per quanto riguarda la sensibilità all'ADP. La diversità nel riassorbimento di calcio tra fibre lente e veloci potrebbe essere collegato a questi fattori:

1. La densità della pompa è molto maggiore nelle fibre veloci rispetto a quelle lente (circa cinque-sette volte). Tra le fibre veloci, la densità è maggiore nelle fibre 2B rispetto che alle fibre 2A sia nel ratto che nel coniglio. Queste differenze sono date dal fatto che il reticolo nelle fibre veloci rispetto alle lente è maggiormente sviluppato e, per di più, vi è anche una maggiore concentrazione della pompa per unità di volume di reticolo (38).
2. La presenza di proteine regolatrici extraluminali e intraluminali collegate alla pompa caratterizza il riassorbimento di calcio del reticolo. Per esempio fosfolamban e sarcolipina sono due proteine regolatrici che modificano il rendimento della pompa SERCA nelle fibre lente e veloci rispettivamente.
3. Il reticolo delle fibre veloci, grazie al maggiore volume e alla maggiore quantità di calsequestrina CASQ, in condizioni di riposo, è riempito di calcio

solo al 35% della sua capacità massima; un ulteriore aumento di calcio libero citosolico sarà seguito da un un rapido risequestro dello stesso da parte del reticolo con un piccolo incremento della concentrazione dello ione libero nel reticolo.

Al contrario, nelle fibre lente, il reticolo è completamente saturo di calcio a concentrazioni di calcio libero nel citosol di riposo; durante la fase di riassorbimento del calcio in movimento nel citosol la saturazione del reticolo rallenterà la rimozione di calcio dal reticolo grazie ad una retro-inibizione delle pompe SERCA (68).

IL CONTRIBUTO DI SARCOLEMMA E MITOCONDRI NELL'OMEOSTASI DEL Ca:

L'influsso e l'efflusso di calcio trans-membrana avviene nelle fibre muscolari scheletriche adulte di mammifero, ma in quantità davvero minime. I canali per il calcio voltaggio-dipendenti di tipo L (recettori per la diidropiridina) presente a livello del sarcolemma non sono in grado di contribuire a più del 5% del calcio in movimento intracellulare, con un possibile maggior contributo nelle fibre lente rispetto alle veloci. Oltre ai canali per il calcio voltaggio dipendenti, lo ione può entrare nella cellula anche attraverso i già citati canali SOCE, SAC e SIC. Per quanto riguarda i meccanismi di estrusione del calcio dalla cellula, le fibre muscolari adulte esprimono le pompe PMCA (plasma membrane calcium pumps) e NCX (sodium calcium exchanger).

I mitocondri, oltre al loro importante ruolo di produzione di energia, contribuiscono a modulare la quantità di calcio libero nel citosol. Nelle fibre muscolari scheletriche i mitocondri sono localizzati sia in prossimità del sarcolemma, sia più in profondità tra le miofibrille (87). Questi ultimi sono localizzati principalmente sulle linee trasversali del sarcomero in prossimità alle unità di rilascio del calcio, con una localizzazione ulteriore sulle linee

longitudinali nelle fibre ossidative (1 e 2A). Il principale meccanismo di entrata del calcio nel mitocondrio è attraverso le MCU (mitochondrial calcium uniporter), un canale per il calcio, mentre gli NCX si occupano dell'estrusione. I mitocondri quindi, posizionati in prossimità del reticolo, catturano una parte del calcio che fuoriesce dai RyR (47). L'entrata di calcio nel mitocondrio è seguita dall'attivazione di tre deidrogenasi nella matrice mitocondriale, e questo determina un aumento nel rapporto NADH/NAD, dei livelli di ATP e dell'assorbimento di substrati da parte del mitocondrio. Quindi il calcio risulta importante per la funzione del mitocondrio, ma allo stesso tempo il mitocondrio contribuisce all'omeostasi del calcio giocando il ruolo di sostanza tamponante. L'assorbimento di calcio da parte dei mitocondri è stato dimostrato sia nel muscolo lento soleo sia nel muscolo veloce EDL del topo.

MECCANISMO DI ATTIVAZIONE MIOFIBRILLARE:

Il legame reversibile tra gli ioni calcio e la subunità C di troponina rappresenta non solo un meccanismo di tamponamento dello ione, ma anche il modo in cui l'incremento del calcio citosolico in movimento determina la contrazione. La troponina C (TnC), insieme alla troponina T (TnT), la troponina I (TnI) e la tropomiosina (TM), forma l'unità regolatoria che controlla sette molecole di actina lungo il filamento sottile. In assenza di calcio, la TnI e la TM impediscono alla miosina di agganciarsi ai siti attivi dell'actina formando ponti acto-miosinici. Con l'arrivo del calcio invece il complesso troponina-tropomiosina cambia conformazione e la tropomiosina lascia scoperti i siti attivi della molecola di actina così che vi sia la possibilità di creare ponti acto-miosinici. In tipi di fibre differenti queste molecole (subunità di Tn, TM, actina e miosina) hanno caratteristiche strutturali e funzionali differenti, e ciò ha un impatto sulla quantità di forza sviluppata ad attivazioni submassimali, sulla quantità di tensione sviluppata durante contrazione e sulla sua diminuzione

durante rilassamento.

ISOFORME DI TROPOMIOSINA E DELLE SUBUNITÀ DI TROPONINA:

Tutti i componenti del complesso troponina-tropomiosina esistono in diverse isoforme espresse nelle fibre dei muscoli scheletrici (115). La TnC è espressa da due geni, il TnC-cardiac/slow è espresso nelle fibre lente e il TnC-fast è espresso in quelle veloci. La principale differenza tra le due isoforme è il numero dei siti attivi a bassa affinità per il legame con il calcio: mentre la TnC-fast ha due siti attivi ad alta affinità e due a bassa affinità, la TnC-cardiac/slow ha solo un sito attivo a bassa affinità in aggiunta ai due ad alta affinità. Anche la TnI esiste in due isoforme, TnI-fast e TnI-slow, espresse rispettivamente nelle fibre veloci e lente. Le isoforme veloci e lente di TnC e TnI sono espresse sempre in associazione con le corrispondenti isoforme veloci e lente MHC. Infatti in studi condotti su ratti e uomini, le isoforme lente di TnC e TnI erano associate sempre a MHC lente, mentre le MHC veloci presentavano sempre TnC e TnI veloci.

Due geni espressi nei muscoli scheletrici codificano per la subunità TnT, e ognuno di questi geni da origine a diverse isoforme. Queste, nei muscoli veloci (EDL), sono generalmente indicate con numeri crescenti: TnT1f, TnT2f, TnT3f, TnT4f....

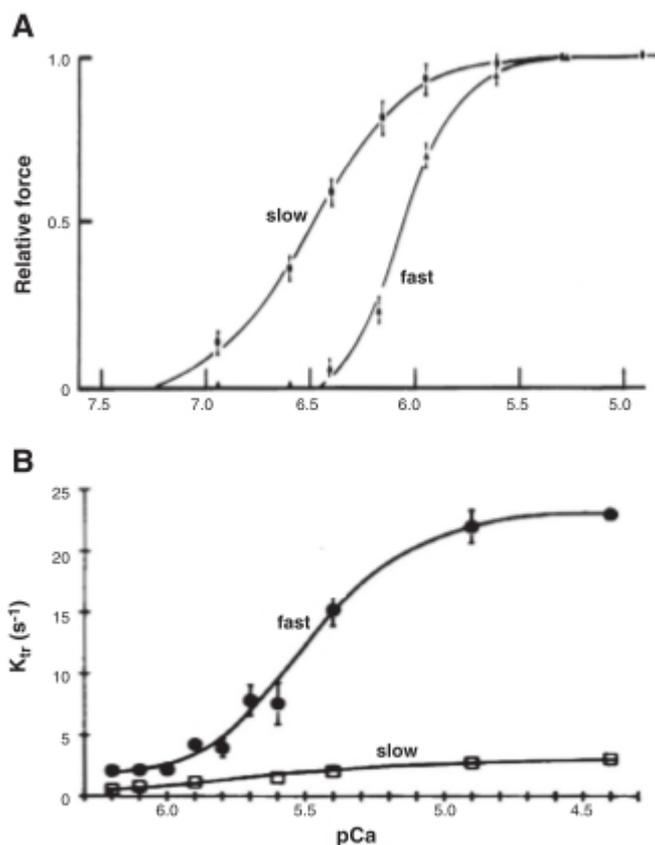
Sono state quindi dimostrate associazioni tra TnT1f e MHC-2x, tra TnT3f e MHC-2a e tra TnT4f e MHC-2b nei muscoli veloci di ratto e uomo. Per quanto riguarda il gene TnT-slow, sono state identificate nei muscoli di ratto, coniglio e uomo due isoforme (TnT1s e TnT2s) nelle fibre lente (117).

Tre geni codificano per la molecola di tropomiosina TM: TPM1 che codifica per l'isoforma TM-fast, TPM2 che codifica per l'isoforma TM- β e TPM3 che codifica per l'isoforma TM-slow. Nel ratto TM-slow è espressa nelle fibre lente, TM-fast nelle fibre veloci 2B, mentre tutte e tre le isoforme sembrano essere

presenti nelle fibre intermedie di tipo 2A e 2X. Nei muscoli umani, le fibre lente esprimono TM-slow e TM- β , mentre le fibre veloci TM-fast e TM- β .

CURVA TENSIONE-CONCENTRAZIONE CALCIO:

Il modo più popolare e semplice per valutare la risposta dell'apparato miofibrillare alle variazioni di concentrazione del calcio è la relazione tra la tensione sviluppata e la concentrazione di calcio libero (sottoforma di logaritmo pCa), indicata come curva tensione-concentrazione di calcio (t-pCa curve) (Figura 3.3). Il valore pCa₅₀ o pK è considerato un indice dell'attività miofibrillare per il calcio.



(Figura 3.3 curva tensione-concentrazione di Ca)

La risposta miofibrillare all'arrivo del calcio presenta variazioni tra i vari tipi di fibre muscolari. Risultati ottenuti su fibre muscolari di differenti specie di mammiferi come il coniglio, il ratto, e l'uomo (104) indicano che la soglia di

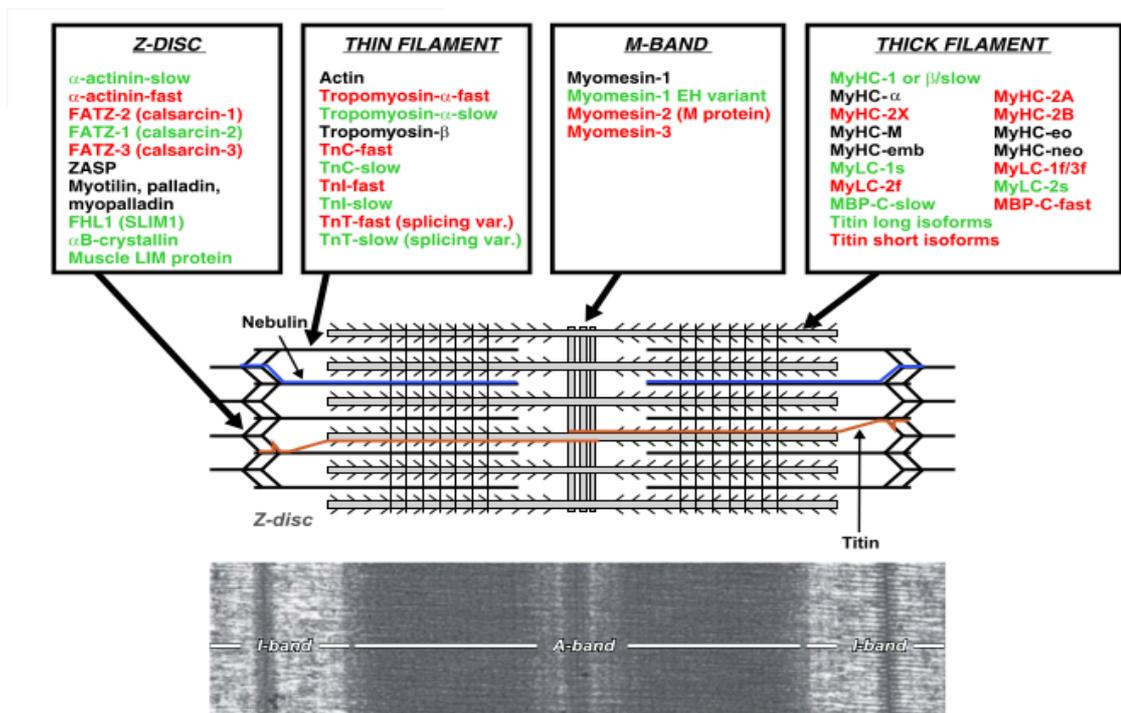
attivazione è più bassa nelle fibre lente rispetto a quelle veloci.

La fosforilazione della componente regolatoria delle catene leggere di miosina MLC sembra aumenti la sensibilità al calcio e quindi il valore di pK . Dato che la fosforilazione della MLC è tipica delle fibre veloci dove la MLC-chinasi è più elevata (20), questo meccanismo può contribuire a incrementare la responsività delle fibre veloci a concentrazioni di calcio submassimali.

3. LA CONTRAZIONE MUSCOLARE

L'unità funzionale del muscolo scheletrico è il sarcomero. Esso associato in serie ad altri sarcomeri costituisce le miofibrille, mentre in parallelo genera la struttura striata del muscolo scheletrico. Ogni sarcomero è costituito da proteine contrattili (actina e miosina), proteine regolatrici della contrazione muscolare (troponina e tropomiosina) e le proteine che costituiscono il citoscheletro miofibrillare di ogni sarcomero (Figura 3.4). Quasi tutte queste proteine del sarcomero esistono in diverse isoforme, responsabili della grande variabilità per quanto riguarda le proprietà meccaniche attive e passive nei differenti tipi di fibre muscolari.

In tutta questa molteplicità di isoforme, si può notare che la proteina contrattile actina è simile in tutti i tipi di fibre. Questa proteina è il principale componente del filamento sottile e costituisce la rotaia su cui la miosina può lavorare. Due isoforme di actina possono essere espresse nelle fibre muscolari scheletriche di mammifero: α -skeletal e α -cardiac codificate da due geni differenti. Mentre nei muscoli scheletrici di ratto e topo solo l'isoforma α -skeletal è espressa, nei muscoli umani le due isoforme coesistono.



(Figura 3.4 Le proteine del sarcomero)

ISOFORME DI MIOSINA E PROPRIETÀ CONTRATTILI:

La miosina è la proteina che più di tutte all'interno delle fibre muscolari è in grado di rispondere alle richieste del sistema nervoso. Essa converte l'energia chimica derivata dalla scissione dell'ATP in lavoro. La miosina presente a livello delle fibrocellule muscolari scheletriche è una molecola motoria facente parte del 2° gruppo delle miosine presenti nel nostro organismo che comprende anche quelle presenti nel tessuto muscolare cardiaco, liscio e anche miosine non muscolari. Come tutte quelle del 2° gruppo, la miosina presente nei sarcomeri del tessuto muscolare scheletrico è un esamero costituito da due catene pesanti e da due catene leggere di miosina associate ad ogni catena pesante, chiamate una "essenziale" e l'altra "regolatrice". Ogni molecola di miosina è caratterizzata da due teste collegate da una lunga coda. Sia il sito per il legame dell'ATP sia quello per il legame alla actina sono presenti sulla testa della miosina, che è quindi in grado di idrolizzare l'ATP e

generare forza e movimento. Alla testa della miosina è associata una porzione che la collega alla coda e che prende il nome di "collo". Questo contiene i due siti per il legame delle due catene leggere alla struttura principale. Le code delle molecole di miosina costituiscono il filamento spesso decorato da centinaia di teste che sporgono all'esterno.

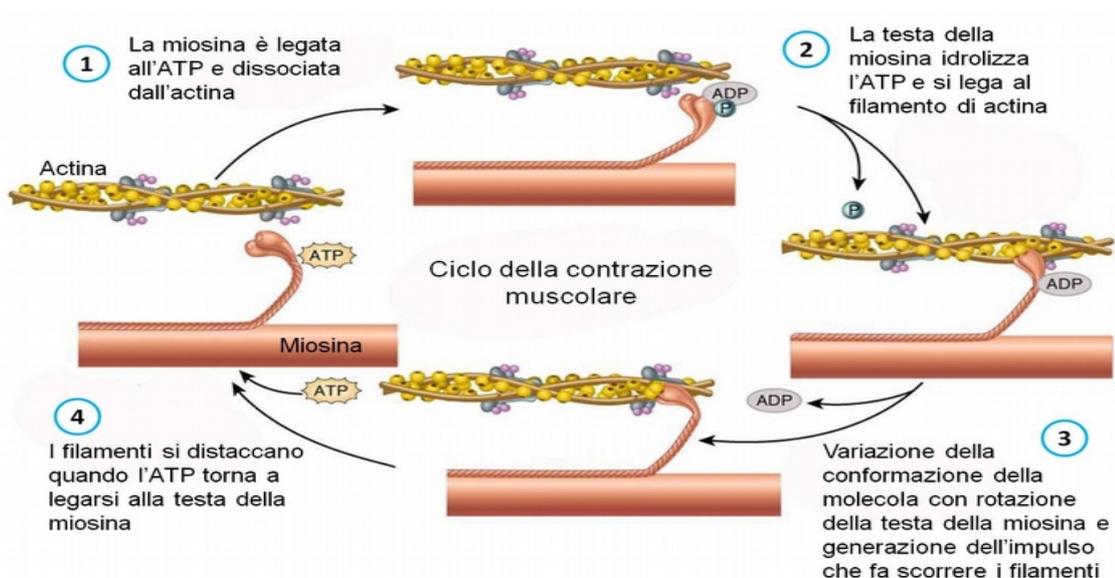
Sia le MHC, catene pesanti di miosina, e le MLC, catene leggere di miosina, presentano diverse isoforme con una differente distribuzione per tipo di fibra. Il genoma dei mammiferi contiene 11 geni che codificano per altrettante isoforme di catena pesante di miosina (13). Vi sono quindi le isoforme espresse nel muscolo cardiaco, MHC- α e MHC- β /slow (MHC-1), quest'ultima espressa anche a livello dei muscoli scheletrici, le tre isoforme espresse nelle fibre muscolari scheletriche, MHC-2a, MHC-2x e MHC-2b. In più vi sono isoforme cosiddette "di sviluppo" espresse in muscoli embrionali e neonatali, MHC-emb e MHC-neo, una isoforma specifica espressa nei muscoli extraoculari, MHC-EO, e tre isoforme specifiche di alcuni muscoli di testa e collo, MHC-slow tonic, MHC-15 e MHC-M. Le fibre intrafusali dei fusi neuromuscolari presentano anche in muscoli adulti isoforme di miosina "di sviluppo".

Anche le due subunità a catena leggera, quella essenziale o MLC1 e quella regolatoria o MLC2, esistono in diverse isoforme (115). Quattro isoforme di MLC2, ognuna codificata da un gene diverso, sono presenti nei muscoli scheletrici: MLC2s espressa nelle fibre muscolari lente e nel miocardio ventricolare, MLC2f espressa nelle fibre veloci scheletriche, MLC2m espressa nei muscoli masticatori, e MLC2a espressa nei cardiomiociti atriali. Anche per quanto riguarda la subunità essenziale esistono almeno quattro isoforme: MLC1sa espressa nelle fibre muscolari lente e in cellule non muscolari, MLC1sv presenti nelle fibre lente e nei cardiomiociti ventricolari, MLC1f presente a livello delle fibre muscolari veloci, e MLC1a/emb espresse in fibre

muscolari in via di sviluppo e nel miocardio atriale.

IL MECCANISMO DI CONTRAZIONE:

Il meccanismo base che porta, attraverso cicliche interazioni tra le teste di miosina e i filamenti di actina, allo sviluppo di forza e movimento, grazie anche alla scissione dell'ATP, è essenzialmente simile in tutte le isoforme di miosina. Attraverso il legame con l'ATP, la miosina può dissociarsi dall'actina e rompere il legame acto-miosinico chiamato "complesso di rigor", e questa dissociazione è velocemente seguita dall'idrolisi dell'ATP in P_i e ADP. All'idrolisi è associato un cambiamento di conformazione e subito dopo la miosina si lega all'actina e il P_i viene rilasciato. Il rilascio di quest'ultimo determina un nuovo cambiamento di conformazione della testa di miosina che è ora in grado di produrre forza e scivolamento di filamenti. Il rilascio dell'ADP porta alla creazione di un nuovo "complesso di rigor" acto-miosinico che verrà ancora una volta dissociato dall'arrivo di una nuova molecola di ATP, che farà partire un altro ciclo (Figura 3.5).



(Figura 3.5 Ciclo di attacco e stacco della miosina)

I parametri cinetici e l'effettiva produzione di forza e scivolamento dei filamenti differiscono tra le isoforme di miosina precedentemente presentate (29), e questo rappresenta il maggior determinante della diversità delle proprietà contrattili tra fibre differenti.

Per esempio il numero di step di idrolisi dell'ATP nel tempo può variare anche di sei volte tra 22 s^{-1} nel muscolo lento soleo e 131 s^{-1} nel muscolo veloce psoas (69). In condizioni di carico nullo, la quantità di ADP rilasciato è il fattore limitante del ciclo e quindi il maggior determinante della velocità di scorrimento dei filamenti.

Le cinetiche di rilascio dell'ADP, tuttavia, rivelano un'altra importante differenza tra le isoforme. La sensibilità delle cinetiche di rilascio ad un carico applicato o alla tensione porta alla classificazione delle isoforme di miosina in due tipi principali, chiamati "sensori di tensione" e "motorie veloci", basandosi sul confronto tra la loro affinità all'ADP e all'accoppiamento termodinamico tra ADP e actina (85). Le isoforme veloci di miosina sono le tipiche "motorie veloci", mentre le isoforme lente possono essere considerate vicine al gruppo dei "sensori di tensione", termine inizialmente introdotto per la muscolatura liscia. Mentre in tutte le isoforme di miosina la caduta di energia libera a seguito del rilascio del Pi porta alla produzione di forza e scivolamento, nelle miosine sensori di tensione, se viene applicato un carico, il rilascio di ADP è posticipato e il legame acto-miosinico è prolungato, generando forza senza apparente consumo di ATP (85).

4. LE CARATTERISTICHE MECCANICHE:

Le caratteristiche meccaniche di una fibra sono tutte quelle collegate alla sua capacità di produrre tensione (forza), di avere una determinata velocità massima di accorciamento e di produrre quindi un determinato output di

potenza.

Ogni tipo di fibra, per le proprie caratteristiche strutturali e metaboliche differenti dagli altri tipi, possiede caratteristiche meccaniche peculiari che definiscono le sue performance contrattili.

MASSIMA FORZA ISOMETRICA P_0 :

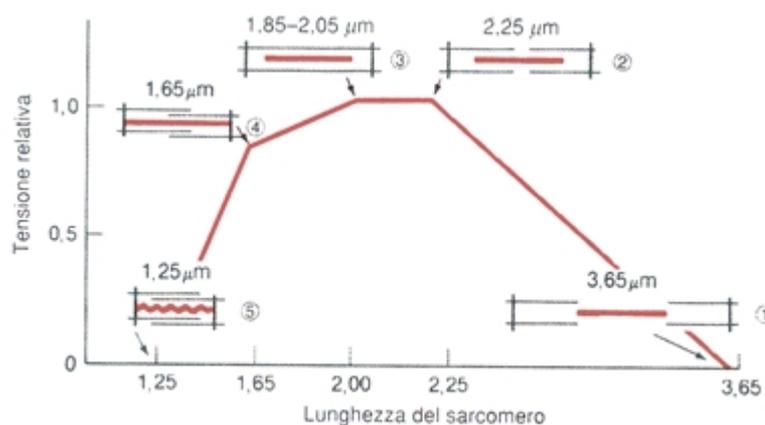
Ciascuno dei differenti tipi di fibre muscolari, se stimolato tetanicamente dal motoneurone associato e sottoposto ad una resistenza esterna inamovibile, produce la sua massima forza tetanica isometrica, un parametro che viene generalmente usato per descrivere le caratteristiche di forza di una singola fibra muscolare.

I determinanti della massima forza isometrica P_0 sono molteplici; i più interessanti da trattare sono il diametro della fibra, la relazione tensione-lunghezza e la cosiddetta forza specifica P/cm^2 .

Per quanto riguarda il diametro della fibra muscolare si può affermare che la massima forza isometrica è direttamente proporzionale ad esso. Se la quantità di proteine contrattili (mg/g di tessuto) e il numero di ponti per cm^2 sono gli stessi in due fibre diverse, la loro massima forza isometrica risulterà direttamente proporzionale al diametro posseduto delle due. Nell'uomo, in molti muscoli degli arti, le fibre veloci sono significativamente più larghe rispetto alle fibre lente, mentre nei ratti, in alcuni muscoli, le fibre di tipo 2A sono significativamente più piccole rispetto alle fibre 2X e 1. L'adattamento nel diametro della fibra in risposta ad alterazioni nei modelli di carico fisico è grandemente documentato. Robert Fitts, Kerry McDonald e Jane Schluter, nel loro studio (44), hanno riscontrato una diminuzione del diametro delle fibre 1 e 2A in protocolli di sospensione del carico applicato e immobilità, mentre un allenamento duraturo di endurance sembra non avere alcun effetto sul diametro delle fibre sia lente sia veloci in ratti e uomini. Sia le fibre lente che

veloci hanno comunque la capacità di ipertrofizzarsi quando sovraccaricate con un allenamento contro resistenza (53).

La lunghezza ottimale del muscolo o della fibra (L_o) a cui si ha la massima forza isometrica (P_o) nei muscoli di mammiferi ricade in lunghezze del sarcomero tra 2,0 e 2,6 μm (4) (Figura 3.6). A questa lunghezza si ha una ottimale sovrapposizione tra i filamenti spessi di miosina e i filamenti sottili di actina che produce il numero massimo di ponti acto-miosinici e quindi la massima tensione. Al di sotto dei 2 μm di lunghezza del sarcomero, la massima forza isometrica è minore per una minore sovrapposizione dei filamenti sottili al centro del sarcomero. Al contrario, a lunghezze maggiori di 2,6 μm si ha una minore sovrapposizione dei filamenti spessi su quelli sottili e quindi è possibile creare una quantità di ponti acto-miosinici minore, con un conseguente minore sviluppo di tensione. La lunghezza ottimale del sarcomero e del muscolo non cambia a seguito di protocolli di sospensione di attività e allenamento di endurance. Se la lunghezza in cui lavora un muscolo è cambiata da una condizione cronica che produce allungamento o accorciamento, la lunghezza della fibra aumenterà o diminuirà incrementando o diminuendo il numero di sarcomeri in serie (139). Questo suggerisce che in vivo, alla lunghezza di riposo, i sarcomeri hanno una lunghezza sempre vicina a quella ottimale (da 2,0 a 2,6 μm).



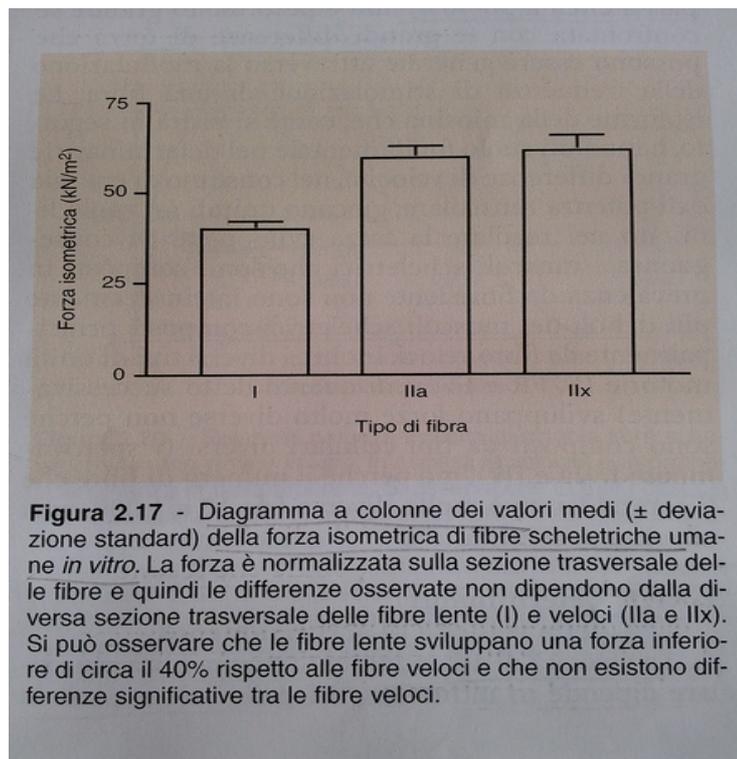
(Figura 3.6 Relazione tensione-lunghezza del sarcomero)

La forza specifica è la forza (tensione) prodotta ad ogni cm^2 della sezione trasversa di un muscolo. Il picco di forza specifica dipende da L_o , e quindi dal numero di ponti acto-miosinici attivi, oltre che dalla forza che è in grado di sviluppare ciascun ponte acto-miosinico. In generale si può affermare che non esistono significative differenze nel picco di forza specifica, e quindi della forza sviluppata ad ogni cm^2 , in kg/cm^2 , tra i vari tipi di fibre sia nell'uomo che nel ratto nei muscoli scheletrici. Fibre muscolari scheletriche lente o veloci intatte generano approssimativamente la stessa quantità di tensione specifica, tra i 2,0 e i 2,5 kg/cm^2 (34). Questo, presumibilmente, è dato dal fatto che in una stessa area di sezione (1cm^2) può essere contenuto un numero minore di fibre veloci, aventi un diametro maggiore, rispetto alle fibre lente. Si è osservato che 2 settimane di sospensione dell'attività hanno portato ad una diminuzione del picco di forza specifica del 28% nelle fibre del muscolo soleo. Questo avveniva poiché si era verificato un drastico abbassamento del contenuto di proteine contrattili in mg/g . Questa seconda evidenza spiega la relativa diminuzione del picco di forza specifica (tensione a cm^2) (45). Si pensa quindi che una diminuzione del picco di forza specifica di un muscolo sia causata da una caduta nel numero di ponti acto-miosinici per area di sezione trasversale e non per una riduzione della tensione prodotta dai singoli ponti. Protocolli di allenamento di endurance producono piccole diminuzioni o nessun cambiamento a livello di picco di forza specifica (131).

In conclusione, i tre tipi di fibre muscolari dei muscoli dell'uomo presentano valori di massima forza isometrica differenti.

Le fibre di tipo 1 presentano valori di massima forza isometrica che sono significativamente inferiori rispetto alle fibre veloci 2A e 2X. In generale, il maggior determinante della massima tensione che è in grado di sviluppare una fibra muscolare è la sezione della fibra stessa e quindi il numero di sarcomeri in parallelo che vi sono presenti. Come già ricordato le fibre veloci

hanno un diametro maggiore rispetto alle lente. Sembra però che anche il tipo di MHC presente possa essere un determinante della massima forza isometrica. Infatti, come si può vedere dal grafico sottostante (Figura 3.7), la massima forza isometrica dei tre tipi di fibre degli uomini normalizzata rispetto alla loro sezione trasversale (le differenze osservate non dipendono dalla sezione della fibra), è diversa per i vari tipi di fibre e, in particolare, mentre le fibre 2A e 2X presentano livelli di forza isometrica del tutto simili, le fibre di tipo 1 presentano un valore inferiore del 30-40% circa. Questo è spiegato dal fatto che le MHC veloci presentano due importanti differenze rispetto a quelle lente: 1. possiedono un numero più elevato di teste di miosina che costituiscono legame forte con l'actina e 2. possiedono una forza generata per testa maggiore.

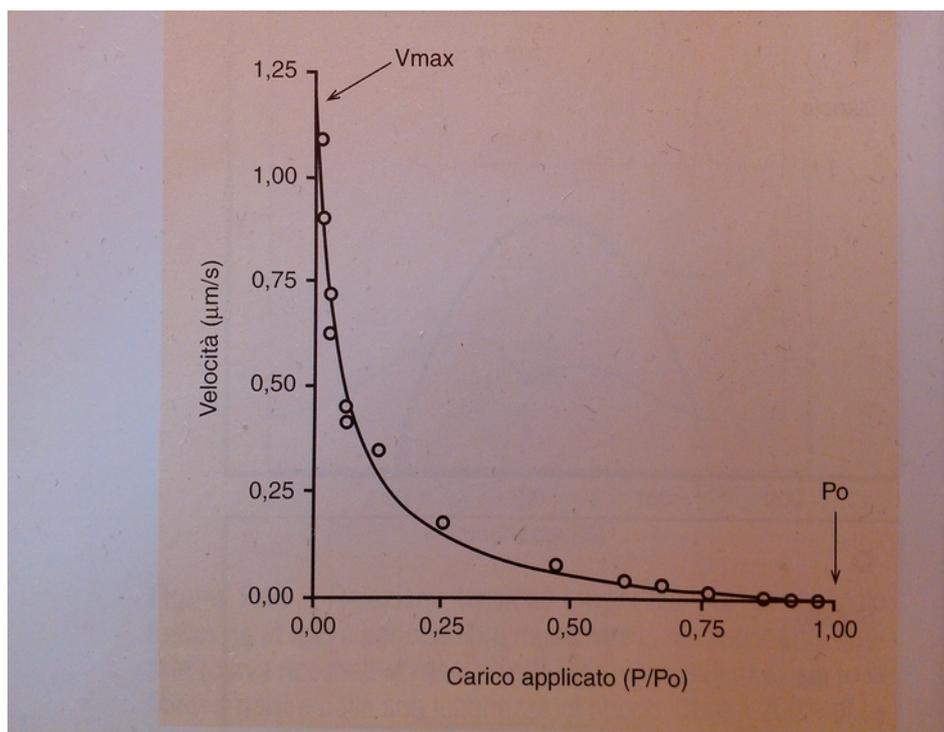


(Figura 3.7 Forza isometrica normalizzata alla sezione trasversale)

LA RELAZIONE FORZA-VELOCITÀ:

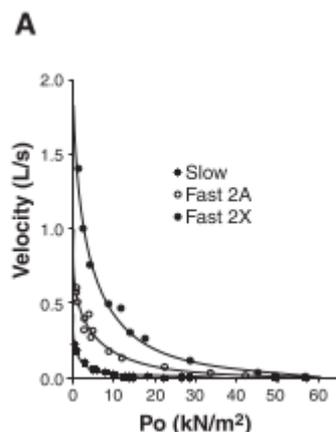
La relazione che intercorre tra una tensione P/P_0 e la velocità di contrazione V è la relazione forza-velocità, riportata nella figura sottostante:

(Figura 3.8 Relazione forza-velocità)



Da essa si comprende come tra la tensione P/P_0 , quindi la forza sviluppata dal muscolo, e la velocità di contrazione esista una relazione di proporzionalità inversa in cui all'aumentare della tensione richiesta diminuisce inevitabilmente la velocità della contrazione, e viceversa. I punti in cui la relazione incontra rispettivamente l'ascissa e l'ordinata sono P_0 , la massima forza isometrica, e V_0 (anche chiamata V_{max}), ovvero la massima velocità di contrazione. P_0 è il valore di forza che si può raggiungere solo quando la velocità di contrazione è nulla, ovvero durante una contrazione isometrica. V_0 invece è la velocità massima di contrazione che si raggiunge eseguendo una contrazione massimale contro un carico nullo. Un modello sperimentale che è stato in

grado di analizzare la velocità di contrazione di una fibra muscolare imponendo un carico nullo, situazione anomala e non facile da raggiungere sperimentalmente, è il cosiddetto slack test. In esso, inizialmente, una fibra muscolare viene fatta contrarre tetanicamente contro una resistenza inamovibile, quindi in maniera isometrica. In questo stato la fibra produce una tensione pari al suo P_0 , le teste delle miosine presenti in essa sono collegate all'actina e stanno creando tensione sul filamento sottile per cercare di far accorciare e quindi contrarre la fibra. Gli elementi elastici della fibra muscolare in questo momento sono allungati. Successivamente si impone alla fibra, in contrazione tetanica, un accorciamento istantaneo che comporta un accorciamento degli elementi elastici e il fatto che la miosina compia cicli di attacco e stacco uno dietro l'altro più velocemente possibile (perché stimolata tetanicamente) fino a riportare la fibra in tensione anche a questa lunghezza minore rispetto a quella iniziale. In questo momento la miosina compie cicli di interazione con l'actina alla più alta velocità possibile in una situazione di carico nullo in cui non viene creata alcuna tensione. Con lo slack test si misura il tempo dal momento in cui viene imposto l'accorciamento fino al momento in cui la fibra porta la sua lunghezza, contraendosi alla massima velocità possibile, alla nuova lunghezza imposta, generando nuovamente tensione. V_0 è quindi facilmente calcolabile conoscendo la differenza di lunghezza imposta e il tempo che la fibra ci ha messo a recuperarlo. In questo modo sono state calcolate le V_0 dei 3 principali tipi di fibre umane e si è giunti alla costruzione di una relazione forza-velocità per ogni singolo tipo di fibra: (Figura 3.9 Relazione forza-velocità dei tipi di fibre umane)

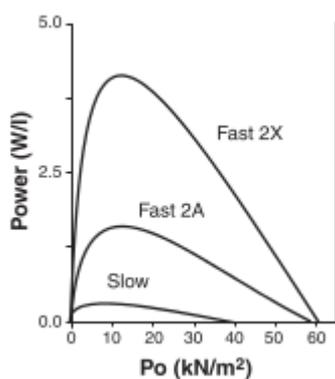


Dal grafico si riconoscono facilmente le diverse V_0 dei vari tipi di fibre sulle ordinate e i diversi valori di P_0 sulle ascisse. Da questa semplice relazione si possono ricavare utili applicazioni pratiche. In particolare, fissando un valore di carico sulle ascisse, si può facilmente capire che fibre muscolari di tipo diverso riusciranno a muovere quel carico, grazie alla tensione sviluppata dalla loro contrazione, con una velocità differente. Infatti, a parità di carico applicato, le fibre muscolari presentano velocità di accorciamento che seguono il seguente andamento $2X > 2A > 1$. Al contrario fissando un dato valore di velocità di accorciamento ai tre tipi di fibre dei muscoli umani, il carico che esse saranno in grado di spostare alla velocità scelta segue il seguente andamento $2X > 2A > 1$.

Essendo che la forza e la velocità sono i determinanti della potenza muscolare, si può intuire come le fibre di tipo 2X sviluppino una potenza maggiore rispetto alle fibre 2A, e ancora maggiore rispetto alle fibre 1.

Dalla relazione forza velocità possono essere ricavate le relazioni forza-potenza e velocità-potenza (Figure 3.10 e 3.11)

(Figura 3.11 Relazione velocità-potenza)



(Figura 3.10 Relazione forza-potenza)

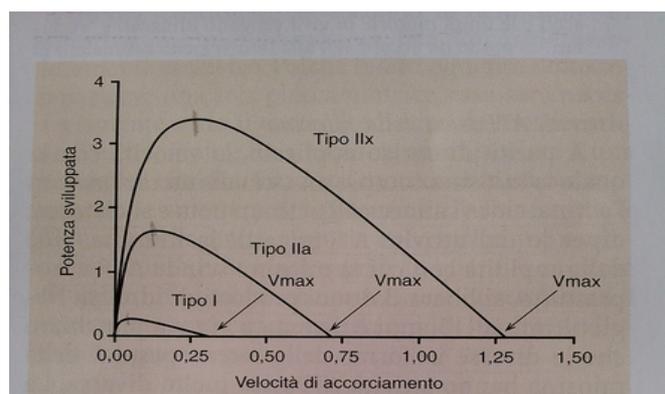


Figura 2.20 - Relazioni potenza-velocità di singole fibre scheletriche umane isolate *in vitro*. In ascissa la velocità e in ordinata la potenza in unità arbitrarie. Si osserva che in tutti i casi c'è una velocità alla quale la potenza sviluppata è massima; al di sopra e al di sotto di questa velocità la potenza sviluppata diminuisce fino a diventare zero, da un lato alla velocità massima (forza zero) e dall'altra alla velocità zero (contrazione isometrica). Si può anche osservare che le fibre IIx sviluppano una potenza massima molto più alta delle fibre I e che le fibre IIa sviluppano potenze intermedie. Le frecce indicano la velocità massima (V_{max}) per ogni tipo di fibra.

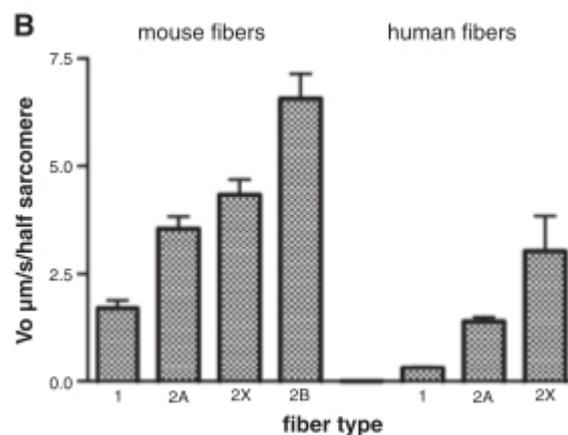
Da queste relazioni si possono ricavare i valori di forza e di velocità ai quali le singole fibre sviluppano la massima potenza, chiamate forze ottimali e velocità ottimali. Il valore di velocità ottimale nelle fibre veloci è una frazione di V_0 che corrisponde a circa il 20%. Nelle fibre lente questo valore invece corrisponde a circa il 15% della massima velocità di accorciamento. Diversi studi hanno posto l'attenzione sul fatto che la velocità ottimale è quella velocità di contrazione che il nostro organismo adotta durante il normale movimento (80). Quindi il reclutamento delle fibre muscolari è messo in atto non solo per raggiungere livelli di forza espressi via via maggiori ma per raggiungere le potenze espresse richieste e quindi anche la velocità con la quale deve essere eseguito un particolare movimento. In generale comunque si può dire che le forze ottimali e le velocità ottimali crescono a seconda del tipo di fibra secondo il classico andamento $2X > 2A > 1$.

LA MASSIMA VELOCITÀ DI ACCORCIAMENTO (V_0)

Nel ratto essa, misurata in FL/s (lunghezze di fibra/s), è 5-6 volte maggiore nelle fibre di tipo 2B rispetto alle fibre 1; mentre nelle fibre di tipo 2A e 2X è 3-4 volte maggiore rispetto alle fibre 1. Nell'uomo, a carico nullo, le fibre di tipo 1 sono 7-9 volte più lente delle fibre di tipo 2X, mentre le fibre di tipo 2A hanno velocità intermedie. Tutto questo è dato da fatto che la velocità con la quale la miosina compie un ciclo di interazione con l'actina dipende dall'attività ATPasica della miosina, cioè dalla rapidità con cui la miosina scinde ATP e, soprattutto, si libera dai suoi prodotti di idrolisi. Negli ultimi decenni è diventato via via più chiaro che le diverse isoforme delle catene pesanti di miosina hanno un'attività ATPasica molto diversa. La MHC-1 ha un'attività ATPasica 3-4 volte più bassa della MHC-2x, mentre la MHC-2a presenta valori intermedi. La massima velocità di accorciamento di una fibra dipende quindi dalla durata del singolo ciclo di attacco e stacco, quindi dal tempo in cui la

testa di miosina rimane attaccata all'actina e dal reciproco tempo di staccamento in cui le due sono staccate. Sembra quindi che le isoforme MHC presenti a livello delle fibre siano il principale determinante della massima velocità di accorciamento V_0 .

Esistono poi differenze interspecie per quanto riguarda la velocità dei singoli tipi di fibre dei mammiferi; ad esempio tutti i tipi di fibre umani possiedono una V_0 minore rispetto agli stessi tipi di fibre nel ratto, che peraltro possiede anche il tipo 2B che è in grado di esprimere V_0 circa doppia rispetto alla fibra 2X umana (Figura 3.12)



(Figura 3.12 V_0 nelle fibre di uomo e topo)

POTENZA MECCANICA:

La potenza meccanica può quindi essere definita come l'energia meccanica generata o rilasciata per unità di tempo, e dipendente dai valori di V_0 e P_0 . La potenza meccanica è direttamente collegata con l'energia chimica rilasciata attraverso l'idrolisi dell'ATP, e il rapporto tra questi due valori (potenza/quantità di energia chimica rilasciata) prende il nome di efficienza termodinamica. Comparando fibre muscolari adulte, la potenza meccanica picco aumenta nell'ordine da fibre di tipo 1 a fibre 2A, 2X e 2B che presentano i valori più elevati, in tutte le specie di mammiferi e in tutti i muscoli esaminati finora

(19). Per quanto riguarda invece la quantità di ATP consumata durante contrazioni isometriche massime nel tempo, essa aumenta da fibre lente di tipo 1 a fibre veloci di tipo 2A e 2X, e raggiunge i massimi valori nelle fibre 2B (17,18). In questo caso però la tensione sviluppata dai differenti tipi di fibre è differente. Se invece a noi interessa il costo di tensione (tension cost), ovvero la quantità di ATP consumata a parità di tempo e a parità di tensione sviluppata dalla fibra, le fibre lente di tipo 1 hanno un costo di tensione minore rispetto alle fibre veloci e quindi nello stesso tempo e con lo stesso carico applicato consumano meno ATP. Questo dato assume una notevole importanza se noi pensiamo ai muscoli posturali presenti nel nostro corpo. Questi muscoli per sopportare carichi esigui ma prolungati nel tempo sono costituiti pressochè totalmente da fibre lente di tipo 1 che possiedono un costo di tensione molto basso, e ciò ne riduce grandemente l'affaticamento.

Durante l'accorciamento invece, la quota di idrolisi di ATP cresce in tutti tipi di fibre muscolari (Fenn effect) (122). L'idrolisi di ATP aumenta sia nelle fibre lente sia nelle fibre veloci in una relazione di proporzionalità diretta con la velocità di accorciamento. La quota di idrolisi di ATP durante accorciamento attivo è proporzionale alla potenza espressa, che è differente a seconda del tipo di fibra (99).

5. IL CITOSCHELETRO

Il citoscheletro è una impalcatura cellulare che determina la forma e la grandezza di una cellula muscolare e che è in grado di trasmettere la forza generata dall'interazione tra actina e miosina allo scheletro fibroso extracellulare. Anche le stesse miofibrille possono essere considerate parte del citoscheletro. Esse corrono lungo l'asse maggiore della fibre da una

estremità all'altra, terminando con connessioni specializzate con il sarcolemma chiamate giunzioni miotendinee. La trasmissione laterale e trasversa di forza non è meno importante di quella longitudinale e vi sono infatti strutture di collegamento e connessione che tengono a registro le fibre anche in presenza di una attività contrattile differente (82). Tutto questo è reso possibile dal citoscheletro miofibrillare ed extramiofibrillare. Questi ultimi, ancora una volta, presentano caratteristiche differenti a seconda del tipo di fibra preso in esame.

CITOSCHELETRO MIOFIBRILLARE:

Lo spessore delle linee o strie Z dipende dal tipo di fibra, essendo più sottili nelle fibre veloci (~30-50 nm), più spesse nelle fibre lente e nei cardiomiociti (~100 nm). Il costituente principale delle linee Z è la proteina α -actinina, organizzata in filamenti a formare una rete. Questa struttura collega i filamenti sottili di due sarcomeri adiacenti e lega le proteine giganti titina e nebulina. L' α -actinina esiste in due isoforme: ACTN2 espressa in tutte le fibre muscolari, e ACTN3 espressa solo nelle fibre muscolari di particolari muscoli veloci. Nell'uomo la ACTN3 è presente in quantità maggiore nelle fibre di tipo 2X rispetto a quelle di tipo 2A (134). Oltre ad actina dei filamenti sottili, α -actinina e le proteine nebulina e titina, sono collegate alle linee Z anche proteine minori come la calsarcina. Essa è presente nelle fibre veloci in due isoforme, calsarcin-1 e calsarcin-3, mentre calsacin-2 è l'isoforma presente nelle fibre lente.

La banda M è la struttura citoscheletrica che collega le code di miosina e i filamenti di titina al centro del sarcomero. Le sue funzioni sono di stabilizzazione trasversale e longitudinale della banda A e del sarcomero in toto durante contrazione. La presenza di creatin-chinasi (CK), poi, dà alla banda M un ruolo di riserva metabolica per la contrazione. I più importanti

costituenti della banda M sono: miomesina 1, miomesina 2 o proteina M, miomesina 3 e creatin-chinasi (3). Mentre la miomesina 1 è presente in tutti i muscoli striati, una forma di questa proteina più lunga, chiamata miomesina EH, è presente nelle fibre lente. La miomesina 2 è presente a livello delle fibre di tipo 2B, mentre la miomesina 3 in quelle fibre veloci e intermedie, 2X e 2A. In una sezione condotta longitudinalmente alla miofibrilla, la linea M consiste in 3-5 linee elettroniche dense parallele nella zona centrale della banda A. Le fibre veloci hanno una struttura a 3 linee parallele, quelle lente presentano una struttura a 4 linee parallele mentre quelle veloci intermedie a 5 linee parallele (118).

Le proteine cosiddette "giganti" che costituiscono il citoscheletro sono titina, nebulina e obscurina. La titina, inizialmente chiamata connettina, è la più grande proteina espressa nelle fibre muscolari scheletriche ed esiste in diverse isoforme. La proteina titina va dalla linea Z, ad una estremità del sarcomero, fino alla linea M, a metà della lunghezza totale del sarcomero. Mentre il segmento di titina presente a livello della banda A è all'interno del filamento spesso ed è rigido, quello presente nella banda I ha caratteristiche di dimensione e proprietà elastiche differenti. In generale isoforme di titina più lunghe sono espresse nei muscoli ricchi di fibre lente o dove la miosina lenta è abbondantemente espressa (95). La titina è il maggior responsabile della tensione passiva di una fibra, è l'espressione di varianti più lunghe di titina determina un minor livello di tensione passiva o un più alto livello di estensibilità della fibra.

La proteina obscurina è presente a livello della periferia della banda M ed è collegata al reticolo sarcoplasmatico; per questo si pensa che permetta interazione tra il reticolo e le miofibrille. Diverse varianti genetiche esistono anche per questa proteina. Confronti in muscoli di coniglio hanno mostrato che la grandezza della obscurina è correlata positivamente con la grandezza

della titina e con l'abbondanza di fibre lente (95).

La nebulina invece costituisce la sagoma del filamento sottile e ne stabilizza la struttura. Ci sono differenze nella grandezza della nebulina tra specie animali differenti e diverse varianti dal singolo gene di nebulina in ogni specie. Le varianti più grosse sono espresse in quei muscoli ricchi di fibre lente (95), in accordo con l'espressione delle varianti più grandi di titina.

CITOSCHELETRO EXTRAMIOFIBRILLARE:

Desmina, γ -actina e filamento C sono i componenti base del citoscheletro extramiofibrillare che connette miofibrille periferiche, nuclei, mitocondri e sarcolemma. La desmina è la classica proteina filamentosa presente nella muscolatura scheletrica e liscia che, grazie all'interazione con isoforme differenti di un'altra proteina specifica chiamata plectina, collega il nucleo (plectina1), la linea Z (plectina1b), e i mitocondri (plectina1d) (75). L'importanza della struttura citoscheletrica mitocondriale fa sì che le fibre lente ossidative siano più sensibili alla mancanza di plectina rispetto a quelle veloci e glicolitiche. Quindi la plectina risulta essere più abbondante nelle fibre di tipo 1 lente ossidative e ricche di mitocondri rispetto alle fibre di tipo 2 veloci ossidative.

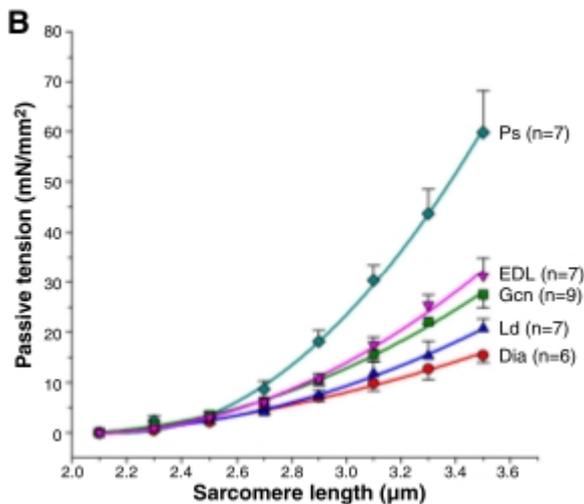
I filamenti γ -actina sono presenti sia intorno alle miofibrille a livello delle linee Z sia nella zona adiacente al sarcolemma e la loro funzione è quella di legare la rete miofibrillare ai sistemi di membrana.

I filamenti C invece sono un'isoforma particolare di proteina citoscheletrica presente a livello dei muscoli scheletrici e collega i filamenti di actina tra loro fino a formare fasci paralleli con una organizzazione tridimensionale (133).

IMPLICAZIONI FUNZIONALI DELLA DIVERSITÀ DEL CITOSCHELETRO:

Dalla lunghezza di riposo, che corrisponde ad una lunghezza del sarcomero

tra circa 1,9 e 2,4 μ m, le fibre a riposo possono essere allungate virtualmente senza nessuna resistenza di circa 0,5 μ m/sarcomero. Oltre questa misura, la fibra resiste all'allungamento e crea una tensione, chiamata tensione passiva. Dati affidabili indicano che la tensione passiva è maggiore nelle fibre veloci rispetto a quelle lente (95) (Figura 3.13)



(Figura 3.13 Relazione lunghezza sarcomero-tensione passiva)

Il citoscheletro intracellulare è il maggior responsabile della tensione passiva e, tra i suoi componenti, la titina gioca il ruolo di principale produttore di tensione a seguito di allungamenti passivi (55). Le isoforme più lunghe e più estensibili di titina nelle fibre lente forniscono una spiegazione del perché in questo tipo di fibra la tensione passiva sia più bassa. Le proteine filiformi citoscheletriche extramiofibrillari come la desmina contribuiscono allo sviluppo di tensione passiva solo a lunghezze di sarcomero estreme nelle fibre muscolari scheletriche di tronco e arti. Invece nei cardiomiociti la desmina contribuisce alla tensione passiva anche nel range delle lunghezze fisiologiche del sarcomero (137). I muscoli veloci esprimono livelli più elevati di desmina rispetto alle fibre lente.

Mentre l'andamento a campana della curva tensione-lunghezza del sarcomero è comune in tutti i muscoli striati, la lunghezza del sarcomero alla quale si genera la massima tensione varia tra specie e muscoli differenti. Per esempio la lunghezza ottimale del sarcomero nelle fibre muscolari dei muscoli veloci di

rana cade nell'intervallo tra 2.0 e 2.2 μm , ma è spostato a valori più elevati (2.3-2.6 μm) nelle fibre muscolari di topo o ratto (39). In generale la lunghezza ottimale corrisponde alla lunghezza del sarcomero alla quale vi è la maggiore sovrapposizione di filamenti. Dato che la struttura e la lunghezza dei filamenti spessi è conservata in tutti i vertebrati, la lunghezza del filamento sottile assume il ruolo di maggior determinante. Quindi la differenza nella curva tensione attiva-lunghezza tra fibre veloci e lente nel pesce è spiegata dalla differente lunghezza del filamento sottile. Le fibre lente quindi, avendo filamenti sottili più lunghi e isoforme di titina più lunghe, hanno range di lunghezza di sarcomero ottimali spostati verso valori di lunghezza maggiori rispetto alle fibre veloci.

6. IL RIFORNIMENTO DI ENERGIA: METABOLISMO OSSIDATIVO E GLICOLITICO

IL CONSUMO E LA RIGENERAZIONE DI ATP:

Tutta l'energia richiesta dalle funzioni cellulari, inclusa l'attività contrattile, è messa a disposizione grazie all'idrolisi dell'ATP in ADP+Pi. Per questo motivo, l'energia consumata da una fibra muscolare può essere misurata in moli di ATP consumate o in calorie o joule. In condizioni fisiologiche 1 mole di ATP è in grado di rilasciare tra i 50 e i 60 kJ in condizioni fisiologiche (122). A riposo come durante esercizio, il parametro più rilevante per l'energetica muscolare è la potenza: potenza metabolica, moli di ATP/unità di tempo generate o consumate, e potenza termodinamica calorie o Joules/unità di tempo. Il termine capacità invece è generalmente adottato per indicare la quantità totale di energia immagazzinata nelle fibre muscolari in forma di ATP o rilasciata durante un dato periodo di attività. Una caratteristica unica delle fibre muscolari scheletriche è il fatto che esse possono sopportare grandi e

improvvisi cambiamenti nel consumo di energia quando passano da una situazione di riposo ad una di attività. La quantità di energia spesa a riposo nelle fibre muscolari umane si attesta ad un valore tra 0,004 e 0,008 mM/s. Il consumo di energia a riposo è determinato dalle pompe Na/K e dalla sintesi proteica, due parametri che non variano grandemente tra tipi di fibre diverse (102). Durante la contrazione il consumo di energia ha due componenti principali: ATP consumato dall'ATPasi miofibrillare (70%) e ATP consumato per il trasporto ionico (30%), di calcio principalmente. È stato calcolato il consumo di ATP miofibrillare in fibre umane in condizioni fisiologiche durante contrazione isometrica massimale e i valori ricavati (in mM/kg di peso netto/s) sono: fibre di tipo 1, 6,5; fibre di tipo 2A, 17,6; fibre di tipo 2X, 26,6 (109). Questi valori, incrementati di un 30-40% a causa del trasporto di ioni, in particolare per la ricaptazione di calcio da parte del reticolo sarcoplasmatico, portano a valori di 1,7-4,7-7,2 mM/s come consumo totale durante contrazione per fibre di tipo 1, 2A e 2X rispettivamente. Analisi spettroscopiche basate su misurazioni del consumo di ATP in vivo nel muscolo adduttore del pollice nell'uomo hanno ricavato valori di 4,4 mM/s durante contrazione isometrica e 9,7 mM/s durante contrazione isotonica positiva. Calcoli basati su analisi microchimiche su fibre muscolari singole di uomo hanno mostrato che durante 32s di contrazioni intermittenti indotte elettricamente, la quantità di ATP consumato è 1,2 e 2,4 mM/s in fibre lente e fibre veloci, rispettivamente (56). Per avere a che fare con queste grandi variazioni di consumo di ATP, sono necessari meccanismi veloci ed efficienti per la risintesi di ATP. Tre principali meccanismi permettono la risintesi di ATP nelle fibre muscolari: l'attività della creatin-chinasi (CK), la glicolisi e la fosforilazione ossidativa mitocondriale. La fosfocreatina (PCr) ricopre il ruolo di serbatoio di fosfati ad alta energia per una rapida rigenerazione di ATP attraverso creatin-chinasi, e quindi evitando l'accumulo di ADP. Il sistema PCr-CK è localizzato vicino ai siti di consumo di

ATP (miofibrille e reticolo) e rappresenta un processo di rigenerazione di ATP ad alta energia e bassa capacità. Una quantità minore di energia è poi risintetizzata attraverso l'adenilato-chinasi: da due molecole di ADP, tramite questa reazione, ne sono generate 1 di ATP e 1 di AMP (adenosina monofostato). La glicolisi è responsabile del metabolismo del glucosio e del glicogeno portando alla creazione di piruvato o lattato e rappresenta la seconda risorsa di ATP con una potenza minore ma una capacità maggiore se confrontata con il sistema PCr-CK. Piruvato, acidi grassi e corpi chetonici possono essere trasformati in acetil-CoA che è il substrato per i processi ossidativi mitocondriali caratterizzati da una potenza ancora minore ma una capacità veramente alta, per quanto riguarda la rigenerazione dell'ATP. I substrati energetici e l'ossigeno, ovviamente, devono essere disponibili nelle fibre muscolari o riforniti attraverso la microcircolazione, e la rimozione di sostanze di rifiuto o intermedie, come il lattato e il diossido di carbonio, è richiesta per mantenere i processi metabolici sempre in funzione.

Muscoli lenti e veloci differiscono tra loro per il ruolo che la glicolisi e la fosforilazione ossidativa hanno nella rigenerazione di ATP. I muscoli lenti sono in grado di generare tutta l'ATP che hanno bisogno dai processi ossidativi mitocondriali. Il loro consumo di ATP durante contrazione non è così elevato, e questo determina la loro capacità di mantenere l'attività contrattile a lungo nel tempo senza mostrare fatica. I muscoli veloci invece si avvalgono dei processi glicolitici per generare ATP in maniera rapida, e questo fissa un limite alla durata della loro attività contrattile.

La diversità per quanto riguarda le proprietà metaboliche, inizialmente osservata tra muscoli rossi e muscoli bianchi, venne estesa a livello delle fibre grazie allo sviluppo di metodi istochimici. Basandosi sulle loro proprietà biochimiche le fibre vennero classificate come S (slow), FOG (fast oxidative glycolitic), e FG (fast glycolitic) (90). Il successivo sviluppo di metodi

microchimici a livello della singola fibra hanno permesso di individuare le attività enzimatiche e di descrivere quantitativamente le proprietà metaboliche di fibre muscolari (100). In tempi più recenti la spettroscopia ha aperto la nuova frontiera dello studio del metabolismo muscolare in vivo, a riposo e durante contrazione, rendendo evidente le diversità presenti tra tipi di fibre differenti (132).

LA RIGENERAZIONE DI ATP ATTRAVERSO CREATIN-CHINASI E ADENILATO-CHINASI:

Nei muscoli umani, la concentrazione di ATP a riposo è veramente simile in fibre muscolari lente e veloci, con un range di 23,7-25,5 mmol/kg di peso netto (4,7-5,1mM), o leggermente maggiore nelle fibre veloci rispetto a quelle lente (27 contro 22 mmol/kg di peso netto) (111). In altre specie le differenze sono più marcate. La concentrazione di ATP è continuamente tenuta sottocontrollo grazie all'utilizzo delle scorte disponibili di PCr (fosfocreatina) che, grazie all'azione dell'enzima CK (creatin-chinasi) è in grado di cedere il suo fosfato ad una molecola di ADP (adenosina difosfato) e riconvertirla in ATP diventando creatina attraverso la reazione di Loozman ($ADP+PCr \leftrightarrow ATP+Cr$). La PCr è quindi il più veloce ed efficace sistema di rigenerazione di ATP durante brevi periodi di contrazione ma gioca anche il ruolo di collegamento tra i siti di sintesi di ATP nei mitocondri e i siti della loro utilizzazione nelle miofibrille e nel reticolo sarcoplasmatico.

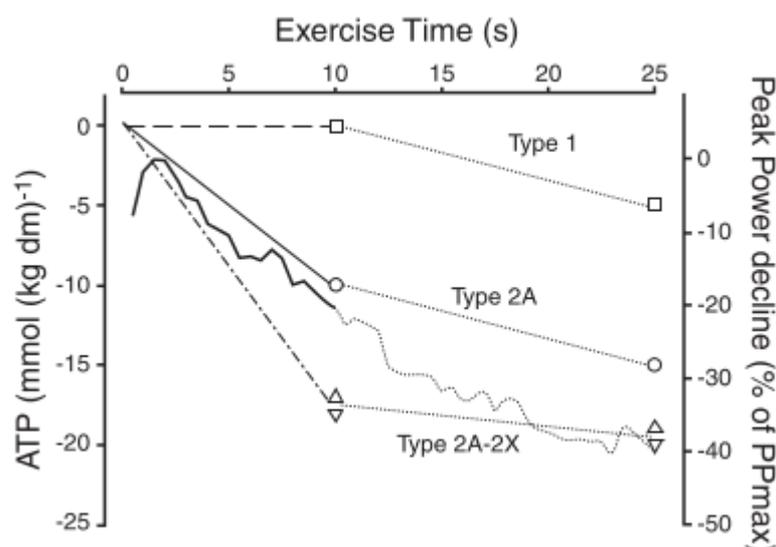
Nei muscoli degli uomini a riposo, il contenuto di PCr è leggermente più elevato nelle fibre veloci rispetto alle lente, le concentrazioni variano da 60-70mmol/kg di peso netto (12-14mM) a 80-90 mmol/kg di peso netto (16-18mM), in fibre lente e veloci rispettivamente (111). L'attività totale della CK si equivale in fibre lente e veloci, o è leggermente maggiore nelle fibre veloci

(141). La rigenerazione di ATP dalla PCr sembra essere più efficiente nelle fibre veloci rispetto alle fibre lente.

La concentrazione totale di ADP nelle fibre muscolari a riposo è circa 2-3 mmol/kg di peso netto (0,4-0,6mM), ma la concentrazione libera di ADP rappresenta solo una piccolissima frazione. La concentrazione di gruppi fosfato P_i è maggiore nelle fibre lente rispetto a quelle veloci.

La PCr è la principale risorsa di ATP nei muscoli scheletrici dei mammiferi durante il passaggio dal riposo all'attività. In queste circostanze, la PCr è velocemente consumata nel tentativo di mantenere costante la concentrazione di ATP. La deplezione di PCr è diversamente distribuita tra i diversi tipi di fibre muscolari. Se si prende come esempio un esercizio alla massima intensità di durata <30s, la rapida e progressiva riduzione nella potenza meccanica può essere ricondotto alla deplezione di PCr nei differenti tipi di fibre (72) (Figura 3.13).

In queste condizioni, come si può vedere anche dalla figura sottostante, sia l'ATP che il PCr velocemente decrescono, e con loro anche il picco di potenza espressa, mentre la concentrazione di ADP aumenta di 10 volte.



(Figura 3.13 Relazione tempo di esercizio-deplezione di ATP)

Nei muscoli umani, la riduzione di ATP al 30% dei valori di riposo avviene già dopo solo 10s di esercizio massimale nelle 2X ed è accompagnata da una riduzione di PCr anche maggiore. Il fatto che la deplezione sia più pronunciata nelle fibre di tipo 2X è dovuto principalmente al fatto che il loro consumo di ATP nel tempo è maggiore rispetto alle altre fibre. Durante esercizi intensi di breve durata, la concentrazione di Pi aumenta fino ad 8 volte (132). L'incremento della concentrazione di ADP gioca invece un ruolo specifico a seconda del tipo di fibra nell'attivazione della respirazione mitocondriale.

	Fibre VELOCI	Fibre LENTE
Concentrazione di ATP a riposo	~25-27mM/kg di peso netto	~22-23mM/kg di peso netto
Concentrazione di PCr a riposo	~80-90mM/kg di peso netto	~60-70mM/kg di peso netto
Attività totale CK	Leggermente maggiore rispetto alle lente	Leggermente minore rispetto alle veloci

(Tabella 2)

L'ADP può anche supportare direttamente la produzione di ATP attraverso una reazione catalizzata dall'enzima adenilato-chinasi (AK), che converte 2 ADP in 1 ATP e 1 AMP. Questa reazione può contribuire fino al 15% del turnover dell'ATP durante brevi esercizi. Grazie a questa reazione, durante la prima fase di una intensa attività contrattile la concentrazione di AMP cresce e con essa si crea anche un accumulo di IMP, che deriva dall'AMP per deaminazione (108). L'attività dell'enzima AMP-deamminasi (AMPD), che catalizza la conversione di AMP in IMP, è maggiore nelle fibre veloci glicolitiche, a causa della presenza di più isoforme specifiche per i vari tipi di

fibre (83).

LA RIGENERAZIONE DI ATP ATTRAVERSO LA GLICOLISI:

Esiste una grande diversità tra i vari tipi di fibre muscolari per quanto riguarda la potenza e la capacità della rigenerazione di ATP attraverso il metabolismo glicolitico e ossidativo. La glicolisi anaerobica è la via catabolica dal glucosio al piruvato associata con la rigenerazione di 2-3 moli di ATP per ogni mole di glucosio. Questo zucchero deriva sia dal suo trasporto transmembrana (maggiore nelle fibre lente) sia delle scorte di glicogeno intracellulari. La demolizione del glucosio è attivata dall'aumento delle concentrazioni di AMP e IMP che seguono l'inizio dell'attività contrattile. Nei muscoli umani è stata documentata una pronunciata differenza nell'attività glicolitica tra fibre lente e veloci durante contrazioni massimali: 0,35 e 0,52 mM/s nelle fibre di tipo 1 e tipo 2, rispettivamente (136). La maggiore attività glicolitica nelle fibre veloci rispetto a quelle lente è dovuta in parte ad un contenuto maggiore di fosforilasi e in parte ad una più efficace stimolazione indotta dall'accumulo di AMP e IMP, più rapido nelle fibre veloci. Anche i modelli di deplezione del glicogeno durante attività contrattile sono dipendenti dal tipo di fibra, anche se è la sequenza di reclutamento delle unità motorie il vero determinante. Nell'uomo infatti, il glicogeno decresce prima nelle fibre di tipo 1 e 2A e solo successivamente nelle fibre di tipo 2X (135). Successivamente alla deplezione avviene la risintesi di glicogeno e il recupero completo dopo un esercizio ad alta intensità può richiedere anche 24 h, di cui la parte iniziale (prime 3-5 h) è più rapida nelle fibre lente.

La fosfofrutto-chinasi (PFK) è l'enzima che limita la velocità con cui avviene la glicolisi. Nei muscoli scheletrici dei mammiferi solo l'isoforma muscolare specifica PFK-M è presente. L'attività della PFK è maggiore nelle fibre veloci glicolitiche (123). Bisogna aggiungere però che tutti gli enzimi impiegati nella

via metabolica della glicolisi, incluso LDH, presentano un'attività maggiore (fino a 9-10 volte) nelle fibre veloci rispetto a quelle lente. Le fibre veloci raggiungono una più elevata potenza glicolitica, sono in grado quindi di sintetizzare ATP per via glicolitica con una velocità maggiore rispetto alle lente, e questo è dovuto non solo ai più elevati livelli di enzimi glicolitici, ma anche alla presenza di tre meccanismi addizionali essenziali per garantire un efficiente flusso glicolitico. L'attività dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH) e della glicerolo-3-fosfato deidrogenasi (GPDH) permettono la rapida ossidazione dei NADH prodotti dalla glicolisi. In aggiunta, i muscoli veloci hanno livelli più elevati di fosfofruttochinasi/fruttosiofosfatasi 3 (Pfkfb3), un enzima responsabile della generazione di fruttosio-2,6-bifosfato, un potente attivatore della PFK e quindi della glicolisi (64).

La differente distribuzione di glicerolo-3-fosfato deidrogenasi (GPDH), che è più abbondante nei muscoli veloci, può essere considerato un marker del metabolismo glicolitico. La specifica attività del GPDH è fortemente correlata con quella degli altri enzimi glicolitici. Colorazioni istochimiche mostrano un modello di espressione di questo enzima di questo tipo: 2B>2X>2A>1 (59).

Il prodotto finale della glicolisi è il piruvato (o acido piruvico), che può essere convertito in lattato grazie all'enzima lattato deidrogenasi (LDH). Forme alternative di geni di questo enzima concorrono a creare 5 isoenzimi: LDH-1, LDH-2, LDH-3, LDH-4 e LDH-5. La distribuzione di questi varia in accordo al tipo di fibra, con le fibre di tipo 1 che presentano una predominanza per gli isoenzimi LDH-1, -2 e -3, mentre la maggior parte (80%) delle fibre di tipo 2 contiene solo LDH-5. Circa il 20% delle fibre veloci contiene, oltre alla LDH-5, una piccola quantità di LDH-4 e -3.

Questa distribuzione dei vari isoenzimi nelle fibre permette di ottimizzare i processi di conversione del piruvato in lattato nelle fibre veloci, e di lattato in piruvato nelle fibre lente.

Il potere glicolitico, ovvero la quantità di ATP rigenerata nel tempo dai processi glicolitici, nei muscoli umani in vivo, è 2,5 mM/s nelle fibre veloci e 1,2 mM/s nelle fibre muscolari lente durante attività contrattili corte e intense (56).

	Fibre VELOCI	Fibre LENTE
Attività glicolitica massima	~0,52mM glucosio/s	~0,35mM glucosio/s
Attività della PFK fosfofruttochinasi	Maggiore rispetto alle lente	Minore rispetto alle veloci
Potere Glicolitico	2,5mM ATP/s	1,2mM ATP/s

(tabella 3)

LA RIGENERAZIONE MITOCONDRIALE DI ATP:

La risintesi di ATP attraverso la fosforilazione ossidativa mitocondriale utilizza l'acetil-CoA derivato del piruvato generato dalla attività della PDH (fosfato deidrogenasi) o dagli acidi grassi attraverso la β -ossidazione e permette di risintetizzare 18 ATP per ogni acetato con un consumo di ossigeno nel rapporto di P/O di 2,6. Il contributo della β -ossidazione degli acidi grassi al ciclo di krebs (TCA) è maggiore nelle fibre lente rispetto a quelle veloci. Infatti le fibre di tipo 1 hanno una maggiore disponibilità e utilizzazione di acidi grassi rispetto alle fibre di tipo 2. Come già menzionato, il volume mitocondriale varia nei differenti tipi di fibre muscolari; non è una sorpresa quindi il fatto che le attività degli enzimi presenti a livello mitocondriale misurate nelle singole fibre, sia istochimicamente sia microchimicamente, siano differenti (65). Le fibre lente e veloci mostrano una diversità marcata per quanto riguarda il consumo

di ossigeno se stimulate massimamente con ADP. Studi recenti hanno riscontrato una differenza nella regolazione dell'attività mitocondriale tra fibre lente e veloci, in cui le fibre lente presentano una maggiore K^m di fosforilazione ossidativa con ADP rispetto alle veloci. In altre parole, le fibre di tipo 1 sono in grado di consumare più ossigeno a parità di ADP presente rispetto alle veloci, e sono quindi più responsive, più sensibili alla concentrazione di ADP. L'area % relativa alle fibre di tipo 1 è direttamente proporzionale all'incremento della frequenza respiratoria e indirettamente proporzionale all'indice di sensibilità delle stessa all'ADP (57).

Il consumo di ossigeno durante contrazione aumenta sia nei muscoli veloci sia in quelli lenti: per esempio, nel ratto contrazioni ripetute (2 min a 1Hz) in vivo causano un aumento da 22 a 141 ml O_2 /kg/min nel soleo e da 10 a 72 ml O_2 /kg/min nel muscolo veloce peroneo (81). Questi valori sono comparabili con quelli osservati nei muscoli umani: il consumo di ossigeno aumenta da 0,006 mM/s a riposo a 0,132 mM/s durante contrazioni intense, eventualmente raggiungendo un valore massimo di 0,26 mM/s (15).

	Fibre VELOCI	Fibre LENTE
Aumento consumo di ossigeno durante esercizio (uomo)	0,007→0,050mM O_2 /s	0,016→0,104mM O_2 /s

(Tabella 4)

Per quanto riguarda il ciclo di Krebs, essendo in grado di generare 18 moli di ATP per mole di acetato, massimamente stimolato in condizioni fisiologiche, è in grado di produrre 1,37 mM ATP/s, in una muscolo misto umano. È importante sottolineare che, nelle fibre muscolari lente umane, il consumo totale di ATP è di 1,2 o 1,7 mM/s, e può essere completamente ricoperto della

rigenerazione di ATP. Questo invece non può avvenire nelle fibre veloci dove il consumo di ATP è molto maggiore.

Studi in vivo attraverso spettrometria e spettroscopia, sorprendentemente hanno rivelato che l'accoppiamento tra ossidazione e fosforilazione è maggiore delle fibre veloci ($P/O=2,7$) rispetto alle lente ($P/O=2,0$). Una ulteriore differenza tra le fibre lente e quelle veloci è la cosiddetta “inerzia metabolica”, ovvero il ritardo temporale nell'attivazione della rigenerazione mitocondriale di ATP durante un'attività contrattile sostenuta. In un classico studio Bangsbo et al. (8) mostrarono che in muscoli scheletrici umani sani l'idrolisi della PCr e la glicolisi provvedono all'80% del totale di ATP rigenerata durante gli iniziali 30 s di esercizio ad alta intensità, il 45% durante i successivi 60-90 s, e circa il 30% dopo 120 s di esercizio. La diminuzione della rigenerazione anaerobica di ATP è coperta da un parallelo incremento della rigenerazione aerobica. Questo è dovuto a diversi fattori tra cui le differenti quantità e cinetiche di utilizzazione di ossigeno, il fatto che l'attivazione della respirazione mitocondriale richieda un tempo sufficiente affinché le quantità di ADP e creatina siano sufficienti, e il fatto che questa attivazione, dipendente da questi due “prodotti di scarto” dei processi anaerobici, è differente in fibre di tipo diverso.

7. LE BASI STRUTTURALI DELLA DIVERSITÀ METABOLICA DELLE FIBRE MUSCOLARI:

Le fibre muscolari adattano la loro grandezza o il loro spessore, la loro struttura interna e le loro caratteristiche extracellulari alle loro attività metaboliche.

DIAMETRO DELLA FIBRA:

Lo spessore della fibra è in generale inversamente proporzionale all'attività aerobica ossidativa o alla densità mitocondriale. Nel muscolo gastrocnemio di ratto è presente una relazione inversa tra l'attività dell'enzima SDH (indicazione della densità mitocondriale) e il diametro della fibra muscolare, e una correlazione positiva tra α -glicerofosfato deidrogenasi (GPD, indicatore dell'attività glicolitica) e la grandezza della fibra (101). Questa relazione inversa è presente in ogni muscolo, ma lo stesso tipo di fibra con identiche proprietà metaboliche può avere grandezza differente in muscoli differenti. Per esempio, le fibre muscolari lente del muscolo soleo di ratto sono più grandi rispetto alle fibre lente presenti nei muscoli veloci di ratto. In generale comunque nella maggior parte dei muscoli dell'uomo, ad eccezione dei muscoli che serrano la mandibola, le fibre di tipo 2 hanno un diametro maggiore rispetto alle fibre di tipo 1 (110).

DENSITÀ CAPILLARE:

Il numero di vasi capillari che circondano una fibra muscolare è maggiore nelle fibre lente rispetto a quelle veloci. Per esempio, nei muscoli di ratto la ragione di capillari per fibra è di 2.85 nel soleo (muscolo lento) e 1.46 nei peronei (muscolo veloce) (12), e il numero di capillari per fibra perfusi a riposo è di 0.98 nel soleo e 0.66 nella parte superficiale veloce del muscolo tibiale anteriore. Nei muscoli umani, la ragione di capillari per fibra è di 4.92 per fibre lente, 4.52 per fibre di tipo 2A, e 3.52 per quelle 2X (5). Il flusso sanguigno in arrivo al muscolo aumenta diverse volte durante esercizio e sembra che le arteriole dei muscoli composti prevalentemente da fibre lente siano più propense alla vasodilatazione rispetto alle arteriole dei muscoli composti prevalentemente da fibre veloci.

STRUTTURA E VOLUME MITOCONDRIALE:

Il contenuto mitocondriale varia significativamente in relazione al tipo di fibra muscolare considerato. In fibre muscolari umane, il volume mitocondriale varia da un 6% nelle fibre di tipo 1 ad un 4,5% nelle fibre di tipo 2A e un 2,3% nelle fibre 2X (66). Oltre che per la loro densità, i mitocondri delle fibre lente e veloci differiscono anche nella loro struttura interna e nella loro attività enzimatica. Nel coniglio, le attività degli enzimi del ciclo di Krebs sono approssimativamente due volte maggiori e la catena di trasporto degli elettroni possiede una capacità due volte maggiore nei mitocondri di muscoli lenti rispetto a quelli di muscoli veloci (70). Esistono, in generale, due distinte sottopopolazioni di mitocondri nelle fibre muscolari con differenti localizzazione, morfologia e proprietà biochimiche (66). I mitocondri localizzati in prossimità del sarcolemma mostrano una forma larga e a lamelle, mentre i mitocondri che si trovano a livello miofibrillare sono più piccoli, più compatti e localizzati tra le miofibrille in prossimità delle triadi dove il calcio è rilasciato dal reticolo. Nei muscoli di ratto, i mitocondri prossimi al sarcolemma sono più abbondanti nelle fibre ossidative (tipo 1 e 2A) rispetto a quelle veloci glicolitiche e sono più sensibili a variazioni di attività, come disuso e allenamento, e ai livelli di ormoni tiroidei rispetto ai mitocondri intermiofibrillari.

SCORTE DI GLICOGENO E LIPIDI:

Scorte di glicogeno e lipidi sono utilizzate come substrato per la produzione di energia e sono presenti in tutti i tipi di fibre. Il contenuto di glicogeno a riposo è maggiore nelle fibre veloci, per la precisione, di un valore compreso tra il 16 e il 31% (56), rispetto alle fibre lente. Durante esercizio, la concentrazione di glicogeno cala prima nelle fibre lente e successivamente nelle fibre veloci; questo probabilmente riflette il progressivo reclutamento di unità motorie da

lente a veloci (135). Il contenuto di lipidi invece è maggiore nelle fibre lente rispetto a quelle veloci: nei muscoli umani, la concentrazione di trigliceridi è di 7 mM nelle lente e 4,2 mM nelle veloci, e le goccioline lipidiche rappresentano lo 0,5% del volume della fibra nelle lente tipo 1 e una quantità <0,1% nelle fibre veloci 2X (66).

8. IL TRASPORTO DI SUBSTRATI TRANS-MEMBRANA:

Dato che le scorte di substrati intracellulari possono supportare la rigenerazione di una piccola quantità di ATP, il metabolismo energetico delle fibre muscolari dipende grandemente dal trasporto di substrati trans-membrana. Secondo i dati disponibili, le fibre lente sarebbero equipaggiate con una maggiore quantità di meccanismi di trasporto del lattato, del glucosio e degli acidi grassi. In particolare la quantità di lattato e di glucosio in entrata è circa due volte maggiore e il trasporto di acidi grassi è tre volte maggiore nei muscoli rossi rispetto ai muscoli bianchi. In generale quindi, le fibre rosse ossidative ricevono un rifornimento di substrati che è due volte maggiore rispetto alle fibre bianche glicolitiche.

TRASPORTO DI LATTATO:

Sia in condizione di riposo sia durante esercizio, il muscolo scheletrico è il principale sito dell'ossidazione del lattato e della sua produzione. Secondo l'ipotesi del trasporto di lattato da cellula a cellula, le fibre veloci glicolitiche producono e rilasciano il lattato che è assorbito e ossidato dalle fibre lente ossidative (21). Il lattato rilasciato dalle fibre veloci glicolitiche può quindi essere utilizzato dalle fibre lente ossidative nello stesso muscolo in cui è stato prodotto o può essere trasportato attraverso la circolazione sanguigna agli altri

muscoli o al fegato dove il lattato viene convertito in piruvato e successivamente in glucosio attraverso la gluconeogenesi. È più controversa invece l'ipotesi di trasporto del lattato intracellulare (21), secondo cui il lattato è direttamente trasportato dal citosol ai mitocondri della stessa fibra muscolare e convertito in piruvato e ossidato (107). Il lattato è trasportato attraverso il sarcolemma da un meccanismo di cotrasporto lattato/H⁺ la cui capacità è maggiore nei muscoli rossi di ratto rispetto a quelli bianchi; questa differenza è associata ad un tasso massimo di trasporto più alto nei muscoli rossi. Questa diversità è probabilmente dovuta ad una quantità di trasportatori differenti e alla presenza di isoforme specifiche. Il trasporto del lattato è mediato dai trasportatori di acido monocarbossilico (MCT) che esistono in diverse isoforme. Nei muscoli scheletrici umani, l'espressione di MCT1 è maggiore nelle fibre lente, minore nelle fibre 2A e pressochè assente nelle 2X. Al contrario, l'espressione dell'isoforma MCT4 è minore nelle fibre di tipo 1, maggiore nelle fibre 2A e 2X; l'espressione dell'isoforma MCT2 è ristretta ad un numero limitato di fibre lente, in cui è presente in un range che varia da <5% al 40%, a seconda dello specifico muscolo considerato (43).

Secondo alcuni studi le isoforme di MCT sarebbero presenti anche a livello intracellulare e in particolare sulla membrana mitocondriale e questo supporterebbe l'ipotesi del trasporto di lattato intracellulare. Dal punto di vista metabolico, la differente localizzazione e la relativa quantità delle isoforme di MCT contribuisce al trasporto di lattato da cellula a cellula. Il lattato prodotto nelle fibre veloci con una elevata attività glicolitica può essere rilasciato via MCT4 e passare nelle fibre ossidative attraverso i trasportatori MCT1 del sarcolemma.

IL TRASPORTO DI GLUCOSIO:

Il glucosio è il maggiore substrato per la produzione di energia nel muscolo

scheletrico. Per questa ragione, il muscolo scheletrico gioca un ruolo attivo nella regolazione della concentrazione di glucosio nel plasma. Il trasporto facilitato del glucosio attraverso la membrana plasmatica delle fibre muscolari scheletriche dei mammiferi è catalizzata da una famiglia di proteine trasportatrici del glucosio, chiamate GLUT. Mentre il trasportatore GLUT4 insulino-dipendente è sempre espresso nei muscoli scheletrici dall'età fetale a quella adulta, i GLUT1 e GLUT3, riscontrati nei muscoli fetali, scompaiono alla nascita (52). Recentemente, è stata dimostrata l'espressione dell'isoforma GLUT1 nelle fibre di tipo 1, prevalentemente associata a strutture intracellulari e non solo al sarcolemma. Nei roditori, la capacità di assorbimento del glucosio è maggiore nelle fibre di tipo 1 e 2A rispetto alle fibre 2X. Studi su singole fibre nel coniglio hanno mostrato che l'espressione di GLUT4 è maggiore nelle fibre di tipo 1 e 2A.

Tuttavia questa differenza tra le fibre di tipo 1 e tipo 2 nell'uomo per quanto riguarda l'assorbimento di glucosio è meno marcata (36).

IL TRASPORTO DI ACIDI GRASSI:

Gli acidi grassi penetrano nel sarcolemma grazie ad un trasporto proteina-mediato che coesiste con il meccanismo di diffusione passiva. Secondo analisi basate sul confronto di muscoli rossi e muscoli bianchi nel ratto, il trasporto di acido palmitico risulta essere circa due o tre volte superiore nei muscoli rossi rispetto ai muscoli bianchi, e a questo si accompagna una maggiore quantità di proteine di membrana trasportatrici FAT/CD36 (fatty acid translocase). Questo porta a pensare ad un incremento dell'assorbimento degli acidi grassi e della loro ossidazione nei muscoli scheletrici durante esercizio (16). Per di più l'esercizio fisico porta ad un incremento dell'assorbimento di acidi grassi e della loro utilizzazione. Due lipasi contribuiscono a rendere gli acidi grassi disponibili come substrato: la lipasi lipoproteica endoteliale (LPL) che agisce

sulle lipoproteine circolanti, e la lipasi ormone-sensibile sarcoplasmatica (HSL) che agisce sui lipidi intracellulari. Entrambi questi enzimi mostrano una distribuzione dipendente dal tipo di fibra, essendo maggiormente espresse nelle fibre lente-ossidative rispetto a quelle veloci-glicolitiche. In accordo con la distribuzione già osservata per le fibre di ratto, nell'uomo la proteina trasportatrice FAT/CD36 è più abbondante nel sarcolemma delle fibre di tipo 1, e meno abbondante in quello delle fibre di tipo 2 (73).

MIOGLOBINA E TRASPORTO DI OSSIGENO:

Grandi quantità di ossigeno sono richieste dai mitocondri durante attività contrattili sostenute. L'ossigeno viene assorbito dalla fibra attraverso semplice diffusione grazie al gradiente di pressione parziale o attraverso la diffusione facilitata dalla mioglobina. Questa proteina è in grado di legare ossigeno grazie alla presenza di un gruppo eme contenente lo ione ferro nella sua struttura ed è importante anche ai fini della sua diffusione. In molti animali, tra cui ratto, maiale, coniglio e gatto, i livelli di mioglobina sono più elevati nei muscoli rossi, dove il contenuto di fibre di tipo 1 e 2A è predominante, e veramente bassi nei muscoli bianchi, dove sono predominanti fibre di tipo 2X e 2B. L'espressione di mioglobina segue il seguente schema: $1 > 2A > 2X > 2B$ (dove è virtualmente assente) (88). Nei muscoli umani tuttavia, il contenuto di mioglobina nei muscoli umani non differisce grandemente tra i tipi di fibre, con le fibre ossidative che contengono circa il 50% di mioglobina in più rispetto a quelle glicolitiche.

LE TRANSIZIONI DEI TIPI DI FIBRE MUSCOLARI

La transizione di un tipo di fibra muscolare è la trasformazione della fibra da un tipo ad un altro. Questo è possibile poiché la fibra muscolare non è un universo rigido che non ammette mutamento, ma al contrario è una struttura dinamica in grado di mutare il proprio fenotipo a seconda della condizione in cui si trova.

In generale, possiamo semplificare dicendo che il muscolo ha delle grandi capacità adattive e risponde ai molteplici stimoli interni ed esterni che lo raggiungono in tre modi: 1. modificando il diametro delle proprie fibre muscolari, 2. modificando le proprie caratteristiche metaboliche e 3. modificando il tipo di fibre muscolari presenti nello stesso. Queste modificazioni sono correlate poi a cambiamenti di forza prodotta e di resistenza alla fatica del muscolo. L'ipertrofia e l'atrofia muscolare sono le situazioni che vengono utilizzate come esempi della modificazione del diametro delle fibre. L'argomento di questo capitolo però è l'abilità che il muscolo ha di rispondere a determinati stimoli che lo raggiungono per andare incontro ad una transizione del tipo di fibra che li porti, in futuro, a tollerarli meglio. Questi stimoli derivano da situazioni che precedentemente erano stabili che ora mutano; il muscolo quindi, sottoposto ad una situazione mutata, deve necessariamente trasformarsi per adattarsi al meglio alla nuova situazione venutasi a creare. Le transizioni dei tipi di fibre muscolari avvengono quindi grazie a particolari stimoli che sono in grado di alterare l'espressione genica della cellula muscolare e che, secondo diversi studi, sono i seguenti: 1. attività neuromuscolare alterata, 2. profili ormonali alterati, 3. carico meccanico aumentato o diminuito, 4. età.

Avendo ben presente quali siano i quattro principali tipi di fibre, gli studi scientifici hanno condotto, negli anni, a questo schema generale delle

transizioni: 1↔2A↔2X↔2B.

A seconda degli stimoli pervenuti al muscolo, la fibra muscolare modificherà la sua struttura secondo una transizione FAST→SLOW oppure SLOW→FAST, quindi lo schema generale esposto sopra, indipendentemente dal tipo di fibra di partenza, verrà utilizzato rispettivamente da destra a sinistra o da sinistra a destra secondo i due modelli di transizione appena esposti.

Le modificazioni che vengono ritenute più importanti e prese in considerazione maggiormente in una fibra in transizione sono le modificazioni delle catene pesanti di miosina MHC, che dimostrano l'avvenuta trasformazione strutturale della materia contrattile; pur tenendo presente che una fibra in transizione è in grado di modificare ogni suo aspetto per adattarsi al meglio alla nuova situazione venutasi a creare. In muscoli le cui fibre sono in transizione aumenta la percentuale di quelle fibre che possiedono due diverse MHC nella loro struttura e che vengono chiamate fibre ibride (1C, 2C, 2AX, 2XA, 2XB, 2BX).

Avendo chiaro questo schema generale, passiamo ora ad esaminare nel dettaglio i differenti stimoli sopra citati e le modificazioni, in riferimento al tipo di fibra, a cui sono in grado di portare.

1. MODELLI GENERALI DI TRANSIZIONE:

ATTIVITÀ NEUROMUSCOLARE MUTATA:

La singola fibra muscolare è innervata, insieme ad altre fibre dello stesso tipo, dallo stesso motoneurone a formare una unità motoria. Da qui risulta di facile comprensione il fatto che la fibra muscolare è fortemente condizionata dal tipo di innervazione e quindi dal tipo di modello di scarica che le è associato. L'impatto del tipo di innervazione nello stabilire e nel mantenere un particolare fenotipo di fibra muscolare è infatti stato dimostrato da numerosi studi. Uno

dei primi studiosi che dimostrò scientificamente questa affermazione fu Buller nel 1960. Egli portò a termine uno dei primi esperimenti di Cross-reinnervation (reinnervazione incrociata), un esperimento in cui, prima denervando muscoli veloci e lenti e successivamente reinnervando i veloci con nervi lenti e i lenti con nervi veloci, si andavano a valutare a quali modificazioni questi muscoli andassero incontro. Egli fu quindi in grado di dimostrare che muscoli veloci diventavano lenti se reinnervati con nervi lenti e muscoli lenti diventavano veloci se reinnervati con nervi veloci (23). I cambiamenti nel fenotipo delle fibre in seguito a reinnervazione crociata è dovuto principalmente ai due modelli di impulsi neurali che i nervi veloci e lenti hanno e che sono molto diversi tra loro. Lo step successivo fu capire che anche con particolari protocolli di elettrostimolazione muscolare era possibile raggiungere il medesimo risultato raggiunto con la cross-reinnervation, ovvero profonde modificazioni fenotipiche delle fibre muscolari (91,93). Sono nati quindi due protocolli di elettrostimolazione in accordo con i parametri di frequenza di scarica del motoneurone veloce e lento:

CLFS→"Chronic low frequency stimulation"

che mima la bassa frequenza di scarica tonica di solito riscontrata in una unità motoria lenta.

PHFS→"Phasic high frequency stimulation"

che mima l'alta frequenza fasica di solito riscontrata in una unità motoria veloce.

Dall'attuazione di questi protocolli di elettrostimolazione si è riscontrato che il CLFS, tra i due, induce i maggiori cambiamenti nell'espressione della miosina e che quindi è in grado di trasformare isoforme di miosina veloci in forme via via sempre più lente (seguendo sempre lo schema generale presentato precedentemente). Molti degli studi di questo genere hanno utilizzato il muscolo estensore lungo delle dita (EDL) e/o il muscolo tibiale anteriore di

piccoli mammiferi. Bisogna sottolineare che esistono differenze inter- e intra-specie ma comunque con il protocollo di stimolazione CLFS si verifica sempre una transizione FAST→SLOW di questi muscoli. Nei ratti, mentre inizialmente la composizione del muscolo estensore delle dita (EDL) era pressochè completamente costituita da fibre con catene pesanti di miosina del tipo MHC-2b, dopo l'attuazione del protocollo si riscontrava una diminuzione percentuale delle isoforme di miosina di tipo MHC-2b e la comparsa prima e il successivo aumento percentuale delle isoforme di tipo MHC-2x e successivamente 2a. Nei conigli invece, il protocollo sullo stesso muscolo ha prodotto lo spostamento dalle fibre di partenza con MHC-2b veloci, a fibre con MHC-2x e 2a, fino anche alla ulteriore trasformazione di queste ultime in MHC-1 lenta. (94). Questo step finale di trasformazione da MHC-2a ad MHC-1 è molto difficile da ottenere nel ratto e avviene solo dopo lunghi periodi di stimolazione. Nei grandi mammiferi come i conigli, quindi può avvenire la transizione FAST→SLOW in maniera completa mentre sembra che nei ratti e nei topi, a seguito della medesima quantità e tipologia di stimolazione (CLFS) sui medesimi muscoli, ciò non possa avvenire. Risulta comunque evidente che il range adattivo di fibre differenti dipende dalla loro posizione iniziale nello schema generale. Si può anche affermare che ogni muscolo ha un suo “range di adattamento” delle possibili transizioni in risposta a differenti protocolli di elettrostimolazione (78). I muscoli veloci hanno la capacità di adattarsi maggiormente nel range delle possibili isoforme di miosina veloci:

MHC-2b↔MHC-2x↔MHC2a

mentre in quelli lenti può avvenire anche il passaggio da isoforma veloce a lenta:

MHC-2x↔MHC2a↔MHC-1

L'estensione della transizione dipende anche dalla durata dell'elettrostimolazione (71). Esiste quindi una relazione dose somministrata-

effetto. Un protocollo di due mesi di stimolazione a bassa frequenza su alcuni muscoli veloci di ratto non ha portato ad una espressione di MHC-1 apprezzabile negli stessi muscoli, ma una trasformazione apprezzabile delle stesse fibre fu riscontrato dopo 4 mesi utilizzando lo stesso tipo di stimolazione.

Per sintetizzare quindi, la velocità e l'entità delle trasformazioni che investono un particolare tipo di fibra in un particolare muscolo con uno specifico protocollo di elettrostimolazione dipende dal tempo in cui il muscolo è elettrostimolato e dal tipo di muscolo che sto studiando, oltre che dalla specie animale presa in considerazione.

La stimolazione CLFS non influisce solo sulla miosina presente nelle fibre ma su tutti gli elementi funzionali delle stesse, e provoca oltretutto lo spostamento, dalle isoforme veloci a quelle lente, di altre proteine miofibrillari come la troponina e la tropomiosina, l' α -actinina, varie proteine del reticolo sarcoplasmatico, sistemi di regolazione del calcio citosolico, enzimi, proteine di membrana recettoriali; variano in positivo anche la quantità di glucosio e acidi grassi, il rifornimento di ossigeno e alimenti, la rimozione di metaboliti e anidride carbonica. Si riscontra anche un aumento della densità capillare e mitocondriale, oltre che un aumento del contenuto di mioglobina.

Il protocollo di stimolazione PHFS invece, al contrario, sembra essere in grado di trasformare fibre contenenti alti quantità MHC-1 lente dal muscolo soleo, di ratto, in fibre veloci inducendo la comparsa di una buona quantità di fibre di MHC-2x e addirittura di MHC-2b (non nell'uomo) (54).

Tuttavia la transizione SLOW→FAST che viene permessa da questo protocollo di elettrostimolazione, a differenza di quello che avveniva con la transizione inversa e il protocollo CLFS, risulta incompleta. Infatti, anche dopo lunghi periodi di stimolazione, non avviene una completa trasformazione di tutte le fibre e permane una significativa quantità di isoforme di miosina lente.

PROFILI ORMONALI ALTERATI:

Molti ormoni del nostro corpo hanno una profonda influenza sulla composizione dei nostri muscoli per quanto riguarda il tipo di fibre muscolari.

Per esempio il testosterone si è dimostrato avere un effetto a dir poco significativo sulla composizione del muscolo temporale del maiale. È stato dimostrato che differenze del livello di ormoni, specialmente di testosterone, determinano le differenze legate al genere per quanto riguarda il diametro e il tipo di fibre muscolari tra individui maschili e femminili. Mentre inizialmente fino ai 15 anni circa maschi e femmine hanno fibre muscolari molto simili, da quella età in poi cominciano a riconoscersi le prime differenze legate al sesso. Infatti dopo la pubertà, la sezione trasversa media delle fibre di un muscolo è minore nelle femmine rispetto che nei maschi. In più nei muscoli maschili, le fibre di tipo 2 tendono ad avere un diametro maggiore rispetto alle fibre di tipo 1, mentre nelle femmine succede l'inverso. Quindi il deficit per quanto riguarda la sezione muscolare dei muscoli in individui femminili di un 30-40% rispetto ad individui maschili è dovuto sia al fatto che le fibre sono presenti in numero totale minore, sia al fatto che queste sono più piccole. Questo avviene poichè mentre nella femmina la quantità di testosterone prodotto rimane molto bassa, nel maschio, a partire dalla pubertà circa, cresce grandemente e, tra tutte le modificazioni fisiologiche che porta all'organismo maschile, ha delle ripercussioni anche sulle fibre muscolari (92).

Di tutti gli ormoni, gli ormoni tiroidei sembrano avere il maggiore effetto sul fenotipo delle fibre muscolari. In generale, è stato dimostrato che la condizione di ipotiroidismo, in cui sono ridotti i livelli di ormoni tiroidei, causa uno spostamento dell'espressione delle isoforme di catena pesante di miosina MHC da veloce a lento, provocando quindi una transizione FAST→SLOW della fibra muscolare (46). Mentre, al contrario, una condizione di ipertiroidismo, in cui sono aumentati i livelli di ormoni tiroidei, porta ad uno

spostamento delle isoforme MHC da lente a veloci e quindi una transizione SLOW→FAST della fibra (27).

I cambiamenti dello stato tiroideo all'interno dell'organismo, associati ai protocolli di elettrostimolazione precedentemente presentati, sono in grado di espandere i range di adattamento delle singole fibre muscolari o comunque di velocizzare gli effetti di spostamento che l'elettrostimolazione possiede. Oltre al loro impatto sul fenotipo delle fibre muscolari adulte, gli ormoni tiroidei giocano un ruolo importante durante lo sviluppo e la maturazione muscolare. Bassi livelli di questi ormoni inibiscono o ritardano lo spostamento delle MHC veloci adulte da quelle di sviluppo, mentre elevati livelli accelerano lo spostamento da isoforme MHC di sviluppo a quelle riscontrabili nell'adulto.

CARICO MECCANICO AUMENTATO E SCARICO MECCANICO:

Secondo i numerosi studi, qualsiasi aumento del carico funzionale cui viene sottoposto il corpo comporta una transizione dei tipi di fibre presenti nei muscoli sovraccaricati qualitativamente simile a quella che si verifica a seguito di una elettrostimolazione CLFS, anche se quantitativamente inferiore. Un sovraccarico di allungamento o un sovraccarico meccanico causano sempre una transizione FAST→SLOW delle fibre muscolari sovraccaricate. Patullo nel 1992 condusse uno studio di questo genere (89) e arrivò alle medesime conclusioni: un sovraccarico di allungamento, prodotto dall'immobilizzazione di muscoli veloci in posizioni allungate, causa un incremento della frazione di fibre lente negli stessi. Anche Goldspink, negli stessi anni e in esperimenti del tutto simili, riscontrò sempre uno spostamento da MHC veloci a MHC lente nelle fibre muscolari dei muscoli sovraccaricati con allungamento.

Lo stesso risultato si riscontra con un aumento del carico meccanico e, in particolare, un sovraccarico funzionale dei muscoli scheletrici porta ad un aumento percentuale delle fibre lente e delle MHC-1 a livello dei muscoli

sovraccaricati.

Gli effetti dello scarico meccanico invece sono stati studiati tramite protocolli che prevedevano immobilizzazione in posizioni accorciate, microgravità e altro. I risultati di questi studi, che sembrano poco plausibili, sono invece stati più volte dimostrati nel corso degli anni. Sembra che un muscolo scaricato diventi più veloce; questo accade poiché diminuiscono di diametro e di numero le fibre di tipo 1 presenti in esso e di conseguenza diminuisce la concentrazione relativa di MHC-1, mentre aumenta quella di MHC-2a e MHC-2x (26).

ETÀ:

Secondo alcune autopsie eseguite sui muscoli scheletrici degli arti, i bambini dai 2 ai 5 anni di età possiedono una percentuale di fibre muscolari di tipo 1 significativamente più alta rispetto ai neonati o agli adulti. Infatti molti muscoli di neonati presentano circa un 40-45% di fibre di tipo 1, mentre i bambini dai 2 ai 5 anni di età ne contengono circa il 60%. Successivamente, dai 5 ai 20 anni, la percentuale di fibre di tipo 1 tende gradualmente a decrescere fino a stabilizzarsi su un valore di circa il 50% (40). Anche se la percentuale di fibre lente può essere ritenuta simile tra i neonati e gli adulti, il 10-17% delle fibre nei muscoli di neonato sono fibre ibride che contengono sia l'isoforma MHC-1 sia l'isoforma MHC-2a, mentre il contenuto di queste nell'adulto non supera il 5% (40). Tutti questi cambiamenti nella composizione delle fibre presenti nei muscoli avvengono, apparentemente, senza un cambiamento nel numero totale di fibre muscolari.

Per quanto riguarda invece gli effetti dell'invecchiamento sulle caratteristiche dei muscoli scheletrici, si può affermare che l'età causa una perdita della capacità funzionale, dovuta principalmente a una diminuzione della massa muscolare (sarcopenia) e del massimo consumo di ossigeno. Circa un terzo

della massa muscolare totale viene perso dai 30 agli 80 anni e questo è dovuto in primo luogo ad una perdita selettiva di fibre muscolari e ad un rimodellamento delle unità motorie rimaste (22). Alla settima decade di vita molti muscoli possiedono la metà del numero delle unità motorie e il 75% del numero totale di fibre in confronto agli stessi muscoli in giovani adulti. Oltre a questo tipo di modificazioni, l'invecchiamento potrebbe essere responsabile anche di una transizione FAST→SLOW della materia contrattile in esame. Secondo alcuni studi infatti, muscoli lenti e veloci sarebbero sottoposti a cambiamenti dovuti all'invecchiamento per quanto riguarda l'isoforma di MHC presente. Le fibre veloci dei muscoli di ratto infatti, presentano un decremento, apparentemente legato all'età, della concentrazione relativa di MHC-2b, con un concomitante aumento della MHC-2x, e potenzialmente anche delle MHC-2a e -1 (128).

Le cause di tutti questi cambiamenti non sono conosciute nel dettaglio, anche se processi degenerativi nel sistema nervoso centrale (con perdita selettiva di α -motoneuroni veloci) e/o del sistema nervoso periferico, come anche l'inattività e livelli di ormoni tiroidei alterati, sono tutti fattori in grado di portare ad una perdita dei motoneuroni veloci e delle fibre veloci. Un processo che è in grado di unire questi fattori con la perdita selettiva delle fibre muscolari è il cosiddetto “fiber type grouping” o raggruppamento del tipo di fibra. Sembra che la perdita selettiva di α -motoneuroni a livello del sistema nervoso centrale porti alla perdita del motoneurone periferico che costituisce, con le fibre da lui innervate, l'unità motoria; esse, a seguito della degenerazione che ha colpito il loro nervo periferico vengono denervate e, mentre alcune si atrofizzano e vengono poi perse, alcune sono reinnervate da un motoneurone lento. A seguito di ciò, queste fibre, che precedentemente presentavano un fenotipo veloce, sono ora innervate da un motoneurone le cui caratteristiche di scarica sono diverse rispetto ai motoneuroni veloci, e la fibra inizia un processo di

trasformazione fino ad adattare il proprio fenotipo al particolare motoneurone lento che ora le è stato associato. Questo si intende per raggruppamento, poiché alla perdita di motoneuroni veloci si associa un ingrandimento delle unità motorie lente che inglobano ora anche le fibre veloci denervate da motoneuroni veloci degenerati. E così infatti si presentano i muscoli delle persone anziane, una quantità di unità motorie totali molto inferiore, la maggior parte lente e molto grandi, quindi con un motoneurone che innerva un numero molto elevato di fibre in transizione. Queste teorie, confermate da una numero ormai crescente di studi, sottolineando la presenza di un grande numero (fino al 30%) di fibre ibride (in transizione) con un contenuto del 50% di MHC-2a e 50% MHC-1 (tipo C) (6).

Secondo gli studi di Lexell (1988), la perdita delle fibre muscolari inizierebbe già a partire dai 25 anni di età e accelera successivamente. Sembra comunque che l'esercizio fisico sia in grado di contrastare il processo di perdita di unità motorie e di mantenere la distribuzione dei tipi di fibre dei muscoli di persone anziane vicina a quella riscontrata nei giovani. In particolare sembra che con esso aumenti il trasporto di sostanze a livello assonale nei motoneuroni veloci, contrastando la degenerazione cui questi vanno necessariamente incontro all'aumentare dell'età.

2. ALLENAMENTO E ATTIVITÀ SPORTIVA: IL LORO IMPATTO SUI TIPI DI FIBRE MUSCOLARI

Come descritto precedentemente, qualsiasi incremento generico del carico funzionale cui viene sottoposto il corpo induce dei mutamenti a livello delle fibre muscolari sollecitate che si trasformano andando incontro ad una transizione FAST→SLOW. Questa affermazione risulta abbastanza generica e incompleta poiché non risponde alla seguente domanda: se pur è stato

dimostrato che un incremento generico del carico funzionale crea i suddetti adattamenti alla fibra muscolare, questi adattamenti si verificano sempre e comunque qualsiasi sia il tipo di sollecitazione funzionale cui viene sottoposto il corpo?

Esiste quindi una tipologia di carico funzionale capace di creare adattamenti diversi?

Per rispondere a queste domande, a partire dagli anni '70 circa, sono stati eseguiti diversi studi in cui il corpo umano veniva sottoposto a diverse tipologie di allenamento fisico, con lo scopo di verificare quali adattamenti venissero prodotti all'interno della fibra muscolare. I risultati di questi studi ci hanno permesso di appurare che le trasformazioni cui la fibra muscolare va incontro a seguito di un particolare allenamento coinvolgono tutti i compartimenti cellulari, e che il tempo richiesto per la trasformazione delle varie componenti è diverso (91). In generale si può affermare che le risposte adattive più rapide siano quelle metaboliche, mentre le modificazioni strutturali delle catene pesanti di miosina MHC richiedono un tempo considerevolmente maggiore.

Lo scopo di questo capitolo comunque è di focalizzarsi solo sulla transizione dei tipi di fibre muscolari a seguito di diversi protocolli di allenamento, con attenzione alle modificazioni delle catene pesanti della miosina (MHC).

Quando si parla di allenamento e tipi di fibre muscolari ci sono due variabili importanti da tenere in considerazione: 1. il tempo e 2. l'intensità dell'allenamento.

Come già detto, il tempo necessario perché si verifichi, a seguito di allenamento, una modificazione delle catene pesanti di miosina nelle fibre muscolari sollecitate è considerevolmente maggiore di quello che serve per produrre risposte adattive metaboliche. Diversi studi in cui il corpo veniva sottoposto a differenti tipologie di allenamento avevano una durata troppo

bassa per poter dare il via a spostamenti da un tipo di MHC ad un altro nelle fibre sollecitate, quindi lo studio non dava risultati apprezzabili e si riscontravano solo modificazioni a livello metabolico. Un tempo di somministrazione dell'allenamento in grado di creare modificazioni delle catene pesanti di miosina deve avere una durata di almeno di 3 mesi fino anche ad anni. Si può affermare quindi che esiste una relazione di proporzionalità diretta tra il tempo di somministrazione dell'allenamento e l'entità delle trasformazioni delle catene pesanti di miosina.

Il secondo parametro citato è ancora più importante del primo, in quanto l'intensità di allenamento determina la qualità delle trasformazioni delle MHC e quindi delle fibre muscolari. Diversi studi che sottoponevano la materia contrattile ad un allenamento di endurance di intensità modesta anche per prolungati periodi di tempo hanno riscontrato solo modificazioni di tipo metabolico, principalmente un aumento degli enzimi ossidativi, mentre le caratteristiche strutturali (MHC) delle fibre non variavano minimamente (110). Quindi si può affermare che un allenamento di modesta intensità crea solo modificazioni a livello metabolico.

Altri studi in cui venivano utilizzati protocolli di allenamento di endurance e di forza di intensità maggiore provocavano modificazioni dei tipi di fibre muscolari ma solo nel range delle fibre veloci ($2A \leftrightarrow 2X$ nell'uomo), senza determinare transizioni FAST→SLOW o viceversa (7).

Infine in alcuni studi in cui venivano utilizzati particolari protocolli di allenamento e in cui l'intensità dell'allenamento risultava sempre molto elevata, è stato dimostrato che l'allenamento è in grado di creare transizioni FAST→SLOW e viceversa (si rimanda alla tabella sottostante) (Howald et al. 1985).

	TEMPO DI SOMMINISTRAZIONE INSUFFICIENTE (< 3 MESI)	TEMPO DI SOMMINISTRAZIONE SUFFICIENTE (>3 MESI)
INTENSITÀ DELL'ESERCIZIO BASSA	Solo modificazioni di tipo metabolico	Solo modificazioni di tipo metabolico
INTENSITÀ DELL'ESERCIZIO ELEVATA	Solo modificazioni di tipo metabolico (o eventuali lievi modificazioni di MHC ma solo nel range delle fibre veloci)	Modificazioni metaboliche e modificazioni significative delle MHC dell fibre muscolari sollecitate

(Tabella 5)

Dai dati raccolti negli anni sullo studio dei differenti adattamenti della fibra muscolare a diversi protocolli di allenamento, sembra che un allenamento di resistenza (endurance training) di intensità sufficiente e somministrato per un tempo necessario a creare trasformazioni apprezzabili, sia in grado spostare la composizione percentuale delle isoforme di MHC verso quelle lente, creando quindi una transizione FAST→SLOW. In particolare attraverso protocolli di allenamento basati sulla corsa di lunga distanza e sul ciclismo, è stato dimostrato che avviene uno spostamento delle isoforme di MHC verso quelle più lente (tipo 1), per cui, nella maggior parte dei casi, diminuisce la percentuale sul totale delle fibre veloci 2X, aumenta quella delle fibre di tipo 1 e rimane invariata quella delle fibre di tipo 2A. Quindi si può desumere che la velocità di trasformazione 2X→2A e 2A→1 sia, se non uguale, molto simile.

Le fibre muscolari di tipo 1, avendo una maggiore densità mitocondriale e capillarizzazione oltre che maggiori livelli di mioglobina, hanno una grande capacità aerobica. Bergh et al. scoprì l'esistenza di una proporzionalità diretta tra il Vo₂max e la quantità di fibre muscolari di tipo 1 in 53 soggetti tra sollevatori di pesi e atleti di endurance (14). Oltre a ciò, è stata dimostrata una correlazione positiva tra la composizione di fibre lente nei muscoli di atleti ben allenati e le relative performance su distanze di 1, 2 e 6 miglia di corsa.

Quindi per gli sport in cui sono richieste capacità aerobiche e di endurance ottimali, una percentuale maggiore di fibre lente è vantaggiosa per il tipo di performance richiesta. Se gli atleti di endurance vogliono aumentare la percentuale delle loro fibre lente nei loro muscoli agonisti, dovrebbero utilizzare protocolli di allenamento (allenamento per la forza e per l'endurance) caratterizzati da un elevato volume e una bassa intensità o da elevato volume, elevata intensità ma intermittenti (interval training).

Per quanto riguarda invece la maggior parte degli allenamenti di forza (strength training), avviene una transizione FAST→SLOW che riguarda principalmente il range delle fibre veloci. Quindi, anche con metodi che utilizzano carichi massimali, la percentuale di fibre di tipo 2X sul totale diminuisce, mentre aumenta quella delle fibre veloci ossidative 2A. Non sembra invece modificata in maniera significativa la quantità di fibre lente di tipo 1. La trasformazione 2X→2A modifica le caratteristiche metaboliche delle fibre veloci rendendole più resistenti allo sforzo e quindi in grado di sostenere un numero più elevato di ripetizioni all'interno della serie. A questo viene aggiunto anche un aumento della forza massima dovuto ad una ipertrofia selettiva delle fibre 2A e/o 2X, a seconda dell'entità del carico somministrato. Un numero di ripetizioni basso (1-5) all'interno di una serie determinato dall'utilizzo di carichi massimali creerà ipertrofia selettiva delle fibre 2X, mentre un numero di ripetizioni più alto (6-12) e un carico intorno all'80% dell' 1RM,

crea ipertrofia selettiva delle fibre 2A che hanno una propensione maggiore all'ipertrofia e sono anche in numero più elevato. Questo spiega perché chi è interessato a massimizzare l'ipertrofia dei propri muscoli utilizza generalmente quest'ultimo range di carichi e ripetizioni. Al contrario a chi, come gli sportivi, interessa aumentare la propria forza massima, utilizzando carichi massimali creerà ipertrofia selettiva delle fibre di tipo 2X che, se pur hanno un diametro in generale maggiore delle fibre 2A, sono meno propense a ipertrofizzarsi e sono contenute in numero minore (visto anche la simultanea trasformazione 2X→2A); il risultato finale quindi sarà un muscolo la cui sezione trasversa totale risulta aumentata ma ancora simile a quella iniziale mentre la tensione che ora è in grado di esercitare risulta considerevolmente maggiore.

Per quanto riguarda protocolli di allenamento basati su sprint massimali (sprint training), sempre che abbiano una durata sufficiente, sembra avvenire una trasformazione bidirezionale per cui diminuisce la percentuale delle fibre di tipo 2X e 1 mentre aumenta quella delle fibre 2A. Quindi nello specifico avvengono contemporaneamente le trasformazioni 2X→2A e 1→2A. In questo modo, la quantità delle fibre lente di tipo 1 diminuisce mentre aumenta il numero totale di fibre veloci (2A+2X), e questo implica il verificarsi in generale di una transizione SLOW→FAST dei muscoli impiegati.

In questo modo i muscoli sollecitati diverranno più veloci per una diminuzione della percentuale di fibre lente sul totale.

TIPO DI ALLENAMENTO	TIPI DI FIBRE MUSCOLARI	ANDAMENTO GENERALE
Endurance training	Tipo 1 ↑ (aumento) Tipo 2A ↔ (costante) Tipo 2X ↓ (diminuzione)	Tipo 2X→Tipo 2A→ Tipo 1
Strenght training	Tipo 1 ↔ (costante) Tipo 2A ↑ (aumento) Tipo 2X ↓ (diminuzione)	Tipo 2X→Tipo 2A
Sprint training	Tipo 1 ↓ (diminuzione) Tipo 2A ↑ (aumento) Tipo 2X ↓ (diminuzione)	Tipo 2X→Tipo 2A← Tipo 1

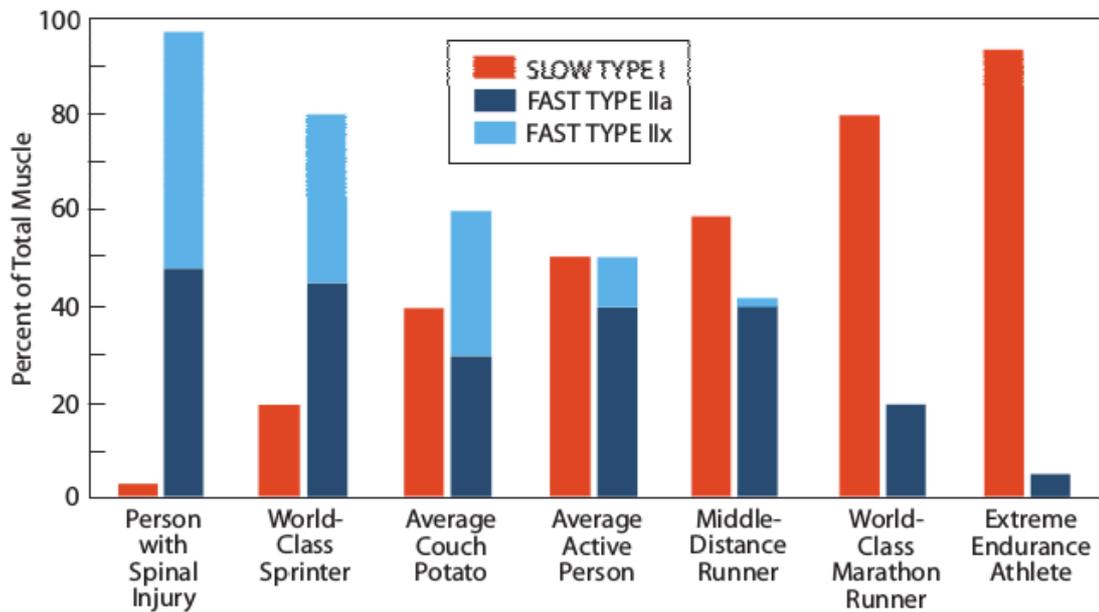
(Tabella 6)

Quanto appena esposto, lungi dell'essere considerato un sistema definitivo e perfetto di previsione dei risultati che un allenamento è in grado di produrre sulla materia contrattile, è solamente un insieme di affermazioni basate sui risultati di alcuni studi; questo significa che studi apparentemente simili possono dare risultati completamente diversi e in disaccordo con quanto esposto precedentemente e questo è dovuto alle numerose variabili non considerate che possono di volta in volta influire sul risultato finale degli stessi.

3. DIFFERENZE NELLA COMPOSIZIONE PERCENTUALE DEI TIPI DI FIBRE A SECONDA DELL'ATTIVITÀ SPORTIVA PRATICATA

Una grande quantità di ricerche è stata fatta negli anni allo scopo di scoprire il ruolo delle transizioni delle fibre muscolari nel determinare la performance sportiva. Per questo, una parte di esse ha analizzato la composizione dei tipi di fibre muscolari dei muscoli maggiormente impiegati in competizione da atleti di elite provenienti da diversi sport. Questi studi sono stati di primaria importanza poiché ci hanno permesso di costruire un quadro pressochè ordinato della composizione percentuale dei tipi di fibre in buona parte delle condizioni in cui è in grado di vivere un uomo (Figura 4.1). In tutti gli studi di seguito riportati la composizione dei tipi di fibre è stata verificata con metodiche di biopsia a livello del muscolo vasto laterale della coscia.

In un classico studio, Costill et al. (1976) verificò che nei muscoli di una persona normale, in salute, mediamente attiva, ma non praticante una particolare attività sportiva, la composizione percentuale tra fibre lente (tipo 1) e veloci (tipo 2A e 2X) è di circa 50/50% (35). Allo stesso modo, Andersen and Saltin hanno messo in evidenza che persone sane che conducono uno stile di vita sedentario (non attivo) possiedono una quantità di fibre veloci (2A e 2X) che è leggermente maggiore e si attesta a valori di circa il 60%. Un mezzofondista dell'atletica leggera di alto livello possiede, in percentuale, un rapporto fibre lente/veloci di circa 60/40 rispettivamente. La percentuale delle fibre lente sembra poi ancora maggiore se si prendono in considerazione atleti di alto livello in discipline prolungate come la maratona, il ciclismo su strada, lo sci di fondo, il nuoto di fondo, il triathlon, con percentuali di fibre lente che variano in un range dall'80 al 95% circa.



(Figura 4.1)

Al contrario atleti come gli sprinter dell'atletica leggera o i sollevatori di pesi hanno una quantità significativamente più elevata di fibre veloci (2A e 2X) con valori compresi tra il 60 e 80% (138,6).

Questi studi indicano quindi che atleti di sport che richiedono grandi qualità aerobiche e capacità di endurance possiedono una percentuale di fibre lente molto più elevata rispetto a quelle veloci (anche 90-95% sul totale delle fibre presenti nel muscolo), mentre al contrario atleti di sport che richiedono grandi capacità anaerobiche, forza e potenza (come i sollevatori di peso e gli sprinter) hanno una quantità molto elevata di fibre veloci rispetto alle lente (fino a 80% sul totale) (1).

Alcuni studi sono stati condotti anche su persone colpite da una lesione alla spina dorsale tale da rendere gli arti inferiori di queste persone totalmente paralizzati. Le biopsie muscolari eseguite sui muscoli di queste persone hanno mostrato, al contrario di quello che si potrebbe pensare, valori elevatissimi di fibre veloci, fino a percentuali del 95-100% (6). Nel 1990 Geoffrey Goldspink

suggeri che le fibre di tipo 2X, presenti in grande quantità nei muscoli di questo tipo di persone, siano da ritenere la fibra di “default” del nostro organismo. L'espressione di questo tipo di fibra infatti aumenta in caso di sedentarietà o inattività mentre diminuisce, sostituito dalle fibre dal fenotipo via via più lento, con l'aumentare dell'attività cui vengono sottoposti i muscoli che le contengono.

4. SLOW→FAST: COME RAGGIUNGERLO CON L'ALLENAMENTO

La transizione SLOW→FAST è stata per anni ritenuta impossibile dalla maggior parte dei ricercatori e studiosi della materia. Pur conoscendo che con reinnervazione incrociata, elettrostimolazione con modello di scarica PHFS, inattività e ipertiroidismo questa transizione è possibile, si riteneva che fosse inattuabile attraverso la somministrazione di particolari protocolli di allenamento. In generale, si pensava che una unità motoria lenta non potesse diventare veloce poiché, seppur le sue fibre avrebbero potuto mutare in questo senso, l' α -motoneurone associato ad esse non avrebbe potuto farlo. Per di più, tutti gli esperimenti fino ad allora condotti su muscoli di mammiferi, sottoposti a svariati protocolli di allenamento, non mostravano alcuna tendenza ad una transizione verso il fenotipo veloce ma anzi, la maggior parte di loro, o non portavano a modificazioni evidenti, o conducevano ad una transizione FAST→SLOW, peraltro in accordo con un aumento del carico funzionale.

Tuttavia, a partire dai primi anni '90, si cominciava a comprendere che, attraverso particolari metodiche di allenamento, era possibile convertire fibre muscolari lente in veloci. Il parametro fondamentale per determinare questa modificazione sembra essere la velocità con cui vengono eseguiti i movimenti.

In particolare, movimenti ad alta velocità sembrano stimolare in positivo questo tipo di trasformazione. A questo proposito Andersen et al. nel 1994 scoprirono che 12 settimane di un protocollo di allenamento basato su sprint massimali in velocisti allenati risultava in un incremento della percentuale di MHC-2a (34,7-52,3%), con un simultaneo decremento nelle percentuali di MHC-1 (52-41%). Anche la percentuale di MHC-2x però diminuiva (18-10,5%) con l'aumentare di MHC-2a. Se pur quindi avveniva uno spostamento delle isoforme di miosina di tipo 2x verso quelle di tipo 2a, i muscoli di questi atleti risultavano più veloci per un aumento delle fibre di tipo 2A a scapito del contenuto di fibre lente che diminuiva.

Andersen e collaboratori portarono a termine altri esperimenti su sprinter di elite dell'atletica leggera, sottoponendoli a un rigoroso protocollo di allenamento della durata di tre mesi basato questa volta su esercitazioni di forza con carico molto elevato ed esercitazioni di corsa intervallata massimale su brevi distanze. I risultati di questo particolare allenamento furono gli stessi ottenuti poco tempo dopo anche da Mona Esbornsson e i suoi collaboratori presso il Karolinska Institute a Stoccolma, i quali non utilizzarono atleti d'elite. Questo protocollo che unisce un pesante allenamento della forza con altre forme di esercizio anaerobico ad alta intensità è in grado di convertire non solo le fibre di tipo 2X in 2A ma anche le fibre 1 in 2A, raggiungendo i medesimi risultati dei precedenti protocolli che si basavano solo su sprint massimali. Quest'ultima affermazione confutava quello che si era pensato fino ad allora sulle transizioni SLOW→FAST delle fibre muscolari, e sembrava quindi possibile trasformare unità motorie lente in unità motorie veloci. Studi successivi, riguardanti le modificazioni cui può andare incontro l' α -motoneurone collegato alle fibre muscolari di una unità motoria a seguito di esercizio fisico, avvalorarono questa ipotesi. Secondo questi studi, anche se un α -motoneurone lento non può diventare a tutti gli effetti veloce, esso, in

risposta ad un modello di scarica diverso dal proprio, mette in atto una serie di modificazioni metaboliche, strutturali ed elettrofisiologiche che gli permettono di soddisfare al meglio le nuove richieste. In questo modo il motoneurone lento si avvicina a quelle che sono le caratteristiche dei motoneuroni veloci (51). In realtà comunque, nella trasformazione da unità motorie lente a veloci e viceversa, viene data più importanza alla transizione delle fibre e non alle presenti, se pur limitate, modificazioni del motoneurone associato.

Secondo i risultati di questi studi è quindi possibile, con particolari allenamenti ad alta intensità e basati su velocità di movimenti elevate, modificare le caratteristiche strutturali delle miosine presenti nelle fibre muscolari di un muscolo aumentando la quantità di fibre veloci 2A a scapito delle fibre lente di tipo 1.

Ma le fibre 2X?

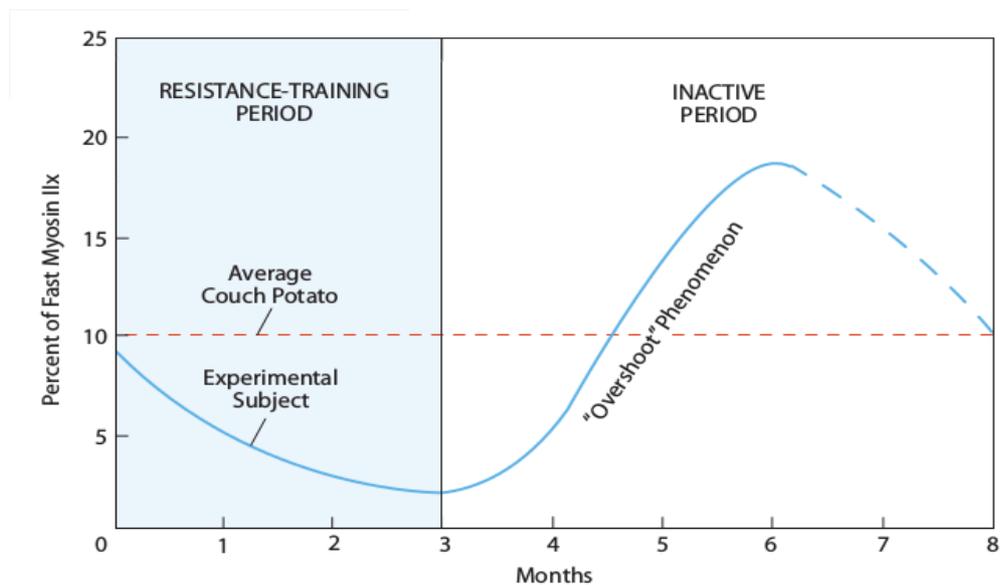
Sono destinate a diminuire con l'allenamento?

Secondo i risultati fin qui esposti sembra di sì, dato che sia con un allenamento di endurance, sia con uno che abbia come obiettivo l'aumento della forza e sia con un allenamento basato su sprint massimali, la loro percentuale relativa diminuisce poiché tendono a trasformarsi nelle fibre di tipo 2A, più resistenti e consone a sostenere livelli di attività ed esercizio fisico incrementati.

Molte ricerche negli anni hanno riscontrato una correlazione positiva tra l'isoforma di miosina MHC-2a e l'attività muscolare.

Un fenomeno particolare legato però alle fibre di tipo 2X è il cosiddetto "overshooting" scoperto da Andersen, Schjerling e Saltin (2000) (Figura 4.2). Essi hanno condotto un esperimento di questo tipo: 6 ragazzi danesi sedentari sono stati sottoposti ad un allenamento della forza ad alta intensità sulla muscolatura estensoria del ginocchio della durata di 3 mesi, per poi interrompere bruscamente il periodo di allenamento e tornare alla vita

sedentaria che conducevano prima dello stesso. Vennero raccolti campioni di fibre muscolari tramite biopsia dal muscolo vasto laterale della coscia prima, subito dopo e tre mesi dopo la fine del periodo di allenamento. Come ci si poteva aspettare, la quantità relativa di fibre di tipo 2X nel loro muscolo vasto laterale si era ridotta da un 9% pre-allenamento a circa un 2% post-allenamento. La biopsia condotta tre mesi dopo la fine dell'allenamento però, inaspettatamente, presentava un valore percentuale del 18% di fibre di tipo 2X. Questo significa che la quantità di fibre 2X, invece che solamente ritornare al valore iniziale di pre-allenamento, era raddoppiata. Non venne fatta una quarta biopsia sei mesi dopo la fine del periodo di allenamento ma presumibilmente i valori riscontrati sarebbero stati simili a quelli di partenza (9% di fibre di tipo 2X).



(Figura 4.2 Il fenomeno dell'overshooting)

Non si ha una spiegazione scientifica di questo fenomeno, ma da questo studio si possono ricavare utili applicazioni pratiche.

Per esempio, a uno sprinter dell'atletica leggera che voglia massimizzare la quantità di fibre veloci 2X dei propri muscoli bisognerebbe consigliare un allenamento basato su esercitazioni di tipo anaerobico di forza e di corsa su distanze brevi ricercando sempre la massima intensità di esercizio, utilizzando volumi di lavoro modesti e periodi di recupero molto ampi, e dando particolare importanza, durante il periodo di allenamento o prima di gare di particolare importanza, a periodi di scarico o “tapering”.

Un esempio di esercitazione di forza ad alta intensità per un velocista potrebbe essere: 9 serie da 1 ripetizione, carico 90-95% dell'1RM, con un recupero di 2-3 minuti tra una serie e l'altra.

L'utilizzo di queste esercitazioni di intensità sempre massimale con periodi di recupero ampi tra una ripetizione e l'altra o tra le serie, nel periodo di allenamento porterà ad una trasformazione 2X→2A della materia contrattile di minima intensità e, parallelamente, l'impiego intelligente di periodi di scarico o “Tapering” porterà ad una trasformazione nel verso inverso 2A→2X, secondo Andersen, di intensità maggiore. Tutto questo sarebbe quindi in grado di aumentare o comunque di mantenere elevata nel tempo, la quantità di fibre di tipo 2X nei muscoli di velocisti, con evidenti vantaggi in fatto di potenza e velocità.

5. NUOVE FRONTIERE PER QUANTO RIGURDA L'ALLENAMENTO DELLA FORZA: COMBINATION TRAINING E SOVRACCARICO ECCENTRICO

Dalle informazioni che sono state riportate fin qui, sembra che solo allenamenti di tipo anaerobico di intensità massimale come gli sprint, associati o meno a metodiche di sviluppo della forza (di elevata intensità) siano in grado di portare ad una transizione SLOW→FAST delle fibre sollecitate. Questa transizione risulta però incompleta dato che, si le fibre di tipo 1 si trasformano in fibre di tipo 2A, ma anche le fibre 2X, le più veloci fibre muscolari scheletriche umane, diminuiscono in quantità e si trasformano in fibre 2A. Sembra infatti che la concentrazione delle fibre di tipo 2X aumenti soltanto a seguito di un periodo di diminuita attività o di scarico fisico e che qualsiasi attività muscolare porti ad una loro diminuzione.

Partendo da queste premesse, vengono ora di seguito presentati in maniera quanto più sintetica ma completa possibile due studi riguardanti particolari metodi di allenamento della forza che hanno condotto a risultati innovativi per quanto riguarda la loro capacità di modificare le caratteristiche delle fibre muscolari e condurle verso un fenotipo più veloce.

Different effects on human skeletal myosin heavy chain isoform expression: strength vs. combination training

AUTORI: Y. Liu, A. Schlumberger, K. Wirth, D. Schmidtbleicher, and J. M. Steinacker

PUBBLICAZIONE: in data 28 gennaio 2003

Lo scopo di questo studio è di verificare gli effetti di differenti protocolli di allenamento della forza sulla espressione delle isoforme di miosina MHC.

Un numero di soggetti pari a 24 è diviso in due gruppi da 12 in maniera randomizzata. I due gruppi sono sottoposti a due protocolli di allenamento della forza differenti che comprendono entrambi 3 giorni alla settimana (lunedì, mercoledì, venerdì) di allenamento, per un numero totale di 6 settimane. Tutti i soggetti concludono il periodo di allenamento e quindi lo studio senza particolari problemi.

Per quanto riguarda i protocolli di allenamento, il gruppo MAX (forza massima) esegue 5 serie da 3 ripetizioni (carico 3RM) dell'esercizio panca piana con bilanciere (bench press), con un recupero di 6 minuti tra le serie e circa 3-4 secondi tra le ripetizioni, tutti e tre i giorni di allenamento settimanali. Il gruppo COMBI (forza combinata) invece esegue il lunedì la stessa sessione di allenamento del gruppo MAX, il mercoledì 10 movimenti balistici in cui viene eseguita solo la fase concentrica dello stesso esercizio (panca piana con bilanciere) alla massima velocità possibile e con un carico di circa il 30% dell'1RM, infine il venerdì eseguono 10 piegamenti sulle braccia con prestiramento alla massima velocità.

Nel test vengono eseguite misurazioni biomeccaniche due volte prima dell'inizio del periodo di allenamento di 6 settimane, per permettere ai soggetti di familiarizzare con le procedure di misurazione, e vengono poi ripetuti 3 e 11 giorni dopo la fine del periodo di allenamento. In questi test viene misurata la forza massima dei soggetti con semplice esecuzione dei loro 1RM all'esercizio di panca piana. Viene misurata anche la massima velocità di movimento attraverso l'esecuzione di tre ripetizioni di "bench press throw" alla multistation in cui i soggetti muovono alla massima velocità un bilanciere di

peso 16,9 kg. Grazie all' "Optical reflective sensor sistem" si è in grado di misurare la velocità con cui il bilanciere viene spinto in alto e, dei tre tentativi, il valore più alto è utilizzato a fini statistici.

Viene eseguita anche biopsia muscolare 3 giorni prima e 7 giorni dopo il periodo di allenamento di 6 settimane dal muscolo tricipite brachiale dell'arto dominante dei soggetti; vengono raccolti in totale 3 mg di tessuto a ciascun soggetto. Da esso, attraverso particolari tecniche di analisi, si può stimare la quantità di proteine totali, l'mRNA totale e la quantità di mRNA relativa delle singole isoforme di miosina.

Per quanto riguarda i risultati, dopo 6 settimane, l'1RM dei soggetti è cresciuto in entrambi i gruppi similmente (6,7 contro 6,0% per MAX e COMBI, rispettivamente).

La massima velocità di movimento invece è cresciuta maggiormente nel gruppo COMBI, con un incremento di 0,1 m/s rispetto a 0,07 m/s del gruppo MAX (con $P < 0.05$).

I campioni raccolti tramite biopsia sono stati analizzati con successo.

Secondo i dati, nei muscoli dei soggetti del gruppo MAX, dopo 6 settimane di allenamento, si è verificato un significativo incremento della concentrazione di MHC-2a (49,4→66,7% con $P < 0,01$). Sempre nel gruppo MAX si è riscontrato dopo l'allenamento un decremento della concentrazione di MHC-2x (33,4→19,5% con $P < 0,01$), mentre il cambiamento a livello della concentrazione delle MHC-1 non è statisticamente significativo (17,2→13,8%).

Nel gruppo COMBI, confrontando i dati ottenuti dalle due biopsie prima e dopo il periodo di allenamento, si è riscontrato un incremento della concentrazione di MHC-2a (47,7→62,7% con $P < 0,05$), nessun cambiamento statisticamente significativo per quanto riguarda le MHC-2x (34,1→28,1%), ma un significativo decremento nella concentrazione della MHC-1 (18,2→9,2% con $P < 0,01$).

Questo studio quindi raccoglie dati interessanti sulle possibili modificazioni

biomeccaniche e strutturali che possono avvenire nelle fibre muscolari di muscoli sollecitati con protocolli di allenamento di forza differenti e ne confronta gli effetti.

In particolare, attraverso un classico allenamento per il miglioramento della forza massima (gruppo MAX), a livello delle isoforme di miosina MHC, vengono prodotti questi adattamenti:

MHC-2x ↓ diminuzione

MHC-2a ↑ aumento

MHC-1 - invariata

Mentre il combination training conduce ai seguenti adattamenti:

MHC-2x - invariata

MHC-2a ↑ aumento

MHC-1 ↓ diminuzione

Unendo i dati dei test biomeccanici e i suddetti adattamenti, gli autori sono giunti ad alcune conclusioni.

Per quanto riguarda il gruppo MAX, l'aumento delle qualità di forza massima è probabilmente dovuto ad un aumento della concentrazione delle MHC-2a; in questo gruppo però la massima velocità di movimento non è aumentata significativamente e questo probabilmente è dovuto ad una diminuzione delle MHC-2x e al fatto che la percentuale di MHC-1 è rimasta pressochè invariata.

I valori di forza massima dei soggetti del gruppo COMBI aumentano (come per il gruppo MAX), e questo è ancora una volta dovuto probabilmente ad un aumento delle MHC-2a, anche se in questo gruppo aumentano significativamente anche i valori di massima velocità dei movimenti. Ciò è spiegato dal fatto che la concentrazione di MHC-1, la più lenta delle isoforme di miosina umane, diminuisce significativamente.

Sembra quindi che una maggiore velocità di movimento sia collegata ad una

diminuzione della componente di MHC-1 nel muscolo, mentre maggiori qualità di forza massima siano collegate all'aumento della MHC-2a.

In definitiva, da questo studio si può affermare che sportivi con l'intento di migliorare le loro qualità di velocità, forza e potenza dovrebbero associare al classico allenamento a carico elevato per il raggiungimento della forza massima anche particolari esercitazioni di forza di tipo elastico e balistico a carico ridotto eseguite a velocità massimali.

Questo allenamento combinato sembra essere più efficace nello sviluppo di una muscolatura le cui fibre contengano una quantità inferiore di MHC-1 e quindi di permettere il raggiungimento di velocità di movimento maggiori e di una maggiore potenza.

Effects of strenght training with eccentric overload on muscle adaptation in male athletes

AUTORI: Birgit Friedmann-Bette, Timm Bauer, Ralf Kinscherf, Silke Vorwald, Konstanze Klute, Dirk Bischoff, Helmut Muller, Marc-Andrè Weber, Jurgen Metz, Hans-Ulrich Kauczor, Peter Bartsch, Rudolf Billeter

PUBBLICAZIONE: in data 25 novembre 2009

RIVISTA: European Journal of Applied Physiology (Eur J Appl Physiol) 108
p.821-836

Lo scopo di questo studio è quello di comparare gli effetti prodotti da un classico allenamento della forza concentrico/eccentrico del muscolo quadricipite con il metodo del sovraccarico eccentrico sullo stesso muscolo in

atleti che sono regolari praticanti di allenamento muscolare.

Trenta soggetti attivi in sport di potenza, forza e velocità, con 1-15 (5 in media) anni di allenamento della forza alle spalle e 1-2 sessioni di allenamento di forza eseguite normalmente ogni settimana, sono volontari in questo studio.

I soggetti sono assegnati random a due gruppi di allenamento: il gruppo CON/ECC e il gruppo CON/ECC+. Solo 25 di loro hanno svolto senza interruzioni il programma di allenamento assegnato.

L'allenamento è condotto da entrambi i gruppi 3 volte alla settimana (lunedì, mercoledì e venerdì) per una durata di 6 settimane. Prima di ogni seduta i soggetti completano un riscaldamento standardizzato uguale a entrambi i gruppi.

L'esercizio da eseguire per il potenziamento del muscolo quadricipite è una classica leg extension, anche se, per il gruppo CON/ECC+, un sistema computerizzato è in grado di aggiustare il carico eccentrico da sostenere.

Entrambe le gambe, in entrambi i gruppi, vengono sottoposte ad un carico pari a 8RM, e le ripetizioni vengono eseguite velocemente (10-12 secondi per completare il numero totale di ripetizioni). Il carico viene continuamente aggiustato a 8RM durante le 6 settimane di allenamento. Nel gruppo CON/ECC viene utilizzato lo stesso carico nella fase concentrica e nella fase eccentrica del movimento, mentre per quanto riguarda il gruppo CON/ECC+ viene utilizzato un carico nella fase eccentrica che è circa 1,9 volte maggiore rispetto alla fase concentrica. Per raggiungere lo stesso ammontare di lavoro a livello di carico, il gruppo CON/ECC porta a termine 6 serie da 8RM per gamba, con 4 minuti di recupero tra le stesse, mentre il gruppo CON/ECC+ ne esegue 5 da 8RM per gamba con 4 minuti di recupero.

Nella seconda e nella penultima sessione di allenamento vengono raccolti 2 μ l di sangue dal lobo dell'orecchio per stimare la massima concentrazione lattato

indotta dall'esercizio dopo 1-3-5-10-15 min dall'ultima serie.

Oltre a questo, viene fatta una misurazione dell'1RM di entrambe le gambe, su una normale leg extension, a tutti i soggetti appartenenti ai due gruppi, prima della prima e prima dell'ultima seduta di allenamento.

Vengono eseguiti anche 3 squat jump massimali con le mani ai fianchi su una piattaforma per il rilevamento della forza in cui viene misurata la massima altezza del salto e il valore più elevato viene utilizzato per la statistica.

Viene anche eseguita una risonanza magnetica per stimare l'area della superficie trasversa di entrambi i quadricipiti femorali di tutti i soggetti.

Viene raccolto materiale tissutale attraverso biopsia muscolare dal muscolo vasto laterale dell'arto destro prima e dopo il periodo di allenamento e sul tessuto raccolto vengono svolte analisi per valutare le caratteristiche dell'RNA presente in esso. Attraverso l'ibridazione in situ si è in grado di stimare la presenza di fibre in transizione, poichè con questo tipo di analisi vengono valutati i cambiamenti della concentrazione di mRNA delle isoforme MHC nelle varie fibre. In questo studio in particolare, ci permette di valutare l'eventuale aumento della concentrazione di mRNA di MHC-2x nelle fibre 2A e di mRNA di MHC-2a nelle fibre 2X.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti a seguito delle 6 settimane di allenamento, si può constatare un aumento del valore di carico relativo all'1RM di 11-15 kg in entrambi i gruppi. Un aumento in altezza di 2-3 cm nel test di squat jump avviene solo per quanto riguarda i soggetti appartenenti al gruppo CON/ECC+, mentre nessun cambiamento è stato riscontrato nei soggetti del gruppo CON/ECC ($P < 0,05$).

Si evidenzia un aumento significativo della massima concentrazione di lattato post allenamento nella seconda misurazione rispetto alla prima ma solo nei soggetti del gruppo CON/ECC+, mentre non vi è nessuna differenza tra pre e post allenamento nei soggetti del gruppo CON/ECC. L'area della sezione

trasversa totale del muscolo quadricipite aumenta con entrambi i protocolli di allenamento:

+5,8 ± 4,3 cm² con CON/ECC+

+8,0 ± 6,5 cm² con CON/ECC

In entrambi i gruppi la quantità totale di RNA isolato nel tessuto è significativamente aumentata dopo il periodo di allenamento (+40% CON/ECC e +63% CON/ECC+).

Dallo studio dei vari mRNA si può affermare che solo due di essi vengono regolati in maniera diversa a seguito dei due differenti protocolli di allenamento.

L'mRNA della MHC-2b è il primo dei due, ed aumenta significativamente dopo il protocollo CON/ECC+, mentre con CON/ECC sembra diminuire. L'aumento di questo particolare mRNA, che codifica per la MHC più veloce dei muscoli dei mammiferi non presente nell'uomo, è indicativo di uno spostamento dell'espressione genica verso un fenotipo più veloce.

Il secondo è l'mRNA del recettore androgeno che è significativamente più alto a seguito del protocollo CON/ECC+. L'ibridazione in situ ha evidenziato un aumento significativo della percentuale di fibre 2A con espressione di mRNA di MHC-2x aumentata, ma solo a seguito di sei settimane di CON/ECC+. Non sono stati riscontrati invece cambiamenti significativi dell'espressione di mRNA di MHC-2a nelle fibre 2X in entrambi i gruppi.

La sezione trasversa delle singole fibre di tipo 2X dei muscoli dei soggetti del gruppo CON/ECC+, dopo le sei settimane, è significativamente aumentata, mentre non lo è per lo stesso tipo di fibre per quanto riguarda i soggetti del gruppo CON/ECC. Nel gruppo CON/ECC+ ma non in quello CON/ECC, l'aumento del valore di carico 1RM è correlato significativamente con l'aumento della sezione trasversa delle fibre di tipo 2X e quello (non significativo ma presente) delle fibre di tipo 2A, e ciò indica che, in questo

gruppo, l'ipertrofia delle fibre veloci causata dall'allenamento ha portato ad un aumento della forza massimale. Non è stata riscontrata alcuna tendenza ad ipertrofia selettiva per alcun tipo di fibre per quanto riguarda il gruppo CON/ECC.

Questa affermazione potrebbe sembrare in disaccordo con l'aumento precedentemente documentato dell'area di sezione trasversa del muscolo quadricipite in toto, riscontrata anche per il gruppo CON/ECC. In realtà, dopo 5 settimane di convenzionale allenamento della forza, il significativo incremento del volume totale del muscolo quadricipite è dovuto principalmente ad un significativo incremento del volume del retto femorale, mentre il vasto laterale non presenta cambiamenti significativi. Dopo 5 settimane di allenamento con sovraccarico eccentrico, invece, sono state trovate significativi incrementi del volume del vasto mediale, del vasto intermedio e del vasto laterale, quest'ultimo tendente quindi ad un differente adattamento nei confronti dei due protocolli di allenamento.

Il significativo aumento nella sezione trasversa delle fibre di tipo 2X non può che essere spiegato con un incremento nel reclutamento di questo tipo di fibra a seguito di allenamento basato su un sovraccarico eccentrico.

Dai dati raccolti e fin qui elencati sembra quindi che un allenamento contro resistenza con l'obiettivo di aumentare la forza caratterizzato da un sovraccarico nella fase eccentrica rispetto a quella concentrica determini adattamenti nella materia contrattile che portano il muscolo ad essere più forte, veloce e potente, e che quindi apporti maggiori benefici a tutti quegli atleti interessati ad avere risultati in sport basati su queste caratteristiche. Il sovraccarico eccentrico, da questo studio, risulta quindi essere un metodo più efficace per migliorare le caratteristiche biomeccaniche e funzionali della muscolatura rispetto al classico allenamento della forza in cui il carico è il medesimo sia nella fase concentrica sia nella fase eccentrica.

Interessante poi constatare una maggiore tendenza, evidente dai dati raccolti, del metodo basato sul sovraccarico eccentrico a spostare il fenotipo delle fibre 2A verso quello delle fibre 2X. In questo studio non sono stati riscontrati cambiamenti delle percentuali relative delle fibre 2X o 2A del muscolo vasto laterale, e quindi non si sono verificate transizioni complete da un tipo di fibra all'altro, ma l'aumento statisticamente significativo dell'mRNA di MHC-2x nelle fibre di tipo 2A fa pensare che ciò, presumibilmente, avrebbe potuto verificarsi se lo studio si fosse protratto per un periodo di tempo maggiore di 6 settimane.

Questi due articoli sono stati descritti poiché riportano due metodiche di allenamento della forza particolari che conducono a delle modificazioni del tutto innovative e non in linea con quelle che erano le premesse scientifiche riportate in precedenza. Trovare articoli di questo tipo in letteratura non è semplice poiché la maggior parte delle ricerche sull'allenamento e le modificazioni del tipo di fibra associati hanno sempre portato a risultati differenti. Sembra quindi che il ventunesimo secolo stia portando a indagini sempre più specifiche e dettagliate in grado di valutare variabili che prima non si è era in grado di considerare, e di portare a nuovi innovativi risultati.

In questo quadro, questi due studi sono veramente innovativi, poiché sono i primi che dimostrano che è possibile raggiungere una transizione SLOW→FAST completa anche con l'allenamento.

L'allenamento combinato, in cui ad un classico allenamento della forza di elevata intensità sono associati esercizi balistici ed elastici a massima velocità, sembra portare ad un aumento della concentrazione delle fibre di tipo 2A, ma senza una diminuzione statisticamente significativa delle fibre 2X, che vengono preservate; questo risulta in disaccordo con i risultati ottenuti dalla precedente letteratura che sanciva dall'inevitabile diminuzione della

concentrazione delle fibre di tipo 2X associata a qualsiasi forma di attività muscolare.

Un allenamento di forza ad alta intensità in cui venga applicato un sovraccarico ulteriore nella fase eccentrica, addirittura, sembra portare ad una transizione delle fibre 2A in fibre 2X, non avvenuta a tutti gli effetti nello studio presentato probabilmente per un tempo di somministrazione dell'allenamento troppo ridotto.

Questa metodica di allenamento è l'unica fin ora riconosciuta in grado di portare a tale modificazione.

È ormai indubbio che la transizione SLOW→FAST non è un qualcosa di fisiologicamente impossibile.

Probabilmente con il passare degli anni e con lo sviluppo di tecnologie e metodiche di ricerca ancora più sofisticate si riuscirà a scoprire altre informazioni a riguardo e finalmente a ricavare delle leggi oggettive, basate sulla statistica, riguardanti le transizioni dei vari tipi di fibre muscolari scheletriche a seconda del tipo di allenamento che viene somministrato.

CONCLUSIONI:

Questo elaborato, prodotto della sintesi dei risultati scientifici di numerosi studi, ha avuto come obiettivo quello di far conoscere più da vicino l'eterogeneità fenotipica delle fibre muscolari scheletriche. Tutti oggi possono conoscere velocemente quali sono i principali tipi di fibre muscolari leggendo sui libri di anatomia e fisiologia oppure andando su internet. Questo elaborato invece fornisce una analisi sull'argomento più approfondita, con numerosi riferimenti scientifici, che parte dalle scoperte e dalle principali metodiche di indagine che sono state usate per separare e distinguere i diversi tipi di fibre muscolari scheletriche, per poi descriverli da un punto di vista macroscopico ma soprattutto microscopico e infine trarre alcune indicazioni sulla loro capacità di mutare la loro struttura, il loro fenotipo, in risposta agli stimoli che li raggiungono. Di tutto questo, proprio quest'ultimo tema è ciò che dovrebbe interessare maggiormente ad un laureato in scienze motorie o comunque a chiunque lavori nell'ambito del movimento umano, il fatto di comprendere fino in fondo quali siano le caratteristiche che possono mutare nelle fibre muscolari in via di trasformazione e l'entità di questo mutamento a seguito della somministrazione di un particolare tipo di allenamento o attività sportiva.

La ricerca, negli anni, è stata in grado di caratterizzare i tipi di fibre muscolari macroscopicamente e microscopicamente, costruendo quindi una base solida di conoscenze per poter ora investigare e studiare le relazioni che intercorrono tra movimento e transizioni dei tipi di fibre muscolari. In particolare, un obiettivo che ci si potrebbe porre, più in generale, in un prossimo futuro, potrebbe essere quello di scoprire quali sono tutte le modificazioni acute e croniche che il muscolo mette in atto in risposta a specifici programmi di allenamento; tra queste anche le modificazioni del tipo di fibra muscolare sollecitata giocano un ruolo di primaria importanza. In questo senso, questo

elaborato propone risultati e studi di nuova e vecchia generazione e, da una parte, fa un po' il punto della situazione riguardo alle conoscenze scientifiche sull'argomento, mentre dall'altro propone tematiche di ricerca nuove e che sono ancora in fase di studio e sperimentazione sul complesso rapporto tra movimento e transizioni delle fibre, rimanendo fiducioso del fatto che il progresso scientifico degli ultimi anni non si arresterà e che nel prossimo futuro si giungerà finalmente ad avere tutte le risposte.

BIBLIOGRAFIA:

1. Aagaard P, Andersen JL. Correlation between contractile strength and myosin heavy chain isoform composition in human skeletal muscle. *Med Sci Sports Exercise* 30: 1217-1222, 1998.
2. Achten E, Van Cauteren M, Willer R, Luypaert R, Malaisse WY, Van Bosch G, DeLanghe R, De Meirleir K, Osteaux M. P-NMR spectroscopy and the metabolic Properties of different muscle fibres. *J Appl Physiol* 68: 644-649, 1990.
3. Agarkova I, Perriard JC. The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol* 15: 477-485, 2005.
4. Allen JD, Moss RL. Factors influencing the ascending limb of the sarcomere length-tension relationship in rabbit skinned muscle fibres. *J Physiol* 390: 119-136, 1987.
5. Andersen P. Capillary density in skeletal muscles of the man. *Acta Physiol Scand* 95: 203-206, 1975.
6. Andersen JL, Schjerling P, Saltin B. Muscle, genes and athletic performance. *Sci Am* 283: 48-55, 2000.
7. Andersen P, Henriksson J. Training induced changes in the subgroups of human type II skeletal muscle fibers. *Acta Physiol Scand* 99: 123-125, 1977.
8. Bangsbo J, Gollnick PD, Graham TE, Juel C, Kiens B, Mizuno M, Saltin B. Anaerobic energy production and O₂ deficit-debt relationship during exhaustive exercise in humans. *J Physiol* 422: 539-559, 1990.
9. Barany M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 50: 197-218, 1967.
10. Baylor SM, Hollingworth S. Sarcoplasmic reticulum calcium release compared in slow-twitch and fast-twitch fibres of mouse muscle. *J Physiol* 551: 125-138, 2003.
11. Beard Na, Laver DR, Dulhunty AF. Calsequestrin and calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog Biophys Mol Biol* 85: 33-69, 2004.
12. Behnke BJ, McDonough P, Padilla DJ, Musch TI, Poole DC. Oxygen exchange profile in rat muscles of contrasting fibre types. *J Physiol* 549: 597-605, 2003.
13. Berg JS, Powell BC, Cheney SE. A millennium myosin census. *Mol Biol Cell* 12: 780-794, 2001.

14. Bergh U, Thorstensson A, Sjodin B, Hulter B, Piehl K, Karlsson J. Maximal oxygen uptake and muscle fiber types in trained and untrained humans. *Med Sci Sports* 10: 151-154, 1978.
15. Bloemink MJ, Adamek N, Reggiani C, Geeves MA. Kinetic analysis of the slow skeletalmyosin MHC-I isoform from bovine masseter muscle. *J Mol Biol* 373: 1184-1197, 2007.
16. Bonen A, Campbell SE, Benton CR, Chabowski A, Coort SL, Han XX, Koonen DP, Gratz JF, Luiken JJ. Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36. *Proc Nutr Soc* 63: 245-249, 2004.
17. Bottinelli R, Betto R, Schiaffino S, Reggiani C. 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, 1994.
18. Bottinelli R, Canepari M, Reggiani C, Stienen GJ. Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres. *J Physiol* 481: 663-675, 1994.
19. Bottinelli R, Schiaffino S, Reggiani C. Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform composition of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J Physiol* 437: 655-672, 1991.
20. Bozzo C, Spolaore B, Toniolo L, Stevens L, Bastide B, Cieniewski-Bernard C, Fontana A, Mounier Y, Reggiani C. Nerve influence on myosin light chain phosphorylation in slow and fast skeletal muscles. *FEBS J* 272: 5771-5785, 2005.
21. Brooks GA. Cell-cell and intracellular lactate shuttle. *J Physiol* 587: 5591-5600, 2009.
22. Brown WFA. A method for estimating the number of motor units in thenar muscles and the change in motor unit count with aging. *J Neurol Neurosurg Psych* 35: 845-852, 1972.
23. Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM. Interaction between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *J Physiol* 150: 417-439, 1960.
24. Burke RE, Levine DN, Zajac FE. Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science* 174: 709-712, 1971.
25. Caiazzo VJ, Baker MJ, Baldwin KM. Novel transitions in MHC isoforms: separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *J Appl Physiol* 85:

- 2237-2248, 1998.
26. Caiazzo VJ, Baker MJ, Herrick RE, Tao M, Baldwin KM. Effect of spaceflight on skeletal muscle: mechanical properties and myosin isoform content of a slow muscle. *J Appl Physiol* 76: 1764-1773, 1994.
 27. Caiazzo VJ, Herrick RE, Baldwin KM. Response of slow and fast muscle to hypothyroidism: maximal shortening velocity and myosin isoforms. *Am J Physiol* 263: C86-C94, 1992.
 28. Campbell WG, Gordon SE, Carlson CJ, Pattison JS, Hamilton MT, Booth FW. Differential global gene expression in red and white skeletal muscles. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C763-C768, 2001.
 29. Capitanio M, Canepari M, Cacciafesta P, Lombardi V, Cicchi R, Maffei M, Pavone FS, Bottinelli R. Two independent mechanical events in the interaction cycle of skeletal muscle myosin with actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 87-92, 2006.
 30. Carrol S, Nicotera P, Pette D. Calcium transients in single fibers of low frequency stimulated fast-twitch muscle of rat. *Am J Cell Physiol* 277: C1 122- C1 129, 1999.
 31. Carrol SL, Klein MG, Schneider MF. Decay of calcium transients after electrical stimulation in rat fast- and slow-twitch skeletal muscle fibres. *J Physiol* 501: 573-588, 1997.
 32. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationship of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 57: 397-409, 2005.
 33. Close R. Properties of motor units in fast and slow skeletal muscles of rat. *J Physiol* 193: 45-55, 1967.
 34. Close R. Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 52: 129-197, 1972.
 35. Costill DL, Daniels J, Evans W, Fink W, Krahenbuhl G, Saltin B. Skeletal muscle enzymes and fiber composition in male and female track athletes. *J Appl Physiol* 40: 149-154, 1976.
 36. Dugaard JR, Nielsen JN, Kristiansen S, Andersen JL, Hargreaves M, Richter EA. Fiber type-specific expression of GLUT4 in human skeletal muscle: influence of exercise training. *Diabetes* 49: 1092-1095, 2000.
 37. DeNardi C, Ausoni S, Moretti P, Gorza L, Velleca M, Buckingham M, Schiaffino S.

- Type 2X-myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene. *J Cell Biol* 123: 823-835, 1993.
38. Dulhunty AF, Banyard MR, Medveczky CJ. Distribution of calcium ATPase in the sarcoplasmic reticulum of fast- and slow-twitch muscles determined with monoclonal antibodies. *J Membr Biol* 99: 79-92, 1987.
 39. Edman KAP. Contractile properties of mouse single muscle fibers, a comparison with amphibian muscle fibers. *J Exp Biol* 208: 1905-1913, 2005.
 40. Elder GC, Kakulas BA. Histochemical and contractile property changes during human muscle development. *Muscle Nerve* 16: 1246-1253, 1993.
 41. Essen B, Jansson E, Henriksson J, Taylor AW, Saltin B. Metabolic characteristics of fibre types in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 95: 153-165, 1975.
 42. Everts ME, Clausen T. Activation of the Na-K pump by intracellular Na in rat slow- and fast-twitch muscles. *Acta Physiol Scand* 145: 353-362, 1992.
 43. Fishbein WN, Merezhinskaya N, Foellmer JW. Relative distribution of three major lactate transporters in frozen human tissues and their localization in unfixed skeletal muscle. *Muscle Nerve* 26: 101-112, 2002.
 44. Fitts RH, McDonald KS, Schluter JM. The determinants of skeletal muscle force and power: their adaptability with changes in activity pattern. *J Biomechanics* 24: 111-122, 1991.
 45. Fitts RH, Metzger JM, Riley DA, Unsworth BR. Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. *J Appl Physiol* 60: 1946-1953, 1986.
 46. Fitts RH, Winder WW, Brooke MH, Kaiser KK, Holloszy JO. Contractile, biochemical, and histochemical properties of thyrotoxic rat soleus muscle. *Am J Physiol* 238: C15-C20, 1980.
 47. Franzini-Armstrong C. ER-mitochondria communication. How privileged? *Physiology* 22: 261-268, 2007.
 48. Franzini-Armstrong C, Ferguson DG, Champ C. Discrimination between fast- and slow-twitch fibres of guinea pig skeletal muscle using the relative surface density of junctional transverse tubule membrane. *J Muscle Res Motil* 9: 403-414, 1988.
 49. Fraysse B, Desaphy JF, Pierno S, De Luca A, Liantonio A, Mitolo CI, Camerino DC. Decrease in resting calcium and calcium entry associated with slow-to-fast transition in rat soleus muscle. *FASEB J* 17: 1916-1918, 2003.

50. Friedmann-Bette B, Bauer T, Kinscherf R, Vorwald S, Klute K, Bischoff D, Muller H, Weber MA, Metz J, Kauczor HU, Bartsch P, Billeter R. Effects of strenght training with eccentric overload on muscle adaptation in male athletes. *Eur J Appl Physiol* 108: 821-836, 2010.
51. Gardiner P, Dai Y, Heckman CJ. Effects of exercise training on α -motoneurons. *J Appl Physiol* 101: 1228-1236, 2006.
52. Gaster M, Franch J, Staehr P, Beck-Nielsen H, Smith T, Schroder H. Induction of GLUT-I protein in adult human skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E1191-E1195, 2000.
53. Golspink G, Howells KF. Work-induced hypertrophy in exercised normal muscles of different ages and the reversibility of hypertrophy after cessation of exercise. *J Physiol* 239: 179-193, 1974.
54. Gorza L, Gundersen K, Lomo T, Schiaffino S, Westgaard RH. Slow-to-fast transformation of denervated soleus muscles by chronic high-frequency stimulation in the rat. *J Physiol* 402: 627-649, 1988.
55. Granzier HL, Wang K. Passive tension and stiffness of vertebrate skeletal and insect flight muscles: the contribution of weak cross-bridges and elastic filaments. *Biophys J* 65: 2141-2159, 1993.
56. Greenhaff PL, Soderlund K, Ren JM, Hultman E. Energy metabolism in single human muscle fibres during intermittent contraction with occluded circulation. *J Physiol* 460: 443-453, 1993.
57. Gueguen N, Lefaucher L, Fillaut M, Herpin P. Muscle fiber contractile type influences the regulation of mitochondrial function. *Moll Cell Biochem* 276: 15-20, 2005.
58. Guth L, Samaha FJ. Qualitative differences of actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscles. *Exp Neurol* 25: 138-152, 1969.
59. Hallauer PL, Hastings KE. Coregulation of fast contractile protein transgene and glycolytic enzyme expression in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C113-C124, 2002.
60. Hamalainen N, Pette D. Patterns of myosin isoforms in mammalian skeletal fibres. *Microse Res Tech* 30: 381-389, 1995.
61. Harridge SDR, Bottinelli R, Canepari M, Pellegrino MA, Reggiani C, Esbjornsson M, Saltin B. Whole muscle and single fibre contractile properties nad myosin heavy

- chain isoforms in humans. *Pflugers Arch* 432: 913-929, 1996.
62. Hasselbach W. Structural and enzymatic properties of calcium transporting membranes of the sarcoplasmic reticulum. *Ann NY Acad Sci* 137: 1041-1048, 1964.
63. Hennig R, Lomo T. Firing patterns of motor units in normal rats. *Nature* 314: 164-166, 1985.
64. Hers HG. The discovery and the biological role of fructose 2,6-biphosphate. *Biochem Soc Trans* 12: 729-735, 1984.
65. Hintz CS, Coyle EF, Kaiser KK, Chi MM, Lowry OH. Comparison of muscle fiber typing by quantitative enzyme assays and by myosin ATPase staining. *J Histochem Cytochem* 32: 655-660, 1984.
66. Howald H, Hoppeler H, Claassen H, Mathieu O, Straub R. Influence of endurance training on the ultrastructure composition of different muscle fibre types in human. *Pflugers Arch* 403: 369-376, 1985.
67. Hundal HS, Marette A, Ramlal T, Liu Z, Klip A. Expression of beta subunit isoforms of the Na⁺, K⁺-ATPase is muscle type-specific. *FEBS Lett* 328: 253-258, 1993.
68. Inesi G, de Meis L. Regulation of steady state filling in sarcoplasmic reticulum. Roles of back-inhibition, leakage, and slippage of the calcium pump. *J Biol Chem* 264: 5929-5936, 1989.
69. Iorga B, Adamek N, Geeves MA. The slow skeletal muscle isoform of myosin shows kinetic features common to smooth and non-muscle myosin. *J Biol Chem* 282: 3559-3570, 2007.
70. Jackman MR, Willis WT. Characteristics of mitochondria isolated from type I and type IIb skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 270: C673-C678, 1996.
71. Jarvis JC, Mokrusch T, Kwende MMN, Sutherland H, Salmons S. Fast-to-slow transformation in stimulated rat muscle. *Muscle Nerve* 19: 1469-1475, 1996.
72. Karatzaferi C, de Haan A, van Mechelen W, Sargeant AJ. Metabolism changes in single human fibre during brief maximal exercise. *Exp Physiol* 86: 411-415, 2001.
73. Keizer HA, Schaart G, Tandon NN, Glantz JF, Luiken JJ. Subcellular immunolocalisation of fatty acid translocase (FAT)/CD36 in human type-I and Type-2 skeletal muscle fibres. *Histochem Cell Biol* 121: 101-107, 2004.
74. Klein MG, Kovacs L, Simon BJ, Schneider MF. Decline of myoplasmic Ca²⁺, recovery of calcium release and sarcoplasmic Ca²⁺ pump properties in frog skeletal

- muscle. *J Physiol* 441: 639-971, 1991.
75. Konieczny P, Fuchs P, Reipert S, Kunz WS, Zeold A, Fischer I, Paulin D, Schroder R, Wiche G. Myofiber integrity depends on desmin network targeting to Z-disks and costameres via distinct plectin isoforms. *J Cell Biol* 181: 667-681, 2008.
 76. Liu Y, Carroll SL, Klein MG, Schneider MF. Calcium transients and calcium homeostasis in adult mouse fast-twitch skeletal muscle fibres in culture. *Am J Physiol Cell Physiol* 272: C1919-C1927, 1997.
 77. Liu Y, Schlumberger A, Wirth K, Schmidtbleicher D, Steinacker JM. Different effects on human skeletal myosin heavy chain isoform expression: strenght vs. combination training. *J Appl Physiol* 94: 2282-2288, 2003.
 78. Lomo T. Nerve-muscle interactions. In: Cincial Neurophysiology of Disorders of Muscle and the Neuromuscular Junction in Adult and Children. *IFSCN Handbook of Clinical Neurophysiology*, edited by Sta^olberg E. Amsterdam: Elsevier, 2003, p. 47-65.
 79. Lowry CV, Kimmey JS, Felder S, Chi MMY, Kaiser KK, Passoneau PN, Kirk KA, Lowry OH. Enzyme patterns in single human muscle fibers. *J Biol Chem* 253: 8269-8277, 1978.
 80. Lutz GJ, Rome LC. Built for jumping: the design of the frog muscular system. *Science* 263: 370-372, 1994.
 81. McDonough P, Behnke BJ, Musch TI, Poole DC. Recovery of microvascular Po₂ during the exercise off-transient in muscle of different fiber type. *J Appl Physiol* 96: 1039-1044, 2004.
 82. Monti RJ, Roy RR, Hodgson JA, Edgerton VR. Transmission of force within mammalian skeletal muscles. *J Biomechanics* 32: 371-380, 1999.
 83. Morisaki T, Holmes EW. Functionally distinct elements are required for expression of the AMPD I gene in myocytes. *Mol Cell Biol* 13: 5854-5860, 1993.
 84. Needham DM. Red and white muscles. *Physiol Rev* 6: 1-27, 1926.
 85. Nyitrai M, Geeves MA. Adenosine diphosphate and strain sensitivity in myosin motors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359: 1867-1877, 2004.
 86. Ogata T. Structure of motor endplates in the different fiber type of vertebrate skeletal muscles. *Arch Histol Cytol* 51: 385-424, 1988.
 87. Ogata T, Yamasaki Y. Scanningelectron- microscopic studies on the three-

- dimensional structure of mitochondria in the mammalian red, white and intermediate muscle fibres. *Cell Tissue Res* 241: 251-256, 1985.
88. Ordaway G, Garry D. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J Exp Biol* 207: 3441-3446, 2004.
89. Patullo MC, Cotter MA, Cameron NE, Barry JA. Effects of lengthened immobilization on functional and histochemical properties of rabbit tibialis anterior muscle. *Exp Physiol* 77: 433-442, 1992.
90. Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pig and rabbit. *Biochemistry* 11: 2627-2633, 1972.
91. Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol* 170: 143-223, 1997.
92. Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol* 115: 359-372, 2001.
93. Pette D, Vrbova G. What does Chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity? *Muscle Nerve* 22: 666-677, 1999.
94. Peuker H, Conjard A, Putman CT, Pette D. Transient expression of myosin heavy chain MHC1 α in rabbit muscle during fast-to-slow transition. *J Muscle Res Cell Motil* 20: 147-154, 1999
95. Prado LG, Makarenko I, Andresen C, Kruger M, Opitz CA, Linke WA. Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active properties of rabbit skeletal muscles. *J Gen Physiol* 126: 461-480, 2005.
96. Prakash YS, Miller SM, Huang M, Sieck GC. Morphology of diaphragm neuromuscular junctions on different fibre types. *J Neurocytol* 25: 88-100, 1996.
97. Pusch M, Jentsch TJ. Molecular physiology of voltage-gated chloride channels. *Physiol Rev* 74: 813-827, 1994.
98. Rannou F, Droguet M, Giroux-Metges MA, Pennec Y, Gioux M, Pennec JP. Differences in sodium voltage gated channel properties according to myosin heavy chain isoform expression in single muscle fibers. *J Physiol* 587: 5249-5258, 2009.
99. Reggiani C, Potma EJ, Bottinelli R, Canepari M, Pellegrino MA, Stienen GJM. Chemomechanical energy transduction in relation to myosin isoform composition in skeletal muscle fibres of the rat. *J Physiol* 502: 449-460, 1997.

100. Reichmann H, Pette D. A comparative microphotometric study of succinate dehydrogenase activity levels in type I, IIA e IIB fibres of mammalian and human muscles. *Histochemistry* 74: 27-41, 1982.
101. Rivero JL, Talmadge RJ, Edgerton VR. Fibre size and metabolic properties of myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 19: 733- 742, 1998.
102. Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 77: 731-758, 1997.
103. Rossi AC, Mammucari C, Argentini C, Reggiani C, Schiaffino S. Two novel/ancient myosin in mammalian skeletal muscle: MYH14/7b and MYH15 are expressed in extraocular muscles and muscle spindles. *J Physiol* 588: 353-364, 2010.
104. Ruff RL. Calcium sensitivity of fast- and slow-twitch human muscle fibers. 1989
105. Ruff RL. Sodium channel slow inactivation and the distribution of sodium channels on skeletal muscle fibre enable the performance properties of different skeletal muscle fibre type. *Acta Physiol Scand* 156: 159-168, 1996.
106. Ruff RL, Whittlesey D. Na⁺ current densities and voltage dependence in human intercostal muscle fibres. *J Physiol* 458: 85-97, 1992.
107. Sahlin K, Fernstrom M, Svensson M, Tonkonogi M. No evidence of an intracellular lactate shuttle in rat skeletal muscle. *J Physiol* 541: 569-574, 2002.
108. Sahlin K, Soderlund K, Tonkonogi M, Hirakoba K. Phosphocreatin content in single fibers of human muscle after sustained submaximal exercise. *Am j Physiol Cell Physiol* 273: C172-C178, 1997.
109. Sahlin K, Tonkonogi M, Soderlund K. Energy supply and muscle fatigue in humans. *Acta Physiol Scand* 162: 261-266, 1998.
110. Saltin B, Gollnick PD. Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. In: Handbook of Physiology. Skeletal Muscle. Bethesda, MD: *Am. Physiol Soc* 1983, sect. 10, chapt. 19, p. 555-632.
111. Sant'ana Pereira JAA, Sargeant AJ, Rademaker ACHJ, de Haan A, van Mechelen W. Myosin heavy chain isoform expression and high energy phosphate content in human fibres at rest and post-exercise. *J Physiol* 496: 583-588, 1996.
112. Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Ausoni S, Vianello M, Gundersen K, Lomo T. Three Myosin Heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J*

- Muscle Res Cell Motil* 10: 197-205, 1989.
113. Schiaffino S, Hanzlikova V, Pierobon S. Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 47: 107-119, 1970.
 114. Schiaffino S, Margreth A. Coordinated development of the sarcoplasmic reticulum and T system during postnatal differentiation of rat skeletal muscle. *J Cell Biol* 41: 855-875, 1969.
 115. Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 76: 371-423, 1996.
 116. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 91: 1447-1531, 2011.
 117. Schmitt TL, Pette D. correlations between troponin-T and myosin heavy chain isoforms in normal and transforming rabbit muscle fibres. *The dynamic state of muscle fibers*, edited by Pette D. Berlin: De Gruyter, 1990.
 118. Sjöström M, Squire JM. Fine structure of the A-band in cryo-sections. The structure of A-band of human skeletal muscle fibres from ultra-thin cryo-sections negatively stained. *J mol Biol* 109: 49-68, 1977.
 119. Sketelj J, Leisner E, Gohlsch B, Skorjanc D, Pette D. Specific impulse patterns regulate acetylcholinesterase activity in skeletal muscles of rats and rabbits. *J Neurosci Res* 47: 49-57, 1997.
 120. Smerdu V, Karsch-Mizrachi I, Campione M, Leinwand L, Schiaffino S. Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscles. *Am J Physiol Cell Physiol* 267: C1723-C1728, 1994.
 122. Smith NP, Barclay CJ, Loiselle DS. The efficiency of muscle contraction. *Prog Biophys Mol Biol* 88: 1-58, 2005.
 123. Spamer C, Pette D. Activity patterns of phosphofructokinase, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase in microdissected fast and slow fibres from rabbit psoas and soleus muscle. *Histochemistry* 52: 201-216, 1977
 124. Staron RS. Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in single human muscle fibers. *Histochemistry* 96: 21-24, 1991.
 125. Staron RS, Hikida RS. Histochemical, biochemical, and ultrastructural analyses

- of single human muscle fibers with special reference to the C fiber population. *J Histochem Cytochem* 40: 563-568, 1992.
126. Staron RS, Hikida RS, Hagerman FC. Myofibrillar ATPase activity in human muscle fast-twitch subtypes. *Histochemistry* 78: 405-408, 1983.
 127. Stephenson DG, Lamb GD, Stephenson GM. Events of the excitation-contraction-relaxation (E-C-R) cycle in fast- and slow-twitch mammalian muscle fibres relevant to muscle fatigue. *Acta Physiol Scand* 162: 229-245, 1998.
 128. Sullivan VK, Powers SK, Criswell DS, Tumer N, Larochelle JS, Lowenthal D. Myosin heavy chain composition in young and old rat skeletal muscle: effects of endurance exercise. *J Appl Physiol* 78: 2115-2120, 1995.
 129. Tanabe T, Beam KG, Powell JA, Numa S. Restoration of excitatio-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature* 336: 134-139, 1988.
 130. Tricarico D, Mele A, Conte Camerino D. Phenotype-dependent functional and pharmacological properties of BK channels in skeletal muscle: effects of microgravity. *Neurobiol Dis* 20: 296-302, 2005.
 131. Troup JP, Metzger JM, Fitts RH. Effect of high-intensity exercise training on functional capacity of limb skeletal muscle. *J Appl. Physiol.* 60: 1743-1751, 1986.
 132. Vandeborne K, McCully K, Kakihira H, Prammer M, Boliger L, Detre JA, De Meirleir K, Walter G, Chance B, Leigh JS. Metabolic heterogeneity in human calf muscle during maximal exercise. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5714-5718, 1991.
 133. Van der Ven PFM, Ehler E, Vakeel P, Eulitz S, Schenk JA, Milting H. Unusual splicing events result in distinct Xin isoforms that associate differentially with filamin c and Mena/VASP. *Exp Cell Res* 312: 2154-2167, 2006.
 134. Vincent B, De Bock K, Ramaekers M, Van den Eede E, Van Leemputte M, Hespel P, Thomis MA. ACTN3 (R577X) genotype is associated with fiber type distribution. *Physiol Genomics* 32: 58-63, 2007.
 135. Vollenstad NK, Vaage O, Hermansen L. Muscle glycogen depletion patterns in type I and subgroups of type II fibres during prolonged severe exercise in man. *Acta Physiol Scand* 122: 433-441, 1984.
 136. Vøllestad NK, Tabata I, Medbø JI. Glycogen breakdown in different human muscle fibre types during exhaustive exercise of short duration. *Acta Physiol Scand* 144:

- 135-141, 1992.
137. Wang K, McCarter R, Wright J, Beverly J, Ramirez-Mitchell R. Viscoelasticity of the sarcomere matrix of skeletal muscles. The titin-myosin composite filament is a dual-stage molecular spring. *Biophys J* 64: 1161-1177, 1993.
 138. Widrick JJ, Stelzer JE, Shoepe TC, Garner DP. Functional properties of human muscle fibers after short-term resistance exercise training. *Am J Physiol* 283: R408-R416, 2002.
 139. Witzmann FA, Kim DH, Fitts RH. Hindlimb immobilization: length-tension and contractile properties of skeletal muscle. *J Appl Physiol* 53: 335-345, 1982.
 140. Wood SJ, Slater CR. The contribution of postsynaptic folds to the safety factor for neuromuscular transmission in rat fast- and slow-twitch muscles. *J Physiol* 500: 165-176, 1997.
 141. Yamashita K, Yoshioka T. Activities of creatine kinase isoenzymes in single skeletal muscle fibres of trained and untrained rats. *Pflugers Arch* 421: 270-273, 1992.

RINGRAZIAMENTI:

Ringrazio tutte le persone che mi sono state vicine e mi hanno supportato durante la stesura di questo elaborato.

Un ringraziamento particolare va alla mia famiglia, al mio professore e relatore Dottor Massimiliano Mantovani, alla mia amica Marcella e al mio amico Paolo.