

## **GLICOGENO E TIPOLOGIA DELLE FIBRE MUSCOLARI**

1. Struttura del glicogeno
2. Biosintesi e scissione del glicogeno
3. Metodi di valutazione qualitativa e quantitativa del glicogeno nel muscolo
4. Tipi di fibre muscolari e glicogeno: accumulo e deplezione in funzione della prestazione

## 1. Struttura del glicogeno

Il glicogeno, o meglio, i glicogeni fanno parte di quel vasto gruppo di carboidrati contenuti nei tessuti viventi sotto forma di polisaccaridi, polimeri ad alto peso molecolare degli zuccheri semplici. La loro funzione è sia di supporto, conferendo rigidità ad aggregati di tessuti viventi, sia di riserva alimentare, quando possono venire parzialmente trasformati in zuccheri metabolizzabili.

### 1.1. Struttura dei polisaccaridi

In generale i polisaccaridi possono essere considerati come prodotti di poli-condensazione di unità monosaccaridiche, legate con legame glicosidico (con contemporanea eliminazione di acqua) a formare catene lineari o ramificate. Molti di essi contengono solo una specie monosaccaridica come unità strutturale; tuttavia anche il polisaccaride più complesso raramente contiene più di tre o quattro tipi di tali unità. L'unità strutturale dei polisaccaridi non è costituita solamente dai semplici aldosi e chetosi, ma comprende anche acidi uronici ed amino-zuccheri: questi componenti possono comparire da soli (come unità strutturale semplice) oppure uniti in due o più tra loro in una unità strutturale complessa.

I polisaccaridi che contengono un'unica specie monosaccaridica sono detti *omoglicani* (od omopolisaccaridi) che possono essere suddivisi in lineari ed a catena ramificata; i polisaccaridi contenenti due o più specie monosaccaridiche sono detti *eteroglicani*. I polisaccaridi quindi sono macromolecole i cui pesi molecolari vanno da poche migliaia a molti milioni; alcuni sono costituiti essenzialmente da catene lineari di unità monosaccaridiche, mentre altri sono molto ramificati. Le caratteristiche fisiche di tali strutture sono molto influenzate dalla presenza di un gran numero di gruppi idrossilici lungo la catena polimerica: tali gruppi conferiscono ai polisaccaridi delle tipiche caratteristiche che ne fanno una classe a sé tra le varie macromolecole.

I polisaccaridi di supporto e quelli di riserva nutritiva presentano differenze notevoli nelle loro proprietà fisiche generali. I primi, fortemente legati con ponti ad idrogeno intermolecolari, sono nella maggior parte dei casi insolubili in acqua

e poco reattivi con i mezzi chimici, che non possono facilmente penetrare nei loro aggregati. I polisaccaridi di riserva possono invece assorbire facilmente acqua perdendo così la loro rigidità, per formare soluzioni colloidali viscose in cui sono attaccabili con facilità da vari mezzi chimici. La natura liofila dei polisaccaridi di riserva scaturisce dalla mancanza di legami intermolecolari ad idrogeno, il che permette ai gruppi idrossilici della molecola di impegnarsi in legami ad idrogeno con le molecole dell'acqua: ciò facilita la dispersione della macromolecola nel mezzo acquoso. Va sottolineato inoltre che il grado di polimerizzazione di un polisaccaride estratto dai tessuti non è costante, ma varia entro limiti abbastanza ampi per cui i pesi molecolari ottenuti dai vari metodi chimico-fisici sono da intendersi come pesi molecolari medi.

Importanti informazioni strutturali sono fornite dagli studi con i raggi X: la maggior parte dei polisaccaridi si presenta amorfa da un punto di vista macroscopico, ma le molecole dei polisaccaridi lineari sono in genere orientate parallelamente le une alle altre, tanto da mostrare una struttura parzialmente o quasi completamente cristallina ai raggi X. Lo studio ai raggi X è poi particolarmente utile per la valutazione dei legami ad idrogeno inter- ed intra-molecolari, mentre lo studio sulla rotazione ottica specifica (sia a lunghezza di onda fissa, sia a diverse lunghezze d'onda) fornisce utili informazioni sulla configurazione dei legami glicosidici. Pure molto impiegati sono gli spettri all'infrarosso dal momento che molti picchi di assorbimento nell'infrarosso sono correlati a caratteristici raggruppamenti molecolari. La presenza di sostituenti (come gruppi acetonicici, carbossilici, ecc.), può essere così evidenziata; anche la configurazione del legame interglicosidico può in tal modo essere determinata.

## 1.2. Struttura dei glicogeni

E' bene ricordare che il termine « glicogeni » (come i termini « amido » o « destrina ») non identifica uno specifico composto chimico, ma fa riferimento a polisaccaridi che sono ampiamente diffusi nei tessuti animali (particolarmente fegato e muscolo) e che danno con lo iodio colorazioni rosso-bruno, rosso o a volte violetto: per completa idrolisi essi liberano D-glucoso.

Il glicogeno è composto da molte unità di glucoso unite per mezzo di un legame  $\alpha$ -glicosidico; le unità glicosidiche sono così legate in catene glicosidiche che presentano numerose ramificazioni attuate a mezzo di un ossidrile in posizione 6 del glucoso, nel modo illustrato nella Figura 1.1. Lo studio dei glicogeni metilati fornisce i dati relativi al grado di ramificazione: la metilazione infatti, sostituisce tutti gli idrogeni idrossilici (-OH) con gruppi metilici; l'idrolisi acida dei prodotti metilati produce gli zuccheri liberi metilati. Ogni unità di glucoso terminale (come le unità A e D della Figura 1.1) nel glicogeno metilato conterrà 4 gruppi metilici, mentre le altre unità conterranno 3 gruppi metilici (come l'unità C della Figura 1.1) oppure 2 gruppi metilici (come l'unità B della Figura 1.1). Quando questi glicogeni metilati sono idrolizzati, si ottengono miscele di 2,3,4,6-

tetrametilglucoso (da unità terminali di glucoso), di 2,3,6-trimetilglucoso (da unità intracatena di glucoso) e di 2,3-dimetilglucoso (da unità di glucoso dei punti di ramificazione). Più grande è il numero delle ramificazioni, più grande sarà la percentuale di tetrametilglucoso ottenuto per idrolisi: la quantità di tetrametilglucoso è perciò l'indice del grado di ramificazione della catena. I risultati ottenuti dall'amilo-  
 loso metilato danno una piccola proporzione di tetrametilglucoso, indicando con ciò scarsa o nulla ramificazione; nel caso dell'amilopectina, il tetrametilglucoso è presente per il 4%, con ciò indicando una unità di glucoso terminale ogni 25 unità di glucoso; nel caso dei glicogeni, la presenza di 2,3,4,6-tetrametilglucoso è di circa 9 moli per cento, con ciò indicando una unità di glucoso terminale per ogni undici

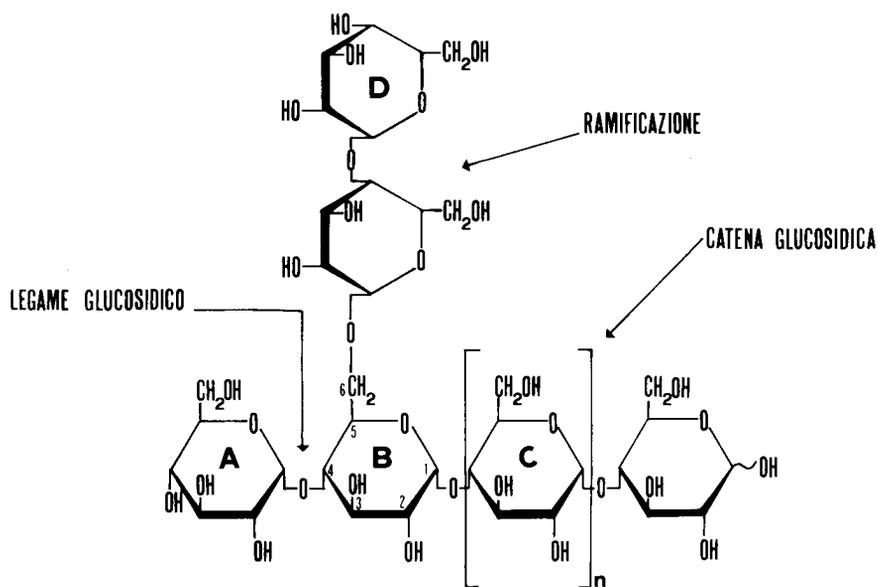


Figura 1.1

unità di glucoso. Si deduce da ciò che le catene nel glicogeno sono molto ramificate: infatti nel glicogeno le ramificazioni esterne contengono 6-7 unità di glucoso, mentre i frammenti di catena tra le ramificazioni sono lunghi di media appena tre unità di glucoso.

Come si vede nella Figura 1.2, la molecola del glicogeno ha una struttura « ad albero »: la presenza di 2,3-dimetilglucoso nella miscela di zuccheri metilati mostra che le ramificazioni sono legate alla catena attraverso la posizione 6 del glucoso.

Il peso molecolare del glicogeno è stato oggetto di molte ricerche: si sono ottenuti valori ampiamente differenti, apparentemente correlati al diverso grado di degradazione della molecola di glicogeno durante l'isolamento. Il peso minimo

di una molecola di glicogeno, si aggira sui 4-5 milioni; le più grosse molecole di glicogeno possono avere pesi di varie volte maggiore di quello minimo.

Rimane infine il problema di determinare la forma delle molecole di glicogeno; uno dei metodi di determinazione più appropriato è quello delle misure di viscosità, a mezzo del quale si è verificato che le molecole di glicogeno sono sferiche.

La misura di viscosità assume un elevato interesse per lo studio della forma della macromolecola e delle sue interazioni col solvente, ossia della deformabilità della macromolecola in un particolare mezzo solvente; infatti il contributo che il soluto macromolecolare dà alla viscosità dipende dal volume effettivo occupato dalla macromolecola.

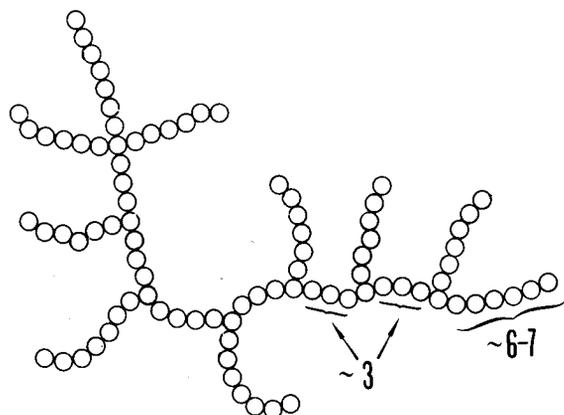
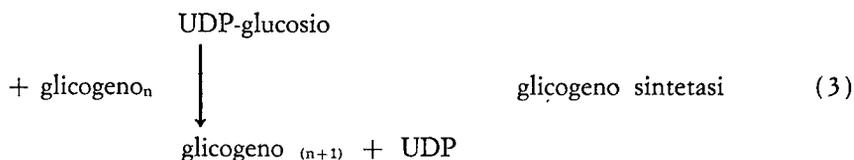


Figura 1.2

Si consideri un sistema costituito da particelle rigide, impermeabili, disperse in un liquido puro: la presenza di tali particelle nel liquido determina degli ostacoli allo scorrimento degli strati del liquido gli uni rispetto agli altri, aumentando le forze d'attrito e quindi l'energia dissipata nel mezzo sotto forma di calore. Questo aumento di difficoltà allo scorrimento dipende evidentemente dalla natura del liquido e si traduce, da un punto di vista macroscopico, in una viscosità della soluzione ( $\eta$ ) superiore a quella del solvente puro ( $\eta_0$ ). Allo scopo di valutare la perturbazione dovuta alle particelle, indipendentemente dal mezzo disperdente, si definiscono generalmente:



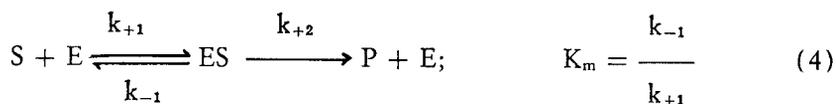
Nella reazione (2) compare una sintetasi che si può estrarre dal fegato, dal muscolo e dal cervello; l'enzima esige un accettore; il glicogeno già formato è certamente il migliore degli accettori, anche se, ad es., le maltodestrine possono fungere da accettori. Quando l'accettore è un glicogeno preformato (ad n molecole di glucoso) la (2) diventa:



La glicogeno sintetasi forma i legami glucosidici 1,4 delle catene rettilinee del glicogeno; l'enzima sussiste sotto due forme: 1) la forma D (dipendente) che esige la presenza di glucoso-6-fosfato per essere attiva; 2) la forma I (indipendente) che è attiva anche in assenza di glucoso-6-fosfato.

La forma D è attiva solo in presenza di concentrazioni di glucoso-6-fosfato dell'ordine di 10 mM, mentre le concentrazioni tissutali muscolari sono assai più basse: 0,2-0,5 mM. Questa forma D dell'enzima è poi inibita dalla concentrazione fisiologica 5 mM di fosfatoioni; pertanto la forma D sembra essere costantemente inattiva in vivo, salvo nel caso di una deficienza patologica di glucoso-6-fosfatasi che determina un abnorme incremento dei tassi di glucoso-6-fosfato, e che è la causa dell'accumulo patologico di glicogeno: glicogenosi di von Gierke. La forma I della glicogeno sintetasi è attiva anche in assenza di glucoso-6-fosfato, malgrado sia attivata da quest'ultimo nella misura del 40% circa; la forma I è pure attiva in presenza delle concentrazioni fisiologiche dei fosfatoioni. La forma I ha un'alta affinità per l'UDP-glucosio ( $K_m = 0,07 - 0,2$  mM) il quale nel muscolo ha una concentrazione fisiologica di 0,4 mM.

Ricordiamo che la  $K_m$  è la cosiddetta « costante di Michaelis », definibile in termini sperimentali come il valore della concentrazione del substrato (ad es. glucoso-6-fosfato) per la quale la velocità di reazione  $V$  è uguale alla metà della velocità massima ( $V_{max}$ ). Il valore della  $K_m$  indica una dissociazione, esprime cioè di quanto il substrato  $S$  e l'enzima  $E$  tendono a dissociarsi rispetto alla loro capacità di associarsi:



dove:  $k_{+1}$  = costante della velocità di associazione

$k_{-1}$  = costante della velocità di dissociazione

$k_{+2}$  = costante della velocità di formazione del prodotto  $P$  con rigenerazione dell'enzima  $E$ .

Ora è noto che la velocità di formazione del prodotto P è quantizzabile come:

$$V = \frac{V_{\max}}{\frac{K_m}{[S]} + 1} \quad (5)$$

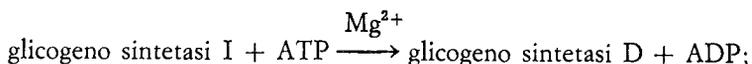
Se si assume una  $[S]_{50}$  tale per la quale  $V = 0,5 V_{\max}$ , si ha:

$$0,5 V_{\max} = \frac{V_{\max}}{\frac{K_m}{[S]_{50}} + 1}; \quad 0,5 \frac{K_m}{[S]_{50}} + 0,5 = 1; \quad 0,5 \frac{K_m}{[S]_{50}} = 0,5$$

$$K_m = [S]_{50} \quad (6)$$

Il valore della  $K_m$  è quindi misurato in unità di concentrazione; tanto più piccolo sarà questo valore, tanto più piccola sarà la dissociazione di E da S, ossia tanto maggiore sarà l'affinità di E per S, dato che l'affinità è l'inverso della dissociazione. Nella maggior parte delle reazioni catalizzate da un enzima con un solo substrato, la  $K_m$  ha valori compresi fra 0,01 mM e 10 mM.

Le due forme D ed I della glicogeno sintetasi sono interconvertibili; infatti la forma I può essere trasformata nella forma D a mezzo dell'azione catalitica di una « proteino chinasi », in presenza di ioni  $Mg^{2+}$  e di ATP:

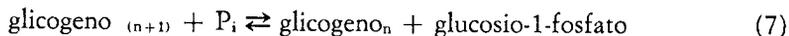


questa reazione è attivata specificamente dall'AMP-ciclico ( $K_m = 6 \times 10^{-5}$  mM).

La reazione inversa di trasformazione della forma D nella forma I è catalizzata da una specifica « fosfatasi » che è attivata dal glucosio ed inibita dal glicogeno. Lo schema di questi interventi enzimatici è riassumibile nella Figura 2.1.

## 2.2. La scissione del glicogeno e le glicogeno fosforilasi

La scissione degradativa del glicogeno si attua a partire dal polimero glicogeno (ad n molecole di glucosio) che viene scisso in glucosio-1-fosfato e glicogeno ad (n - 1) molecole di glucosio:



Questa reazione è catalizzata dalla glicogeno fosforilasi che scinde i legami  $\alpha$ -1,4 (ossia i legami lineari), mentre lascia indenni i legami  $\alpha$ -1,6 (ossia i legami di ramificazione).

La reazione (7) è reversibile; tuttavia va notato che, a pH = 7,0, l'equilibrio si verifica per un rapporto  $[P_i]/[\text{glucosio-6-fosfato}]$  uguale a 3; la sintesi del glicogeno (verso reattivo destra-sinistra della (7)) avviene per dei valori di

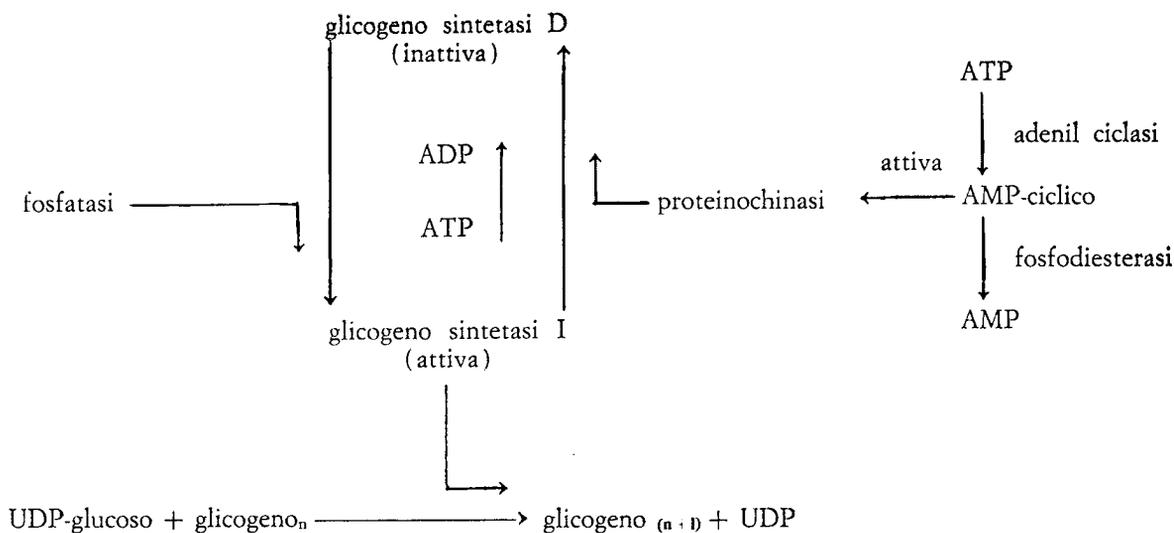
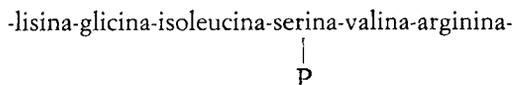


Fig. 2.1

rapporto di circa 300, il che indica che normalmente il verso reattivo è quello sinistra-destra, ossia quello della glicogenolisi. Il prodotto della (7), ossia il glucosio-1-fosfato, viene poi trasformato, ad opera della fosfoglucomutase, in glucosio-6-fosfato entrando così nella glicolisi.

La glicogeno fosforilasi esiste sotto due forme: la attiva *a*, e la inattiva *b*; il peso molecolare della forma *b* è 185.000, mentre quello della *a* è 370.000. La *b* è un dimero, mentre la *a* è un tetramero; ossia esse sono rispettivamente formate da due o da quattro unità monomeriche a peso molecolare 92.500. Ciascuna unità monomerica fissa una molecola di piridossalfosfato, la cui rimozione causa l'inattivazione, anche se non è stato dimostrato alcun intervento diretto dello stesso nella reazione (7); l'attività enzimatica può essere riottenuta mediante ricombinazione dell'apoenzima con il piridossalfosfato. Ciascun monomero contiene una molecola di serina che può essere fosforilata; la sequenza costitutiva viciniora a questa serina è la seguente:

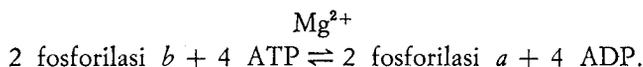


La forma *a* è fosforilata, mentre la forma *b* è defosforilata; la forma *a* fosforilata dell'enzima muscolare cristallizza sotto forma tetrameric. Tuttavia, la forma dimerica che può essere ottenuta per diluizione, per azione del glicogeno, del glucosio-6-fosfato e dell'AMP, ha una attività specifica cinque volte superiore alla forma tetrameric. La fosforilasi *a* è attiva in assenza di AMP, ma è tuttavia attivata

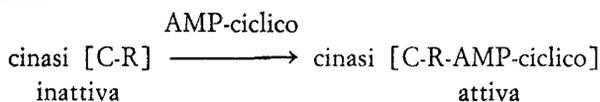
dall'AMP attraverso l'effetto di dissociazione dimerica: la concentrazione di AMP provocante il 50% dell'attivazione massimale è  $6 \times 10^{-3}$  mM.

La forma *b* non fosforilata esiste essenzialmente come dimero; la forma *b* inattiva viene attivata allostericamente dall'AMP. Tuttavia, le concentrazioni di AMP muscolare necessarie all'attivazione sono molto elevate: infatti le concentrazioni di AMP capaci di attuare una attivazione pari al 50% di quella massimale sono di  $2,2 \times 10^{-1}$  mM, a  $37^\circ$  e  $\text{pH} = 6,5$ . Dato che le concentrazioni muscolari di AMP sono scarse, allo stato di riposo si può pensare che le concentrazioni di fosforilasi *a* attiva condizionino la glicogenolisi.

L'interconversione delle forme *a* e *b* avviene enzimaticamente: la fosforilazione della forma *b* in forma *a* si attua in presenza di ATP, di  $\text{Mg}^{2+}$  e dell'enzima fosforilasi b cinasi:

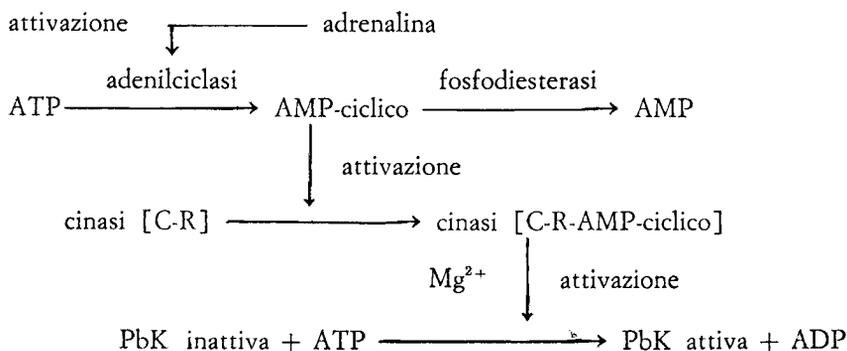


La fosforilasi *b* cinasi (PbK) isolata dal muscolo costituisce circa l'1% delle proteine solubili, ha peso molecolare 40.000, e si trova sotto forma inattiva; la sua attivazione avviene ad opera di ATP e  $\text{Mg}^{2+}$ , mediante fosforilazione dell'enzima a livello di una serina. Tale attivazione, pur potendo essere autocatalitica, si attua essenzialmente sotto l'azione di una cinasi, chiamata « proteino cinasi AMP-ciclico-dipendente », dotata di bassa specificità di substrato. In assenza di AMP-ciclico, la cinasi esiste sotto forma dimerica inattiva: una delle subunità (detta subunità C o catalitica) ha una attività proteino-cinasi indipendente dall'AMP-ciclico, mentre l'altra subunità (detta subunità R o regolatrice) ha la capacità di legare l'AMP-ciclico:



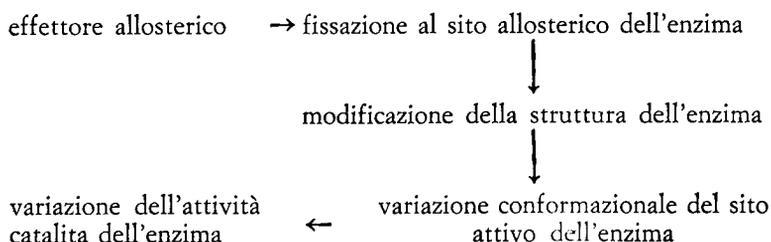
la  $K_m$  per l'AMP-ciclico essendo uguale a  $6 \times 10^{-5}$  mM.

D'altra parte l'AMP-ciclico è a sua volta formato nel muscolo per l'azione di un enzima: l'adenil-ciclastasi, attivato dell'adrenalina; l'AMP-ciclico è decomposto ad AMP da un altro enzima: la fosfodiesterasi. L'attivazione della PbK da AMP-ciclico è quindi la seguente:



Questa reazione costituisce un evidente esempio di attivazione allosterica.

Ricordiamo che si chiama « allosterismo » quel fenomeno per il quale la variazione dell'attività dell'enzima si accompagna ad una modificazione reversibile della struttura dell'enzima stesso, quale risultato della interazione di specifici effettori (attivatori od inibitori) con la proteina enzimatica. Non esiste cioè una analogia strutturale fra l'effettore ed il substrato su cui l'enzima agisce: ossia gli effettori sono « allosterici » rispetto al substrato, dato che si indica invece con « isosteria » la analogia strutturale. Lo schema di azione di un effettore allosterico è il seguente:

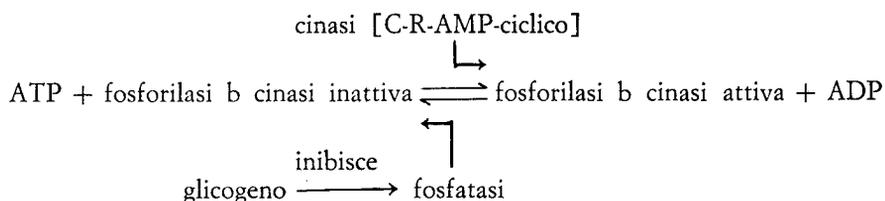


La fosforilasi b cinasi (PbK) inattiva viene attivata, oltre che dalla cinasi [C-R-AMP-ciclico], anche da altri due processi:

1) da un fattore proteico denominato *fattore cinasi-attivante* (o Kinase Activating Factor o KAF) che è una proteasi agente in presenza di  $\text{Ca}^{2+}$ ;

2) dagli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  (alla concentrazione  $10^{-4}$  mM) e da ortofosfato, in presenza di enzima estrattivo purificato; dato che  $\text{Ca}^{2+}$  ed ortofosfato sono liberati in maniera istantanea allorché si attua un impulso nervoso stimolante le miofibrille, si avrà una attivazione allosterica istantanea della PbK.

La PbK attiva può trasformarsi in PbK inattiva sotto l'effetto di una fosfatasi, denominata *fosforilasi b cinasi fosfatasi*, attivata da  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ed inibita da EDTA,  $\text{F}^-$  e glicogeno



L'effetto inibitore del glicogeno sull'azione della fosfatasi è molto importante, perché permette, durante la prestazione, di attuare il verso reattivo sinistra-destra, con costante formazione di PbK attiva. La fosforilasi *a* può essere trasformata in fosforilasi *b* sotto l'azione di una fosfatasi, denominata *fosforilasi a-fosfatasi*; tale enzima è inibito dall'AMP-ciclico e l'inibizione diviene totale per una concentrazione di AMP-ciclico pari a  $1 \times 10^{-2}$  mM.

Nel complesso quindi, la regolazione della glicogenolisi a livello delle fosforilasi avviene per mezzo di due processi regolativi:

1) un processo di tipo allosterico, per il quale vari fattori di correlazione (tra cui il più importante è l'AMP-ciclico) intervengono in maniera non covalente per modulare l'attività sia della fosforilasi *a* che di quella *b*; 2) un processo di modificazione covalente, per il quale si ha la fosforilazione della forma *b* in *a*, processo che dipende da una serie di attivazioni a cascata, come indicato nello schema della Figura 2.2.

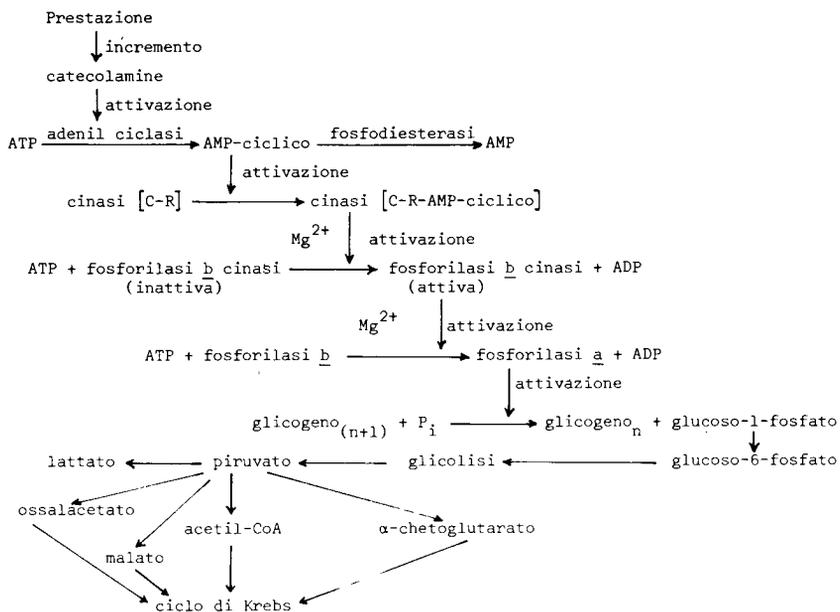


Figura 2.2

E' interessante notare come i fenomeni della glicogenolisi e della glicogeno-sintesi siano regolati da enzimi che presentano caratteristiche e funzionalità inverse, come indicato nella Tabella 2.I.

Tabella 2.I.

Glicogeno sintetasi			Fosforilasi		
forma	fosforilazione	attività	forma	fosforilazione	attività
D	si	no	a	si	si
I	no	si	b	no	no

### 3. Metodi di valutazione qualitativa e quantitativa del glicogeno

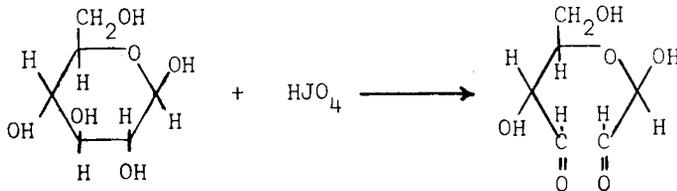
La valutazione del glicogeno muscolare può essere effettuata sia con metodi istochimici (attuati su preparati istologici) sia con metodi chimico-analitici (attuati estraendo il glicogeno da frammenti di tessuto).

#### 3.1 Metodi istochimici di valutazione del glicogeno

3.1.1. *Metodo Best al carminio.* Questo metodo non dà una indicazione globale della disposizione del glicogeno, poiché solo la frazione idrosolubile (lioglicogeno) si colora in rosso, mentre la frazione non solubile legata ad altre strutture (desmoglicogeno) non può essere evidenziata. Inoltre il carminio non è specifico per la dimostrazione del lioglicogeno, poiché esso colora anche muco, fibrina, ghiandole gastriche e granuli dei mastociti. Per questo motivo si dubita che sia proprio il glicogeno a venir colorato dal carminio, e non piuttosto il mucoide basico, a cui è associato il glicogeno. E' infatti improbabile che una sostanza ad alto peso molecolare come il carminio penetri o si depositi in una molecola così fitta quale quella del glicogeno.

3.1.2. *PAS reazione secondo Hotchkiss e McManus.* La reazione PAS o Per-iodic Acid Schiff's reaction (reazione dell'acido per-iodico di Schiff) è un altro metodo che permette la valutazione qualitativa del glicogeno. Esso si basa sulla idrolisi elettiva dei glicidi e sull'ossidazione dei due gruppi CHO, in posizione 1 e 2, in gruppi aldeidici (CHO), mediante trattamento con acido per-iodico ( $\text{HJO}_4$ ).

La reazione con acido per-iodico decorre nel modo seguente:



I gruppi aldeidici così ottenuti vengono successivamente colorati in rosso mediante fuxina solforosa (reagente di Schiff).

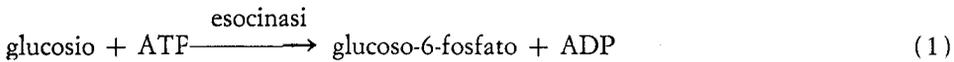
Tuttavia anche questo metodo, pur essendo più specifico del precedente, permette la dimostrazione solo del lioglicogeno.

L'intensità della colorazione PAS può essere classificata arbitrariamente, allo scopo di evidenziare la distribuzione del glicogeno nelle fibre muscolari. Il sistema di classificazione di Piehl (1974) prevede quattro categorie: scura (la fibra più intensamente colorata dal PAS nel campione), moderata, chiara e negativa (nessuna colorazione): la classificazione è eseguita al microscopio ottico, direttamente dai vetrini che portano la fettina di muscolo colorata con PAS; per identificare i diversi tipi di fibre sono usate microfotografie di campioni colorati per l'ATPasi della miosina. L'attendibilità del metodo di classificazione è controllata con un sistema fotometrico (Edgerton et al., 1974) ed il rapporto tra la valutazione soggettiva dell'intensità della colorazione PAS e la lettura fotometrica risulta essere di circa 0,8.

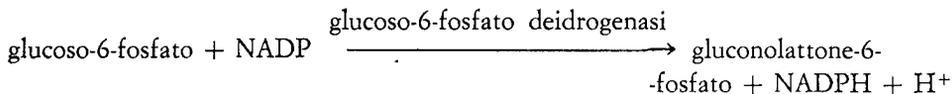
### 3.2. Metodo analitico di valutazione del glicogeno

Da un frammento di muscolo si ottiene, dopo opportuni trattamenti e centrifugazioni, un precipitato costituito dal glicogeno contenuto nel frammento tissutale esaminato.

E' possibile così valutare quantitativamente il glicogeno: esso viene inizialmente scisso, mediante trattamento con acido solforico, nelle molecole di glucosio che lo compongono; le molecole di glucosio così ottenute vengono successivamente dosate con un metodo, basato sul principio di Schmidt, secondo cui il glucosio viene fosforilato dall'ATP a glucoso-6-fosfato per mezzo dell'enzima esocinasi:



Il glucoso-6-fosfato, in presenza di NADP e per azione dell'enzima glucoso-6-fosfato deidrogenasi, viene trasformato in gluconolattone-6-fosfato:



E' possibile calcolare la quantità di NADPH che si forma dall'NADP seguendo allo spettrofotometro (alla lunghezza d'onda di 366 m $\mu$ ) l'andamento dei valori di estinzione: tali valori sono proporzionali alle moli di gluconolattone-6-fosfato prodotte e quindi alle moli di NADPH formato.

Poiché la quantità di NADPH prodotta è equivalente alla quantità di glucoso-6-fosfato ottenuto in (1), è possibile in ultima analisi risalire alla quantità di glucosio presente nel tessuto analizzato.

### 3.3. Attendibilità comparativa dei metodi istochimici ed analitici

I metodi esaminati hanno ovviamente vantaggi e svantaggi. I metodi analitici danno delle valutazioni quantitative ben precise e ripetibili; tuttavia essi evidenziano che in un certo frammento muscolare è presente una certa concentrazione media di glicogeno, ma non danno, ovviamente, alcuna indicazione sulla sua distribuzione. In questo senso vengono in soccorso i metodi istochimici i quali, pur essendo sostanzialmente qualitativi o semi-quantitativi, indicano in maniera probante la distribuzione del glicogeno nella zona di tessuto esaminata: è così possibile evidenziare, ad es., una diversa deplezione od accumulo di glicogeno nelle fibre ST rispetto alle fibre FT.

Purtroppo anche queste indicazioni hanno un significato relativo in quanto sono correlate alla sezione del frammento di muscolo in esame; pertanto non è sempre facile identificare le evidenze istochimiche di una minuscola sezione con la realtà distributiva di tutta una grossa massa muscolare. Ciò è valido in particolare per l'uomo dove, per evidenti necessità di rispetto della integrità dello stesso, i

prelievi sono di modesta entità (40-80 mg), di diametro limitato (1,0-2,5 mm) e non superiori a due o tre per ogni grossa massa muscolare. Queste limitazioni sono alquanto mitigate dal fatto che si ritiene che almeno ciascuna unità motoria sia costituita da un unico tipo di fibre muscolari (Kugelberg e Edström, 1968) e che a riposo il contenuto di glicogeno sia abbastanza uniformemente distribuito nello stesso gruppo muscolare (Hultman, 1967). Non va però dimenticato che l'attivazione funzionale da prestazione può, in una grossa massa muscolare, essere disomogenea: in questo caso non è possibile estendere all'intero muscolo i reperti acquisiti su di un singolo frammento.

Le valutazioni istochimiche sono di tipo qualitativo e quindi consentono, al più, di costruire scale di misura semi-quantitative arbitrarie, basate su tre o quattro gradazioni di intensità di colorazione del glicogeno. Purtroppo, a partire da un certo livello (circa 80 mM di glicogeno) l'intensità della colorazione (ad es., al PAS) è sempre la stessa: ciò può dare luogo a grossi equivoci interpretativi.

E' quindi evidente che solo la contemporanea attuazione di rilievi analitici, istochimici ed enzimostochimici su un alto numero di prelievi dalla stessa massa muscolare può dare una visione abbastanza vicina alla realtà fisiologica e biochimica.

#### 4. Glicogeno e tipi di fibre muscolari

Le prime osservazioni sulla costituzione dei muscoli scheletrici furono pubblicate nel 1678 da Lorenzini, il quale aveva riscontrato una differenza di colore in alcuni muscoli di coniglio; a quel tempo si riteneva che il colore rosso di alcuni muscoli fosse da attribuirsi ad una maggiore irrorazione sanguigna. Nel 1850 Kölliker avanzò l'ipotesi, successivamente confermata da Kühne (1865), che il pigmento colorante fosse contenuto nella sostanza contrattile delle fibre: la sostanza pigmentante fu chiamata « miocromo » da Mörner nel 1897, ma il suo nome venne successivamente mutato in « mioemoglobina » o « mioglobina » da Günther nel 1921. Si era frattanto osservato che i muscoli più attivi contenevano quantitativi più elevati di questa sostanza (Lankester, 1871) e che, mediante la stimolazione elettrica dei muscoli « rossi » e « bianchi », quelli « rossi » si contraevano e si rilassavano più lentamente di quelli « bianchi » (Ranvier, 1873). Nel 1887 Grützner ed altri ricercatori studiarono il comportamento del muscolo durante una singola contrazione o durante il tetano e Gleiss avanzò l'ipotesi che i muscoli « rossi » ed i muscoli « bianchi » avessero un diverso metabolismo. In un accurato studio del 1891, Knoll chiamò queste fibre « protoplasma-arm » e « protoplasma reich » rispettivamente; anche Grützner giunse alla conclusione che i muscoli dei mammiferi superiori dovessero essere una intima commistione di fibre « rosse » e « bianche », e che le proprietà contrattili di un muscolo dipendessero dal rapporto tra questi due tipi di fibre. Tutte queste osservazioni hanno contribuito al consolidarsi di un'opinione corrente secondo la quale i muscoli « rossi » sono impegnati nel lavoro continuativo di grado elevato, mentre i muscoli « bianchi » sono implicati nelle contrazioni rapide ed intense, ma di breve durata.

#### 4.1. Differente costituzione delle fibre muscolari

I tessuti muscolari di varie specie animali sono stati oggetto di attenti studi istochimici e biochimici, e sono stati descritti almeno due, o più, tipi di fibre. In *vari mammiferi*, Ogata (1958) ne ha evidenziati tre tipi, mediante un metodo basato sulla intensità della colorazione degli enzimi ossidativi; il medesimo autore ha successivamente riscontrato differenze nel contenuto di glicogeno e nell'attività glicolitica delle fibre, usando esclusivamente preparati istologici di fibre muscolari « rosse » o « bianche » (Ogata, 1960). Nonostante si fossero osservate delle differenze nel metabolismo e nel contenuto di substrato delle fibre, le proteine presenti in esse risultarono identiche: questo fatto venne evidenziato per la prima volta da Meyer e Weber nel 1933, e fu successivamente confermato da Bàràny (1965). Si è riscontrato anche una maggiore attività ATPasica nei muscoli « bianchi » rispetto a quelli « rossi » e questa differenziazione biochimica fu posta in relazione con la maggiore velocità di contrazione dei muscoli « bianchi » (Bàràny, 1967). Un altro elemento correlato alla velocità di contrazione risultò essere la maggiore o minore intensità di colorazione per l'ATPasi miosinica (Barnard et al., 1971), determinata mediante la tecnica istochimica di Padykula e Herman (1955).

Va poi rilevato che nei cosiddetti muscoli bianchi sono stati riconosciuti tre tipi di fibre, caratterizzati da differenti risposte ai metodi istochimici per gli enzimi saggiati (deidrogenasi lattica (LDH), deidrogenasi succinica (SDH), nicotinamide-adenin-dinucleotide diaforasi (NADH-d) ) ed ATP-asi miofibrillare. Tale caratterizzazione si è effettuata seguendo ciascuna delle numerose fibre di un fascio muscolare, in sezioni trasverse seriate ottenute in criostato, sulle quali è stata ripetuta più volte la citata sequenza di metodi istoenzimologici. Si è così stabilito che: a) tutte le fibre dotate di debole risposta al metodo per l'ATPasi (tipo I) rivelano un forte contenuto in enzimi ossidativi; b) tra quelle fortemente positive per l'ATPasi alcune (tipo II) rispondono debolmente ai metodi per i suddetti enzimi, mentre altre (tipo III) offrono risposte intermedie (Margreth et al., 1974).

Quanto alla grandezza, nei muscoli bianchi le fibre del II tipo risultano le più voluminose, mentre quelle del I tipo e del III hanno diametri medi minori e simili, risultando alquanto minori quelli delle fibre del I tipo. Quanto al numero, le fibre del II tipo sono sempre in maggioranza (intorno al 50%); le altre costituiscono due gruppi minori, tra i quali prevale di poco quello delle fibre del III tipo. Viene pertanto confermata la composizione caratteristica dei c.d. muscoli bianchi dei mammiferi in tre tipi di fibre tra loro commisti. Il I sembra essere simile alle c.d. fibre « rosse o lente » (« piccole-scure » ai metodi per gli enzimi ossidativi); il II alle c.d. fibre « bianche o rapide » (« grandi-chiare » a tali metodi) dei muscoli umani. Ciò è confermato dalle loro opposte risposte per l'ATPasi: deboli nel I tipo, forti nel II.

Problematico resta il significato del III tipo, che dà risposte intermedie per gli enzimi ossidativi e risulta pure intermedio come grandezza delle fibre: cioè presenta una sorta di « totipotenza » relativamente al corredo enzimatico preso in

Tabella 4.1. - Comparazione secondo Pichl (1974) dei diversi sistemi di classificazione delle fibre muscolari: la nomenclatura è basata sul sistema classificativo di Barnard et al. (1971).

AUTORI	METODO	SPECIE	NOMENCLATURA	
Barnard et al. (1971)	Istochimico multiplo	cavia	rosso	intermedio
Ogata (1958, 1969)	Istochimico multiplo	coniglio e uomo	intermedio	rosso
Stein e Padykula (1962)	Istochimico multiplo	ratto	tipo C	tipo B
Romanul (1964)	Istochimico multiplo	ratto	gruppo II	gruppo III
Olson e Swett (1966)	Presunta velocità di contrazione	gatto	veloce	lento
Barany (1967)	Attività ATPasica	diverse	tipo II	tipo I
Burke (1967)	Istochimico multiplo	gatto	tipo FR	tipo S
Gauthier (1969)	Microscopia elettronica	ratto	intermedio	rosso
Peter et al. (1972)	Determinazione quantitativa di enzimi e substrati con esame istochimico multiplo	coniglio e cavia	fast-twitch (ossidative glicolitiche)	slow-twitch (ossidative)
Dubowitz e Pearce (1960)	Istochimico multiplo	varie sp. e uomo	—	rosso
Ogata e Mori (1964)	Istochimico multiplo	uomo	<b>medio</b>	rosso
Engel (1962)	ATPasi (istochimico)	uomo	—	tipo I
James (1968)	Mioglobina	uomo	—	molta
Edström e Nyström (1969)	ATPasi (istochimico)	uomo	—	tipo I
				veloce
				tipo II
				tipo FF
				bianco
				fast-twitch (glicolitiche)
				bianco
				bianco
				tipo II
				poca
				tipo II

considerazione per queste esperienze condotte sui muscoli bianchi di animali da laboratorio (Margreth et al., 1974).

I lavori sui muscoli scheletrici dell'uomo forniscono dati istochimici e tentativi di caratterizzare i vari tipi di fibre e la loro costituzione. Così, mediante la colorazione istochimica per diversi enzimi e substrati, Engel (1962) stabilì su preparati istologici l'esistenza di due tipi di fibre (tipo I e tipo II) ed alle medesime conclusioni giunsero Edström e Nyström (1969). Altri ricercatori hanno fatto uso di altri metodi di colorazione istochimica dei preparati istologici per identificare i vari enzimi e substrati, per cui la nomenclatura ha subito grosse variazioni creando una notevole confusione terminologica, come riassunto nella Tabella 4.I.

Il glicogeno nei muscoli è stato descritto per la prima volta nel 1859 da Bernard. La sintesi del glicogeno fu studiata invece da Leloir e coll. (1959), i quali trovarono che essa aveva alla base un sistema enzimatico: uno degli enzimi implicati, la glicogeno sintetasi, risultò essere « rate-limiting factor », ossia un fattore limitante la velocità della « sintesi » del glicogeno. Successivamente Benzi ed Arrigoni (1971) hanno avanzato l'ipotesi che le sequenze biochimiche legate alla attivazione della fosforilasi *b* siano fattori limitanti la scissione del glicogeno durante le prestazioni, ed Asmussen et al. (1974) hanno proiettato questo dato nell'uomo.

Sia il glicogeno, che i due enzimi coinvolti nella sua regolazione (la glicogeno sintetasi e la fosforilasi), variano secondo il tipo di fibra dei muscoli scheletrici delle varie specie animali, uomo compreso, come riportato nella Tabella 4.II. Supponendo che le attività della glicogeno sintetasi e della fosforilasi riflettano la capacità della fibra muscolare di sintetizzare e utilizzare il glicogeno, sembra assai probabile che le fibre con un elevato livello di tali enzimi usino prevalentemente il glicogeno come fonte energetica; ora è noto che le fibre « bianche » hanno un alto contenuto di glicogeno e di fosforilasi.

Sulla glicogeno sintetasi sono state pubblicate osservazioni contraddittorie: secondo George e Naik (1958) le fibre di dimensioni maggiori sono cariche di glicogeno ed enzima, e quindi adatte ad azioni rapide e improvvise; anche Engel (1962) osserva che le fibre di tipo II (ossia le « bianche ») nei tessuti umani sono ricche sia di glicogeno che di enzima. Al contrario, Sasaki e Takeuchi (1963) trovarono una debole intensità di colorazione per la fosforilasi nelle fibre di dimensioni maggiori. Stein e Padykula (1962) hanno formulato l'ipotesi che le modificazioni nel contenuto di glicogeno (intensità della colorazione PAS) riflettano le diverse fasi di un ciclo di accumulo e liberazione di glicogeno: la maggiore intensità di colorazione per il glicogeno nelle fibre di tipo A (tipo II o bianche) potrebbe essere interpretata come una prova che tali fibre sintetizzano il glicogeno più velocemente o che lo utilizzano in misura minore. Stein e Padykula (1962) hanno sottolineato l'importanza di usare la colorazione PAS unitamente ad una determinazione quantitativa del glicogeno allo scopo di seguire gli eventi dinamici correlati alla deplezione di glicogeno nelle fibre muscolari per giungere in tal modo a stabilire in quale tipo di fibra si verifica la deplezione. Una perdita preferenziale di

*Tabella 4.II.* - Contenuto di glicogeno e attività della glicogeno sintetasi e della fosforilasi nelle fibre muscolari di diverse specie, uomo incluso. Questa valutazione soggettiva è valida solo a fini di confronto nell'ambito di uno stesso lavoro e non può essere usata per un confronto diretto tra dati desunti da lavori differenti.

AUTORI	SPECIE	METODI (istochimici e quantitativi)	CONTENUTO NEI TIPI DI FIBRE	
			rosse	intermedie bianche
George e Naik (1958)	piccione	carminio; quantitativo per il glicogeno	basso	alto
Ogata (1960)	coniglio	quantitativo per il glicogeno	basso	alto
Stein e Padykula (1962)	ratto	PAS	basso	alto
Kugelberg e Edström (1968)	ratto	PAS; fosforilasi (a & b)	alto	medio
Gillespie et al. (1970)	cavia	quantitativo		medio
Peter et al. (1972)	cavia e coniglio	per il glicogeno PAS; fosforilasi (a & b)	alto	basso
Lindholm e Piehl (1974)		quantitativo	alto	alto
Hess e Pearse (1961)	cavallo	per il glicogeno quantitativo per la fosforilasi (a & b)	alto	medio
St. George Stubbs e Blanchaer (1965)	ratto	PAS	medio	alto
	cavia	sintetasi (I & D) fosforilasi (a & b)	medio	alto
		sintetasi (I & D) fosforilasi (a & b)	basso	basso
		quantitativo	basso	alto
		per la sintetasi (I & D)	basso	basso
		quantitativo	alto	alto
		per la fosforilasi (a & b)	basso	basso
Bocck e Beatry (1966)	ratto e scimmia	sintetasi (I & D) fosforilasi (a & b)	medio	alto
		quantitativo	medio	medio
		per la sintetasi (I & D)	alto	basso
Dubowitz e Pearse (1960)	diverse sp. e uomo	quantitativo	basso	alto
Engel (1962)	uomo	per la fosforilasi (a & b) fosforilasi (a & b)	basso	alto
Edström e Nyström (1969)	uomo	PAS; fosforilasi (a & b) sintetasi (I & D)	basso	alto
	uomo	<b>PAS; fosforilasi (a &amp; b)</b>	basso	alto

glicogeno fu osservata nelle fibre « bianche », o di tipo A, allorchando singole fibre nervose, od interi nervi, o direttamente i muscoli di ratto sono stati sottoposti a stimolazione elettrica (Kugelberg e Edström, 1968; Edgerton et al., 1970). Successivamente, si è evidenziato che nelle cavie e nei ratti l'esercizio muscolare poteva modificare le sequenze fisiologiche che presiedono alla deplezione del glicogeno a livello delle varie fibre muscolari (Edgerton et al., 1970; Armstrong et al., 1973).

L'ipotesi di una influenza differenziativa della innervazione motoria sulle caratteristiche contrattili intrinseche delle fibre muscolari ha una correlazione specifica con il processo di specializzazione delle fibre in « lente » e « rapide », in rapporto al tipo di risposta funzionale. Tale processo ha luogo nelle fasi tardive dell'ontogenesi, principalmente nelle prime settimane dopo la nascita nelle specie con prole inetta. Esperimenti di innervazione crociata tra muscoli lenti e rapidi hanno inoltre dimostrato che l'effetto « trasformante » dell'innervazione motoria persiste nell'età adulta, con modificazione completa, o quasi completa, delle proprietà contrattili dei muscoli reinnervati dopo un periodo di diversi mesi (Buller, 1972).

Queste osservazioni fisiologiche, ormai classiche, hanno costituito il punto di partenza per una serie di indagini rivolte a chiarire: a) le basi molecolari delle differenze fisiologiche tra muscoli lenti e rapidi; b) i meccanismi che mediano il controllo nervoso sulla espressione genica e che determinano e stabilizzano l'uno o l'altro fenotipo muscolare prevalente. Sono stati effettuati degli studi (Margreth, 1972) che dimostrano l'esistenza di un controllo epigenetico da parte della innervazione muscolare sulle proprietà catalitiche e sulla composizione molecolare della miosina, e sulla attività di trasporto del calcio del reticolo sarcoplasmico. Lo studio di questi due siti di controllo è pertinente ai fini di una integrazione di dati biochimici e fisiologici, data la correlazione tra attività ATPasica della miosina e velocità massima di contrazione muscolare da un lato, ed il ruolo esercitato dal reticolo sarcoplasmico nel rilasciamento, dall'altro (Close, 1972).

La miosina dei muscoli di vertebrati ha una struttura molecolare caratterizzata da due catene identiche con un peso molecolare di circa 200.000 (*catene pesanti*) e da quattro subunità di circa 20.000 (*catene leggere*) (Lowey et al., 1969). Le differenze in proprietà enzimatiche della miosina isolata da muscoli lenti e rapidi di diverse specie sono state attribuite principalmente alla diversa composizione in catene leggere. Mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide in presenza di SDS, si è potuto dimostrare che la miosina « rapida » contiene tre tipi di catene leggere (di peso molecolare 25.000, 18.000 e 16.000 circa) e quella « lenta » due tipi distinti di catene polipeptidiche (di peso molecolare 27.000 e 20.000) rispettivamente.

Studi recenti (Margreth et al., 1974) hanno riguardato l'analisi comparata della miosina di diversi muscoli di mammiferi, uccelli ed anfibi. I dati dimostrano che il « pattern » tripartito delle catene leggere della miosina rappresenta una caratteristica comune non solo dei muscoli rapidi con attività fasica-intermittente (muscoli bianchi), ma anche di quei muscoli con attività fasica sostenuta (quali il massetere di ratto ed il pettorale di piccione) che per caratteristiche metaboliche

aerobiche sono assimilabili ai muscoli lenti con attività tonico-posturale (rossi). Ne deriva, pertanto, che i fattori implicati nella determinazione di queste caratteristiche molecolari della miosina sono funzionalmente, se non causalmente, correlati con la intermittenza o continuità della attività motoria e indipendenti, invece, dall'attività muscolare totale. Tale convergenza biochimica dei muscoli di diverse specie in rapporto al tipo prevalente di attività, fasica o tonica, è di particolare interesse in vista di un'analoga convergenza per quanto riguarda la composizione proteica ed enzimatica del reticolo sarcoplasmico. In tutti i muscoli fascici, la ATPasi per il trasporto del calcio, con un peso molecolare di circa 100.000, è la proteina intrinseca principale delle membrane isolate. Il profilo elettroforetico delle proteine sarcoreticolari dei muscoli lenti è caratteristicamente più complesso, la quantità di ATPasi proporzionalmente più bassa, oltre ad esserne apparentemente ridotto il numero di siti attivi fosforilabili.

#### 4.2. Criteri di classificazione delle fibre muscolari nell'uomo

Si è prima evidenziato come le fibre muscolari siano oggetto di molteplici classificazioni: il più comune termine « a contrazione lenta » ed « a contrazione rapida » (ST e FT, rispettivamente) tiene conto delle caratteristiche contrattili delle fibre. Questa modalità di attuare una classificazione ha una sua logicità, in quanto altri criteri sono stati esaminati ma non hanno portato a risultati costanti nelle varie condizioni sperimentali. Bàràny (1967) ha segnalato che l'attività specifica della ATPasi miosinica è proporzionale alla velocità di contrazione delle fibre muscolari, e Guth e Samaha (1969) hanno dimostrato che l'attività dell'ATPasi actomiosinica è correlata alla ATPasi miosinica evidenziabile istochimicamente. Gli studi più completi sulle proprietà istochimiche, biochimiche e contrattili delle fibre muscolari sono stati effettuati tuttavia nel muscolo di cavia (Barnard et al., 1971): nelle fibre a contrazione lenta è risultata presente, a basso livello di attività, la ATPasi miosinica, con valori inversi per le fibre veloci.

Il supporre che tali risultati siano direttamente applicabili ai tessuti umani presenta ovviamente alcune difficoltà: tuttavia, sono stati pubblicati numerosi lavori nei quali si avanza l'ipotesi che i muscoli umani siano composti da fibre di due tipi diversi, che si differenziano appunto per il tempo di contrazione (Eberstein e Goodgold, 1968; McComas e Thomas, 1968). Buchthal e Schmalbruch (1970) hanno posto in relazione nell'uomo le differenze nella velocità di contrazione con la maggiore o minore intensità di colorazione della ATPasi miosinica; inoltre, rilievi sui muscoli intercostali hanno mostrato una correlazione tra il tempo di contrazione e l'attività della ATPasi miosinica misurata quantitativamente (Edgerton, 1974), il che è in accordo con i dati ottenuti con i muscoli flessori umani (Bàràny, 1967). Questi risultati confermano l'opportunità di usare i termini « a contrazione lenta » ed « a contrazione rapida » anche per i tessuti muscolari dell'uomo.

La ragione per cui non si ritiene opportuno adottare una classificazione delle fibre muscolari basata sulle proprietà ossidative del tessuto (ad es., reazione NADH

diaforasi) è motivata dal fatto che entrambi i tipi di fibre (ST e FT) presentano tutta una gamma di capacità ossidativa che rende difficile una distinzione tra i due tipi stessi. Inoltre, il potenziale ossidativo delle fibre muscolari viene accresciuto dall'allenamento di durata (Holloszy, 1967; Benzi, 1972; Gollnick et al., 1973) e ciò comporterebbe una modifica sia dello schema di colorazione che della classificazione basata sulle proprietà ossidative tissutali; al contrario non sono stati descritti effetti di questo tipo sulla ATPasi miosinica a seguito di esercizio fisico (Barnard et al., 1970; Gollnick et al., 1973) anche se sono stati descritti effetti simili negli animali in seguito a stimolazione elettrica (Close, 1965; Dubowitz, 1967; Bàràny e Close, 1971; Srèter et al., 1973; Brown et al., 1974). A tutt'oggi comunque non sono disponibili dati definitivi sugli effetti prodotti dall'allenamento sull'attività della ATPasi miosinica nell'uomo: Thorsensson et al. (1975) hanno dimostrato che uno specifico allenamento di velocità nell'uomo può indurre un incremento nella attività della ATPasi miosinica, della miocinasi e della creatinfosfocinasi. Lo stesso Autore tuttavia non ha confermato tali rilievi (per l'ATPasi miosinica e per la miocinasi) in uno studio successivo (1976) in cui venivano modificate le modalità tecniche di allenamento. Si può concludere che le caratteristiche contrattili sono relativamente le più stabili e pertanto esse costituiscono un parametro idoneo sul quale basare la classificazione delle fibre muscolari umane.

In base a ciò risulta corretto identificare due tipi di fibre che sono chiamati rispettivamente a « contrazione lenta (ST) » e a « contrazione rapida (FT) »: le fibre ST mostrano una bassa intensità di colorazione per l'ATPasi della miosina mentre le fibre FT presentano una elevata intensità di colorazione. Inoltre, le fibre ST si colorano più intensamente di quelle FT per la NADH diaforasi, cui sono legate le proprietà ossidative tissutali. L'intensità della colorazione per l'NADH diaforasi nelle fibre FT varia notevolmente da soggetto a soggetto, ma non nell'ambito di un medesimo muscolo.

Per quanto concerne la distribuzione delle fibre ST e FT, vi sono notevoli variazioni individuali sia in individui allenati che in individui non allenati (Gollnick et al., 1972); tuttavia, in condizioni di base, la variazione tra i muscoli deltoide e quadricipite femorale di uno stesso soggetto non allenato supera raramente il 10-15%. La percentuale di fibre ST è generalmente maggiore nei soggetti sottoposti ad allenamento di durata, mentre in quelli allenati alla velocità la proporzione è pressoché la stessa che nei soggetti sedentari, pur potendosi rilevare in qualche caso una prevalenza delle fibre FT.

Nella maggior parte dei preparati istologici di fettine di muscolo, la sezione delle fibre FT ha un'area maggiore di quella delle fibre ST: ambedue i tipi di fibre appaiono più larghi nelle gambe che nelle braccia. Il tipo di allenamento influenza l'estensione dell'area delle fibre nei soggetti allenati che impiegano in misura notevole gambe (ciclisti) e braccia (canoisti e nuotatori). Ciononostante, esiste una relazione lineare tra la percentuale di fibre ST e l'area da esse coperta. Di conseguenza la composizione di un muscolo, espressa in termini di percentuale dei

Tabella 4.2.I - Comparazione fra le caratteristiche dei muscoli degli animali da esperimento (cavia e ratto) e dell'uomo. FVO = fibre veloci ossidative; FLO = fibre lente ossidative, FVG = fibre veloci glicolitiche.

Parametro biochimico esaminato	Animali da esperimento		Uomo
	FVO/FLO	FVG/FLO	Tipo II/Tipo I
Caratteristiche contrattili			
— ATPasi miosinica	2,4	2,3	2,8
Substrati			
— Glicogeno	2,9	2,2	1,0
— Trigliceridi	1,2	0,8	0,4
Potenziale glicolitico			
— Rapporto: fosfofruttocinasi			
$\alpha$ -glicerofosfato deidrogenasi	2,7	2,7	1,9
Potenziale ossidativo			
— Succinico deidrogenasi	1,5	0,4	0,7

vari tipi di fibre, è un buon indice dell'estensione dell'area di ciascun tipo di fibre nel muscolo stesso.

In campo sperimentale Peter et al. (1972) hanno descritto le caratteristiche biochimiche specifiche delle fibre dei muscoli scheletrici di cavia e ratto; gli Autori hanno differenziato tre tipi di fibre denominate: *veloci ossidative* o FVO o fast twitch oxidative (rosse, tipo II); *veloci glicolitiche* o FVG o fast twitch glycolytic (bianche, tipo II); *lente ossidative* o FLO o slow twitch oxidative (intermedie, tipo I). Anche i muscoli umani sono una miscelazione dei vari tipi di fibre (Johnson et al., 1973), per cui è difficile definirne la caratterizzazione metabolica. Un modo per superare parzialmente tale difficoltà tecnica è quello di utilizzare campioni di muscoli umani contenenti una percentuale nota di fibre di tipo I e II, estrapolando poi le valutazioni biochimiche come percentuale dei due tipi di fibre (Taylor et al., 1974). Un metodo più valido è quello di separare singolarmente le fibre muscolari umane per attuare determinazioni biochimiche quantitative sulle stesse dopo averne definita l'appartenenza ai vari tipi (Essén et al., 1975). Questo procedimento è lungo e tedioso: tuttavia consente di esprimere i valori dei vari parametri biochimici in funzione del peso a secco; un approccio per calcolare tali valori in funzione del peso a fresco, è quello di calcolare come pari al 76% il contenuto di acqua del muscolo.

La specializzazione biochimica e bioenergetica dei vari tipi di fibre muscolari ha una importanza fondamentale per l'attuazione di razionali metodologie di allenamento. Purtroppo i dati relativi all'uomo sono ovviamente estremamente scarsi, data la difficoltà di disporre di materiale; al contrario si hanno molti dati in campo sperimentale su materiale muscolare prelevato da ratto, cavia, coniglio, cane, ecc. Il problema è quindi quello di operare una comparazione fra i tipi di fibre muscolari umane e quelle di altre specie. Può servire come base una comparazione (Tabella 4.2.I) su alcune caratteristiche biochimiche quantitativamente determinate nelle

porzioni *bianca* e *rossa* del vasto laterale e del soleo di cavia (Peter et al., 1972), di ratto (Reitman et al., 1973) e di uomo (Essén et al., 1975). Da questa comparazione risulta che l'attività della ATPasi miosinica è analoga nelle fibre di tipo I (ossia fibre lente) dell'uomo e quelle lente ossidative (FLO) della cavia; le fibre di tipo II (ossia fibre veloci) dell'uomo hanno una lieve maggiore attività ATPasica rispetto a quella delle fibre veloci glicolitiche e veloci ossidative dell'animale da esperimento. Il contenuto in glicogeno delle fibre umane lente è considerevolmente più alto di quello delle fibre lente ossidative della cavia. Inoltre il 50% del glicogeno è contenuto nelle fibre umane di tipo lento; in particolare si rileva dalla Tabella 4.2.I che il rapporto fra la concentrazione del glicogeno muscolare nelle fibre di tipo veloce (tipo II) e quella delle fibre di tipo lento (tipo I) è di 1, mentre nell'animale da esperimento tale rapporto è di 2,9 (FVO/FLO) e di 2,2 (FVG/FLO). Il più basso contenuto in trigliceridi è rilevabile nelle fibre umane di tipo veloce ed in quelle veloci glicolitiche di ratto. Valutando comparativamente la capacità ossidativa si rileva che le fibre umane di tipo II e quelle di tipo veloce glicolitico dell'animale da esperimento hanno la più bassa attività, mentre le fibre umane di tipo I sono simili a quelle lente ossidative e veloci ossidative del ratto e della cavia. Come si osserva nella Tabella 4.2.II (Essén et al., 1975) le notevoli variazioni nell'attività di un enzima spia delle capacità ossidative (succinico deidrogenasi) e di un enzima spia delle capacità anaerobiche lattacide (fosfofruttocinasi) nelle fibre muscolari umane confermano la validità della suddivisione delle strutture in almeno due tipi. Non va tuttavia dimenticato che i rilievi in campo umano sono sovente ottenuti su muscoli di differenti parti del corpo umano, ed in stato di diversa condizione di allenamento: questo pone ovviamente dei limiti alla individuazione dei fattori genetici e dei fattori di adattamento enzimatico. Ciò in tema di biologia dello sport è di vitale importanza: di qui la necessità di studi su vasta scala in campo umano attuato su atleti appartenenti a gruppi omogenei sia per specialità che per prestazioni tecniche. Ovviamente tali studi dovrebbero essere effettuati periodicamente nel singolo soggetto in funzione dell'età e del tipo di allenamento man mano attuato, in modo da evidenziare rapporti precisi fra capacità prestative sul campo e caratteristiche biochimiche laboratoristiche.

Tabella 4.2.II - Caratteristiche biochimiche del muscolo umano, espresse in funzione del peso del tessuto fresco.

Parametro biochimico e dimensione	Fibre muscolari umane		
	Tipo I	Tipo II	Tipo I+II (media)
Glicogeno $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	54,6	58,8	56,7
Fosfofruttocinasi $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	6,2	11,9	9,0
Succinico deidrogenasi $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	7,5	5,4	6,4

Gli studi istochimici sembrerebbero a prima vista indicare che i muscoli umani non contengono fibre veloci (fast twitch fibres) che abbiano un'alta od una bassa attività ossidativa, così come riscontrato da Peter et al. (1972) nel ratto e nella cavia. Tuttavia va evidenziato che fibre veloci con caratteristiche analoghe a quelle veloci ossidative della cavia sono state descritte in varie specie, comprese forme inferiori di primati quali i lemuridi (Gillespie et al., 1974). I differenti tipi di fibre muscolari della cavia evidenziano differenti potenziali di membrana e differenti concentrazioni di sodio e di potassio (Campion, 1974). D'altra parte anche nei muscoli umani si riscontrano tra i due tipi di fibre I e II differenti potenziali di membrana (Eberstein e Goodgold, 1968; Hanson, 1974) e differenti tempi di contrazione (Buchthal e Schmalbruch, 1970).

Esperimenti con stimolazione elettrica o con innervazione crociata hanno mostrato negli animali che le fibre possono essere convertite le une nelle altre (Bàràny e Close, 1971; Sréter et al., 1973): non è ben noto se ciò possa avvenire anche nei muscoli umani. Infatti i più disparati metodi di allenamento sembrerebbero avere solo scarsa influenza sulla composizione delle fibre umane, studiata però con il metodo istochimico della ATPasi miofibrillare (Gollnick et al., 1973; Saltin et al., 1975). Tuttavia, con rilievi biochimici, ciò non può essere, ad es., sostenuto per i sottogruppi delle fibre umane di tipo II, le quali hanno (vedi Tabella 4.2.III) un diverso atteggiamento ossidativo, come indicato dall'attività della succinico deidrogenasi, o glicolitico, come indicato dall'attività della fosfofruttocinasi. Infatti il training di endurance incrementa la percentuale delle fibre di tipo II A a spese delle fibre di tipo II B (Jansson, 1975; Andersen e Henriksson, 1975). D'altra parte alcuni dati della patologia sembrerebbero far ritenere che anche nell'uomo sia possibile ottenere una interconversione delle fibre di tipo I in tipo II, e viceversa. Ciò è derivato, ad esempio, dallo studio delle masse muscolari di pazienti spastici paralizzati agli arti inferiori a causa di lesioni al midollo spinale; nelle masse muscolari del gastrocnemio e del soleo essi hanno il 100% di fibre di tipo II, mentre nel deltoide hanno la normale composizione mista (Grimby, 1975).

Si deve ancora sottolineare che le caratteristiche biochimiche dei vari tipi di fibre muscolari dovrebbero servire alla loro nomenclatura in modo migliore delle loro caratteristiche contrattili. Ovviamente ciò condiziona l'esistenza di strette correlazioni fra i livelli di attività enzimatiche mitocondriali (capacità ossidative) e

*Tabella 4.2.III* - Attività enzimatiche del muscolo umano in funzione della tipologia delle fibre muscolari. Le misure sono state effettuate sui frammenti di fibre, senza operare alcuna correzione relativamente alla perdita di enzimi legata alla metodologia attuata.

Attività enzimatica ( $\mu\text{moli} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	Tipo di fibre muscolari umane			
	Tipo I (lente)	Tipo II (veloci)		
		A	B	C
Succinico deidrogenasi	2,5	1,9	1,0	2,4
Fosfofruttocinasi	3,9	5,6	6,9	5,5

ialoplasmatiche (capacità glicolitiche) e le caratteristiche funzionali delle fibre muscolari. Ciò è vero solo in via presuntiva giacché le caratteristiche biochimiche sono espressione della capacità di *liberare* energia, mentre le caratteristiche contrattili sono espressione delle capacità di *utilizzare* energia. Si tratta quindi di caratterizzazioni a mezzo di eventi nettamente differenziati fra di loro: tuttavia sembrerebbe strano pensare che un tipo di fibra muscolare specializzi una particolare modalità di liberare energia, e nel contempo specializzi una capacità contrattile di utilizzo energetico di tipo diverso.

Fatta questa premessa e limitazione, si propone la seguente classificazione delle fibre muscolari umane, ricavata dalla Tabella 4.2.III.

1) <i>Fibre di tipo I</i>	Fibre lente ad alta capacità ossidativa ed a bassa capacità glicolitica
2) <i>Fibre di tipo II A</i>	Fibre veloci a capacità ossidativa e glicolitica mista
3) <i>Fibre di tipo II B</i>	Fibre veloci a bassa capacità ossidativa e ad elevata capacità glicolitica
4) <i>Fibre di tipo II C</i>	Fibre veloci ad alta capacità ossidativa ed a buona capacità glicolitica

Per quanto concerne le caratteristiche biochimiche dei muscoli scheletrici dell'uomo, si evidenziano nella Tabella 4.2.IV le caratteristiche biochimiche medie espresse in funzione del peso secco. Un problema intimamente connesso con la tipologia muscolare è quello della *densità capillare* o capillarizzazione: di questo sarà fatta trattazione nel Capitolo « *Il massimo consumo di ossigeno* », al paragrafo 5.

Una interessante valutazione funzionale è costituita dalla capacità di accumulo

Tabella 4.2.IV - Caratteristiche biochimiche medie delle fibre muscolari umane (gastrocnemio), espresse in funzione del peso secco.

Parametro biochimico e dimensione	Fibre di tipo	
	II	I
Glicogeno ( $\mu\text{moli} \cdot \text{g}^{-1}$ )	360 (110-750)	340 (100-880)
Trigliceridi ( $\mu\text{moli} \cdot \text{g}^{-1}$ )	75 (20 - 160)	210 (50 - 330)
Fosfofruttocinasi ( $\mu\text{moli} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	50 (20 - 100)	25 (8 - 60)
Succinico deidrogenasi ( $\mu\text{moli} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	20 (6 - 40)	30 (22 - 50)
Potassio ione ( $\mu\text{moli} \cdot \text{g}^{-1}$ )	630 (600 - 700)	620 (600 - 700)
Sodio ione ( $\mu\text{moli} \cdot \text{g}^{-1}$ )	100 (90 - 120)	100 (90 - 120)

**Tabella 4.2.V** - Concentrazione media di acido lattico raggiunta nelle singole fibre muscolari umane o in un pool di fibre di fascio muscolare dell'arto inferiore. I soggetti erano sottoposti a lavoro dinamico ( $\dot{V}O_2 = 100\%$ ) od ad attività statica 50% della capacità isometrica volontaria massimale). Le concentrazioni di acido lattico sono espresse come  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  di muscolo fresco.

Tipo di attività	Fibre lente (ST)		Fibre veloci (FT)	
	Singole fibre	Pool di fibre	Singole fibre	Pool di fibre
Esaurimento da attività dinamica	15,8	17,6	25,9	22,9
Attività statica	8,3	7,9	12,1	9,7
Esaurimento da attività statica	15,8	13,2	27,2	22,9

di acido lattico nei due fondamentali tipi di fibre muscolari umane. Esperienze condotte sull'uomo (Essén e Häggmark, 1975) sottoposto a lavoro dinamico ( $\dot{V}O_2 = 100\%$ ) o ad attività statica (50% della capacità isometrica massimale volontaria) hanno evidenziato i risultati raccolti nella Tabella 4.2.V. E' evidente come la capacità di accumulo di acido lattico sia largamente maggiore nelle fibre veloci (FT) piuttosto che in quelle lente (ST). I dati si riferiscono alla concentrazione di acido lattico raggiunta: a) in frammenti di muscolo costituiti da fibre dello stesso tipo (pool di fibre); b) in singole fibre isolate prima dell'analisi biochimica (singole fibre). Le variazioni notate fra le due determinazioni indicano che solo un certo numero di singole fibre è attivato nel pool di un fascio muscolare.

A titolo semplificativo, nella Tabella 4.2.VI si riassumono le caratteristiche generali differenziative dei due tipi fondamentali di fibre muscolari umane.

**Tabella 4.2.VI** - Caratteristiche differenziative di base dei due tipi fondamentali di fibre muscolari umane. I dati esprimono, in maniera molto approssimata, le concentrazioni di enzimi o substrati, o le specifiche capacità.

Tipo di fibra	Glicogeno	Grassi	Mioglobina	Mitochondri	ATPasi	Enzimi Glicolitici	Accumulo Lattati
Lente o ST o di tipo I	++	+++	+++	+++	+	++	++
Veloci o FT o di tipo II	+++	+	+	+	+++	+++	+++

### 4.3. L'accumulo di glicogeno nelle fibre muscolari

Sono state osservate differenze nel contenuto totale di glicogeno dei vari muscoli e dei vari soggetti; ciò non è rilevabile tra parti diverse di uno stesso fascio muscolare (Hultman, 1967). Nel quadricipite femorale sono stati trovati valori normali attorno a 1,2 g / 100 g di muscolo fresco, ma generalmente nei soggetti

allenati i valori sono più alti (Hermansen et al., 1967; Piehl, 1974). La maggior concentrazione di glicogeno muscolare non incrementa il livello della prestazione, quanto piuttosto il tempo per cui la prestazione stessa viene mantenuta ad un certo livello di intensità. La risintesi del glicogeno nei muscoli scheletrici dell'uomo, in seguito alla deplezione prodotta dall'esercizio fisico, è stata oggetto di diversi studi (Bergström e Hultman, 1966; Bergström et al., 1972) dai quali risulta che livelli di glicogeno, maggiori addirittura di quelli riscontrati prima della deplezione da esercizio, sono stati evidenziati nei muscoli di soggetti già 24 ore dopo l'inizio della somministrazione di una dieta iperglicidica. Ciò ha portato alla formulazione di schemi di allenamento nei quali si opera una deplezione notevole del glicogeno (esercizio + dieta ipoglicidica) seguita da dieta iperglicidica: in questo modo si avrebbe una sintesi di glicogeno maggiore di quella iniziale. Questi risultati tuttavia non sono stati confermati in lavori recenti (Gollnick et al., 1972; Piehl, 1974). Secondo questi Autori, a seguito di una precedente deplezione di glicogeno mediante esercizio fisico, il processo di risintesi risulta relativamente lento, nonostante la somministrazione di una dieta arricchita di carboidrati e l'astensione, per quanto possibile, da qualsiasi attività fisica. Secondo detti Autori, per raggiungere i livelli di glicogeno riscontrati prima dell'esercizio sono necessarie almeno 46 ore, anche se la sintesi è risultata più rapida nelle prime 5-10 ore dopo la deplezione. La colorazione PAS indica una leggera tendenza delle fibre FT a risintetizzare il loro glicogeno più velocemente delle fibre ST.

La massima velocità di sintesi del glicogeno corrisponde a circa 8.5 mmol di unità di glucosio per ora, per kg; la degradazione del glicogeno è invece di circa 30 mmol di unità di glucosio per ora, per kg, durante un esercizio di due ore ad un carico di lavoro richiedente circa il 60-70% del  $V_{O_2max}$ ; la entità della sintesi del glicogeno corrisponde quindi solamente ad un terzo dell'utilizzo del glicogeno nella glicolisi. Tra tutti gli enzimi coinvolti nella sintesi del glicogeno, la glicogeno sintetasi mostra l'attività più bassa e si ritiene perciò che sia il fattore limitante biochimico; l'attività enzimatica viene regolata dalle due forme interconvertibili dell'enzima nella forma D inattiva e nella forma I attiva; in effetti esiste una relazione inversa tra il contenuto in glicogeno del muscolo e l'attività della glicogeno sintetasi I (Danforth, 1965), il che dimostra che la regolazione avviene attraverso un meccanismo di feed-back, rappresentato dallo stesso glicogeno. La sintetasi I mostra la sua massima attività quando il contenuto di glicogeno del muscolo è basso, mentre una graduale diminuzione si osserva per livelli più alti (Piehl, 1974).

Non sembra tuttavia che il glicogeno sia il solo fattore di regolazione poiché le fibre ST, nonostante abbiano un più alto contenuto di glicogeno sintetasi I, non mostrano una velocità di sintesi più elevata. Va quindi rilevato che sia il trasporto del glucosio nella cellula muscolare, sia la sua fosforilazione, catalizzata dalla esocinasi, rivestono un ruolo assai importante nell'accumulo del glicogeno. La più elevata attività della esocinasi, riscontrata nei muscoli dei soggetti allenati, può portare alla sintesi di un maggiore quantitativo di glucosio-6-fosfato, che è sia un attivatore, sia un substrato per la sintesi del glicogeno.

Nei soggetti in allenamento, le modificazioni nel contenuto di carboidrati della dieta provocano delle variazioni nei livelli di glicogeno del muscolo (Gollnick, 1972): i livelli di glicogeno risultano infatti inferiori a 50 mM di unità di glucosio, con una dieta ricca di grassi e di proteine; in questo caso le fibre FT si colorano per il glicogeno più intensamente di quelle ST. Con la somministrazione di diete miste o arricchite di zuccheri, i livelli di glicogeno risultano elevati, intorno alle 80-90 ed alle 110-140 mM di unità di glucosio rispettivamente; in questo caso, non è stata riscontrata alcuna differenza tra i due tipi di fibre, in relazione all'intensità della colorazione PAS.

Per quanto riguarda l'influenza dell'allenamento sul contenuto in glicogeno, un confronto tra i muscoli della gamba allenata e di quella non allenata nel medesimo soggetto (Piehl, 1974) evidenzia livelli di glicogeno notevolmente più alti nell'arto allenato, il quale mostra anche una maggiore attività da parte della glicogeno sintetasi (I + D) e dell'esocinasi. La velocità di sintesi del glicogeno non risulta però maggiore nei muscoli allenati.

I più elevati livelli di glicogeno riscontrati nei muscoli dei soggetti allenati possono quindi essere attribuiti non tanto all'adattamento alla dieta iperglicidica, bensì all'allenamento il quale induce alcune modificazioni enzimatiche (ad es. incremento della esocinasi) che « innescano » la sintesi del glicogeno. Naturalmente un adeguato rifornimento di zuccheri è indispensabile per attuare tale sintesi: non va però confuso un « mezzo » con la causa. Tuttavia la capacità di raddoppiare negli atleti il contenuto in glicogeno, il cosiddetto fenomeno di supercompensazione od « over-shoot » non è ancora chiarito del tutto nemmeno su base biochimica. In alcuni casi, infatti, si è osservato un aumento nell'accumulo di glicogeno nonostante che l'attività della sintetasi I fosse bassa (Piehl, 1974): è evidente che il meccanismo di regolazione della sintesi del glicogeno è un processo biochimico complesso, influenzato anche da altri eventi cellulari.

#### **4.4. La deplezione selettiva di glicogeno durante la prestazione**

La scissione del glicogeno durante la prestazione è stata oggetto di numerosi studi, in particolare basati su campioni biotici di muscolo senza differenziazione tra le fibre muscolari. Di conseguenza, se le valutazioni si fondano su prove eseguite su campioni muscolari misti, si corre il rischio di sottovalutare le reali modificazioni funzionali.

La misura in cui la tecnica della colorazione PAS fornisce una risposta pienamente attendibile non è facilmente definibile, soprattutto nel caso della massima intensità di colorazione. La colorazione PAS risulta massima per livelli di glicogeno superiori a 80 mM di unità di glucosio. Le variazioni nel contenuto di glicogeno al di sopra di tale livello non possono più essere evidenziate mediante l'intensità della colorazione PAS, il che può dar luogo ad errori. Ad esempio, si può attribuire uno specifico intervento funzionale solo alle fibre ST, anche quando ciò non è

avvenuto; infatti, dato che le fibre FT sono alquanto più ricche in glicogeno delle ST, la comparsa precoce di fibre ST poco colorate può portare a valutazioni inesatte. Infatti una scissione assai maggiore del glicogeno potrebbe essersi verificata nelle fibre FT, ma può rimanere mascherata da un più elevato contenuto iniziale di glicogeno. Al contrario si può escludere uno specifico intervento funzionale delle fibre ST anche quando ciò è avvenuto. Infatti, una attivazione funzionale potrebbe essersi verificata anche nelle fibre ST, nonostante l'impossibilità di rilevarla attraverso la colorazione PAS a causa della loro maggiore capacità ossidativa che aumenta l'utilizzazione dei grassi e produce di conseguenza un risparmio di glicogeno. Se, fatte queste riserve, si ammette che la variazione istochimica del glicogeno (intensità della colorazione PAS) dalle fibre muscolari riflette variazioni reali, questo parametro può anche essere usato per valutare il diverso impiego delle varie fibre, dato che si ritiene che ciascuna unità motoria sia costituita da un unico tipo di fibre muscolari (Kugelberg e Edström, 1968).

La relazione tra la capacità di sopportare la fatica e il tipo istochimico di fibra implicato è evidenziato in studi che evocano la contrazione muscolare mediante stimolazione elettrica (Kugelberg e Edström, 1968): le fibre ST, che notoriamente mostrano una maggiore intensità di colorazione per gli enzimi ossidativi, sono capaci di attuare le contrazioni per periodi più lunghi rispetto alle fibre FT. La più rapida perdita di glicogeno da parte delle fibre FT è stata considerata come un indice del fatto che tali fibre sono attivate per prime (Kugelberg e Edström, 1968; Edgerton et al., 1970). Invece ciò è valido solo nel caso degli elettrostimoli, giacché se lo studio viene effettuato durante una effettiva prestazione atletica, i rilievi istochimici si modificano completamente (Edgerton et al., 1970; Armstrong et al., 1973). Infatti, in relazione alle condizioni di esercizio, la deplezione di glicogeno si verifica preferenzialmente in uno dei tipi di fibre (Gollnick, 1974): a intensità variabili di lavoro e fino ad un carico di lavoro che richiede il max  $\dot{V}_{O_2}$ , le fibre ST risultano sempre le prime a perdere la colorazione PAS; continuando il lavoro, la deplezione avviene anche in alcune fibre FT. La velocità di deplezione aumenta con l'aumentare dell'intensità del lavoro; il glicogeno che ancora rimane nel muscolo dopo un lavoro a bassa intensità si ritrova sia nelle fibre ST che in quelle FT; nel caso di lavoro ad alta intensità il glicogeno risulta però presente solo nelle fibre FT. Per carichi di lavoro glicolitico (al disopra del  $\dot{V}_{O_2 \max}$ ), che non possono essere sopportati per periodi continuativi superiori a 1-5 minuti, le fibre FT perdono il glicogeno prima o contemporaneamente alle fibre ST; al termine della prestazione si riscontrano delle fibre FT completamente vuote ed il glicogeno ancora presente si ritrova in entrambi i tipi di fibre. Variando la velocità di contrazione, non si riscontra alcuna variazione nelle sequenze di deplezione del glicogeno (Gollnick, 1974).

Al contrario, tali sequenze subiscono lievi modificazioni quando la prestazione viene eseguita con differenti livelli iniziali di glicogeno nel muscolo. Se il livello di glicogeno precedente la prestazione è basso (< 50 mM di unità di glucosio) per dieta ipoglicidica, la colorazione PAS non rivela fibre ST intensamente colorate; le

fibre FT nel complesso, risultano colorate più intensamente di quelle ST. Durante la prestazione, la riduzione del livello di glicogeno muscolare (intensità della colorazione PAS) si verifica preferenzialmente nelle fibre FT; dopo l'esercizio, le fibre FT colorate negativamente per il glicogeno (ossia deplete) sono in numero maggiore di quelle ST. In soggetti nutriti con dieta mista oppure arricchita di zuccheri, i livelli medi iniziali di glicogeno nel muscolo raggiungono rispettivamente le 80-90 e le 110-140 mM di unità di glucosio; l'intensità della colorazione PAS è notevole e simile in entrambi i tipi di fibre. In soggetti nutriti con queste due diete, la prestazione dà luogo ad una perdita preferenziale di colorazione PAS nelle fibre ST. Molte fibre FT sono deplete di glicogeno dopo la prestazione se questa è attuata in soggetti con basso contenuto iniziale di glicogeno muscolare; ciò non avviene nel caso di prestazioni attuate in atleti con alto contenuto di glicogeno muscolare. In ambedue i casi, tuttavia, dopo l'evento prestativo si osserva ancora glicogeno residuo sia in fibre ST che in fibre FT (Gollnick et al., 1974).

Questi dati portano a rilevare come le fibre ST sono reclutate per prime durante l'attivazione fisiologica da prestazione; tale evento può essere attribuito ad una loro più bassa soglia di attivazione (Henneman e Olson, 1965). Questo tipo di stimolazione fisiologica da prestazione possiede una frequenza inferiore a quella della stimolazione elettrica sopra menzionata: di conseguenza la soglia di attivazione delle fibre FT non viene subito raggiunta dalla stimolazione fisiologica. E' chiaro che la messa in attivazione delle fibre durante la stimolazione elettrica e durante la stimolazione fisiologica segue sequenze ben diverse nei due casi. Se la prestazione procede, le fibre ST perdono glicogeno e non sono più in grado di soddisfare il fabbisogno energetico: entrano perciò in gioco gradualmente le fibre FT (Gollnick et al., 1973), le quali hanno una più elevata soglia di eccitabilità nervosa.

La selettiva perdita di glicogeno nelle fibre ST ed FT sopra descritta è da imputarsi ad osservazioni sperimentali in cui l'attività prestativa durava da qualche minuto a più di un'ora. Sottolineo ancora il fatto che nel caso di attività molto brevi ed intense, il reclutamento iniziale riguarda le fibre FT (Grimby e Hanerz, 1968).

Anche la tensione è un fattore importante nell'attivazione delle fibre: il passaggio improvviso della perdita precoce di glicogeno dalle fibre ST a quelle FT si osserva allorché le contrazioni isometriche richiedono più del 20-25% della massima forza contrattile volontaria (Gollnick et al., 1974).

In conclusione si può affermare che nei due tipi di fibre ST ed FT si osservano delle differenze per quanto riguarda la velocità di accumulo e di deplezione del glicogeno, in relazione alla dieta somministrata, all'intensità dell'allenamento e al tipo di prestazione eseguita. Tale fenomeno risulta anche essere diversamente influenzato sia dall'atteggiamento metabolico che dalle proprietà contrattili delle fibre muscolari. E' pertanto evidente che nella programmazione di un piano di allenamento e di sequenze prestativo non si può ulteriormente ignorare che il binomio « glicogeno-fibra muscolare » è un fattore biologico in evoluzione dinamica con grosse diversificazioni sia di tipo qualitativo che quantitativo.