



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Biomediche
Corso di laurea triennale in Scienze Motorie

Tesi di laurea

**“EFFETTI DI DIVERSI PROTOCOLLI DI
ALLENAMENTO PER STIMOLARE LA
CAPILLARIZZAZIONE MUSCOLARE IN ANZIANI
SANI”**

Relatrice:

Prof.ssa Tatiana Moro

Correlatrice:

Dott.ssa Gioi Spinello

Laureanda: **Anna Nadalin**

Matricola: **2049198**

Anno Accademico 2023/2024

Sommario

ABSTRACT	2
INTRODUZIONE	3
1. <i>INVECCHIAMENTO E SARCOPENIA.....</i>	3
2. <i>CAPILLARIZZAZIONE</i>	6
3. <i>RESISTANCE TRAINING (RT) E ENDURANCE TRAINING (ET)</i>	6
4. <i>COMBINAZIONE ET E RT IN UN PROTOCOLLO DI STUDIO.....</i>	8
MATERIALI E METODI.....	10
1. <i>PARTECIPANTI E CRITERI DI INCLUSIONE.....</i>	10
2. <i>DISEGNO SPERIMENTALE</i>	10
3. <i>PROTOCOLLO DI STUDIO.....</i>	11
3.1 Riscaldamento.....	11
3.2 Corpo centrale.....	11
3.3 Stretching.....	12
4. <i>MISURAZIONI.....</i>	13
4.1 Composizione corporea	13
4.2 Test di forza	13
4.3 Le biopsie muscolari.....	13
RISULTATI	15
1. <i>CAMBIAMENTI TRA T0 E T2</i>	15
2. <i>CAMBIAMENTI TRA T0-T2-T3</i>	17
DISCUSSIONE	19
CONCLUSIONI.....	21
BIBLIOGRAFIA:.....	22

ABSTRACT

L'invecchiamento comporta un deterioramento progressivo del sistema muscolo-scheletrico, spesso portando a sarcopenia, patologia caratterizzata dalla perdita di funzionalità e massa muscolare che si può associare a numerosi rischi, tra cui disabilità, cadute e mortalità.

La capillarizzazione muscolare gioca un ruolo cruciale nella funzione muscolare e la sua riduzione nell'anziano potrebbe contribuire alla sarcopenia, compromettendo la risposta a possibili stimoli anabolici provenienti dall'attività fisica e dalla nutrizione. Infatti i capillari sono fondamentali per fornire ossigeno, nutrienti e fattori di crescita alle cellule muscolari, nonché nell'eliminare i prodotti di scarto.

Il resistance training (RT) e l'endurance training (ET) sono due tipologie di allenamento similmente efficaci nel migliorare la massa muscolare e la funzionalità in soggetti anziani, sebbene con meccanismi diversi. Il RT stimola in particolare l'ipertrofia muscolare mentre l'ET migliora soprattutto la densità capillare. Alcuni studi hanno mostrato che un protocollo combinato di ET e RT potrebbe offrire benefici sinergici, ma i risultati sono stati variabili.

Questo studio vuole esaminare l'efficacia di protocolli di allenamento combinati di ET e RT su un periodo di 12 settimane. Il progetto prevede la divisione dei partecipanti in tre gruppi: un protocollo di 4 settimane di ET seguito da 8 settimane di RT, un altro di 4 settimane di RT, seguite da 4 settimane di ET e infine 4 settimane di RT e un gruppo di controllo con 12 settimane di RT. L'obiettivo di questa tesi è determinare quale schema favorisca maggiormente l'ipertrofia muscolare, ottimizzando così l'efficacia dell'allenamento nei soggetti anziani e contribuendo a una gestione più efficace della sarcopenia.

INTRODUZIONE

1. INVECCHIAMENTO E SARCOPENIA

L'invecchiamento è un processo naturale che coinvolge gradualmente tutti gli organi e i sistemi del corpo e uno tra i potenziali aspetti critici per i soggetti anziani, sono i cambiamenti fisiologici a livello del sistema muscolo-scheletrico. Questo si può presentare con minor funzionalità e capacità di contrazione, a causa di uno squilibrio tra sintesi e degradazione delle proteine muscolari, di un'inadeguata capillarizzazione muscolare e della maggior infiltrazione di tessuto fibroso e adiposo. (Lexell 1995) Questi fattori potrebbero contribuire nella riduzione delle dimensioni delle fibre e alla loro denervazione, principalmente nelle fibre di tipo 2 (fast-twitch). La prevalenza di fibre di tipo 1 (slow-twitch) è agevolata dalla formazione di nuove connessioni tra i loro motoneuroni e le fibre di tipo 2 denervate. Questo fenomeno noto come "grouping", porta a raggruppamenti di numerose fibre slow-twitch, invece di una distribuzione uniforme nel tessuto. Tale raggruppamento è causato dall'inefficienza del reclutamento motorio ed è quindi un meccanismo di difesa che permette al soggetto di portare a termine un compito, reclutando un maggior numero di unità motorie. Questo adattamento può modificare la qualità del movimento, influenzandone la finezza e la precisione (Kelly 2018)

Tuttavia, l'interpretazione dei cambiamenti fisiologici legati all'invecchiamento e il suo impatto sul sistema muscolo-scheletrico, è complessa e multifattoriale. Infatti, molteplici elementi sono coinvolti in questi cambiamenti tra cui il sistema nervoso endocrino, il sistema nervoso centrale e periferico e le influenze sociali, ambientali e nutrizionali.

(Larsson 2019)

La perdita di massa muscolo-scheletrica e della sua funzionalità può essere frequentemente associata al termine sarcopenia, patologia che aumenta il rischio di disabilità, cadute, infortuni e mortalità. (Nishikawa 2021)

Da un recente studio della Geriatrics Department of Wroclaw University Hospital con Pachołek K e colleghi, sono stati valutati 101 soggetti (25 uomini e 76 donne) con un'età media di 78 anni, seguendo le linee guida fornite dalla EWGSOP2 (European Working Group on Sarcopenia in Older People) (Cruz-Jentoft 2010) Tra questi, 16 soggetti sono risultati affetti da sarcopenia, con deficit di forza e ridotta quantità muscolare (16.8%), tra cui 6 gravi presentando anche scarse

prestazioni fisiche (5.9%). In termini di differenza di sesso, dai dati è emersa una maggior diffusione nella popolazione maschile (28% maschi, 13.2% delle donne) (Pacholek K 2021).

La sarcopenia venne definita per la prima volta da Rosemberg nel 1989, in riferimento alla sola perdita di massa muscolo-scheletrica. Tuttavia, intorno al 2010 furono proposte nuove definizioni che includono l'importanza della perdita della forza muscolare e della prestazione fisica. (Sayer 2022)

Secondo il lavoro del gruppo EWGSOP2 del 2010, la sarcopenia è un disordine che per la sua diagnosi necessita sia della presenza di bassa massa muscolare sia di scarsa funzione muscolare (forza o prestazione). Infatti, la forza non è sempre associata alla quantità muscolare e la loro relazione non risulta lineare. Perciò, restringere i criteri di diagnosi alla sola perdita di massa può risultare limitante. (Cruz-Jentoft 2010)

Le cause di questa condizione sono numerose e i sintomi si possono riscontrare anche nella popolazione giovane, anche se la maggioranza dei soggetti sarcopenici sono anziani. La sarcopenia può essere suddivisa in categoria primaria e secondaria, utile nel caso in cui, in alcuni individui, non sia possibile identificare una chiara ed unica causa di sarcopenia. Infatti, è considerata primaria quando è unicamente correlata all'età, mentre è secondaria quando coesistono altre cause oltre all'invecchiamento, come patologie o situazioni ambientali e nutrizionali. (Cruz-Jentoft 2010).

Nel 2018 il medesimo gruppo ha aggiornato la valutazione diagnostica della sarcopenia, elevando il concetto di forza muscolare come primo criterio di identificazione. In combinazione con la presenza di bassa quantità muscolo-scheletrica si conferma la diagnosi e se viene identificata anche una scarsa prestazione fisica, la sarcopenia può essere considerata grave. (Cruz-Jentoft 2010) Tuttavia, non vi è ancora una definizione ritenuta ufficiale e sono presenti differenze significative individuali per quanto riguarda l'inizio del declino fisiologico e fisico, la perdita progressiva della massa magra e la velocità di questo processo (Cruz-Jentoft 2010).

Esistono diversi test per misurare il livello di ciascun criterio, pertanto, il gruppo EWGSOP2 ha proposto delle linee guida: la forza muscolare è valutabile attraverso l'hand grip, il quale misura la forza di presa, spesso correlata alla forza di altre parti del corpo; il "Chair Stand Test" per la forza dei muscoli degli arti inferiori. Questo test può essere svolto o considerando i secondi che il soggetto impiega ad alzarsi cinque volte da una sedia senza l'aiuto delle mani, oppure, contando il numero di volte in cui il soggetto si alza dalla sedia in trenta secondi. (Cruz-Jentoft 2019)

La quantità di muscolo viene valutata attraverso esami di riferimento, quali la risonanza magnetica (MRI), la tomografia computerizzata (CT) e l'assorbimetria a raggi X a doppia energia (densitometria ossea o DXA). La valutazione attraverso questi strumenti può risultare particolarmente costosa ed inoltre è necessaria la presenza di personale altamente qualificato.

Per determinare la composizione corporea viene spesso utilizzata la DXA, la quale permette di determinare la quantità di tessuto magro totale del corpo (SMM) o la massa muscolare scheletrica appendicolare (ASM). Dai dati ottenuti viene normalizzato il valore di SMM o ASM a seconda delle dimensioni corporee del soggetto utilizzando l'altezza al quadrato ($ASM/altezza^2$), il peso ($ASM/peso$) o l'indice di massa corporea (ASM/BMI). (Cruz-Jentoft 2019)

Infine, la prestazione fisica comprende sia l'efficienza del tessuto muscolo-scheletrico sia la funzionalità del sistema nervoso centrale e periferico. Viene misurata attraverso tre test: "Short Physical Performance Battery" (SPPB), "Time-Up and Go" (TUG) e il "400-m walk test". (Cruz-Jentoft 2019)

La sarcopenia è il risultato di una combinazione di fattori biologici che agiscono in sinergia causando il deterioramento muscolare associato all'invecchiamento. La sedentarietà risulta uno tra i principali fattori di rischio, poiché la riduzione dell'esercizio fisico non fornisce una sufficiente stimolazione per il mantenimento o il miglioramento della massa muscolare. (Rogeri 2021)

In aggiunta, la diminuzione di ormoni come l'ormone della crescita, il testosterone e l'ormone tiroideo e l'aumento di sostanze infiammatorie come necrosi tumorale- α (TNF- α) e l'interleuchina-6 (IL-6) contribuiscono alla perdita di massa poiché sbilanciano l'equilibrio tra segnali catabolici e anabolici. Inoltre, la malnutrizione, uno scarso apporto proteico dalla dieta, l'accumulo di sostanze dannose e una disfunzione delle cellule satellite, fondamentali per la rigenerazione cellulare, possono favorire l'insorgenza della sarcopenia. (Papadopoulou 2020)

Pertanto, l'invecchiamento è un processo che non può essere evitato, ma può essere accompagnato attraverso strategie come l'attività fisica e una dieta adeguata. (Papadopoulou 2020) Se ciò non viene effettuato, la probabilità di incorrere a sarcopenia aumenta, entrando in un circolo vizioso: il muscolo è meno forte, ha minor capacità di reagire velocemente a situazioni potenzialmente pericolose ed è meno resistente, aumentando quindi il rischio di cadute e fratture e il muscolo si affatica più velocemente. Tutti questi fattori possono imporre ai soggetti un riposo forzato, a casa o in strutture ospedaliere, con allettamento e immobilità temporanea che peggiora ulteriormente

i fattori precedentemente citati quali forza, potenza e resistenza. La sarcopenia conduce ad un ciclico declino funzionale, a fragilità, alla perdita di indipendenza, disabilità e mortalità. (Hunter 2004)

2. CAPILLARIZZAZIONE

Grazie a diversi studi, si è ipotizzato che questo processo degenerativo sia relazionato all'insufficiente densità capillare del tessuto muscolare, che può causare un'incapacità di risposta a stimoli anabolici, proposti dall'attività fisica e dalla nutrizione. (Snijders 2017)

Infatti, i capillari sanguigni sono i più piccoli vasi presenti nel sistema circolatorio, i quali forniscono ossigeno, nutrienti, amminoacidi e fattori di crescita alle cellule muscolari ed eliminano prodotti di scarto, per evitarne l'accumulo e i potenziali danni alle cellule. La capillarizzazione, cioè la formazione e la distribuzione di capillari nel tessuto muscolare, è fondamentale per la sintesi proteica, per mantenere e migliorare la massa muscolare. Nell'anziano, questo processo vitale è alterato a causa dell'invecchiamento e può aggravare la perdita muscolare.

Attraverso i capillari vengono veicolati diversi fattori importanti per l'ipertrofia muscolare, quali citochine e fattori di crescita, che vanno ad interagire con le cellule satelliti, cellule staminali muscolari adibite alla capacità rigenerativa. Infatti, la letteratura suggerisce che la capillarizzazione delle fibre muscolari, in particolare di tipo 2, contribuisce alla compromissione della funzione delle cellule satelliti negli anziani. È probabile, quindi, che il miglioramento della capillarizzazione delle fibre muscolari possa essere un importante fattore che contribuisce a contrastare la sarcopenia. (Defante Telles 2019)

3. RESISTANCE TRAINING (RT) E ENDURANCE TRAINING (ET)

Il resistance training o RT è noto per essere un valido stimolo per indurre ipertrofia muscolare, frequenza e dimensione delle fibre di tipo 2. (Kosek 2006) (Verdijk 2009)

Secondi diversi studi, questa modalità di allenamento anaerobico, risulta adeguatamente efficace, (Abernethy 1994) (Ahtiainen 2003) tuttavia, gli anziani non riescono ad ottenere gli stessi risultati in termini di aumento di massa muscolare. (Kosek 2006) (Cloutier 2014) Per cercare di spiegare questa sorta di resistenza anabolica, negli ultimi anni è emersa un'ipotesi interessante che vede il

grado di vascolarizzazione muscolare giocare un ruolo centrale nel dettare gli adattamenti all'allenamento con sovraccarichi. Alcuni studi hanno infatti evidenziato che i soggetti anziani che meglio rispondono al RT sono coloro che presentano indici di capillarizzazioni elevati (Snijders 2017) (Verdijk 2016) (Moro 2019).

Inoltre, l'endurance training è una modalità di esercizio efficace per contrastare il declino della capacità aerobica e la perdita della massa muscolare in soggetti giovani e in particolare negli anziani. (Lovell 2010) Come il RT, anche l'ET può avere benefici per quanto riguarda l'ipertrofia muscolare negli anziani, ma non la promuove con la stessa efficacia. (Grgic 2019)

Alcuni dei principali adattamenti locali a livello muscolo-scheletrico, conseguenti ad un protocollo di allenamento con ET, sono l'aumento della biogenesi mitocondriale, della gittata cardiaca e della densità capillare, i quali aiutano il corpo nella sua capacità di perfusione, trasporto e utilizzo dell'ossigeno, per generare energia e ritardare l'affaticamento muscolare durante prestazioni aerobiche prolungate. (Hughes 2018) Per accompagnare l'aumento del flusso sanguigno, la rete capillare ha bisogno di espandersi per mantenere o migliorare il tempo di transito medio del flusso.

L'angiogenesi è la risposta a cambiamenti meccanici e/o metabolici attraverso la creazione di nuovi capillari da capillari esistenti. Il sistema vascolare è, infatti, normalmente quiescente salvo determinati eventi in cui viene attivato transitoriamente (come ad esempio durante il ciclo riproduttivo femminile, in caso di condizioni patologiche o con l'allenamento). L'esercizio fisico è tra i principali elementi di stimolo dell'apparato vascolare, a tal punto che nel tessuto muscolare di un atleta, la rete capillare può essere estesa fino a quattro volte di più rispetto a soggetti sedentari. (Saltin 1988)

L'angiogenesi nel muscolo scheletrico viene facilmente indotta sia da ET (Andersen 1977), sia da RT (Gavin 2007). L'endurance training permette l'aumento del rapporto tra capillari e numero di fibre che li condividono (C/F) e del numero di capillari, senza alterare in modo significativo l'area delle fibre, in questo modo quindi, la densità capillare aumenta. L'allenamento contro resistenza modifica notevolmente l'area delle fibre e, anche se questi cambiamenti sono accompagnati da aumenti del rapporto C/F, la densità capillare non viene alterata. (Hoier 2014) Anche nel caso del gruppo di Snijders (Snijders 2017) la capillarizzazione muscolare non è cambiata dopo il protocollo di allenamento di 12 settimane di RT, invece, in un altro studio (Verdijk 2016) è stato riscontrato un aumento in risposta a 12 settimane di allenamento contro

resistenza, possibilmente a causa di diversi fattori (volume di allenamento e caratteristiche miocellulari di base). (Moro 2019)

Il processo di crescita capillare è probabilmente legato all'attività di VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), assieme ad altri fattori pro-angiogenici e anche angiostatici. (Hoier 2014) La contrazione muscolare, la segnalazione meccanica (shear stress e passive stretch) e l'adenosina possono aumentare soprattutto il VEGF interstiziale, il quale origina per lo più dalle cellule muscolari scheletriche che lo immagazzinano in vescicole. (Hoier 2014)

Considerando che in precedenti studi è stato osservato un significativo aumento delle dimensioni delle fibre di tipo 2 solo in soggetti con un livello di capillarizzazione al baseline elevato (Snijders 2017) (Moro 2019), la densità capillare potrebbe avere un ruolo cruciale nella risposta all'allenamento, poiché permette un miglior apporto di nutrienti e ossigeno alle fibre. Sia RT che ET possono stimolare l'angiogenesi, tuttavia con meccanismi e adattamenti diversi e, probabilmente, un periodo di pre-condizionamento aerobico potrebbe migliorare la densità capillare al fine di rendere i soggetti più responsivi alla successiva fase di RT, a favore dell'ipertrofia delle fibre muscolari.

4. COMBINAZIONE ET E RT IN UN PROTOCOLLO DI STUDIO

Al fine di comprendere l'influenza della combinazione di un protocollo ET e RT sulla crescita delle fibre muscolari, il gruppo di Snijders, propose un progetto di 12 settimane con RT due volte a settimane, con lo scopo di stimolare l'ipertrofia, ed ET una volta a settimana, con l'idea di indurre una risposta da parte delle cellule satelliti. (Snijders 2019)

Il gruppo ottenne dei risultati stimolanti, nonostante l'attenzione principale era rivolta alla risposta in acuto delle cellule satelliti. Infatti i dati non confermarono l'ipotesi iniziale di poter avere un miglior adattamento ipertrofico grazie alla combinazione di allenamento anaerobico e aerobico. Vi è stata una tendenza all'aumento della densità capillare muscolare, a cui, tuttavia, non si è accostato un significativo miglioramento delle dimensioni delle fibre di tipo 1 e 2 ($p = 0,066$), potenzialmente a causa della modalità di combinazione RT e ET.

Lo scopo di questo elaborato è, quindi, comprendere se un diverso accostamento delle due tipologie di allenamento, ossia un programma di 12 settimane, con 4 settimane di ET e 8 settimane seguenti di RT oppure con 4 settimane di RT, seguiti da 4 settimane di ET e, infine, 4

settimane di RT, possa permettere di confermare una nuova ipotesi, ossia creare le migliori condizioni di base per indurre un processo anabolico muscolare efficiente nell'anziano.

MATERIALI E METODI

1. PARTECIPANTI E CRITERI DI INCLUSIONE

Il reclutamento è stato svolto tramite passaparola, volantini o social media e i potenziali partecipanti sono stati sottoposti ad un questionario conoscitivo al fine di osservare che venissero rispettati i criteri di inclusione. È stato accertato che avessero tutti un'età superiore ai 65 anni, un BMI compreso tra 18 e 30kg/m², un peso corporeo stabile negli ultimi 3 mesi, assenza di diabete, pre-diabete, patologie croniche, stati acuti infiammatori, uso o trattamento con farmaci steroidei e pratica regolare di attività fisica intensa (≥ 2 sessioni/settimana).

Per questa tesi verranno presi in considerazione solamente 16 partecipanti, poiché lo studio è ancora in corso e non tutti si sono resi disponibili per le biopsie muscolari. I soggetti sono stati rispettivamente divisi nei seguenti gruppi:

- RRR: 7 soggetti di cui 4 uomini e 3 donne.
- ARR: 9 soggetti di cui 5 uomini e 4 donne.

Le caratteristiche dei partecipanti sono meglio descritte in tabella 1.

Tabella 1. Caratteristiche antropometriche dei soggetti al baseline.

	RRR	ARR
N (M,F)	7 (4,3)	9 (5,4)
ETÀ (anni)	71,43 \pm 5,74	70,11 \pm 3,89
ALTEZZA (m)	1,70 \pm 0,09	1,64 \pm 0,11
PESO (kg)	76,89 \pm 14,20	73,59 \pm 13,15
BMI (kg/m²)	27,03 \pm 2,67	27,07 \pm 2,20
%FAT MASS	37,04 \pm 6,19	35,23 \pm 6,95

2. DISEGNO SPERIMENTALE

I soggetti volontari sono stati suddivisi in maniera casuale in due gruppi di intervento: RRR, ovvero il gruppo di controllo che prevedeva 12 settimane di allenamento con sovraccarichi e ARR, i cui partecipanti potevano iniziare con 4 settimane di allenamento aerobico e seguite da due mesi di allenamento di forza, oppure alternare un mese di allenamento contro resistenza, un mese di allenamento aerobico e l'ultimo mese con allenamento di forza. La scelta di inserire in un unico gruppo i soggetti che avevano effettuato almeno un mese di allenamento aerobico è dovuta alla bassa numerosità campionaria, essendo lo studio ancora in corso. Osservando la risposta dei soggetti presi

singolarmente, possiamo affermare che la risposta dei soggetti che hanno eseguito almeno un mese di allenamento aerobico risulta simile.

Nei seguenti paragrafi verranno spiegati nel dettaglio il protocollo di allenamento e i test eseguiti.

3. PROTOCOLLO DI STUDIO

Il protocollo di allenamento scelto è stato svolto per 12 settimane (36 sedute totali). L'allenamento contro resistenza è un allenamento di tipo total body, con particolare attenzione agli esercizi per gli arti inferiori, mentre l'allenamento aerobico veniva svolto su una cyclette ad un'intensità di circa 60%VO₂peak.

Gli esercizi proposti potevano talvolta subire variazioni nel caso di algie o dolori articolari dei singoli partecipanti. La sequenza degli esercizi è stata svolta con l'idea di alternare un esercizio per gli arti inferiori ad uno per gli arti superiori ed è stata suddivisa in: leg press, chest press, affondi, pulley con elastici o rematore, leg extension, alzate laterali, curl per bicipiti e addominali.

Tutti gli allenamenti erano divisi in riscaldamento, corpo centrale e stretching, per la durata totale di circa 60 minuti e sono descritti in Tabella 2. e Tabella 3.

3.1 Riscaldamento

Durata di circa sei minuti con cinque minuti di cicloergometro o ellittica a bassa intensità e due serie da quindici ripetizioni di piegamenti al muro.

3.2 Corpo centrale

Diverso a seconda del gruppo di appartenenza:

I soggetti appartenenti al gruppo RRR svolgevano tre serie per gli arti inferiori e due serie per gli arti superiori, con un carico di intensità crescente ogni settimana, a partire nella prima settimana da 15 ripetizioni al 60%1RM per concludere nell'ultimo mese con 8 ripetizioni all'80% 1RM,

Per quanto riguarda il gruppo ARR, i partecipanti hanno svolto il primo mese un allenamento aerobico; nello specifico la prima settimana 20 minuti di cyclette al 60% VO₂peak, la seconda settimana 30 minuti di cyclette al 60%VO₂peak e le ultime due settimane 40 minuti di cyclette alla medesima intensità). Il secondo mese prevedeva allenamento con sovraccarichi come per il gruppo RRR, ma partendo con un'intensità maggiore (70% 1RM) fino all'80% 1RM per l'ultimo mese.

I partecipanti al protocollo RAR, invece hanno eseguito il primo mese lo stesso allenamento di RRR (3 serie per gli arti inferiori e 2 serie per gli arti superiori da 12-15 ripetizioni al 60-70%1RM), il secondo mese hanno eseguito il protocollo aerobico (20, 30, 40 minuti di bici al 60%VO₂peak), e l'ultimo mese RT ad intensità 80%1RM.

Per quanto riguarda il gruppo ARR i partecipanti hanno svolto un allenamento aerobico durante il primo o il secondo mese dello studio. Il protocollo aerobico prevedeva la prima settimana 20 minuti di cyclette al 60%VO₂peak, la seconda settimana 30 minuti di cyclette al 60%VO₂peak e le ultime due settimane 40 minuti di cyclette alla medesima intensità. Le settimane in cui non eseguivano il protocollo aerobico, i partecipanti eseguivano lo stesso protocollo del gruppo RRR.

3.3 Stretching

Questa fase è stata svolta con due esercizi di stretching uno per la catena posteriore delle gambe e uno per i muscoli pettorali.

<i>Esercizio</i>	<i>Serie</i>
Riscaldamento	5 minuti
Leg press	3
Chest press	2
Affondi in avanzamento	3
Rematore con elastico o su panca	2
Leg extension	3
Alzate laterali	2
Curl per bicipiti	2
Crunch	2
Stretching	5 minuti

Tabella 2. Protocollo di allenamento per RT.

<i>Esercizio</i>	<i>Serie</i>
Riscaldamento	5 minuti
Cyclette	20 0 30 0 40 minuti
Chest press	2
Rematore con elastico o su panca	2
Alzate laterali	2
Curl per bicipiti	2
Crunch	2
Stretching	5 minuti

Tabella 3. Protocollo di allenamento per ET

4. MISURAZIONI

Ogni partecipante è stato sottoposto ad analoghi test in tre diversi time point: T0 al baseline, T2 dopo 8 settimane di allenamento e T3 dopo 12 settimane.

4.1 Composizione corporea

Il peso corporeo e l'altezza sono stati misurati utilizzando uno stadiometro con bilancia (Wunder C201, Italia) e l'indice di massa corporea (BMI) è stato calcolato in kg/m^2 . Per quantificare la composizione corporea, i soggetti sono stati sottoposti nell'ordine a bioimpedenziometria BIA (BIA 101 BIVA PRO – Akern S.R.L., Italia) e successivamente a densitometria assiale a raggi X (Horizon DXA System; QDR 4500 W, Hologic Italia s.r.l, Roma, Italia). Dall'analisi della BIA si sono ricavati dati di idratazione corporea, l'acqua intracellulare ed extracellulare corporea e l'angolo di fase; mentre dalla DXA si sono ottenuti indici di densità minerale-ossea, massa magra e massa grassa.

4.2 Test di forza

Per la valutazione della forza isometrica, sono state eseguite massime contrazioni isometriche volontarie (maximal voluntary contraction, MVC) su un dinamometro isometrico su misura (custom made).

La forza dinamica è stata calcolata indirettamente con la formula di Brzycki (Brzycki, 1993) per mantenere i soggetti in sicurezza, essendo dei neofiti. È stato utilizzato il test 4-6RM durante gli esercizi di leg extension e leg press, arrivando a raggiungere un carico con il quale era possibile compiere un massimo di quattro o cinque ripetizioni. Questi test venivano svolti ogni mese in modo anche da poter adattare il carico degli allenamenti e poter così impostare una buona progressione.

4.3 Le biopsie muscolari

Le biopsie muscolari umane sono state ottenute dal vasto laterale utilizzando un ago Bergström 5mm. Una parte di tessuto muscolare orientato è stato posizionato in apposita cameretta contenente un mezzo di inclusione ideale per il sezionamento del campione ed è stato poi congelato in isopentano raffreddato con azoto liquido e successivamente conservato a -80°C fino al momento del taglio. Mediante un criostato (Histo-line Laboratories) la biopsia è stata tagliata in sezioni di $7\ \mu\text{m}$ di

spessore, che sono state poste su vetrini porta-oggetto, lasciate asciugare per un'ora e conservate a -20°C fino al momento della colorazione.

Successivamente, le sezioni sono state fissate in acetone a -20°C per 10 minuti e l'eccesso eliminato con vari lavaggi da 3 minuti in PBS.

In seguito, è stata aggiunta una soluzione bloccante al 2.5% NHS in RT (Vector #S-2012), per poi essere incubati tutta la notte con anticorpi primari in 2.5% NHS blocking a 4°C con:

- Ms IgG1 CD31/PECAM (1:50) (BD Biosciences cat #550300);
- Type 1 BA.D5 Ms IgG2b (1:500) (BA.D5 –C, from DHSB Iowa);
- Rb laminin (1:500) (Sigma cat #L9393).

Il giorno seguente sono stati nuovamente fatti tre lavaggi da 3 minuti ciascuno in PBS e incubati per un'ora con anticorpi secondari in 2.5% NHS a temperatura ambiente con:

- Gt anti-Ms IgG1, Alexa Fluor 568 (1:500) (Invitrogen, Cat #A-21124);
- Gt anti Ms IgG2b Alexa Fluor 488 (1:500) (Invitrogen, Cat #A-21127);
- Gt anti Rb IgG Alexa Fluor 350 (1:500) (Invitrogen, Cat #A-11034).

Dopo tre lavaggi da 3 minuti ciascuno in PBS, le sezioni sono state sigillate con vetrino copri-oggetto utilizzando il mezzo di montaggio Mowiol, lasciando solidificare per 24 ore.

Le immagini delle sezioni sono state acquisite con microscopio Nikon Ti2 Eclipse e sono state analizzate attraverso il software di analisi Nikon Advanced Research Software.

In ogni sezione sono state analizzate 50 fibre muscolari per soggetto per timepoint. Le analisi effettuate sono state: la cross sectional area delle singole fibre (25 type 1 e 25 type 2), il numero di capillari attorno alle fibre (capillary contacts CC), il numero di capillari che irrorano una singola fibra (capillary to fibre ratio C/Fi) e il rapporto di scambio tra capillari e fibra (CFPE).

5. ANALISI STATISTICA

I dati raccolti sono stati inseriti in un foglio Microsoft Excel (2019) e successivamente sono stati analizzati utilizzando il software JASP 0.19.0 (2024).

Per valutare la presenza di differenze tra i gruppi RRR e ARR è stato utilizzato il *test Two-way ANOVA per misure ripetute* sulle variabili raccolte.

In caso di significatività statistica ($p < 0,05$), è stato eseguito il post hoc test di Bonferroni al fine di identificare eventuali differenze tra i diversi timepoint.

RISULTATI

I risultati riportati in questa sezione non includono la totalità dei soggetti in tutti i timepoint, purtroppo infatti non tutti i soggetti sono riusciti a completare i tre mesi di studio e/o non tutti si sono resi disponibili per la terza biopsia. Per questo motivo i risultati verranno suddivisi in cambiamenti tra t0 (basale) e t2 (dopo 2 mesi) e adattamenti tra t0 e t3 (dopo 3 mesi) per coloro che hanno concluso tutti gli allenamenti.

Per tutte le variabili considerate, a livello basale non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi.

1. CAMBIAMENTI TRA T0 E T2

Dall'analisi statistica dell'1RM si è osservato un effetto significativo per il fattore tempo ($p < 0,001$) da cui emerge che la forza aumenta da t0 a t2 sia per il gruppo RRR sia per ARR. Tuttavia, non si può apprezzare un aumento significativo della massa magra totale tra i due timepoint per nessuno dei due gruppi, mentre dall'analisi della massa magra dell'arto inferiore si osserva un effetto significativo per il fattore tempo ($p = 0,016$) e un'interazione tempo x gruppo tendente alla significatività ($p = 0,07$). L'analisi post hoc ha infatti evidenziato un aumento significativo della massa magra nel gruppo RRR ($p = 0,045$), mentre non sembra modificarsi significativamente per il gruppo ARR (Figura 1)

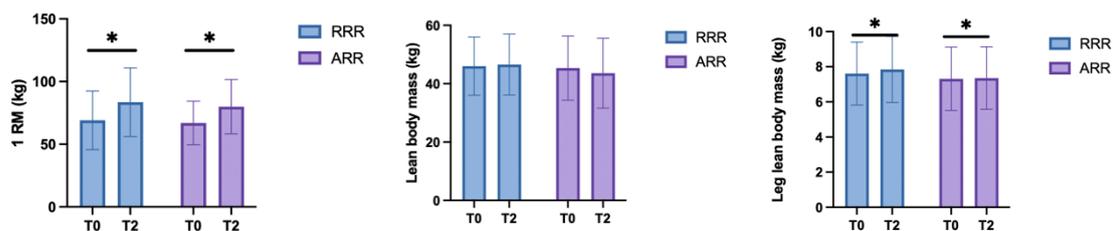


Figura 1: two way ANOVA per misure ripetute di 1RM, lean body mass leg lean body mass tra T0 e T2.

Dall'analisi della CSA proveniente dai campioni biopsici muscolari, si osserva un effetto tendente alla significatività statistica ($p = 0,051$) per il fattore tempo, che delinea un aumento della dimensione totale delle fibre durante i due mesi di allenamento per entrambi i gruppi di studio (nello specifico RRR +28,94% e ARR +25,31%). Dall'analisi degli indici di capillarizzazione non è emerso alcun cambiamento significativo (Figura 2)

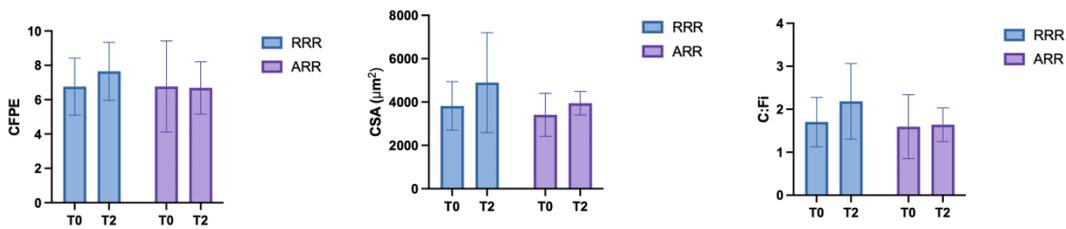


Figura 2: two way ANOVA per misure ripetute di CFPE, CSA e C:Fi tra T0 e T2.

Suddividendo i dati per tipologia di fibra muscolare, nelle fibre di tipo 1 non si è riscontrato alcun cambiamento significativo, né per la CSA né per gli indici di capillarizzazione C:FI e CFPE (Figura 3).

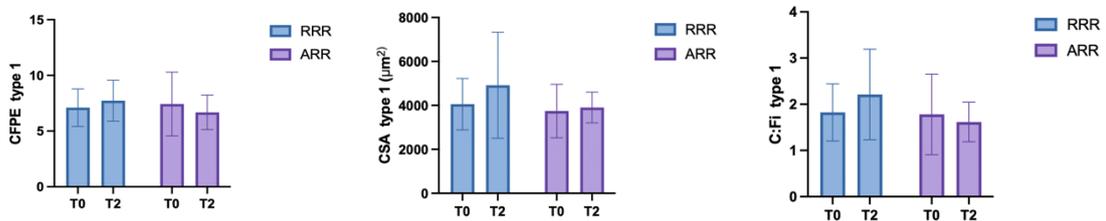


Figura 3: two way ANOVA per misure ripetute di CFPE, CSA e C:Fi delle fibre di tipo 1 tra T0 e T2.

Tuttavia, nelle fibre di tipo 2 è possibile apprezzare un effetto significativo per il fattore tempo ($p=0,019$) che descrive un aumento della CSA in entrambi i gruppi (+33,67% RRR e +41,96% ARR) tra t0 e t2. Anche gli indici di capillarizzazione hanno presentato un andamento simile C:FI $p=0,011$ e CFPE $p=0,021$, senza evidenziare alcuna differenza tra i due gruppi (Figura 4).

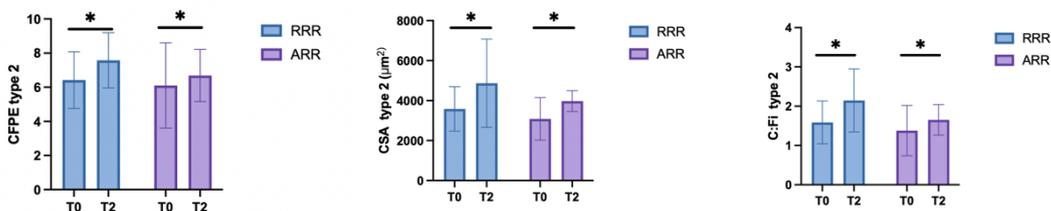


Figura 4: two way ANOVA per misure ripetute di CFPE, CSA e C:Fi delle fibre di tipo 2 tra T0 e T2.

2. CAMBIAMENTI TRA T0-T2-T3

Dall'analisi della forza è emerso un aumento significativo tra tutti e tre timepoint ($p < 0,001$). (Figura 5)

Diversamente non si è riscontrata nessuna differenza significativa per quanto riguarda la massa magra, mentre è apprezzabile una tendenza alla significatività tra i tre timepoint per la massa magra dell'arto inferiore destro ($p = 0,053$). (Figura 5)

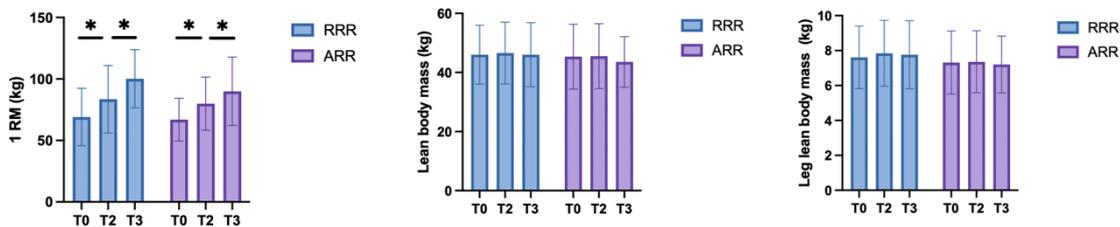


Figura 5: two way ANOVA per misure ripetute di 1RM, lean body mass e leg lean body mass tra T0, T2 e T3.

I successivi risultati verranno presentati solo in forma descrittiva, poiché la numerosità campionaria è troppo bassa per avere una validità statistica.

La CSA totale è aumentata tra il primo e il terzo mese nei soggetti ARR con +11,96%, mentre per il gruppo RRR è diminuita di -17,77%. (Figura 6)

Dagli indici di capillarizzazione si è riscontrato rispettivamente un aumento per C:FI tra t0 e t3 (del + 5,63% per RRR e del + 6,76% per ARR), come per CFPE, nello specifico +12,40% per RRR e +1,45% per ARR. (Figura 6)

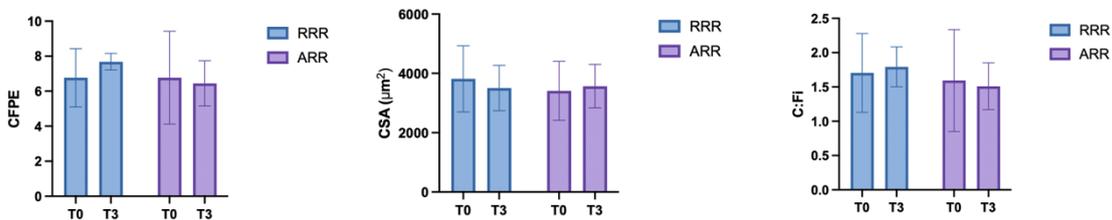


Figura 6: two way ANOVA per misure ripetute di CFPE, CSA e C:Fi tra T0 e T3.

Prendendo in considerazione solo le fibre di tipo 1, dalla CSA è apprezzabile una riduzione per RRR di -28,86% tra t0 e t3 e un aumento per il gruppo ARR di +7,56% tra il primo e il terzo mese. (Figura 7)

Relativamente a CFPE è riscontrabile un aumento di +2,52% per RRR e una diminuzione di -2,62% per ARR. Mentre per RRR, C:Fi è diminuito di -14,35% e per ARR è aumentato di 0,44%. (Figura 7)

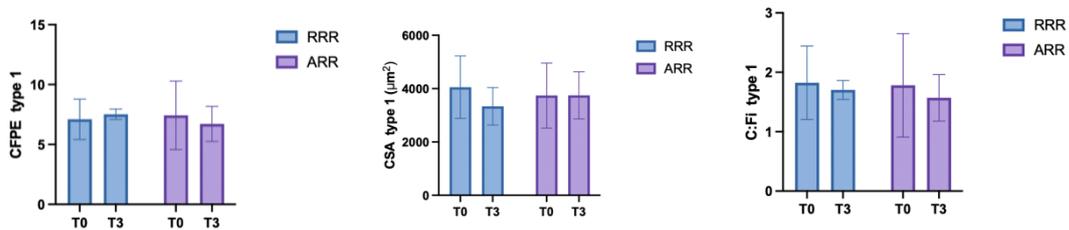


Figura 7: two way ANOVA per misure ripetute di CFPE, CSA e C:Fi delle fibre di tipo 1 tra T0 e T3.

Dall'analisi della CSA delle fibre di tipo 2, si è riscontrato un aumento tra t0 e t3 per ARR (+18,71%) e una diminuzione per RRR (-4,76%) (Figura 8).

Infine, è possibile apprezzare un aumento per CFPE tra t0 e t3 sia per RRR (+24,21%) sia per ARR (+13,01%), come per C:Fi (nello specifico RRR con +19,62% e ARR con +17,07%) (Figura 8).

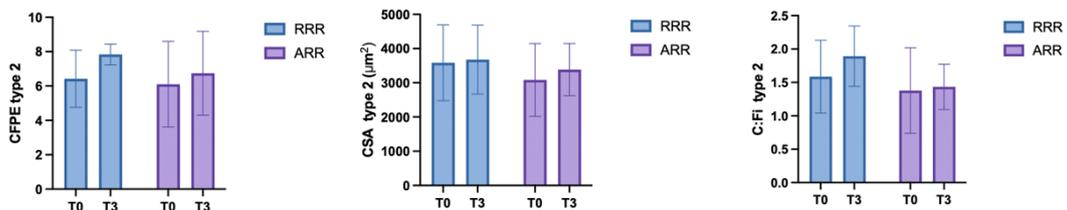


Figura 8: two way ANOVA per misure ripetute di CFPE, CSA e C:Fi delle fibre di tipo 2 tra T0 e T3..

DISCUSSIONE

Lo scopo di questo studio era comprendere se l'inserimento di un mese di endurance training in un piano di allenamento di 12 settimane in soggetti anziani, potesse essere una strategia efficace per favorire la crescita muscolare, in particolare delle fibre di tipo 2. Questa ipotesi nasce dall'osservazione che la risposta ipertrofica negli anziani sembra essere maggiore quando i livelli di capillarizzazione muscolare sono elevati (Snijders 2017) (Moro 2019); e considerando che l'endurance training è uno stimolo efficace per stimolare l'angiogenesi (Hughes 2018) per rispondere alle richieste energetiche dello sforzo stesso.

I risultati preliminari di questo studio ci hanno permesso di osservare un aumento significativo della forza già nei primi due mesi di allenamento, da cui possiamo dedurre che entrambe le metodologie di allenamento possono portare ad un miglioramento della forza, fattore determinante per la sarcopenia. (Cruz-Jentoft 2019) Il fatto che non siano emerse differenze significative tra i due gruppi, può essere spiegato dalla scelta di far eseguire la parte aerobica su cicloergometro: infatti l'allenamento su bike richiede al soggetto di pedalare contro la resistenza offerta dallo strumento, e può quindi spiegare l'aumento di forza.

Per lo stesso motivo, non sono stati osservate differenze tra i gruppi per quanto riguarda l'incremento di massa muscolare. Questo dato non stupisce, soprattutto considerando che l'obiettivo dei primi due mesi di allenamento diversificato, erano quello di aumentare i livelli di capillarizzazione per poter massimizzare la risposta muscolare in risposta al terzo mese di allenamento. Come atteso, un allenamento progressivo con sovraccarichi ha indotto un aumento maggiore di massa muscolare negli arti inferiori, rispetto al gruppo che ha eseguito l'allenamento di endurance. La maggior parte degli studi che hanno utilizzato l'allenamento aerobico alternato a quello con sovraccarichi ("concurrent training") ha alternato queste due modalità all'interno della stessa seduta di allenamento. Da questi studi è emerso che il concurrent training sembra inibire l'ipertrofia muscolare, soprattutto quando la componente aerobica viene proposta con volumi elevati (più di 4 giorni a settimana) e ad un'intensità superiori al 70% del VO₂max (Hughes 2018). Nel presente studio, volume ed intensità erano minori rispetto a quanto descritto, ma evidentemente interrompere un periodo di allenamento con sovraccarichi inserendo un allenamento esclusivamente aerobico, è sufficiente per inibire l'effetto anabolico che normalmente si osserverebbe. Questi risultati vengono confermati anche a livello microscopico, infatti anche la dimensione delle singole fibre è aumentata, tuttavia non si sono potute apprezzare differenze significative tra i due gruppi.

Inaspettatamente, gli indici di capillarizzazione non hanno subito un miglioramento significativo nel gruppo ARR: il protocollo di allenamento prevedeva infatti un componente aerobico a bassa intensità proprio allo scopo di aumentare il numero di capillari muscolari. Non solo questa tipologia di allenamento non sembra esser estata efficace a raggiungere lo scopo, ma sembra addirittura meno efficace del gruppo controllo. Benché questi dati non siano ancora completi, e quindi il power statistico non sia ottimale, è possibile formulare alcune ipotesi per spiegare questo risultato inatteso: 1) la durata del protocollo aerobico non è sufficiente ad innescare il processo di angiogenesi, 2) protocolli ad alta intensità (tipo HIIT) potrebbero essere più efficaci, ma non sarebbero adeguati ad una popolazione anziana sedentaria e neofita; 3) i partecipanti si presentavano con un livello di decondizionamento tale, che il primo adattamento al periodo di allenamento è stato più neuronale e meno strutturale.

L'obiettivo iniziale dello studio era tuttavia quello di studiare l'influenza che dei primi due mesi di protocolli differenziati sull'adattamento al terzo mese di allenamento di forza.

Come già spiegato, i soggetti che hanno portato a termine il terzo mese e/o che si sono resi disponibili per la terza biopsia muscolare sono pochi per poter eseguire un'analisi statistica adeguata. Possiamo, tuttavia, osservare come la forza sia aumentata per tutta la durata dell'intervento in entrambi i gruppi; e che anche la massa muscolare degli arti inferiori tende ad aumentare in entrambi i gruppi. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che il focus dell'allenamento fosse sugli arti inferiori.

Il CFPE è aumentato in entrambi i gruppi, in particolare per i soggetti RRR. L'indice CFPE rappresenta il rapporto tra numero di capillari e dimensione delle fibre: un suo aumento può quindi indicare che l'incremento di capillarizzazione è stato maggiore rispetto a quello della dimensione delle fibre. Nel caso dei presenti dati preliminari, si potrebbe quindi ipotizzare che i due mesi di allenamento, siano questi con o senza componente aerobica, non sono stati sufficienti ad indurre uno stimolo angiogenetico sufficiente a promuovere una maggior risposta ipertrofica durante il terzo mese di allenamento. L'incremento della numerosità campionaria potrà dare una maggior chiarezza sull'interpretazione di questi risultati.

CONCLUSIONI

Alla fine di questo progetto, i risultati ottenuti non sono riusciti a confermare l'ipotesi che l'inserimento di un mese di allenamento aerobico in un periodo di tre mesi di allenamento possa portare a miglioramenti maggiori a livello di vascolarizzazione e ipertrofia muscolare. Ad oggi, possiamo affermare che entrambe le modalità sono valide per ottenere un aumento di forza, densità capillare e ipertrofia, in particolare per le fibre di tipo 2, le quali sono quelle maggiormente compromesse nella popolazione anziana.

Possiamo ipotizzare che al fine di apprezzare i benefici che si possono ottenere con l'endurance training, sarebbe stato necessario uno stimolo aerobico più lungo

Sarà quindi interessante osservare se con una maggior numerosità campionaria vi saranno dei risultati differenti andando ad indagare inoltre se diverse combinazioni di allenamento, possano promuovere maggiormente l'ipertrofia muscolare.

BIBLIOGRAFIA:

- Abernethy, PJ, Ju" rima"e, J, Logan, PA, Taylor, AW, and Thayer, RE. Acute and chronic response of skeletal muscle to resistance exercise. *Sports Med* 17: 22–38, 1994.
- Ahtiainen, JP, Pakarinen, A, Alen, M, Kraemer, WJ, and Ha"kkinen, K. Muscle hypertrophy, hormonal adaptations and strength development during strength training in strength-trained and untrained men. *Eur J Appl Physiol* 89: 555–563, 2003.
- Andersen P, Henriksson J. Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise. *J Physiol.* 1977 Sep;270(3):677-90.
- Cloutier, G., Forman, D., Lindegger, N., Roubenoff, R. and Castaneda-Sceppa, C. (2014), Effects of a short-term heavy resistance training in young and older adults for strength and body composition (1028.1). *The FASEB Journal*, 28: 1028.1.
- Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel JP, Rolland Y, Schneider SM, Topinková E, Vandewoude M, Zamboni M; European Working Group on Sarcopenia in Older People. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing.* 2010 Jul;39(4):412-23.
- Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyère O, Cederholm T, Cooper C, Landi F, Rolland Y, Sayer AA, Schneider SM, Sieber CC, Topinkova E, Vandewoude M, Visser M, Zamboni M; Writing Group for the European Working Group on Sarcopenia in Older People 2 (EWGSOP2), and the Extended Group for EWGSOP2. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing.* 2019 Jan 1;48(1):16-31.
- Defante Telles G, Lixandrão M, Conceição M. Effects of combined exercise training in older adults: a potential relationship between muscle fibre satellite cell function and capillarization. *J Physiol.* 2019 Apr;597(8):2127-2128.
- Gavin TP, Drew JL, Kubik CJ, Pofahl WE, Hickner RC. Acute resistance exercise increases skeletal muscle angiogenic growth factor expression. *Acta Physiol (Oxf).* 2007 Oct;191(2):139-46.
- Geriatrics Department of Wroclaw University Hospital
- Grgic J, Mcllvenna LC, Fyfe JJ, Sabol F, Bishop DJ, Schoenfeld BJ, Pedisic Z. Does Aerobic Training Promote the Same Skeletal Muscle Hypertrophy as Resistance

Training? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med.* 2019 Feb;49(2):233-254

- Hoier B, Hellsten Y. Exercise-induced capillary growth in human skeletal muscle and the dynamics of VEGF. *Microcirculation* 21: 301–314, 2014.
- Hughes DC, Ellefsen S, Baar K. Adaptations to Endurance and Strength Training. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 Jun 1;8(6):a029769.
- Hunter, G. R., McCarthy, J. P., & Bamman, M. M. (2004). Effects of Resistance Training on Older Adults. *Sports Medicine*, 34(5), 329–348.
- Kelly NA, Hammond KG, Bickel CS, Windham ST, Tuggle SC, Bamman MM. Effects of aging and Parkinson's disease on motor unit remodeling: influence of resistance exercise training. *J Appl Physiol* (1985). 2018 Apr 1;124(4):888-898.
- Kosek DJ, Kim JS, Petrella JK, Cross JM, Bamman MM. Efficacy of 3 days/wk resistance training on myofiber hypertrophy and myogenic mechanisms in young vs. older adults. *J Appl Physiol* (1985) 101: 531–544, 2006.
- Larsson L, Degens H, Li M, Salviati L, Lee YI, Thompson W, Kirkland JL, Sandri M. Sarcopenia: Aging-Related Loss of Muscle Mass and Function. *Physiol Rev.* 2019 Jan 1;99(1):427-511.
- Lexell J. Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1995 Nov;50 Spec No:11-6.
- Lovell DI, Cuneo R, Gass GC. Can aerobic training improve muscle strength and power in older men? *J Aging Phys Act.* 2010 Jan;18(1):14-26.
- Moro T, Brightwell CR, Phalen DE, McKenna CF, Lane SJ, Porter C, Volpi E, Rasmussen BB, Fry CS. Low skeletal muscle capillarization limits muscle adaptation to resistance exercise training in older adults. *Exp Gerontol.* 2019 Nov;127:110723.
- Nishikawa H, Fukunishi S, Asai A, Yokohama K, Nishiguchi S, Higuchi K. Pathophysiology and mechanisms of primary sarcopenia (Review). *Int J Mol Med.* 2021 Aug;48(2):156.
- Pacholek K, Sobieszczanska M. Sarcopenia Identification during Comprehensive Geriatric Assessment. *Int j Environ Res Public Health.* 2021 Dec 21;19(1):32.
- Papadopoulou SK. Sarcopenia: A Contemporary Health Problem among Older Adult Populations. *Nutrients.* 2020 May 1;12(5):1293.

- Rogeri PS, Zanella R Jr, Martins GL, Garcia MDA, Leite G, Lugaresi R, Gasparini SO, Sperandio GA, Ferreira LHB, Souza-Junior TP, Lancha AH Jr. Strategies to Prevent Sarcopenia in the Aging Process: Role of Protein Intake and Exercise. *Nutrients*. 2021 Dec 23;14(1):52.
- Saltin B. Capacity of blood flow delivery to exercising skeletal muscle in humans. *Am J Cardiol*. 1988 Sep 9;62(8):30E-35E.
- Sayer AA, Cruz-Jentoft A. Sarcopenia definition, diagnosis and treatment: consensus is growing. *Age Ageing*. 2022 Oct 6;51(10):afac220.
- Snijders T, Nederveen JP, Bell KE, Lau SW, Mazara N, Kumbhare DA, Phillips SM, Parise G. Prolonged exercise training improves the acute type II muscle fibre satellite cell response in healthy older men. *J Physiol*. 2019 Jan;597(1):105-119.
- Snijders T, Nederveen JP, Joannis S, Leenders M, Verdijk LB, van Loon LJ, Parise G. Muscle fibre capillarization is a critical factor in muscle fibre hypertrophy during resistance exercise training in older men. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2017 Apr;8(2):267-276.
- Verdijk LB, Gleeson BG, Jonkers RA, Meijer K, Savelberg HH, Dendale P, van Loon LJ. Skeletal muscle hypertrophy following resistance training is accompanied by a fiber type-specific increase in satellite cell content in elderly men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 64: 332–339, 2009.
- Verdijk LB, Snijders T, Holloway TM, VAN Kranenburg J, VAN Loon LJ. Resistance Training Increases Skeletal Muscle Capillarization in Healthy Older Men. *Med Sci Sports Exerc*. 2016 Nov;48(11):2157-2164.