

**POLITECNICO DI TORINO**

Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



Tesi di Laurea Magistrale

**Age-Related Changes in Motor Unit Behavior:  
Implications for Force Modulation and  
Fatigue during isometric contractions**

**Relatori**

Prof. Alberto BOTTER

Dott. Marco CARBONARO

Dott.ssa Marta BOCCARDO

**Candidato**

Vincenzina PALLOTTA

**Luglio 2025**

## Abstract

L'invecchiamento è associato a un progressivo deterioramento del controllo neuromuscolare e della forza, influenzati da modificazioni strutturali compensatorie, come processi di denervazione e reinnervazione delle unità motorie (MU). Questi cambiamenti, che possono manifestarsi già tra i 50 e i 60 anni, hanno conseguenze funzionali significative e favoriscono l'insorgenza della sarcopenia, aumentando il rischio di disabilità. Sebbene numerosi studi trasversali abbiano descritto le differenze tra giovani e anziani, un approccio longitudinale risulta essenziale per distinguere gli effetti del normale processo di invecchiamento dalla variabilità interindividuale.

Il presente lavoro di tesi si inserisce in un progetto di ricerca più ampio, denominato Trajector-Age, e si propone di caratterizzare i cambiamenti trasversali e longitudinali del comportamento delle MU legati all'età, con particolare interesse ad eventuali risvolti dal punto di vista delle variazioni nello sviluppo della forza e nel comportamento a fatica.

L'analisi delle implicazioni sul controllo della forza e sulla fatica negli anziani contribuisce a discriminare il ruolo dei meccanismi centrali, associati al comportamento delle MU, rispetto ai fattori periferici, e ad interpretare le evidenze contrastanti sulla fatica, talora ricondotte a processi di rimodellamento neurale.

Sono state analizzate due fasce d'età critiche per il processo di invecchiamento, rappresentate rispettivamente da 11 adulti di mezza età (PRM;  $58 \pm 4$  anni) e 11 anziani (PRO;  $78 \pm 5$  anni), che hanno preso parte a tre sessioni sperimentali, a distanza di sei mesi l'una dall'altra (T0, T1 e T2). In aggiunta, è stato considerato un gruppo di controllo di 10 giovani (TOY;  $26 \pm 2$  anni), nelle contrazioni a fatica. I segnali elettromiografici ad alta densità (HDEMG) sono stati acquisiti dal muscolo vasto laterale (VL) mediante una griglia a 64 canali, durante contrazioni isometriche a rampa fino al 30% e 50% della contrazione volontaria massima (MVC) e durante una contrazione sostenuta al 50% MVC fino ad esaurimento.

I segnali acquisiti sono stati elaborati con un software di decomposizione che permette di identificare gli istanti di attivazione delle singole MU che contribuiscono al segnale globale. L'analisi delle proprietà di sparo delle MU evidenzia una crescita limitata del firing rate (FR) dei PRO nella fase ascendente della rampa di forza, che quindi raggiunge un valor medio significativamente minore nel plateau rispetto ai PRM (9-15%).

Dal rapporto tra la variazione di forza e di FR dal reclutamento alla fase di tenuta, emerge che, a parità di forza sviluppata, le MU dei PRO mostrano un incremento del FR contenuto rispetto ai PRM, fattore che influenza una ridotta capacità nei soggetti anziani di modulare la forza.

Nelle contrazioni affaticanti, l'andamento del FR nel tempo è stato analizzato tramite regressione bilineare, al fine di identificare un punto di cambiamento nella tendenza (breakpoint). L'analisi della variazione del firing rate al secondo (slope) ha evidenziato un aumento significativo del FR dei PRM rispetto agli altri due gruppi (0,02-0,03 pps/s) nella fase precedente il breakpoint, e una successiva riduzione nei PRO rispetto ai TOY (0,02 pps/s), suggerendo la presenza di adattamenti favorevoli alla resistenza alla fatica nei PRM, ma non evidenti nei PRO.

In conclusione, questo studio ha rilevato una riduzione significativa della dinamica del FR nei soggetti anziani, evidenziandone implicazioni nel limitare la capacità di modulare la forza generata e un miglior adattamento nelle condizioni affaticanti per i soggetti di mezza età ma non per gli anziani.

# Abstract

*(English version)*

Ageing is associated with a progressive deterioration of neuromuscular control and strength, influenced by compensatory structural changes, such as denervation and reinnervation processes of motor units (MU). These changes, which can occur as early as between 50 and 60 years of age, have significant functional consequences and favour the onset of sarcopenia, increasing the risk of disability. Although numerous cross-sectional studies have described differences between young and old, a longitudinal approach is essential to distinguish the effects of the normal ageing process from inter-individual variability.

This thesis work is part of a larger research project, called Trajector-Age, and aims to characterise cross-sectional and longitudinal age-related changes in the behaviour of MUs, with particular interest in possible implications for force development and fatigue behaviour. Analysing the implications on force control and fatigue in the elderly helps to discriminate the role of central mechanisms, associated with MU behaviour, versus peripheral factors, and to interpret conflicting evidence on fatigue, sometimes traced back to neural remodelling processes.

Two age groups critical to the ageing process were analysed, represented respectively by 11 middle-aged (PRM;  $58 \pm 4$  years) and 11 elderly (PRO;  $78 \pm 5$  years) adults, who took part in three experimental sessions, six months apart (T0, T1 and T2). In addition, a control group of 10 young people (TOY;  $26 \pm 2$  years), in fatigue contractions, was considered. High-density electromyographic signals (HDEMG) were acquired from the vastus lateralis (VL) muscle using a 64-channel grid, during isometric ramp contractions up to 30% and 50% of maximal voluntary contraction (MVC) and during a sustained contraction at 50% MVC until exhaustion.

The acquired signals were processed with decomposition software to identify the activation instants of the individual MUs contributing to the overall signal. The analysis of MUs firing properties shows a limited increase in the firing rate (FR) of PRO in the ascending phase, which reaches a significantly lower average value in the plateau compared to PRM (9- 15%). From the relationship between the change in force and FR from recruitment to the holding phase, it emerges that, for the same force developed, the MUs of PRO show a limited increase in FR compared to PRM, a factor that influences a reduced ability in elderly subjects to modulate force.

During fatigue contractions, the temporal trend of FR was analysed by bilinear regression in order to identify a point of change in the trend (breakpoint). Analysis of the change in firing rate per second (slope) showed a significant increase in the FR of the PRM compared to the other two groups (0.02-0.03 pps/s) in the phase prior to the breakpoint, and a subsequent decrease in the PRO compared to the TOY (0.02 pps/s), suggesting the presence of favourable adaptations to fatigue resistance in the PRM, but not evident in the PRO.

In conclusion, this study found a significant reduction in FR dynamics in elderly subjects, highlighting implications in limiting the ability to modulate force generated, and better adaptation in fatiguing conditions by middle-aged but not older subjects.

# Indice

1	Introduzione .....	5
1.1	Invecchiamento.....	6
1.2	Processo di eccitazione-contrazione: dal SNC al muscolo.....	9
1.3	Elettromiografia.....	14
1.3.1	Elettromiografia ad alta densità.....	17
1.3.2	Decomposizione del segnale EMG in singole unità motorie.....	20
1.4	Caratteristiche del vasto laterale ed effetti dell'invecchiamento.....	25
1.5	Effetti dell'invecchiamento sulle unità motorie.....	27
1.6	Processi di denervazione e reinnervazione.....	32
1.7	Conseguenze funzionali sulla modulazione di forza e resistenza a fatica.....	34
1.7.1	Effetti dell'invecchiamento sulla modulazione della forza.....	37
1.8	Obiettivi dello studio.....	43
1.9	Trajector-Age .....	45
2	Materiali e metodi.....	46
2.1	Protocollo.....	46
2.1.1	Reclutamento dei soggetti.....	48
2.1.2	Descrizione del protocollo neuromuscolare.....	49
2.1.3	Procedure e Setup sperimentale.....	55
2.2	Analisi del segnale elettromiografico multicanale.....	61
2.3	Analisi del comportamento delle MU.....	70
2.3.1	Analisi delle caratteristiche delle MUs in contrazioni "a rampa".....	70
2.3.2	Analisi delle variazioni di firing rate rispetto alle variazioni di forza.....	74
2.3.3	Analisi della resistenza a fatica.....	75
2.4	Statistica.....	84
3	Risultati.....	87
3.1	Risultati dell'analisi sulle alterazioni nelle MUs nelle contrazioni "a rampa".....	88
3.2	Risultati dell'analisi sulle alterazioni nel controllo neurale sulla forza.....	103
3.3	Risultati dell'analisi sulle alterazioni nella resistenza a fatica.....	112
4	Conclusioni .....	125
	Bibliografia .....	128

# 1 Introduzione

L'invecchiamento è un processo fisiologico che interessa tutto l'organismo, ma assume una particolare rilevanza funzionale e clinica in riferimento al sistema neuromuscolare. L'allungamento della vita ha indotto nuove sfide nella comprensione di come questi processi influenzino le capacità funzionali dei soggetti anziani.

Il presente elaborato di tesi si pone come scopo quello di approfondire le alterazioni che si manifestano con l'invecchiamento a livello delle unità motorie e le loro ripercussioni nella generazione e modulazione della forza e nella resistenza alla fatica.

Il primo capitolo, a scopo introduttivo, ha l'obiettivo di delineare il quadro teorico di riferimento, approfondendo i principali aspetti neurofisiologici e funzionali dell'invecchiamento, al fine di contestualizzare in modo accurato la tematica oggetto dello studio.

L'attuale contesto demografico nazionale è descrivibile come "un caso esemplare in un'Europa che invecchia"[1], caratterizzato da una percentuale rilevante di soggetti anziani, le cui condizioni di vita dipendono dall'insorgenza di limitazioni motorie, fortemente connesse alla perdita di massa muscolare (sarcopenia). Questo aspetto verrà trattato nel primo paragrafo (1.1).

Verrà esaminato lo stato dell'arte in merito all'origine, propagazione e prelievo del segnale elettromiografico (par. 1.2 e 1.3). Sarà quindi descritto il sistema neuromuscolare, approfondendo in particolare le caratteristiche delle unità motorie ed in che modo queste vengono alterate dai meccanismi fisiologici che intervengono con l'invecchiamento (par. 1.5 e 1.6).

Con il processo di invecchiamento, infatti, le unità motorie subiscono cambiamenti che determinano alterazioni strutturali e funzionali del sistema neuromuscolare, con impatto rilevante sulla sua capacità di risposta alle richieste funzionali. Pertanto, verranno presentate, nel paragrafo 1.7, le evidenze riportate in letteratura in merito agli effetti delle modificazioni neuromuscolari dovute all'invecchiamento sullo sviluppo della forza muscolare e della resistenza alla fatica.

L'analisi delle caratteristiche delle unità motorie è resa possibile dall'utilizzo dell'elettromiografia di superficie ad alta densità elettrodica, grazie alla quale, impiegando algoritmi di decomposizione, è possibile ricostruire il contributo delle singole unità motorie al segnale EMG complessivo registrato dalla griglia di elettrodi (par. 1.3).

Inoltre nella sezione 1.4, verrà descritto il vasto laterale, muscolo oggetto di studio in quanto cardine nell'analisi dell'invecchiamento neuromuscolare, per la sua funzione nell'arto inferiore e per la sua accessibilità a valutazioni elettrofisiologiche e morfologiche.

Infine, verranno presentati gli obiettivi del presente lavoro di tesi (nel paragrafo 1.8), che si colloca nel più ampio progetto di ricerca denominato Trajector-Age, descritto nel paragrafo 1.9.

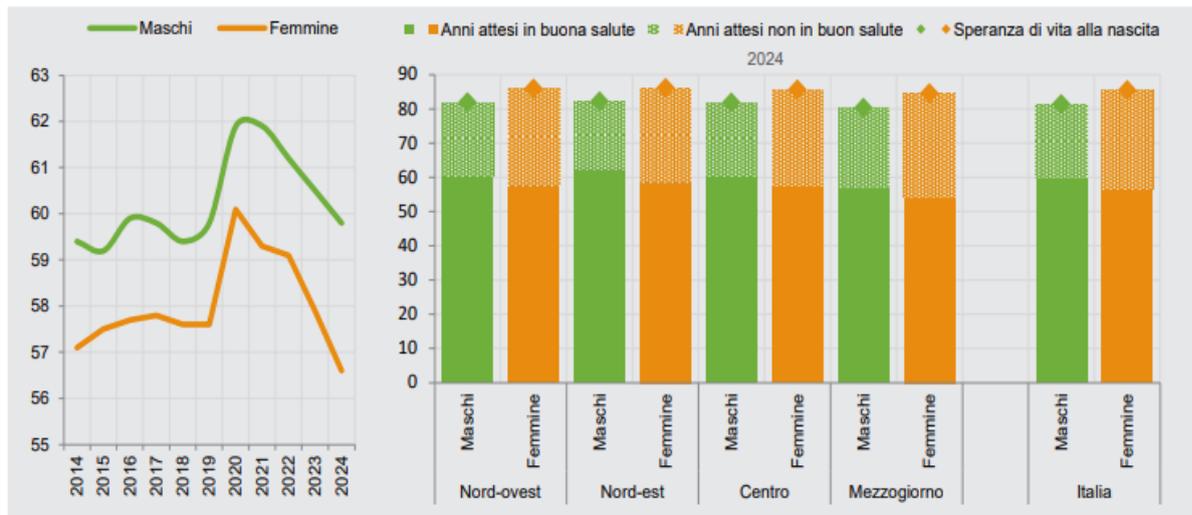
## 1.1 Invecchiamento

L'invecchiamento è un fenomeno complesso che interessa molteplici sistemi del corpo umano, determinando profonde conseguenze funzionali e cliniche.

Nell'attuale contesto demografico, in cui la popolazione è soggetta a un progressivo invecchiamento, a seguito dell'aumento costante dell'aspettativa di vita alla nascita e del trend negativo della natalità registrati negli ultimi decenni, diventa essenziale approfondire lo studio della condizione degli anziani, che costituiscono una quota sempre più rilevante della società. Questo fenomeno avrà un impatto rilevante nel sociale, nella sanità e nelle politiche di prevenzione, chiamate a rispondere ai bisogni di un numero crescente di individui in età avanzata. Tali considerazioni evidenziano l'importanza di condurre studi approfonditi e longitudinali sull'invecchiamento, come nel caso del progetto Trajector-AGE, che si propone di valutare lo stato di salute e autonomia della popolazione anziana anche in assenza di patologie manifeste, analizzando aspetti multifattoriali che contribuiscono al processo di invecchiamento. In questa stessa direzione si colloca anche il presente progetto di tesi, seppur con un focus più circoscritto all'ambito neuromuscolare.

Nel rapporto annuale ISTAT 2025 viene, infatti, definito il nostro Paese come “un caso esemplare in un'Europa che invecchia”, con un'età mediana che raggiunge 48,7 anni (superiore a quella dell' UE27 pari a 44,7) e una percentuale di popolazione di età pari o superiore a 65 anni del 21,6 % (+2,9 punti percentuali rispetto a 10 anni prima).[1]

L'invecchiamento comporta un generale calo delle condizioni fisiche, muscolari e funzionali dell'individuo, ravvisabili nel declino progressivo della mobilità, della velocità di movimento e dell'autonomia nelle attività quotidiane. Il complessivo peggioramento delle facoltà individuali impatta fortemente sulla qualità della vita e sul rischio di disabilità per i soggetti anziani. Come mostrano i dati del rapporto ISTAT 2025 riportati in Figura 1.1, a fronte di un'aspettativa di vita alla nascita nel 2024 superiore agli 80 anni per maschi e femmine indipendentemente dalla ripartizione geografica, la speranza di vita in buona salute è ridotta al di sotto del sesto decennio, con valori simili a quelli assunti un decennio prima. Inoltre si sottolinea che tra il 2024 e il 2025 il 28,4 % degli italiani con più di 65 anni presenta gravi limitazioni motorie, sensoriali o cognitive, quasi il 7 % degli over 65 riferisce gravi difficoltà in più di 3 attività quotidiane (come la cura della persona, sedersi o sdraiarsi, vestirsi) e la percentuale sale al 12 % tra gli over 75 [2].



Fonte: Istat, Tavole di mortalità della popolazione residente e Indagine multiscopo sugli aspetti della vita quotidiana (a) Il dato relativo al 2024 è una stima provvisoria.

Sul piano motorio, tra gli effetti più evidenti dell'invecchiamento vi sono una riduzione della forza e della potenza muscolare, strettamente legata alla perdita di massa muscolare (sarcopenia); tali fattori, il cui declino inizia generalmente tra i 40 e i 50 anni, concorrono all' aumento della disabilità [3], [4] e all' incremento del rischio di mortalità nella popolazione anziana [5],[ 6].

La diminuzione della massa muscolare e della sezione trasversale del muscolo (cross sectional area,CSA) risulta in un calo di forza. Studi longitudinali in anziani hanno indicato un 12,5-33% di decremento del CSA del quadricipite. Tale riduzione è quasi proporzionale alla diminuzione della forza massima volontaria di questi individui [7], [8]. Il dato appena citato suggerisce che gran parte della variabilità della forza riscontrata nell'invecchiamento sia attribuita alla diminuzione del CSA. Nonostante la quantità di perdita muscolare possa variare a seconda del livello di attività o dalla predisposizione genetica, è ben stabilito che l'invecchiamento compromette la massa muscolare [9]. Il decremento di massa muscolare si ritrova soprattutto negli estensori dell'arto inferiore, come il vasto laterale, i quali sono importanti per molte attività quotidiane, quali ad esempio camminare o sedersi su una sedia. Ecografie e tomografie computerizzate hanno indicato una riduzione dello spessore del muscolo anche del 39% [8], [10]. La riduzione dello spessore compromette non solo la capacità di generare forza, ma altera le proprietà elastiche del tessuto muscolare, portando ad una maggiore rigidità e a maggior rischio di infortuni, in particolare nelle attività dinamiche. Infatti, circa le proprietà viscoelastiche del muscolo, la perdita di elasticità associata all'invecchiamento riduce la capacità di trasmettere la forza e di mantenere stabilità e adeguate reazioni di aggiustamento posturale in situazioni dinamiche [9].

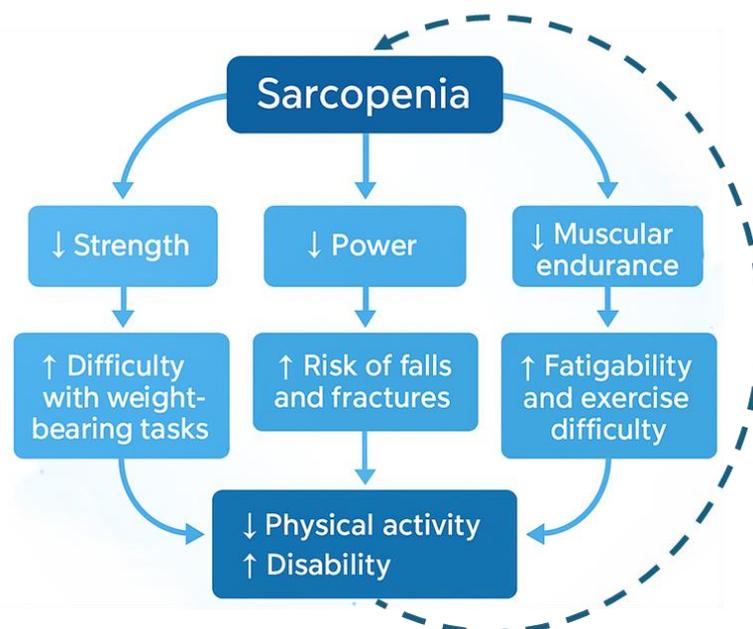
Le modificazioni strutturali del muscolo nell'invecchiamento, associate alla condizione di sarcopenia, implicano la degenerazione selettiva delle fibre di tipo II a contrazione rapida, contribuendo al calo

della velocità di contrazione muscolare negli anziani, riducendo la performance in attività ad alta velocità [11]. L'interazione complessa tra CSA, composizione fibrosa e cambiamenti nelle proprietà elastiche del muscolo porta a modificare le caratteristiche muscolari in modo multifattoriale [11], [12].

Uno degli elementi centrali nelle definizioni più attuali di sarcopenia è la "Clinically Meaningful Weakness" (debolezza muscolare clinicamente significativa), riconosciuta da tempo come un fattore cruciale nella comparsa di disabilità fisiche e nel peggioramento della salute negli anziani [13]. Le cause della debolezza muscolare legata all'invecchiamento sono molteplici e includono, oltre alle alterazioni a carico dell'apparato muscolo-scheletrico, anche modificazioni a livello del sistema nervoso, in quanto la progressiva degenerazione dal punto di vista funzionale e muscolare è chiaramente associata ad alterazioni del sistema neuromuscolare.

L'invecchiamento si manifesta sul sistema neuromuscolare a più livelli (dal centrale al periferico): alterazioni del controllo da parte del sistema nervoso centrale (SNC), riduzione dell'eccitabilità dei motoneuroni e conseguentemente della velocità di conduzione assonale [14], instabilità delle giunzioni neuromuscolari e, soprattutto, alterazioni morfologiche e funzionali a carico delle unità motorie.

Gli effetti dell'invecchiamento a livello neuromuscolare costituiscono il fulcro di questa tesi e verranno analizzati dettagliatamente nei capitoli seguenti, insieme ai processi di neurorimodellazione, alla base di molte di queste alterazioni osservabili con l'avanzare dell'età.



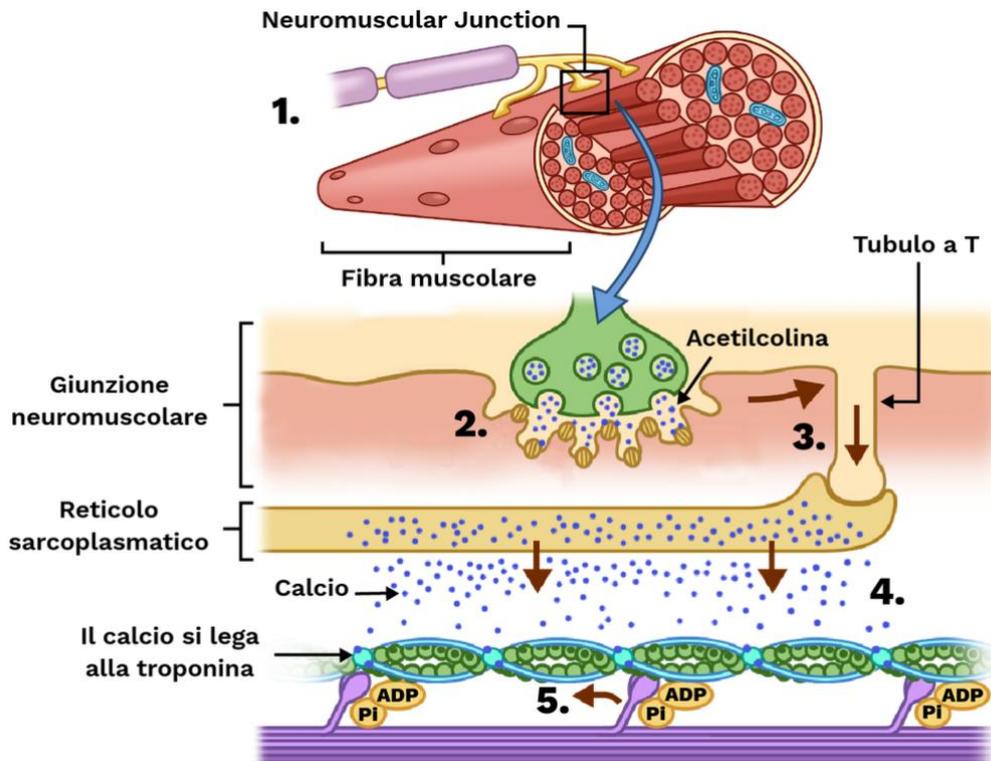
*Figura 1.2: Un modello delle conseguenze funzionali della sarcopenia legata all'età e del ciclo di feedback positivo in base al quale la ridotta attività fisica determina la progressione del disturbo, con le conseguenze funzionali associate ad esso. Adattato da Hunter 2004 [115]*

## 1.2 Processo di eccitazione-contrazione: dal SNC al muscolo

Il movimento volontario prende origine nella corteccia motoria primaria del cervello, situata nel giro precentrale del lobo frontale. In questa regione, i neuroni piramidali generano potenziali d'azione che viaggiano lungo il tratto corticospinale e si dirigono verso il midollo spinale, dove si collegano ai motoneuroni  $\alpha$  del corno anteriore, che rappresentano il collegamento diretto tra il sistema nervoso centrale (SNC) e la muscolatura scheletrica.

Il tessuto muscolare striato o scheletrico, preposto al movimento volontario, insieme al tessuto muscolare liscio o involontario, situato nei visceri e nei vasi sanguigni, ed al tessuto muscolare cardiaco, costituisce l'apparato muscolare che svolge quattro funzioni: sostegno posturale, protezione degli organi interni, produzione di calore e generazione del movimento. Il complesso muscolare, lo scheletro e le articolazioni costituiscono l'apparato locomotore, responsabile del movimento e del sostegno corporeo.

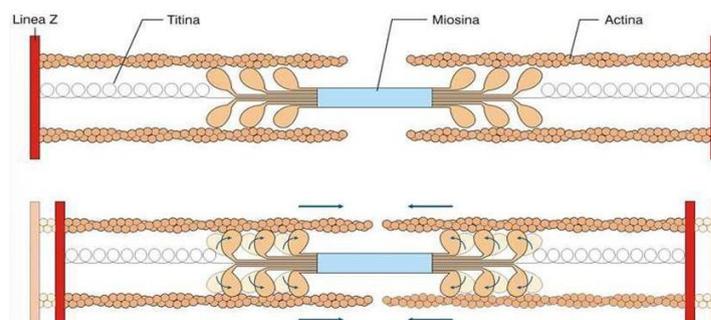
Il potenziale d'azione, generato a livello dell'encefalo e disceso lungo il midollo spinale fino ai motoneuroni, si propaga attraverso l'assone mielinizzato di questi ultimi a una velocità di conduzione di circa 60–70 m/s fino a raggiungere la giunzione neuromuscolare. A livello della sinapsi si ha il vero contatto tra il sistema nervoso e le fibre muscolari: l'arrivo del potenziale d'azione determina il rilascio di un neurotrasmettitore, l'acetilcolina, che attraversa la fessura sinaptica e si lega ai recettori nicotinici del sarcolemma, provocando la depolarizzazione della membrana della fibra muscolare (Figura 1.3). Questo evento dà origine a un nuovo potenziale d'azione che si propaga lungo la membrana cellulare e penetra in profondità attraverso i tubuli T, attivando i canali del calcio voltaggio-dipendenti e provocando il rilascio di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  dal reticolo sarcoplasmatico [15], [16], [17].



**Figura 1.3:** Sequenza dei principali eventi del processo di eccitazione-contrazione muscolare:

1. Il potenziale d'azione viaggia lungo il motoneurone fino alla giunzione neuromuscolare.
2. L'arrivo dell'impulso nervoso stimola il rilascio di acetilcolina nella fessura sinaptica.
3. L'acetilcolina si lega ai recettori sul sarcolemma, avviando la depolarizzazione della membrana
4. Il segnale si propaga nei tubuli T, inducendo il rilascio di ioni calcio nel reticolo sarcoplasmatico
5. Il calcio si lega alla troponina, permettendo l'interazione actina-miosina e la contrazione muscolare

A questo punto ha inizio il processo contrattile: il calcio rilasciato si lega alla troponina, provocando lo spostamento della tropomiosina dai siti di legame dell'actina, rendendoli disponibili per la miosina. L'ATPasi presente sulla testa della miosina idrolizza l'ATP, generando l'energia necessaria per l'inclinazione della testa e lo scorrimento dei filamenti sottili di actina su quelli spessi di miosina, secondo il meccanismo del ponte trasverso [18], [19] (Figura 1.4). Questo ciclo si ripete finché vi è disponibilità di calcio e ATP.



**Figura 1.4:** Legame tra actina e miosina: ponte trasverso.

A livello strutturale, il muscolo scheletrico è composto da fasci di fibre muscolari, ciascuno avvolto da un tessuto connettivo detto perimisio, mentre l'intero muscolo è rivestito da un involucro esterno chiamato epimisio (Figura 1.4). Ogni fibra muscolare è circondata dal sarcolemma e contiene numerose miofibrille organizzate in sarcomeri, che rappresentano le unità contrattili fondamentali delimitate da linee Z. All'interno del sarcomero si distinguono la banda I (actina), la banda A (miosina) e la linea M, che stabilizza i filamenti durante la contrazione. Durante l'accorciamento muscolare, le linee Z si avvicinano, la banda I si restringe e la banda A resta inalterata.

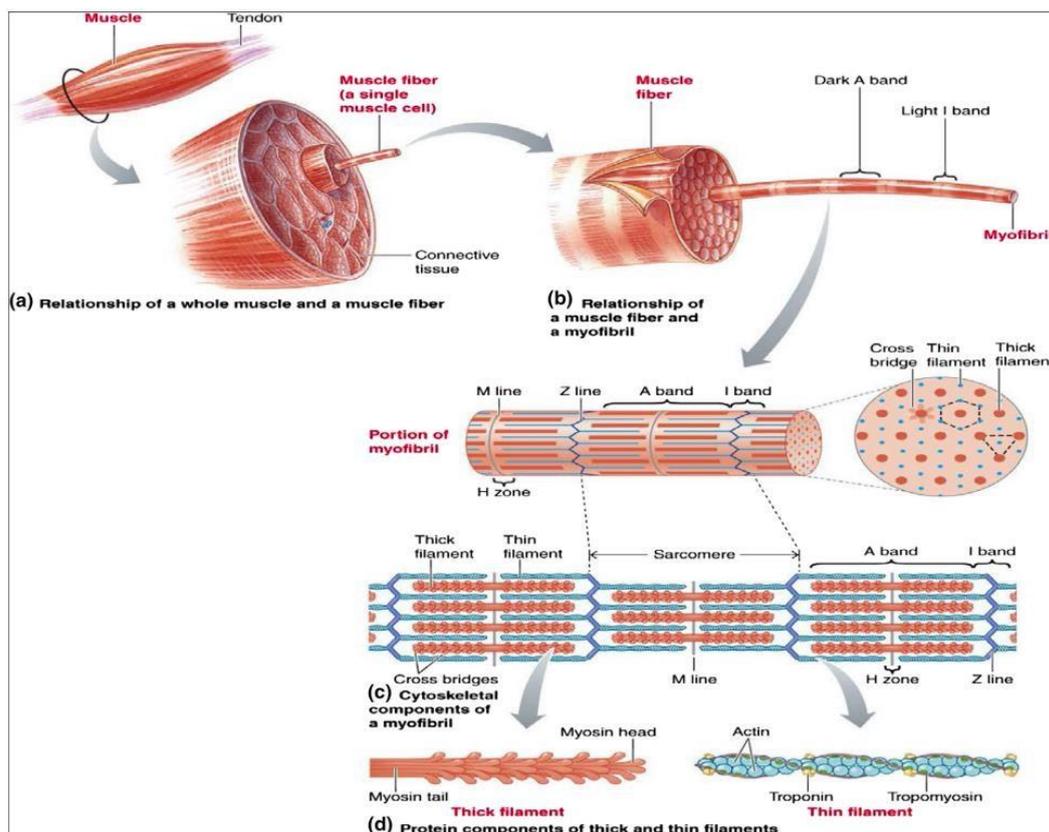


Figura 1.4: Struttura del muscolo scheletrico [7], originale in [118].

Il tipo e la velocità della contrazione dipendono da caratteristiche biochimiche e strutturali delle fibre muscolari. Le fibre lente di tipo I sono ricche di mitocondri, utilizzano il metabolismo aerobico e sono resistenti alla fatica; quelle di tipo IIa (veloci-ossidative) uniscono buona resistenza e capacità contrattile; le fibre IIb (veloci-glicolitiche) sviluppano forza elevata in tempi rapidi, ma si affaticano facilmente [16].

Il motoneurone non innerva una singola fibra, ma controlla simultaneamente un insieme di fibre muscolari che costituiscono l'unità motoria (motor unit, MU), considerata l'unità funzionale fondamentale del muscolo scheletrico [20]. Ogni MU è composta dal corpo cellulare del motoneurone, il suo assone, la giunzione neuromuscolare e le fibre da esso innervate (Figura 1.5). Il potenziale d'azione generato nel corpo neuronale si propaga lungo l'assone e raggiunge la fibra muscolare, dove viene tradotto in un potenziale d'azione di unità motoria (MUAP), che rappresenta la somma dei potenziali generati da ciascuna fibra attivata [21]. All'interno della fibra, il potenziale si propaga in entrambe le direzioni a circa 2,5–5 m/s e si esaurisce alle estremità tendinee [20], [21].

Durante l'attivazione volontaria del muscolo, il sistema nervoso centrale recluta in maniera asincrona tutte le unità motorie, attivandole progressivamente, in base alla forza richiesta. Ciascuna MU riceve sequenze di impulsi a frequenza variabile, definite treni di potenziali d'attivazione (firing patterns). La somma delle attività elettriche di tutte le MU attive forma il segnale elettromiografico interferente (EMG), la cui analisi fornisce indicazioni fondamentali sullo stato funzionale del muscolo e sulle modalità di controllo motorio adottate dal SNC [22].

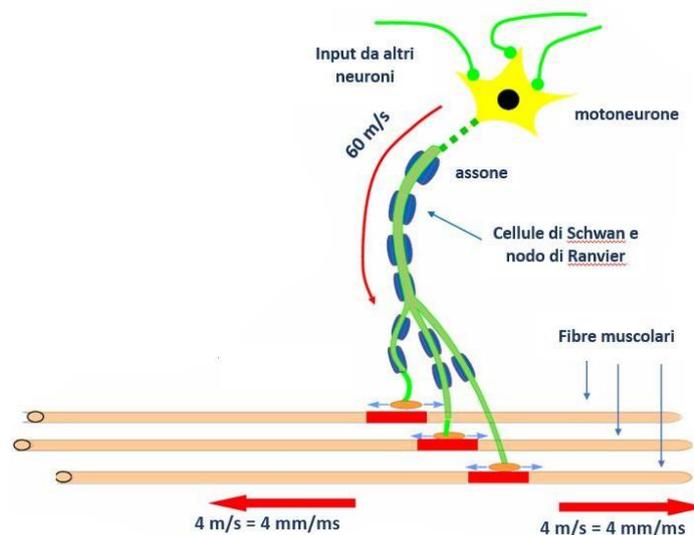


Figura 1.5: Schema dell'unità motoria e della generazione del potenziale d'azione di singola fibra.

La Figura 1.6 rappresenta un modello completo del processo fisiologico e strumentale che porta alla generazione e registrazione del segnale elettromiografico (EMG) di superficie durante una contrazione muscolare volontaria.

Nella parte superiore è illustrato il modello fisiologico: l'impulso nervoso, che parte dal midollo spinale sotto forma di treni di impulsi (modello Dirac delta), viaggia lungo gli assoni dei motoneuroni e attivano le rispettive unità motorie, ciascuna caratterizzata dalla propria risposta temporale specifica (modellata come una funzione di trasferimento  $h(t)$ ). Ogni MU ha infatti una risposta temporale diversa, descritta in questo modello come un sistema lineare tempo invariante (LTI) definito dalla propria risposta all'impulso  $h(t)$ , che tiene conto della forma e propagazione del segnale elettrico attraverso la MU.

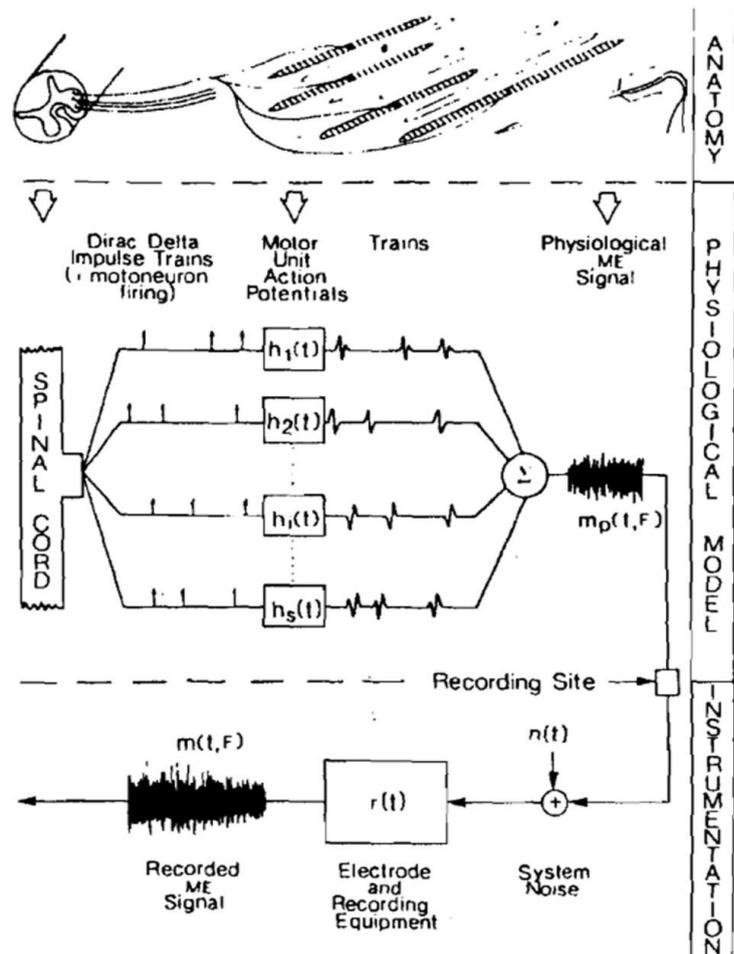


Figura 1.6: Rappresentazione schematica del modello di generazione e prelievo del segnale sEMG in contrazione volontaria. De Luca 1979 [23]

Si generano così i potenziali d'azione delle unità motorie (MUAPs). I segnali elettrici prodotti dalle singole MU si sommano linearmente, dando origine al segnale fisiologico EMG globale, che è quindi un segnale interferente e dipende dal tempo e dal livello di forza generata dal muscolo ( $m_p(t, F)$ ). Nella parte inferiore della figura viene mostrato il modello strumentale: il segnale fisiologico giunge al sito di registrazione, dove attraversa il sistema di acquisizione – rappresentato da un filtro  $r(t)$  che include elettrodi, amplificatori e dispositivi elettronici – e viene quindi influenzato da un rumore di sistema  $n(t)$ , che può includere interferenze esterne e artefatti strumentali. Il segnale EMG effettivamente registrato ( $m(t, F)$ ) è quindi il risultato della convoluzione tra il segnale fisiologico e la risposta strumentale, con l'aggiunta del rumore:

$$m(t, F) = [m_p(t, F) * r(t)] + n(t).$$

## 1.3 Elettromiografia

Esistono due tecniche principali di acquisizione di segnali EMG: invasiva e di superficie. La prima di queste sfrutta elettrodi ad ago inseriti nel muscolo stesso che permettono la registrazione di un segnale molto vicino alla sorgente, con un volume di prelievo molto piccolo che però non permette di avere una visione globale dell'attività muscolare. La seconda tecnica di acquisizione invece sfrutta il posizionamento di elettrodi sulla cute sopra il muscolo superficiale di interesse e questo permette di avere una visione più generale della attivazione muscolare. Tuttavia, poiché in questa seconda modalità la distanza tra la sorgente e l'elettrodo aumenta molto, il segnale registrato è molto interferente, contiene il contributo di decine di unità motorie ed è filtrato dallo strato sottocutaneo che funge da filtro passa-basso e diminuisce l'ampiezza del segnale e la larghezza della banda in frequenza, aumentandone il supporto temporale [22]. In generale questa metodologia di acquisizione è usata per stimare l'attivazione muscolare, per valutare l'insorgere di segnali di fatica muscolare e per permettere il controllo di dispositivi esterni. La Tabella 1.1 mostra i range di ampiezza e banda del segnale mioelettrico per le due tecniche di acquisizione appena descritte.

	Elettromiografia invasiva	Elettromiografia di superficie
Ampiezza (mV)	0,1 - 5	0,01-0,5
Contenuto in frequenza (Hz)	0.01-10000	10-400

Tabella 1.1: Range di ampiezza e di banda in frequenza del segnale mioelettrico acquisito con prelievo invasivo con elettrodi ad ago o con prelievo superficiale [24]

Ci sono anche altri fattori che influiscono in questa metodologia di acquisizione che possono essere fisici, anatomici o relativi al sistema di prelievo [22]. Per esempio, l'effetto dell'inclinazione delle fibre muscolari rispetto al sistema di rilevamento può portare a differenze di difficile interpretazione dell'onda bifasica, rispetto alla forma tradizionale ottenuta dal segnale EMG singolo differenziale per i muscoli fusiformi e non pennati. Inoltre, la posizione del sistema di prelievo influisce moltissimo, soprattutto se posto a cavallo della zona di innervazione o nella zona del tendine. Infine, altri fattori di influenza sono: la qualità del contatto cute elettrodo, la distanza interelettrodica che genera un filtro spaziale e la dimensione dell'elettrodo che, fungendo da superficie equipotenziale, ha l'effetto di attenuazione di ampiezza e di diminuzione del contenuto in frequenza a diametri maggiori [22].

Per attenuare il più possibile questi fattori di influenza sull'acquisizione del segnale EMG di

superficie si attuano alcune strategie migliorative prima della acquisizione. La prima fra tutte è la preparazione della cute che deve essere esfoliata con una pasta abrasiva e pulita con un panno umido per ridurre lo spessore e ridurre l'impedenza elettrodo-cute e di conseguenza il rumore associato e l'ampiezza di artefatti da movimento [24]. Inoltre, per migliorare il contatto con l'elettrodo si aggiunge il gel conduttivo con lo scopo di creare un'interfaccia stabile e senza spazi d'aria tra le due superfici [24]. Tipicamente sono utilizzati gli elettrodi in argento o in argento clorurato la cui impedenza è prevalentemente resistiva e non viene influenzata dalla frequenza del segnale. Il diametro degli elettrodi è minore di 3-5 mm per limitare il filtraggio passa basso dovuto all'effetto di media del potenziale sotto la superficie dell'elettrodo [24], [25]. Infatti, per elettrodi con aree maggiori si ha una resistenza d'elettrodo minore, ma si ha anche un effetto di attenuazione maggiore con rimozione di componenti del segnale ad alte frequenze.

Il numero di elettrodi usati può variare in base all'informazione che si vuole ottenere tramite elettromiografia di superficie. Il numero minimo di elettrodi è due, per sfruttare una configurazione monopolare in cui il segnale corrisponde al potenziale elettrico rilevato sulla superficie della pelle, sopra al tessuto muscolare, riferito al potenziale misurato con il secondo elettrodo posto sulla cute sopra una zona ossea (Figura 1.7). Tuttavia, questa configurazione non elimina il contributo al segnale che potrebbe essere dato da fonti esterne come la rete elettrica e un muscolo diverso da quello in esame (crosstalk). Infatti, per facilitare l'interpretazione delle acquisizioni, spesso si predilige il montaggio bipolare o singolo differenziale che è ottenuto mediante la differenza tra due segnali monopolari. Questi ultimi hanno una ampiezza simile dovuta al modo comune, cioè ad altre fonti come l'effetto di fine fibra, l'interferenza di rete, il crosstalk, l'attività di MU profonde o qualsiasi altra fonte di interferenza che si ripercuote allo stesso modo sui due segnali monopolari.

Questa ampiezza comune viene attenuata grazie al differenziale e anche grazie al rapporto di reiezione del modo comune (CMRR) dell'amplificatore differenziale. Però, è importante notare che in questa modalità il volume di prelievo diminuisce notevolmente (Figura 1.8) e che la distanza interelettrodica comporta un filtro spaziale da tenere in considerazione [22]. In letteratura è suggerito di posizionare questi elettrodi tra la zona di innervazione e la regione tendinea per evitare entrambi queste zone che potrebbero portare a conclusioni sbagliate sull'attività muscolare, soprattutto con la modalità di acquisizione singolo differenziale. Queste raccomandazioni derivano dallo studio dei segnali EMG ad alta densità di muscoli fusiformi con fibre complanari rispetto alla pelle. Infatti, il passo successivo nello studio dell'attività muscolare è quello di aumentare la quantità di elettrodi e passare da due ad una griglia più o meno ampia che permette di ottenere segnale elettromiografico ad alta densità (HD-EMGs).

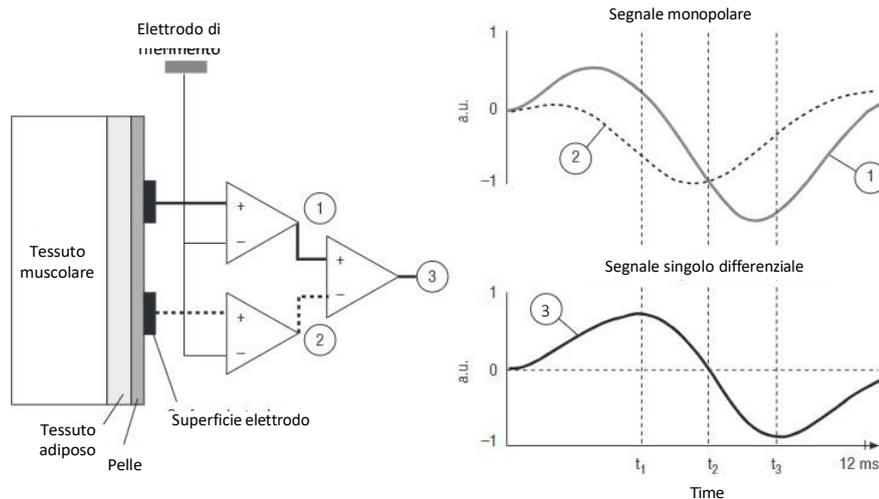


Figura 1.7: Rappresentazione delle due tipologie tradizionali del montaggio degli elettrodi. I segnali EMG monopolari sono potenziali di singola fibra simulati e mostrati in alto a destra (1,2), mentre il segnale EMG bipolare (3) è mostrato in basso a destra ed equivale alla differenza tra i due monopolari [21].

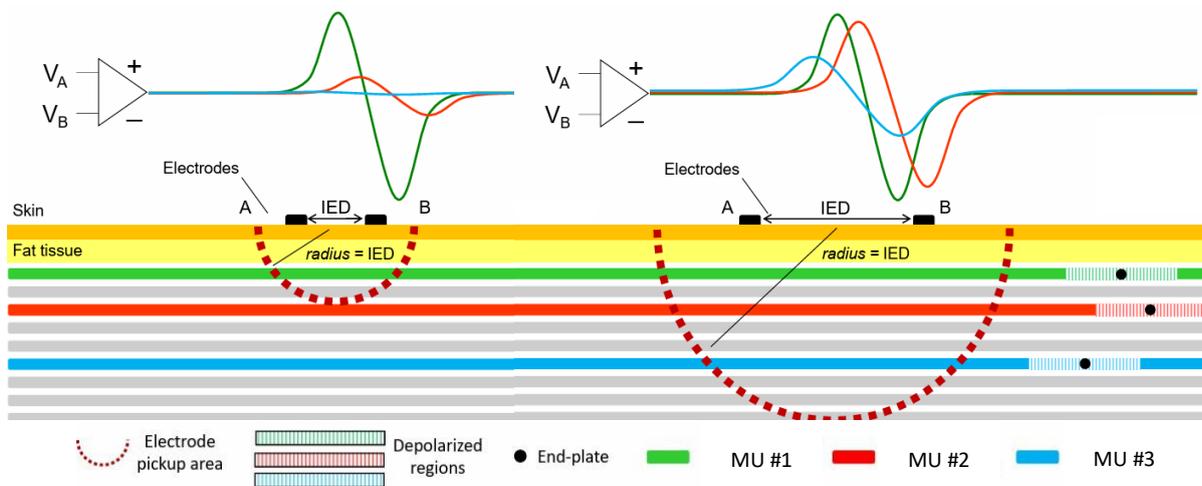


Figura 1.8: Effetto della distanza elettroica sul volume di prelievo visualizzato come la zona dentro il tratteggio rosso. Nel caso a sinistra la MU 3 blu non è rilevata mentre nel caso a destra sì [119].

### **1.3.1 Elettromiografia ad alta densità**

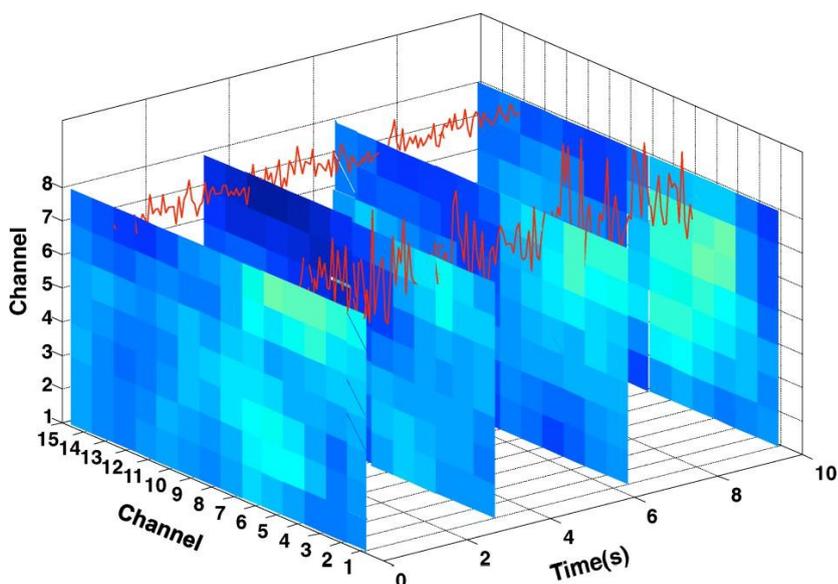
L'innovazione tecnologica con la metodica elettromiografica di superficie ad alta densità (HDEMG), che ha rivoluzionato la conoscenza della fisiologia neuromuscolare attraverso una descrizione dettagliata, ma comunque in situ, dei profili spaziali di conduzione dei potenziali d'azione delle unità motorie, del loro livello di complessità e della stabilità spaziale delle fonti delle principali componenti spettrali, fornisce un'inestimabile risorsa sia diagnostica che terapeutica per monitorare lo stato e le performance neuromuscolari e la loro modificazione nel tempo [26], [27]. Inoltre, con l'utilizzo delle metodiche HDEMG non si è in grado soltanto di monitorare e quantificare i potenziali d'azione, ma anche di stimare in maniera precisa la variazione degli stessi, consentendo così di effettuare confronti su una data variabile in istanti temporali differenti. Questo dato riveste un'importante significatività, in quanto permette di sviluppare dei sistemi di predizione e di valutazione a lungo termine sempre più precisi, che siano utilizzabili sia per scopi diagnostici e prognostici, sia per programmare interventi terapeutici di maggior successo.

L'elettromiografia ad alta densità è una tecnica avanzata utilizzata per studiare l'attività elettrica dei muscoli superficiali con elevata risoluzione spaziale. Si passa da un numero di due o tre elettrodi a griglie di decine o centinaia di elettrodi che permettono uno studio più dettagliato dell'attività muscolare, ottenendo mappe di potenziali nel tempo che sono immagini istantanee dell'evoluzione della distribuzione del potenziale sulla cute [28]. Nello specifico, gli elettrodi disposti in modo ravvicinato consentono la creazione di mappe bidimensionali (se viene utilizzato un array lineare) o tridimensionali (se viene utilizzata una griglia di elettrodi bidimensionale) dell'attività elettrica del muscolo, che non si comporta come un'unità singola durante la contrazione. Dalla interpretazione di queste mappe si possono ottenere numerose informazioni, tenendo sempre in considerazione il forte impatto della architettura del muscolo target e l'organizzazione delle fibre che lo compongono.

La maggior parte delle caratteristiche del segnale EMG, in ampiezza o in frequenza, riflettono un meccanismo fisiologico. Queste caratteristiche solitamente vengono calcolate per un singolo canale EMG (monopolare o singolo differenziale) e associate all'intero muscolo per una determinata epoca di segnale. Tuttavia, è vero che i valori cambiano se cambia la posizione dell'elettrodo sul muscolo stesso. Per questo motivo un'acquisizione con una schiera o una griglia di elettrodi risulta essere più informativa sul comportamento di queste variabili che sono ottenute per ogni elettrodo (monopolare) o per ogni coppia vicina di elettrodi (singolo differenziale), ottenendo una serie di mappe come in Figura 1.21. La sintesi dell'informazione

dell'immagine ottenuta con HD-EMGs è ottenuta mediando le variabili su una zona di interesse o su tutta l'immagine, o tramite operazioni di analisi di immagini: sogliatura, segmentazione, rotazione, calcolo del baricentro.

Oltre alla valutazione spaziale delle variabili fisiologiche correlate all'ampiezza e al contenuto frequenziale del segnale EMG, la modalità di acquisizione ad alta densità è sfruttata per risalire alle caratteristiche individuali delle MU e al loro driver di attivazione neurale. Questo è possibile tramite il processo di decomposizione del segnale interferente che consente di seguire il percorso inverso rispetto a quello di Figura 1.9 di sommatoria dei MUAP e generazione del segnale EMG.



*Figura 1.9: Quattro mappe (su 40) colore della variabile ARV (valor rettificato medio) calcolata su epoche di 0,25s, in una contrazione volontaria di 10 s del gastrocnemio mediale. Le mappe sono ottenute dall'analisi dei segnali monopolari e i due segnali in rosso sono due segnali EMG monopolari del tempo, corrispondenti a due pixel e quindi a due canali della griglia.*

L'applicazione dell'elettromiografia di superficie ad alta densità, insieme allo sviluppo di software di elaborazione per la decomposizione automatica dei segnali, rappresenta ad oggi un modo non invasivo ed affidabile per la quantificazione del numero di unità motorie. Gli studi che utilizzano questa tecnologia e che verificano, attraverso algoritmi computerizzati, l'accuratezza di questa tecnologia e la sua stabilità di sessione in sessione ne confermano l'affidabilità. In una sessione sperimentale, gli algoritmi sono in grado di identificare con elevata precisione e ripetibilità il tempo esatto di reclutamento e dereclutamento delle unità motorie, di estrapolare i tempi di scarica e di identificare i pattern comuni di unità motorie sia in compiti motori eseguiti alla stessa intensità, ma in sessioni diverse, sia quando i compiti vengono eseguiti a diversa intensità.

I tassi di riproducibilità del numero delle unità motorie risultano altamente ripetibili non solo tra i giorni di studio, ma anche tra gli operatori. In tal senso, durante una singola sessione, un algoritmo è stato in grado di scomporre il 91,15% dei segnali EMG con un'elevata affidabilità e ripetibilità di sessione in sessione e tra operatori [29]. Le analisi delle sorgenti comuni hanno presentato un elevato tasso di concordanza, fino al 92,8% dei tempi di scarica tra i due operatori e di 17,6 su 19 sorgenti comuni validati tramite analisi manuale [30].

L'utilizzo di questa tecnica garantisce un elevato grado di ripetibilità sia nel monitoraggio dell'attivazione del pattern delle unità motorie nel corso di una sessione sperimentale, che nello studio delle modifiche strutturali che si osservano durante follow-up longitudinali. Inoltre, garantisce una valutazione ripetibile dei differenti parametri elettrofisiologici che caratterizzano l'attivazione del pattern delle unità motorie e la loro influenza sulla modulazione della forza.

Questi aspetti rivestono notevole importanza quando si vuole indagare l'attivazione del sistema neuromuscolare nelle diverse età e nei suoi disturbi e/o in tutte quelle condizioni in cui l'azione motoria avviene con attivazione di diverse fibre muscolari. Inoltre, consentono di stabilire con maggiore certezza quali fattori limitano la produzione di forza ed implementare adeguati interventi compensatori.

In conclusione, l'avanzamento degli studi neurofisiologici con l'introduzione dell'HDEMG ha portato all'identificazione di segnali e pattern di attivazione più complessi nel processo d'invecchiamento che si traducono nella perdita progressiva della riserva funzionale neuromuscolare e nell'aumento della faticabilità muscolare. La riserva funzionale neuromuscolare indica il grado con cui il sistema nervoso è in grado di garantire una quantità sufficiente di elementi attivi nel muscolo in grado di generare una precisa e fluida quantità di forza muscolare e di resistere alla fatica. Nel corso dell'invecchiamento, l'affievolimento graduale delle capacità di compenso porta alla riduzione della riserva funzionale del sistema neuromuscolare, che si evidenzia nella ridotta capacità di attivare e sostenere una determinata quantità di fibre attive in un determinato muscolo ed impedisce di mantenere costante l'output del motoneurone con il conseguente fallimento nel sostenere ed equilibrare le azioni fisiche.

### 1.3.2 Decomposizione del segnale EMG in singole unità motorie

La decomposizione del segnale elettromiografico, come accennato nel paragrafo precedente, consiste nella capacità di scomporre il segnale interferente registrato sulla cute tramite elettrodi di superficie nei singoli contributi dati dalla depolarizzazione delle unità motorie che lo compongono. Infatti esiste una corrispondenza tra il potenziale d'azione del motoneurone  $\alpha$  e il potenziale d'azione di unità motoria che propaga nelle fibre muscolari innervate da tale neurone. Pertanto, risalire al contributo di ogni MUAP al segnale interferente equivale ad accedere al comando neurale ricevuto dal muscolo, alle strategie di controllo motorio e alle proprietà morfologiche e funzionali delle MU (Figura 1.10). In ogni caso è lecito pensare che una matrice con molti elettrodi vicini permetta di ottenere segnali con una differenza parziale gli uni dagli altri, perché registrano il contributo comune di molte sorgenti. Infatti, il segnale HD-EMG presenta delle informazioni ridondanti ma proprio questa caratteristica permette la discriminazione tra singole MU. Per esempio, in uno studio basato sulla simulazione di unità motorie si è visto che con un singolo canale monopolare era possibile distinguere solo il 3,4% delle sorgenti simulate, mentre con un array di 9x9 canali monopolari era possibile far salire questa percentuale al 47% [31].

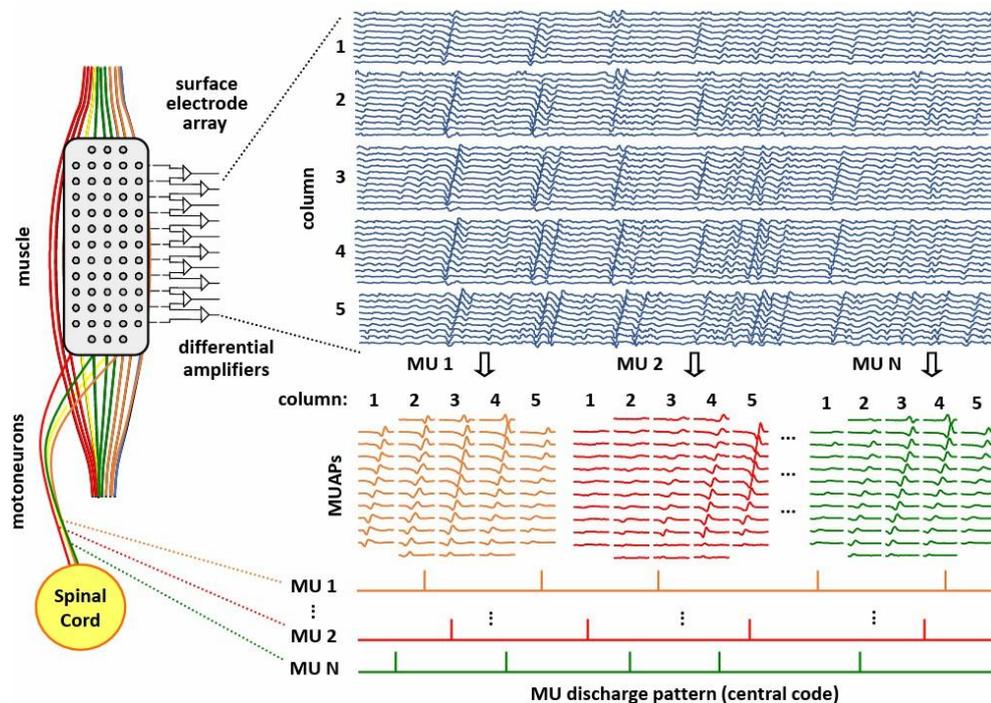


Figura 1.10: Schema del processo di decomposizione partendo da segnale EMG interferente ad alta densità fino ad ottenere il treno di impulsi delle tre MU identificate [120].

## sEMG : convolutive mixture model

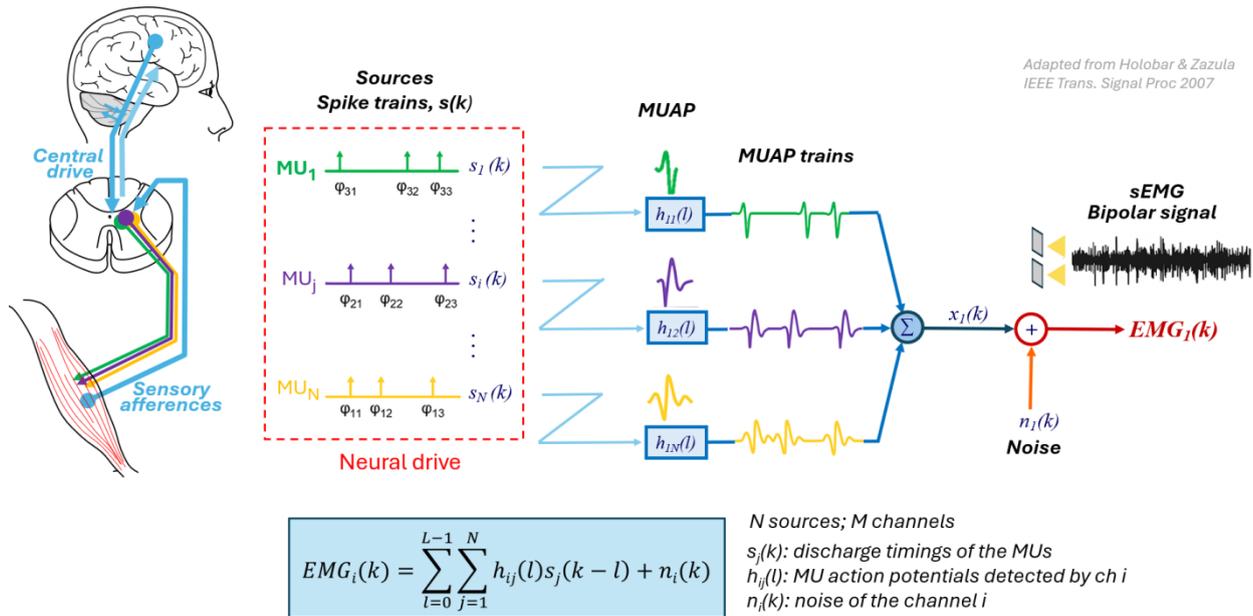


Figura 1.11: Processo di generazione, propagazione e prelievo del segnale elettromiografico di superficie

Per comprendere come sia possibile mediante la decomposizione risalire al comando neurale, ossia i treni di spike a partire dal segnale HD-sEMG è necessario analizzare come evolve il meccanismo di generazione, conduzione e prelievo del segnale passando da una coppia di elettrodi, quindi nella configurazione classica dell'elettromiografia di superficie, ad una griglia.

Il segnale EMG di superficie è un segnale di natura interferenziale, dato dalla somma dei contributi convolutivi delle diverse MU presenti nel volume di prelievo, come viene descritto matematicamente in Figura 1.11.

La contrazione volontaria ha origine dal SNC (nella corteccia motoria primaria), il segnale si propaga poi a livello spinale, dove il comando centrale viene integrato con gli input afferenti. Questa integrazione porta alla generazione di un treno di spike per ciascuna unità motoria attiva, che costituisce il COMANDO NEURALE.

A livello muscolare, questo treno di spike viene convoluto con il potenziale d'azione dell'unità motoria (MUAP), generando il treno di MUAP e la somma di tutti i treni di MUAP (con un contributo di rumore additivo) costituisce il segnale elettromiografico di superficie (sEMG).

Per un unico canale si ottiene, quindi, la somma convolutiva di un certo numero di treni di spike in input; aggiungendo un secondo canale, esso registrerà un' altra somma degli stessi contributi, provenienti dalle medesime sorgenti, e così via aumentando il numero dei canali fino anche a centinaia, come mostrato in Figura 1.12. Con l'approccio HD-EMG mediante la griglia di elettrodi si rilevano, quindi, diverse osservazioni dello stesso set di treni di spike in origine ed è proprio questa ridondanza ad essere informativa perchè permette di applicare algoritmi di source separation.

La DECOMPOSIZIONE consente di fare il processo opposto: permette di ottenere l'input al sistema (spike trains) dall'output (HD-EMG), estraendo informazioni sulle MU sia da un punto di vista di controllo centrale che di attivazione periferica.

## HD-sEMG : The High-Density approach DECOMPOSITION

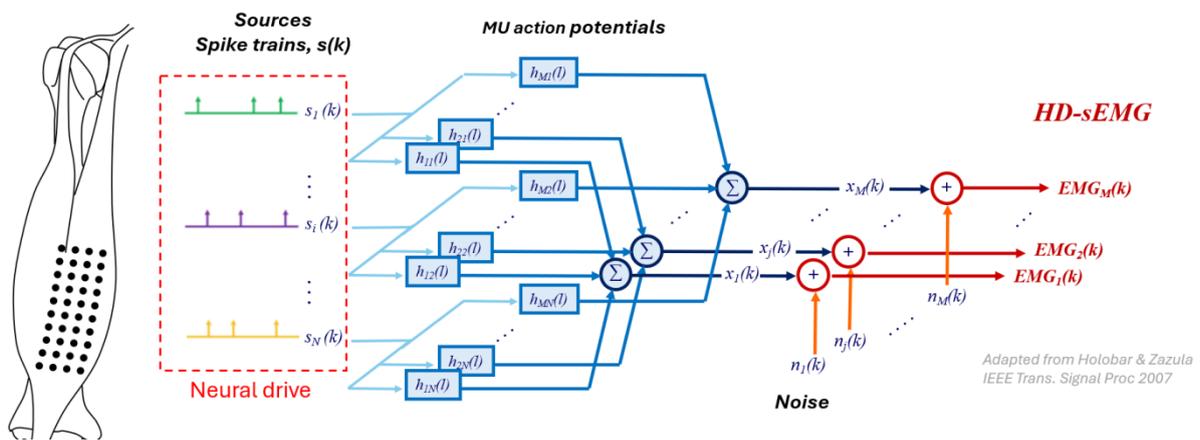


Figura 1.12: Processo di generazione, propagazione e prelievo del segnale EMG ad alta densità elettrodoica

Tradizionalmente il segnale EMG che viene analizzato con questa metodologia è quello ottenuto con acquisizione intramuscolare con elettrodi ad ago, ma in molti studi, e anche per questo progetto di tesi, si sono sfruttati segnali EMG di superficie ottenuti con tecnica di acquisizione da alta densità. La decomposizione automatica soffre la sovrapposizione di MUAP in segnali molto interferenti come quelli ottenuti ad output di forza elevati in cui si sovrappongono i contributi di molte sorgenti. Inoltre, è sempre vero che per fare decomposizione l'acquisizione deve essere in condizioni isometriche per limitare il più possibile il movimento dinamico del muscolo sotto la cute che si avrebbe in condizione dinamica, il quale porterebbe ad una variazione della forma del MUAP dovuto al cambiamento geometrico della forma del muscolo. Inoltre, sfruttando contrazioni di breve durata tali da limitare il più possibile gli effetti della fatica sulla forma del MUAP, si assume che tale forma sia stazionaria [32] e questo è un principio basilare dei metodi di decomposizione sviluppati finora.

Tutti i metodi implementati ricercano la ripetizione di MUAP nell'intero segnale esaminato basandosi su due approcci principali [32]: la ricerca del template noto del potenziale, oppure la ricerca delle sorgenti (o componenti latenti, latent variable analysis LVA) sconosciute, indipendenti tra loro e senza conoscenze a priori (anche detta blind source separation, BSS) [33]. Il primo approccio è alla base di metodi sviluppati per la decomposizione dell'EMG intramuscolare ed è stato adattato anche alla decomposizione di segnali di superficie [34]. I metodi che si basano su di esso variano in base alle euristiche sulle regolarità di forma e attivazione delle MU che sono sfruttate per ottenere risultati più accurati e robusti. Infatti, più forti sono le proprietà ipotizzate del MUAP più è breve il tempo di decomposizione, pur aumentando la dipendenza da tali assunzioni. L'approccio generale consiste in tre fasi:

- Identificazione delle possibili unità motorie e dei relativi MUAP tramite l'utilizzo della Continuous Wavelet Transform (CWT) applicata su tutti i canali. Quest'ultima consiste nell'applicazione di un insieme di filtri con lo stesso prototipo di forma del potenziale d'azione approssimato, ma diverso supporto temporale e diversa ampiezza che dipende principalmente dalla funzione di trasferimento introdotta dal volume conduttore.
- Dopo aver trovato gli istanti di tempo che corrispondono ad un determinato MUAP per ogni canale si procede con la separazione del suo contributo rispetto agli artefatti e al rumore.
- Fase di clustering in cui i MUAP sono raggruppati in qualità di output di diverse MU sorgenti.

Il secondo metodo invece non sfrutta la conoscenza a priori di una forma del potenziale ma si tratta di un approccio matematico alla composizione del segnale EMG interferente che può essere scritto in forma matriciale secondo un modello convolutivo [32], [33], [35]:

$$\mathbf{x}(t) = \mathbf{H}\bar{\mathbf{s}}(t) + \boldsymbol{\omega}(t)$$

Dove:

$\mathbf{x}(t)$  è un vettore di M canali di elettromiografia superficiale ( $\mathbf{x}(t) = [x_1(t), \dots, x_M(t)]^T$ ),

$\boldsymbol{\omega}(t)$  è un vettore di rumore additivo ( $\boldsymbol{\omega}(t) = [\omega_1(t), \dots, \omega_M(t)]^T$ )

$\bar{\mathbf{s}}(t)$  è la serie di L campioni nel tempo di N modelli di forma del MUAP sorgenti

$$(\bar{\mathbf{s}}(t) = [s_1(t), s_1(t-1), \dots, s_1(t-L+1), s_N(t), \dots, s_N(t-L+1)]^T).$$

La matrice di interferenza  $\mathbf{H}$  ha dimensioni M x NL e comprende tutte le N forme d'onda MUAP che sono rilevate dagli elettrodi senza considerare il rumore.

$$\mathbf{H} = [\mathbf{H}_1, \mathbf{H}_2, \dots, \mathbf{H}_N]$$

L'obiettivo principale di questo metodo è stimare la matrice di interferenza  $H$  dalle osservazioni  $x(t)$  senza basarsi su regole relative a forma e frequenza dei MUAP e senza vincoli sul modello di combinazione delle sorgenti. Dopo aver ricavato la matrice  $H$  si ottengono i firing pattern sfruttando la relazione inversa senza considerare il rumore aggiuntivo  $\omega$  e usando la pseudo inversa di  $H$ :

$$\hat{\mathbf{s}}(t) = \mathbf{H}^{-1}\mathbf{x}(t)$$

Questa caratteristica di indipendenza dalle assunzioni fisiologiche tradizionali rende l'approccio valido per lo studio di condizioni patologiche in cui la regolarità della frequenza di sparo e della forma di riferimento del potenziale non è garantita. D'altro canto, questo modello non è computazionalmente ottimale perché produce  $L$  ripetizioni ritardate di ciascun modello della singola sorgente. Questo aspetto negativo può essere limitato tramite un approccio sequenziale che studia una sorgente alla volta:

$$\hat{s}_y(t) = \mathbf{h}_j^{-1}\mathbf{x}(t)$$

dove  $\mathbf{h}_j^{-1}$  sta per la riga  $j$  della matrice  $\mathbf{H}^{-1}$ .

In particolare, nel progetto di tesi è stato sfruttato un algoritmo di decomposizione (DEMUSE introdotto nel capitolo 2.2.1) basato su questo secondo approccio e sviluppato sul metodo del kernel di convoluzione compensato (CKC) [35]. Quest'ultimo permette di evitare la necessità di trovare la matrice  $H$  e parte da una stima di un vettore di cross-correlazione tra un pattern di potenziale di MU  $s_j(t)$  e il vettore di segnale  $\bar{\mathbf{x}}(t)$ :

$$c_{sjx} = E[s_j(t)x(t)]$$

Tale stima può essere fatta con un approccio probabilistico (CKC) [35] o mediante un'operazione di aggiornamento del gradiente (gCKC) [36]. Pertanto, ignorando le forme di MUAP in  $H$ , il metodo CKC è insensibile sia all'anatomia del muscolo sia alla configurazione dell'array di elettrodi posti sulla cute. Inoltre, è anche insensibile alla sincronizzazione delle MU e questo si è rilevato essere un vantaggio significativo rispetto ad altri approcci di decomposizione BSS conosciuti, poiché la sincronizzazione è piuttosto comune, non solo in patologie come il tremore, ma anche in muscoli sani affaticati.

## 1.4 Caratteristiche del vasto laterale ed effetti dell'invecchiamento

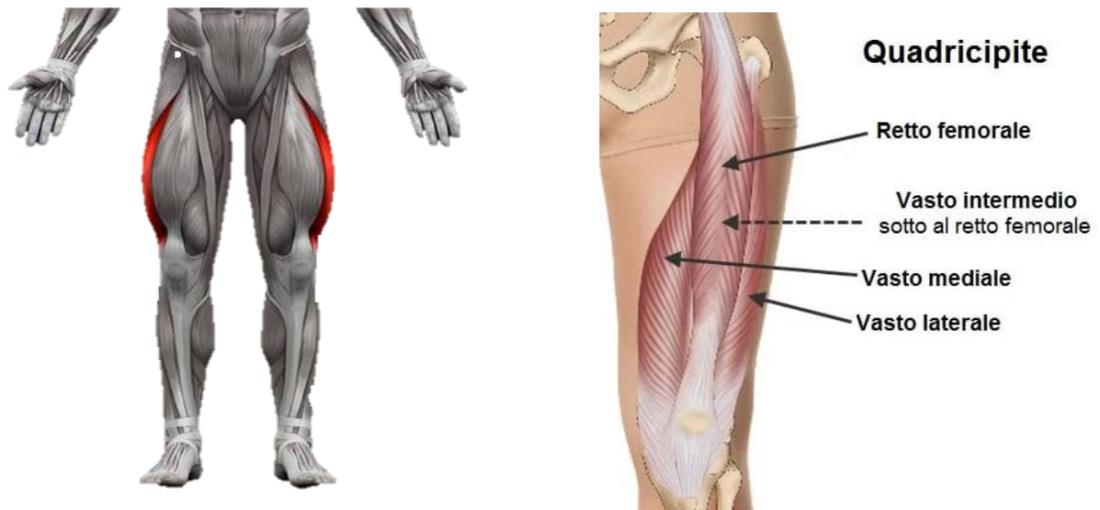


Figura 1.12: Rappresentazione del vasto laterale nel complesso del quadricipite femorale

Il vasto laterale (VL) rappresenta un muscolo cardine nell'analisi dell'invecchiamento neuromuscolare, per la sua funzione nell'arto inferiore e per la sua accessibilità a valutazioni elettrofisiologiche e morfologiche; per questi motivi, viene considerato come muscolo di interesse per il progetto Trajector-AGE: tutti i segnali elettromiografici analizzati nel progetto di tesi sono acquisiti dal VL in condizione di spinte isometriche.

Questo muscolo monoarticolare è uno dei quattro che compongono il quadricipite femorale che sono: Vasto Laterale, Vasto Mediale, Vasto intermedio e Retto Femorale (Figura 1.12). Il complesso del quadricipite femorale è il muscolo più grande del corpo umano ed è situato nella zona anteriore della coscia, in posizione antero-laterale rispetto al femore. Nello specifico il Vasto Laterale origina dalla zona laterale del gran trocantere, dalla tuberosità glutea e dal labbro laterale della linea aspra; e culmina in un tendine unico per tutti i componenti del quadricipite che aderisce alla rotula [37].

L'orientamento delle fibre muscolari cambia tra i muscoli che compongono il quadricipite femorale conferendo così a ciascuno una funzione biomeccanica distinta. Le fibre del VL decorrono longitudinalmente all'asse del femore e permettono di estendere l'articolazione del ginocchio e stabilizzare la rotula [37].

Durante l'invecchiamento, la sezione trasversale del VL diminuisce fino al 67% [8] con conseguente diminuzione della forza massima che si riduce fino al 68% [38].

In seguito alla perdita di unità motorie (UM), la quale si aggira attorno al 50–60% rispetto ai giovani, la dimensione del potenziale d'azione delle unità motorie (MUP) aumenta del 23-29% [8]. Questo cambiamento è dovuto al processo di denervazione e reinnervazione in cui i motoneuroni sopravvissuti innervano un numero maggiore di fibre. Ciò determina un incremento della complessità dell'EMG, evidenziato dalle variabili delle fasi, dei giri e del "jiggle".

Pur essendo la reinnervazione un valido meccanismo di compensazione parziale della perdita delle UM, il livello funzionale complessivo non riesce ad essere completamente ripristinato. A dimostrazione di questo, i tassi di scarica delle UM risultano inferiori rispetto ai giovani in tutti i livelli di forza, con diminuzione della frequenza di scarica fino al 30% anche ad intensità molto basse (<10% MVC) [10], [39]. Anche la diminuzione della pendenza della relazione forza richiesta – frequenza di scarica suggerisce una grande perdita di plasticità, con conseguenti problemi nella modulazione della frequenza di scarica in base alla forza necessaria per compiere un determinato compito.

L'alterazione del VL, per ciò che concerne la frequenza di scarica, contribuisce alla diminuzione della modulazione fine della forza e al grossolano controllo motorio con ripercussioni dirette sulla performance in tutti i compiti e con difficoltà durante compiti di controllo e bassa intensità. La maggiore variabilità della frequenza di scarica, con intervalli di scarica sempre più irregolari e la cui velocità di attivazione fluttua, diviene un problema maggiore a partire dai 70 anni [40]. Infatti, il coefficiente di correlazione seriale negativo e la deviazione standard degli intervalli di scarica aumenta significativamente, segnalando una trasmissione del segnale attivatorio più instabile.

In seguito alla contrazione isometrica prolungata, gli anziani modificano il tasso di attivazione delle UM in maniera meno adattiva, riuscendo di meno ad attivare UM extra o ad aumentare la frequenza di scarica delle UM già attive. In questo contesto, il twitch e la coppia tetanica si modificano per compensare la maggiore tendenza alla fatica dell'anziano, in cui il tasso di incremento della forza è inferiore, con conseguente minore capacità di generare e mantenere la forza [40]. Il declino del reclutamento delle UM porta gli anziani a raggiungere il limite di fatica più rapidamente durante le contrazioni sottomassimali. Il declino funzionale avviene per via sia muscolare sia del drive neurale centrale. La forza dei muscoli estensori del ginocchio, dove il VL gioca un ruolo primario, scende tra la settima e l'ottava decade di vita, peggiorando in tutti i compiti che richiedono potenza e capacità funzionale [38]. Anche la velocità nello svolgere alcuni movimenti di precisione con le mani diminuisce del 25-40% entro i 70 anni.

Il VL fornisce quindi un quadro completo e variegato degli effetti dell'invecchiamento sul sistema neuromuscolare e sulle conseguenze riscontrabili sulla qualità della vita degli anziani.

## 1.5 Effetti dell'invecchiamento sulle unità motorie

Le unità motorie (MU) rappresentano il mattone funzionale per il controllo neuromuscolare, connettono l'attività del sistema nervoso con la contrazione muscolare, determinando lo sviluppo e la modulazione della forza nei muscoli scheletrici [42]. Ogni unità motoria è costituita da un motoneurone alfa e da tutte le fibre muscolari da esso innervate. Unità motorie diverse possiedono differenze per caratteristiche contrattili, soglie di eccitazione, tempi per il picco di forza ed altri parametri, che consentono loro di rispondere in maniera ottimale ai vari compiti motori. La dimensione delle unità motorie varia molto in base al muscolo preso in esame; mentre in alcuni muscoli di dimensioni ridotte il motoneurone innerva solo un numero limitato di fibre muscolari, in quelli di grandi dimensioni può arrivare ad innervare anche centinaia di fibre. Fattori come l'invecchiamento, il livello di attività fisica e patologie neuromuscolari possono influire sulla composizione delle unità motorie.

Le unità motorie non vengono attivate in modo casuale, ma seguendo la legge delle dimensioni di Henneman, dove per prime vengono attivate quelle più piccole, con soglie di attivazione più basse (frequenza di 6-8 Hz), seguite poi dalle unità motorie più grandi, come è possibile vedere in Figura 1.12. Il sistema nervoso centrale infatti, adotta due strategie fisiologiche di controllo delle MU per regolare l'output di forza che vuole generare: all'aumentare della forza richiesta, da un lato aumenta la frequenza di scarica delle singole MU, tramite il treno di potenziali d'azione in input, dall'altro ne vengono reclutate di nuove, aventi maggiori dimensioni (la frequenza può raggiungere valori fino a 40-45 Hz, durante una contrazione volontaria massima) [42]. L'interazione tra frequenza di scarica e reclutamento delle unità motorie è soggetta all'influenza dell'input sinaptico centrale e periferico, e consente di controllare finemente la gradazione della forza muscolare. L'invecchiamento, però, influenza notevolmente il meccanismo di reclutamento e le frequenze di scarica, determinando modificazioni sul controllo della forza muscolare e suggerendo la possibilità che il declino funzionale della capacità neuromuscolare di adattarsi alle variazioni di forza richieste sia in gran parte correlato alla graduale perdita di efficienza del meccanismo di controllo del reclutamento stesso.

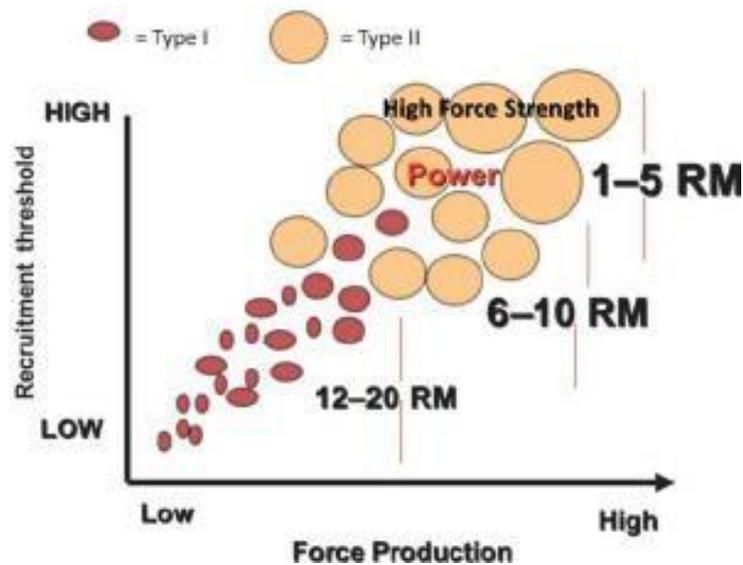


Figura 1.12: Principio di reclutamento ordinato in funzione della tipologia e della dimensione della unità motoria. Ogni cerchio rappresenta un gruppo di fibre, diverse per quantità e tipologia. Cerchi più grandi rappresentano MU con più fibre, il colore scuro indica fibre di tipo I (lente, rosse) e il colore chiaro indica fibre di tipo II (veloci, bianche). Aumentando la resistenza (ripetizione massima, RM) e quindi la forza prodotta, si ha un aumento delle unità motorie reclutate e un aumento delle MU di tipo II. [122]

Anche la **modulazione della frequenza di scarica** risulta essere elemento cruciale per il controllo muscolare. La compromissione della capacità di modulare la frequenza di scarica e di reclutamento durante contrazioni massimali e submassimali a causa dell'invecchiamento è stata ampiamente documentata: è stata riscontrata una diminuzione nella dinamica del firing rate (FR) nelle persone anziane rispetto ai giovani [44], [45] e una limitazione della capacità di modulazione di forza nel gruppo degli anziani; questo suggerisce un declino del controllo neurale muscolare [45].

In seguito a una **diminuzione del numero delle unità motorie**, gli anziani, in modo da compensare tale perdita e conservare comunque l'abilità di generare sufficiente forza muscolare, implementano delle strategie di controllo neurale. Con l'invecchiamento avviene un processo di denervazione e reinnervazione muscolare che influisce sulle caratteristiche strutturali e funzionali delle MU [8], [46].

La riduzione nel numero delle MU è conseguente alla progressiva perdita di motoneuroni alfa spinali che si verifica con l'invecchiamento. A tal riguardo, nel vasto laterale si stima una riduzione della riserva neuromuscolare del 50-60% del numero totale delle unità motorie rispetto a quella dei giovani adulti [8], [9]. La **perdita dei motoneuroni alfa** e delle fibre muscolari determina una diminuzione della capacità di innervazione, portando all'esaurimento della riserva neuromuscolare di ogni individuo, con conseguente perdita della capacità di stabilizzare l'equilibrio e di coordinare azioni motorie.

Al contrario, le **dimensioni del potenziale di unità motoria (MUP) crescono** a causa dei fenomeni di denervazione e reinnervazione, in quanto la perdita di alcuni motoneuroni alfa porta le unità rimanenti ad aumentare il numero delle fibre muscolari da innervare. Per esempio, lo studio di Piasecki et al. (2016) ha riscontrato un aumento del 23-29% del MUP sia in ampiezza che in area in anziani rispetto a giovani [8]. Questo fenomeno compensatorio, per quanto possa alleviare la perdita di forza, è meno efficace dell'innervazione normale delle fibre muscolari. Le dimensioni maggiori del MUP e l'aumento di complessità del segnale EMG indicano una minore accuratezza per quanto concerne la fine modulazione della forza [8], [9].

Come riportato da Deschenes (2004), le fibre muscolari vengono perse selettivamente negli anni, con le fibre di tipo II che diminuiscono del 26% del CSA tra i 24 e gli 80 anni [11]. Per quanto riguarda la composizione fibrosa, il numero di fibre di tipo II passa dal 60% nei giovani adulti al 42% negli anziani. Al contrario, le fibre di tipo I si conservano maggiormente durante il processo di invecchiamento. La perdita selettiva delle fibre II determina un calo della potenza muscolare e la difficoltà nello svolgere movimenti rapidi ed esplosivi, rendendo così difficile, ad esempio, sollevarsi da una sedia rapidamente [11]. Frontera et al. (2000) hanno evidenziato una diminuzione della densità capillare muscolare nei soggetti anziani. Questo deficit comporta la perdita della performance e della resistenza ad esercizi prolungati [47].

Gli adattamenti delle fibre rimanenti, come le transizioni fibrose (modificazioni fenotipiche) e una maggiore dipendenza dalle fibre a contrazione lenta (di tipo I), possono attenuare le conseguenze del declino delle capacità muscolari, ma non sono sufficienti a prevenire del tutto l'insufficienza delle funzioni muscolari, in particolare della capacità di esplosività e tolleranza alla fatica [11]. L'invecchiamento porta inoltre ad una progressiva perdita dell'elasticità delle fibre muscolari e quindi a un aumento della rigidità, portando a una minore capacità di immagazzinare e rilasciare energia durante il ciclo di allungamento-accorciamento. Questo può determinare anche un maggiore rischio di lesioni [48].

Dato che la perdita progressiva dei motoneuroni e delle fibre muscolari porta ad un declino della riserva funzionale del sistema neuromuscolare, è prevedibile un calo progressivo della performance muscolare ad un ritmo dell'1-2% all'anno dopo i 60 anni [9]. Questa insufficienza rende il sistema neuromuscolare meno capace di reagire agli stress quotidiani e di rispondere a eventi imprevisti. L'eccessiva diminuzione di tale riserva aumenta il rischio di incidenti, nonché la perdita dell'autonomia funzionale. Inoltre, una minore plasticità neuromuscolare negli anziani compromette l'abilità di apprendere nuove abilità motorie o di riacquisire quelle perdute a

seguito di un trauma o di una malattia, riducendo il recupero post-intervento riabilitativo e compromettendo la qualità della vita [9].

Molti autori riportano differenze dell'elettromiografia di superficie (EMG) ad alta densità tra giovani e anziani che risultano dalla variazione del controllo muscolare [49]. I risultati mostrano un **aumento dell'entropia** della complessa serie temporale di contrazione muscolare di superficie, e ciò risulta essere legato alle variazioni nella regolarità dell'EMG di superficie che indica deterioramento del controllo centrale nei muscoli degli anziani. Ciò comporta, in gran parte, la variazione nell'eccitazione sinaptica dei singoli motoneuroni e la variazione nella loro sincronizzazione muscolare. Questi indici del segnale ad alta densità possono essere usati come variabili esplicative iniziali, poiché le variabili di reclutamento e di frequenza di scarica delle unità motorie degli anziani sono insufficienti ad esaminare interamente il controllo muscolare e la produzione di forza. A partire dai primi cambiamenti a livello del sistema nervoso che portano al peggioramento della regolazione dell'eccitazione muscolare, gli anziani risentiranno di variabilità muscolare e deficit nella modulazione fine della forza, e sarà questa riduzione del controllo centrale a portare alle deficienze in equilibrio e mobilità.

Le unità motorie svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione della postura e dell'andatura; infatti, la forza e la capacità delle MUs di rispondere agli stimoli esterni sono necessarie per la stabilità posturale e l'equilibrio nelle condizioni di supporto instabili. In particolare, studi effettuati su muscoli della caviglia hanno dimostrato che, in presenza di poca forza muscolare e pochi motoneuroni in attività, vi sono ampie oscillazioni posturali e aumento del rischio di cadute negli anziani [50]. Infatti, gli anziani hanno forza muscolare bassa e tendono a non eseguire correttamente il controllo posturale ed è quindi più probabile che ricorrano a strategie di co-contrazione muscolare per mantenere la stabilità, portando ad un corpo rigido e meno efficiente. Anche durante l'andatura, la ridotta forza muscolare data dall'invecchiamento compromette la capacità di generare rapidi incrementi di tensione, cosa essenziale per il mantenimento dell'efficienza della marcia [51].

A partire da questa conoscenza sulle caratteristiche di sparo delle MUs, sulle strategie di reclutamento e sugli effetti nel controllo della forza, diventa possibile elaborare differenti tipologie di intervento per migliorare il controllo neurale muscolare negli anziani e favorire un miglior fine-tuning in risposta alle variazioni muscolari [52].

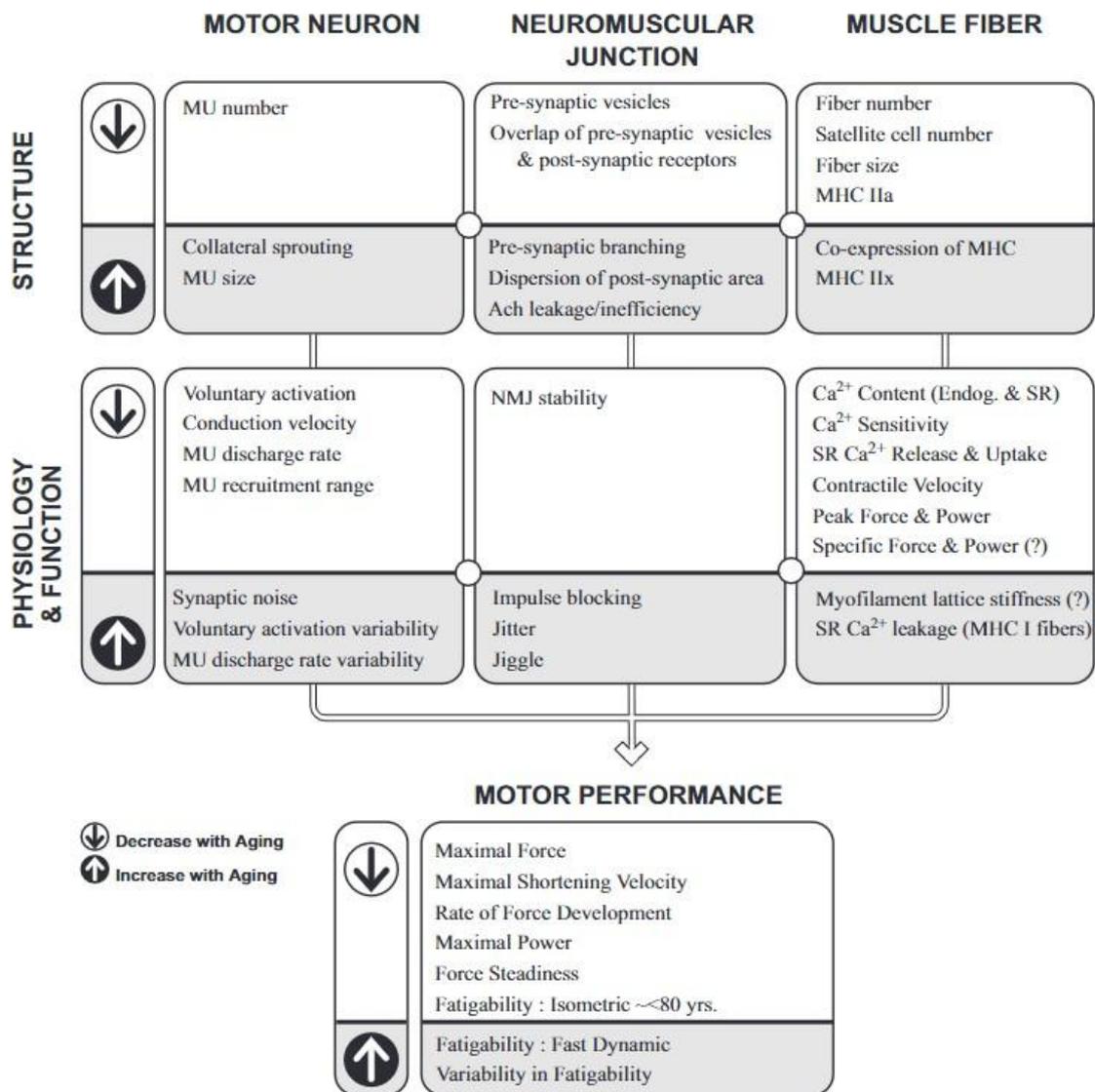


Figura 1.13: Cambiamenti strutturali e fisiologici nell'unità motoria legati all'invecchiamento. Sono mostrati i cambiamenti che si pensa che si verifichino nelle strutture (in alto) nella funzione (in mezzo). I livelli dell'unità motoria sono indicati come: motoneurone, giunzione neuromuscolare e fibre muscolari. In basso invece sono riportate le prestazioni motorie. Le frecce a sinistra indicano se il cambiamento consiste in un aumento o in una diminuzione. [104]

## 1.6 Processi di denervazione e reinnervazione

La riduzione del numero delle unità motorie, come conseguenza della denervazione, è una delle principali caratteristiche del deterioramento neuromuscolare legato all'età. Nel vasto laterale degli anziani, si riscontra una riduzione del 50-60% del numero di unità motorie rispetto ai giovani. Tale perdita può essere definita, a tutti gli effetti, la principale causa del calo della forza muscolare e della resistenza alla fatica [8], [9]. Ridurre il numero delle unità motorie significa diminuire la riserva funzionale del sistema neuromuscolare con conseguente incapacità di generare incrementi improvvisi di forza, riprendersi da eventi traumatici o sostenere forze ripetute.

Il fenomeno della denervazione avviene maggiormente a livello delle unità motorie più grandi e delle fibre muscolari di tipo II che, essendo specializzate per contrazioni esplosive e rapide, sono più soggette alla perdita dell'innervazione. Di conseguenza, le caratteristiche dinamiche dei muscoli si riducono ed il rate di incremento della forza risulta minore negli anziani [8].

Le indagini morfologiche condotte sul vasto laterale sembrano confermare che, contemporaneamente alla perdita delle unità motorie, i muscoli deteriorati presentano un aumento delle fibre muscolari che non fanno parte di alcuna unità motoria, di conseguenza queste fibre non contribuiscono alla produzione di forza del muscolo e/o ne limitano le sue capacità di stabilizzazione dell'articolazione durante movimenti complessi [8].

Con l'avanzare dell'età, la perdita di motoneuroni alfa comporta la denervazione di fibre muscolari. Tuttavia, per compensare questa perdita, si attivano processi di reinnervazione attraverso il "collateral sprouting", in cui i rami terminali degli assoni residui si estendono per innervare le fibre denervate (Figura 1.14). Questo rimodellamento porta alla formazione di unità motorie più ampie e meno numerose, modificando l'organizzazione delle fibre muscolari, la morfologia delle giunzioni neuromuscolari e la stabilità della trasmissione sinaptica. La reinnervazione provoca, inoltre, un aumento delle dimensioni dei potenziali d'azione di tutte le unità motorie. La presenza di segnali elettromiografici complessi durante il reclutamento, nel soggetto anziano, è dovuta principalmente all'aumento delle dimensioni dei potenziali unità motorie e della complessità delle correnti bioelettriche in ingresso, fenomeno che non sempre si traduce in un aumento reale delle prestazioni funzionali [8], [30].

La riorganizzazione funzionale delle unità motorie, che accompagna il processo di reinnervazione, conduce ad un sistema più disomogeneo nel quale le unità motorie tendono ad essere di dimensioni maggiori, non specializzate ed a basso controllo, non permettendo di attivare selettivamente un determinato gruppo di fibre muscolari. Di conseguenza, l'anziano perde gradualmente la capacità di eseguire compiti che richiedono precisione muscolare [8].

Molti studi, eseguiti attraverso l'elettromiografia di superficie ad alta densità, descrivono segnali elettromiografici complessi negli anziani, tipici di una incompleta e non selettiva reinnervazione. I segnali caratterizzati da polifasia ed irregolarità mostrano difetti nella sincronia delle risposte sinaptiche dei motoneuroni durante la scarica, ciò sembra essere un ulteriore indicatore di mal funzionamento [30]. L'attivazione asincrona delle unità motorie interferisce nella produzione di forza e ne compromette la fluidità e stabilità.

Infine, la maggiore frequenza di potenziali satelliti che si riscontra nel muscolo deteriorato può essere considerata un ulteriore fattore di disturbo neuromuscolare nel soggetto anziano. In virtù delle differenti caratteristiche del motoneurone e della trasmissione sinaptica nelle diverse età, il potenziale muscolare satellite riflette una disfunzione neurale legata alla propagazione irregolare del nervo e delle terminazioni nervose durante le contrazioni nel muscolo [53].

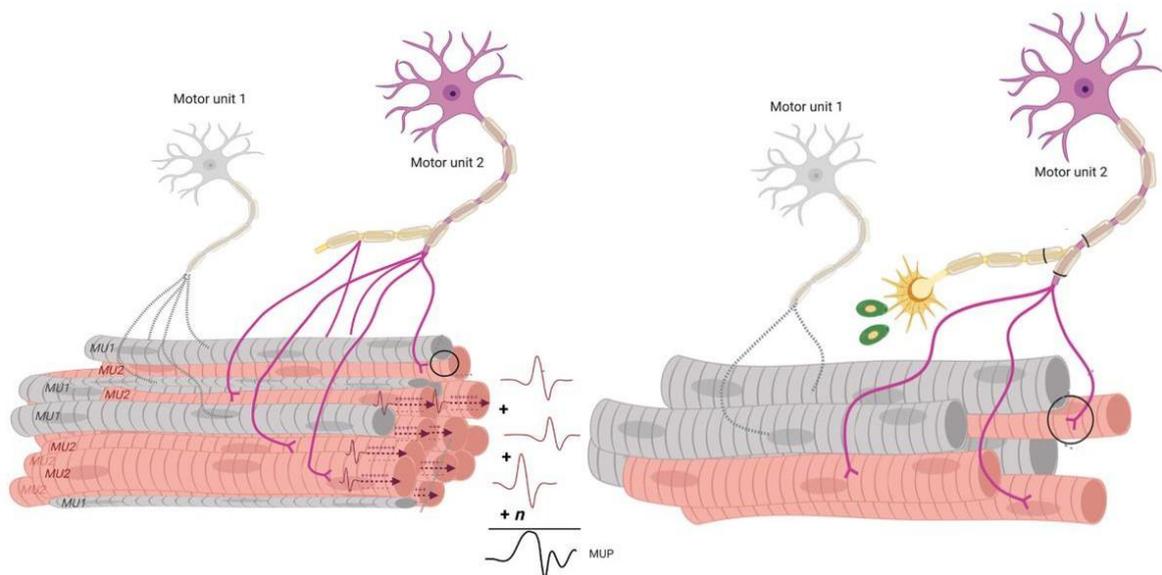


Figura 1.14: Processo di denervazione o del motoneurone 1 a sinistra e processo di reinnervazione da parte del motoneurone 2 sopravvissuto, a destra. [123]

## **1.7 Conseguenze funzionali sulla modulazione di forza e resistenza a fatica**

Le capacità neuromuscolari rappresentano la base imprescindibile per un controllo motorio efficace e coordinato. Tra queste, la modulazione della forza e la resistenza alla fatica rivestono un ruolo cruciale nel mantenimento dell'autonomia funzionale, in quanto sono strettamente legate alla qualità dell'esecuzione dei movimenti quotidiani. Con l'avanzare dell'età, tali funzioni risultano progressivamente compromesse a causa di alterazioni sia centrali che periferiche che coinvolgono la struttura e il controllo delle unità motorie.

Analizzare le conseguenze funzionali dell'invecchiamento neuromuscolare in questi ambiti è fondamentale per comprendere l'impatto sulla capacità motoria residua. In particolare, l'adozione di un approccio longitudinale consente di monitorare l'evoluzione nel tempo dei meccanismi di adattamento e la variabilità interindividuale, offrendo una visione più accurata della plasticità del sistema neuromuscolare e delle strategie compensatorie messe in atto per preservare la funzione motoria.

### ***1.7.1 Effetti dell'invecchiamento sulla modulazione della forza***

Un elemento centrale nel declino della funzione motoria legata all'età riguarda la modulazione della forza muscolare, direttamente influenzata dalla frequenza di scarica delle unità motorie. Studi meta-analitici hanno evidenziato che, negli anziani, il controllo neurale della forza risulta ridotto di circa il 14–17% rispetto ai soggetti giovani, sia in condizioni isometriche che dinamiche, durante contrazioni submassimali e massimali [44], [45]. Questa alterazione nella regolazione motoria si riflette in una ridotta precisione e stabilità durante l'esecuzione di movimenti volontari.

Il deterioramento del controllo neuromuscolare è quindi un fattore rilevante nel declino funzionale, contribuendo alla perdita di forza, all'instabilità articolare e alla difficoltà nell'eseguire attività complesse come la deambulazione [51]. La forza massima volontaria (MVC) ne risente sensibilmente, come dimostrato da Welsh et al. (2007), che hanno registrato una riduzione del 37% nella forza degli estensori del ginocchio nei soggetti anziani rispetto ai giovani, accompagnata da una maggiore variabilità dell'intervallo inter-scarica (ISI) e della forza generata, indicativa di una minore affidabilità nel controllo motorio [54].

L'abilità di modulare la forza muscolare è fondamentale per una performance motoria efficiente, ma negli anziani risulta compromessa, soprattutto in condizioni di richiesta elevata. Orssatto et al. (2022) hanno osservato che a parità di forza esercitata, i soggetti anziani presentano una minore capacità di adattare la frequenza di scarica delle unità motorie, rendendo difficoltoso sostenere compiti muscolari intensi. Inoltre, questo divario aumenta proporzionalmente con l'incremento dell'intensità contrattile, compromettendo progressivamente l'indipendenza funzionale [45].

È stato anche sottolineato che rate-coding e frequenza delle scariche neurali possono deteriorarsi in modo indipendente [53], contribuendo a una risposta motoria meno tempestiva e a una maggiore esposizione a cadute. Sebbene si osservino meccanismi compensatori, come l'aumento della dimensione delle unità motorie o la reinnervazione delle fibre denervate, questi processi non sembrano sufficienti a ripristinare una modulazione precisa della forza [45].

Anche a basse intensità (<10% MVC), la frequenza di scarica muscolare negli anziani si riduce in media del 30% rispetto ai giovani [10]. Wages et al (2023) sottolinea che, pur non essendo il rate-coding il principale regolatore del drive neurale in soggetti anziani decondizionati, esso resta essenziale nelle attività quotidiane di bassa intensità [55]. Inoltre, la pendenza del rapporto tra frequenza di scarica e forza generata risulta inferiore negli anziani per entrambi i tipi di unità motorie (a bassa e alta soglia), con un decremento più marcato nelle MU a soglia bassa.

L'inefficienza nella regolazione della forza, legata alla perdita di sincronizzazione tra motoneuroni e all'instabilità del firing pattern che determinano oscillazioni della forza, ha ovviamente un impatto negativo sulla precisione motoria, evidenziato dalla compromissione nei movimenti fini, come la manipolazione di oggetti [53].

La maggiore variabilità nei tassi di scarica tra due unità motorie con l'avanzare dell'età comporta un maggiore sforzo per mantenere la forza costante, aumentando il rischio di fallimento motorio. Inoltre, i potenziali satelliti rilevati nei segnali EMG degli anziani indicano un degrado funzionale del sistema neuromuscolare, con una struttura elettrica più irregolare e asincrona, che impatta sulla qualità del movimento [53].

Queste carenze nel controllo e nella modulazione continua della forza influiscono negativamente su molte attività quotidiane, compromettendo la stabilità e aumentando la probabilità di cadute.

Le evidenze raccolte mostrano che negli anziani si verificano alterazioni profonde nel funzionamento delle unità motorie, nella loro capacità di reclutamento e nella frequenza di

scarica, che portano a una forza muscolare ridotta, un controllo motorio instabile e un'inefficiente modulazione della forza. Comprendere questi meccanismi è cruciale per prevenire le limitazioni funzionali e migliorare la qualità della vita nella popolazione anziana. Integrando i dati quantitativi della generazione di forza con l'attività delle MU, si può andare ad interpretare a fondo la plasticità neuromuscolare, incrementando la capacità di progettare regimi di allenamento/riabilitazione che puntino a massimizzare la funzione neuromuscolare .

### **1.7.2 Declino o adattamento? La complessità della fatica nell'invecchiamento**

La fatica muscolare ha origini complesse e multifattoriali, non sempre distinguibili con chiarezza tra cause periferiche e centrali: risulta essere il prodotto dell'interazione continua tra processi metabolici e segnali nervosi.

Le numerose ricerche sull'argomento presentano spesso risultati non uniformi, complici le differenze metodologiche tra studi in vitro e in vivo. Inoltre, la fatica è altamente specifica in relazione all'attività eseguita, il che rende difficile proporre una spiegazione unica o universale.

Gli effetti periferici della fatica sono stati frequentemente ricondotti al ruolo delle pompe ioniche e alla concentrazione di calcio intracellulare [57], [58], che svolgono un ruolo centrale nell'accoppiamento eccitazione-contrazione, come anche l'accumulo di ADP o di protoni, noto anche come acidosi, che altera il pH cellulare, influenzando negativamente diversi processi enzimatici e contribuendo alla perdita di forza [59], [60].

La fatica centrale è considerata come l'incapacità del sistema nervoso di mantenere un adeguato comando motorio, associata ad alterazioni a livello dei neurotrasmettitori come noradrenalina [61], dopamina e serotonina, che influenzano anche la componente cognitiva, determinando una sensazione di affaticamento mentale [62], [63].

Potremmo quindi descrivere più accuratamente il fenomeno della fatica mediante un modello tridimensionale, che considera aspetti centrali, periferici e cognitivi in continua interazione tra loro.

Cercando di rispondere al quesito "Che cos'è l'affaticamento muscolare?", generalmente si fa riferimento a definizioni come quella adottata da Lorist et al.: "Eeguire un compito motorio per lunghi periodi di tempo induce affaticamento motorio, generalmente definito come un declino nella capacità di una persona di esercitare forza." [64], nelle quali si descrive la fatica dal punto di vista del calo delle proprietà meccaniche. In quest'ottica, in un task motorio che richieda di sostenere una contrazione muscolare il più a lungo possibile, il soggetto è in grado di mantenere un livello di forza costante fino al raggiungimento del cedimento, definito come "failure point meccanico", oltre il quale si registra un calo drastico della forza. Pertanto, secondo un'interpretazione puramente meccanica, la manifestazione della fatica sarebbe apprezzabile solo al raggiungimento del cedimento. Diversamente, dallo studio del segnale elettromiografico (EMG) è possibile apprezzare che i cambiamenti dipendenti dal tempo indicativi di un processo di

affaticamento intervengono fin dall'inizio della contrazione, anche se le prestazioni meccaniche osservabili esternamente non si alterano fino al punto di rottura. Le alterazioni del segnale mioelettrico di superficie, riscontrabili nell'ampiezza, nella forma e nella velocità di propagazione del potenziale di azione, sono il risultato dei fenomeni di perturbazione del ciclo eccitazione/contrazione e sono noti con il termine di "manifestazioni mioelettriche di fatica muscolare localizzata".

Questo genere di sperimentazioni vengono effettuate durante una contrazione di tipo isometrico, che pur non riproducendo fedelmente le condizioni muscolari naturali, fornisce un modello sperimentale altamente standardizzabile e meno soggetto a interferenze esterne, come il movimento del muscolo rispetto agli elettrodi durante contrazioni dinamiche [65].

In Figura 1.15 è mostrato l'output di forza di un muscolo durante un tentativo di mantenere costante una contrazione volontaria massima del 50% (MVC) e la frequenza mediana dello spettro di densità di potenza del segnale mioelettrico di superficie. Come descritto precedentemente, è possibile apprezzare che anche quando il soggetto mantiene costante il livello di forza, quindi prima del failure point meccanico, la frequenza mediana diminuisce continuamente a partire dall'inizio della contrazione.

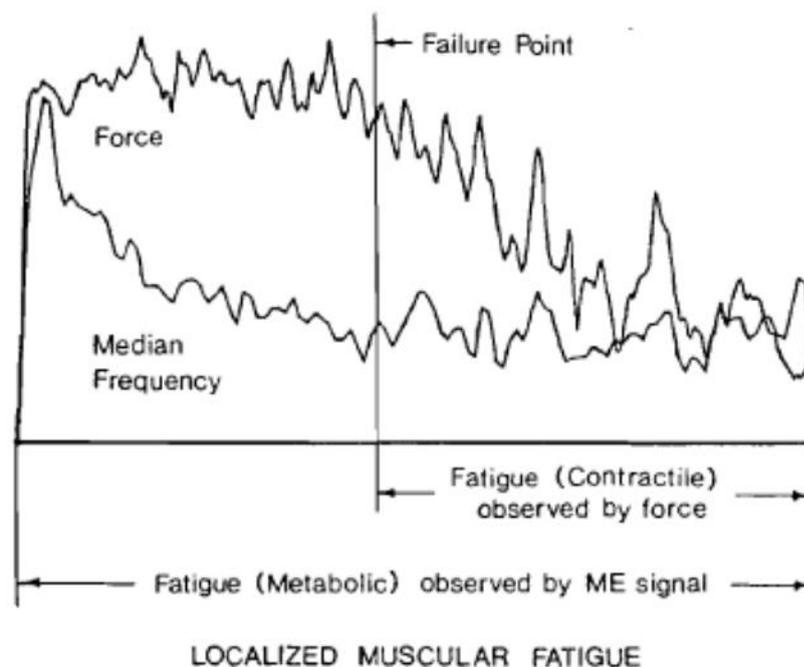


Figura 1.15: Differenza tra fatica metabolica e fatica meccanica. De Luca 1984 [67]

Nello studio del segnale mioelettrico di superficie vengono adottati descrittori come grandezze fisiche che sono classificabili "nel dominio del tempo", che forniscono informazioni sull'ampiezza del segnale, come il Valore Rettificato Medio (ARV) o il Valore Efficace (RMS), e "nel dominio della frequenza", informative sul contenuto spettrale del segnale, la Frequenza Media (MNF) o la Frequenza Mediana (MDF).

Nel corso di una contrazione muscolare isometrica sub-massimale protratta nel tempo, nel segnale mioelettrico, a causa dell'insorgenza del fenomeno della fatica, si osserva l'aumento dei descrittori nel tempo e una concomitante diminuzione dei descrittori in frequenza come evidenziato in Figura 1.16. Le frequenze media e mediana diminuiscono all'insorgere della fatica in quanto il segnale elettromiografico si impoverisce dei contributi ad alta frequenza, quindi lo spettro del segnale si sposta verso sinistra e le armoniche significative presentano valori progressivamente inferiori [66].

Il calo della velocità di conduzione delle fibre muscolari è una delle cause dello spostamento dello spettro di potenza del segnale verso frequenze più basse e anche dell'aumento dell'ampiezza del segnale sEMG a causa di un effetto di filtro passa-basso spaziale del tessuto come conduttore di volume [67].

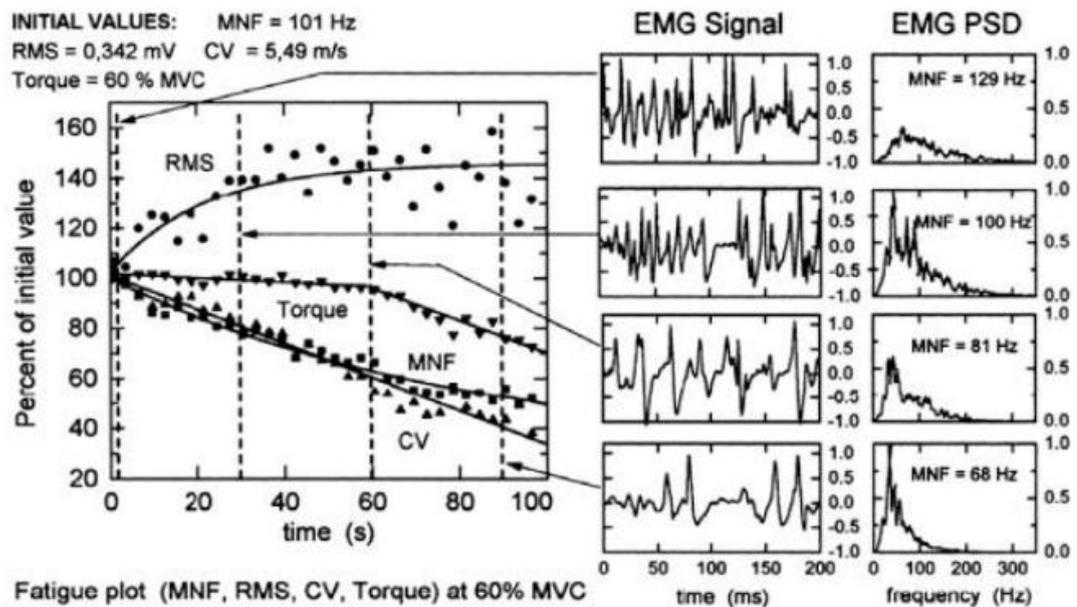


Figura 1.16: Variazione del segnale EMG durante una contrazione sostenuta. Cifrek et al.,2009

In Figura 1.17 vengono riportati i principali fattori che concorrono a definire la forma d'onda del potenziale d'azione di una unità motoria.

Considerando i 3 rami principali, il ramo a sinistra ("Spatial filtering") e quello a destra ("Depolarization zone"), in una contrazione isometrica sono fattori che bisogna considerare ma che influiscono in maniera costante sul segnale, non determinano quindi grosse variazioni della forma d'onda nel tempo. Queste sono quindi riconducibile essenzialmente al ramo centrale, governato dalla velocità di conduzione.

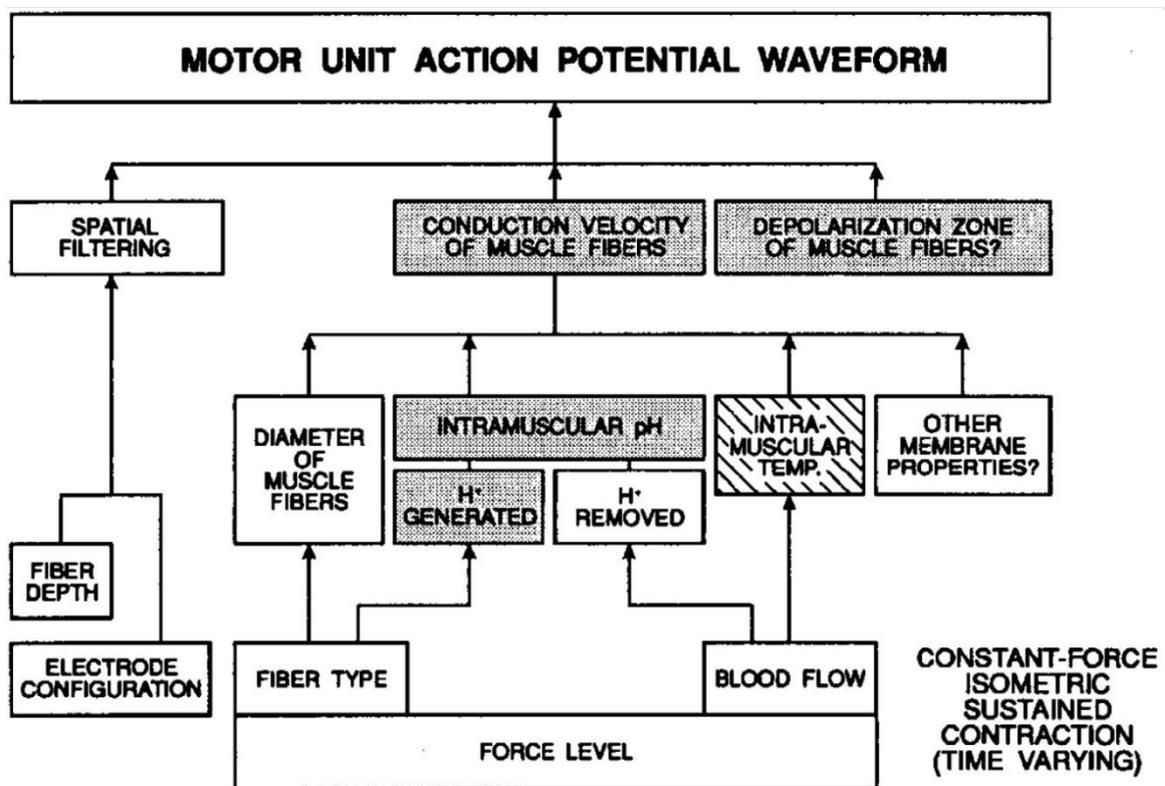


Figura 1.16: Fattori che influenzano la forma del potenziale d'azione dell'unità motoria durante una contrazione sostenuta. I riquadri ombreggiati indicano i fattori che vengono modificati in funzione del tempo durante una contrazione isometrica sostenuta a forza costante superiore al 30% della VMC. La temperatura è meno rilevante rispetto agli altri fattori evidenziati. Gli altri fattori indicati sono rilevanti solo durante contrazioni più deboli o contrazioni non isometriche (De Luca, 1992). [69]

Tuttavia, si osserva che i cambiamenti dello spettro di potenza sono spesso maggiori di quelli prevedibili sulla velocità di conduzione, suggerendo che le manifestazioni mioelettriche della fatica muscolare non possono essere attribuite solo ai decrementi della CV: devono essere considerati altri fattori [69]. Ma poiché l'analisi del segnale EMG, anche nella sua configurazione

ad alta densità, fornisce informazioni aggregate, essendo un segnale interferente dato dalla somma dei contributi delle varie unità motorie, non consente di discriminare con precisione le modificazioni dei pattern di attivazione a livello delle singole unità motorie. A tale scopo, la decomposizione del segnale HDEMG rappresenta uno strumento essenziale per accedere al livello di dettaglio richiesto per indagare i meccanismi neurali che sottendono l'insorgenza della fatica. L'analisi della frequenza di scarica delle MU consente infatti di valutare direttamente le strategie di controllo motorio adottate dal sistema nervoso in risposta all'affaticamento, offrendo una prospettiva più specifica e fisiologicamente interpretabile rispetto ai soli descrittori spettrali o di ampiezza del segnale di superficie.

Nello studio dell'invecchiamento dal punto di vista neuromuscolare è importante valutare un'eventuale compromissione nella gestione della fatica muscolare, in particolare nell'analisi delle caratteristiche di sparo delle MU, in quanto sono stati osservati negli anziani cambiamenti nella frequenza di scarica sia in compiti di bassa che di alta intensità contrattile [45], nonché a una sinaptogenesi inefficace e a un drive neurale ridotto, che potrebbero aggravare la difficoltà dei soggetti in età avanzata nel compensare la perdita di MU con un'adeguata attivazione delle rimanenti [10].

Lo studio degli effetti dell'invecchiamento dal punto di vista neuromuscolare in termini di resistenza alla fatica presenta tuttora risultati contrastanti in letteratura, evidenziando come tale parametro sia fortemente influenzato da numerosi fattori. Tra questi, il tipo di contrazione (isometrica vs dinamica), l'intensità e la durata dell'esercizio. Oltre a fattori periferici, che rivestono sicuramente un ruolo determinante nell'affaticamento, come il deterioramento delle caratteristiche muscolari già ampiamente descritto, gli aspetti centrali e in particolare i cambiamenti strutturali e funzionali delle unità motorie hanno conseguenze rilevanti sull'insorgenza della fatica e i meccanismi compensatori messi in atto per resistervi.

Con l'età si osservano diversi cambiamenti nel sistema neuromuscolare: diminuzione delle connessioni cortico-motorie, riduzione del numero di unità motorie, minore eccitabilità sia a livello spinale che corticale e rallentamento della conduzione assonale motoria [70], [71], [72], [73], [74], [75]. Tutti questi fattori contribuiscono a rendere il muscolo anziano meno resistente alla fatica. In alcuni studi è stato rilevato che gli individui anziani mostrano una resistenza alla fatica pari o persino inferiore rispetto ai più giovani [76], [77]. Tuttavia, in molte situazioni, è emerso che gli anziani presentano una maggiore resistenza alla fatica in differenti gruppi muscolari e durante svariati compiti ad alta richiesta [78], [79], [80], [81], [82].

Le ragioni di questa maggiore resistenza alla fatica negli anziani non sono del tutto comprese. Secondo alcune evidenze ottenute da biopsie muscolari, con l'età si verifica una riduzione globale del numero e del volume delle fibre muscolari, in particolare di quelle di tipo II, che sono più grandi e a contrazione rapida [83], [84]. Questa perdita selettiva favorisce un aumento relativo delle fibre di tipo I nei muscoli invecchiati. Si ipotizza che tale prevalenza di fibre lente e resistenti alla fatica conferisca agli anziani un vantaggio nei compiti ad alta richiesta muscolare [77], [85]. Ad esempio, nel muscolo tibiale anteriore, nei soggetti giovani circa l'80% delle fibre è a contrazione rapida, mentre negli anziani tale percentuale scende al 70% [83]. Nonostante ciò, la relazione tra tipo di fibra e affaticabilità non è sempre lineare [86], [87], suggerendo che altre caratteristiche influenzino le differenze nella fatica tra giovani e anziani.

Durante contrazioni muscolari isometriche prolungate, le MU tendono a seguire un pattern bifasico di attivazione: una fase iniziale di aumento della frequenza seguita da una progressiva riduzione, finalizzata a ritardare l'insorgenza della fatica attraverso il reclutamento di nuove MU e un incremento transitorio della frequenza di scarica [88]. Tuttavia, negli anziani, la capacità di sostenere elevati tassi di scarica risulta compromessa, determinando un rapido esaurimento della forza sviluppata, da cui emerge la necessità da parte degli anziani di mettere in atto strategie compensatorie per mantenere il livello di forza muscolare costante richiesto dal task.

Le variazioni tra individui nelle risposte neuromuscolari all'invecchiamento sono molto marcate e non possono essere spiegate unicamente dalla perdita o dalla contrazione delle MU. La capacità di coordinare l'attivazione delle MU non è uniforme tra gli anziani: alcuni mostrano una marcata perdita di MU attive già nelle fasi iniziali della contrazione, altri le mantengono fino al fallimento. Queste differenze individuali indicano una complessa interazione tra la perdita delle MU e il peggioramento dell'efficacia attivazionale delle restanti, sottolineando la natura non omogenea del declino neuromuscolare.

Alla luce di ciò, risulta fondamentale seguire il decorso individuale dei cambiamenti delle caratteristiche neuromuscolari dei soggetti anziani mediante un'analisi longitudinale, che miri ad evidenziare eventuali effetti sui meccanismi di resistenza alla fatica e regolazione della forza. Una comprensione approfondita delle strategie neuromuscolari alterate con l'età, determinanti nella gestione della forza e della fatica, è indispensabile per affrontare in modo mirato i deficit motori nella popolazione anziana.

## 1.8 Obiettivi dello studio

L'obiettivo generale di questo progetto di tesi è analizzare le alterazioni neuromuscolari associate all'invecchiamento a carico dell'unità motoria.

Lo studio si articola in tre aree principali di indagine, ciascuna rivolta a un diverso aspetto dell'adattamento neuromuscolare e del controllo motorio nel corso dell'età.

### 1. Modificazioni nelle caratteristiche di scarica delle unità motorie

L'indagine si concentra sui cambiamenti età-dipendenti nella caratterizzazione delle MU dal punto di vista centrale e periferico durante contrazioni isometriche a rampa, mediante un approccio sia longitudinale che trasversale.

Per tale scopo, è stata condotta un'analisi **longitudinale** delle MU, estesa su tre sessioni di acquisizione dati nell'arco di un anno di osservazione, confrontando un gruppo di soggetti di mezza età con un gruppo di anziani. Sono state, inoltre considerate prove a due diversi livelli di forza (30% e 50% della massima contrazione volontaria, MVC), per valutare l'eventuale insorgenza di effetti legati all'invecchiamento al variare dell'entità della richiesta di forza nella fase di tenuta.

L'analisi longitudinale, in particolare, riveste un ruolo cruciale per distinguere i cambiamenti intra-individuali da quelli legati alla variabilità tra soggetti, permettendo di cogliere in modo più accurato le traiettorie evolutive all'interno delle fasce d'età considerate.

### 2. Alterazioni del controllo neurale della forza

Un secondo ambito riguarda l'impatto dell'invecchiamento sulla capacità di modulare la forza in relazione alla variazione del firing rate. Sebbene sia noto che con l'età si riduca la capacità di generare e regolare la forza, non è ancora del tutto chiaro in quale misura tale decadimento sia attribuibile a fattori centrali, oltre che a componenti periferiche e muscolari. L'analisi si propone di approfondire il contributo del controllo neurale alla modulazione della forza nelle diverse età, valutando il guadagno tra forza generata e frequenza di sparo delle unità motorie dalla fase di reclutamento a quella di tenuta, sia in termini di forza relativa che assoluta [89].

L'obiettivo è quindi comprendere in che misura il declino della capacità di generare e regolare la forza osservato con l'invecchiamento sia attribuibile a meccanismi centrali di controllo neurale, oltre che a modificazioni periferiche o muscolari.

### 3. Risposta neuromuscolare a fatica

L'ultima area di indagine esplora le differenze età-dipendenti nella risposta a fatica. Come descritto ampiamente nei paragrafi precedenti, i risultati presenti in letteratura in merito sono contrastanti: mentre alcuni studi mostrano una resistenza simile o ridotta degli anziani rispetto ai giovani, altri indicano una minore affaticabilità dei soggetti in età avanzata, potenzialmente attribuibile a un rimodellamento neurale che favorisce fibre di tipo I, più resistenti alla fatica.

La divergenza nelle evidenze sugli effetti dell'invecchiamento dal punto di vista neuromuscolare in termini di resistenza alla fatica sottolinea la complessità del fenomeno, fortemente influenzato dai numerosi fattori già menzionati. Tra questi, in particolare, i cambiamenti strutturali e funzionali delle unità motorie hanno conseguenze rilevanti sull'insorgenza della fatica e i meccanismi compensatori messi in atto per resistervi.

Nell'ottica di arricchire la controversa conoscenza in merito all'affaticamento nei soggetti anziani, è stato calcolato lo slope [90] del firing rate delle unità motorie in contrazioni isometriche a forza costante pari al 50% MVC, confrontando 3 gruppi di soggetti: giovani, di mezza età e anziani.

## 1.9 Trajector-Age

Il presente lavoro di tesi si inserisce in un progetto di ricerca più ampio, denominato Trajector-Age, che viene presentato di seguito al fine di contestualizzare l'acquisizione e l'elaborazione dei dati.

Il progetto intende caratterizzare i cambiamenti longitudinali legati all'età nella funzione motoria, nelle prestazioni fisiche e nei muscoli, combinando i metodi classici di valutazione in-vivo ed ex-vivo della funzione neuromuscolare con approcci innovativi.

Vengono prese in esame le due fasi critiche dell'invecchiamento: 55-60 anni e 75-80 anni

Mediante analisi periodiche, a distanza di circa 6 mesi, per un arco temporale di 2 anni, si è interessati a descrivere gli effetti dell'invecchiamento nei seguenti ambiti: i meccanismi di compromissione della funzione neuromuscolare (processi di denervazione-reinnervamento), compromissioni neurali/metaboliche, cambiamenti funzionali e metabolici che si verificano a livello dell'intero muscolo e delle singole fibre.

I risultati estenderanno l'attuale comprensione dei determinanti fisiologici delle alterazioni neuromuscolari nell'invecchiamento, identificando il decorso e la velocità dei cambiamenti di fattori specifici che mediano la perdita funzionale e la disabilità negli adulti anziani.

### ***Punti di forza di TRAJECTOR-AGE***

- L'approccio longitudinale fornisce dati sulle traiettorie dei cambiamenti in due fasi critiche dell'invecchiamento, consentendo una migliore comprensione degli impatti dell'invecchiamento stesso e del livello di attività fisica.
- L'approccio traslazionale, dalla prospettiva molecolare a quella integrativa, portato avanti da un team scientifico con un'ampia gamma di competenze, che coinvolge conoscenze cliniche, fisiologiche e tecnologiche.
- L'individuazione di predittori precoci (biomarcatori molecolari e fisiologici, indici funzionali) di un successivo declino funzionale, utili nella salute pubblica e nella pratica clinica.

Per gli aspetti di analisi neuromuscolare, le sessioni di acquisizione di dati vengono svolte presso l'azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, con cadenza settimanale a partire da Novembre 2022. Sono stati coinvolti 97 partecipanti, dei quali 57 nella fascia d'età 55-60 anni (PRM) e 40 nella fascia 75-80 anni (PRO). Le acquisizioni si svolgono nelle modalità descritte dettagliatamente nella sezione *Materiali e metodi*.

## 2 Materiali e metodi

In questo capitolo verranno descritti i metodi e i materiali usati nelle sessioni di acquisizione di dati sperimentali svolte sia presso l'azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, sia presso il laboratorio di ingegneria del sistema neuromuscolare (Laboratory for Engineering of the Neuromuscular System LISiN) di Torino. Questi processi di acquisizione sono stati concepiti per studiare in modo completo l'attivazione muscolare in soggetti sani ma distinti per fasce di età, al fine di indagare i cambiamenti relativi al controllo neuromuscolare legati all'invecchiamento.

A seguire, dopo aver presentato i gruppi di soggetti coinvolti nello studio, descrivendo l'andamento delle sessioni di acquisizione dei dati nel tempo ai fini longitudinali dello studio, verranno descritte dettagliatamente le procedure sperimentali eseguite nelle due strutture e i materiali usati durante le acquisizioni (Par. 2.1), per arrivare poi al fulcro del progetto, ossia l'analisi dei dati analizzati (Par. 2.2).

### 2.1 Protocollo

Il progetto di tesi prende in esame un campione ristretto di soggetti coinvolti nel progetto Trajector-AGE, nel corso del primo anno di osservazione, considerando quindi 3 sessioni sperimentali svolte presso l'azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma: la prima (T0), la seconda (T1) a distanza di sei mesi dalla prima e la terza (T2) ad un anno. Al fine di analizzare due fasce d'età considerate critiche per l'invecchiamento, sono stati reclutati due gruppi di soggetti distinti per età: il primo costituito da 11 soggetti di mezza età (tra i 50 e i 65 anni) definiti PRM, il secondo da 11 soggetti anziani (età compresa tra 70 e 85 anni) detti PRO.

Per avere una visione più completa dell'effetto dell'invecchiamento neuromuscolare ed ai fini di uno studio trasversale tra fasce di età, è stato aggiunto un gruppo di controllo limitato di 10 soggetti giovani (TOY), con età pari o inferiore a 30 anni, le cui acquisizioni sono state svolte presso il LISiN con un protocollo il più simile possibile a quello adottato per i due gruppi precedentemente menzionati. I dati relativi al gruppo under-30 sono stati acquisiti in un'unica sessione, ritenendo che eventuali variazioni neuromuscolari in soggetti così giovani, in assenza di

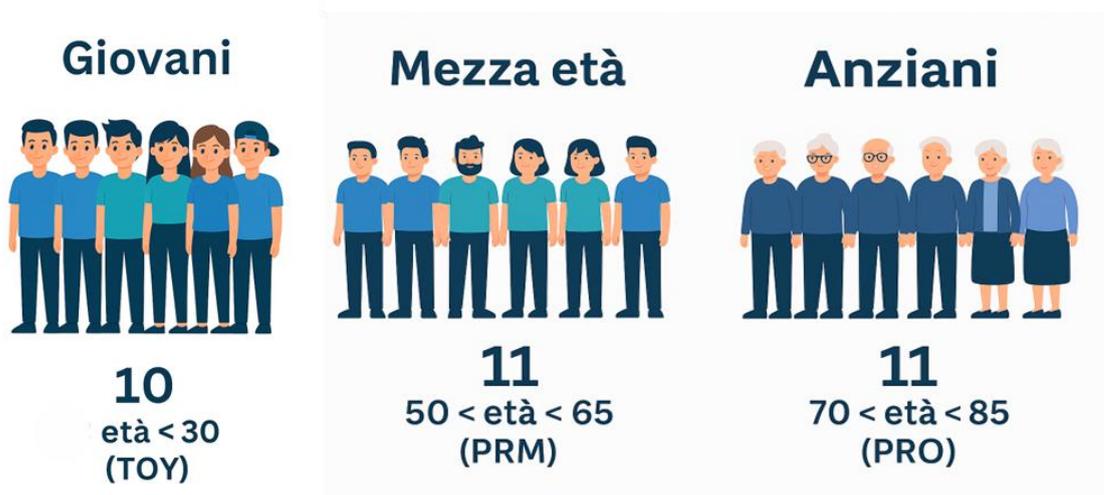
condizioni neuro-motorie particolari, siano tendenzialmente trascurabili ai fini dello studio. Trattandosi di un'indagine centrata sugli effetti dell'invecchiamento, eventuali cambiamenti osservabili in questa fascia d'età sarebbero probabilmente imputabili ad altri fattori e non offrirebbero un contributo significativo nell'ottica del confronto trasversale con i gruppi più anziani.

Il confronto con i soggetti under-30 è stato però condotto solo nell'ultima delle tre sezioni dello studio che verranno dedicata all'attività neuromuscolare in contrazioni isometriche affaticanti, in quanto gli altri aspetti considerati sono stati oggetto di studio di un precedente lavoro di tesi [94], riscontrando variazioni più rilevanti tra il gruppo di anziani e quello di mezza età, maggiormente affine ai giovani. Pertanto si è deciso di indagare più a fondo le caratteristiche delle unità motorie concentrando il confronto trasversale tra PRM e PRO e inserendo l'osservazione longitudinale, non valutata precedentemente, nello studio degli aspetti già investigati e di introdurre l'analisi del comportamento a fatica.

In Tabella 2.1 vengono riportati i dati anagrafici e alcuni parametri antropometrici dei partecipanti per i 3 gruppi acquisiti nel corso della prima sessione sperimentale alla quale hanno preso parte.

Gruppo	Età	FL (cm)	VL (cm)	Altezza (cm)	Massa (kg)
TOY	26 ± 2,28	41,0 ± 2,06	14,9 ± 1,60	172 ± 9,42	62,7 ± 11,12
PRM	58 ± 3,64	40,2 ± 2,22	14,3 ± 2,53	172 ± 8,64	74,85 ± 18,62
PRO	78 ± 4,75	39,9 ± 2,11	14,3 ± 1,03	170 ± 8,77	73,59 ± 14,50

Figura 2.1: Età, lunghezza del femore, larghezza del vasto alterale, altezza e massa dei soggetti coinvolti nello studio, espresse in termini di valori medi per gruppo ± deviazioni standard.



## 2.1.1 Reclutamento dei soggetti

I partecipanti allo studio sono stati reclutati presso l'Università degli Studi di Parma (UNIPR), selezionati tra coloro che si recano abitualmente nella struttura per valutazioni cliniche. L'inclusione nello studio richiedeva il rispetto di specifici criteri volti a garantire l'integrità delle capacità cognitive e motorie. Per la valutazione delle funzioni cognitive è stato somministrato il Mini Mental State Examination (MMSE), un test standardizzato che prevede una serie di domande e compiti grafici finalizzati ad analizzare diverse funzioni mentali, tra cui memoria, attenzione, linguaggio e capacità di calcolo. Un punteggio pari o superiore a 24/30 è stato considerato indicativo di uno stato cognitivo nella norma.

Invece, per attestare le capacità motorie si fa riferimento a 4 test diversi:

1. Cammino su una distanza di 4 metri
2. Short Physical Performance Battery
3. Timed-Up and Go
4. GRIP test

Il primo è un test del cammino su una distanza di 4 metri (gait speed over four-meter) per il quale non è considerata accettabile una velocità inferiore a 0,8 m/s. Il secondo test è lo Short Physical Performance Battery (SPPB), il quale è stato sviluppato dal National Institute of Aging, e comprende tre sezioni che valutano rispettivamente l'equilibrio, il cammino su 4 metri lineari e la capacità di alzarsi da seduti per 5 volte di fila senza l'utilizzo degli arti superiori; il valore minimo di accettabilità è fissato a 9 su un range che va da 0 a 12. Il terzo test è il Timed-Up and Go test (TUG) in cui si misura il tempo necessario affinché il soggetto si alzi dalla sedia, cammini per tre metri e si volti su se stesso per tornare indietro e risedersi sulla sedia. Un tempo superiore ai 20 secondi suggerisce la necessità di assistenza esterna e per questo è la soglia massima di accettabilità. L'ultimo test valuta la forza di presa della mano (GRIP) usando un dinamometro ed effettuando contrazioni massimali con tenuta di almeno cinque secondi con entrambe le mani; le soglie minime di accettabilità sono 16 kg per le donne e 27 kg per gli uomini.

Vengono esclusi dal progetto tutti i soggetti che non superano i test appena descritti o che sono affetti da Parkinson, altre malattie neurologiche, disabilità, ictus, cancro in stadio avanzato, malattia renale cronica (IV e V stadio), grave insufficienza epatica, grave disturbo cardiaco, recente intervento chirurgico al cuore, osteoartrite grave.

Successivamente al superamento di questi test cognitivi e motori, sempre presso l'Università degli studi di Parma, i soggetti ammessi devono compiere una valutazione geriatrica multifunzionale (Comprehensive Geriatric Assessment, CGA[92]) per monitorarne le condizioni cliniche. Pertanto, ai risultati ottenuti ai test di ammissibilità si aggiungeranno altre valutazioni: cognitive e psicologiche, dell'autonomia del soggetto, del rischio di malnutrizione e disfagia, della prestazione fisica, della massa muscolare scheletrica e appendicolare mediante BIA [93], della pressione arteriosa e della salute del sistema cardiovascolare con ECG a riposo ed ecocardiografia.

## 2.1.2 Descrizione del protocollo neuromuscolare

Il protocollo completo, schematizzato in Figura 2.2, comprende tre fasi: una statica, una di spinte isometriche in estensione della gamba destra e una di estensioni dinamiche rapide e intervallate da contrazioni massimali. L'obiettivo della prima fase è quello acquisire delle immagini e delle panoramiche che permettano la semplice visualizzazione della struttura muscolare e l'acquisizione di riferimenti anatomici del soggetto. Invece l'obiettivo delle altre due fasi è quello di acquisire più dati contemporaneamente, compreso il video ecografico e i segnali HD-EMGs, per avere un'informazione il più possibile dettagliata dell'attivazione muscolare. In questo paragrafo verrà descritto nello specifico lo svolgimento della sessione sperimentale nelle sue prime due parti, tralasciando le contrazioni dinamiche; sia il suo svolgimento presso la sede di Parma, sia quello riprodotto presso il laboratorio LISiN.

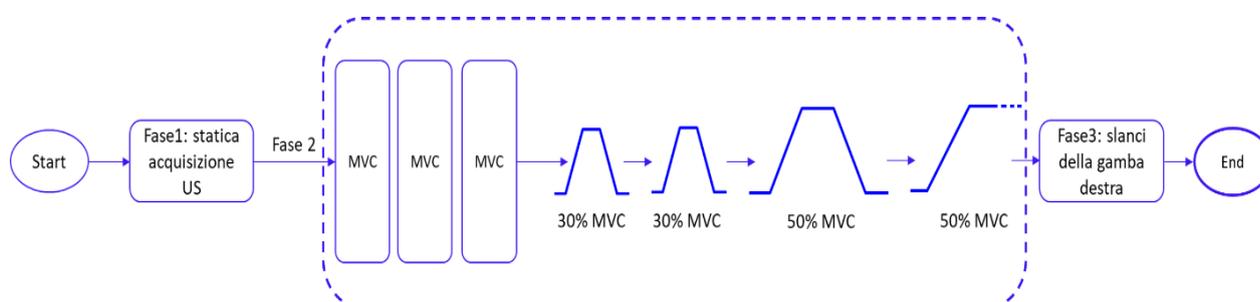


Figura 2.2: Schema del protocollo sperimentale

### ***Fase statica e acquisizione dei dati anatomici***

Il soggetto viene accolto in sala misure e gli si chiede di togliersi le scarpe, di indossare i pantaloncini e di sdraiarsi sul lettino con il busto appoggiato sullo schienale leggermente rialzato. Un operatore esperto esegue l'identificazione di punti anatomici di interesse della gamba destra per misurare la lunghezza del femore e la larghezza del muscolo VL attraverso l'uso di una sonda ecografica. In questa fase il soggetto viene informato sulle fasi successive fornendo inoltre una contestualizzazione generale del progetto. Per prima cosa vengono individuate le estremità prossimale e distale di inserzione del muscolo, viene presa nota di queste posizioni tracciando dei segni sulla cute con un pennarello indelebile. Successivamente, usando un metro, da questi segni si ricava la lunghezza del femore e alcune distanze dal ginocchio definite in percentuale rispetto alla lunghezza totale: 60%, 50%, 40%, 30% e 20%. In corrispondenza del 50% vengono identificati i bordi medio laterali del muscolo e, tramite i segni sulla cute, si ottiene la larghezza del Vasto Laterale. Utilizzando la sonda ecografica, per tutte le distanze vengono salvate delle immagini panoramiche trasversali di tutta la gamba, dove si può vedere tutta l'area della sezione trasversale (cross sectional area, CSA) del complesso muscolare del quadricipite (Figure 2.1). Infine, con la sonda ecografica disposta parallelamente al muscolo e inclinata per ottenere visione migliore possibile dei fascicoli muscolari, si acquisisce un'immagine longitudinale alla distanza pari al 50%. Questa sarà la posizione in base alla quale verrà collocata la griglia di elettrodi per la fase successiva, perché la finestratura di 1x6 cm nella matrice dovrà combaciare alla zona di appoggio della sonda ecografica lineare. Tutta questa prima fase è stata svolta allo stesso modo in entrambe le sedi sperimentali.

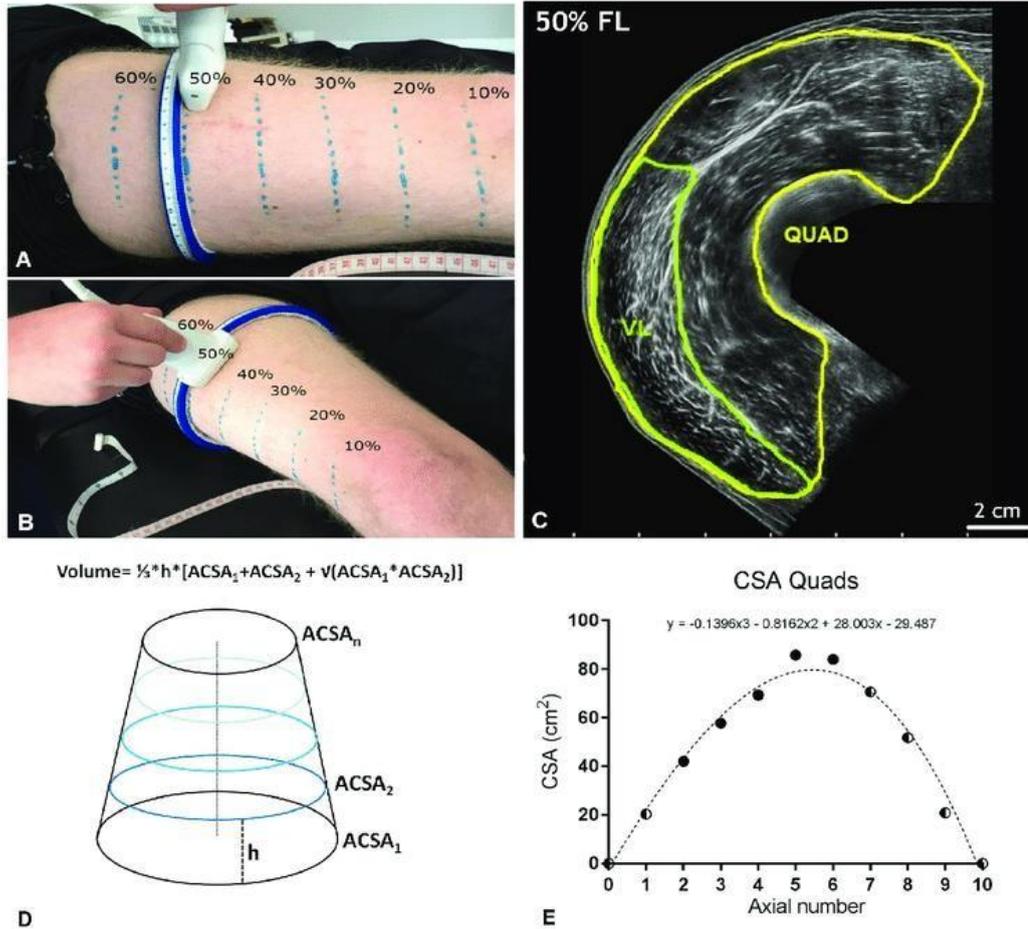


Figure 2.1: a ,b) metodo di acquisizione delle CSA a diversi livelli di lunghezza del femore, c) CSA del quadricipite al 50% della lunghezza del femore con il la sezione del VL evidenziata in verde, d) modello a tronco di cono per il calcolo del volume muscolare, e) interpolazione dei valori di CSA tramite una curva polinomiale di grado tre.

### ***Fase di spinte isometriche a forza controllata***

In questa fase si ha l'obiettivo di acquisire in modo sincronizzato i segnali HD-EMGs, il video ecografico, il profilo di forza e il segnale dell'angolo articolare del ginocchio durante delle contrazioni isometriche di estensione di gamba. Il protocollo procede con la preparazione della cute del soggetto prima di posizionare gli elettrodi. La zona di interesse viene depilata (solo se necessario) e viene applicata una pasta abrasiva (Nuprep Skin Prep Gel, Weaver and Company, Aurora, Colorado) con forte pressione per ridurre al minimo l'impedenza elettrodo-cute. I residui di questa pasta abrasiva vengono rimossi con un panno prima di far sedere il soggetto sulla sedia sensorizzata e applicare attentamente la matrice preparata con il foam biadesivo e con la pasta conduttiva.

Nel laboratorio dell'ospedale di Parma la caviglia del soggetto è vincolata al supporto morbido per la gamba con delle bande elastiche mentre lui è seduto con la schiena bene attaccata allo schienale. Successivamente vengono posizionati due Meacs, uno per ognuno dei due connettori della matrice di elettrodi e vengono connessi all'elettrodo di riferimento posto sul ginocchio del soggetto. Per ultimo il dispositivo DueBio deve essere collegato alla cella di carico e all'elettrogoniometro in posizione laterale. Tutti i sensori che sono applicati sul soggetto o che sono poggiati sulla sua gamba (il DueBio, i Meacs, l'elettrogoniometro e la matrice di elettrodi descritti in Procedure e Setup sperimentale) vengono stabilizzati sulla cute del paziente tramite Hypafix (BSN Medical, Agrate Brianza, Italia) e foam biadesivo come mostra la Figura 2.4 con il setup definitivo.

Lo stesso procedimento di sensorizzazione è stato eseguito anche presso il LISiN con l'unica differenza che la sedia sensorizzata in questa sede è stata sostituita dal Biodex System 4 Pro settato in modalità isometrica con le specifiche riportate nella Tabella 2.3. Anche in questo caso l'altezza della seduta, la sua profondità e la sua distanza dal centro di rotazione del braccio che funge da sostegno per la gamba sono state accuratamente cambiate per ogni soggetto, in modo tale che il centro di rotazione del sostegno meccanico stesso corrispondesse il più precisamente possibile al ginocchio.



*Figura 2.4: Setup completo nel laboratorio dell'ospedale di Parma, l'immagine include: una BH-L010 Leg Extension, una griglia di elettrodi 8x8, 2 Meacs Sensor Unit, Un elettrodo di riferimento, un sensore DueBio, la sonda lineare L15-7H40-A5 e un elettro-goniometro.*

Finita questa fase di preparazione del setup sperimentale si lascia al soggetto il tempo di entrare in confidenza con la strumentazione che gli viene sommariamente descritta e gli si chiede di iniziare a provare a compiere qualche spinta con la gamba destra per riscaldamento. Intanto si prepara un monitor grande da porre davanti al soggetto e che gli permetterà di visualizzare in tempo reale l'andamento del segnale di forza. A questo punto si inizia con le prime tre acquisizioni vere e proprie che consistono in pochi secondi di spinte al massimo della forza (maximum voluntary contraction, MVC) intervallate da almeno due minuti di pausa tra una e l'altra. Questo serve per ottenere un valore di MVC medio a cui fare riferimento per calcolare matematicamente i profili delle contrazioni isometriche successive. Questi ultimi sono definiti come profili trapezoidali con plateau pari al 30% o al 50% del massimo valore di forza ottenuto e con velocità di incremento di forza lenta, pari al 2% dell'MVC al secondo (Figure 2.2 a). Nello specifico si chiede al soggetto di controllare il più possibile la sua forza incrementandola lentamente durante la fase di salita, mantenendola costante durante i 15 secondi di fase di tenuta e rilassando il muscolo lentamente durante la fase di discesa. Essendo che il controllo è abbastanza difficile si lascia la possibilità al soggetto di fare almeno un paio di prove iniziali in cui si pone come obiettivo quello di seguire, con il proprio output di forza visualizzato in tempo reale, il profilo trapezoidale ottimale con plateau al 30% dell'MVC.

Dopo aver fatto qualche prova si procede con le acquisizioni vere e proprie che consistono in due rampe isometriche al 30%MVC, una rampa isometrica al 50%MVC e una contrazione isometrica a fatica con plateau 50%MVC; tutte intervallate da 2 o 3 minuti di pausa. Quest'ultima contrazione a fatica ha un andamento di forza simile a quelle trapezoidali tranne che per la mancanza della fase di rilassamento muscolare perché l'obiettivo del soggetto è resistere il più a lungo possibile mantenendo un livello di output pari al suo 50%MVC come in Figure 2.2 b.

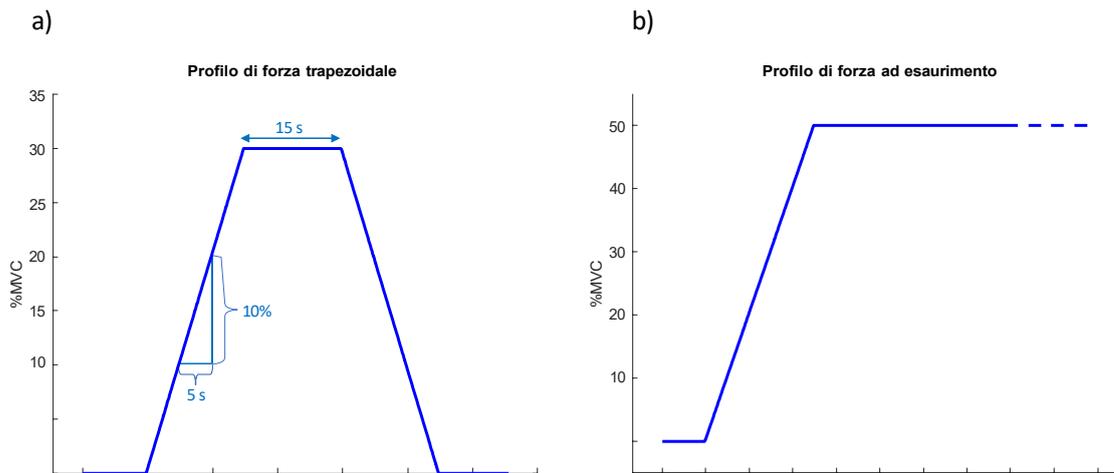


Figure 2.2: a) Profilo trapezoidale di forza con plateau al 30% dell'MVC, b) Profilo di forza ad esaurimento con plateau al 50% dell'MVC

### 2.1.3 Procedure e Setup sperimentale

Nella prima fase dell'esperimento in cui il soggetto è sdraiato su un lettino, l'ecografo utilizzato per visualizzare la struttura muscolare del Vasto Laterale e ottenere i primi dati anatomici è l'ArtUs EXT- 1H - Color Doppler Ultrasound Beamformer Figure 2.3A (TELEMED, Vilnius, Lithuania) con la sonda lineare L15-7H40-A5 (Tabella 2.2, Figure 2.3: ). Nella seconda fase invece il soggetto deve compiere le estensioni isometriche di ginocchio con la gamba destra ed è fatto accomodare su una sedia sensorizzata e dotata di un supporto meccanico fisso per la gamba in esame.

Per la raccolta dei dati svolta all' ospedale di Parma si usa una "leg extension machine", più precisamente una BH L010 Leg Extension (BH fitness-EXERCYCLE, S.L. , Vitoria-Gasteiz, Spagna) mostrata in Figure 2.4, con il supporto per la gamba bloccato in modo tale da formare un angolo articolare di ginocchio di 110° (riferimento: ginocchio completamente esteso = 180°) e sensorizzato con una cella di carico (Figure 2.4, MODEL TF 031, fondo scala 100 kg e sensitività di 2 mv/V, CCT Transducers, Torino, Italy) per misurare la forza isometrica espressa dal soggetto.



Figure 2.3: A) ArtUs EXT-1H Color Doppler Ultrasound Beamformer B) Sonda lineare L15-7H40-A5

Intervallo frequenze	7-15 MHz
Campo di vista	40 mm
Profondità campo di vista	20-100 mm
Numero elementi	192
Applicazioni	Pediatria, piccole zone, vascolare, veterinaria

Tabella 2.2 : Caratteristiche della sonda lineare



Figure 2.4: setup sedia sensorizzata presso l'ospedale di parma a) BH L010 leg extension, b) cella di carico

Invece, per l'acquisizione dei dati svolta al laboratorio LISiN è stato usato il sistema Biodex System 4 Pro (Biodex Medical Systems, Shirley, New York) mostrato in Figura 2.5 e impostato sul funzionamento in modalità isometrica. In questo caso il sostegno della gamba corrisponde al braccio del dinamometro e la grandezza misurata dallo strumento durante la spinta non è la forza ma la coppia. In entrambe le sedi, la profondità e l'altezza della seduta e la lunghezza del supporto della gamba sono state adattate al soggetto, ed egli è stato immobilizzato con cinture o bande elastiche nella zona della vita e sulla gamba destra per minimizzare i movimenti relativi rispetto al sistema di acquisizione della sedia. Nella Tabella 2.3 sono riportati i parametri impostati sul Biodex per il caso specifico, seguendo il manuale dell'utilizzatore per il movimento di flessione estensione per il ginocchio. Inoltre, per l'utilizzo corretto del Biodex si è fatta attenzione alla corrispondenza tra il centro di rotazione del sostegno della gamba e il ginocchio. L'angolo di flessione del ginocchio di  $70^\circ$  è quello per cui si ha forza stimata per il VL massima, con i fascicoli alla lunghezza ottimale di  $78 \pm 2,7\text{mm}$  [52].

Durante questa seconda fase di contrazioni isometriche è acquisito il segnale elettromiografico ad alta densità (HD-sEMG) dal muscolo vasto laterale con due sistemi modulari, multicanale e wireless: Meacs Sensor Units (Figura 2.6, LISiN– Politecnico di Torino, Turin, Italia). Ogni sensore ha 32 canali di amplificazione per il segnale EMG monopolare ed esegue il condizionamento, il campionamento (2048 Hz) e la trasmissione wireless al software Bp (LISiN Politecnico di Torino, Turin, Italia) con una risoluzione di 16-bit (Tabella 2.4).

Orientamento del dinamometro	70°
Inclinazione del dinamometro	0°
Orientamento della sedia	90°
Inclinazione dello schienale	70-85°
Asse di rotazione	L'asse di rotazione è sul piano sagittale e attraversa il condilo femorale laterale
Posizione di partenza	Flessione incompleta, 110° flessione di ginocchio

*Tabella 2.3: Set-up del Biodex definito nel manuale per la flessione estensione del ginocchio*



*Figura 2.5: Biodex System 4 pro usato per estensione della gamba*

Ogni sistema di acquisizione è collegato ad uno dei due connettori della matrice bidimensionale, multicanale e adesiva con otto-per-otto elettrodi in argento (LISiN-Politecnico di Torino, Turin, Italia). Questa griglia infatti è composta da due sottomatrici da quattro-per-otto elettrodi affiancate l'una all'altra come mostrato in Figura 2.7, la distanza interelettrodotica è pari a 1 cm nella direzione maggiore e 2 cm nella direzione minore. Per la preparazione della griglia si usa un foam biadesivo che viene incollato sulla matrice in modo da presentare dei buchi corrispondenti agli elettrodi. Il passo successivo è riempire questi spazi, spessi 1 mm e lasciati vuoti dal foam, con una pasta conduttiva (AC CREAM, SPES Medica, Genova, Italia) per ottenere un contatto ottimale tra la cute e gli elettrodi. Il posizionamento della griglia sul muscolo è tale da coprire il decorso longitudinale del VL dal 20% al 60% della sua lunghezza avendo come riferimento l'inserzione distale nel ginocchio. Pertanto, il posizionamento finale risulta come in Figura 2.7 con la griglia disposta in modo parallelo alla direzione principale del muscolo, visionato tramite le immagini ecografiche nella fase statica. Si può notare che nella sottomatrice più prossimale è ricavata una zona libera dalla griglia, che non coinvolge nessuno degli elettrodi e che permette l'acquisizione delle immagini ultrasonografiche durante le fasi del protocollo che coinvolgono la flessione-estensione. In particolare, il centro della finestatura è posizionato sulla metà della lunghezza del muscolo, quindi in corrispondenza del suo 50% della distanza dal ginocchio.



Figura 2.6: Meacs Sensor Units creato presso il LISiN (Torino), visuale superiore sulla sinistra e visuale inferiore sulla destra



Figura 2.9 : DueBio, visione frontale, retro e laterale



Figura 2.8 : Elettro-goniometro

Numero di canali	32
Banda passante EMG	10 Hz - 500 Hz
ADC risoluzione	16 bit
CMRR	82 dB
Modulo di impedenza di ingresso	1,3 G (10 Hz) 13 M (1 kHz)
Guadagno	183 V/V $\pm$ 1 V/V
Range di input	10 mV
RTI Rumore	< 3 $\mu$ VRMS
Frequenza di campionamento	2048 sps
Comunicazione	Wi-Fi (2,4 GHz) – IEEE 802.11 a/b/g/n
Tipo di ricevitore	PC, Smartphone or Tablet
Massimo ritardo di sincronizzazione	$\pm$ 500 $\mu$ s (quando si usa il dispositivo hSync)
Massima distanza di trasmissione	15 m indoor (<0,02% dati persi)
Alimentatore	270 mAh 1-Cell LiPo batteria
Tempo di vita in modalità di trasmissione	3 h
Dimensioni	3.4 cm x 3 cm x 1.5 cm
Peso	16,7 g

*Tabella 2.4: Specifiche tecniche del Meacs Sensor Unit*

Per acquisire il segnale di forza della cella di carico nella sede di Parma si usa il dispositivo DueBio (OT Bioelettronica and LISiN, Turin, Italia. Figura 2.9 ) che invia automaticamente il segnale via Bluetooth al software Bp (LISiN– Politecnico di Torino, Turin, Italia).

Per controllare che durante le contrazioni isometriche la gamba non si muova e per avere un riferimento per le successive contrazioni dinamiche, si aggiunge un elettro-goniometro (Figura 2.8, Noris medical device, Ponte Taro di Noceto, Italia) lateralmente sulla gamba destra del soggetto.

Infine, per sincronizzare tutte le acquisizioni e rendere possibile l'analisi contemporanea dei dati si usa un impulso di sincronizzazione dato con il dispositivo hSync all'inizio e alla fine dell'acquisizione (LISiN Politecnico di Torino, Turin, Italia).

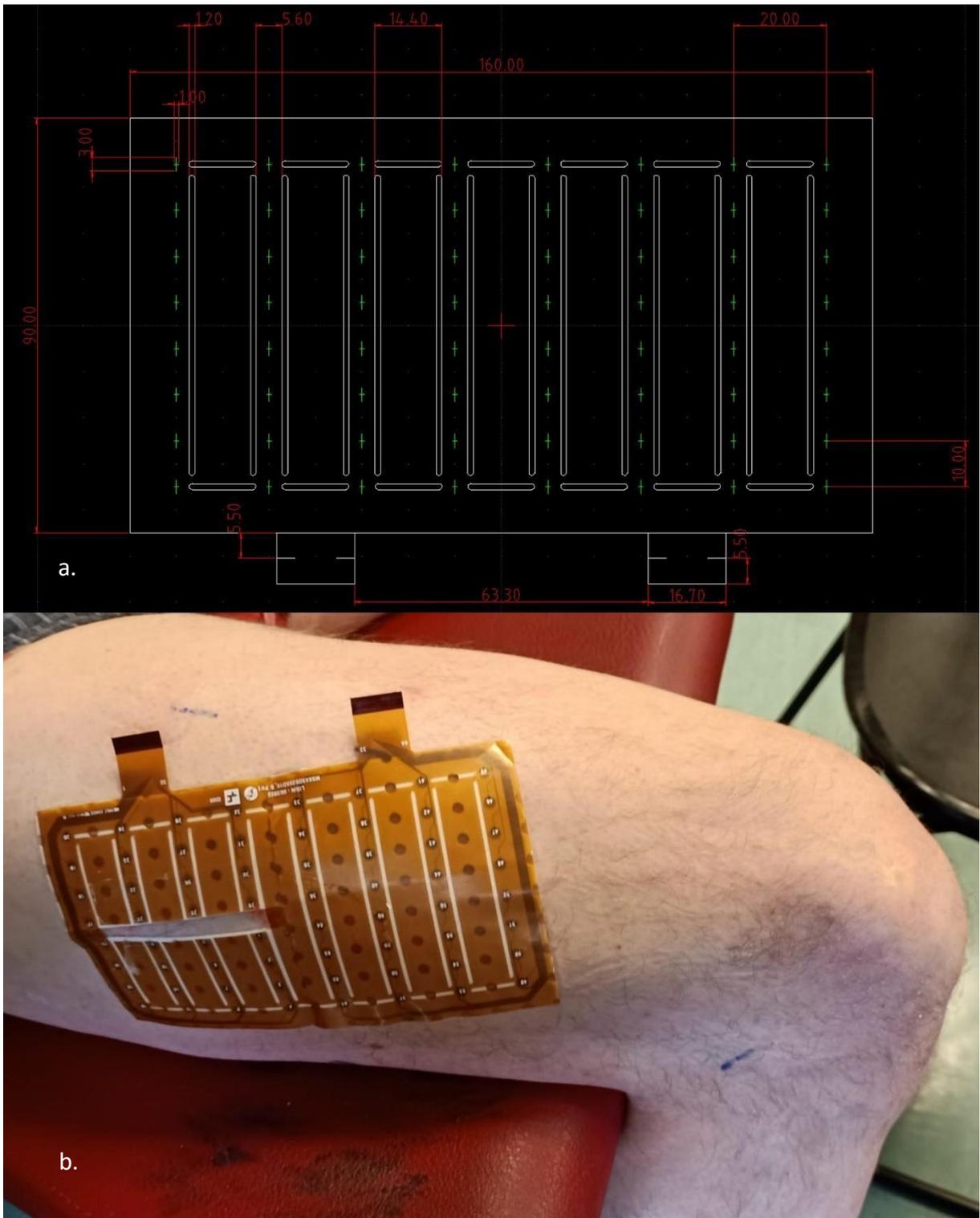


Figura 2.7: Matrice di elettrodi 8x8, a) disegno CAD della matrice in alto con misure in millimetri, b) posizionamento della matrice sul soggetto in basso

## 2.2 Analisi dei dati

Il presente capitolo descrive le procedure di analisi adottate per l'elaborazione e lo studio del segnale elettromiografico di superficie ad alta densità (HDEMG), con l'obiettivo di indagare le alterazioni neuromuscolari legate all'invecchiamento a livello delle unità motorie.

Il capitolo si articola in due sezioni principali.

Nella prima parte (par. 2.2), si illustrano in dettaglio le fasi di elaborazione del segnale HDEMG registrato durante contrazioni isometriche del muscolo vasto laterale, secondo il protocollo sperimentale descritto nel capitolo precedente. Dopo una descrizione iniziale delle operazioni di **preprocessing** e **decomposizione** del segnale, si passa all'**editing dei treni di scarica** delle unità motorie (MU), necessario per garantire l'accuratezza delle analisi successive. La sequenza di procedure descritta in questa sezione ha lo scopo di ottenere, a partire dal segnale HDEMG prelevato, le informazioni utili allo studio delle unità motorie, sia in merito alla modalità di attivazione delle MU da parte del sistema nervoso sia sulle proprietà elettrofisiologiche periferiche delle MU stesse.

La seconda parte (par. 2.3) è dedicata all'**analisi del comportamento delle MU**, organizzata in tre sottosezioni, ciascuna in linea con uno dei tre obiettivi principali della tesi.

L'organizzazione del capitolo riflette la progressione logica dell'indagine: dalla ricostruzione accurata del segnale elettromiografico, alla caratterizzazione del reclutamento e del controllo neuromuscolare in condizioni di forza crescente, fino all'analisi della resistenza a fatica, per esplorare in profondità gli effetti funzionali dell'invecchiamento sul sistema neuromuscolare.

### **2.2.1 Segnale elettromiografico multicanale**

I segnali EMG multicanale, acquisiti con il software BP durante le estensioni isometriche della gamba destra, sono analizzati offline utilizzando MATLAB (v. R2023a; The MathWorks, Natick, Massachusset, USA). In particolare, il cuore dell'analisi è svolto con DEMUSE (v. 4.1 and v. 5.01, System Software Laboratory, Faculty of Electrical Engineering and Computer Science University of Maribor, Slovenia) che è un programma commerciale implementato in MATLAB che permette la visualizzazione e la decomposizione (utilizzando la tecnica CKC [36]) di segnali elettromiografici multicanale di superficie.

L'obiettivo di questa analisi è estrarre tutte le informazioni relative alle unità motorie attive durante la contrazione del vasto laterale, sia in termini di controllo da parte del sistema nervoso centrale e della frequenza di attivazione, al fine di caratterizzare le MU dal punto di vista strutturale, funzionale e di attivazione spaziale, analizzando i relativi MUAPs.

I passaggi svolti per ottenere le informazioni utili ai fini dello studio sulle MU a partire dal segnale elettromiografico di superficie ad alta densità elettrodica, acquisito secondo le procedure descritte nel capitolo precedente, sono fondamentalmente tre e saranno approfonditi nei paragrafi successivi:

- 1. Preprocessing**
- 2. Decomposizione**
- 3. Editing della decomposizione**

### 2.2.1.1 Preprocessing

Il preprocessing rappresenta la fase iniziale dell'elaborazione dei segnali EMG multicanale di superficie e viene eseguito all'interno di una funzione di lettura, implementata come uno script MATLAB flessibile e adattabile alle diverse acquisizioni. Questa funzione, salvata nella cartella dedicata 'CKC\_readers', viene selezionata dall'utente al momento del caricamento e della visualizzazione dei segnali EMG nel software DEMUSE, restituendo in output una struttura dati contenente specifici campi predefiniti.

L'input di questa funzione è il percorso in cui sono stati salvati i file ".SIG" acquisiti da BP per una rampa isometrica e il nome del file selezionato. L'output invece è la struttura con i seguenti campi:

- **data.SIG**: un'array di celle bidimensionale in cui ogni cella corrisponde ad un canale EMG, facendo molta attenzione ad ordinarli all'interno della mappa seguendo la corrispondenza numerico-spaziale della loro disposizione.
- **data.fsamp**: la frequenza di campionamento (2048 Hz)
- **signal\_length**: la lunghezza del segnale in campioni.
- **montage**: un flag che indica se l'acquisizione sia stata fatta in modalità monopolare o singolo differenziale.
- **IED**: la distanza interelettrodo.
- **ref\_signal**: un segnale di riferimento nel tempo come il segnale di trigger dell'hSynk o il segnale di forza.
- **description**: il nome del file in input.

Per ordinare i segnali nella matrice bidimensionale SIG bisogna anche inserire i nomi dei MEACS che sono stati utilizzati, perché le acquisizioni a carico delle due sottomatrici devono essere concatenate spazialmente nel modo giusto e sincronizzate nel tempo tramite il segnale di trigger registrato da entrambi i dispositivi. Dopo il riallineamento dei canali delle due sottomatrici con il trigger, per precisione è aggiunto un secondo riallineamento considerando le 8 coppie di segnali a cavallo delle due sottomatrici. Per ogniuna delle coppie è calcolato il coefficiente di cross-correlazione su un secondo di segnale nella fase di plateau e poi, per la coppia con correlazione maggiore, si è calcolato il ritardo in campioni sfruttando l'allineamento dello spettro con il metodo di Newton per la minimizzazione dei minimi quadrati.

Dopo il riallineamento si continua con l'eliminazione della frequenza di rete (50Hz) e delle sue sette armoniche multiple con un filtro rigetta-banda di Butterworth di ordine 6. Invece, il resto del preprocessing è implementato direttamente nella finestra principale di DEMUSE (Figura 2.10) che comprende un filtro passa banda di secondo ordine con frequenza di taglio di default pari a 20-500 Hz e una operazione di differenza tra campioni successivi che ha un effetto passa-alto, al fine di aumentare la capacità di discriminazione tra i potenziali di azione di unità motorie diverse. DEMUSE offre, inoltre, strumenti per testare la presenza di artefatti da movimento o da instabilità del contatto elettrodo-cute, e consente di escludere automaticamente i canali ritenuti di bassa qualità, mantenendo per impostazione predefinita solo il 95% dei canali migliori. Tuttavia, per i segnali acquisiti in questo studio si è ritenuto preferibile adottare un approccio più rigoroso, optando per la selezione manuale dei canali da escludere. Tale scelta, abilitata tramite l'opzione "manual chs selection", ha previsto un'attenta ispezione visiva dell'attività registrata su ciascun canale lungo l'intera durata della prova, con esclusione mirata di quelli con evidenti artefatti o segnali anomali, selezionandoli direttamente dalla griglia rettangolare che rappresenta la matrice degli elettrodi.

Infine, prima di procedere con la decomposizione delle unità motorie, sono stati impostati i parametri di default per il numero massimo di run (50), e definiti manualmente l'istante iniziale e la durata del segmento di segnale da analizzare.

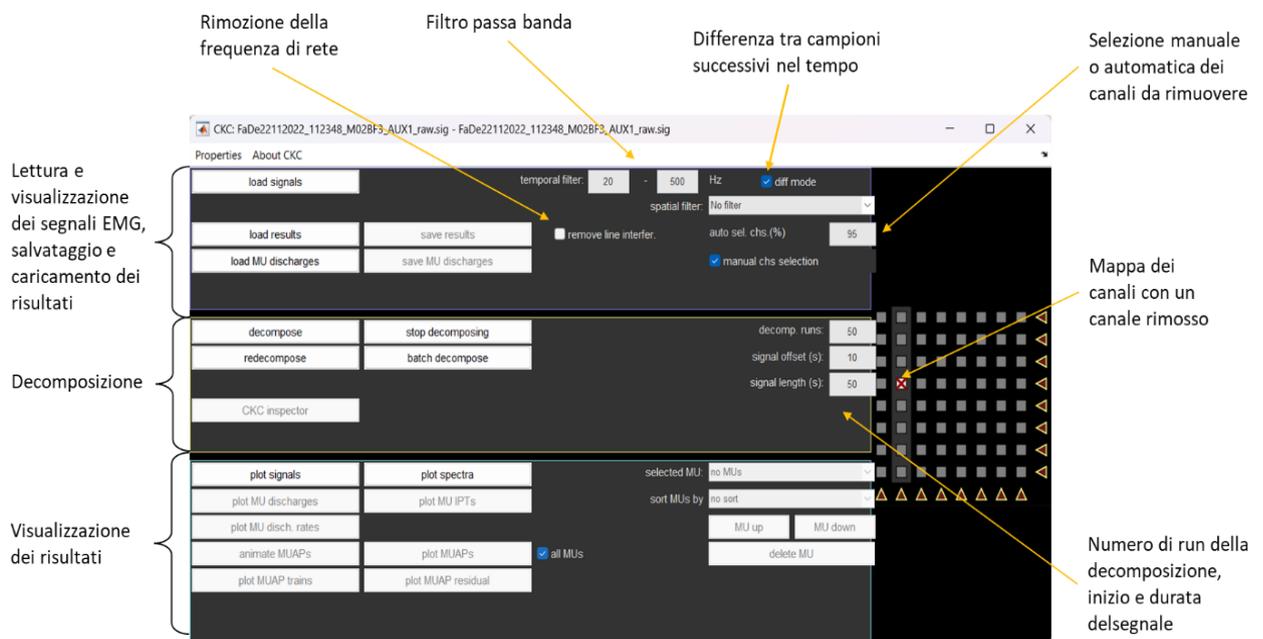


Figura 2.10: Finestra principale di DEMUSE e parametri di inizializzazione

### 2.2.1.2 Decomposizione del segnale elettromiografico

La decomposizione viene lanciata, dopo aver valutato visivamente la qualità del segnale (Figura 2.11) e del suo preprocessing, cliccando sul tasto *decompose*. Il numero delle runs decrementa fino alla conclusione del processo che è completamente automatico e implementa il gradiente del kernel di convoluzione compensato [36] (gradient Convolution Kernel Compensation, gCKC) per ottenere il treno di potenziali d'azione per ogni unità motoria identificata.

Si visualizzano i risultati della decomposizione graficando i potenziali di azione delle unità motorie (MUAPs) ottenuti facendo, per ogni canale, la media di tutti i potenziali d'azione in una finestra temporale (10ms) nell'intorno dello sparo (spike) che attiva l'unità motoria (Figura 2.13), e il pattern totale dei treni di spari di attivazione (Figura 2.12).. Per interpretare meglio i risultati è importante togliere l'opzione *diff mode* che viene usata durante la decomposizione e aggiungere un filtro spaziale, ottenendo il segnale singolo differenziale (SD) bifasico e senza modo comune. Quest'ultimo passaggio è effettuato facendo la differenza tra i segnali lungo le righe dove si ha il decorso principale delle fibre del VL, dunque la propagazione del potenziale d'azione. Tramite visualizzazione dei primi risultati grezzi si individuano rapidamente se sono presenti MU sbagliate, cioè con una forma del potenziale d'azione non coerente con la forma teorica di propagazione di un'onda bifasica nel muscolo a cui corrisponde un altrettanto incoerente treno di spari di attivazione. Successivamente si prosegue con il raffinamento di questi output grezzi tramite il processo di editing.

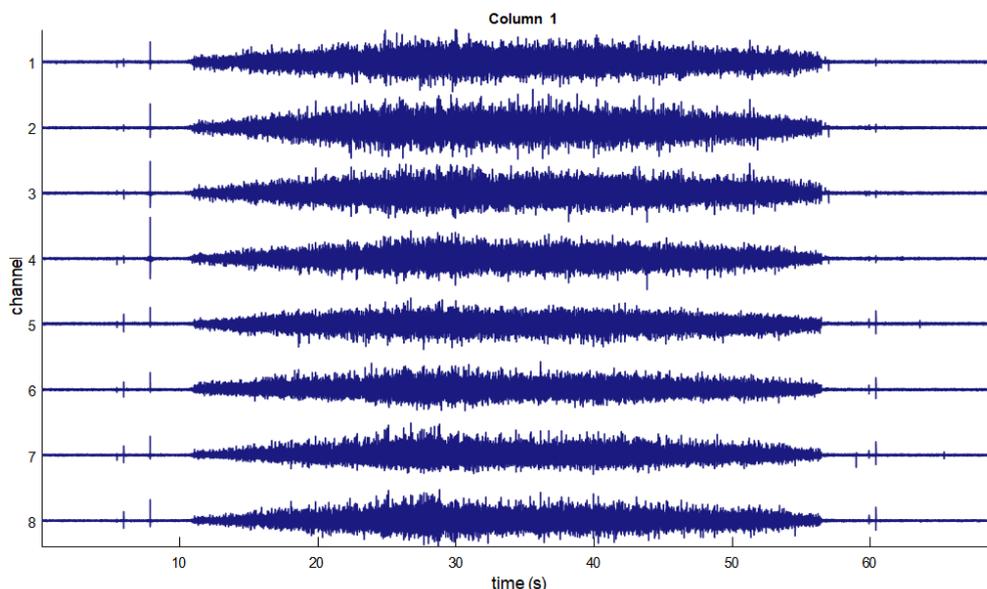


Figura 2.11: Esempio di visualizzazione dei segnali EMG per valutarne la qualità in ogni canale. Prima colonna della griglia di elettrodi, in posizione laterale.

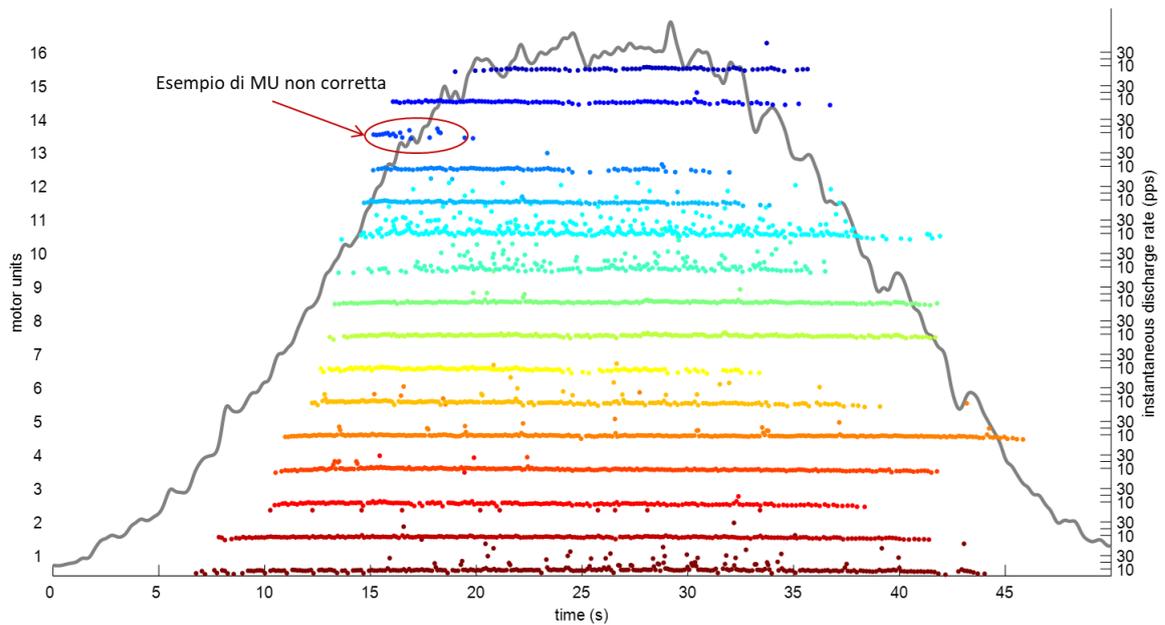


Figura 2.12 : Esempio di grafico con i firings patterns (frequenza di sparo istantanea in impulsi al secondo, PPS) di ogni unità motoria nel tempo

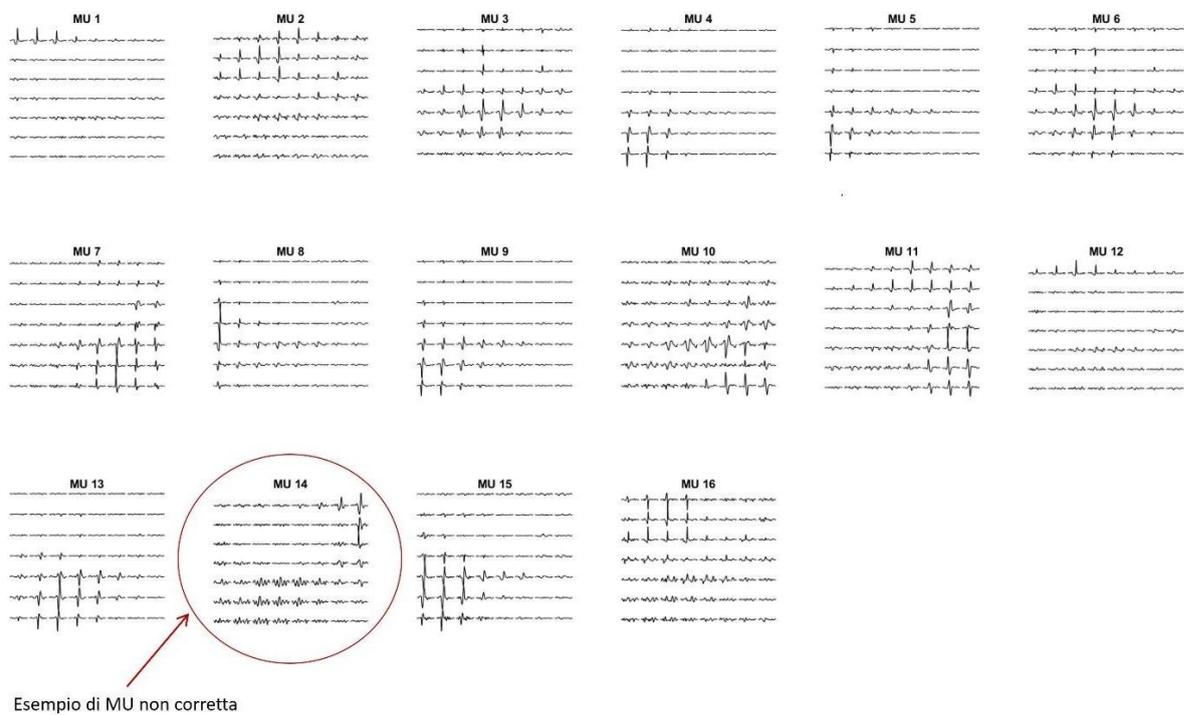


Figura 2.13 : Esempio di grafico con i MUAPs multicanale per tutte le unità motorie

### 2.2.1.3 Editing della decomposizione

Il processo di Editing consiste nel controllo e nel miglioramento dei risultati grezzi ottenuti dall'utilizzo del gradiente CKC seguendo le indicazioni teoriche descritte nel tutorial di Del Vecchio [49]. Questo passaggio richiede molto tempo ed esperienza di utilizzo da parte dell'utente ed è stato svolto con DEMUSE v 5.01 che ha più funzionalità rispetto alla versione 4.1. Per fare ciò, bisogna accedere alla finestra del *CKC inspector* che analizza una sola MU per volta e che si divide in tre sezioni: il pannello superiore che raffigura i MUAPs multicanale, quello centrale che raffigura la frequenza di sparo istantanea (instantaneous discharge rate, IDR) con il grafico a punti sovrapposto al segnale di forza di riferimento, e quello in basso che rappresenta il treno di impulsi della MU (innervation pulse train, IPT) Figura 2.14. L'obiettivo generale è quello di ottenere un IPT che sia coerente con le conoscenze teoriche e con l'andamento della forza come si vede in Figura 2.15. Inoltre, è importante visualizzare un profilo omogeneo di IDR, con particolare attenzione per la parte iniziale del treno di spari in modo che coincida con il reclutamento della unità motoria.

I passaggi principali eseguiti per ogni MU sono:

- Applicazione della soglia massima di IDR pari a 30 Hz come in altri esperimenti svolti sul VL [54], [55], poiché spari a distanza inferiore a 33,3 ms o superiore a 250 ms l'uno dall'altro portano ad una frequenza di sparo istantanea non fisiologica, o troppo alta (>30 Hz) o troppo bassa (<4Hz).
- Eliminazione di spari di scarsa qualità perché sono troppo disomogenei dalla IDR media.
- Analisi dell'inizio della contrazione con aggiunta dei primi spari che denotano il reclutamento dell'unità motoria. Si deve porre particolare attenzione alla forma di ogni MUAP iniziale graficandolo sovrapposto al MUAP medio, nel pannello superiore spuntando il flag *plot EMG*. Si può vedere un esempio di questo nel riquadro bianco in Figura 2.16.
- Analisi della restante parte della contrazione individuando eventuali spari mancanti, non identificati dal solo metodo automatico. Si può vedere un esempio di questo nel riquadro giallo in Figura 2.16.

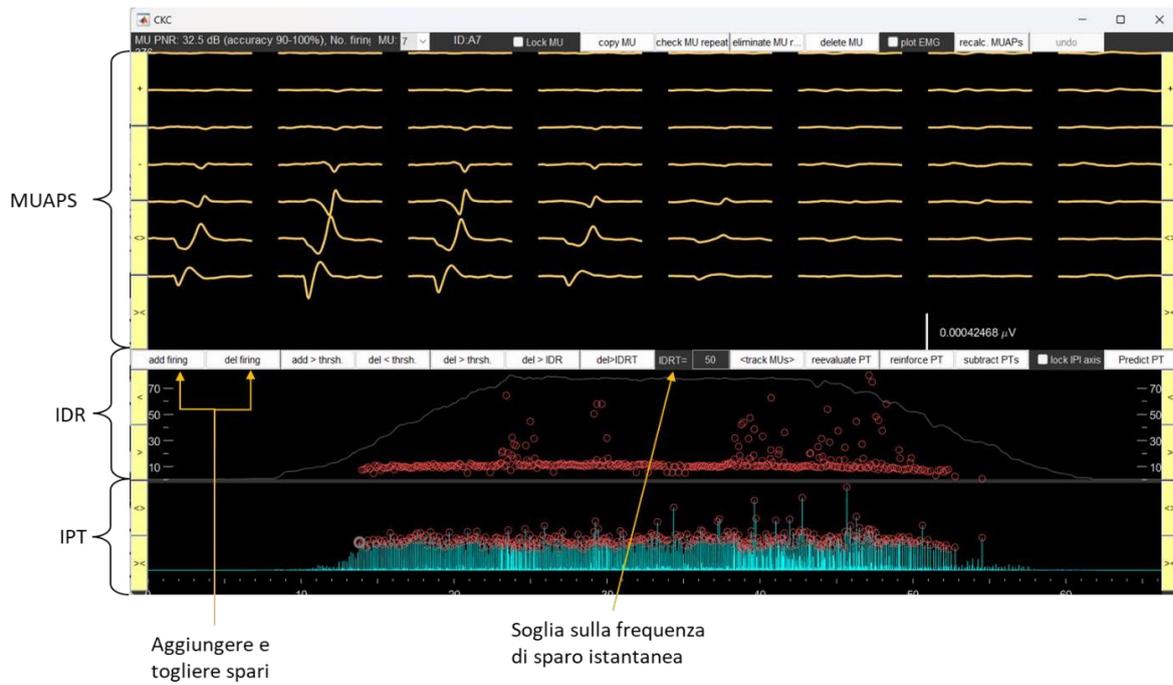


Figura 2.14: CKC inspector: visualizzazione dei MUAP, della frequenza di sparo istantanea (IDR) e del treno di spari (IPT). Messa in evidenza di alcuni dei comandi più comunemente usati durante la fase di editing

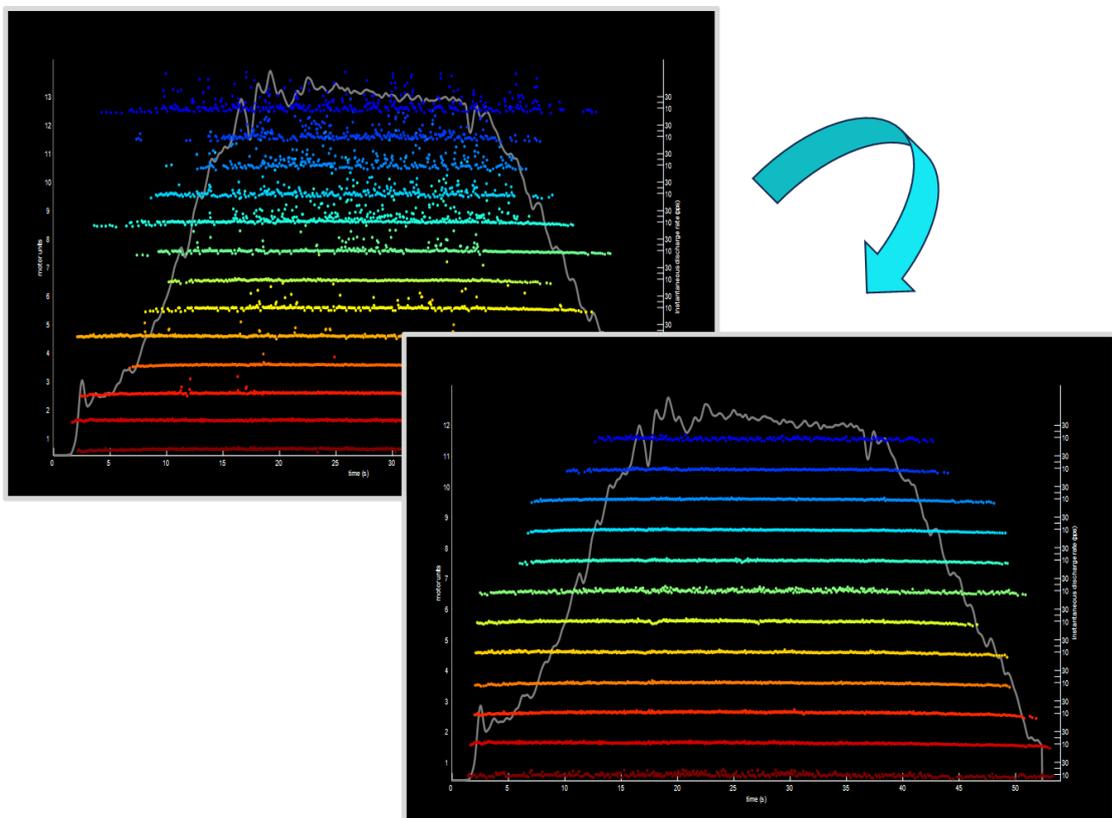


Figura 2.15: Risultato del processo di editing di una contrazione 30% MVC

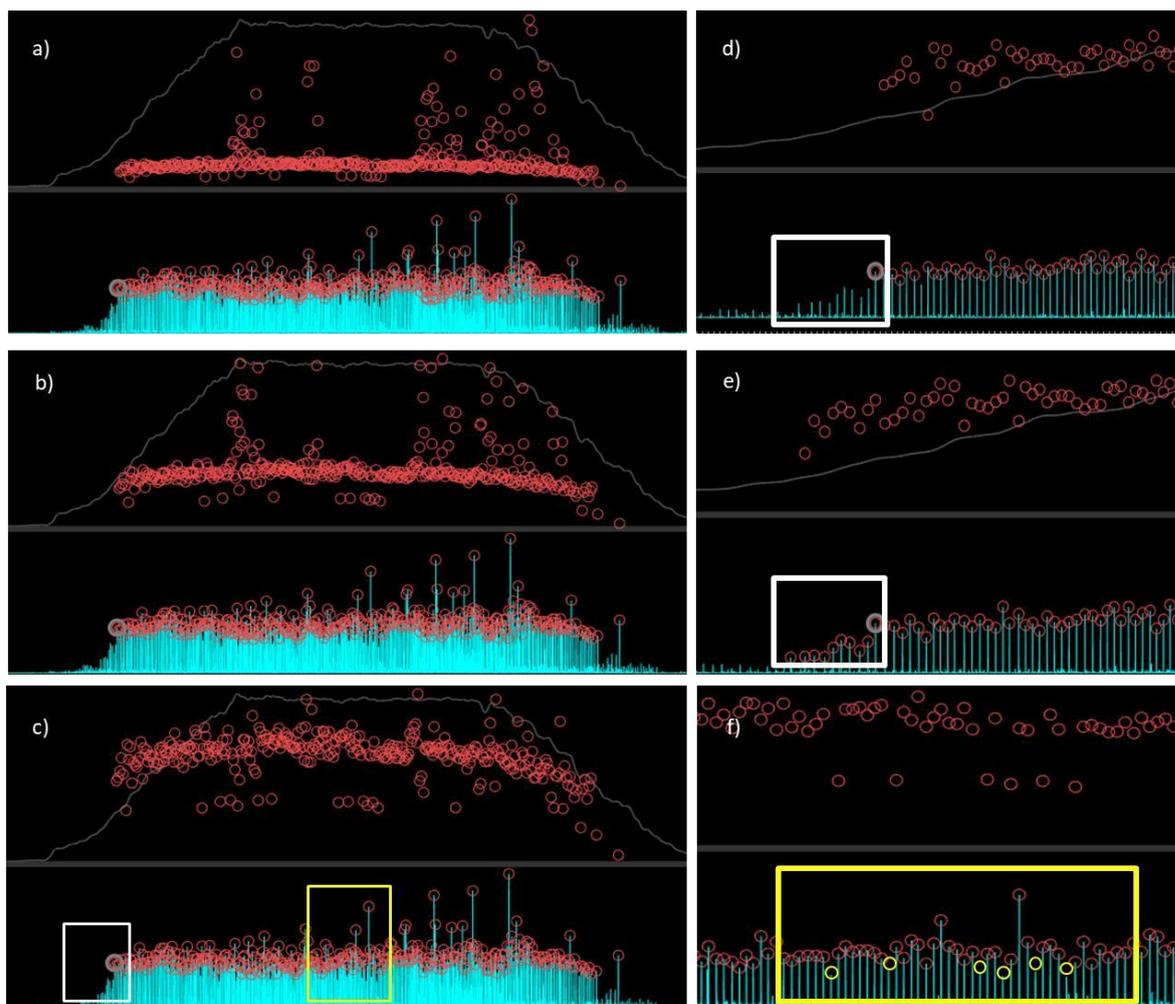


Figura 2.16 : Esempio di processo di editing: a) situazione di partenza, b) soglia IDR <30 Hz, c)eliminazione di spari disomogenei rispetto all'andamento medio della IDR e identificazione delle aree da analizzare più in dettaglio, d) analisi della fase iniziale della contrazione con focalizzazione degli spari da aggiungere nel riquadro bianco, e) risultato dell'aggiunta degli spari che definiscono il reclutamento della MU, f) aggiunta di spari (cerchi gialli) nella zona evidenziata dal riquadro giallo in cui si vede del vuoto dell'IPT con conseguente calo sporadico della IDR.

## 2.3 Analisi del comportamento delle MU

L'analisi del comportamento delle MU si articola in 3 sezioni principali, finalizzate ad indagare i 3 macrobiettivi dello studio:

1. Analisi longitudinale delle caratteristiche delle MU appartenenti ai due gruppi di età (PRM e PRO) nei 3 time points successivi (T0, T1 e T2) e per due livelli di forza (30% MVC e 50% MVC)
2. Analisi della variazione di forza nel tempo rispetto alla relativa variazione del firing rate delle MU nei due gruppi di età (PRM e PRO)
3. Analisi del comportamento a fatica delle MU in 3 gruppi di età (TOY, PRM e PPRO) per un livello di forza pari al 50% MVC.

### ***2.3.1 Analisi delle caratteristiche delle MUs in contrazioni "a rampa"***

In questa sezione si indagano le caratteristiche delle MU, relativamente alle contrazioni "a rampa", considerando quindi i due livelli di forza distinti (30% MVC e 50% MVC) per ciascuna delle 3 sessioni di acquisizione nell'arco dell'anno di osservazione. Pertanto, si focalizza su eventuali differenze tra i due gruppi dal punto di vista dello sviluppo longitudinale e in condizioni di forza diverse.

Si distinguono due momenti fondamentali della contrazione: la fase ascendente o di reclutamento (evidenziati in Figura 2.16), nel corso della quale il soggetto incrementa lentamente (con un aumento del 2%/s) la sua forza seguendo la rampa trapezoidale fino a raggiungere il livello di forza target (30% o 50% MVC), e la fase di tenuta o plateau, nella quale si mantiene costante per 15s il livello di forza raggiunto.

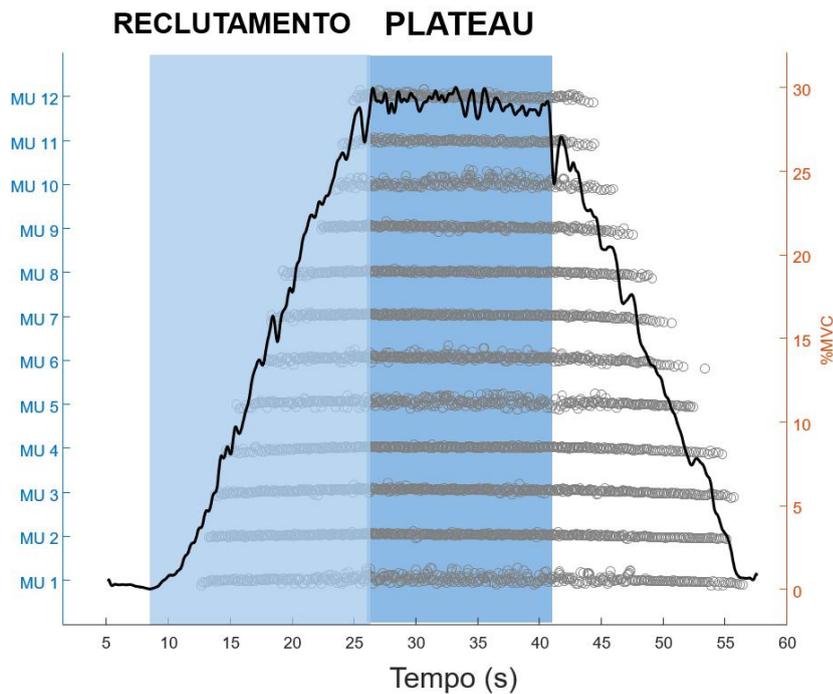


Figura 2.16 : Fase ascendente del profilo di forza (o di reclutamento) con incremento pari al 2%/s e fase di tenuta (o plateau) della durata di 15 s al 30% MVC

Nella fase di tenuta sono state analizzate le seguenti variabili:

- Numero di MU detectate
- Firing rate medio
- Coefficiente di variazione del firing rate
- Activation width

L'inter spike interval (ISI) è definito come la differenza temporale tra due spari successivi.

Il **firing rate medio** di ogni MU è stato calcolato come l'inverso dell'intervallo inter-spike per la frequenza di campionamento, ottenendo così la frequenza di sparo istantanea (istantaneous discharge rate, IDR), e poi mediando nei 15s dall'inizio alla fine della fase di tenuta.

Il **coefficiente di variazione (CoV) del firing rate** è stato calcolato come la deviazione standard della frequenza di sparo istantanea sulla media.

$$CV_{IDR}(\%) = \left( \frac{\sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (IDR_i - \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N IDR_j)^2}}{\frac{1}{N} \sum_{j=1}^N IDR_j} \right) \times 100$$

In aggiunta alle informazioni relative alla frequenza di sparo delle MU, si hanno le informazioni periferiche riguardanti i territori di attivazione tramite l'analisi dei MUAPs in modalità singolo differenziale. Secondo questo diverso punto di vista si procede ottenendo il MUAP medio per ogni canale partendo dal segnale singolo differenziale, dopo il filtraggio passa-banda (banda compresa tra 20Hz e 500Hz), ed estraendo il potenziale d'azione in una finestra temporale di 60ms centrata su ogni impulso di contrazione. In questo modo per ogni MU si calcolano 56 potenziali d'azione, uno per ogni canale, che definiscono la mappa spaziale della singola unità e permettono di valutare metriche di ampiezza come il Root Mean Square (RMS). Questo consiste nella radice quadrata della media dei quadrati, rappresenta la radice quadrata della potenza media del segnale EMG e si calcola secondo la seguente formula:

$$\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{n=0}^{N-1} EMG [n]^2}$$

Si usa questa informazione per descrivere visivamente, in scala cromatica, la distribuzione spaziale della attivazione della MU sull'area della griglia come in Figure 2.17 a. Da essa si ottiene una mappa binaria imponendo una soglia minima di attivazione per ogni MU pari al 70% del massimo del valore RMS. Tramite questa mappa binaria Figure 2.17 b, in cui il bianco corrisponde alla zona attiva della mappa, si trovano altre grandezze come le coordinate del baricentro, la percentuale di area attivata rispetto al totale e la larghezza dell'area attivata (**Activation width**) in direzione medio-laterale. Quest'ultima in particolare è l'informazione più significativa in termini di descrizione della grandezza della unità motoria reclutata, poiché in direzione prossimo-distale le fibre sono pennate e questo influisce sulla proiezione dell'area di attivazione sulla cute.

La larghezza dell'area di attivazione viene espressa in cm moltiplicando il valore in pixel ottenuto dalla mappa RMS binarizzata per il fattore di scala  $7/80$  (deriva dalla dimensione fisica della griglia di elettrodi, ossia 8 colonne con distanza inter-elettrodica di 1cm, e dagli 80 pixel di larghezza della mappa RMS).

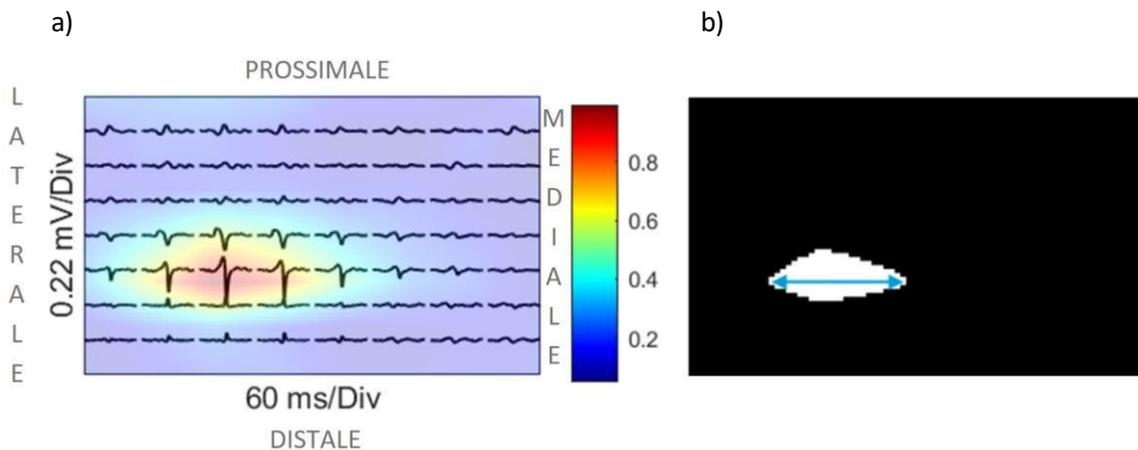


Figure 2.17: a) Mappa di attivazione della MU ottenuta dal segnale SD con raffigurazione dei MUAPs [mV] e del valore RMS normalizzato in scala cromatica che va dal blu al rosso, b) Maschera binaria della mappa di attivazione con soglia minima di attivazione pari al 70% del valore massimo di RMS. La freccia blu indica la larghezza dell'area attiva in direzione medio-laterale

Passando alla fase ascendente<sup>1</sup>, si analizza il reclutamento muscolare per intervalli di forza crescente.

Nel trattare questo aspetto si fa fortemente riferimento allo studio di Watanabe et al. del 2016 in merito al cambiamento della frequenza di sparo delle unità motorie del vasto laterale dovuto all'età [10].

In primis viene suddivisa la rampa di forza in intervalli e vengono individuate le MU reclutate per questi diversi livelli per i due range di età. Si considerano solo le rampe a 50% dell'MVC, in quanto una variazione di forza importante permette di individuare meglio diversi livelli di reclutamento. Dunque si distinguono cinque intervalli di forza suddivisi come in Figura 2.18 : <10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%.

Infine, si individuano gli istanti in cui si verifica il passaggio da una fascia di forza ad un'altra per usarli nello studio del cambiamento del IDR di ogni MU all'aumentare dell'intensità della contrazione. Per ogni gruppo di MU si valuterà la IDR in momenti successivi della fase ascendente della rampa. Per esempio, per le unità motorie rosse reclutate all'inizio della contrazione isometrica a 50% dell'MVC (Figura 2.18), si valuta la frequenza di sparo per i cinque

<sup>1</sup> NOTA: Questa fase viene comunemente definita "di reclutamento", tuttavia si preferisce denominarla fase ascendente – dal punto di vista della forza – in quanto è possibile che alcune unità motorie vengano reclutate anche durante la fase di tenuta, soprattutto nelle contrazioni affaticanti. In ogni caso, facendo riferimento alle contrazioni a rampa, verranno utilizzate indistintamente entrambe le definizioni.

livelli di forza successivi (0-10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%), per quelle blu reclutate nella seconda fascia di contrazione si valuta la IDR per i quattro livelli di forza successivi e così via per le altre fasce, ciascuna valutata nell'intervallo relativo di reclutamento e nei successivi.

Mantenendo la suddivisione nelle 5 fasce di reclutamento, è stato poi valutato anche il comportamento nella fase di tenuta, calcolando firing rate medio e CoV del firing rate per i 2 gruppi.

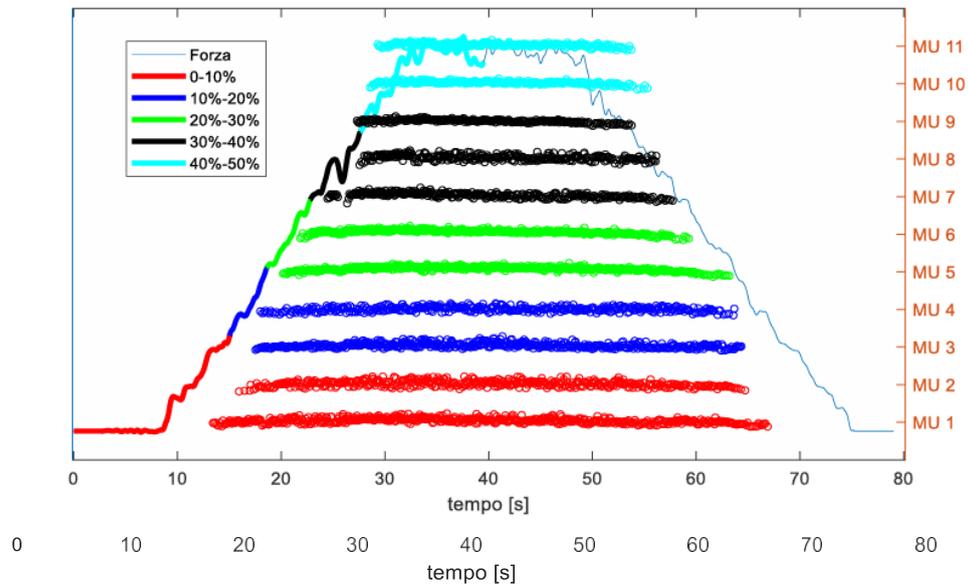


Figura 2.18: Suddivisione delle unità motorie in cinque intervalli di attivazione in base alla percentuale di MVC per cui vengono reclutate. Esempio di suddivisione in una contrazione isometrica con profilo trapezoidale e plateau pari al 50% del MVC.

### **2.3.2 Analisi delle variazioni di firing rate rispetto alle variazioni di forza**

Il macro-obiettivo di questa sezione è indagare il **neural drive-to-muscle gain**, stimato dalla relazione tra le variazioni di forza ( $\Delta$ FORCE, ovvero output muscolare) rispetto alle variazioni di MU DR ( $\Delta$ DR, ovvero input neurale).

Per l'impostazione dell'analisi si fa riferimento allo studio di Casolo-Del Vecchio del 2021 [89].

Si considerano le prove relative ad entrambi i livelli di forza (30% e 50% MVC) per ogni time-point (T0, T1 e T2).

Vengono prese in esame le variazioni di forza sia normalizzate (in termini di percentuali di MVC), sia in termini assoluti (N\*m). Pertanto, il primo oggetto di interesse è l'MVC, calcolato come il valore massimo registrato tra le 3 acquisizioni per ogni sessione. Vengono attenzionate eventuali differenze tra i 2 gruppi (PRM e PRO) e all'interno di uno stesso gruppo tra le diverse sessioni, dal punto di vista dello sviluppo longitudinale.

Il guadagno di impulso neurale al muscolo è stato stimato calcolando la variazione di forza dal reclutamento alla fase di plateau delle contrazioni di rampa submassimali ( $\Delta$ FORCE), in funzione della variazione di firing rate delle MU dalla fase di reclutamento alla fase di plateau ( $\Delta$ DR). In questo modello, il  $\Delta$ DR fornisce una stima indiretta dell'aumento dell'impulso neurale al muscolo (ovvero, input neurale), mentre il  $\Delta$ FORCE fornisce una misura del corrispondente aumento della forza generata (ovvero, output muscolare). Eventuali differenze nella relazione  $\Delta$ FORCE rispetto a  $\Delta$ DR tra i due gruppi potrebbero implicare un contributo distinto di fattori neurali e morfologici alla generazione di forza volontaria in età differenti.

Per valutare, quindi, tale guadagno input-output vengono considerate le seguenti variabili per ogni MU:

- **soglia di reclutamento (MU RT)**: valore di forza in termini assoluti (MU RT assoluto, N) o in termini normalizzati (MU RT normalizzato, % MVC) al quale è stato scaricato il primo potenziale d'azione
- **firing rate nella fase di reclutamento (MU FR di reclutamento)**: calcolato come la media del firing rate dei primi 5 spari nella fase ascendente della rampa
- **firing rate nella fase di plateau (MU FR di plateau)**: DR medio sulla fase di forza costante

Da qui è possibile calcolare:

- $\Delta$  **FORCE** come differenza tra il valore della forza nella fase di tenuta e MU RT (normalizzata o assoluta)
- $\Delta$  **FR** come differenza tra MU FR di plateau e MU FR di reclutamento

Per ogni soggetto di ciascun gruppo è stato poi estratto il tasso di variazione della forza in funzione di MU DR, ossia la pendenze della retta di regressione, sia in valori assoluti (N) che normalizzati (% MVC) e i relativi coefficienti di correlazione di Pearson (R).

### **2.3.3 Analisi della resistenza a fatica**

Si considerano ora esclusivamente le prove affaticanti al 50% MVC, in particolare nella loro fase di tenuta, che ovviamente avrà una durata variabile da soggetto a soggetto.

Poichè il presupposto delle successive valutazioni relative al comportamento a fatica delle MU è che il soggetto stia esprimendo una forza il più possibile costante, è necessario verificare che la forza non diminuisca eccessivamente durante la fase di tenuta.

Dopo aver ispezionato visivamente gli andamenti della forza nel plateau in termini di variazione relativa rispetto al primo secondo della fase di tenuta, come è possibile constatare in fig. , è emersa una variazione importante in alcune prove, che ha reso necessario ridefinire il termine della contrazione a forza costante rispetto alla durata effettiva.

Pertanto, nel caso in cui sia stata rilevata una variazione relativa superiore al 10% rispetto al valor medio registrato nei primi 10 secondi della fase di plateau, è stata considerata come fase di tenuta quella che inizia al raggiungimento del plateau e termina un secondo prima che la variazione relativa della forza superi il 10%.

Sono state poi escluse dall'analisi le prove nelle quali la durata così ottenuta risulta inferiore a 30s, poichè troppo brevi per essere considerate effettivamente contrazioni ad esaurimento.

In questo modo, sono state ottenute 9 o 10 prove a forza costante per ogni gruppo in ciascun time-point, con variazioni relative della forza rispetto al secondo iniziale nella maggioranza dei casi inferiori al 5% (fig).

Si procede valutando gli andamenti di 3 variabili principali nelle contrazioni affaticanti: **firing rate**, **CoV del firing rate** e **CoV della forza**. Per una maggiore stabilità, i valori ottenuti da ogni MU sono

stati mediati su una finestra temporale di un secondo e, per poter mediare e confrontare gli andamenti di diverse MU appartenenti ad uno stesso soggetto o a soggetti distinti, è stata divisa la durata della prova a forza costante in 10 intervalli temporali normalizzati con una durata pari al 10% del tempo fino al fallimento del compito (dal 10 al 100% del tempo fino al fallimento del compito con incrementi del 10%), come mostrato in Figura 2.19, calcolando in valore medio e la deviazione standard in ogni intervallo per ciascuna variabile. Si ottengono, in questo modo, i **fatigue plot** nei quali è possibile valutare gli andamenti delle 3 variabili per i 3 gruppi di soggetti dall'inizio della fase di tenuta alla fine della fase a forza costante, definita come descritto precedentemente (l'inizio corrisponde allo 0% e la fine al 100% per ciascuna MU). E' importante precisare che, a differenza di altri studi su contrazioni affaticanti, in quest'analisi si tengono in considerazione esclusivamente le MU attive dall'inizio alla fine della fase di tenuta, escludendo eventuali unità motorie reclutate nel plateau.

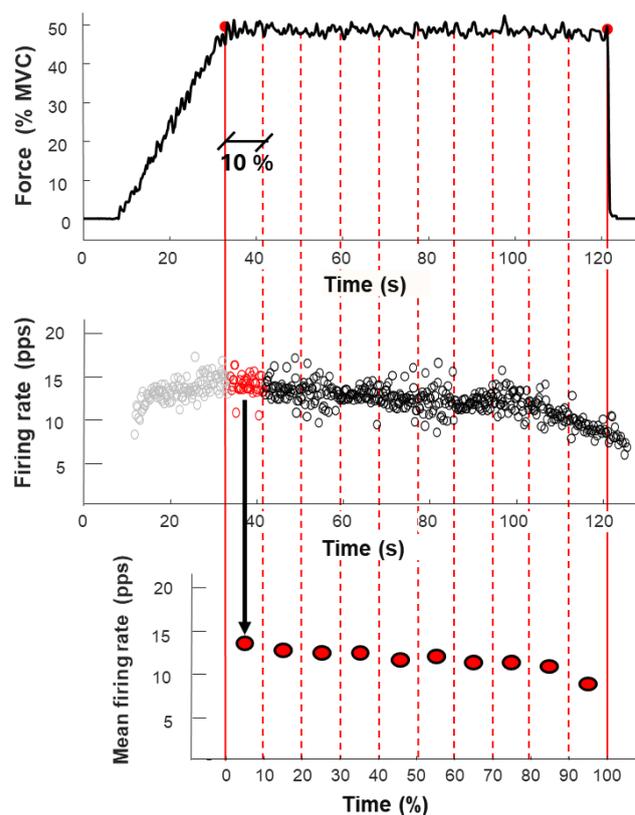


Figura 2.19: Calcolo del firing rate medio su intervalli pari al 10% dalla durata della prova (0% coincide con l'inizio del plateau e 100% con il fallimento della prova)  
 Nell'immagine in alto si vede come dal profilo di forza siano stati calcolati gli istanti di inizio e fine del task.  
 Nell'immagine centrale, sono stati individuati i valori puntuali di firing rate all'interno di ciascun intervallo %  
 Infine, viene calcolato un singolo valore medio di firing rate per ciascun intervallo %, ottenendo il firing rate definito per tutte le MU su 10 punti indipendenti dalla durata della prova, che viene così normalizzata

Gli andamenti medi così ottenuti, tuttavia, soffrono di una limitazione: non viene tenuta in considerazione l'affettiva durata di ciascun intervallo temporale nel quale si valuta la variabile (il 10% della durata della fase di tenuta per un soggetto potrebbe corrispondere a pochi secondi mentre per un altro a diverse decine di secondi). E' necessario individuare un metodo che consenta di produrre delle stime continue, uniformi e informative dei profili di scarica delle MU e che permetta di quantificare e visualizzare i contributi di ampie popolazioni di MU in "ensemble", ottenendo tracce medie dei tassi di scarica. Per ensemble si intende sottopopolazioni di MU separate da una metrica di interesse, in questo caso la soglia di reclutamento delle MU che le colloca in una delle 5 fasce (0-10%,10-20%,20-30%,30-40%,40-50%); quindi l'ensemble rappresenta il comportamento medio delle MU all'interno della sottopopolazione di appartenenza.

Ad oggi, questo è un problema aperto, in quanto non esiste un metodo concordato e comunemente utilizzato per ottenere tali stime, ma è fondamentale adottare un approccio che limiti il più possibile la distorsione degli andamenti per evitare il rischio di influenzare considerevolmente i risultati ottenuti soprattutto nell'estrazione di metriche fisiologicamente rilevanti dai profili di scarica. Facendo riferimento all'articolo di Beuchamp del 2022 [95], sono stati vagliati diversi metodi comunemente utilizzati:

- Filtraggio con finestra di Hanning: ogni treno di picchi di MU binarizzato viene filtrato con una finestra di Hanning di lunghezza di 1 s.
- Regressione polinomiale: il firing rate istantaneo di ciascuna MU viene adattato con una funzione polinomiale di 5° e 6° grado.
- **Regressione vettoriale di supporto (SVR):** la SVR è una tecnica di regressione non lineare derivata dalle Support Vector Machines (SVM), progettata per stimare una funzione che approssima i dati entro un margine di tolleranza  $\epsilon$ . Come la classificazione con macchine a vettori di supporto, la SVR impiega molti degli stessi principi, tra cui l'uso di kernel per rappresentare i dati in uno spazio di dimensione superiore, un iperpiano che separa i punti dati in questo spazio di dimensione superiore e un margine attorno a questo iperpiano. La SVR è stata implementata mediante una funzione integrata di Matlab *fitrsvm* per addestrare un modello SVR con minimizzazione del margine morbido L1. Per ciascuna MU, i dati di training includevano le stime della portata di scarica istantanea e i corrispondenti intervalli di tempo. Dopo l'addestramento, la funzione predict di MATLAB è stata usata per generare stime continue della frequenza di scarica calcolate su un vettore temporale uniforme di previsione dal reclutamento della MU al termine della fase di tenuta o solo nella fase di tenuta, campionato a 2048 Hz e di lunghezza predefinita. L'SVR è stato preferito agli altri metodi in quanto , grazie alla sua capacità di ponderare in modo

indipendente le osservazioni e di regolare gli iperparametri per ottimizzare l'adattamento, permette una maggiore accuratezza: evita effetti di distorsione in fase di reclutamento e dereclutamento introdotti dagli effetti di bordo della finestra di Hanning e riduce l'inutile smoothing introdotto dall'adattamento con funzioni polinomiali.

Dopo aver osservato gli andamenti del firing rate delle MU suddivise in fasce di reclutamento, sia nelle medie sui 10 intervalli che sfruttando l'SVR, si vuole quantificare la variazione della frequenza di sparo nella fase di tenuta mediante una metrica che permetta di confrontare gli andamenti delle diverse MU e degli ensemble. Per questo scopo si introduce lo **slope normalizzato**: variazione percentuale del firing rate al secondo normalizzata sull'intercetta della retta di regressione.

Lo slope normalizzato fornisce una misura dell'affaticamento a livello delle singole MU, come descritto da Merletti in una pubblicazione del 1990 [69] e nel libro *Elementi di elettromiografia di superficie* [66]. Tuttavia, il procedimento adottato in questo studio si discosta da quanto riportato nei suddetti lavori, in quanto, invece di considerare la pendenza di una retta di regressione ai minimi quadrati sui primi  $n$  secondi di ciascun set di dati, scegliendo  $n$  in modo arbitrario e invariante per tutte le MU, si è preferito adottare un metodo che permettesse di adattare l'intervallo di stima della regressione all'andamento del FR delle singole MU e che non si limitasse alla sola fase iniziale; tale metodo verrà dettagliato di seguito.

Per poter calcolare lo slope è necessario rettificare linearmente l'andamento del firing rate per ottenere il coefficiente angolare e l'intercetta della retta di regressione lineare. Tuttavia questo procedimento è adatto ad un segnale monotono, ma dall'ispezione visiva dei segnali delle singole MU e delle fasce risulta evidente che in alcuni casi si hanno degli andamenti del firing rate bifasici. Per questi ultimi è opportuno individuare il punto nel quale il comportamento dell'unità motoria cambia, che viene definito come **breakpoint**, e considerare le due fasi (prima e dopo il breakpoint) ottenendo due rette di regressione lineare, in quanto una singola non sarebbe sufficiente a rappresentare il decorso.

Partendo dal firing rate di ciascuna MU mediato su epoche di 1s è stato applicato il seguente procedimento con l'obiettivo di identificare un breakpoint temporale ottimale, ovvero il punto nel tempo in cui cambia la tendenza della scarica. Per farlo, si applica una **regressione bilineare**, che consiste nell'adattare due rette distinte a due segmenti del segnale, uniti in un punto (il breakpoint). Si definisce quindi una funzione di perdita che, dato un valore candidato per il breakpoint (bp), suddivide i dati in due segmenti: il primo da inizio a bp, il secondo da bp alla fine. Su ciascun segmento si esegue una regressione lineare, e la somma degli errori quadratici tra i valori osservati e

quelli previsti costituisce l'errore complessivo per quel breakpoint. In Figura 2.20 viene mostrato il calcolo della regressione bilineare al variare del punto di breakpoint considerato nell'intervallo definito dal time to task failure e del relativo errore, a circa 5 s dall'inizio della prova e al termine.

La ricerca del valore ottimale di breakpoint avviene minimizzando questa funzione di perdita attraverso l'algoritmo fminbnd, che trova il minimo di una funzione univariata in un intervallo specificato. Una volta trovato il breakpoint ottimale, si eseguono le due regressioni lineari finali usando quel punto di separazione. I coefficienti ottenuti descrivono quindi l'andamento del tasso di scarica prima e dopo il cambiamento di tendenza in modo più accurato rispetto ad una singola regressione lineare. (Figura 2.21)

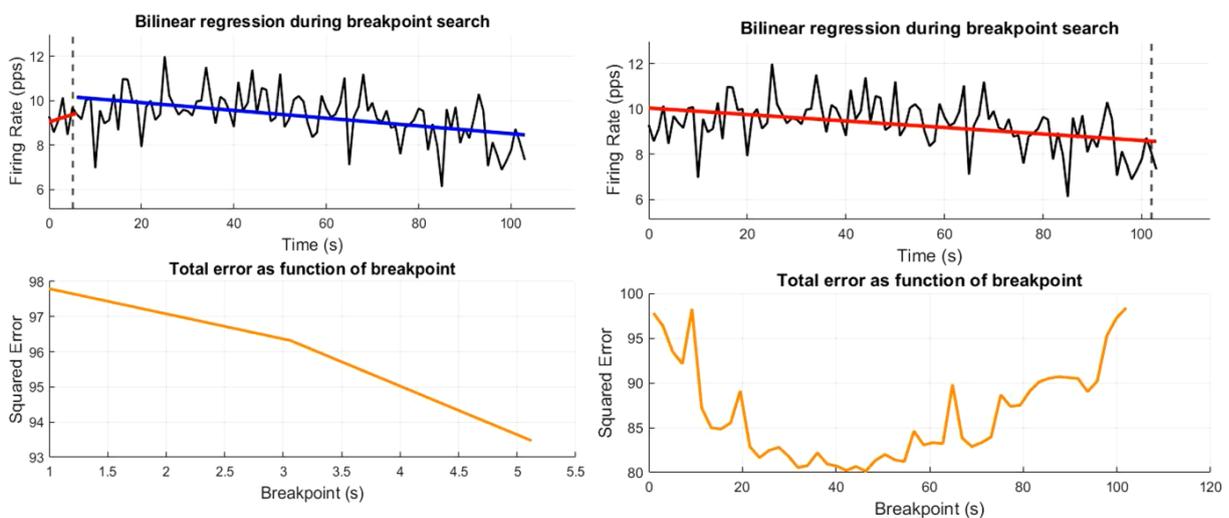


Figura 2.20: Ricerca del valore di breakpoint ottimale e della regressione bilineare associata a tale punto: viene mostrato l'avanzamento del processo da 5 s dopo l'inizio della prova al termine (circa 110 s). In alto, la linea tratteggiata indica il punto di bp candidato, per il quale viene rappresentata la corrispondente regressione. In basso, lo scarto quadratico ottenuto per punti successivi dalla funzione di perdita.

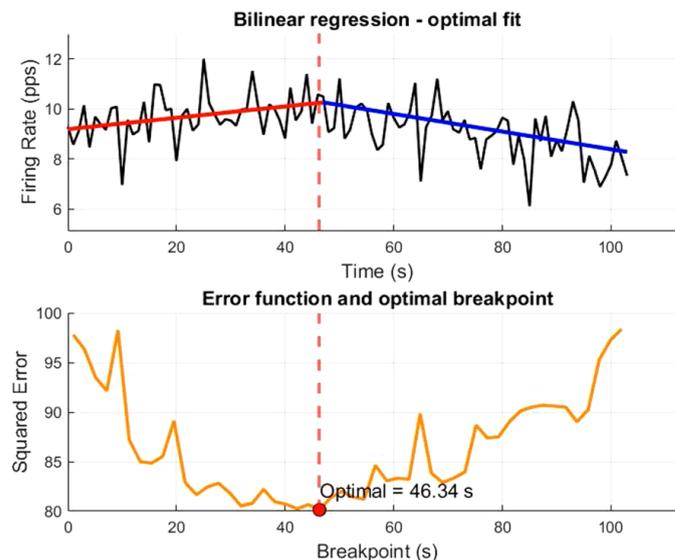


Figura 2.21: valore di breakpoint ottimale e regressione bilineare associata a tale punto.

Per ogni MU di ogni soggetto in ciascuna sessione di acquisizione è stato linearizzato l'andamento del FR come descritto; in Figura 2.22 è riportato come esempio il caso di alcune delle MU del soggetto PRM013 nella sessione T0.

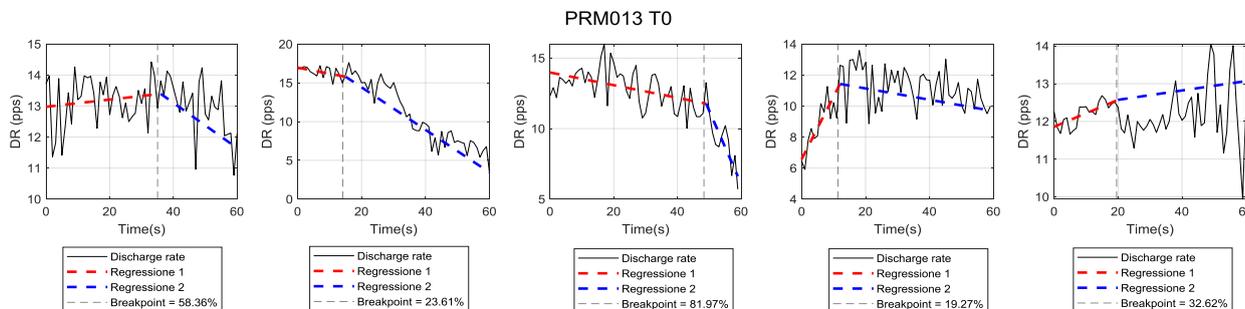


Figura 2.22: Esempio di regressione bilineare applicata agli andamenti di FR di 5 delle MU analizzate per il soggetto PRM013 nella sessione T0. Viene riportato il punto di breakpoint (indicato dalla linea tratteggiata) in figura e in legenda, dove si legge il valore espresso in secondi.

Dopo aver calcolato il punto di breakpoint e le relative regressioni lineari per ogni MU si vuole valutare quante abbiano effettivamente un comportamento bifasico, per le quali è strettamente necessaria la regressione bilineare al fine del calcolo dello slope, e quante invece mostrano un andamento del firing rate monotono, per le quali una singola retta interpolante sarebbe rappresentativa, come mostrato in Figura 2.23 in due casi esemplificativi.

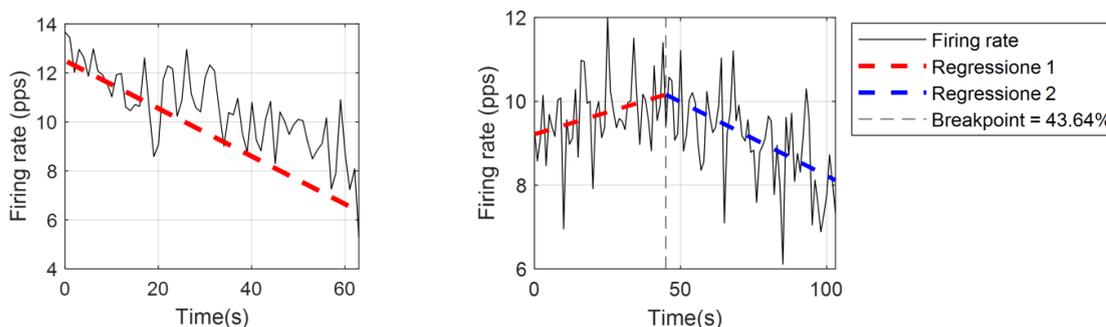


Figura 2.23: Esempi di andamenti del firing rate di MU linearmente decrescente (sinistra) e bimodale (destra)

Sono stati utilizzati 3 criteri per stabilire se la regressione bilineare fosse più accurata nel rappresentare l'andamento del firing rate dell'unità motoria rispetto alla più semplice regressione lineare e si è adottata la prima soluzione nel caso in cui venissero soddisfatti tutti:

1. Differenza minima tra i coefficienti angolari delle 2 rette pari al 5% , affinché si possa considerare un effettivo cambiamento di pendenza.
2. Riduzione dell'errore residuo superiore al 5% : il Residual Sum of Squares (RSS), ovvero la somma dei quadrati degli errori tra dati osservati e modello nel caso della regressione bilineare deve essere almeno del 5% superiore rispetto a quella della regressione lineare. Quindi, per entrambi i modelli interpolanti è stato calcolato l'RSS, poi è stato valutato se il miglioramento dell'RSS, definito come variazione relativa tra l'RSS del modello lineare e quello del bilineare, fosse superiore a 0,05.

$$RSS_{\text{improvement}} = \frac{RSS_2 - RSS_1}{RSS_1}$$

Dove:

- $RSS_1$  = errore residuo del modello 1 (regressione lineare)
- $RSS_2$  = errore residuo del modello 2 (regressione bilineare)

$$RSS = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

Dove:

- $y_i$  = valore osservato (vero) per l'osservazione  $i$
- $\hat{y}_i$  = valore previsto dal modello per l'osservazione  $i$
- $n$  = numero totale di osservazioni

3. AIC minore per il modello bilineare: L'AIC (Akaike Information Criterion) è un **criterio** di penalizzazione statistica usato per confrontare modelli e scegliere quello che meglio bilancia bontà di adattamento e semplicità. Più basso è l'AIC, migliore è il modello. È stato introdotto anche questo criterio in quanto , a differenza dei primi due, non richiede di imporre una soglia ed è quindi indipendente dalla scelta del valore.

$$AIC = 2k + n \cdot \log\left(\frac{RSS}{n}\right)$$

Dove:

- $RSS$  = Residual Sum of Squares (somma dei quadrati degli errori osservati tra dati e modello)
- $n$  = numero totale dei dati osservati (es. numero di punti del segnale)
- $k$  = numero dei parametri stimati dal modello (es. per una retta: slope + intercetta  $\rightarrow k=2$ ;  
per una regressione bilineare: 2 slope + 2 intercette + 1 breakpoint  $\rightarrow k = 5$ )

Per i diversi gruppi di età e per ogni sessione di acquisizione è stato quantificato la percentuale di MU rispetto al totale aventi comportamento bifasico o meglio per le quali, secondo i 3 criteri stabiliti, il modello bilineare rappresenta più accuratamente l'andamento del firing rate nella fase di tenuta rispetto a quello lineare. Per queste MU si è poi valutata la distribuzione dei breakpoint, cioè in che intervallo temporale di durata pari al 10% del time to failure ricadessero.

Successivamente è stata calcolata la correlazione tra la durata in secondi dell'intervallo temporale tra l'inizio della fase di tenuta e il breakpoint, considerato come punto di inversione del comportamento dell'unità motoria, con la durata della fase a forza costante. L'obiettivo era verificare se mediante il calcolo del breakpoint fosse possibile predire il tempo di cedimento della prova.

Con lo stesso procedimento descritto per il firing rate, è stato calcolato anche il breakpoint sul CoV della forza di ogni prova per ogni soggetto e anche per questi punti è stata calcolata la distribuzione negli intervalli temporali normalizzati e la correlazione con il time to failure.

Per ogni gruppo è stato calcolato il coefficiente di correlazione di Pearson e il p\_value sia per i breakpoint stimati sull'andamento del FR che sul CoV della forza con il tempo di durata della prova; le due metriche vengono riportate a sostegno della valutazione della correlazione tra le variabili in esame.

Infine, è stato quindi possibile calcolare lo slope normalizzato del discharge rate al secondo per le MU appartenenti a tutti i soggetti di ciascun gruppo in ogni sessione. L'analisi sugli slope è stata approfondita considerando la divisione delle MU di ciascun gruppo in fasce di reclutamento. Tuttavia, considerando tale suddivisione aumenta decisamente la complessità dei confronti, in quanto, oltre a considerare comparazioni trasversali tra i diversi gruppi e longitudinali tra le varie sessioni, si aggiunge un ulteriore livello di confronto, ossia quello delle fasce. Pertanto, da un lato le diverse sessioni sono state valutate singolarmente e poi congiuntamente e dall'altro, per semplificare l'analisi dei risultati, si è preferito classificare le MU in sole due fasce di reclutamento: low-threshold (LT MUs), caratterizzate da una soglia di reclutamento minore del 30% MVC, e high-threshold (HT MUs), reclutate tra 30 e 50%MVC.

## 2.4 Statistica

L'analisi statistica dei dati è stata condotta al fine di valutare le differenze significative tra i tre gruppi di soggetti esaminati in tre sessioni sperimentali. Pertanto, le variabili categoriche considerate nei confronti includono: l'età dei soggetti, il tempo inteso come sessione di acquisizione (T0, T1 e T2) ed, eventualmente, la percentuale di forza a cui avviene il reclutamento, qualora siano state suddivise le MU in fasce di reclutamento.

Per ciascun soggetto sono state estratte più unità motorie (MUs), su cui sono state calcolate le variabili di interesse (es. firing rate, CoV, dimensione MUAP, ecc.). La struttura dei dati risultante è quindi gerarchica e longitudinale: le osservazioni non sono indipendenti né tra i soggetti, né all'interno dello stesso soggetto nel tempo, né tra le unità motorie appartenenti allo stesso individuo. Per gestire correttamente questa complessità, è stato adottato un **modello lineare misto (Linear Mixed Model, LMM)**. Questo approccio è particolarmente indicato in presenza di:

- Misure ripetute sullo stesso soggetto (effetto longitudinale);
- Gruppi multipli tra cui confrontare le variabili;
- Struttura nidificata dei dati, poiché più unità motorie appartengono allo stesso soggetto.

Il modello lineare misto consente di considerare effetti fissi, che rappresentano i fattori sperimentali di interesse (Gruppo e Tempo), ed effetti casuali, che modellano la variabilità intra-soggetto (cioè dovuta all'individuo stesso), rispettando la dipendenza dei dati.

La forma generale del modello lineare misto adottato è:

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + u_k + \varepsilon_{ijk}$$

Dove:

$Y_{ijk}$  è il valore della variabile per la k-esima MU del soggetto k nel gruppo i e nella sessione j;

$\mu$  è l'intercetta generale;

$\alpha_i$  è l'effetto fisso del Gruppo (TOY, PRM, PRO);

$\beta_j$  è l'effetto fisso del Tempo (T0, T1, T2);

$(\alpha\beta)_{ij}$  è l'interazione tra Gruppo e Tempo;

$u_k \sim N(0, \sigma^2_{ui})$  rappresenta l'effetto casuale del soggetto, che cattura la variabilità individuale;

$\varepsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$  è l'errore residuo.

L'implementazione è stata effettuata nel software RStudio mediante l'utilizzo del pacchetto *lme4*, con la formula:

$$Y \sim \text{Gruppo} * \text{Tempo} + (1 | \text{Soggetto})$$

Nel modello lineare misto, i fattori **Gruppo** e **Tempo** sono stati trattati come variabili categoriche. Il fattore *Gruppo* distingue i tre insiemi di soggetti (TOY, PRM e PRO), mentre *Tempo* rappresenta le tre sessioni di acquisizione (T0, T1, T2). Il fattore *Soggetto* è stato modellato come effetto casuale, in quanto ogni partecipante contribuisce con più osservazioni (più unità motorie e più acquisizioni nel tempo), violando l'assunzione di indipendenza tra i dati. Questo approccio consente di tenere conto della variabilità individuale tra soggetti, evitando di sovrastimare l'effetto dei fattori fissi. L'inclusione del soggetto come effetto casuale permette di gestire la struttura gerarchica dei dati, in cui più unità motorie sono associate a ciascun individuo, e ciascun individuo è osservato ripetutamente. In questo modo, si preserva la validità statistica dei risultati anche in presenza di correlazioni intragruppo.

Dopo aver stimato il modello, è stata condotta un'analisi della varianza per valutare la significatività dell'effetto principale dei due fattori (Gruppo e Tempo) e della loro interazione. È stata inoltre calcolata la dimensione dell'effetto (effect size) mediante l'eta quadrato parziale, per quantificare la rilevanza statistica delle differenze osservate.

Per approfondire le differenze specifiche tra le condizioni sperimentali, sono stati eseguiti **confronti post-hoc** per indagare nel dettaglio le differenze tra condizioni sperimentali. Per questo scopo si è fatto uso delle stime marginali (Estimated Marginal Means, EMMs), che rappresentano le medie corrette dei gruppi tenendo conto degli altri effetti nel modello.

I confronti post-hoc sono stati effettuati in due modalità principali:

- Tra gruppi (TOY, PRM, PRO) all'interno di ciascuna sessione temporale (T0, T1, T2), per individuare se esistono differenze significative tra fasce d'età in uno stesso momento;
- Tra tempi (T0 vs T1, T0 vs T2, ecc.) all'interno di ciascun gruppo, per valutare l'effetto del tempo o della condizione sperimentale ripetuta sul medesimo insieme di soggetti.

Per garantire il controllo del tasso di errore nei confronti multipli, è stata applicata la **correzione di Bonferroni**, una procedura conservativa che limita la possibilità di risultati falsi positivi. Questo metodo consente di mantenere l'affidabilità statistica pur eseguendo numerosi confronti.

I risultati sono stati interpretati considerando come significativi i confronti con p-value  $< 0.05$  (dopo correzione) e saranno trattati nel capitolo 3 tramite la raffigurazione di diagrammi a scatola e baffi e tramite grafici con valor medio ed errore standard. Tutti gli output includono gli intervalli di confidenza al 95%.

Questo approccio ha reso possibile condurre l'analisi statistica sia nel confronto trasversale tra i gruppi di età differenti, sia dal punto di vista longitudinale per uno stesso gruppo nel corso dell'anno di osservazione.

### 3 Risultati

In questo capitolo saranno descritti i risultati ottenuti dall'analisi del comportamento delle unità motorie, condotta come descritto precedentemente nel Capitolo 2.2.

La struttura organizzativa del capitolo ripercorre la suddivisione in tre sezioni adottata nella descrizione dell'analisi, al fine di garantire una presentazione ordinata e coerente dei dati ottenuti, pur mantenendo il legame logico tra le evidenze emerse nelle diverse fasi dell'indagine.

La prima sezione (**3.1**) è dedicata all'analisi delle **alterazioni nelle proprietà delle unità motorie** durante contrazioni isometriche "a rampa", considerando sia la fase di reclutamento sia la fase di mantenimento a forza costante. I risultati sono confrontati sia in senso trasversale tra i gruppi di soggetti di mezza età (PRM) e anziani (PRO), sia in senso longitudinale attraverso le tre sessioni di acquisizione. Le variabili analizzate includono il firing rate, la sua variabilità (CoV), e la dimensione dei territori di attivazione delle MUs.

La seconda sezione (**3.2**) riguarda l'analisi delle **alterazioni nel controllo neurale delle variazioni di forza**, attraverso lo studio della relazione tra la variazione del firing rate delle unità motorie e l'incremento della forza generata. Viene introdotta la nozione di *guadagno neuromuscolare*, stimato come coefficiente angolare della regressione tra firing rate e forza, in termini sia assoluti sia normalizzati, con l'obiettivo di valutare le modifiche nell'efficienza del sistema neuromuscolare con l'avanzare dell'età.

Infine, nella terza sezione (**3.3**) vengono riportati i risultati relativi alla **resistenza alla fatica muscolare**, valutata attraverso prove isometriche sostenute al 50% della forza massima volontaria (MVC). L'analisi si concentra sulla durata della contrazione, sull'andamento del firing rate delle MUs, e sulla sua variabilità, con particolare attenzione all'identificazione del *breakpoint* nella risposta neurale e nella stabilità della forza. I risultati sono interpretati alla luce delle differenze tra i tre gruppi di età (TOY, PRM e PRO) e vengono discusse le implicazioni delle strategie neuromuscolari adattative legate all'invecchiamento.

L'esposizione dei risultati mira non solo a delineare differenze significative tra i gruppi e le sessioni, ma anche a individuare possibili traiettorie evolutive delle proprietà neuromuscolari nel tempo, integrando considerazioni di natura fisiologica, metodologica e statistica.

### 3.1 Risultati dell'analisi sulle alterazioni nelle MUs nelle contrazioni "a rampa"

In questa sezione vengono presentati i risultati relativi alle caratteristiche delle MU dei due gruppi di età (PRM e PRO) nelle contrazioni "a rampa" per i due livelli di forza (30% MVC e 50%MVC).

Come descritto nel Capitolo 2.2, si analizzano separatamente la fase di tenuta, allo scopo di indagare il comportamento delle MU durante la contrazione a forza costante, e la fase ascendente della rampa, concentrando lo studio sul reclutamento.

L'obiettivo è il confronto trasversale e longitudinale tra i due gruppi d'interesse, condotto parallelamente per i due livelli di forza. Pertanto, i risultati relativi ad ognuna delle quattro variabili introdotte vengono riportati nelle tre sessioni acquisite per entrambe le coppie di prove (30 e 50% MVC).

I risultati verranno rappresentati mediante l'utilizzo di diagrammi a scatola (boxplot) in cui il 75° percentile rappresenta il limite superiore della scatola, il 25° percentile rappresenta il limite inferiore e l'ampiezza della scatola rappresenta l'interquartile, cioè la dispersione dei dati nel 50% centrale. Inoltre, è stata aggiunta la visualizzazione della variabilità della mediana tra i campioni (rappresentati singolarmente come punti sovrapposti al boxplot di riferimento) per permettere un test d'ipotesi visivo su distribuzione normale e per evidenziare le traiettorie longitudinali nelle diverse sessioni.

Il primo aspetto preso in analisi è il **numero di MU analizzate**. L'intento non è quello di verificare che tale fattore sia discriminante tra i due gruppi o nelle diverse sessioni, in quanto questo valore è fortemente condizionato dalla selezione operata nei processi di decomposizione ed editing del segnale EMG multicanale, durante i quali si favoriscono le MU meglio detectate sulla base di caratteristiche come il PNR, i firing patterns e i MUAPs. Pertanto, si ritiene che il valore riportato non sia rappresentativo del numero totale di MU effettivamente attive per un dato soggetto, bensì una sottostima di questo, per le motivazioni descritte. Si è invece interessati a constatare che il numero di MU analizzate per i soggetti appartenenti ai gruppi distinti nelle sessioni di acquisizione sia confrontabile, che non ci siano discrepanze importanti nella numerosità tali da

incidere nelle fasi di studio successive. I grafici in Figura 3.1 mostrano il numero di MU per i due gruppi nelle 3 sessioni analizzate rispettivamente nelle prove al 30% MVC e al 50% MVC. In tutti i casi esaminati, il numero di MU analizzate per entrambi i gruppi si attesta mediamente tra 5 e 10; per ciascun soggetto sono state considerate almeno 2 MU e un massimo di 15 MU. Non si evidenziano differenze statisticamente significative tra i due gruppi, né aspetti longitudinali rilevanti.

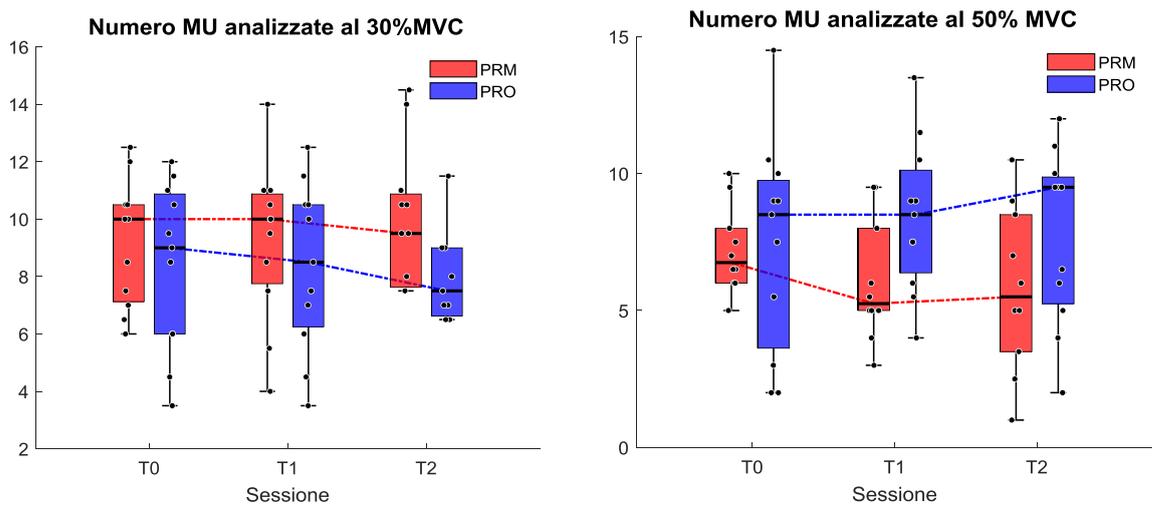


Figura 3.1: Valutazione, tramite boxplot, del numero di MU analizzate nella contrazione al 30% MVC (a sinistra) e al 50% MVC (a destra). Confronto tra i gruppi di età diverse (PRM PRO) nelle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2)

Passando ad investigare le caratteristiche delle MU nella fase di tenuta, i grafici in figura riportano il firing rate medio di ogni MU per le tre sessioni in ciascuna delle due coppie di prove. Si evidenziano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ) tra i due gruppi: il firing rate medio dei PRM risulta sempre maggiore rispetto a quello dei PRO in tutte le sessione e per entrambi i livelli di forza. I valori della mediana, evidenziati nei boxplot, nelle prove al 30% MVC raggiungono per i PRM 11 pps, mentre per i PRO 10 pps, rimanendo circa costanti nelle tre sessioni di acquisizione, con una variazione relativa percentuale tra i due gruppi pari al 9% (calcolata come differenza tra i valori di PRM e PRO, sul valore assunto per i PRM). Non si apprezzano quindi differenze dal punto di vista longitudinale per entrambi i gruppi in queste prove.

È possibile osservare come sia per i PRM che per i PRO la frequenza di sparo nel plateau sia mediamente più alta nelle prove al 50% MVC rispetto a quelle al 30% MVC. Infatti, nelle prove al 50% MVC i valori della mediana per PRM e PRO si attestano rispettivamente intorno 13 pps e 11 pps (variazione relativa percentuale pari a 15,4%) nella prima sessione di acquisizione, 14 pps e 12

pps nelle due successive (variazione relativa percentuale pari a 14,3%).

L'incremento del FR medio rilevato in entrambi i gruppi tra il T0 e le due sessioni successive (T1 e T2), risultate invece più simili in termini di valori è risultato statisticamente significativo; tuttavia questo trend comune non è stato ricondotto a fenomeni legati all'invecchiamento neuromuscolare, ma piuttosto ad aspetti sperimentali, che verranno esaminati più approfonditamente in questo capitolo nella trattazione del prossimo descrittore (CoV del FR), per il quale risultano più evidenti.

L'analisi statistica (ANOVA di tipo III con modello misto) ha evidenziato un effetto significativo del fattore GRUPPO, indicando una differenza sistematica nel firing rate tra le due popolazioni.

Questo risultato trova riscontro in numerosi studi, condotti sia sul vasto laterale che su altri muscoli e per diversi livelli di forza massima volontaria sviluppata. Infatti, è stato dimostrato che l'impatto dell'invecchiamento sulla trasmissione neurale è ben definito da una diminuzione generalizzata dei tassi di scarica delle unità motorie, sia durante contrazioni di bassa che di alta intensità [8], [44], [45], [96]. Tale diminuzione comprometterebbe la capacità del sistema nervoso di regolare la trasmissione neurale durante la contrazione, inibendo la massima attivazione del muscolo. Coerentemente con gli esiti degli studi appena citati, è possibile osservare la compromissione della capacità di raggiungere valori della frequenza di scarica più elevati da parte dei soggetti anziani durante contrazioni massimali e submassimali a causa dell'invecchiamento sia più consistente all'aumentare del livello di forza.

L'alterazione nelle caratteristiche di sparo delle MUs è riconducibile a diversi fattori fisiologici che concorrono al processo di invecchiamento, molti dei quali causati dai processi di rimodellamento neurale [8], [96], descritti nel paragrafo introduttivo, che intervengono a partire dal quinto-sesto decennio di vita. La riduzione del FR riscontrata evidenzia la minor efficienza delle MU oggetto della reinnervazione a seguito della morte dei motoneuroni alfa dai quali erano originariamente innervate, poiché i motoneuroni a bassa soglia non delezionati manifesteranno potenziali d'azione più lenti [45] per via delle alterazioni neuromuscolari su più livelli che interessano i soggetti anziani, descritte nell'introduzione. Essi riceveranno dunque un input sinaptico ridotto e l'unità motoria nel suo complesso risponderà più lentamente nell'integrare questo input e nel trasmetterlo alle fibre muscolari, a causa delle alterazioni strutturali e funzionali precedentemente discusse: questi fenomeni provocano la riduzione della frequenza di scarica [97].

Contrariamente ad alcuni studi presenti in letteratura [98], [99], i quali avevano riportato differenze significative nella frequenza di scarica solamente durante contrazioni muscolari superiori al 50% di MVC, in questo studio si sono osservate differenze anche a contrazioni inferiori (30% di MVC). Nel recente studio di A. Casolo (2024), le variazioni del tasso di scarica delle MU rilevate nelle prove al

50% MVC tra soggetti under-35 e over-65 sono assolutamente confrontabili in termini di valori con quelle qui riportate; questo confronto attesta la consistenza del risultato [44].

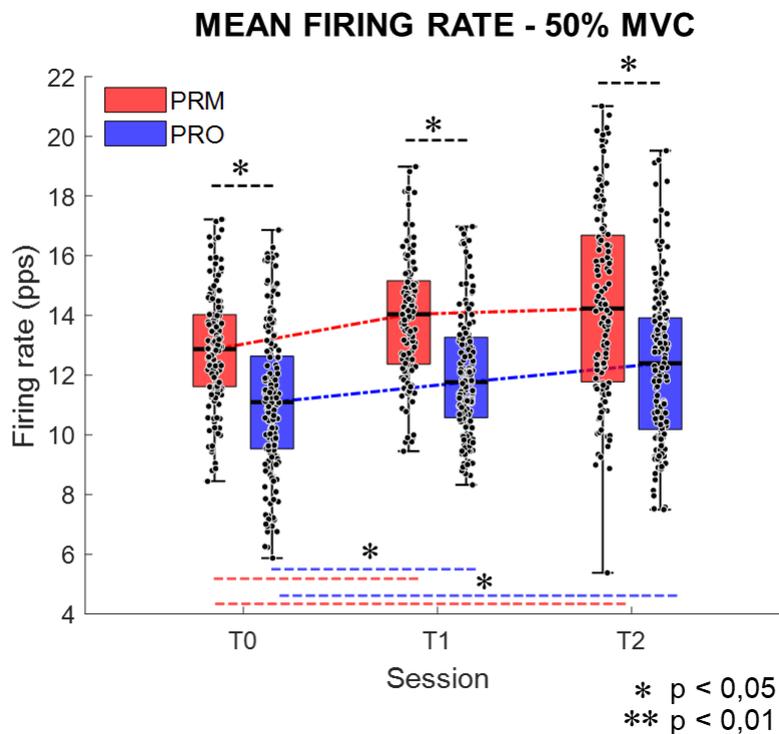
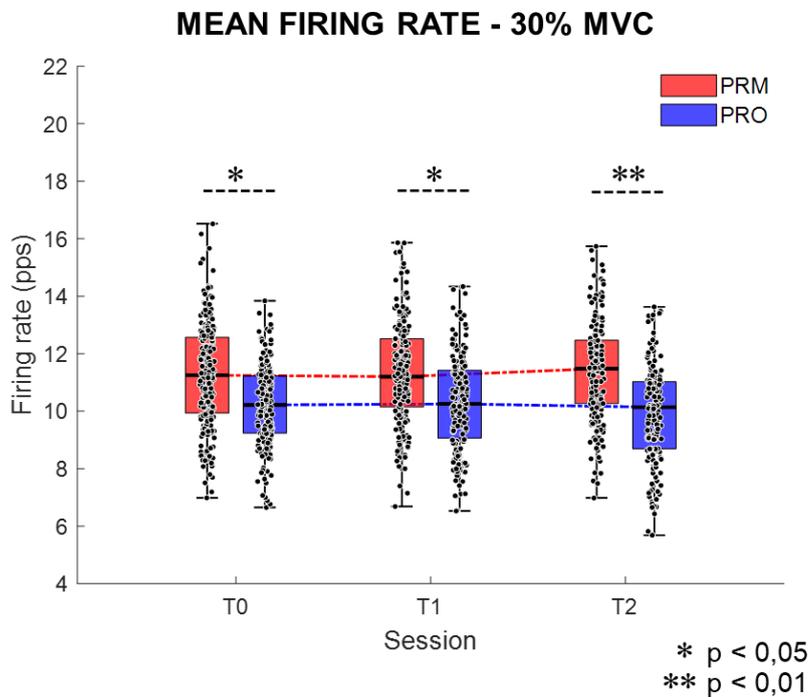


Figura 3.2: Valutazione, tramite boxplot, del FR medio delle MU nella fase di tenuta nella contrazione al 30% MVC (sopra) e al 50% MVC (sotto). Confronto tra i gruppi di età (PRM PRO) nelle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2)

Il **coefficiente di variazione del firing rate**, come è possibile osservare nei grafici in Figura 3.3, ha mostrato una diminuzione nell'arco dell'anno di osservazione. Nelle prove al 30% MVC non si evidenziano differenze tra i due gruppi nelle singole sessioni, mentre in quelle al 50% MVC il CoV dei PRO risulta minore rispetto ai PRM, con rilevanza statisticamente molto significativa nel primo time point ( $p < 0,01$ ). Questo risultato mette in luce come, soprattutto per livelli di forza maggiori, i soggetti più anziani, avendo un "dynamic range" del firing rate limitato rispetto a quelli più giovani, abbiano una capacità minore di variare la frequenza di sparo e conseguentemente questa risulta più stabile.

Rispetto agli sviluppi longitudinali, per entrambi i gruppi si osserva un CoV significativamente maggiore nel T0 rispetto alle due sessioni successive, che risultano invece più simili tra loro (ad eccezione dei PRM nelle prove al 30% MVC, per le quali si rileva una diminuzione significativa ( $p < 0,05$ ) tra T1 e T2). Non si esclude una possibile influenza su questo risultato da parte dell'intervento dell'operatore, in particolare nella fase di selezione ed editing delle MU ottenute dalla decomposizione. Questa metrica, infatti, è particolarmente suscettibile ad un approccio più o meno conservativo nelle procedure menzionate, pertanto sarebbe interessante approfondire quanto le scelte individuali possano influire sugli esiti dell'analisi da questo punto di vista. Tale aspetto viene tenuto in considerazione in quanto il set di dati relativo alla prima acquisizione era stato processato precedentemente da un operatore diverso rispetto alle due successive.

Tuttavia, un'analisi longitudinale estesa negli anni a venire potrebbe contribuire a chiarire se tali differenze riflettano un reale trend di riduzione del CoV o una sua maggiore stabilizzazione nel tempo, distinguendo così con maggiore certezza gli effetti fisiologici da quelli metodologici.

Questo risultato sembrerebbe discostarsi dalle evidenze conclamate di maggiore variabilità del firing rate delle MUs riportate in letteratura [100]: è noto che con l'invecchiamento la minore sincronia dei potenziali d'azione e un'attività generalmente più variabile delle MUs durante contrazioni di intensità stabile contribuiscono all'instabilità del controllo muscolare, portando ad oscillazioni involontarie nella forza sviluppata.

Quest'apparente incongruenza è dovuta al fatto che il coefficiente di variazione del firing rate sia una misura della variabilità relativa, sostanzialmente dominata dalla diminuzione del valor medio della variabile nei soggetti anziani discussa poc'anzi, posto al denominatore. Valutando la variabilità in termini assoluti, il calcolo della deviazione standard dell'intervallo inter-spike (riportata in Figura 3.4) ha infatti mostrato valori mediamente maggiori per i soggetti più anziani, in particolare nelle contrazioni al 30% MVC (fatta eccezione per la prima sessione di acquisizione); lo

studio di Welsh et al. del 2007 ha mostrato concordemente un aumento della variabilità dell'ISI in soggetti in età avanzata rispetto ai giovani [54].

La variabilità della frequenza di scarica delle unità motorie è stata associata a un aumento della variabilità nella produzione di forza durante compiti di mantenimento di forza costante [100], [101]. Nel presente studio, così come in letteratura, è stato osservato un aumento della variabilità nella forza espressa dai soggetti anziani rispetto ai PRM nella fase di tenuta, riportato in Figura 3.5 come Force Steadiness o coefficiente di variazione della forza. Questi risultati rafforzano l'ipotesi secondo cui parte della variabilità osservata nell'output motorio durante un compito potrebbe derivare da un rumore sovrapposto al segnale motorio in qualunque punto della catena neurale [102]. Di conseguenza, la variabilità riscontrata mette in evidenza una ridotta precisione del controllo della forza e del movimento nei soggetti anziani, con differenze che appaiono più marcate nella variazione dell'intervallo inter-spike durante contrazioni di bassa intensità, probabilmente a causa di un'attivazione più "rumorosa" delle unità motorie.

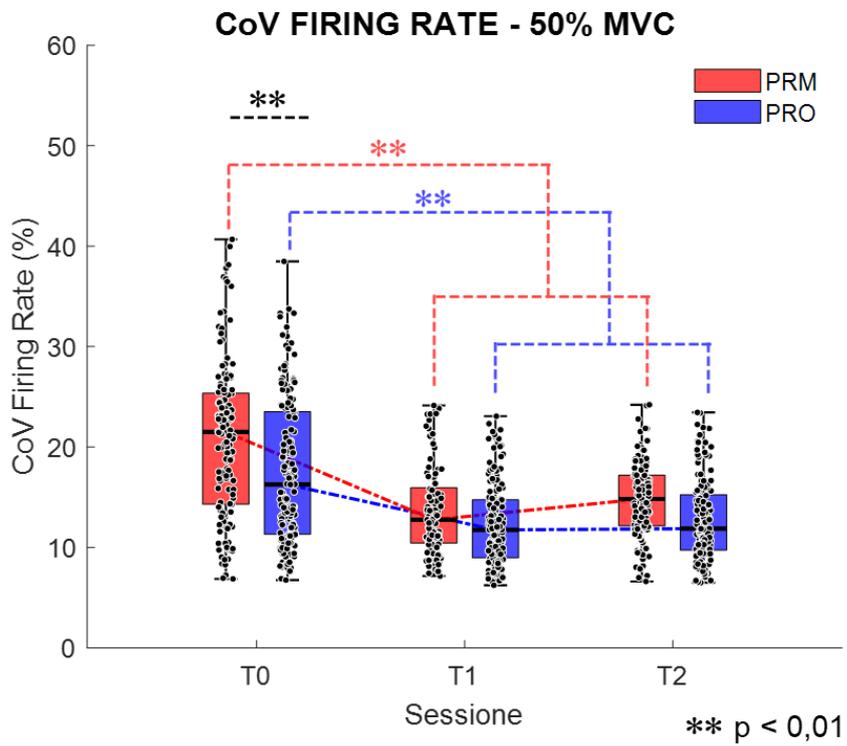
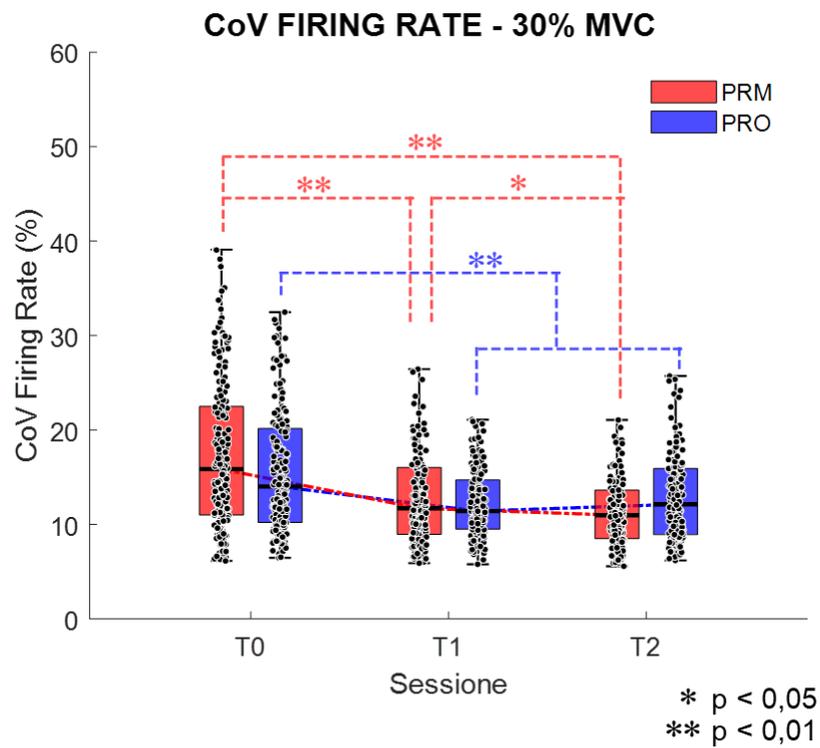


Figura 3.3: Valutazione, tramite boxplot, del coefficiente di variazione del firing rate medio delle MU durante la fase di tenuta nella contrazione al 30% MVC (sopra) e al 50% MVC (sotto). Confronto tra i gruppi di età diverse (PRM PRO) nelle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2)

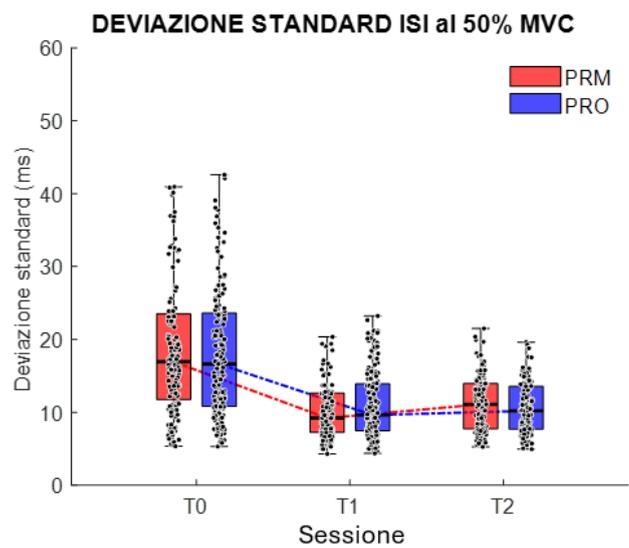
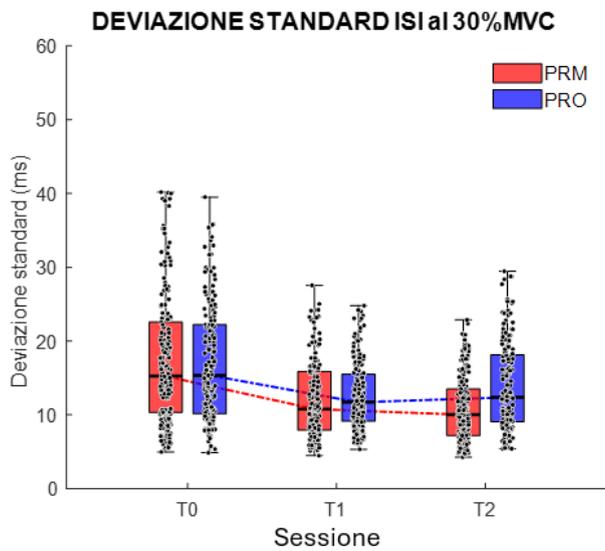


Figura 3.4 Valutazione, tramite boxplot, della deviazione standard dell'intervallo inter-spike delle MU durante la fase di tenuta nella contrazione al 30% MVC (sinistra) e al 50% MVC (destra). Confronto tra i gruppi di età diverse (PRM PRO) nelle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2)

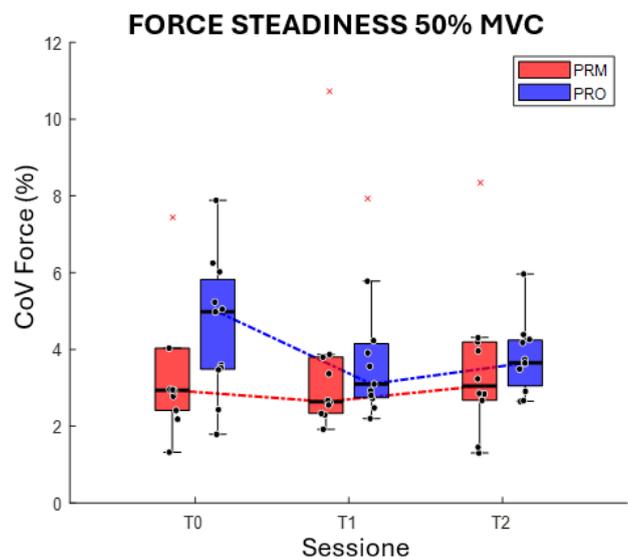
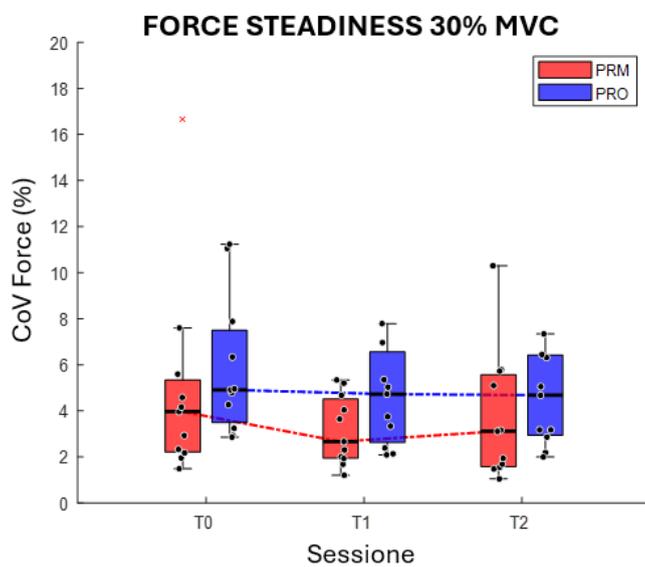


Figura 3.5: Valutazione, tramite boxplot, della force steadiness (o CoV della forza) di ciascun soggetto nella contrazione al 30% MVC (sinistra) e al 50% MVC (destra). I marker neri rappresentano i singoli soggetti. Confronto tra i gruppi di età diverse (PRM PRO) nelle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2)

Abbandonando gli aspetti neurali e spostandosi su quelli periferici, è possibile confrontare i due gruppi PRM e PRO, per entrambi i livelli di forza (30% MVC e 50% MVC) relativamente alle dimensioni dei territori attivi per ogni MU, mediante il calcolo dell'**Activation Width**, come descritto nel capitolo *Materiali e Metodi*, il cui risultato è riportato in Figura 3.6.

Le dimensioni delle Activation Width per i due gruppi sono abbastanza simili nelle prove al 30%, con valori delle mediane che si attestano intorno ai 2,5 cm. Nelle prove al 50% MVC, invece, si riscontrano valori significativamente maggiori per i PRM rispetto ai PRO e abbastanza stabili nelle tre sessioni di acquisizione: le mediane raggiungono rispettivamente valori di circa 3 cm e 2 cm (variazione relativa percentuale tra i due gruppi pari a 33,3%). Non si osservano invece sviluppi rilevanti nei singoli gruppi dal punto di vista longitudinale.

Dalle conoscenze teoriche ci si aspetta che i territori delle MU siano più grandi in età avanzata [103], [104], [105]. Questo è dovuto al processo di neurorimodellazione, descritto nei capitoli introduttivi, per il quale le fibre denervate alla morte di un motoneurone vengono reinervate collateralmente da un motoneurone ancora attivo, determinando l'ampliamento del territorio della singola unità motoria, tramite il raggruppamento di un maggior numero di fibre. Tuttavia, questo processo di compensazione è sempre meno efficiente con il passare del tempo e la reinervazione lascia il posto a una graduale perdita del numero di fibre e all'atrofia delle fibre di tipo II [106]; la mancata reinervazione delle fibre muscolari nei soggetti più anziani potrebbe giustificare la tendenza inversa riscontrata. Lo studio di Piasecki et al. [107] riporta una riduzione delle dimensioni delle unità motorie nei soggetti con muscoli classificati come sarcopenici, a differenza di quanto osservato nei soggetti pre-sarcopenici: ciò potrebbe avvalorare l'ipotesi appena avanzata.

Inoltre, è necessario considerare che per poter confrontare le dimensioni dei territori di attivazione tra soggetti diversi in modo più accurato sarebbe opportuno dividere il valore riportato dell'Activation Width in cm per le relative CSA (Cross-Sectional Area), misurate al 50% della lunghezza del muscolo, che fungono da riferimento fisiologico. Infatti, la matrice è uguale per tutti i soggetti mentre la dimensione del muscolo è soggettiva, così una percentuale di attivazione alta su un VL grande corrisponde ad un territorio della MU relativamente più piccolo rispetto alla stessa percentuale di attivazione su un VL piccolo.

In generale, è noto che con l'età la massa muscolare diminuisce per effetto della sarcopenia: si

rileva una differenza del 20-30% della CSA tra soggetti giovani e anziani e una diminuzione del 13% del volume totale per i muscoli estensori del ginocchio associate all'invecchiamento[10], [108]. Maden-Wilkinson et al. [109] riportano che al 55-60% della lunghezza del femore l'area della sezione trasversale del quadricipite negli anziani rispetto ai giovani è ridotta del 32% negli uomini e del 28% nelle donne.

Pertanto, sarebbe legittimo supporre che la normalizzazione potrebbe anche evidenziare una maggiore ampiezza di attivazione nei PRO. Tuttavia, non disponendo dei valori di CSA dei singoli soggetti per questo studio, non è stato possibile approfondire ulteriormente. Si spera che, con il proseguire del progetto Trajector-Age, disponendo anche dei parametri antropometrici registrati in ogni sessione di acquisizione, sarà possibile indagare più a fondo questo aspetto. In aggiunta, sarebbe interessante portare avanti lo studio longitudinale in quanto, essendo stata documentata una «variazione percentuale compresa tra il 12,5 e il 16,1%» della CSA nell'arco di 12 anni (dai 65 ai 77 anni), un periodo di osservazione più lungo potrebbe evidenziare sviluppi anche a carico dei singoli individui e non solo nella caratterizzazione di gruppo.

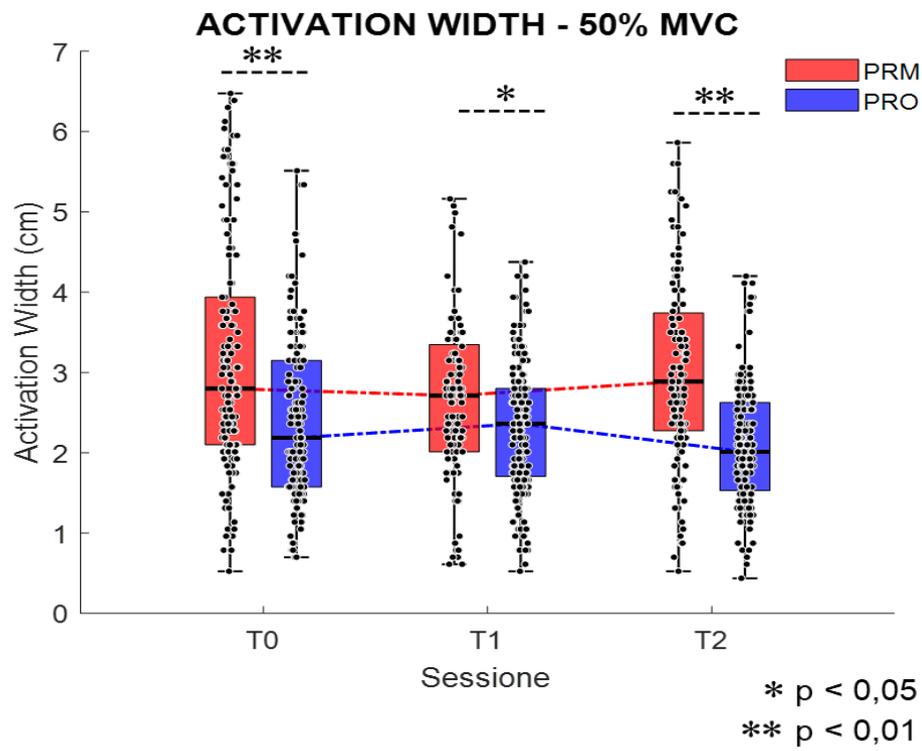
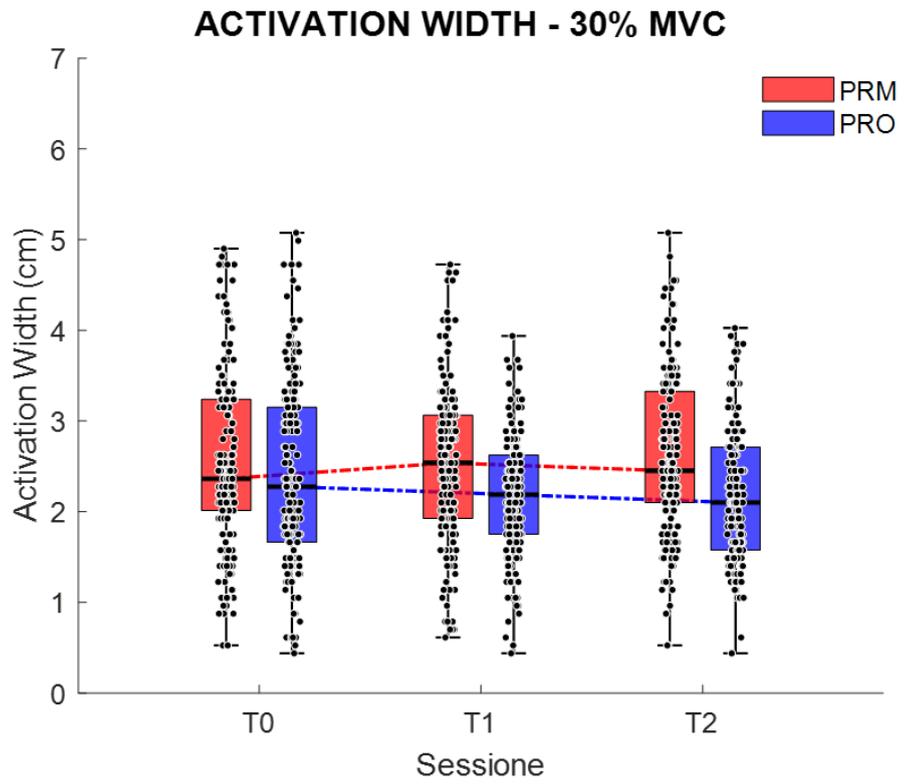


Figura 3.6: Valutazione, tramite boxplot, dell' Activation Width in cm delle MU durante la fase di tenuta nella contrazione al 30% MVC (sopra) e al 50% MVC (sotto). Confronto tra i gruppi di età diverse (PRM PRO) nelle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2).

Analizzando, invece, la fase ascendente delle rampe di forza al 50% MVC si è interessati alle caratteristiche delle MU al momento del reclutamento. Come descritto nel capitolo 2 e riprendendo lo studio condotto da Watanabe [10], le MU sono state divise in 5 **fasce di reclutamento** in funzione dell'intervallo percentuale in cui è stato rilevato il primo sparo ed il firing rate di ciascun ensemble è stato osservato nel relativo intervallo di reclutamento e in quelli successivi, fino alla fase di plateau. In Figura 3.7 vengono riportati i risultati in termini di valor medio e standard error per ogni intervallo, mettendo a confronto i due gruppi nelle 3 sessioni.

Un aspetto evidente nel gruppo PRM è il cosiddetto modello "onion skin" [110], che descrive come le unità motorie più piccole e reclutate per prime (a soglia bassa) abbiano firing rate inizialmente più alto e un incremento continuo della frequenza con l'aumento della forza. In particolare, è possibile apprezzare che in ogni time point la fascia reclutata nel precedente range di incremento percentuale di forza è caratterizzata sempre da un firing rate più alto, all'inizio del range attuale, rispetto alla fascia appena reclutata, generando un andamento stratificato dei tassi di scarica.

Un paragone particolarmente calzante proposto da De Luca è quello con un condotto idraulico: le unità motorie reclutate per prime possono essere considerate come tubature poste ad una quota inferiore, quindi con maggiore 'portata' (firing rate), mentre quelle reclutate successivamente come le tubature poste più in alto e quindi con minore portata; quest'immagine intuitiva descrive bene la dinamica del modello "onion skin".

Questo comportamento, seppur presente, è meno visibile nei PRO, per i quali sembra esserci meno distinzione tra alcune fasce nell'incremento di FR durante gli intervalli percentuali.

La principale differenza trasversale tra i due gruppi consiste nella "saturazione" da parte di tutte le fasce di MU dei PRO verso un valore di frequenza più basso (11-12 pps) rispetto alle frequenze raggiunte dalle fasce PRM nell'ultimo intervallo percentuale prima del plateau, che arrivano fino a 15 pps. Le fasce di MUs dei soggetti anziani sembrano convergere ad un valore limite di FR, ridotto rispetto ai valori raggiunti dai PRM al termine della fase ascendente in tutte le sessioni di acquisizione.

L'incapacità di adattare la frequenza di scarica alle variazioni di forza richieste implica che la diminuita plasticità dei circuiti motori centrali è un determinante chiave nel declino funzionale degli anziani. La diminuzione dei tassi di scarica comporta una saturazione della del FR nelle unità motorie attive e ciò comprometterebbe la capacità del sistema nervoso di regolare la trasmissione neurale durante la contrazione, contribuendo in maniera importante al declino della forza in un muscolo [10], [45].

Confrontando poi le singole fasce di reclutamento nei 3 time point (Figura 3.8) non si rilevano aspetti longitudinali d'interesse riconducibili all'invecchiamento; pertanto, per gli obiettivi proposti, le tre sessioni possono essere considerate equivalenti dal punto di vista dell'analisi del FR durante la fase di reclutamento.

In generale si può concludere che il passaggio di età da PRM a PRO porta ad un abbassamento della frequenza massima di sparo e anche ad una minore capacità di crescita in frequenza per ogni gruppo di MU.

**Firing rate delle MUs dal RECLUTAMENTO al PLATEAU - 50%MVC (Valor medio ± SE)**

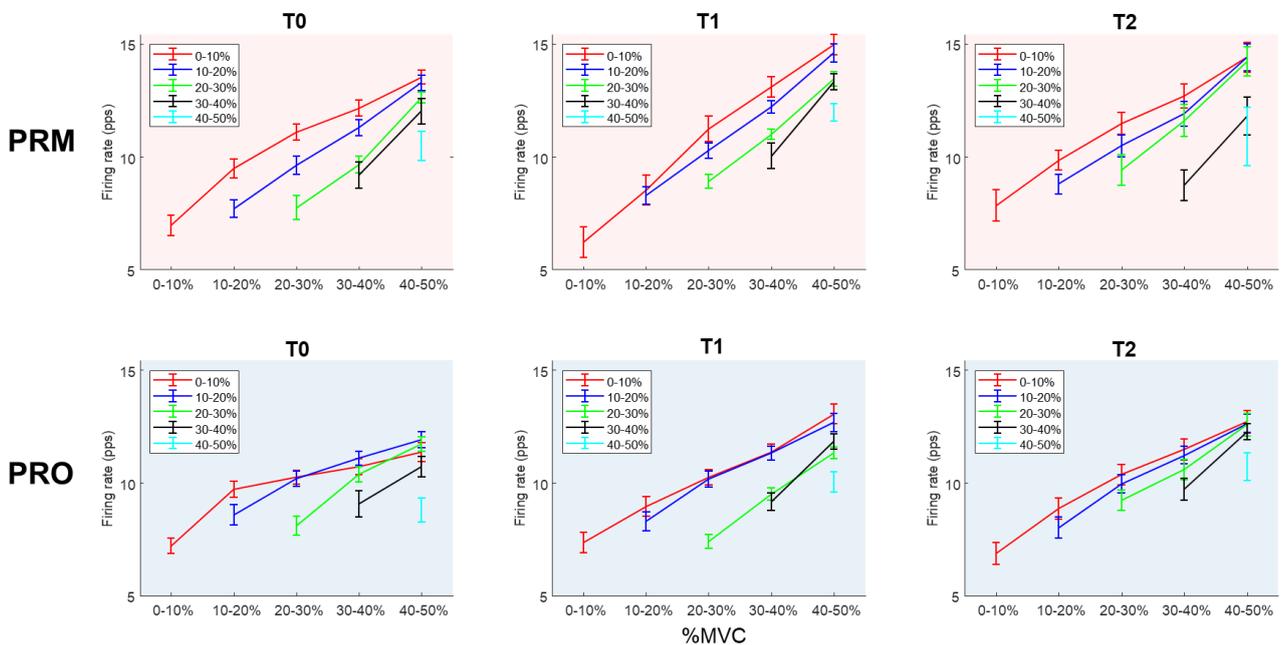


Figura 3.7: La frequenza di sparo media valutata per ogni gruppo di MU (reclutate nei range di forza 0-10% MVC, 10-20% MVC, 20-30% MVC, 30-40% MVC e 40-50% MVC della contrazione al 50% MVC) in tutti gli intervalli di forza dopo il reclutamento nella fase ascendente del profilo di forza. Confronto tra le fasce di reclutamento di ciascun gruppo (PRM PRO) nelle 3 sessioni di acquisizione

### Firing rate delle MUs dal RECLUTAMENTO al PLATEAU - 50% MVC (Mean value $\pm$ SE)

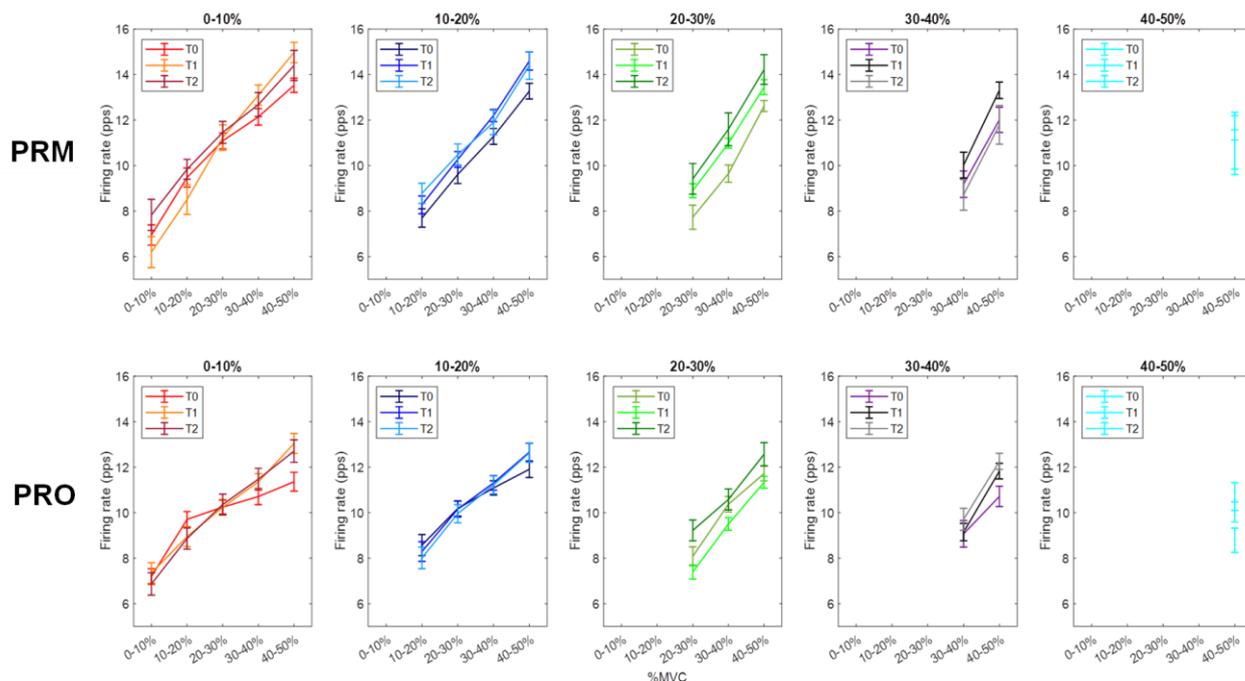


Figura 3.8: La frequenza di sparo media valutata per ogni gruppo di MU (reclutate nei range di forza 0-10% MVC, 10-20% MVC, 20-30% MVC, 30-40% MVC e 40-50% MVC della contrazione al 50% MVC) in tutti gli intervalli di forza dopo il reclutamento nella fase ascendente del profilo di forza. Confronto tra le medesime fasce di reclutamento nelle 3 sessioni di acquisizione per ciascun gruppo (PRM PRO).

Infine, si riporta il firing rate medio nella fase di plateau, come descritto prima, ma mantenendo la distinzione in fasce di reclutamento. I risultati, presentati in Figura 3.9, mostrano che i valori medi dei PRO si attestano sempre intorno ai 10 Hz, per tutte le fasce, mentre per i PRM si parte nella prima fascia da valori di circa 15 Hz e solo nell'ultima si arriva a 10 Hz. Questo sostiene l'ipotesi della convergenza precoce ad un valore massimo del firing rate delle MU dei PRO rispetto ai PRM, non solo nell'ultima fase del reclutamento (40-50%), ma mediamente per tutta la fase di tenuta.

Viene inoltre calcolato il coefficiente di variazione del firing rate per le 5 fasce nel plateau (Figura 3.10). Si evidenzia che il decremento già riscontrato per questa variabile tra T0 e le altre due sessioni in entrambi i gruppi di soggetti ha interessato principalmente le MUs reclutate a bassa soglia, nonostante la possibilità che tale variazione sia legata a fattori confondenti piuttosto che a fenomeni di invecchiamento neuromuscolare, come spiegato precedentemente.

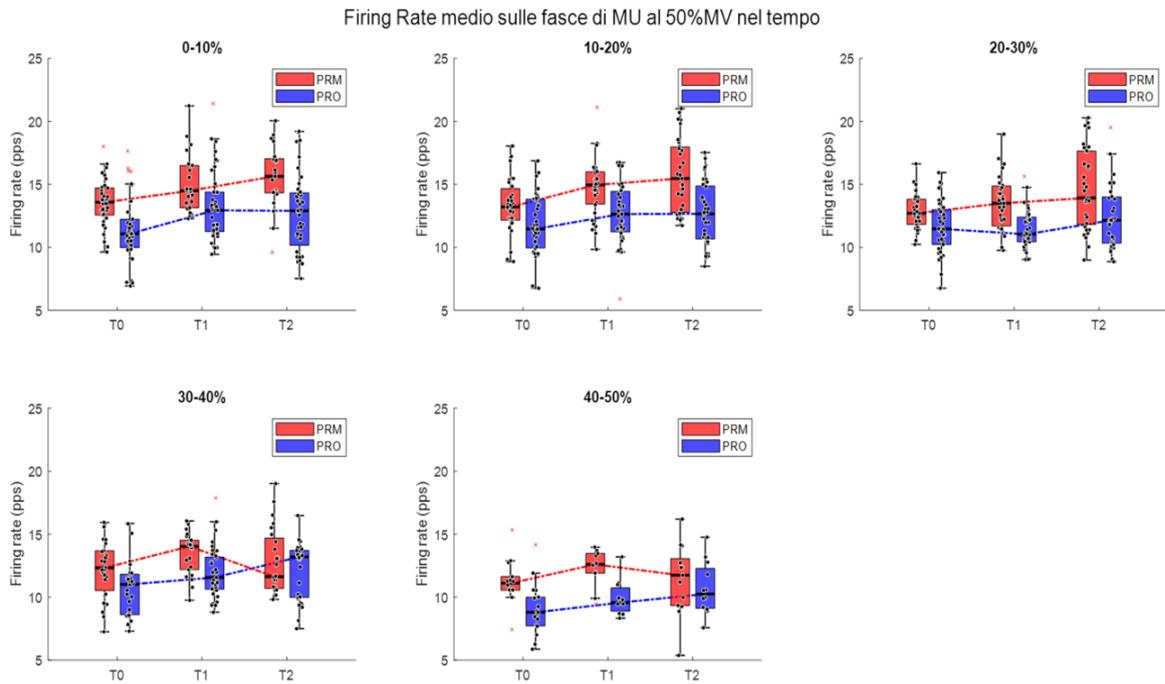


Figura 3.9: Valutazione, tramite boxplot, del firing rate medio dei gruppi di MU (reclutati nei range di forza 0-10% MVC, 10-20% MVC, 20-30% MVC, 30-40% MVC e 40-50% MVC della contrazione al 50% MVC) durante la fase di tenuta nella contrazione al 50% MVC. Confronto tra i gruppi di età diverse (PRM PRO) nelle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2)

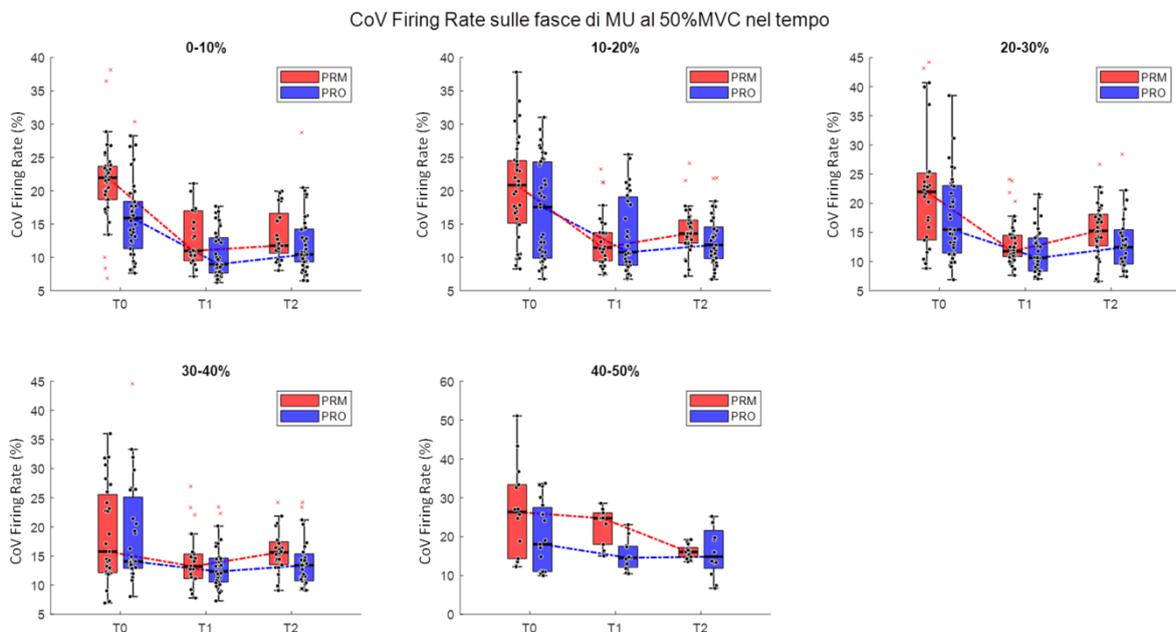
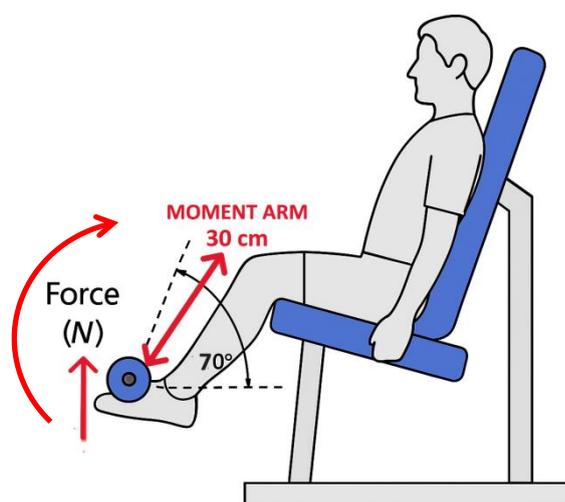


Figura 3.10: Valutazione, tramite boxplot, del CoV del firing rate dei gruppi di MU (reclutati nei range di forza 0-10% MVC, 10-20% MVC, 20-30% MVC, 30-40% MVC e 40-50% MVC della contrazione al 50% MVC) durante la fase di tenuta nella contrazione al 50% MVC. Confronto tra i gruppi di età diverse (PRM PRO) nelle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2)

## 3.2 Risultati dell'analisi sulle alterazioni nel controllo neurale sulle variazioni di forza

Il primo parametro analizzato nel confronto tra i due gruppi PRM e PRO è la massima forza volontaria (**MVC**) sviluppata nelle 3 sessioni di acquisizione dati, sulla base della quale sono state normalizzate tutte le rampe di forza individualmente. Tutti i dati relativi alla forza espressa in termini assoluti vengono riportati in N\*m, in quanto si considera la coppia esercitata sul perno della leg extension machine, data dalla



forza (misurata in kg per l'accelerazione gravitazionale  $g=9,81 \text{ m/s}^2$ ) per il braccio (distanza tra l'asse del ginocchio e il punto di applicazione della forza). Il braccio del momento rotante viene considerato di lunghezza standard 30 cm per tutti i soggetti.

In Figura 3.11 si può notare che l'MVC dei PRM è mediamente maggiore rispetto ai PRO, come era prevedibile, considerando la riduzione nella capacità di generare forza che si verifica con l'avanzare dell'età. Lo studio di Welsh et al. del 2007, già citato a questo proposito nell'introduzione, riporta una riduzione del MVC del 37% tra soggetti giovani e anziani; in questo caso si osserva una variazione relativa tra i due gruppi che si attesta, rispettivamente per le tre sessioni di acquisizione, intorno al 37%, 21% e 13%.

Nel gruppo di mezza età i dati sono maggiormente dispersi, più precisamente si distinguono due sottogruppi: gli MVC maggiori appartengono a soggetti di sesso maschile, mentre per le donne si registrano valori nettamente inferiori. Nei PRO la differenza di genere non è marcata, pertanto i dati risultano meno dispersi.

Dal punto di vista longitudinale, la forza massima del gruppo anziano è risultata mediamente costante nel tempo, mentre nei PRM si evidenzia una diminuzione costante del valore della mediana: da T0 a T2 si ha una riduzione di circa il 23%.

In Figura 3.12 è riportato per ogni soggetto l'andamento di MVC nel tempo, rispetto al

valore acquisito nella prima sessione. In generale non è apprezzabile un trend comune e si evidenzia un incremento notevole per alcuni soggetti, in particolare a 6 mesi dalla prima acquisizione, che raggiunge anche il 40% in un caso. Questo aumento, in controtendenza rispetto agli esiti attesi, essendo prevedibile un'eventuale diminuzione o una misura piuttosto costante nel corso dell'anno di osservazione [3], [5], [8], potrebbe essere legato a fattori personali come miglioramenti in uno stile di vita più attivo fisicamente o anche ad una maggior confidenza con il set-up sperimentale dopo la prima esperienza, che rappresentano elementi confondenti al fine dell'osservazione di fenomeni di invecchiamento. Ad ogni modo, considerando la variazione complessiva nel corso dell'anno di osservazione, al massimo si rileva un aumento di circa il 20% nell'ultima prova rispetto alla prima.

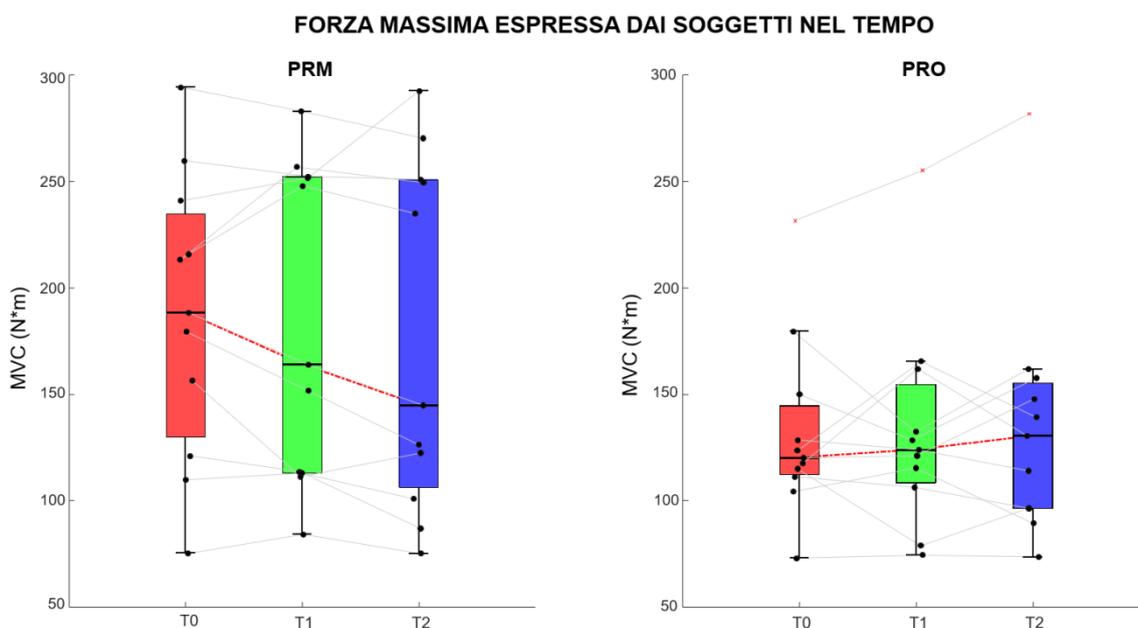


Figura 3.11: Valutazione, tramite boxplot, della massima forza volontaria (MVC) espressa dai soggetti di ciascun gruppo nelle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2). Confronto tra i gruppi di età diverse (PRM PRO)

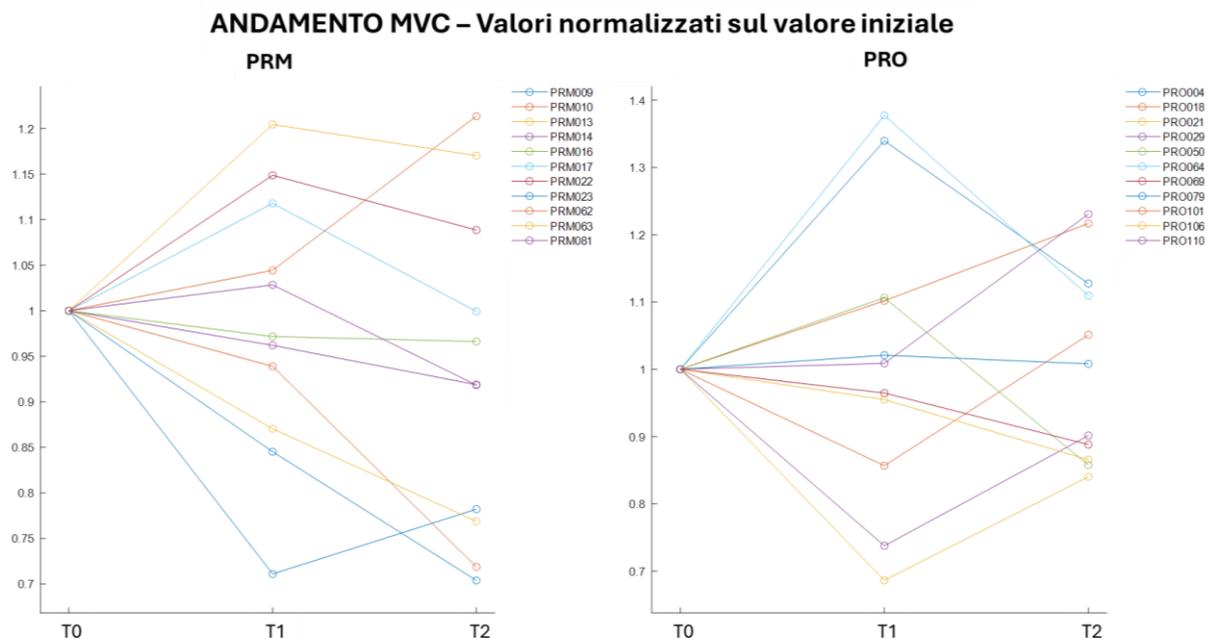


Figura 3.12: Massima forza volontaria (MVC) espressa dai soggetti di ciascun gruppo nelle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2) normalizzata rispetto al valore della prima sessione. Confronto tra i gruppi di età diverse (PRM PRO)

I seguenti grafici (Figure 3.13, 3.14, 3.15) riportano, per i 2 livelli di forza in esame e nelle 3 sessioni di acquisizione, espressi come media e deviazione standard sia sulle MUs che sui soggetti di ciascun gruppo, i valori delle variabili analizzate:

- soglia di reclutamento (**MU RECRUITMENT THRESHOLD**), valore di forza in termini assoluti (MU RT assoluto, N\*m) e in termini normalizzati (MU RT normalizzato, % MVC)
- firing rate nella fase di reclutamento (**MU FR recruitment**)
- firing rate nella fase di plateau (**MU FR plateau**)

Nelle soglie di reclutamento non sono state riscontrate differenze rilevanti tra i due gruppi in termini di valori normalizzati come percentuale MVC (ovviamente in valori assoluti risultano sempre maggiori per i PRM rispetto ai PRO, essendo più elevata la massima forza volontaria, come discusso precedentemente).

Non si apprezzano differenze significative anche per il firing rate di reclutamento, al quale viene affiancato per completezza il FR della fase di plateau, già discusso nel paragrafo precedente.

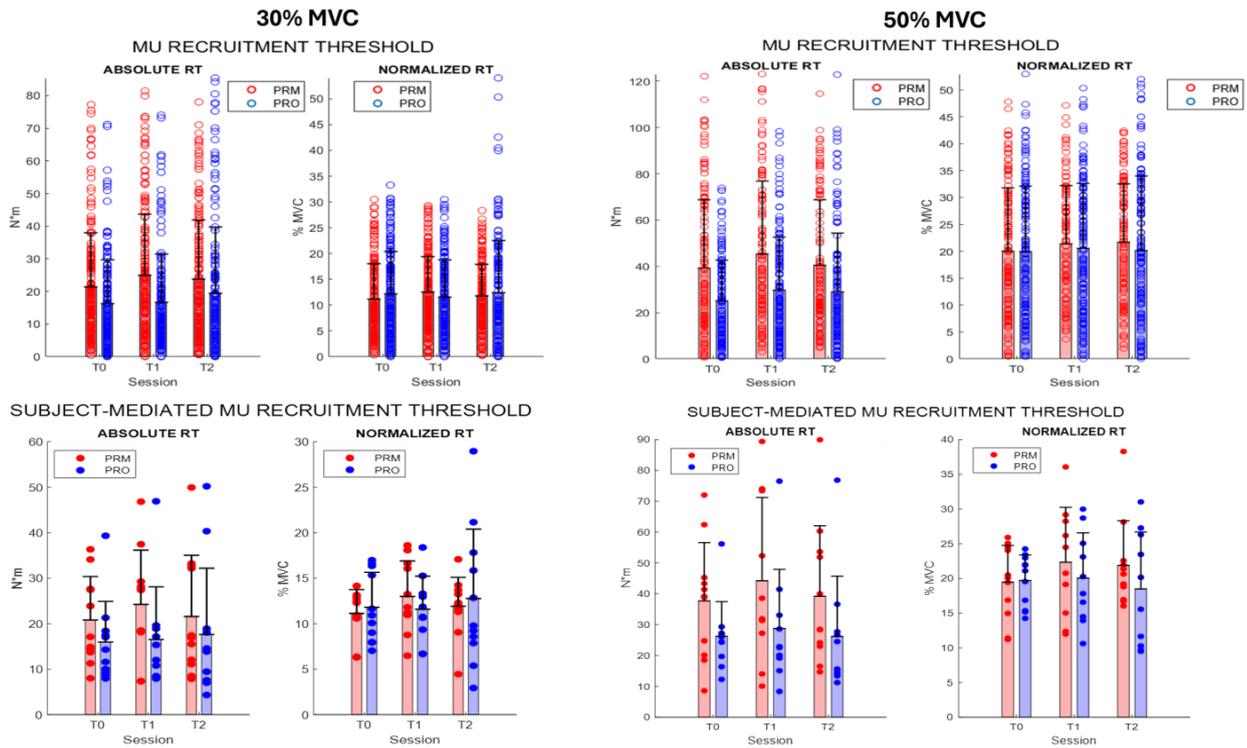


Figura 3.13: Soglie di reclutamento MU. Grafici a barre che rappresentano MU RT assoluto ( a sinistra di ogni coppia ) e normalizzato ( a destra di ogni coppia ) per le contrazioni al 30% MVC e 50% MVC. Confronto tra i gruppi di età diverse PRM (barre e marker rossi) e PRO (barre e marker blu) nelle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2). I grafici a barre mostrano le medie di gruppo  $\pm$  i valori SD calcolati sulle MU (prima riga, marker vuoti) e sui soggetti (seconda riga, marker pieni).

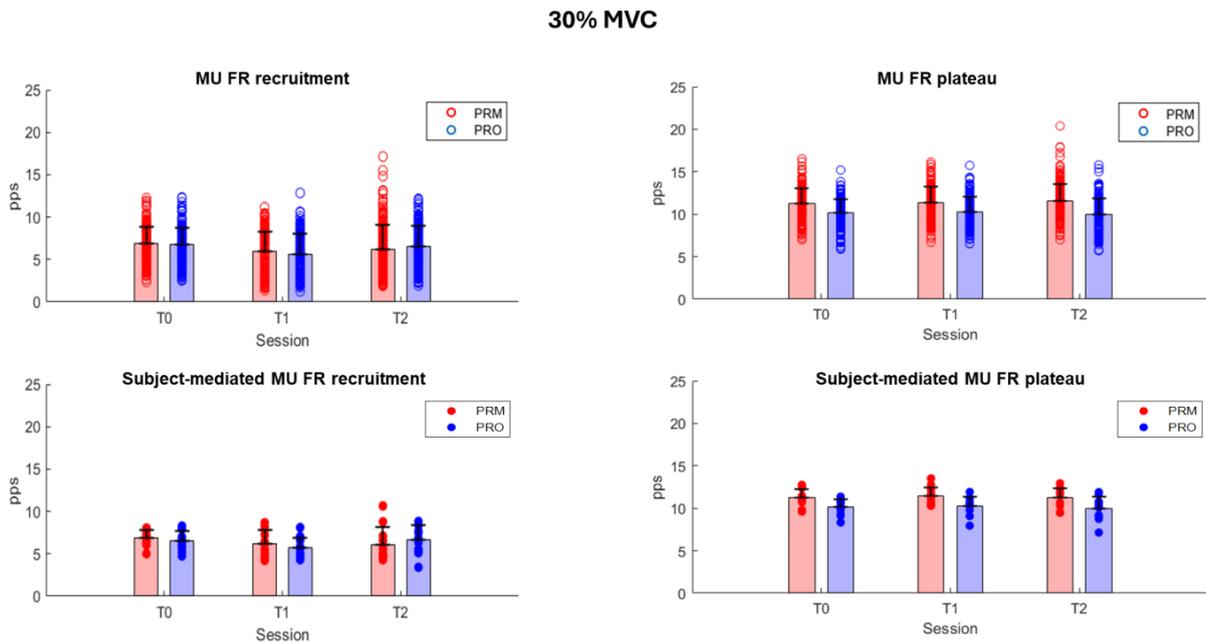


Figura 3.14: Firing rate MU al reclutamento (sinistra) e nel plateau (destra) nelle contrazioni al 30% MVC. Confronto tra i gruppi di età diverse PRM (barre e marker rossi) e PRO (barre e marker blu) nelle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2). I grafici a barre mostrano le medie di gruppo  $\pm$  i valori SD calcolati sulle MU (prima riga, marker vuoti) e sui soggetti (seconda riga, marker pieni).

### 50% MVC

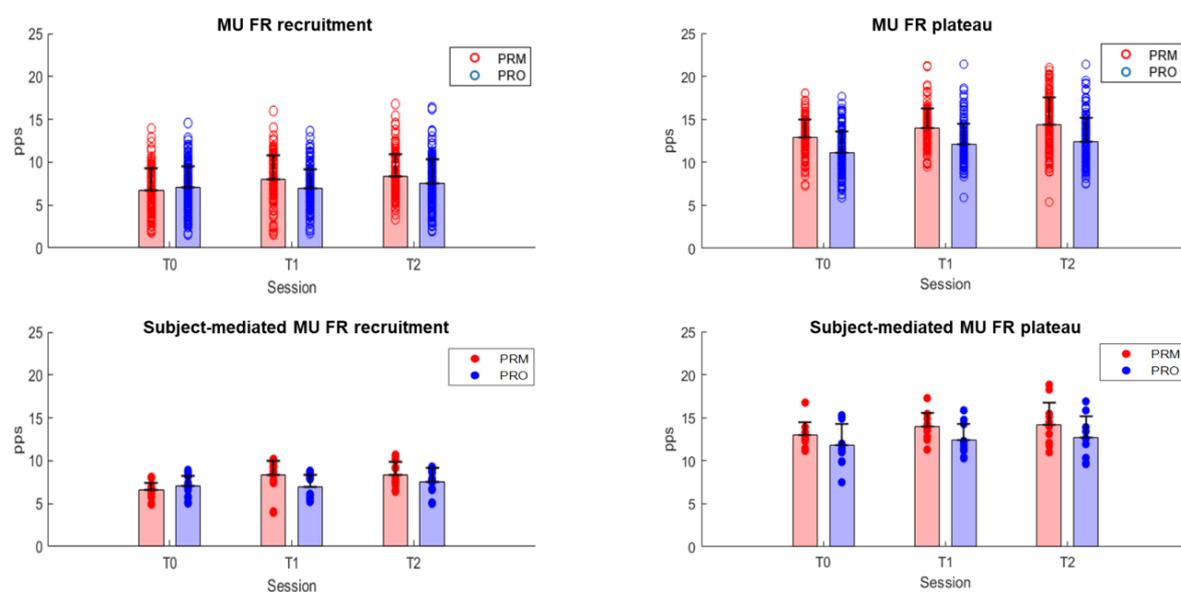


Figura 3.15: Firing rate MU al reclutamento (sinistra) e nel plateau (destra) nelle contrazioni al 50% MVC. Confronto tra i gruppi di età diverse PRM (barre e marker rossi) e PRO (barre e marker blu) nelle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2). I grafici a barre mostrano le medie di gruppo  $\pm$  i valori SD calcolati sulle MU (prima riga, marker vuoti) e sui soggetti (seconda riga, marker pieni).

Per ciascuna unità motoria sono stati calcolati i valori di  $\Delta$  FORCE (sia in forma assoluta che normalizzata) e  $\Delta$ FR, secondo le definizioni riportate nel capitolo *Materiali e metodi*, in ogni sessione sperimentale e per entrambi i livelli di forza.

Successivamente, ciascuna MU è stata rappresentata come un punto nel piano cartesiano definito dalle due variabili (variazione di forza in funzione della variazione di firing rate), visualizzato nei grafici seguenti mediante simboli vuoti.

Al fine di semplificare l'analisi e aumentare la numerosità dei dati per ciascuna sessione, i due livelli di forza sono stati aggregati in un'unica rappresentazione. Pertanto, nelle analisi successive non verrà più mantenuta la distinzione tra le due prove di forza.

Per ciascun soggetto è stata calcolata la regressione lineare sui punti definiti dalle proprie unità motorie e il relativo coefficiente di correlazione tra le due variabili rappresentate, come è riportato nei due casi esemplificativi in Figura 3.16.

Quindi è stato calcolato il guadagno individuale, sia in termini di forza assoluta che normalizzata, come lo slope della retta di regressione.

In Figura 3.17 vengono rappresentati, per le tre sessioni, i punti descritti dalle MUs di ciascun gruppo e la relativa retta di regressione, calcolata senza considerare la distinzione tra soggetti, solo a scopo illustrativo. La tabella, a completamento della rappresentazione, riporta i dati relativi ad ogni retta (slope e intercetta) e il coefficiente di correlazione R, per le due condizioni (forza assoluta e forza normalizzata) nelle 3 sessioni.

Il guadagno per gruppo viene però stimato considerando il guadagno individuale di tutti i soggetti (marker pieni in figura) e rappresentato come media e deviazione standard.

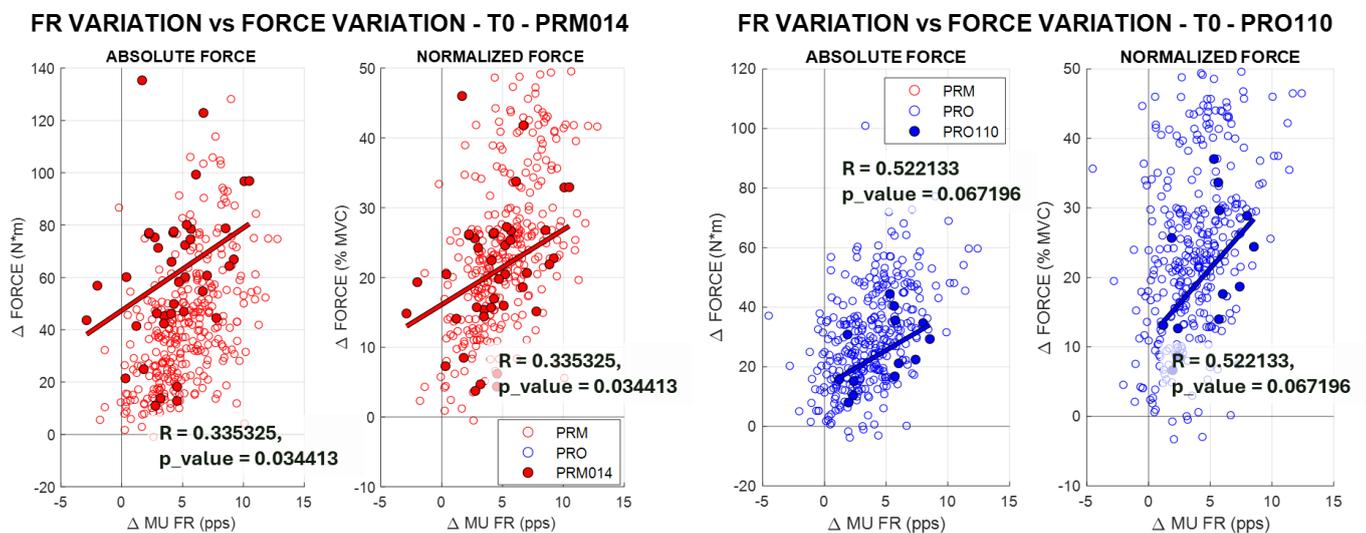


Figura 3.16: Grafici di dispersione che rappresentano l'associazione tra la variazione della forza volontaria (asse y,  $\Delta \text{FORCE}$ ) da MU RT alla fase di plateau delle contrazioni isometriche a rampa (30% MVC e 50% MVC condensate), rispetto alla variazione di MU DR (asse x,  $\Delta \text{FR}$ ), dal reclutamento (reclutamento MU FR) al plateau (plateau MU FR), considerando tutti i dati delle MU identificate raggruppati per gruppo indipendentemente dagli individui (marker vuoti). I valori assoluti sono mostrati a sinistra ( $N*m$ ), mentre i valori normalizzati a destra di ogni coppia (% MVC). I marker vuoti rappresentano le MU per i gruppi PRM (rosso) e PRO (blu). I marker pieni rappresentano le MU di un singolo soggetto per ciascun gruppo (PRM014 e PRO110) sulle quali viene calcolato il guadagno individuale dallo slope della regressione lineare. Vengono riportati il coefficiente di correlazione di  $\Delta \text{FR}$  e  $\Delta \text{FORCE}$  individuali e il relativo p value.

### FIRING RATE VARIATION vs FORCE VARIATION - 30% + 50% MVC

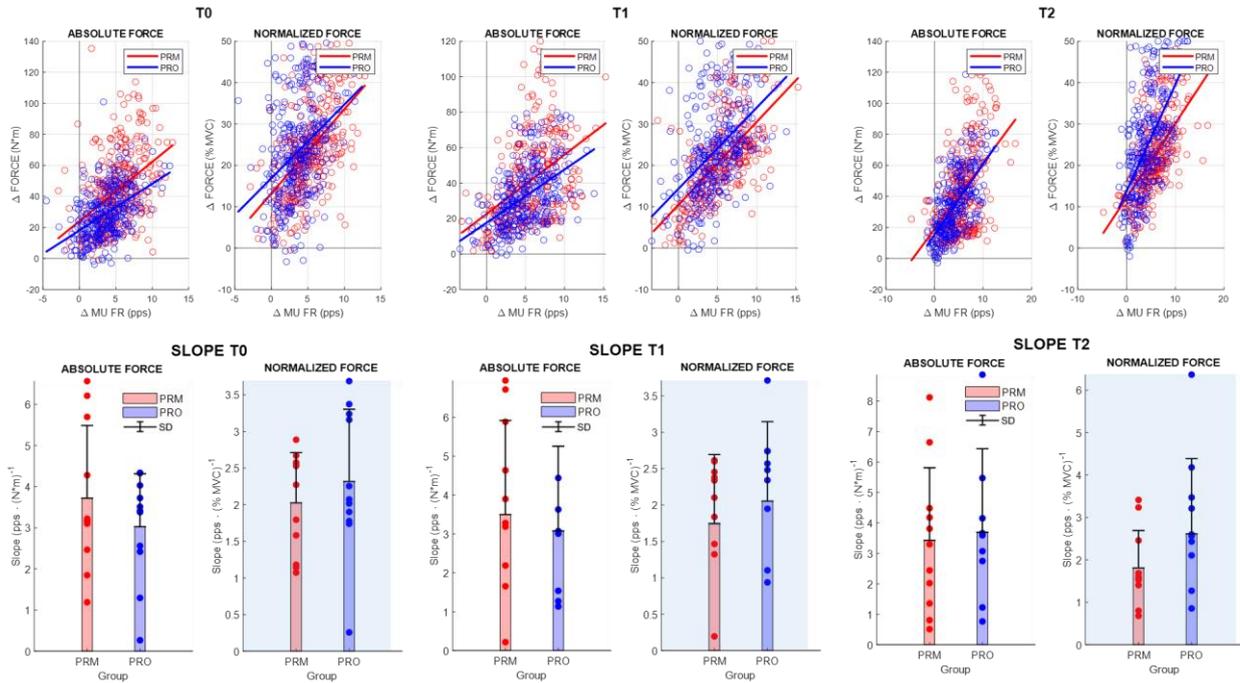


Figura 3.17: Guadagno stimato dalla spinta neurale al muscolo. Grafici di dispersione (prima riga) che rappresentano l'associazione tra la variazione della forza volontaria (asse y,  $\Delta FORCE$ ) da MU RT alla fase di plateau delle contrazioni isometriche a rampa (30% MVC e %50 MVC condensate), rispetto alla variazione di MU DR (asse x,  $\Delta FR$ ), dal reclutamento (reclutamento MU FR) al plateau (plateau MU FR), considerando tutti i dati delle MU identificate raggruppati per gruppo indipendentemente dagli individui. I valori assoluti sono mostrati a sinistra ( $N*m$ ), mentre i valori normalizzati a destra di ogni coppia (% MVIF). I marker vuoti rappresentano le MU per i gruppi PRM (rosso) e PRO (blu). Grafici a barre (seconda riga) che rappresentano le medie di gruppo  $\pm$  DS e i valori individuali (marker pieni) per il tasso di variazione (pendenza) di  $\Delta FORCE$  rispetto a  $\Delta FR$  in valori assoluti ( $pps \cdot (N*m)^{-1}$ ) e normalizzati ( $pps \cdot \% MVIF^{-1}$ ), nelle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2).

SESSION	$\Delta FORCE$	GROUP	SLOPE	INTERCEPT	R
T0	ABS	PRM	3.8221	24.0579	0.428741
		PRO	3.0110	18.0408	0.478633
	NORM	PRM	2.0395	13.2027	0.526916
		PRO	1.7853	16.8897	0.387489
T1	ABS	PRM	3.3441	22.6200	0.432492
		PRO	3.0009	17.6601	0.492857
	NORM	PRM	2.0059	10.4629	0.644881
		PRO	1.9628	14.3300	0.500033
T2	ABS	PRM	4.2415	19.0029	0.495939
		PRO	4.5462	15.3580	0.641778
	NORM	PRM	1.7941	12.2069	0.599879
		PRO	2.5765	13.7804	0.610928

Tabella 3.1: Valori di slope, intercetta e coefficiente di correlazione della retta riportate in Figura 3.17 per valori di forza assoluti (ABS:  $N*m$ ) o relativi (NORM: % MVC) per i gruppi di età (PRM PRO) nelle tre sessioni di acquisizione (T0 T1 T2).

Lo *slope* così calcolato ( $\Delta$ FORCE) e la variazione della frequenza di scarica delle unità motorie ( $\Delta$ MU FR) così calcolato viene considerato un indicatore del **guadagno neuromuscolare** nel controllo della forza, in quanto rappresenta la quantità di forza prodotta per ogni incremento del FR delle MUs. Quando la forza è espressa in termini relativi (% MVC), lo *slope* riflette esclusivamente l'efficacia del controllo neurale, poichè l'output è normalizzato rispetto alla massima capacità muscolare del soggetto. Al contrario, quando il guadagno è espresso in termini di forza assoluta, nello *slope* confluiscono anche componenti periferiche e muscolari, come il numero e la dimensione delle fibre muscolari, l'architettura muscolare e l'efficienza della trasmissione neuromuscolare.

Pertanto, poichè il guadagno relativo evidenzia alterazioni nel controllo centrale della forza, mentre quello assoluto integra anche l'efficienza del sistema periferico, la combinazione dei due indici fornisce una lettura più completa della funzionalità neuromuscolare e di eventuali alterazioni legate all'età.

In questo contesto, un valore elevato di guadagno indica che un piccolo aumento del comando neurale (FR) comporta una variazione relativamente maggiore della forza, suggerendo un'efficienza neuromuscolare elevata o, alternativamente, una ridotta capacità di modulazione del comando stesso a seguito dell'aumento di forza.

I soggetti anziani mostrano una dinamica del FR limitata rispetto ai soggetti di mezza età, come riscontrato nei risultati della prima parte dell'analisi, relativa all'aumento di FR nella fase ascendente delle rampe di forza. Questo aspetto si traduce in uno *slope* relativo maggiore: a parità di incremento percentuale di forza, la variazione di MU FR è inferiore, facendo aumentare il valore della pendenza della retta di regressione. In Figura 3.17, infatti, si può apprezzare come in tutte e tre le sessioni (T0, T1, T2) il guadagno in termini relativi (colonne su sfondo azzurro) risulti sistematicamente maggiore nel gruppo PRO, suggerendo una persistente difficoltà di modulazione fine della forza da parte del comando neurale. Questo meccanismo porta, da una parte, ad una maggiore vulnerabilità delle prestazioni di controllo motorio alla perturbazione esterna e, dall'altra, all'inefficienza del controllo motorio durante l'esercizio [8], [53].

Al contrario, osservando il guadagno in termini di forza assoluta, questo risulta generalmente maggiore per i PRM, coerentemente con la loro maggiore capacità di sviluppare forza massima (MVC più elevati).

Solo nella sessione T2 (ad 1 anno dalla prima acquisizione), le differenze tra i gruppi in termini di guadagno assoluto si attenuano, con valori medi sovrapponibili: questo potrebbe riflettere un parziale miglioramento dei fattori muscolari/periferici negli anziani, potenzialmente legato ad un effetto di adattamento all'esercizio, ossia una maggior confidenza con il set-up sperimentale.

La difficoltà ad adattare la frequenza di scarica in funzione della variazione della forza richiesta porta a una minor flessibilità del sistema nervoso durante l'invecchiamento. Tale flessibilità dipende dalla capacità del sistema nervoso di regolare efficacemente il drive neurale in risposta alla necessità di generare forza. Risulta, quindi, che tale capacità sia compromessa in persone anziane con effetti negativi sull'efficienza muscolare [45], [88]. Come mostrato nello studio di Watanabe et al. del 2016 e coerentemente con i risultati ottenuti nella sezione precedente, con l'invecchiamento la pendenza tra il tasso di scarica delle unità motorie e la forza richiesta diminuisce drasticamente con l'incremento dell'intensità di contrazione [10].

Inoltre, è noto che la pendenza del grafico del reclutamento delle unità motorie o del tasso di scarica medio in funzione della percentuale della forza massima volontaria diminuisce significativamente tra vari compiti motori. Questo indica che il declino del drive neurale varia in funzione della richiesta motoria e che il movimento è particolarmente vulnerabile al processo d'invecchiamento [111]. La variabilità nella regolazione delle unità motorie con l'avanzamento dell'età, per compiti motori differenti, mostra che gli anziani sono in grado di variare la scarica in maniera ridotta in funzione della variazione dello sforzo motorio.

Nel complesso, questi risultati suggeriscono che le differenze intergruppo nella relazione forza-FR non riflettono un'efficienza maggiore nel controllo motorio per i PRO (come si potrebbe erroneamente presumere dal guadagno in termini relativi più elevato), ma piuttosto limitazioni nella gamma di modulazione della forza da parte del comando neurale nel gruppo degli anziani.

### 3.3 Risultati dell'analisi sulle alterazioni nella resistenza a fatica

Il primo parametro considerato nell'analisi della resistenza a fatica tra i 3 gruppi distinti per età (TOY, PRM e PRO) è la durata della contrazione affaticante (**time to task failure**, TTF), ovvero il tempo di mantenimento della forza al 50% della contrazione massimale volontaria. Questo parametro viene riportato in apertura poiché, nelle analisi successive, gli intervalli temporali verranno normalizzati rispetto alla durata della prova, espressa in percentuale del tempo di fallimento del compito.

I dati relativi al gruppo dei giovani (TOY) sono stati raccolti in un'unica sessione, ma verranno riportati in tutti i risultati nelle tre sessioni (T0, T1, T2) al solo scopo di facilitare il confronto trasversale con gli altri due gruppi, che invece sono stati valutati longitudinalmente.

Il grafico in Figura 3.18 mostra chiaramente come il gruppo TOY presenti valori di durata più elevati e meno dispersi, con mediana superiore al minuto. Il gruppo PRM mostra valori significativamente più bassi rispetto agli under-30 in tutte le sessioni e piuttosto stabili nel tempo, con una mediana intorno ai 35 s. Per i soggetti di mezza età e anziani si evidenzia una maggior dispersione dei dati, indice di elevata variabilità inter-individuale all'interno di uno stesso gruppo. In particolare, negli anziani per alcuni soggetti i valori di durata risultano simili ai PRM, mentre per altri si registra una fase di tenuta prolungata rispetto alla media. Nei PRO si osserva, inoltre una diminuzione progressiva del valore della mediana di circa il 27 %, passando da 55 s nella prima acquisizione a 40 s nell'ultima, dove diventa statisticamente rilevante la differenza rispetto al gruppo dei giovani.

In Figura 3.19 vengono riportati per i 3 gruppi i valori delle 3 variabili analizzate (**FIRING RATE**, **CoV FIRING RATE** e **CoV FORZA**) nelle 3 sessioni, espressi come andamento medio e deviazione standard.

Durante la contrazione affaticante al 50% MVC, si osserva un andamento coerente con quanto descritto in letteratura: il firing rate medio delle MUs tende a diminuire progressivamente, mentre aumentano la variabilità del firing rate (CoV) e l'instabilità della forza prodotta (CoV della forza). Questi cambiamenti sono stati ampiamente documentati in studi che hanno esaminato le modificazioni neurofisiologiche durante la fatica muscolare.

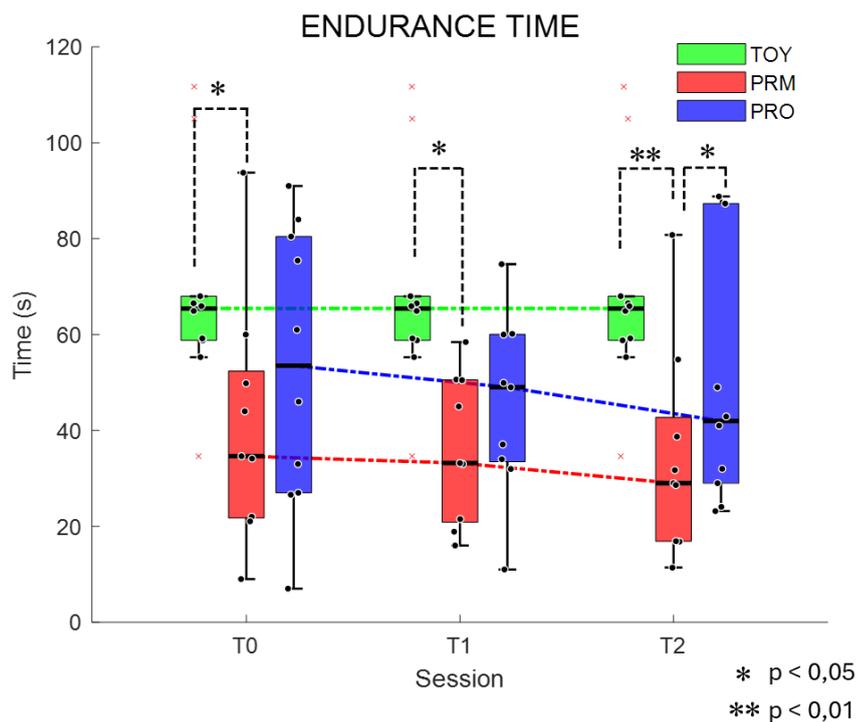


Figura 3.18: Valutazione, tramite boxplot, del tempo di durata della prova per ciascun soggetto di ogni gruppo nella contrazione affaticante al 50% MVC. Confronto tra i gruppi di età diverse (TOY PRM PRO) nelle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2). I dati relativi al gruppo TOY, acquisiti in un' unica sessione vengono riportati in ciascun time point per facilitare il confronto visivo con gli altri due gruppi.

In generale, analizzando la fatica a livello neuromuscolare, [112] evidenziano che la fatica muscolare compromette il controllo del sistema nervoso centrale e la capacità dei motoneuroni di mantenere una frequenza di scarica stabile, portando a un calo del firing rate e a un' aumentata variabilità della forza . Questo è coerente con il trend osservato nei dati del grafico, dove il CoV del firing rate aumenta nel corso della contrazione.

Inoltre, [113] sottolineano che l' incremento della variabilità della forza durante la fatica è associato a una maggiore incoerenza nella scarica delle unità motorie, suggerendo un deterioramento del controllo motorio a livello centrale e periferico .

Dal grafico emerge un aumento del CoV del firing rate dall' inizio alla fine del task simile per i diversi gruppi, senza rilevanti differenze dovute all' età. Il CoV della forza aumenta visibilmente per tutti i gruppi, anche per i soggetti under-30, sebbene i risultati riportati in letteratura suggeriscano una maggior instabilità nel mantenere un livello di forza costante da parte degli anziani, rispetto ai giovani [114]. Tuttavia, l' aumento della variabilità della forza per i TOY, in particolare nel 20% finale della prova, è giustificato da valori di TTF più elevati, pertanto avvicinandosi al termine, i giovani tendono a resistere il più possibile fino a raggiungere il cedimento, anche a costo di maggiori

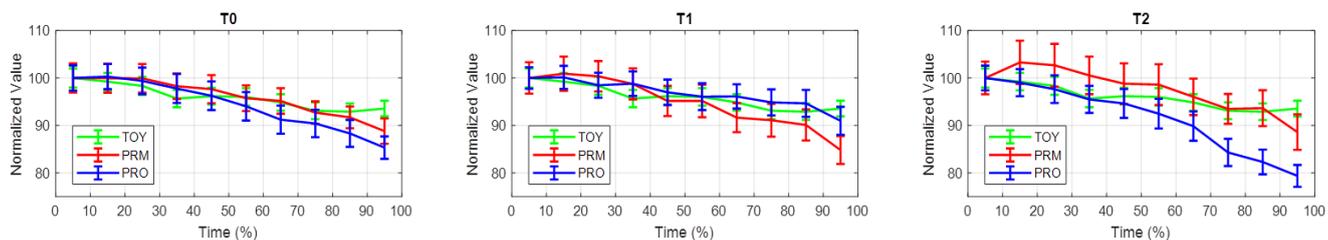
oscillazioni del profilo di forza. Poichè il profilo di forza rimane mediamente entro una variazione inferiore al 10% rispetto alla fase iniziale, per come è stata definita la durata effettiva della prova, si tratta di un importante aumento della deviazione standard per via delle variazioni puntuali, mentre il valor medio rimane circa costante.

Il confronto tra soggetti giovani e anziani in termini di resistenza alla fatica presenta tuttora risultati contrastanti in letteratura, evidenziando come tale parametro sia fortemente influenzato da numerosi fattori. Tra questi, il tipo di contrazione (isometrica vs dinamica), l'intensità e la durata dell'esercizio, oltre a fattori centrali e periferici del sistema neuromuscolare, giocano un ruolo determinante. Alcuni studi, come quelli di Allman e Rice [85] o Hunter e Duchateau [115], hanno riportato una maggiore resistenza alla fatica negli anziani, in particolare durante contrazioni isometriche sostenute, probabilmente grazie a una maggiore percentuale di fibre lente (tipo I) e a una ridotta velocità di contrazione, che favoriscono un miglior risparmio energetico. Anche l'articolo di Enoka et al. (2003) [101] sottolinea come, in compiti a bassa intensità, gli anziani possano essere meno affaticabili dei giovani. Al contrario, altri studi mostrano un quadro opposto: Christie et al. (2011) [116] osservano una maggiore affaticabilità negli anziani durante compiti intermittenti dinamici, mentre Wallerstein et al. (2012) [117] evidenziano una maggiore perdita di potenza e una più rapida insorgenza della fatica negli anziani in esercizi di forza ad alta intensità, riconducibili a un declino nell'attivazione neuromuscolare e al rimodellamento delle unità motorie. Queste discrepanze evidenziano la complessità dell'affaticabilità e il solo confronto fra gli andamenti medi delle tre variabili analizzate non è sufficiente ad identificare in maniera univoca delle caratteristiche distintive dei singoli legate all'età, né a chiarire i risultati contrastanti presenti in letteratura.

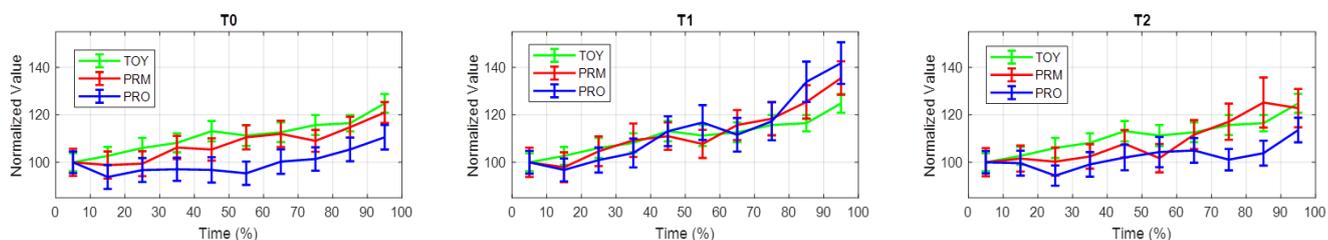
Pertanto, approfondendo l'analisi del firing rate dei 3 gruppi nelle contrazioni affaticanti, si evidenzia che, seppur mostrino tutti un andamento decrescente, la progressione della diminuzione della frequenza di sparo avviene con modalità diverse: inizialmente si rileva un decremento simile per TOY e PRO, ma nel corso della prova il calo di questi ultimi diventa più drastico, arrivando a valori di FR al termine della prova notevolmente inferiori rispetto ai giovani. Per i PRM si osserva una progressione meno regolare, caratterizzata da possibili incrementi di FR nella fase iniziale, mentre il decremento interviene solo durante lo sviluppo successivo della prova. Tali caratteristiche si manifestano con diversa evidenza nelle tre sessioni analizzate, ma poiché non sono emerse differenze significative nel tempo all'interno di ciascun gruppo (in termini di sviluppi longitudinali riconducibili all'avanzamento dell'età), nei grafici seguenti i dati relativi alle tre sessioni sono stati raggruppati e considerati congiuntamente.

## FATIGUE PLOT TOY - PRM - PRO

### FIRING RATE



### CoV FIRING RATE



### CoV FORZA

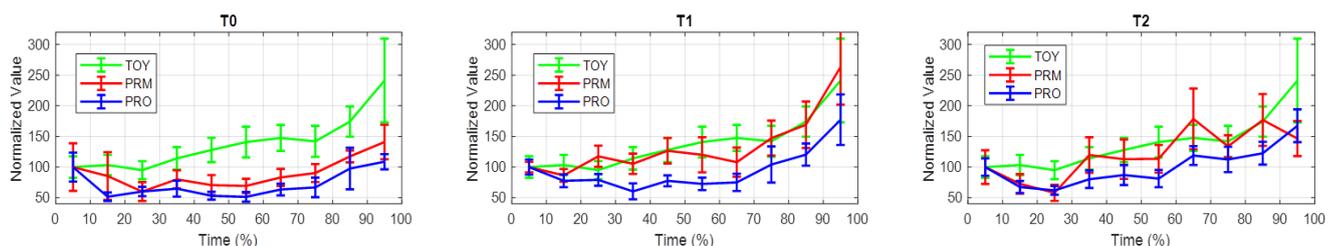


Figura 3.19: Valor medio  $\pm$  errore standard di firing rate, CoV del firing rate e CoV della forza delle Mu di ciascun gruppo nella contrazione affaticante al 50% MVC. Valori normalizzati rispetto al primo valore (Valori iniziali riportati in Tabella 3.2). Tempo normalizzato rispetto alla durata della prova: intervalli successivi pari al 10% della durata della prova. Confronto tra i gruppi di età diverse (TOY PRM PRO) nelle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2).

Variabile	Sessione	TOY	PRM	PRO
FIRING RATE (pps)	T0	12.45 $\pm$ 0.25	12.63 $\pm$ 0.29	11.34 $\pm$ 0.29
	T1	//	14.18 $\pm$ 0.29	12.58 $\pm$ 0.28
	T2	//	14.28 $\pm$ 0.35	12.34 $\pm$ 0.30
CoV FIRING RATE (%)	T0	20.30 $\pm$ 0.77	18.38 $\pm$ 0.81	17.16 $\pm$ 0.76
	T1	//	12.88 $\pm$ 0.58	12.06 $\pm$ 0.58
	T2	//	15.05 $\pm$ 0.61	12.78 $\pm$ 0.56
CoV FORCE (%)	T0	1.36 $\pm$ 0.24	3.63 $\pm$ 1.25	3.79 $\pm$ 0.80
	T1	//	2.18 $\pm$ 0.34	2.42 $\pm$ 0.28
	T2	//	2.96 $\pm$ 0.90	2.04 $\pm$ 0.28

Tabella 3.2: Valori iniziali di firing rate, CoV del firing rate e CoV della forza rispetto ai quali vengono normalizzati gli andamenti nel fatigue plot in Figura 3.19 per i 3 gruppi di età (TOY PRM PRO) nelle tre sessioni di acquisizione (T0 T1 T2).

Il seguito della trattazione sarà, quindi, finalizzato a quantificare in modo oggettivo le variazioni del firing rate appena descritte per i diversi gruppi nelle contrazioni affaticanti, introducendo lo **SLOPE** come metrica di riferimento per valutare la resistenza a fatica.

Si procede dunque analizzando l'andamento del firing rate delle singole unità motorie. Il 52% delle MUs sul totale di quelle analizzate ha mostrato un andamento bifasico del FR, sulla base dei 3 criteri dettagliati nella sezione *Materiali e Metodi*.

Nel grafico a barre in Figura 3.20 è mostrata la distribuzione di queste unità motorie come percentuale rispetto alle MUs di ciascun gruppo nelle singole sessioni (circa la metà in ciascuna condizione, con percentuali comprese tra il 41% e il 60%).

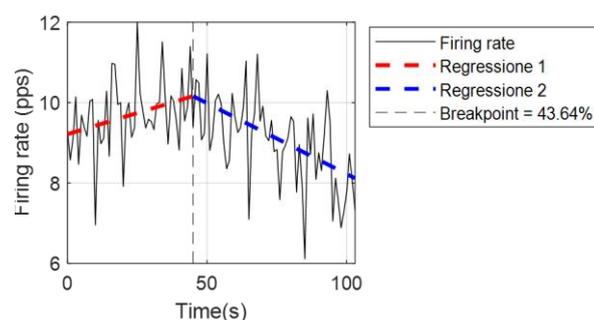


Figura 3.21: Esempio di andamento bifasico del FR.

L'andamento del FR in questi casi è stato descritto

con un **modello regressivo bilineare**, calcolando la

posizione del **BREAKPOINT** e i parametri delle rette (intercette e coefficienti angolari), come descritto precedentemente, ottenendo per ogni MU una rappresentazione come quella riportata in Figura 3.21 a scopo esemplificativo.

Nell'istogramma in Figura 3.22 viene rappresentata la posizione del **breakpoint** del firing rate delle MUs a carattere bifasico in termini percentuali rispetto alla durata della prova. In ciascun gruppo, l'intervallo percentuale compreso tra il 30% e il 40% del time to task failure risulta essere quello in cui si osserva la frequenza più elevata di occorrenze del breakpoint delle singole unità motorie, indicando una maggiore concentrazione in questa fase della contrazione affaticante. Tale risultato trova riscontro nell'analisi condotta da Martinez-Valdez [56], sulle MUs del vasto mediale e vasto laterale in una popolazione di età media 28 anni, nella quale è stato osservato il cambiamento di pendenza del FR al 40% del tempo di fallimento della prova.

Tuttavia, nei gruppi di mezza età e anziani si evidenzia un numero notevole di unità motorie nelle quali il breakpoint si manifesta in una fase avanzata della contrazione rispetto a quelle descritte finora (precisamente nell'intervallo 60-70%) e la percentuale di queste sul totale delle unità motorie del relativo gruppo cresce dai PRM ai PRO. Una possibile interpretazione di questo fenomeno è che, con l'invecchiamento, alcune unità motorie tendano a mantenere a lungo un pattern stabile di attivazione, per poi modificarsi solo nelle fasi finali della contrazione, a ridosso del

termine della prova. Un'ipotesi alternativa potrebbe essere che, nei gruppi PRM e PRO, il time to task failure registrato non coincida con il vero limite funzionale, ma rappresenti una soglia conservativa, determinata dalla tendenza dei soggetti più anziani a interrompere la prova in anticipo, in maniera cautelativa. La presenza di questo gruppo di MUs potrebbe, quindi, riflettere un margine di resistenza a fatica residuo non pienamente espresso, tuttavia queste considerazioni richiedono ulteriori approfondimenti e non consentono, allo stato attuale, di trarre conclusioni definitive.

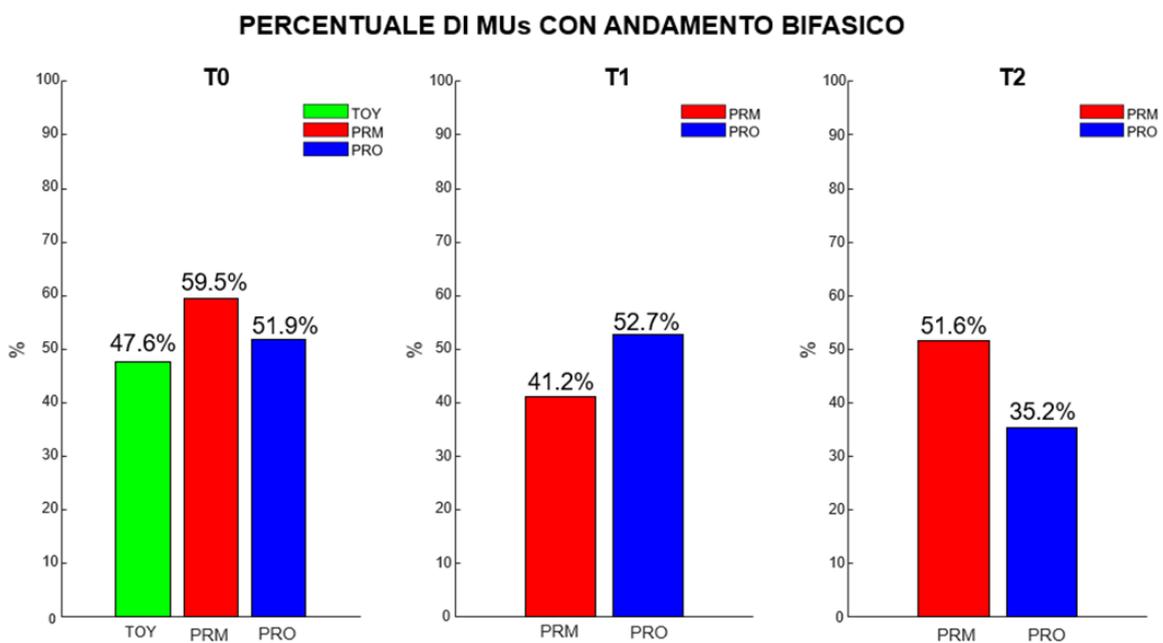


Figura 3.20: Percentuale di MU il cui firing rate mostra un andamento bifasico rispetto al totale delle MU analizzate per ciascun gruppo di età (TOY PRM PRO) nelle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2) per la contrazione affaticante al 50% MVC.

I dati relativi al gruppo TOY, acquisiti in un'unica sessione, vengono riportati solo in T0.

## DISTRIBUZIONE VALORI BREAKPOINT (% RISPETTO AL FAILURE POINT)

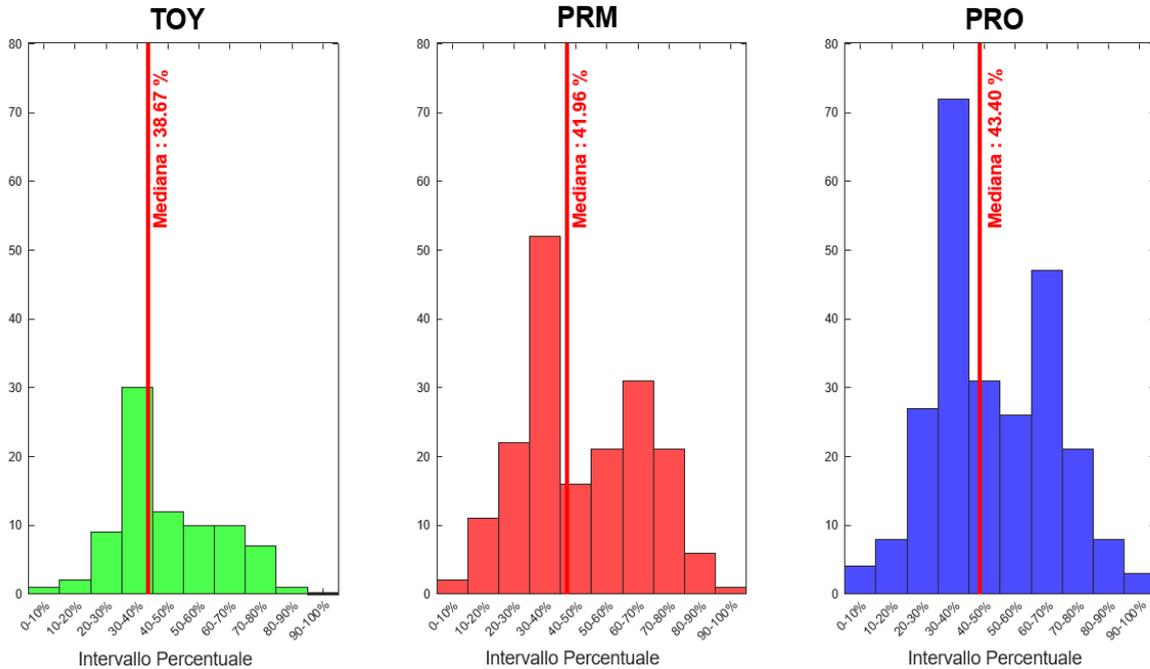


Figura 3.22: Posizione del breakpoint del firing rate delle MUs a carattere bifasico rispetto alla durata della prova, in termini di intervallo percentuale pari al 10% della durata della prova stessa. Confronto tra tre gruppi di età diverse (TOY PRM PRO). Dati relativi alle tre sessioni di acquisizione (TO T1 T2) aggregati.

Nel grafico in Figura 3.23 è rappresentata la relazione tra la durata della contrazione isometrica (asse x), intesa come il tempo fino al fallimento (time to task failure, TTF), e il momento di insorgenza del breakpoint, calcolato in due modi distinti: come inversione nel trend del firing rate (DR breakpoint) e come incremento della variabilità della forza (CoV FORCE breakpoint). L'obiettivo era verificare la presenza di una correlazione significativa tra questi due parametri e valutare se il momento del breakpoint potesse essere indicativo della durata di resistenza alla fatica da parte del soggetto.

Nei gruppi di mezza età (PRM) e anziani (PRO), entrambe le modalità di calcolo del breakpoint mostrano una forte correlazione positiva con la durata della prova, con valori di R compresi tra 0.66 e 0.70 e p-value altamente significativi ( $p < 0.01$ ), ad eccezione del caso relativo al CoV della forza per i PRO, nel quale la correlazione risulta più debole, ma comunque significativa. Questo suggerisce che, per questi gruppi, il momento in cui si verifica una variazione nel comportamento dell'unità motoria (sia essa nella frequenza di scarica che nella stabilità della forza) rappresenta un indicatore attendibile della durata di resistenza alla fatica. Inoltre, nei grafici PRM e PRO si osserva che le due rette di regressione (DR breakpoint e CoV FORCE breakpoint) risultano pressoché

sovrapponibili, suggerendo una coerenza tra gli indicatori centrali (modulazione del firing rate) e periferici (stabilità della forza) nella manifestazione della fatica.

Tale coerenza è stata riscontrata anche nel lavoro già citato di Martinez-Valdez [56], nel quale si riporta che le rette di regressione descrittive la correlazione tra il TTF e i punti di breakpoint calcolati su FR, CoV della forza e CoV del FR sono sovrapponibili per i soggetti analizzati.

Nel gruppo dei giovani (TOY), invece, sebbene la correlazione tra DR breakpoint e durata della contrazione sia comunque significativa ( $p < 0.001$ ), quella tra CoV FORCE breakpoint e TTF non lo è ( $p = 0.116$ ) e il coefficiente di correlazione risulta generalmente minore rispetto agli altri due gruppi ( $R = 0.53$ ). Inoltre, la retta di regressione relativa al CoV FORCE risulta spostata verso l'alto rispetto a quella calcolata sul FR, indicando che nei soggetti giovani l'incremento della variabilità della forza tende a comparire più tardivamente rispetto al cambiamento delle caratteristiche di sparo delle MUs. Questo potrebbe suggerire una maggiore capacità dei giovani di mantenere stabile la forza anche quando si verificano segnali centrali di fatica, riflettendo un migliore controllo neuromuscolare o una maggiore tolleranza allo sforzo.

Tuttavia, è necessario sottolineare che i dati relativi al gruppo TOY sono numericamente ridotti di circa un terzo rispetto agli altri due gruppi, essendo relativi ad una singola acquisizione su 10 soggetti; pertanto, la scarsa numerosità potrebbe inficiare i risultati sulla correlazione.

Questi risultati indicano che il breakpoint può rappresentare un buon predittore della capacità di resistenza alla fatica, soprattutto nei soggetti di mezza età e anziani, ma le differenze osservate tra i gruppi suggeriscono che i meccanismi sottostanti la fatica e le strategie di compensazione potrebbero variare con l'età, coinvolgendo in misura diversa i fattori centrali (FR) e periferici (CoV della forza).

## ENDURANCE TIME vs FR / CoV FORCE BREAKPOINT

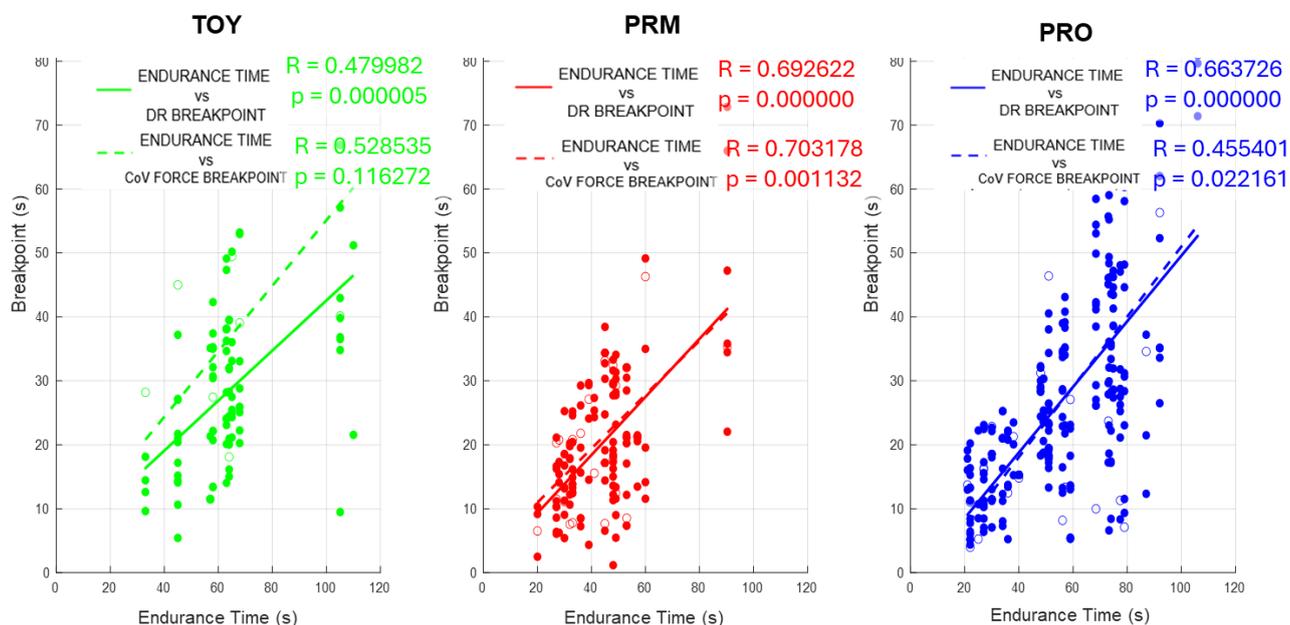


Figura 3.23: Correlazione tra il valore del breakpoint calcolato sul firing rate delle MU o sul CoV della forza e durata della prova in secondi. I marker pieni rappresentano le MU e si riferiscono alla regressione lineare rappresentata dalla linea continua relativa alla correlazione per il breakpoint calcolato sul FR. I marker vuoti rappresentano i soggetti e si riferiscono alla regressione lineare rappresentata dalla linea tratteggiata relativa alla correlazione per il breakpoint calcolato sul CoV della forza. Confronto tra tre gruppi di età diverse (TOY PRM PRO). Dati relativi alle tre sessioni di acquisizione (T0 T1 T2) aggregati. Viene riportato il coefficiente di correlazione di Pearson calcolato tra le due variabili correlate e il relativo p value.

L'individuazione del breakpoint e delle rette di regressione è funzionale a caratterizzare la dinamica del FR nei diversi gruppi in termini di slope. Viene calcolato quindi lo slope come variazione del firing rate al secondo, normalizzato sull'intercetta della retta di regressione (come descritto accuratamente nella sezione *Materiali e Metodi*).

Vengono considerate, per ciascuna unità motoria la fase precedente il BP e quella successiva, includendo anche le MU il cui FR mostra un comportamento lineare, per le quali lo slope è costante nelle due fasi, dunque sono state semplicemente considerate le due metà. I risultati sono riportati in figura, separando appunto le due fasi descritte, ma aggregando i dati relativi alle 3 sessioni di acquisizione, in quanto l'analisi dei singoli time point ha prodotto gli stessi esiti in termini di slope, con valori sovrapponibili che non differiscono dal punto di vista statistico, rendendoli di fatto assimilabili ai fini dell'interpretazione complessiva dello studio.

Per comprendere al meglio il significato fisico dei valori assunti dallo slope, è necessario associare i risultati riportati nel grafico in Figura 3.24 con gli andamenti del firing rate per i 3 gruppi descritti precedentemente e riportati in Figura 3.19. Infatti, il valore numerico dello slope, preso isolatamente, può risultare poco informativo rispetto alle reali dinamiche in atto. Ad esempio, uno slope leggermente positivo indica un modesto incremento della frequenza di scarica, mentre uno fortemente negativo riflette una marcata riduzione: dal punto di vista matematico il primo valore risulta maggiore del secondo, ma sul piano fisiologico la variazione è più consistente nel secondo caso. Allo stesso modo, considerare lo slope in termini assoluti consente di quantificare l'entità della variazione, ma annulla l'informazione sul verso del cambiamento (in aumento o in diminuzione). Pertanto, un'interpretazione corretta dello slope richiede di valutarne congiuntamente sia il segno che il valore, integrandolo con l'andamento complessivo del firing rate nel tempo: solo in questo modo è possibile attribuire un significato fisiologicamente coerente alle differenze osservate tra i gruppi.

Nella prima fase si rileva per i PRM un aumento del firing rate, che definisce quindi uno slope positivo e significativamente maggiore rispetto agli altri due gruppi, nei quali si ha mediamente una riduzione del FR (slope negativo o circa nullo). Nella seconda fase i valori assunti dallo slope per il gruppo TOY non differiscono sostanzialmente dalla prima (la mediana si attesta sempre intorno allo 0,2%/s), mentre per gli altri due gruppi si evidenzia un'incremento nella diminuzione del FR (lo slope assume valori mediamente più negativi). Mediamente PRM e PRO dopo il BP raggiungono valori di slope molto simili (la mediana per entrambi i gruppi è posta quasi a -0,3%/s), ma nel gruppo di mezza età c'è maggiore dispersione e questa variabilità intragruppo indica che la risposta neuromuscolare differisce tra le MU e da soggetto a soggetto; al contrario nei PRO si osserva che i dati sono più raccolti attorno al valore mediano: lo slope nei soggetti anziani diminuisce in maniera più uniforme e il decadimento è potenzialmente riconducibile ad effetti dell'invecchiamento neuromuscolare che interessano indistintamente tutte le MU. Infatti, soltanto lo slope dei PRO in questa fase, soggetto ad un decremento importante e più uniforme tra le diverse MU, è risultato minore rispetto ai TOY in maniera statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Riassumendo, dal punto di vista dell'andamento del FR, per i TOY si ha una diminuzione circa costante nelle due fasi, per i PRM è caratterizzato da un significativo aumento nella fase iniziale e un calo successivo difforme tra le varie MUs, mentre per i PRO inizialmente non si osserva una diminuzione importante, che interviene solo nella fase dopo il breakpoint, con rilevanza statistica rispetto ai TOY.

Concentrandosi sull'analisi della resistenza a fatica, lo slope può essere considerato un indice dell'affaticamento neuromuscolare a livello delle unità motorie, al pari dei descrittori riportati nell'introduzione, il cui andamento caratterizza lo sviluppo della fatica a livello del segnale elettromiografico nel tempo o in frequenza [90]. Interpretando i risultati relativi allo slope in questa prospettiva, si può affermare che, nella fase precedente al breakpoint, i soggetti PRM mostrano una maggiore resistenza alla fatica; mentre nella fase successiva al breakpoint, solo il gruppo PRO, come indicato dal calo marcato dello slope, manifesta un affaticamento significativamente più pronunciato rispetto a quanto osservato negli under-30.

Infine, l'analisi condotta sullo slope delle unità motorie distinte per soglie di reclutamento non ha prodotto esiti ulteriormente informativi (riportati in figura insieme ai risultati sugli slope complessivi dei vari gruppi). L'unico aspetto rilevante risiede nel significativo aumento del FR delle low-threshold MUs dei PRM rispetto alle high threshold: il complessivo aumento del FR discusso finora sarebbe principalmente dovuto al contributo delle unità motorie a bassa soglia.

Volendo fornire una spiegazione dal punto di vista fisiologico, questi risultati sono ancora una volta riconducibili al processo di neurorimodellamento: per i PRM si evidenziano effetti positivi che influenzano una maggior resistenza alla fatica (almeno nella fase iniziale) potenzialmente riconducibili alla prevalenza di fibre di tipo I, conseguente al reinnervamento che interviene con l'invecchiamento [77], [85]. Inoltre, essendo noto che tali processi compensatori sono sempre meno efficaci con l'avanzare dell'età, portando alla definitiva perdita di innervazione di alcune fibre muscolari che risultano quindi inattive, è possibile supporre che i muscoli dei PRO siano ormai sarcopenici, pertanto abbiano una minor resistenza alla fatica rispetto ai muscoli pre-sarcopenici dei PRM e dei TOY [106].

Questo risultato suggerisce la presenza di effetti di rimodellamento neurale favorevoli alla resistenza alla fatica nei soggetti di mezza età, ma non evidenti nei più anziani.

Le evidenze riscontrate trovano supporto nello studio di Allman-Rice del 2002 [85], nel quale si riporta che *"middle-aged adults may preserve certain aspects of muscle function better than younger or older adults, especially in isometric tasks"*. Ciò suggerisce che la funzione neuromuscolare nei soggetti di mezza età può rimanere relativamente intatta e talvolta mostrare una maggiore efficienza nelle contrazioni isometriche affaticanti. Tuttavia, si evidenzia anche che, sebbene in task isometrici submassimali prolungati sia stata osservata una maggior resistenza alla fatica, in esercizi più intensi o prolungati possono verificarsi esiti diversi a causa di fattori periferici legati all'invecchiamento (es. minore perfusione muscolare, perdita di unità motorie); inoltre si sottolinea l'importanza di tenere in considerazione possibili fattori confondenti come il progressivo

adattamento del soggetto al compito, lo stato di attività fisica e il genere nel confronto dell'affaticabilità.

In letteratura, diversi studi hanno evidenziato risultati a sostegno dell'ipotesi secondo cui l'invecchiamento potrebbe essere associato a un miglioramento relativo della resistenza alla fatica muscolare.

Inoltre è importante considerare anche gli aspetti metabolici che, insieme ai cambiamenti neuromuscolari, incidono sugli effetti dell'invecchiamento nella resistenza a fatica. Lo studio di Kent-Braun et al. (2002) [80] ha riportato che, durante contrazioni isometriche prolungate, i soggetti più giovani mostravano un incremento significativamente maggiore nei livelli intracellulari di fosfato inorganico e fosfato diidrogeno, accompagnato da una riduzione più marcata del pH rispetto agli adulti più anziani (di età compresa tra 65 e 80 anni). Tali risposte metaboliche indicano una maggiore dipendenza da vie anaerobiche per la produzione di ATP nei giovani, mentre negli anziani sembra prevalere un metabolismo più orientato all'utilizzo di fonti ossidative. Questo profilo metabolico, più efficiente dal punto di vista del mantenimento dell'omeostasi durante l'esercizio, potrebbe contribuire alla maggiore resistenza alla fatica osservata con l'avanzare dell'età.

In generale, dal confronto con la letteratura emerge che i cambiamenti associati all'invecchiamento (quali il rimodellamento delle unità motorie menzionato, le modificazioni nella struttura muscolare, le alterazioni nel controllo centrale, nella trasmissione neuromuscolare, nei meccanismi di accoppiamento eccitazione-contrazione e nel metabolismo muscolare) possano in alcuni casi contribuire a una maggiore resistenza alla fatica negli anziani, ma le evidenze disponibili indicano che tali effetti non sono uniformi. L'affaticabilità muscolare nell'invecchiamento non può infatti essere definita in termini assoluti, ma varia in funzione della natura del compito svolto, rendendo necessaria una valutazione specifica per ciascun tipo di esercizio.

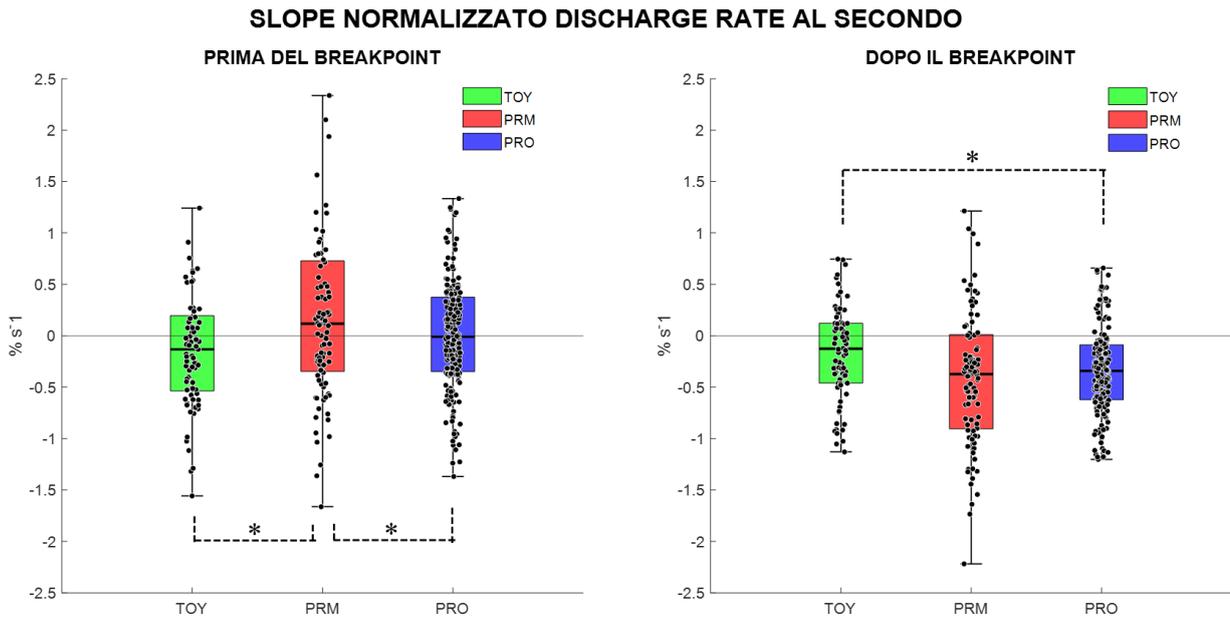


Figura 3.24: Valutazione, tramite boxplot, dello slope del firing rate delle MU di ciascun gruppo prima e dopo il breakpoint nelle contrazioni affaticanti al 50% MVC. Confronto tra i gruppi di età diverse (TOY PRM PRO). Dati relativi alle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2) aggregati.

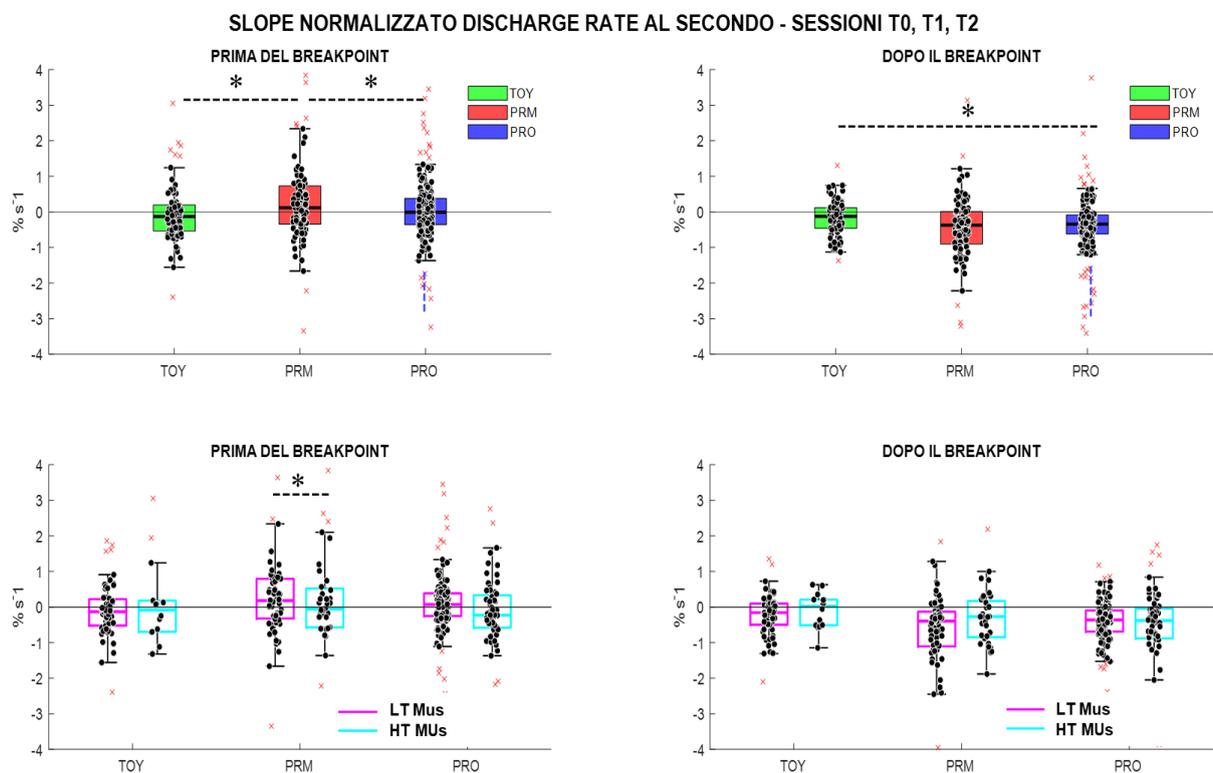


Figura 3.25: Valutazione, tramite boxplot, dello slope del firing rate delle MU di ciascun gruppo divise in Low Threshold (LT Mus: reclutate nel range di forza 0-30%) e High Threshold (HT Mus: reclutate nel range di forza 30-50%) prima e dopo il breakpoint nelle contrazioni affaticanti al 50% MVC. Confronto tra i gruppi di età diverse (TOY PRM PRO). Dati relativi alle 3 sessioni di acquisizione (T0 T1 T2) aggregati.

## 4 Conclusioni

Il presente studio si inserisce all'interno del progetto Trajector-AGE con l'obiettivo di indagare le modificazioni del comportamento delle unità motorie legate all'età, mediante l'uso dell'elettromiografia di superficie ad alta densità, tecnica che ha consentito di acquisire informazioni dettagliate sull'attività neuromuscolare a partire dal segnale EMG prelevato in maniera non invasiva mediante una griglia di elettrodi.

Attraverso l'acquisizione di segnali HD-sEMG dal muscolo vasto laterale durante contrazioni isometriche, e la successiva decomposizione del segnale, è stato possibile identificare il timing di attivazione delle singole MU e analizzare le loro caratteristiche di scarica (in particolare il firing rate).

L'elaborazione dei segnali è stata finalizzata a tre obiettivi principali:

- 1) descrivere le alterazioni nel comportamento delle MU in contrazioni "a rampa",
- 2) valutare le conseguenze funzionali sulla modulazione della forza,
- 3) analizzare la resistenza alla fatica in relazione all'età.

Il disegno sperimentale ha previsto sia un confronto trasversale tra soggetti di età differente – giovani (TOY), adulti di mezza età (PRM) e anziani (PRO) – sia un approccio longitudinale, con tre sessioni sperimentali distribuite nell'arco di un anno, per analizzare l'evoluzione intra-individuale nel tempo.

Riassumendo i principali risultati ottenuti nello studio, in merito alle alterazioni delle caratteristiche di sparo delle MU nelle contrazioni isometriche a rampa (obiettivo 1), è stata riscontrata una significativa **riduzione della dinamica del firing rate nei soggetti anziani**.

L'analisi delle contrazioni isometriche a rampa ha evidenziato una riduzione della dinamica del FR nei soggetti anziani (PRO) rispetto agli adulti di mezza età (PRM). Tale riduzione è emersa in modo consistente:

- Il FR medio dei PRO nella fase di plateau della contrazione è risultato significativamente più basso rispetto ai PRM in tutte le sessioni.
- Durante la fase di incremento della forza, i PRO hanno mostrato un aumento limitato del FR, con evidenza di saturazione precoce del FR per tutte le fasce di MU, raggiungendo valori inferiori a quelli dei PRM.
- Inoltre, nei PRO è apparso meno evidente il fenomeno di "onion skin" – tipico profilo di

scarica dove le MU reclutate precocemente mantengono un FR maggiore – mentre nei TOY era ben riconoscibile.

Queste osservazioni trovano riscontro in letteratura [8], [44], [45], [96], confermando la tendenza alla riduzione del FR con l'invecchiamento.

La riduzione del FR osservata nei soggetti anziani interviene nel guadagno tra input neurale e output motorio (obiettivo 2), determinando **limitazioni nella modulazione della forza da parte del comando neurale**.

La seconda parte dello studio, infatti, ha indagato la relazione tra variazione di FR e variazione di forza dal reclutamento alla fase di tenuta. I risultati hanno mostrato che, a parità di incremento relativo di forza (%MVC), i soggetti anziani mostrano variazioni inferiori del FR.

Tale risultato conferma la minor capacità dei soggetti anziani di modulare la forza, già osservata in studi precedenti. In particolare, Watanabe [10] ha riportato un incremento più contenuto del FR con l'aumentare del livello di forza nei soggetti anziani rispetto ai giovani. La metodologia adottata in questo studio, che stima il guadagno neuromuscolare in modo simile a quanto fatto da Casolo [89] per soggetti allenati e non allenati, rappresenta un contributo innovativo, applicando tale approccio per la prima volta alla popolazione anziana.

Infine, lo studio del comportamento a fatica (obiettivo 3) suggerisce la presenza di **effetti di rimodellamento neurale favorevoli alla resistenza alla fatica nei soggetti di mezza età, ma non evidenti nei più anziani**.

L'analisi delle contrazioni affaticanti ha evidenziato un andamento bifasico del FR nel tempo, confermando quanto osservato da Martinez-Valdez [56] limitatamente ad una popolazione di soggetti giovani. Tuttavia, il comportamento differiva tra i gruppi, che hanno mostrato divergenze nella risposta neuromuscolare all'affaticamento, stimata mediante il calcolo dello slope.

Nei PRM, nella fase pre-breakpoint, si è osservato un aumento del FR con slope significativamente maggiore rispetto a TOY e PRO, suggerendo un adattamento favorevole alla resistenza alla fatica.

Nella fase post-breakpoint, il gruppo TOY ha mantenuto uno slope stabile, mentre PRM e PRO hanno mostrato un aumento significativo dello slope in direzione negativa (ossia una diminuzione del FR) rispetto alla fase precedente, ma nel confronto trasversale il calo è significativo solo per PRO rispetto ai TOY. Questo suggerisce che nella seconda parte della contrazione i PRO sono maggiormente affaticati rispetto ai TOY, ma non si rilevano differenze statisticamente significative tra TOY e PRM.

Questi dati suggeriscono che nei soggetti di mezza età possa essere presente un meccanismo compensatorio responsabile di una maggior resistenza alla fatica (almeno nella fase iniziale della contrazione), probabilmente legato a una prevalenza di fibre resistenti alla fatica (tipo I), per effetto del processo di neurorimodellamento. Nei soggetti anziani, invece, la minor resistenza nella fase avanzata della contrazione potrebbe essere ricondotta a una minore efficacia dei processi di reinnervazione, tipici dei muscoli sarcopenici.

In conclusione, in questo studio sono stati ottenuti risultati rilevanti nel confronto trasversale tra i gruppi di età diverse, che da un lato trovano riscontro in letteratura negli articoli citati, dall'altro costituiscono uno sviluppo nello studio di fenomeni fisiologici già noti, coinvolti nella modulazione della forza e nella resistenza a fatica, ma non ancora approfonditi su una popolazione in età avanzata: questo rappresenta l'elemento innovativo dello studio.

L'approccio longitudinale, sebbene limitato a un arco temporale di un anno, ha permesso di distinguere tra effetti legati all'età e variazioni individuali, evidenziando l'utilità di questo disegno sperimentale nello studio dell'invecchiamento. Tuttavia, sarà necessario un periodo di osservazione più esteso per delineare in modo affidabile le traiettorie individuali del declino neuromuscolare.

In prospettiva, l'integrazione dei dati neuromuscolari, ottenuti dallo studio delle unità motorie, con informazioni funzionali e metaboliche a livello muscolare e cellulare (come previsto dal progetto Trajector-Age), potrà estendere l'attuale comprensione dei determinanti fisiologici delle alterazioni neuromuscolari nell'invecchiamento, contribuendo all'identificazione di fattori predittivi e potenziali target di intervento per il mantenimento dell'autonomia funzionale negli anziani.

## Bibliografia

- [1] ISTAT - Istituto Nazionale di Statistica, *Rapporto annuale 2025 - Capitolo 2: Il quadro demografico*, Roma, 2025. [Online]. Available: <https://www.istat.it/wp-content/uploads/2025/05/RA-2025-Capitolo-2.pdf>
- [2] Istituto Nazionale di Statistica, "Indicatori demografici," ISTAT. Accessed: Feb. 20, 2024. [Online]. Available: [http://dati.istat.it/index.aspx?datasetcode=dcis\\_inddemog1](http://dati.istat.it/index.aspx?datasetcode=dcis_inddemog1)
- [3] L. Ferrucci *et al.*, «Change in Muscle Strength Explains Accelerated Decline of Physical Function in Older Women With High Interleukin-6 Serum Levels», *J American Geriatrics Society*, vol. 50, fasc. 12, pp. 1947–1954, dic. 2002, doi: 10.1046/j.1532-5415.2002.50605.x.
- [4] F. Lauretani *et al.*, «Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia», *Journal of Applied Physiology*, vol. 95, fasc. 5, pp. 1851–1860, nov. 2003, doi: 10.1152/jappphysiol.00246.2003.
- [5] E. J. Metter, L. A. Talbot, M. Schrager, e R. Conwit, «Skeletal Muscle Strength as a Predictor of All-Cause Mortality in Healthy Men», *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, vol. 57, fasc. 10, pp. B359–B365, ott. 2002, doi: 10.1093/gerona/57.10.b359.
- [6] E. J. Metter, L. A. Talbot, M. Schrager, e R. A. Conwit, «Arm-cranking muscle power and arm isometric muscle strength are independent predictors of all-cause mortality in men», *Journal of Applied Physiology*, vol. 96, fasc. 2, pp. 814–821, feb. 2004, doi: 10.1152/jappphysiol.00370.2003.
- [7] W. R. Frontera, V. A. Hughes, R. A. Fielding, M. A. Fiatarone, W. J. Evans, e R. Roubenoff, «Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study», *Journal of Applied Physiology*, vol. 88, fasc. 4, pp. 1321–1326, apr. 2000, doi: 10.1152/jappl.2000.88.4.1321.
- [8] M. Piasecki, A. Ireland, D. Stashuk, A. Hamilton-Wright, D. A. Jones, and J. S. McPhee, "Age-related neuromuscular changes affecting human vastus lateralis," *Journal of Physiology*, vol. 594, no. 16, pp. 4525–4536, Aug. 2016, doi: 10.1113/JP271087.
- [9] A. A. Vandervoort, «Aging of the human neuromuscular system», *Muscle and Nerve*, vol. 25, fasc. 1, pp. 17–25, gen. 2002, doi: 10.1002/mus.1215.
- [10] K. Watanabe, A. Holobar, M. Kouzaki, M. Ogawa, H. Akima, and T. Moritani, "Age-related changes in motor unit firing pattern of vastus lateralis muscle during low-moderate contraction," *Age (Omaha)*, vol. 38, no. 3, 2016, doi: 10.1007/s11357-016-9915-0.
- [11] M. R. Deschenes, «Effects of Aging on Muscle Fibre Type and Size», *Sports Medicine*, vol. 34, fasc. 12, pp. 809–824, 2004, doi: 10.2165/00007256-200434120-00002.

- [12] M. R. Roos, C. L. Rice, D. M. Connelly, e A. A. Vandervoort, «Quadriceps muscle strength, contractile properties, and motor unit firing rates in young and old men», *Muscle Nerve*, vol. 22, fasc. 8, pp. 1094–1103, ago. 1999, doi: 10.1002/(sici)1097-4598(199908)22:8<1094::aid-mus14>3.0.co;2-g.
- [13] N. P. Wages *et al.*, “Reductions in Motor Unit Firing are Associated with Clinically Meaningful Leg Extensor Weakness in Older Adults,” *Calcif Tissue Int*, vol. 114, no. 1, pp. 9–23, Jan. 2024, doi: 10.1007/s00223-023-01123-x.
- [14] A. E. Smith, M. C. Ridding, R. D. Higgins, G. A. Wittert, and J. B. Pitcher, “Age-related changes in short-latency motor cortex inhibition,” *Exp Brain Res*, vol. 198, no. 4, pp. 489–500, 2009, doi: 10.1007/s00221-009-1945-8.
- [15] K. Mukund and S. Subramaniam, “Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease,” *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, vol. 12, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1002/wsbm.1462.
- [16] Wayne Scott, Jennifer Stevens, Stuart A, and Binder–Macleod, “Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications,” *Phys Ther*, vol. 81, no. 11, pp. 1810–1816, Nov. 2001, Accessed: Mar. 01, 2024. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1093/ptj/81.11.1810>
- [17] R. H. Fitts, “Fatigue Mechanisms Determining Exercise Performance The cross-bridge cycle and skeletal muscle fatigue,” *J Appl Physiol*, vol. 104, pp. 551–558, 2008, doi: 10.1152/jappphysiol.01200.2007.
- [18] W. R. Frontera and J. Ochala, “Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function,” *Calcif Tissue International*, vol. 96, no. 3, pp. 183–195, Mar. 2015, doi: 10.1007/s00223-014-9915-y.
- [19] K. Mukund and S. Subramaniam, “Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease,” *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, vol. 12, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1002/wsbm.1462.
- [20] D. Burke and J. Howells, *The motor unit*. Oxford Textbook of Clinical Neurophysiology, 2017.
- [21] M. Raghavan, D. Fee, and P. E. Barkhaus, “Generation and propagation of the action potential,” in *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 160, Elsevier B.V., 2019, pp. 3–22. doi: 10.1016/B978-0-444-64032-1.00001-1.
- [22] D. Farina, D. F. Stegeman, and R. Merletti, *Surface Electromyography : Physiology, Engineering, and Applications*. Wiley Online Library, 2016. Accessed: Mar. 02, 2024. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1002/9781119082934.ch02>
- [23] C. J. De Luca, «Physiology and Mathematics of Myoelectric Signals», *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. BME-26, fasc. 6, pp. 313–325, giu. 1979, doi: 10.1109/tbme.1979.326534.
- [24] R. Merletti and G. L. Cerone, “Tutorial. Surface EMG detection, conditioning and pre-processing: Best practices,” *Journal of Electromyography and Kinesiology*, vol. 54, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.jelekin.2020.102440.
- [25] M. A. Cavalcanti Garcia and T. Vieira, “Surface electromyography: Why, when and how to use it,” *Rev Andal Med Deport*, vol. 4, pp. 17–28, Mar. 2011.

- [26] R. Merletti, M. Avenaggiato, A. Botter, A. Holobar, H. Marateb, e T. M. M. Vieira, «Advances in Surface EMG: Recent Progress in Detection and Processing Techniques», *Crit Rev Biomed Eng*, vol. 38, fasc. 4, pp. 305–345, 2010, doi: 10.1615/critrevbiomedeng.v38.i4.10.
- [27] R. Merletti e S. Muceli, «Tutorial. Surface EMG detection in space and time: Best practices», *Journal of Electromyography and Kinesiology*, vol. 49, p. 102363, dic. 2019, doi: 10.1016/j.jelekin.2019.102363.
- [28] R. Merletti, T. Vieira, and D. Farina, “Techniques for Information Extraction from the Surface EMG Signalhigh-Density Surface EMG,” in *Surface Electromyography: Physiology, Engineering and Applications*, 2016, pp. 126–157. doi: 10.1002/9781119082934.ch05.
- [29] F. Negro, S. Muceli, A. M. Castronovo, A. Holobar, e D. Farina, «Multi-channel intramuscular and surface EMG decomposition by convolutive blind source separation», *J. Neural Eng.*, vol. 13, fasc. 2, p. 026027, apr. 2016, doi: 10.1088/1741-2560/13/2/026027.
- [30] E. Martinez-Valdes, F. Negro, C. M. Laine, D. Falla, F. Mayer, e D. Farina, «Tracking motor units longitudinally across experimental sessions with high-density surface electromyography», *The Journal of Physiology*, vol. 595, fasc. 5, pp. 1479–1496, mar. 2017, doi: 10.1113/jp273662.
- [31] D. Farina, F. Negro, M. Gazzoni, and R. M. Enoka, “Detecting the Unique Representation of Motor-Unit Action Potentials in the Surface Electromyogram,” *J Neurophysiol*, vol. 100, no. 3, pp. 1223–1233, 2008, doi: 10.1152/jn.90219.2008.
- [32] A. Holobar, D. Farina, and D. Zazula, “Surface EMG Decomposition,” in *Surface Electromyography: Physiology, Engineering and Applications*, Wiley-IEEE Press, 2016, pp. 180–209. doi: 10.1002/9781119082934.ch07.
- [33] A. Holobar and D. Farina, “Blind source identification from the multichannel surface electromyogram,” *Physiol Meas*, vol. 35, no. 7, pp. R143–R165, 2014, doi: 10.1088/0967-3334/35/7/R143.
- [34] M. Gazzoni, D. Farina, and R. Merletti, “A new method for the extraction and classification of single motor unit action potentials from surface EMG signals,” *J Neurosci Methods*, vol. 136, no. 2, pp. 165–177, Jul. 2004, doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.01.002.
- [35] A. Holobar and D. Zazula, “Multichannel Blind Source Separation Using Convolution Kernel Compensation,” *Signal Processing, IEEE Transactions on*, vol. 55, pp. 4487–4496, Mar. 2007, doi: 10.1109/TSP.2007.896108.
- [36] A. Holobar and D. Zazula, “Gradient convolution kernel compensation applied to surface electromyograms,” *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, vol. 4666 LNCS, pp. 617–624, 2007, doi: 10.1007/978-3-540-74494-8\_77.
- [37] B. Bordoni and M. Varacallo, *Anatomy, bony pelvis and lower limb, thigh quadriceps muscle*. Treasure Island (FL): StatPearls , 2023.
- [38] M. R. Roos, C. L. Rice, e A. A. Vandervoort, «Age-related changes in motor unit function», *Muscle Nerve*, vol. 20, fasc. 6, pp. 679–690, giu. 1997, doi: 10.1002/(sici)1097-4598(199706)20:6<679::aid-mus4>3.0.co;2-5.

- [39] R. M. Nelson, G. L. Soderberg, e N. L. Urbscheit, «Comparison of skeletal muscle motor unit discharge characteristics in young and aged humans», *Archives of Gerontology and Geriatrics*, vol. 2, fasc. 3, pp. 255–264, nov. 1983, doi: 10.1016/0167-4943(83)90029-8.
- [40] R. M. Nelson, G. L. Soderberg, e N. L. Urbscheit, «Alteration of Motor-Unit Discharge Characteristics in Aged Humans», *Physical Therapy*, vol. 64, fasc. 1, pp. 29–34, gen. 1984, doi: 10.1093/ptj/64.1.29.
- [41] A. Adam e C. J. De Luca, «Firing rates of motor units in human vastus lateralis muscle during fatiguing isometric contractions», *Journal of Applied Physiology*, vol. 99, fasc. 1, pp. 268–280, lug. 2005, doi: 10.1152/jappphysiol.01344.2004.
- [42] F. Hug *et al.*, «Analysis of motor unit spike trains estimated from high-density surface electromyography is highly reliable across operators», *Journal of Electromyography and Kinesiology*, vol. 58, p. 102548, giu. 2021, doi: 10.1016/j.jelekin.2021.102548.
- [43] W. Kraemer and D. Looney, “Underlying Mechanisms and Physiology of Muscular Power”, *Strength Cond J*, vol. 34, pp. 13–19, Mar. 2012, doi: 10.1519/SSC.0b013e318270616d.
- [44] L. Masiero, “Analisi elettromiografica ad alta densità per lo studio dell’attività delle unità motorie durante esercizio fisico,” Tesi di Laurea Magistrale, Università degli Studi di Padova, Padova, 2023. [Online]. Available: [https://thesis.unipd.it/retrieve/4c712734-c512-4288-bd3f-09e4fd2c5f6a/MASIERO\\_LORENZO.pdf](https://thesis.unipd.it/retrieve/4c712734-c512-4288-bd3f-09e4fd2c5f6a/MASIERO_LORENZO.pdf)
- [45] L. B. R. Orssatto, D. N. Borg, L. Pendrith, A. J. Blazevich, A. J. Shield, e G. S. Trajano, «Do motoneuron discharge rates slow with aging? A systematic review and meta-analysis», *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 203, p. 111647, apr. 2022, doi: 10.1016/j.mad.2022.111647.
- [46] S. M. Ling, R. A. Conwit, L. Ferrucci, e E. J. Metter, «Age-Associated Changes in Motor Unit Physiology: Observations From the Baltimore Longitudinal Study of Aging», *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, vol. 90, fasc. 7, pp. 1237–1240, lug. 2009, doi: 10.1016/j.apmr.2008.09.565.
- [47] W. R. Frontera *et al.*, “Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study,” *J Appl Physiol*, vol. 88, pp. 1321–1326, 2000, doi: 10.1152/jappphysiol.2000.88.4.1321.
- [48] K. Watanabe, M. Kouzaki, R. Merletti, M. Fujibayashi, e T. Moritani, «Spatial EMG potential distribution pattern of vastus lateralis muscle during isometric knee extension in young and elderly men», *Journal of Electromyography and Kinesiology*, vol. 22, fasc. 1, pp. 74–79, feb. 2012, doi: 10.1016/j.jelekin.2011.09.010.
- [49] A. Del Vecchio, A. Holobar, D. Falla, F. Felici, R. M. Enoka, and D. Farina, “Tutorial: Analysis of motor unit discharge characteristics from high-density surface EMG signals,” *Journal of Electromyography and Kinesiology*, vol. 53, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.jelekin.2020.102426.
- [50] T. Cattagni, G. Scaglioni, C. Cornu, G. Berrut, e A. Martin, «What are the effects of the aging of the neuromuscular system on postural stability?», *Gériatrie et Psychologie Neuropsychiatrie du Vieillessement*, vol. 13, fasc. 4, pp. 363–380, dic. 2015, doi: 10.1684/pnv.2015.0570.

- [51] M. J. Kurz e N. Stergiou, «The aging humans neuromuscular system expresses less certainty for selecting joint kinematics during gait», *Neuroscience Letters*, vol. 348, fasc. 3, pp. 155–158, set. 2003, doi: 10.1016/s0304-3940(03)00736-5.
- [52] A. Pradhan, G. Malagon, R. Lagacy, V. Chester, e U. Kuruganti, «Effect of age and sex on strength and spatial electromyography during knee extension», *J Physiol Anthropol*, vol. 39, fasc. 1, dic. 2020, doi: 10.1186/s40101-020-00219-9.
- [53] Z. Erim, M. F. Beg, D. T. Burke, e C. J. De Luca, «Effects of Aging on Motor-Unit Control Properties», *Journal of Neurophysiology*, vol. 82, fasc. 5, pp. 2081–2091, nov. 1999, doi: 10.1152/jn.1999.82.5.2081.
- [54] S. J. Welsh, D. V. Dinunno, e B. L. Tracy, «Variability of quadriceps femoris motor neuron discharge and muscle force in human aging», *Exp Brain Res*, vol. 179, fasc. 2, pp. 219–233, mag. 2007, doi: 10.1007/s00221-006-0785-z.
- [55] N. P. Wages *et al.*, «Reductions in Motor Unit Firing are Associated with Clinically Meaningful Leg Extensor Weakness in Older Adults», *Calcif Tissue Int*, vol. 114, fasc. 1, pp. 9–23, ago. 2023, doi: 10.1007/s00223-023-01123-x.
- [56] E. Martinez-Valdes, F. Negro, D. Falla, J. L. Dideriksen, C. J. Heckman, e D. Farina, «Inability to increase the neural drive to muscle is associated with task failure during submaximal contractions», *Journal of Neurophysiology*, vol. 124, fasc. 4, pp. 1110–1121, ott. 2020, doi: 10.1152/jn.00447.2020.
- [57] O. B. Nielsen e A. P. Harrison, «The regulation of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> pump in contracting skeletal muscle», *Acta Physiologica Scandinavica*, vol. 162, fasc. 3, pp. 191–200, feb. 1998, doi: 10.1046/j.1365-201x.1998.00297.x.
- [58] G. Sjøgaard, «Potassium and fatigue: the pros and cons», *Acta Physiologica Scandinavica*, vol. 156, fasc. 3, pp. 257–264, mar. 1996, doi: 10.1046/j.1365-201x.1996.207000.x.
- [59] J. K. Linderman e K. L. Gosselink, «The Effects of Sodium Bicarbonate Ingestion on Exercise Performance», *Sports Medicine*, vol. 18, fasc. 2, pp. 75–80, ago. 1994, doi: 10.2165/00007256-199418020-00001.
- [60] A. Mannion, P. Jakeman, e P. Willan, «Skeletal muscle buffer value, fibre type distribution and high intensity exercise performance in man», *Experimental Physiology*, vol. 80, fasc. 1, pp. 89–101, gen. 1995, doi: 10.1113/expphysiol.1995.sp003837.
- [61] R. Meeusen e K. De Meirleir, «Exercise and Brain Neurotransmission», *Sports Medicine*, vol. 20, fasc. 3, pp. 160–188, set. 1995, doi: 10.2165/00007256-199520030-00004.
- [62] R. K. Dishman, «Brain monoamines, exercise, and behavioral stress: animal models», *Medicine & Science in Sports & Exercise*, vol. 29, fasc. 1, pp. 63–74, gen. 1997, doi: 10.1097/00005768-199701000-00010.
- [63] Seguin, Liscia, Guezennec, e Fillion, «Effects of moderate and intensive training on functional activity of central 5-HT<sub>1B</sub> receptors in the rat substantia nigra», *Acta Physiologica Scandinavica*, vol. 162, fasc. 1, pp. 63–68, gen. 1998, doi: 10.1046/j.1365-201x.1998.0270f.x.

- [64] M. M. Lorist, D. Kernell, T. F. Meijman, e I. Zijdewind, «Motor fatigue and cognitive task performance in humans», *The Journal of Physiology*, vol. 545, fasc. 1, pp. 313–319, nov. 2002, doi: 10.1113/jphysiol.2002.027938.
- [65] A. Rainoldi, M. Nazzaro, R. Merletti, D. Farina, I. Caruso, e S. Gaudenti, «Geometrical factors in surface EMG of the vastus medialis and lateralis muscles», *Journal of Electromyography and Kinesiology*, vol. 10, fasc. 5, pp. 327–336, ott. 2000, doi: 10.1016/s1050-6411(00)00024-9.
- [66] R. Merletti, *Elementi di elettromiografia di superficie*. Torino, Italia: Cooperativa Libreria Universitaria Torinese (CLUT), 2000.
- [67] C. J. De Luca, «Myoelectrical manifestations of localized muscular fatigue in humans», *Crit Rev Biomed Eng*, vol. 11, fasc. 4, pp. 251–279, 1984.
- [68] M. Cifrek, V. Medved, S. Tonković, e S. Ostojić, «Surface EMG based muscle fatigue evaluation in biomechanics», *Clinical Biomechanics*, vol. 24, fasc. 4, pp. 327–340, mag. 2009, doi: 10.1016/j.clinbiomech.2009.01.010.
- [69] R. Merletti, M. Knaflitz, e C. J. De Luca, «Myoelectric manifestations of fatigue in voluntary and electrically elicited contractions», *Journal of Applied Physiology*, vol. 69, fasc. 5, pp. 1810–1820, nov. 1990, doi: 10.1152/jappl.1990.69.5.1810.
- [70] D. Earles, V. Vardaxis, e D. Koceja, «Regulation of motor output between young and elderly subjects», *Clinical Neurophysiology*, vol. 112, fasc. 7, pp. 1273–1279, lug. 2001, doi: 10.1016/s1388-2457(01)00571-5.
- [71] A. Eisen, M. Entezari-Taher, e H. Stewart, «Cortical projections to spinal motoneurons: Changes with aging and amyotrophic lateral sclerosis», *Neurology*, vol. 46, fasc. 5, pp. 1396–1396, mag. 1996, doi: 10.1212/wnl.46.5.1396.
- [72] D. Powell, P. DeVita, e T. Hortobagyi, «Inertial Loading during Gait Evokes Unique Neuromuscular Adaptations in Old Adults», *Percept Mot Skills*, vol. 107, fasc. 3, pp. 881–892, dic. 2008, doi: 10.2466/pms.107.3.881-892.
- [73] A. Oliviero *et al.*, «Effects of aging on motor cortex excitability», *Neuroscience Research*, vol. 55, fasc. 1, pp. 74–77, mag. 2006, doi: 10.1016/j.neures.2006.02.002.
- [74] G. Scaglioni, M. V. Narici, N. A. Maffiuletti, M. Pensini, e A. Martin, «Effect of ageing on the electrical and mechanical properties of human soleus motor units activated by the H reflex and M wave», *The Journal of Physiology*, vol. 548, fasc. 2, pp. 649–661, apr. 2003, doi: 10.1113/jphysiol.2002.032763.
- [75] M. Tsuruike, D. M. Koceja, K. Yabe, e N. Shima, «Age comparison of H-reflex modulation with the Jendrassik maneuver and postural complexity», *Clinical Neurophysiology*, vol. 114, fasc. 5, pp. 945–953, mag. 2003, doi: 10.1016/s1388-2457(03)00039-7.
- [76] S. Baudry, M. Klass, B. Pasquet, e J. Duchateau, «Age-related fatigability of the ankle dorsiflexor muscles during concentric and eccentric contractions», *Eur J Appl Physiol*, vol. 100, fasc. 5, lug. 2007, doi: 10.1007/s00421-006-0206-9.

- [77] I. R. Lanza, D. E. Befroy, e J. A. Kent-Braun, «Age-related changes in ATP-producing pathways in human skeletal muscle in vivo», *Journal of Applied Physiology*, vol. 99, fasc. 5, pp. 1736–1744, nov. 2005, doi: 10.1152/jappphysiol.00566.2005.
- [78] G. R. Hunter *et al.*, «Age, muscle fatigue, and walking endurance in pre-menopausal women», *Eur J Appl Physiol*, vol. 111, fasc. 4, pp. 715–723, apr. 2011, doi: 10.1007/s00421-010-1694-1.
- [79] D. W. Russ, T. F. Towse, D. M. Wigmore, I. R. Lanza, e J. A. Kent-Braun, «Contrasting Influences of Age and Sex on Muscle Fatigue», *Medicine & Science in Sports & Exercise*, vol. 40, fasc. 2, pp. 234–241, feb. 2008, doi: 10.1249/mss.0b013e31815bbb93.
- [80] J. A. Kent-Braun, A. V. Ng, J. W. Doyle, e T. F. Towse, «Human skeletal muscle responses vary with age and gender during fatigue due to incremental isometric exercise», *Journal of Applied Physiology*, vol. 93, fasc. 5, pp. 1813–1823, nov. 2002, doi: 10.1152/jappphysiol.00091.2002.
- [81] D. S. Ditor e A. L. Hicks, «The effect of age and gender on the relative fatigability of the human adductor pollicis muscle», *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 78, fasc. 10, pp. 781–790, ott. 2000, doi: 10.1139/y00-061.
- [82] D. M. Callahan, S. A. Foulis, e J. A. Kent-Braun, «Age-related fatigue resistance in the knee extensor muscles is specific to contraction mode», *Muscle and Nerve*, vol. 39, fasc. 5, pp. 692–702, mag. 2009, doi: 10.1002/mus.21278.
- [83] F. Jakobsson, K. Borg, e L. Edström, «Fibre-type composition, structure and cytoskeletal protein location of fibres in anterior tibial muscle: Comparison between young adults and physically active aged humans», *Acta Neuropathol*, vol. 80, fasc. 5, pp. 459–468, set. 1990, doi: 10.1007/bf00294604.
- [84] J. Lexell, D. Y. Downham, Y. Larsson, E. Bruhn, e B. Morsing, «Heavy-resistance training in older Scandinavian men and women: short- and long-term effects on arm and leg muscles», *Scandinavian Med Sci Sports*, vol. 5, fasc. 6, pp. 329–341, dic. 1995, doi: 10.1111/j.1600-0838.1995.tb00055.x.
- [85] B. L. Allman e C. L. Rice, «Neuromuscular fatigue and aging: Central and peripheral factors», *Muscle and Nerve*, vol. 25, fasc. 6, pp. 785–796, giu. 2002, doi: 10.1002/mus.10116.
- [86] P. M. Clarkson, W. Kroll, e A. M. Melchionda, «Isokinetic strength, endurance, and fiber type composition in elite American paddlers», *Europ. J. Appl. Physiol.*, vol. 48, fasc. 1, pp. 67–76, feb. 1982, doi: 10.1007/bf00421166.
- [87] P. A. Tesch e J. E. Wright, «Recovery from short term intense exercise: Its relation to capillary supply and blood lactate concentration», *Europ. J. Appl. Physiol.*, vol. 52, fasc. 1, pp. 98–103, nov. 1983, doi: 10.1007/bf00429033.
- [88] T. Valenčič, P. Ansdell, C. G. Brownstein, P. M. Spillane, A. Holobar, e J. Škarabot, «Motor unit discharge rate modulation during isometric contractions to failure is intensity- and modality-dependent», *The Journal of Physiology*, vol. 602, fasc. 10, pp. 2287–2314, mag. 2024, doi: 10.1113/jp286143.

- [89] A. Casolo *et al.*, «Behavior of motor units during submaximal isometric contractions in chronically strength-trained individuals», *Journal of Applied Physiology*, vol. 131, fasc. 5, pp. 1584–1598, nov. 2021, doi: 10.1152/jappphysiol.00192.2021.
- [90] R. Merletti, *Elettromiografia di superficie*. Torino: CLUT, 1995. ISBN: 978-88-7992-095-7. Available: <https://hdl.handle.net/11583/1393709>
- [91] M. F. Folstein, S. E. Folstein, and P. R. McHugh, “‘Mini-mental state’: A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician,” *J Psychiatr Res*, vol. 12, no. 3, pp. 189–198, 1975, doi: [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(75\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0022-3956(75)90026-6).
- [92] A. E. Stuck, A. L. Siu, G. D. Wieland, L. Z. Rubenstein, and J. Adams, “Comprehensive geriatric assessment: a meta-analysis of controlled trials,” *The Lancet*, vol. 342, no. 8878, pp. 1032–1036, Oct. 1993, doi: 10.1016/0140-6736(93)92884-V.
- [93] M. A. Zambone, S. Liberman, and M. L. B. Garcia, “Anthropometry, bioimpedance and densitometry: Comparative methods for lean mass body analysis in elderly outpatients from a tertiary hospital,” *Exp Gerontol*, vol. 138, p. 111020, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111020>.
- [94] M. Boccardo, *Analisi dell’influenza dell’invecchiamento sul comportamento delle unità motorie*. Tesi di Laurea Magistrale, Politecnico di Torino, 2024. Available: <http://webthesis.biblio.polito.it/id/eprint/32379>
- [95] J. A. Beauchamp *et al.*, «A geometric approach to quantifying the neuromodulatory effects of persistent inward currents on individual motor unit discharge patterns», *J. Neural Eng.*, vol. 20, fasc. 1, p. 016034, feb. 2023, doi: 10.1088/1741-2552/acb1d7.
- [96] A. R. Luff, «Age-associated Changes in the Innervation of Muscle Fibers and Changes in the Mechanical Properties of Motor Units», *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 854, fasc. 1, pp. 92–101, nov. 1998, doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09895.x.
- [97] G. M. Opie, B. J. Hand, e J. G. Semmler, «Age-related changes in late synaptic inputs to corticospinal neurons and their functional significance: A paired-pulse TMS study», *Brain Stimulation*, vol. 13, fasc. 1, pp. 239–246, gen. 2020, doi: 10.1016/j.brs.2019.08.003.
- [98] C. A. Knight e G. Kamen, «Relationships between voluntary activation and motor unit firing rate during maximal voluntary contractions in young and older adults», *Eur J Appl Physiol*, vol. 103, fasc. 6, pp. 625–630, ago. 2008, doi: 10.1007/s00421-008-0757-z.
- [99] G. Kamen, S. V. Sison, C. C. Du, e C. Patten, «Motor unit discharge behavior in older adults during maximal-effort contractions», *Journal of Applied Physiology*, vol. 79, fasc. 6, pp. 1908–1913, dic. 1995, doi: 10.1152/jappl.1995.79.6.1908.
- [100] D. H. Laidlaw, M. Bilodeau, e R. M. Enoka, «Steadiness is reduced and motor unit discharge is more variable in old adults», *Muscle Nerve*, vol. 23, fasc. 4, pp. 600–612, apr. 2000, doi: 10.1002/(sici)1097-4598(200004)23:4<600::aid-mus20>3.0.co;2-d.
- [101] R. M. Enoka *et al.*, «Mechanisms that contribute to differences in motor performance between young and old adults», *Journal of Electromyography and Kinesiology*, vol. 13, fasc. 1, pp. 1–12, feb. 2003, doi: 10.1016/s1050-6411(02)00084-6.

- [102] E. A. Christou, «Aging and Variability of Voluntary Contractions», *Exercise and Sport Sciences Reviews*, vol. 39, fasc. 2, pp. 77–84, apr. 2011, doi: 10.1097/jes.0b013e31820b85ab.
- [103] J. Lexell and D. Y. Downham, “The occurrence of fibre-type grouping in healthy human muscle: a quantitative study of cross-sections of whole vastus lateralis from men between 15 and 83 years”, *Acta Neuropathol*, vol. 81, pp. 377–381, 1991.
- [104] S. K. Hunter, H. M. Pereira, K. G. Keenan, and S. K. Hunter, “The aging neuromuscular system and motor performance,” *J Appl Physiol*, vol. 121, pp. 982–995, 2016, doi: 10.1152/jappphysiol.00475.2016.-Age-related.
- [105] M. Piasecki *et al.*, “Long-term endurance and power training may facilitate motor unit size expansion to compensate for declining motor unit numbers in older age,” *Front Physiol*, vol. 10, no. APR, 2019, doi: 10.3389/fphys.2019.00449.
- [106] Y. Barnouin *et al.*, “Coupling between skeletal muscle fiber size and capillarization is maintained during healthy aging,” *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, vol. 8, no. 4, pp. 647–659, Aug. 2017, doi: 10.1002/jcsm.12194.
- [107] M. Piasecki *et al.*, “Failure to expand the motor unit size to compensate for declining motor unit numbers distinguishes sarcopenic from non-sarcopenic older men,” *Journal of Physiology*, vol. 596, no. 9, pp. 1627–1637, May 2018, doi: 10.1113/JP275520.
- [108] M. V Narici, C. N. Maganaris, N. D. Reeves, and P. Capodaglio, “Effect of aging on human muscle architecture,” *J Appl Physiol*, vol. 95, pp. 2229–2234, 2003, doi: 10.1152/jappphysiol.00433.2003.-The.
- [109] T. and D. H. and J. D. and M. J. Maden-Wilkinson, “Comparison of MRI and DXA to measure muscle size and age-related atrophy in thigh muscles.,” *J Musculoskelet Neuronal Interact*, vol. 13(3), pp. 320–328, 2013.
- [110] Z. Erim, C. J. De Luca, K. Mineo, e T. Aoki, «Rank-ordered regulation of motor units», *Muscle Nerve*, vol. 19, fasc. 5, pp. 563–573, mag. 1996, doi: 10.1002/(sici)1097-4598(199605)19:5<563::aid-mus3>3.0.co;2-9.
- [111] S. Jeon, W. M. Miller, e X. Ye, «A Comparison of Motor Unit Control Strategies between Two Different Isometric Tasks», *IJERPH*, vol. 17, fasc. 8, p. 2799, apr. 2020, doi: 10.3390/ijerph17082799.
- [112] R. M. Enoka e J. Duchateau, «Muscle fatigue: what, why and how it influences muscle function», *The Journal of Physiology*, vol. 586, fasc. 1, pp. 11–23, gen. 2008, doi: 10.1113/jphysiol.2007.139477.
- [113] B. K. Barry e R. M. Enoka, «The neurobiology of muscle fatigue: 15 years later», *Integrative and Comparative Biology*, vol. 47, fasc. 4, pp. 465–473, ott. 2007, doi: 10.1093/icb/icm047.
- [114] K. Karamanidis, A. Arampatzis, e L. Mademli, «Age-related deficit in dynamic stability control after forward falls is affected by muscle strength and tendon stiffness», *Journal of Electromyography and Kinesiology*, vol. 18, fasc. 6, pp. 980–989, dic. 2008, doi: 10.1016/j.jelekin.2007.04.003.

- [115] S. K. Hunter, J. Duchateau, e R. M. Enoka, «Muscle Fatigue and the Mechanisms of Task Failure», *Exercise and Sport Sciences Reviews*, vol. 32, fasc. 2, pp. 44–49, apr. 2004, doi: 10.1097/00003677-200404000-00002.
- [116] A. Christie e G. Kamen, «Motor unit firing behavior during prolonged 50% MVC dorsiflexion contractions in young and older adults», *Journal of Electromyography and Kinesiology*, vol. 19, fasc. 4, pp. 543–552, ago. 2009, doi: 10.1016/j.jelekin.2008.03.005.
- [117] L. F. Wallerstein *et al.*, «Effects of Strength and Power Training on Neuromuscular Variables in Older Adults», *Journal of Aging and Physical Activity*, vol. 20, fasc. 2, pp. 171–185, apr. 2012, doi: 10.1123/japa.20.2.171.
- [118] Sherwood Lauralee, *Human physiology*. Belmont, California: Brooks/Cole-Cengage Learning, 2010.
- [119] P. A. Lynn, N. D. Bettles, A. D. Hughes, and S. W. Johnson, “Influences of electrode geometry on bipolar recordings of the surface electromyogram,” *Biol. Eng. & Comput*, vol. 16, pp. 651–660, 1978.
- [120] R. Merletti, A. Holobar, and D. Farina, “Analysis of motor units with high-density surface electromyography,” *Journal of Electromyography and Kinesiology*, vol. 18, no. 6. pp. 879–890, Dec. 2008. doi: 10.1016/j.jelekin.2008.09.002.
- [121] A. Holobar, “DEMUSE, DEcomposition of MULTichannel Surface EMG.” Accessed: Mar. 07, 2024. [Online]. Available: <https://demuse.feri.um.si/>
- [122] C. Tomasi and T. Kanade, “Shape and Motion from Image Streams: a Factorization Method|Part 3 Detection and Tracking of Point Features,” 1991.
- [123] E. J. Jones, S.-Y. Chiou, P. J. Atherton, B. E. Phillips, and M. Piasecki, “Ageing and exercise-induced motor unit remodelling,” *J Physiol*, vol. 600, pp. 1839–1849, 2022, doi: 10.1113/JP281726#support-information-section.