



UNIMORE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MODENA E REGGIO EMILIA

UNIVERSITÀ D EGLI STUDI DI MODENA E REGGIO EMILIA

Dipartimento Chirurgico, Medico, Odontoiatrico e di Scienze Morfologiche con Interesse Trapiantologico,
Oncologico e di Medicina Rigenerativa (CHIMOMO)

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea Magistrale

in

SALUTE E SPORT

(Presidente: Prof.ssa Milena Nasi)

**MODIFICAZIONI DELLA DENSITÀ E DELLA FUNZIONALITÀ MITOCONDRIALE IN
RISPOSTA AD ALLENAMENTO AD ALTA INTENSITÀ**

Relatore:
Prof. Massimo Venturelli

Studente:
Barbieri Riccardo

Correlatore:
Dott.ssa Laura Spinello

ANNO ACCADEMICO 2025-2026

Sommario

Introduzione	4
1. Bioenergetica muscolare e cascata dell'ossigeno	5
Dinamica dell'ATP e sistemi energetici integrati	5
La cascata dell'ossigeno: gradiente pressorio dall'ambiente al miocita	7
Il mitocondrio come terminale della cascata: il complesso IV e la PO ₂ critica	9
Determinanti centrali e periferiche del consumo di ossigeno: VO ₂ e VO ₂ max	10
1.1 Il protocollo HIIT 4x4 e gli adattamenti fisiologici	12
Soglie metaboliche e differenze tra allenamenti aerobici di bassa, media e alta intensità (LIT, MIT, HIT)	12
Definizione del protocollo HIIT	14
Tassonomia dell'alta intensità: inquadramento metabolico dell'HIIT	15
Adattamenti centrali e periferici: rimodellamento cardiaco, gittata sistolica, densità capillare ed estrazione tissutale di O ₂	16
1.2 Condizioni di ossigenazione e modulazione della performance	18
Normossia: omeostasi respiratoria e saturazione arteriosa di base	18
Ipossia: risposte acute, stabilizzazione del fattore inducibile dell'ipossia (1-alpha) e cinetica del lattato	19
Iperossia: alterazione della pressione di spinta respiratoria e supporto ergogenico	20
1.3 Biogenesi e rimodellamento funzionale del reticolo mitocondriale	21
Architettura e dinamica della rete mitocondriale nel muscolo scheletrico	21
Il prelievo biotipico muscolare e il genoma (mtDNA) come marker quantitativo di densità	23
Biogenesi mitocondriale indotta dall'esercizio e adattamenti del mtDNA in risposta all'HIIT e ai diversi gradienti di ossigenazione	24
1.4 Ipotesi e razionale della tesi	25
Qual è il reale impatto dell'allenamento ad alta intensità sul miocita?	25
Effetti delle diverse pressioni parziali di ossigeno sui tassi di respirazione mitocondriale normalizzati per mtDNA	25
2. Materiali e metodi	26
2.1 Disegno sperimentale	26
Tipo di studio	26
Durata, sequenza e setting degli interventi	26
2.2 Partecipanti	27
Criteri di inclusione/esclusione (età, sesso, livello di attività fisica)	27
2.3 Protocolli di allenamento	27
Descrizione dettagliata degli allenamenti HIIT utilizzati (numero di allenamenti, intensità, durata, recupero) e descrizione delle differenti condizioni ambientali (ipossia, normossia, iperossia)	27
2.4 Valutazioni metaboliche	28
Test incrementali per VO ₂ max (TRED/PPO)	28

Test sottomassimale SXT (spiegazione delle misurazioni effettuate: VO ₂ , spirometrie, ecocardio, flussi femorali, lattato ematico, rpe, nirs).....	30
2.5 Misurazioni emodinamiche.....	31
Flusso femorale: metodologia (ecografia Doppler)	31
2.6 Composizione corporea.....	32
Analisi DXA e variazioni strutturali	32
2.7 Biopsie muscolari.....	32
Tecnica di prelievo e analisi istologiche	32
2.8 Analisi statistica	32
Test statistici utilizzati	32
3. Risultati	33
3.1 Composizione corporea.....	33
Analisi DXA	33
3.2 Effetti dell'intervento dell'HIIT.....	34
Performance al ciclo ergometro semi-reclinato	34
Performance sul treadmill	35
Contenuto di DNA mitocondriale	36
Respirometria ad alta risoluzione.....	36
4. Discussione	38
4.1 Interpretazione dei risultati	38
Stabilità della composizione corporea	38
Analisi integrata delle prestazioni funzionali: specificità del gesto e adattamenti qualitativi ...	38
Analisi del contenuto di DNA mitocondriale (mtDNA): dinamiche temporali e limiti della biogenesi organulare a breve termine	40
Fisiologia della catena respiratoria	41
4.2 Implicazioni pratiche.....	42
4.3 Limitazioni	44
Conclusioni	46
Bibliografia	47

Introduzione

L'evoluzione è indiscutibilmente legata al movimento umano. Nella società contemporanea l'esercizio fisico strutturato è diventato un pilastro fondamentale per la tutela della salute e per la prevenzione delle patologie croniche e degenerative. La letteratura scientifica ha ormai ampiamente validato il concetto di esercizio visto come medicina, dimostrando come l'esposizione reiterata ad un carico di lavoro agisca come un potente farmaco fisiologico in grado di contrastare processi degenerativi, patologie croniche e l'insorgenza di disfunzioni sistemiche. Il binomio tra salute e sport non ha solamente finalità agonistiche e competitive, ma è una necessità dell'organismo per mantenere l'omeostasi dell'intero sistema. Questo è un concetto molto importante, il nostro organismo è progettato per rispondere costantemente a stimoli contrattili, necessita del movimento, ma al contempo si ritrova in una società che va sempre più nel verso opposto, un ambiente sempre più sedentario con una carenza di input motori, che porta inevitabilmente all'aumento dei fattori di rischio biologico primario. La scienza dell'esercizio moderno ha progressivamente spostato la concentrazione dall'analisi macroscopica della prestazione atletica alla comprensione di tutti quei meccanismi molecolari che stanno alla base di tutti gli adattamenti all'esercizio. Ogni sessione di allenamento agisce come una perturbazione mirata e dosata nel modo giusto sull'equilibrio chimico e fisico dell'organismo. Il passaggio dalla salute alla performance d'élite richiede una gestione e una dettagliata analisi della combinazione tra intensità e durata dello sforzo. Il presente lavoro di tesi esplora questa frontiera subcellulare, analizzando come la risposta plastica del reticolo mitocondriale venga ulteriormente modulata in base ai diversi gradienti di ossigenazione ambientale. Attraverso una dettagliata analisi che integra la fisiologia sistemica con la biologia molecolare, si vuole chiarire come i processi di trasduzione del segnale consentono di trasformare uno stress meccanico severo in un adattamento a livello mitocondriale e non solo.

1. Bioenergetica muscolare e cascata dell'ossigeno

Dinamica dell'ATP e sistemi energetici integrati

L'esercizio fisico strutturato rappresenta uno degli stimoli capace di innescare molteplici risposte biologiche per il mantenimento dell'omeostasi sistemica e la promozione della salute. Sotto il profilo clinico ed evolucionistico, l'esposizione reiterata al lavoro meccanico induce profondi adattamenti fenotipici che ottimizzano la funzionalità cardiorespiratoria e metabolica, contrastando l'insorgenza delle principali patologie cronico degenerative (Pedersen & Saltin, 2015). Tramite il movimento e la contrazione muscolare l'organismo si trova in una condizione di stress fisiologico e ciò dipende chiaramente dall'intensità e dalla durata dei diversi stimoli. Affinché gli adattamenti sistemici si concretizzino, l'organismo deve tollerare perturbazioni acute e massimali del proprio equilibrio cellulare e al centro di questo paradigma di stress e adattamento risiede la bioenergetica. L'organismo umano necessita di un costante apporto energetico per sostenere le proprie funzioni vitali e ogni forma di attività contrattile. In ambito bioenergetico, tale combustibile è rappresentato dall'adenosina trifosfato (ATP), l'unica molecola in grado di fornire l'energia libera necessaria per alimentare il ciclo dei ponti trasversali tra actina e miosina e sostenere l'accoppiamento eccitazione-contrazione (McArdle, Katch & Katch, 2015). Poiché le riserve di ATP sono strutturalmente esigue (nell'ordine di 5-8 mmol/Kg di muscolo umido), il miocita non può immagazzinare l'energia meccanica pronta all'uso in quantità significative. Di conseguenza, l'organismo deve fare affidamento su una rete integrativa di vie metaboliche per garantire una risintesi continua e isocrona rispetto all'idrolisi, condizione imprescindibile per il mantenimento dell'omeostasi cellulare durante l'esercizio. La fonte immediata di energia per il lavoro muscolare deriva dall'idrolisi dell'ATP, reazione esoergonica catalizzata dall'enzima miosina ATPasi. Essendo la concentrazione basale di ATP estremamente bassa, sofisticati meccanismi di regolazione allosterica intervengono per prevenire la deplezione massiva (una condizione che indurrebbe un danno cellulare irreversibile e il rigor muscolare). Questa stringente reazione metabolica (Sahlin et al., 1998) consente di protrarre il lavoro meccanico anche a fronte di richieste energetiche sub-massimali. Per far fronte a tale eterogeneità di carico, il muscolo scheletrico si avvale di tre processi metabolici distinti ma strettamente interdipendenti, la cui attivazione è modulata primariamente dall'intensità dello sforzo e dalla cinetica di deplezione dei substrati. Sebbene vengano spesso descritti singolarmente, per chiarezza espositiva, è fondamentale sottolineare che questi percorsi bioenergetici non operano mai in successione temporale. Il primo, sistema anaerobico alattacido, è incentrato sulla scissione della fosfocreatina (PCr) mediata dall'enzima creatinchinasi (CK). Operando in assenza di ossigeno, esso assicura una rigenerazione dell'ATP pressoché istantanea nelle prossime fasi del lavoro ad alta intensità, compensando l'inerzia delle vie metaboliche più complesse (Sahlin, 1982). Il secondo processo, sistema anaerobico

lattacido, prevede la degradazione anaerobica dei carboidrati attraverso la via della glicolisi rapida sarcoplasmatica. Qualora la cinetica di produzione del piruvato ecceda la capacità ossidativa mitocondriale, esso viene ridotto ad acido lattico. Storicamente considerato un mero metabolita di scarto associato alla fatica periferica e all'acidosi metabolica, il lattato è oggi riconosciuto, secondo la "Lactate Shuttle Theory" (Brooks, 2018), come un prezioso intermedio energetico, continuamente ridistribuito per l'ossidazione nelle fibre muscolari ad alta capacità ossidativa (Tipo I) e nel miocardio. La scissione dei fosfageni immagazzinati (ATP e PCr) e la scomposizione non aerobica dei carboidrati comprendono quindi quello che viene definito il sistema anaerobico. I termini "alattico" (in cui l'acido lattico non si forma, tipico dei sistemi fosfageni) e "lattico" (associato alla glicolisi) sono spesso usati per descrivere queste vie anaerobiche, ovvero i processi di risintesi che avvengono senza l'intervento dell'ossigeno. Queste vie sono in grado di rigenerare ATP ad alti tassi di velocità, con conseguente grande espressione di potenza muscolare, rendendole fondamentali negli sprint e nei movimenti di forza massimale. La capacità totale del sistema anaerobico è, tuttavia, fortemente limitata dalla quantità complessiva di energia che può essere rilasciata in un singolo evento di esercizio. Una rapida riduzione del PCr immagazzinato e un massiccio accumulo di acido lattico, con una concomitante e drastica riduzione del pH intracellulare (acidosi metabolica), inibiscono gli enzimi glicolitici e interferiscono con la meccanica contrattile. Tutto ciò provoca fisiologicamente una cessazione dell'esercizio fisico o una riduzione forzata della produzione lavorativa e della potenza meccanica. Il terzo processo, sistema aerobico, si basa sulla fosforilazione ossidativa, un processo che si svolge esclusivamente all'interno dei mitocondri e richiede la presenza di ossigeno come accettore finale degli elettroni nel complesso IV. Sfruttando il ciclo di Krebs e la catena di trasporto degli elettroni, questo sistema garantisce la completa e più efficiente ossidazione di carboidrati e lipidi. Mentre le vie anaerobiche vantano un'elevatissima potenza metabolica, il sistema aerobico possiede una capacità teoricamente illimitata, ma la sua espressione di potenza massima è rigidamente vincolata dall'efficienza della cascata dell'ossigeno e dai limiti strutturali dei sistemi cardiorespiratori (Basset & Howley, 2000), quantificabili nel parametro della VO₂max. Questi tre percorsi bioenergetici non operano in rigida successione temporale, ma interagiscono in modo dinamico e simultaneo fin dal primo istante di attività (Gastin, 2001), consentendo all'organismo di transitare fluidamente dallo stato di riposo allo sforzo massimale, preservando sempre l'omeostasi cellulare. Poiché la capacità del sistema aerobico di risintetizzare ATP in volumi massivi è rigorosamente subordinata alla disponibilità ininterrotta di ossigeno a livello mitocondriale, l'espressione della massima potenza metabolica dipende interamente dall'efficienza con cui questo gas viene captato, trasportato e ceduto ai tessuti attivi (Bassett & Howley, 2000). Tale ineludibile

vincolo bioenergetico sposta dunque il fulcro dell'indagine fisiologica sull'analisi dei meccanismi di conduzione che veicolano il comburente dall'ambiente esterno fino all'interno del miocita.

La cascata dell'ossigeno: gradiente pressorio dall'ambiente al miocita

L'organismo necessita di ossigeno per poter sostenere la continua risintesi di ATP che è necessaria per la contrazione muscolare. Poiché l'espressione della massima potenza metabolica attraverso il sistema aerobico è subordinata alla disponibilità ininterrotta di O_2 , è essenziale andare ad analizzare a fondo i meccanismi di trasporto che veicolano i gas dall'ambiente esterno fino al miocita. L'ossigenazione tissutale e il mantenimento del flusso metabolico aerobico dipendono da un processo di trasporto passivo, governato dalle leggi fisiche della termodinamica e della diffusione dei gas. Il trasferimento dell'ossigeno (O_2) dall'aria atmosferica fino all'accettore finale mitocondriale è descritto dal modello fisiologico della "cascata dell'ossigeno" (Wagner, 1991). Tale paradigma modella il sistema di conduzione come una sequenza di resistenze in serie, in cui ogni barriera anatomica e fisiologica determina una progressiva e ineluttabile caduta della pressione parziale di ossigeno (PO_2). Il primo passaggio di questo processo è la ventilazione polmonare (VE) ossia l'aria che viene inspirata ed espirata ogni minuto, in questa fase si porta ossigeno agli alveoli e si rimuove l'anidride carbonica, la PO_2 atmosferica è di circa 159 mmHg, quando viene ispirata attraverso le vie aeree superiori e l'intera zona di conduzione, nonché lo spazio morto anatomico, che ne determina una prima caduta di pressione parziale di ossigeno sebbene non ci sia uno scambio di gas. Questo calo porta la PO_2 a 149 mmHg, il passaggio successivo avviene negli alveoli polmonari, dove l'ossigeno si mescola con l'aria residua ricca di anidride carbonica (CO_2), proveniente dal circolo venoso. In questa fase l'ossigeno si associa all'emoglobina (Hb), data la sua poca solubilità nell'acqua e quindi nel plasma (Dominelli et al., 2021). A causa della sua bassa solubilità l'ossigeno è pari a solo 3ml/l di sangue ad una pressione parziale di 100 mmHg, l'emoglobina (Hb) realizza un enorme aumento delle capacità del sangue per l'ossigeno: infatti, a riposo, la quota di ossigeno resa disponibile dal sangue arterioso ai tessuti (1l/min) è circa 3 volte superiore alle necessità metaboliche e, infatti, il contenuto in O_2 nel sangue venoso refluo dai tessuti si riduce solamente un terzo (Baldissera, F., & Porro, C.A., 2009). La curva in figura illustra le caratteristiche di legame dell'ossigeno all'Hb (figura 1). L'affinità di O_2 per Hb varia notevolmente per effetto di PCO_2 e della temperatura (figura 2).

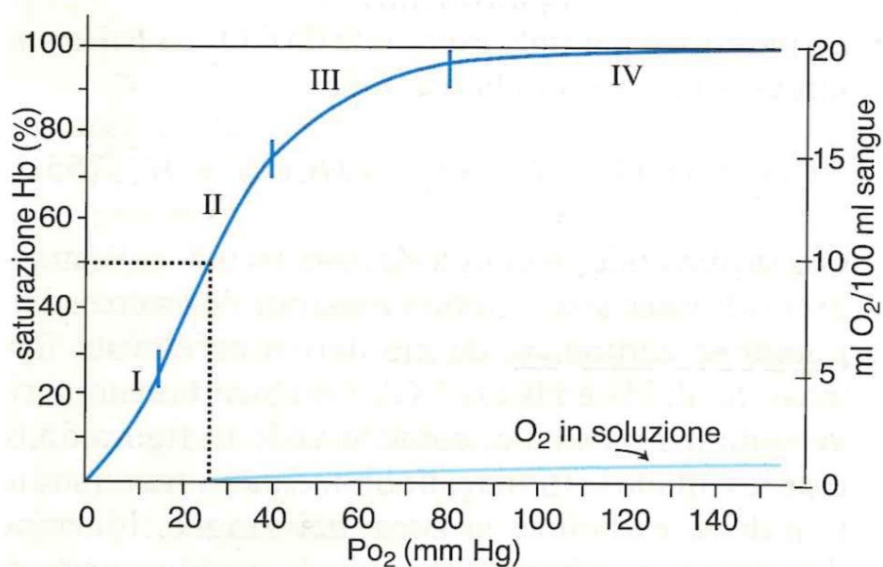


Figura 1- È indicata la percentuale di saturazione di Hb in funzione di PO_2

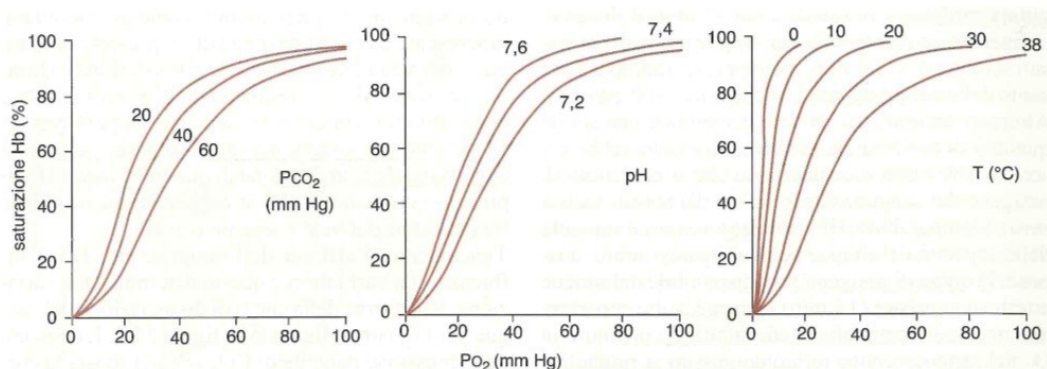


Figura 2- Affinità dell'ossigeno per Hb per effetto di PCO_2 , pH e temperatura

Guidato da gradiente pressorio l'ossigeno attraversa così la membrana alveolo-capillare per riversarsi nel sangue venoso polmonare, a questo punto arriva al cuore sinistro dove viene poi pompato a livello sistemico. L'efficacia di questa fase dipende fortemente dalla gittata cardiaca (Q) e dalla concentrazione di emoglobina. La quantità di O_2 veicolata è proporzionale al volume di sangue pompato per la frequenza di contrazione cardiaca ($Q = VE \times FC$), da questa relazione si ricava che se il volume di eiezione sistolica, ovvero il sangue espulso ad ogni battito, fosse costante, la gittata cardiaca crescerebbe linearmente con la frequenza cardiaca. Ciò in realtà non si verifica mai, in condizioni di gradiente pressorio stabile, cioè normalmente, la gittata cardiaca deve quindi variare in modo reciproco alle resistenze periferiche totali (Baldissera, F., & Porro, C.A., 2009). Questa figura rappresenta i valori medi della pressione parziale dei gas nell'aria inspirata, nell'aria alveolare e nei capillari polmonari e periferici. I valori dell'aria ambiente sono quelli di una giornata con condizioni climatiche buone: alta pressione barometrica e scarsa umidità nell'aria. I valori dei gas respiratori

venosi e arteriosi sono quelli medi all'ingresso e all'uscita dei capillari polmonari. Nei riquadri sono anche indicati tipici valori di PO_2 e PCO_2 nei distretti venosi di alcuni organi e tessuti. Questi valori sono passibili di grandi variazioni in relazione al metabolismo degli stessi.

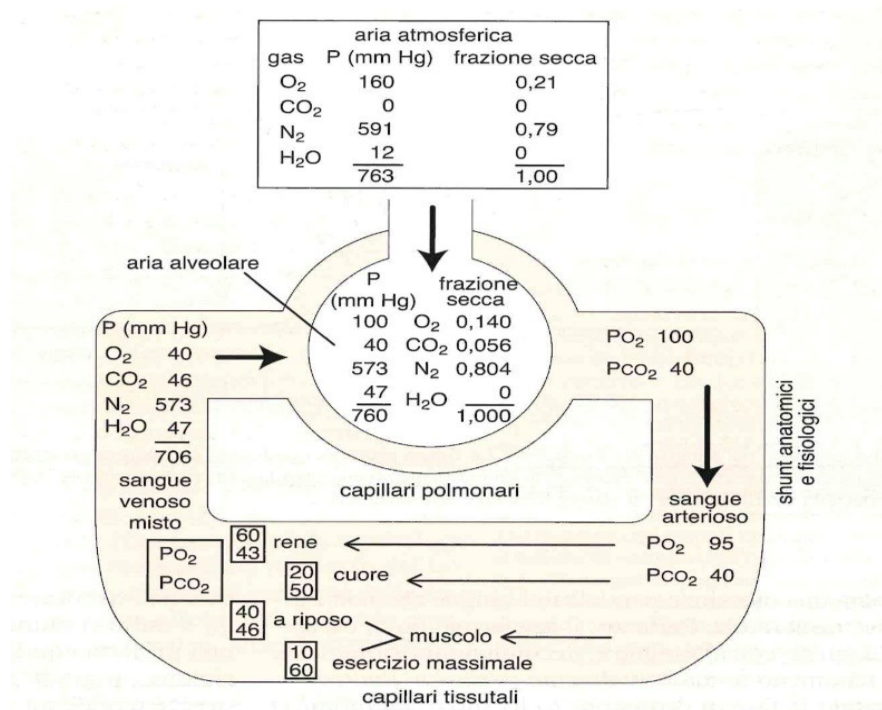


Figura 3- Valori medi della pressione parziale (mmHg) dei gas nell'aria inspirata

Giunto nei capillari del muscolo, l'ossigeno deve staccarsi dall'emoglobina (Hb), all'interno del capillare la PO_2 scenda da circa 100 mmHg a circa 20-40 mmHg. In questo ultimo step della cascata dell'ossigeno ci concentriamo sullo scambio tra i capillari e i tessuti, l'ossigeno giunge ai capillari per essere estratto dai tessuti attivi.

Il mitocondrio come terminale della cascata: il complesso IV e la PO_2 critica

Il mitocondrio rappresenta l'ultimo anello della complessa catena di trasporto dell'ossigeno, fungendo da tramite tra la disponibilità di ossigeno ambientale e la produzione di energia sotto forma di ATP. Parlando in termini fisiologici si considera l'organulo non come un consumatore passivo ma come un "sensore metabolico" altamente plastico, capace di rimodellare la propria architettura e funzionalità in risposta alle variazioni di pressione parziale di ossigeno. L'ossigeno molecolare conclude quindi il suo percorso giunto all'interno della matrice organulare, questo ultimo step biochimico si realizza a livello della membrana mitocondriale interna (IMM) ed è catalizzato dal complesso IV, o citocromo c ossidasi (COX). La COX da un punto di vista termodinamico accoppia

il trasferimento di quattro elettroni, ceduti dalle molecole di citocromo c, e quattro protoni con la riduzione di una molecola di O₂ producendo due molecole d'acqua. Questa reazione esoergonica rappresenta il processo biochimico fondamentale che consente il pompaggio protonico nello spazio intermembrana, mantenendo il potenziale elettricochimico necessario all'ATP sintasi per la fosforilazione dell'ADP (Gnaiger et al., 1995). Da un punto di vista cinetico, l'affinità che la COX ha per l'ossigeno è estremamente elevata, questa fondamentale caratteristica biochimica assicura che il flusso respiratorio rimanga indipendente dalla disponibilità di O₂ fino a livelli pressori estremamente bassi. Durante l'esercizio fisico, la PO₂ intracellulare può scendere a valori prossimi alla PO₂ critica nonché la soglia al di sotto della quale il tasso di respirazione diventa linearmente dipendente dalla pressione parziale del gas (Gnaiger, 2001). A riposo il muscolo scheletrico aumenta molto rapidamente il suo metabolismo fino a raggiungere, durante sforzi massimali, consumi di O₂ anche 50 volte superiori rispetto a quelli di riposo. Questo aumento spettacolare è reso possibile da un cospicuo aumento del flusso di sangue attraverso il muscolo (Baldissera, F., & Porro, C.A., 2009). Il valore della PO₂ critica non è una costante fissa, ma un parametro che varia, si innalza all'aumentare del flusso degli elettroni. Durante esercizi massimali la capacità massima del complesso IV viene messa profondamente alla prova, c'è un massiccio turnover dell'ATP e la richiesta di flussi respiratori estremi, e per mantenere i tassi di fosforilazione ossidativa richiesti dallo sforzo, la PO₂ critica si sposta verso l'alto raggiungendo valori stimati di circa 1-2 mmHg (Gnaiger, 2001). Contemporaneamente, l'elevata estrazione frazionale fa precipitare la pressione parziale di ossigeno intracellulare esattamente in questo range critico (2-4 mmHg) (Richardson et al., 1995). Questo processo trasforma il complesso IV nel vero “collo di bottiglia” dell'intera cascata, l'efficienza con cui la COX riesce a operare a queste pressioni limitanti e la densità dei complessi enzimatici disponibili diventano i determinanti ultimi della trasduzione miocitaria.

Determinanti centrali e periferiche del consumo di ossigeno: VO₂ e VO₂max

La contrazione muscolare è sostenuta dalla continua produzione di adenosina trifosfato (ATP) che viene rigenerata, come precedentemente detto nel paragrafo “Dinamica dell'ATP e sistemi energetici integrati”, tramite i tre principali meccanismi energetici: anaerobico alattacido, anaerobico lattacido e aerobico. Le reazioni del sistema aerobico consumano ossigeno e per misurare lo stato di attivazione del metabolismo aerobico si può studiare e quantificare il consumo di ossigeno. Il consumo di ossigeno (VO₂) quantifica il volume di O₂ che dal livello polmonare viene trasportato dal sistema cardiovascolare e utilizzato dai tessuti periferici, per sostenere la fosforilazione ossidativa. Il VO₂ cresce linearmente fino a raggiungere un plateau, definito come massimo consumo di ossigeno (VO₂max). Questo termine definisce il massimo volume di ossigeno trasportato dall'ambiente ai

mitocondri per supportare la produzione ossidativa di ATP per la contrazione muscolare (Levine, 2008). Questo parametro fisiologico è stato sempre molto studiato nel tempo, la visione tradizionale deve molto al lavoro di Hill, che condusse i primi esperimenti sull'uomo già dagli anni '20, con i suoi studi sostenne che vi sia un limite superiore all'assorbimento di ossigeno, che vi siano chiaramente differenze interindividuali e che il $\dot{V}O_{2\max}$ sia limitato dai sistemi circolatorio e respiratorio. Un altro studioso, Timothy Noakes sosteneva invece che l'assenza di questo plateau in alcuni soggetti dimostrasse quanto la fornitura di ossigeno non sia un fattore limitante per il $\dot{V}O_{2\max}$, Noakes portava avanti l'idea che la prestazione di resistenza fosse limitata da fattori muscolari. Dopo aver attentamente esaminato le prove su entrambi i lati, sebbene il modello classico di Hill continui a rappresentare il paradigma fisiologico maggiormente accettato, il dibattito proposto da Noakes ha contribuito ad ampliare la discussione sui possibili meccanismi centrali coinvolti nella limitazione della performance (Bassett David R.JR.; Howley, Edward T., 1997). Per analizzare le determinanti del $\dot{V}O_{2\max}$ ci basiamo sui caratteri fisiologici descritti dall'equazione di Fick.

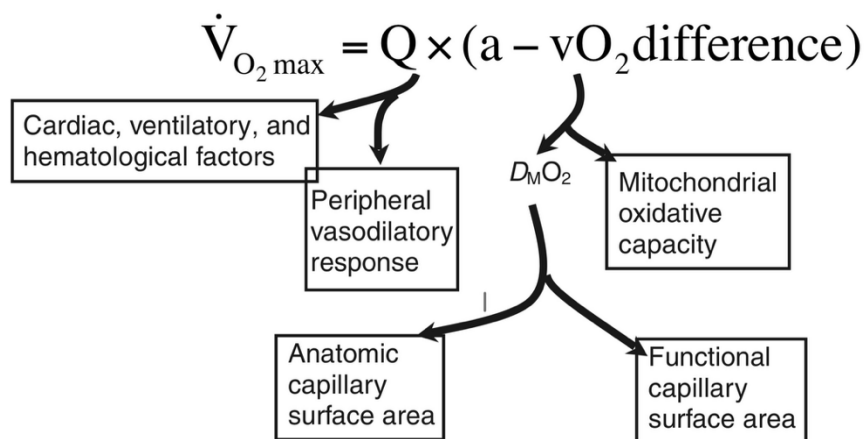


Figura 4- Equazione di Fick

Tramite l'equazione di Fick possiamo capire come ogni singolo passaggio influenzi e limiti il consumo di ossigeno. Consumo di ossigeno ($\dot{V}O_2$) = gittata cardiaca (Q) x differenza artero-venosa di ossigeno ($a - vO_2 \text{ diff.}$). La differenza artero-venosa rappresenta l'estrazione periferica, ovvero la capacità reale del muscolo scheletrico in contrazione di sottrarre O_2 dal torrente ematico.

Le determinanti centrali che vanno ad influire sul $\dot{V}O_{2\max}$ comprendono tutte le strutture e i processi che riguardano il caricamento e il trasporto ematico dell'ossigeno. Il principale fattore che determina la $\dot{V}O_{2\max}$ è la massima capacità del cuore di pompare sangue ricco di ossigeno ai muscoli che lavorano, cioè il prodotto della massima gittata cardiaca (Q) per il contenuto in O_2 del sangue arterioso (Baldissera, F., & Porro, C.A., 2009). La letteratura scientifica concorda ampiamente sul fatto che, in soggetti sani che si esercitano a livello del mare impegnando grandi masse muscolari, il sistema

cardiovascolare rappresenta il fattore limitante primario del VO_2max (Levine, 2008). Altre grandezze fisiologiche che vanno ad agire a livello centrale sono ventilazione alveolare, diffusione alveolo-capillare. Le determinanti periferiche includono la densità capillare, la conduttanza vascolare, la concentrazione di mioglobina e l'architettura bioenergetica della rete mitocondriale (Wagner, 1996). Se a livello centrale la limitazione principale è imposta dal sistema cardiovascolare, a livello periferico l'attenzione si sposta sull'efficienza con cui il muscolo scheletrico estrae e utilizza l'ossigeno dal torrente ematico, questo parametro viene quantificato dalla differenza artero-venosa ($a-v\text{O}_2$ difference). Le determinanti periferiche giocano un ruolo fondamentale in quanto includono fattori strutturali e fattori biochimici che definiscono la reale capacità del miocita di utilizzare l'ossigeno. La densità capillare e la conduttanza vascolare determinano invece il tempo di transito dei globuli rossi, influenzando l'area e il tempo disponibili per lo scambio gassoso. A livello intracellulare la mioglobina funge da molecola trasportatrice essenziale, garantendo una diffusione facilitata e un trasferimento rapido dell'ossigeno dal sacro lemma fino all'interno della matrice mitocondriale (Richardson et al., 1995). L'estrazione frazionale di ossigeno dipende molto dalla capacità ossidativa intrinseca muscolare, che a sua volta è dettata dalla densità mitocondriale e dall'attività degli enzimi del ciclo di Krebs e della catena di trasporto degli elettroni. Tale capacità non è legata solamente alla quantità di massa mitocondriale, ma anche all'ottimizzazione della qualità funzionale degli organelli (*instruct function*). La replicazione del genoma mitocondriale (mtDNA), stimolata dall'allenamento rappresenta il prerequisito molecolare principale per sostenere l'espansione di questi complessi enzimatici (Hood, 2009). Andando a lavorare migliorando questi fattori periferici, tipico adattamento all'allenamento, si avrà una maggiore estrazione frazionale di ossigeno contribuendo ad un incremento dei valori di VO_2max , e si avrà quindi un controbilanciamento dei limiti emodinamici imposti dalla gittata cardiaca. Per concludere si può definire il massimo consumo di ossigeno come il risultato di un delicato equilibrio tra l'apparato cardiovascolare e le strutture periferiche, fornisce quindi un parametro che ci permette di sapere come il sistema cardiocircolatorio distribuisce e utilizza l'ossigeno durante l'attività fisica.

1.1 Il protocollo HIIT 4x4 e gli adattamenti fisiologici

Soglie metaboliche e differenze tra allenamenti aerobici di bassa, media e alta intensità (LIT, MIT, HIT)

L'allenamento rappresenta una perturbazione acuta, mirata e dosata dell'omeostasi sistemica e cellulare, il concetto di omeostasi è il fulcro della fisiologia e della biologia moderna, non indica uno stato chimico-fisico immutabile e statico, bensì un equilibrio dinamico costantemente regolato e

difeso dall'organismo contro le perturbazioni ambientali e metaboliche interne (Cannon, 1929). La risposta a livello sistemico di queste perturbazioni concettualmente trova il suo fondamento nella sindrome generale di adattamento (GAS) postulata dall'endocrinologo Hans Selye (1956). Secondo questo modello quando l'organismo viene sottoposto a stimoli stressori attraversa una prima fase iniziale di allarme, con annesso un declino temporaneo delle prestazioni con l'insorgenza della fatica, a seguire ci sarà una fase di resistenza o di adattamento nella quale i sistemi biologici mobilitano le proprie risorse per ripristinare l'equilibrio.

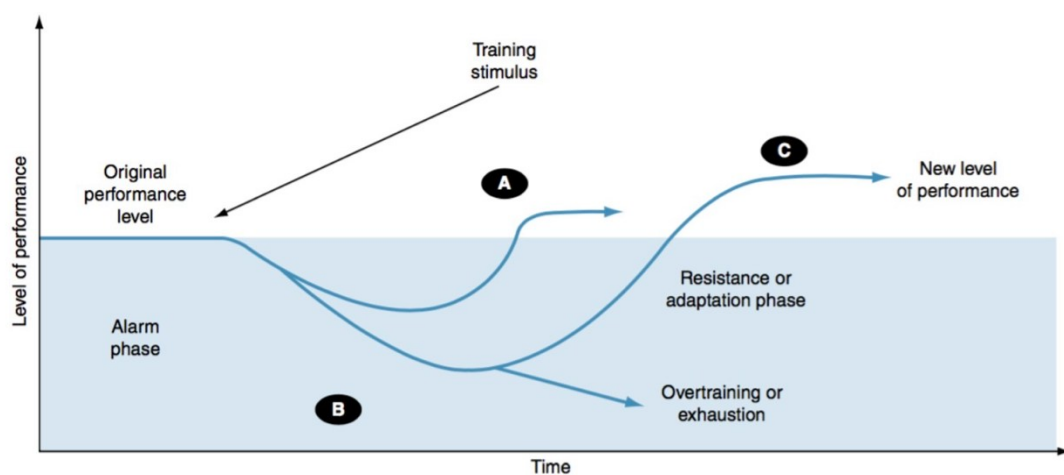


Figura 5- Sindrome generale di adattamento, importanza del tempo di applicazione dello stimolo

Se il periodo di recupero è adeguato e proporzionato, non vi è semplicemente un ritorno alla condizione iniziale, i processi di sintesi portano ad un innalzamento delle riserve energetiche e delle strutture proteiche al di sopra dei livelli basali pre-esercizio. Questo fenomeno, noto come supercompensazione (Yakovlev, 1955), è uno dei principi fondamentali su cui si basa l'allenamento. L'allenamento si può definire come un processo organizzato dove corpo e mente sono costantemente sottoposti a fattori stressanti. Lo stress è l'interazione di molteplici aspetti fisiologici che si possono riassumere come le risposte a due grandi stimoli: intensità e durata. La combinazione di questi deve essere adeguata alla soggettività dell'individuo e di conseguenza alle sue caratteristiche fisiologiche, lo stato di allenamento, di nutrizione e è importante valutare inoltre lo stato di allenamento, la nutrizione e lo stato psicofisico del soggetto. La programmazione dell'allenamento di *endurance* si fonda sulla precisa quantificazione dell'esercizio, essa è categorizzata tramite l'individuazione di precisi e specifici marker fisiologici, tipicamente vengono utilizzate le soglie ventilatorie, andando

ad analizzare gli scambi gassosi tramite l'analisi dei gas inspirati ed espirati a livello della bocca, o le soglie del lattato, in questo caso la rilevazione è più invasiva e si effettua un prelievo del lattato ematico. Questo approccio suddivide lo spettro metabolico in tre macro-zone: *low*, *moderate*, *high* (Seiler, 2010); o anche dette domini: *moderate*, *heavy*, *severe*. Il dominio moderato o *low intensity training* (LIT), comprende tutte le intensità di lavoro inferiori alla prima soglia ventilatoria (VT1) o alla prima soglia del lattato (LT1). L'esercizio in questo dominio può essere protratto per ore, la fatica insorge per esaurimento delle riserve di glicogeno epatico e muscolare, per ipertermia o per fattori legati all'affaticamento del sistema nervoso centrale (SNC) (Noakes, 2012). Aumentando l'intensità oltre la prima soglia ventilatoria o la prima soglia del lattato, si entra nel *heavy domain o moderate intensity training* (MIT), è delimitata superiormente dalla seconda soglia ventilatoria (VT2) o dalla soglia anaerobica (LT2), quest'ultima coincide con il massimo stato stazionario del lattato MLSS, *Maximum Lactate Steady State*) ossia la massima intensità di esercizio per cui il tasso di comparsa del lattato nel torrente ematico è esattamente eguagliato dal suo tasso di smaltimento tissutale. In ultimo troviamo il *severe domain o high intensity training* (HIT), qui la richiesta di potenza meccanica supera le capacità ossidative sostenibili. La prima soglia viene definita come il più alto tasso metabolico che non è associato con acidosi metabolica o che varia l'omeostasi sistemica. La seconda soglia denota il più alto tasso metabolico in cui è presente l'omeostasi fisiologica a discapito di un aumento, seppur limitato, di acidosi metabolica. Al di sopra di tale soglia, l'acidosi metabolica peggiora progressivamente e l'omeostasi fisiologica non è più mantenuta portando all'insostenibilità dell'esercizio (Keir et al., 2022).

Definizione del protocollo HIIT

L'allenamento intervallato ad alta intensità (*High Intensity Interval Training*) si è affermato come una delle metodologie più efficace e validata a livello scientifico nell'ambito della biologia dell'esercizio fisico. L'allenamento ad alta intensità intervallato è definito come un esercizio che consiste nel ripetere intervalli di lavoro ad alta intensità separati da intervalli di recupero a bassa intensità (recupero attivo) o di riposo (recupero passivo) affinché si possa sostenere un alto volume di lavoro HIT (Laursen & Buchheit, 2019). Questa tipologia di intervento allenante si basa sulla possibilità, tramite l'intermittenza del lavoro, di riuscire a posticipare l'insorgenza della fatica e aggirare i limiti omeostatici dell'allenamento a carico costante. Nei tipici allenamenti basati con esercizi a carico costante, si va incontro ad un rapido esaurimento delle riserve anaerobiche e ad un'intollerabile acidosi cellulare. Tramite l'allenamento intervallato ad alta intensità riusciamo a frazionare lo sforzo tramite le pause, così da permettere al muscolo di ripristinare parzialmente le riserve di fosfocreatina mitocondriale (PCr) e di tamponare i metaboliti inibitori, in questo modo

l'atleta è in grado di accumulare un volume totale di lavoro alle massime espressioni metaboliche (quantificato fisiologicamente come tempo trascorso in prossimità o al massimo consumo di ossigeno) molto maggiore rispetto a quanto sarebbe possibile in un'unica singola erogazione di potenza continua (Laursen & Buchheit, 2019).

Tassonomia dell'alta intensità: inquadramento metabolico dell'HIIT

Dal punto di vista termodinamico e metabolico, l'esercizio fisico ad alta intensità rappresenta la più severa perturbazione omeostatica che un organismo sano possa sopportare (McArdle, Katch & Katch, 2015). Il miglior metodo per valutare la tassonomia dell'HIIT è confrontarlo con i tradizionali metodi di allenamento continuo ad intensità moderata. L'ipotesi iniziale si concentra su quali siano i fattori cardine per migliorare la potenza aerobica, Helegrud e colleghi (2007) condussero uno studio di metanalisi dove appunto si confrontavano gli effetti di quattro diversi protocolli di allenamento sul massimo consumo di ossigeno (VO_2max). I quattro protocolli si dividevano in fondo lento, allenamento in soglia lattacida e due protocolli HIIT, i risultati confermarono una netta superiorità degli interventi ad alta intensità che portarono in solo otto settimane di allenamenti a miglioramenti del VO_2max rispettivamente del 5.5% e del 7.2% (importante specificare che si tratta di soggetti non élite con livelli di VO_2max iniziali tra i 26 e i 52 ml/kg/min). La transizione dal riposo al lavoro meccanico massimale è tipica delle frazioni di lavoro di un protocollo HIIT (*High Intensity Interval Training*). Laursen e Buchheit (2019) descrivono la programmazione di questi protocolli, non come uno stimolo unico e standardizzato, ma come un intricato “puzzle” meccanico e metabolico, che viene governato in base alle richieste e agli obiettivi dell'atleta andando a manipolare le variabili indipendenti fondamentali: intensità dell'intervallo di lavoro, durata dell'intervallo di lavoro, intensità della frazione di recupero, durata della frazione di recupero, numero di ripetizioni per serie, numero di serie totali, durata del recupero inter-serie, intensità del recupero inter-serie, modalità biomeccanica dell'esercizio. Tramite la variazione di una o più variabili allo stesso tempo ci sono numerose variazioni nella seduta di allenamento e nell'intera programmazione. Per standardizzare la terminologia e fornire chiare linee guida applicative, la letteratura contemporanea raggruppa le infinite combinazioni di variabili in quattro macrocategorie ben distinte (Laursen & Buchheit, 2019). La prima tipologia di allenamento è l'HIIT a intervalli lunghi (*Long HIIT*), che prevede frazioni di lavoro sostenute, comprese tra 1 e 8 minuti di lavoro, eseguite ad intensità submassimali corrispondenti al 90/100% della potenza o velocità associata al massimo consumo di ossigeno. A causa dell'elevata esposizione allo stress, questa metodologia porta un massimo sovraccarico volumetrico e pressorio sul miocardio, ed è appunto considerata molto efficace nel miglioramento dei parametri centrali (gittata sistolica) e anche per il potenziamento dei tassi di respirazione

mitocondriale. La seconda tipologia è l'HIIT a intervalli brevi (*Short HIIT*), caratterizzata da intervalli di lavoro inferiori ai 60 secondi di lavoro ad intensità pari al 100/120% della potenza o velocità associata al massimo consumo di ossigeno. In questo tipo di protocollo il breve recupero non consente un ritorno ai valori basali del trasporto di ossigeno, di conseguenza si mantengono livelli di VO_2 elevati. Pur garantendo un tempo trascorso in prossimità del $\text{VO}_{2\text{max}}$ eccellente, questi tempi di lavoro brevi prevengono un eccessivo intervento della glicolisi rapida, riducendo lo stress acido-base rispetto agli intervalli lunghi. Un'altra tipologia di intervento è lo *sprint interval training* (SIT), che consiste nell'esecuzione di sforzi massimali e intensità “*all-out*”, ossia non a ritmo prestabilito ma richiedendo il massimo dispendio energetico possibile. Prevede un tempo di lavoro compreso tra i 20 e i 30 secondi con recuperi alti che vanno da un minimo di 1 minuto fino anche a 4 minuti, i recuperi così alti sono dovuti all'ingente deplezione energetica portata dall'esercizio. Il SIT impone uno stress severo sulla capacità glicolitica e innesca potenti segnali di trasduzione legati allo shear stress vascolare e alla massiccia attivazione di fibre di tipo II. Ultimo componente di questa divisione all'interno del protocollo HIIT è il *repeated-sprint training* (RST), consiste in sprint massimali di brevissima durata, minori di 10 secondi, interrotti da periodi di recupero altrettanto ridotti, spesso inferiori a 60 secondi. Questa specifica metodologia va a stressare in modo importante le vie metaboliche dedite al ripristino rapido dei livelli di fosfocreatina e per i meccanismi di clearance ionica, risultando una metodologia fondamentale per le dinamiche di sport di squadra intermittenti. Inoltre, esistono anche i protocolli HIIT basati sul gioco o *Small Sided Games* (SSG), molto utilizzati negli sport di squadra per riuscire ad unire aspetti tecnici e specifici di gioco in un contesto in cui è richiesta una intensità maggiore, hanno durata ed intensità variabile e poco prevedibile.

Adattamenti centrali e periferici: rimodellamento cardiaco, gittata sistolica, densità capillare ed estrazione tissutale di O_2

Il profondo stress meccanico e metabolico indotto dalle diverse modalità di HIIT non si limita a risposte acute, ma innesca una complessa rete di adattamenti cronici e rimodellamento per poter supportare la maggiore richiesta energetica. Questi specifici adattamenti si manifestano sia a livello del sistema cardiovascolare centrale sia a livello del microambiente muscolare periferico. Come postulato dalla legge di Fick, l'incremento del massimo consumo di ossigeno e il miglioramento della tolleranza alla fatica dipendono da componenti centrali e componenti periferiche che lavorano in maniera sinergica. Le diverse tipologie di allenamento che si basano sul protocollo HIIT sono, come visto in precedenza, le migliori per apportare un profondo e mirato rimodellamento di queste strutture. La principale componente centrale è la gittata cardiaca massima, che è il motore primario dell'innalzamento del limite aerobico massimale negli atleti. L'ottimizzazione del $\text{VO}_{2\text{max}}$ richiede

obbligatoriamente un'esposizione protratta del sistema cardiovascolare a regimi di lavoro vicini al massimale (Midgley et al., 2007). Questo stress emodinamico genera un aumento del ritorno venoso che, accoppiato ad un'espansione cronica del volume plasmatico indotta dall'allenamento, massimizza il riempimento telediastolico del ventricolo sinistro. Questo sovraccarico volumetrico e pressorio intermittente applica uno stiramento meccanico massiccio sulle fibre miocardiche, stimolando in tal modo un'ipertrofia eccentrica a livello del ventricolo sinistro. L'ipertrofia del ventricolo è caratterizzata dall'aggiunta di sarcomeri in serie e di conseguenza da un allargamento della cavità ventricolare, c'è quindi un aumento del volume telediastolico e un miglioramento della capacità contrattile del miocardio. Poiché la frequenza cardiaca massima non è soggetta a incrementi positivi con l'allenamento, è unicamente questa espansione strutturale della gittata sistolica massima a determinare l'incremento assoluto del trasporto di ossigeno verso i muscoli locomotori (Midgley et al., 2007). Parlando delle componenti periferiche si deve valutare l'architettura microvascolare per stabilire quanto e come viene utilizzato l'ossigeno in circolo. L'estrazione tissutale di ossigeno ((a-v) O₂max) è direttamente dipendente dalla funzionalità del reticolo mitocondriale e dall'espansione della densità capillare. L'elevato *shear stress* (sforzo di taglio emodinamico), ossia la forza esercitata dal flusso sanguigno contro la membrana delle cellule epiteliali che rivestono il lume dei vasi sanguigni, causato dall'iperemia reattiva durante le frazioni di lavoro ad alta intensità stimola l'angiogenesi (Midgley et al., 2007). L'angiogenesi nella fisiologia dell'esercizio e per quanto riguarda gli adattamenti periferici, rappresenta il meccanismo di espansione del letto microvascolare, quindi un aumento della densità capillare in risposta agli stress indotti dall'allenamento. L'incremento del numero di capillari per fibra muscolare permette di aumentare l'area di superficie disponibile per lo scambio gassoso e, distribuendo il flusso ematico su un letto vascolare più ampio prolunga il tempo di transito medio dei globuli rossi. Questo rallentamento a livello microcircolatorio assicura al globulo rosso il tempo necessario per dissociarsi dall'ossigeno e scaricarlo nel miocita. Spencer e colleghi (Spencer et al., 2005) analizzarono anche quanto, soprattutto negli sport di squadra o caratterizzati da sprint ripetuti, sia importante oltre alla capacità di generare picchi di potenza aerobica, la cinetica di ripristino omeostatico che avviene durante le fasi di recupero. Un'elevata densità capillare associata ad un efficiente corredo enzimatico ossidativo permette un'importante accelerazione nella sintesi della fosfocreatina (PCr) intramuscolare utilizzata durante lo sprint (Spencer et al., 2005). Gli adattamenti indotti dall'HIIT rappresentano un'evoluzione integrata tra fattori centrali quali la gittata sistolica e il rimodellamento del miocardio e fattori periferici rappresentati dall'ottimizzata capacità di estrazione tissutale e un'aumentata densità capillare. Questa sinergia porta ad un aumento del massimo consumo di ossigeno (VO₂max) e porta anche la fibra

muscolare ad avere una resilienza metabolica indispensabile che permetta di tollerare le rotture dell'omeostasi e accelerare il ripristino energetico tra gli sforzi intermittenti tipici dei protocolli HIIT.

1.2 Condizioni di ossigenazione e modulazione della performance

Normossia: omeostasi respiratoria e saturazione arteriosa di base

L'equilibrio omeostatico dell'intero organismo, e quindi la sopravvivenza di tutte le cellule, dipende dal corretto funzionamento dell'apparato respiratorio (Patton, K. T., & Thibodeau, G.A., 2017). Come visto nello studio sulla cascata dell'ossigeno, ogni cellula a livello mitocondriale necessita di ossigeno per poter lavorare e rispondere alle diverse richieste metaboliche. Attraverso la ventilazione polmonare l'aria fresca esterna fluisce nel torrente circolatorio e per mezzo della diffusione, l'ossigeno penetra nell'ambiente interno, il sangue trasporta i gas ematici attraverso tutto l'organismo. In fisiologia respiratoria, per normossia si definisce quella condizione ambientale che può considerarsi standard a livello del mare, caratterizzata da una pressione barometrica (P_b) di circa 760 mmHg e una frazione inspirata da ossigeno (F_iO_2) pari a 20.93%. In queste condizioni, la pressione parziale di ossigeno nell'aria secca è di circa 159 mmHg. Durante il passaggio nelle vie aeree di conduzione, l'aria viene umidificata e riscaldata a 37°, questo processo riduce la pressione parziale di ossigeno inspirato (PO_2) a circa 149 mmHg a livello tracheale (West, 2012). Il mantenimento dell'omeostasi respiratoria alveolare dipende dal bilancio dinamico tra ventilazione alveolare (V_a) e rimozione capillare di ossigeno. Le influenze chimiche costituiscono il più importante tra i fattori modulanti l'attività automatica dei centri respiratori, queste variazioni di alcuni parametri (PCO_2 , PO_2 , pH) sono costantemente rilevate da un sistema di recettori specifici (Baldissera, F., & Porro, C.A., 2009). Esistono chemocettori periferici e centrali con differenze a livello funzionale ma che collaborano per mantenere l'omeostasi. L'elemento biochimico cruciale che garantisce la sicurezza nel trasporto sistemico in normossia risiede nell'emoglobina (Hb) e il suo legame con l'ossigeno. La curva di dissociazione dell'ossiemoglobina a valori di pressione parziale di ossigeno di 90/100 mmHg, si trova nel suo plateau superiore, in una zona quasi orizzontale. Questa conformazione assicura che, in normossia basale, la saturazione arteriosa dell'emoglobina (SO_2) sia massimizzata, raggiungendo valori del 97/99% (Collins et al., 2015). Durante l'esercizio muscolare il metabolismo dei muscoli in attività porta ad un aumento della produzione di CO_2 e nel consumo di O_2 , negli esercizi di tipo anaerobico si nota un abbassamento del pH. Nel tessuto muscolare in attività, PCO_2 può superare il valore di 100 mmHg, il pH può scendere a 6,5 e PO_2 può abbassarsi fino a 15 mmHg (Baldissera, F., & Porro, C.A., 2009). La ventilazione in condizioni di riposo si aggira tra i 5/8 L/min, durante il lavoro muscolare la ventilazione aumenta notevolmente, per poter mantenere i parametri a livelli normali. In sforzi massimali la ventilazione può aumentare di 15/20 volte fino ad arrivare a

raggiungere valori maggiori di 150 L/min. Il notevole aumento del lavoro eseguito dai muscoli respiratori comporta di per sé un aumento importante a livello del consumo di ossigeno, i muscoli respiratori in condizioni normali di riposo hanno un consumo di ossigeno di 2 ml/min e aumenta di circa 2/5 ml/min per ogni litro di ventilazione in più, in sforzi massimali può arrivare fino a 500/700 ml/min. Ciò fa sì che oltre un certo limite, tutto l'incremento respiratorio va speso per sostenere la spesa dei muscoli respiratori e non porta alcun vantaggio ai muscoli impiegati durante l'esercizio (Baldissera, F., & Porro, C.A., 2009). L'aumento della ventilazione che si verifica durante l'esercizio muscolare è spiegato in questo grafico, notiamo un caratteristico andamento temporale trifasico caratterizzato nella prima fase da un aumento immediato che coincide con l'inizio dell'attività, una seconda fase dove notiamo un ulteriore aumento graduale per i primi 2/3 minuti, infine la terza fase mostra un mantenimento ad un valore stabile per la durata restante dell'esercizio.

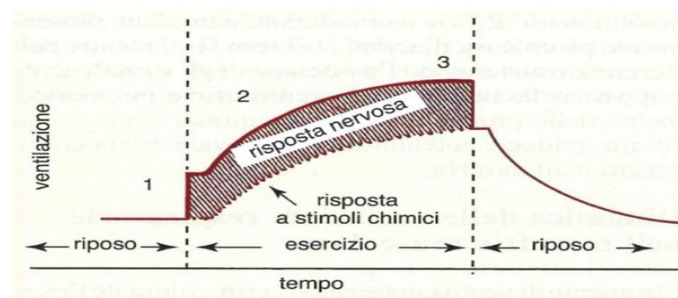


Figura 6- Andamento temporale della ventilazione durante esercizio muscolare di intensità costante

Ipossia: risposte acute, stabilizzazione del fattore inducibile dell'ipossia (1-alpha) e cinetica del lattato

L'ambiente ipossico si può suddividere tra ipossia ipobarica, ossia di natura altimetrica, e ipossia normobarica, simulata artificialmente, in entrambi i casi vi è una caduta della pressione parziale di ossigeno inspirata (P_{iO_2}). Questo decremento va a gravare sulla cascata dell'ossigeno, provocando così una caduta della pressione alveolare (PAO_2) e di conseguenza una marcata ipossemia arteriosa. L'organismo umano reagisce a questa alterazione omeostatica tramite complesse risposte fisiologiche acute e riprogrammazioni molecolari a lungo termine. Il declino della pressione arteriosa (P_aO_2) innesca la risposta ventilatoria ipossica (HVR, Hypoxic Ventilatory Response), si manifesta con un'iperventilazione immediata compensatoria. L'aumento della ventilazione alveolare mira a difendere la PAO_2 , ma inevitabilmente porta ad una spiccata ipocapnia (riduzione della P_aCO_2) e una conseguente alcalosi respiratoria (micheils, 2004). L'accelerazione ventilatoria indotta dall'ipossia è quindi frenata dall'ipocapnia che essa stessa provoca. L'adattamento cellulare profondo è governato dai fattori inducibili dell'ipossia (HIF). Questa famiglia di fattori di trascrizione agisce come il vero e proprio regolatore dell'omeostasi di ossigeno cellulare (Semenza, 2012). Il complesso HIF è

formato da una subunità beta e da una subunità alpha, quest'ultima è la più nota e anche altamente sensibile alle fluttuazioni di O_2 . In condizioni di normossia entrano in gioco le PHD, ovvero una famiglia di enzimi intracellulari che utilizzano l'ossigeno molecolare per idrossilare specifici residui di prolina sulla subunità alpha del complesso HIF, in modo da marcare la subunità rendendola riconoscibile, destinando così il fattore di trascrizione alla rapida distribuzione da parte del proteasoma (Schofield & Ratcliffe, 2004). In condizioni ipossiche, le PHD sono inibite nella loro attività catalitica in quanto è presente una carenza del substrato di ossigeno, la subunità alpha sfugge al riconoscimento e alla conseguente degradazione e si accumula nel citoplasma cellulare per poi spostarsi nel nucleo, dove si legherà alla subunità beta e si legherà nuovamente a specifiche sequenze di DNA avviando la trascrizione in modo da adattare l'organismo alla carenza di ossigeno. Durante l'attività fisica nel pratico variano le dinamiche metaboliche, si nota uno shift verso la glicolisi anaerobica, con un'alta attivazione dei trasportatori di glucosio, inoltre si ha un'accelerazione della produzione di lattato e chiaramente un'anticipazione delle soglie metaboliche e della fatica precoce.

Iperossia: alterazione della pressione di spinta respiratoria e supporto ergogenico

La risposta sistemica è altamente influenzabile da modifiche ambientali che vanno ad influire sul normale decorso e sull'omeostasi della cascata dell'ossigeno. L'iperossia in ambito fisiologico è definita come la respirazione di miscele gassose con una frazione inspirata di ossigeno (F_iO_2) superiore a quella atmosferica standard. È importante diversificare e non confondere la pressione parziale di ossigeno (PO_2), che esprime la quantità di ossigeno presente nell'aria, e la frazione inspirata di ossigeno (F_iO_2), che rappresenta invece la concentrazione di ossigeno presente nell'aria. La prima può variare quando si sale o si scende di quota in base alla pressione atmosferica mentre la seconda rimane invariata (circa 21%). Tramite una miscela iperossica si va incontro a profonde alterazioni delle dinamiche pressorie lungo tutti gli scalini della cascata dell'ossigeno. Tramite queste modifiche si va incontro ad un incremento della pressione arteriosa parziale di ossigeno (P_aO_2), un aumento anche della saturazione arteriosa di ossigeno (S_aO_2) e sono aumentati anche i livelli di O_2 disciolto nel sangue. Respirare miscela iperossica, aumenta il contenuto arterioso di O_2 e il trasporto di O_2 indipendentemente dal flusso sanguigno (Cardinale & Ekblom, 2018). L'aumento della P_aO_2 crea una formidabile pressione di spinta (*driving pressure*) a livello periferico, come dimostrato tramite indagini di risonanza magnetica (Richardson et al., 1999), viene massimizzata la conduttanza tissutale forzando così l'ossigeno ad attraversare più rapidamente interstizio verso il sarcoplasma. L'effetto è il mantenimento di una pressione parziale di ossigeno intracellulare significativamente superiore, anche in sforzi massimali. Vi è una importante alterazione nella bioenergetica della fibrocellula in contrazione, questi processi portano ad una cinetica del consumo di ossigeno più rapida

al l'insorgenza dell'esercizio, riducendo il deficit di ossigeno iniziale. A livello metabolico notiamo come la fosforilazione ossidativa riesce a sostenere una quota maggiore del fabbisogno di ATP, risparmiando le riserve citosoliche di fosfocreatina (PCr) e glicogeno. Si è visto che respirare una $F_{iO_2} > 60\%$ mentre ci si allenava al 70% del VO_{2max} riduceva del 33% l'utilizzo di glicogeno muscolare rispetto a condizioni normossiche (Gifford et al., 2016), questo suggerisce come lavorando in iperossia si riesca a risparmiare a livello energetico mantenendo lo stimolo allenante invariato. Si può considerare quindi l'iperossia come un supporto ergogenico di natura fisiologica, alterando artificialmente le pressioni parziali di dei gas arteriosi si superano i limiti naturali di trasporto e diffusione e questo permette all'atleta di produrre una quantità di lavoro meccanico maggiore rispetto a condizioni normossiche. L'importanza di questo ambiente, tuttavia, non risiede esclusivamente nel vantaggio prestativo acuto, ma anche come potente catalizzatore per gli adattamenti periferici, la variazione del gradiente di ossigeno funge da innesco per la trasduzione del segnale con il quale il miocita traduce lo stress ambientale in un rimodellamento strutturale del proprio apparato ossidativo.

1.3 Biogenesi e rimodellamento funzionale del reticolo mitocondriale

Architettura e dinamica della rete mitocondriale nel muscolo scheletrico

Lo studio della cascata dell'ossigeno e l'efficienza del trasporto ematico, trovano il loro il loro compimento a livello funzionale all'interno del microambiente del miocita. Lo stress imposto dai protocolli di allenamento HIIT e le variazioni della pressione parziale di ossigeno si traducono in segnali molecolari che sono in grado di rimodellare l'architettura cellulare. Il muscolo scheletrico non si limita ad aumentare passivamente il numero di organelli ma noteremo un vero e proprio rinnovamento dall'apparato ossidativo in modo da riuscire ad ottimizzare la gestione dei flussi energetici. Il mitocondrio non è un'unità statica ma bensì presenta un reticolo mitocondriale fluido e interconnesso, attiva una coordinata rete di trasduzione del segnale che vede nei fattori HIF-1 α e PGC-1 α i regolatori chiave della risposta plastica cellulare. La stabilità di HIF-1 α risponde direttamente alle fluttuazioni di PO_2 , l'attivazione del coattivatore PGC-1 α è guidata dallo stress energetico e metabolico indotto dall'alta intensità. Questo processo di adattamento non si limita all'incremento passivo del numero di organelli, ma ad un rinnovamento qualitativo dell'apparato respiratorio, ottimizzando la gestione dei flussi energetici. All'interno della fibra muscolare questa rete avvolge le miofibrille, permettendo una propagazione quasi istantanea del potenziale di membrana e una distribuzione omogenea dei substrati metabolici. Questa plasticità morfologica è governata da un equilibrio tra processi di fusione e fissione, i quali determinano non solo la forma, ma la qualità funzionale dall'apparato respiratorio cellulare (Bishop et al., 2019; Hood, 2009). In

risposta all'esercizio fisico ci sono delle variazioni strutturali sul reticolo. I processi di fusione mitocondriale descrivono appunto come due mitocondri distinti si uniscono per formare un unico organello o per riuscire ad integrarsi in un reticolo più ampio, questo processo è una risposta di ottimizzazione a elevate richieste energetiche, i mitocondri si fondono per condividere i metaboliti e il mtDNA per compensare eventuali mancanze, per diluire lo stress ossidativo disperdendo parte dei danni causati dai radicali liberi (ROS) e per poter massimizzare la produzione di ATP. I processi di fissione mitocondriale invece lavorano in maniera opposta alla fusione mitocondriale, in questo caso un singolo mitocondrio si divide in due o più organelli. Lo scopo fisiologico di questo processo è quello di avere un controllo sulla qualità della proliferazione. Tramite mitofagia se è presente parte del reticolo mitocondriale danneggiata e depolarizzata viene isolata fisicamente dal resto del reticolo. Attraverso la biogenesi e la proliferazione organulare permette agli organelli di dividersi e generare nuove unità funzionali pronte a colonizzare aree del sarcoplasma in modo da avere una reale espansione del reticolo. Inoltre, la fissione è un processo fondamentale per quanto riguarda il trasporto intracellulare in quanto organelli di dimensioni ridotte sono meccanicamente più idonei ad essere veicolati attraverso i microtubuli del citoscheletro verso le zone della cellula con una maggior richiesta di ATP.

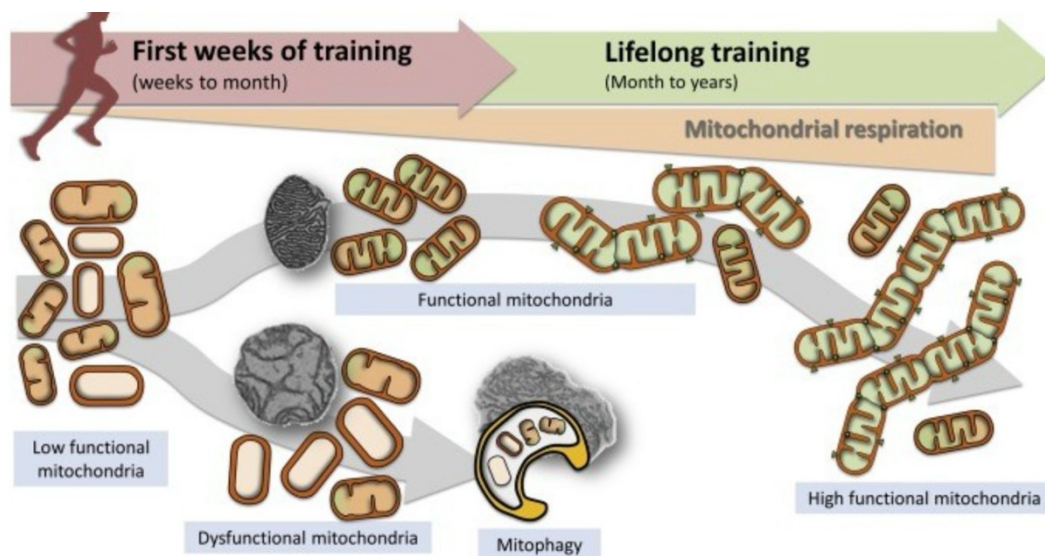


Figura 7- Processi di fissione e fusione mitocondriale

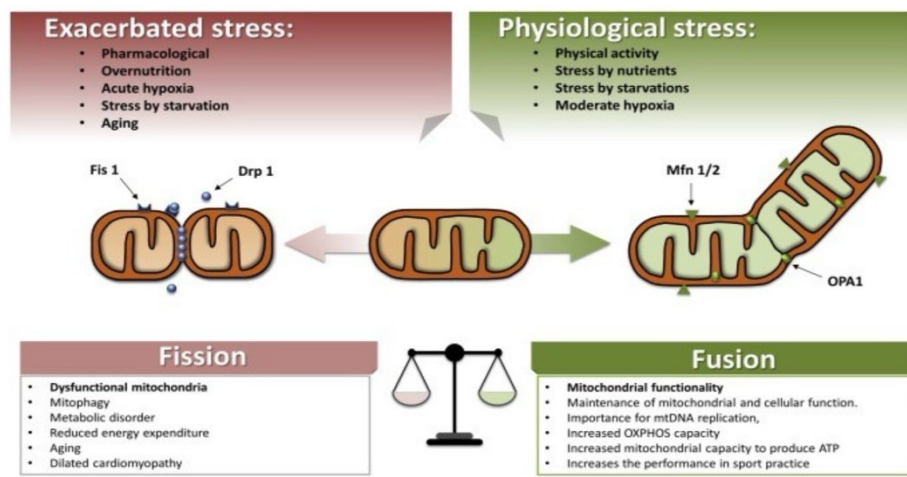


Figura 8- Evoluzione del reticolo ossidativo, fase acuta e adattamento cronico

È quindi importante sapere che l'allenamento non influisce solo sulla massa mitocondriale ossia la quantità, ma ne migliora la qualità e la funzionalità (*intrinsic function*), ottimizzando l'efficienza della catena di trasporto degli elettroni e riducendo la dispersione protonica (Bishop et al., 2019).

Il prelievo biotico muscolare e il genoma (mtDNA) come marker quantitativo di densità

La biopsia muscolare è la principale metodologia di indagine riguardante l'adattamento muscolare, tramite questo strumento si è in grado di avere una fotografia diretta e meccanicistica della plasticità del tessuto contrattile. Attraverso questa analisi è possibile quantificare l'entità della biogenesi grazie a specifici marker biochimici e molecolari. La misurazione del DNA mitocondriale (mtDNA) è un indicatore fondamentale, il contenuto di mtDNA riflette fedelmente il numero di genomi organulari per cellula, il suo incremento è sinonimo di un'espansione della densità del reticolo (Little et al., 2010). A differenza del genoma nucleare il DNA mitocondriale è una molecola a doppio filamento che codifica specificatamente per 13 polipeptidi essenziali, tutti costituenti della catena di trasporto degli elettroni e dell'ATP sintasi. La replicazione del mtDNA rappresenta un passaggio biochimico fondamentale e limitante nell'intera complessa cascata della biogenesi organulare indotta da esercizio (Hood, 2009). Tuttavia, è emerso un dibattito a livello scientifico circa la divergenza che può crearsi tra l'aumento della massa mitocondriale e il reale potenziamento della capacità respiratoria (Bishop et al., 2019). Il solo aumento del contenuto mitocondriale non sempre riflette un incremento della funzionalità respiratoria e per questo tramite il prelievo biotico si deve integrare il dato del mtDNA con la valutazione dell'attività enzimatica e dei tassi di respirazione, degli organelli isolati e delle fibre permeabilizzate in modo da avere così un quadro completo ed esaustivo della reale capacità ossidativa.

Biogenesi mitocondriale indotta dall'esercizio e adattamenti del mtDNA in risposta all'HIIT e ai diversi gradienti di ossigenazione

La biogenesi mitocondriale è un processo coordinato tra il genoma nucleare e quello mitocondriale, l'esercizio fisico rappresenta il più potente stimolo fisiologico per attivare questa cascata, agendo attraverso perturbazioni molecolari come l'aumento del turnover dell'ATP, l'attivazione della protein-chinasi attivata dall'AMP (Adenosina monofosfato) e l'incremento del calcio citosolico (Bishop et al., 2019, Hood, 2009). Il coattivatore trascrizionale principale di questa risposta fisiologica è PGC-1alpha, la cui espressione genica e attivazione proteica guidano l'espansione del reticolo mitocondriale e allo stesso tempo il processo di angiogenesi (Geng et al., 2010). All'interno del protocollo ad alta intensità (HIIT), si osserva un fenomeno molto importante: sebbene il volume di lavoro totale sia inferiore ai protocolli più incentrati sul fondo continuo (LIT), *l'high intensity interval training* innesca una risposta molecolare superiore. I picchi metabolici che il protocollo HIIT permette di raggiungere generano picchi di stress metabolici così acuti da attivare in maniera maggiore PGC-1alpha, inducendo conseguentemente incrementi della densità mitocondriale paragonabili e perfino superiori a sessioni di *endurance* molto più lunghe (Little et al., 2010). Tali adattamenti funzionali sono stati documentati con successo in un ampio spettro di popolazione, dimostrando che la capacità della cellula muscolare di rimodellare il proprio corredo ossidativo in risposta all'HIIT rimane intatta sia nei giovani che negli anziani, indipendentemente dal sesso (Chrøis et al., 2020). Un altro studio condotto da Zwetsloot e colleghi (2014), ha notato come lo stress che porta l'alta intensità provoca una modesta risposta infiammatoria acuta sistemica che però non è dannosa, ma al contrario agisce come segnale ormetico necessario per i processi di riparazione e adattamento a lungo termine. La biogenesi mitocondriale è modulata dall'ossigenazione ambientale. In condizioni di ipossia la marcata riduzione di P_aO_2 stabilizza il fattore inducibile dell'ipossia (HIF), innescando una risposta adattiva orientata all'efficienza. Questo microambiente forza la rete mitocondriale ad una ottimizzazione, in quanto la potenza meccanica espressa è inevitabilmente ridotta ma lo stress omeostatico a parità di carico è massimizzato. In condizioni iperossiche durante sforzi massimali rimane garantito un flusso di ossigeno superiore ai mitocondri e questo permette di sostenere carichi meccanici insostenibili ad altre frazioni inspirate di ossigeno. L'iperossia porta ad un sovraccarico metabolico che esaspera la stimolazione delle vie dell'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) e di PGC-1alpha, questo fa sì che la replicazione del DNA mitocondriale sia accelerata e a sua volta anche il rimodellamento funzionale del reticolo mitocondriale.

1.4 Ipotesi e razionale della tesi

Qual è il reale impatto dell'allenamento ad alta intensità sul miocita?

Studiare come un protocollo di allenamento HIIT, in condizioni ipossiche ed iperossiche, modifichi la biogenesi mitocondriale e il potenziamento del massimo consumo di ossigeno ($\text{VO}_{2\text{max}}$). Il reale impatto dell'allenamento ad alta intensità intervallato sul microambiente miocitario è già ampiamente riconosciuto dalla letteratura scientifica, il razionale di questa tesi è andare a valutare oltre agli adattamenti macroscopici, adattamenti sub-cellulari. Questo protocollo di allenamento innesca massicce variazioni fisiologiche come visto nei sotto capitoli precedenti, e relativi adattamenti da parte dell'organismo, rimane da chiarire in che misura questo stress si traduca in un aumento quantitativo del volume del reticolo mitocondriale o un aumento qualitativo con conseguente rimodellamento della sua architettura. L'ipotesi alla base di questo studio è che le frazioni di lavoro ad altissima intensità forzino il miocita ad una riprogrammazione bioenergetica che non si limita solo alla proliferazione organulare, ma coinvolge una ottimizzazione profonda dell'efficienza intrinseca dei complessi enzimatici e della catena respiratoria.

Effetti delle diverse pressioni parziali di ossigeno sui tassi di respirazione mitocondriale normalizzati per mtDNA

I protocolli di lavoro ad alta intensità intervallati svolti a pressioni parziali di ossigeno (ipossia, iperossia) non sono esclusivamente fattori limitanti o facilitanti a livello acuto per quanto riguarda il lavoro meccanico e la prestazione, ma fungono da potenti trasduttori del segnale in grado di reindirizzare specificatamente la qualità dell'adattamento organulare. La misurazione dei tassi di respirazione mitocondriale assoluti fornisce un quadro incompleto se non viene relazionata alla densità genomica dell'organello. In questo studio vengono normalizzati i tassi di respirazione mitocondriale al mtDNA così da isolare la funzionalità intrinseca del singolo mitocondrio dall'espansione volumetrica totale dell'intera rete mitocondriale.

Il razionale scientifico di questo elaborato prevede che l'allenamento in ipossia induca ad un adattamento mirato principalmente alla massimizzazione dell'accoppiamento termodinamico (*coupling efficiency*) in modo da compensare la caduta del gradiente pressorio, risultando tassi di respirazione intrinseca (normalizzati per mtDNA) superiori rispetto alla normossia a parità di carico relativo. Per quanto riguarda l'allenamento in iperossia, si ipotizza che superando i limiti centrali di conduzione e consentendo di generare livelli di potenza muscolare più alti, si inneschi un livello di stress trascrizionale che massimizza la biogenesi assoluta, quindi un incremento del mtDNA totale, e l'espressione dei citocromi terminali, alterando la capacità di flusso elettronico e la tolleranza del miocita all'acidosi metabolica profonda.

2. Materiali e metodi

2.1 Disegno sperimentale

Tipo di studio

Il disegno dello studio è di tipo sperimentale, longitudinale con misurazioni ripetute prima dell'intervento e alla fine dell'intero protocollo di allenamento. I soggetti hanno svolto tutti lo stesso programma di allenamento, ma in condizioni ambientali differenti (iperossia, normossia, ipossia).

Durata, sequenza e setting degli interventi

Lo studio ha una durata totale di otto settimane, le prime due settimane sono dedicate alle valutazioni pre-intervento ovvero biopsia muscolare e test di valutazione cardiorespiratoria, le successive quattro settimane si concentrano sul protocollo allenante, i soggetti vengono suddivisi randomicamente nei diversi gruppi di intervento e seguono il *training* prestabilito, nelle ultime due settimane si conclude lo studio tramite i test post-intervento, che sono gli stessi fatti nelle prime due settimane. I test vengono effettuati sempre nelle stesse ore, e per quanto possibile si è chiesto ai soggetti di mantenere le loro solite abitudini alimentari e non svolgere attività pesanti nelle 24 ore antecedenti ai test. Il protocollo di allenamento è strutturato in 12 sessioni di allenamento che vengono spalmate nelle 4 settimane in 3 allenamenti a settimana, mantenendo una distanza di 48 ore tra un allenamento e l'altro.

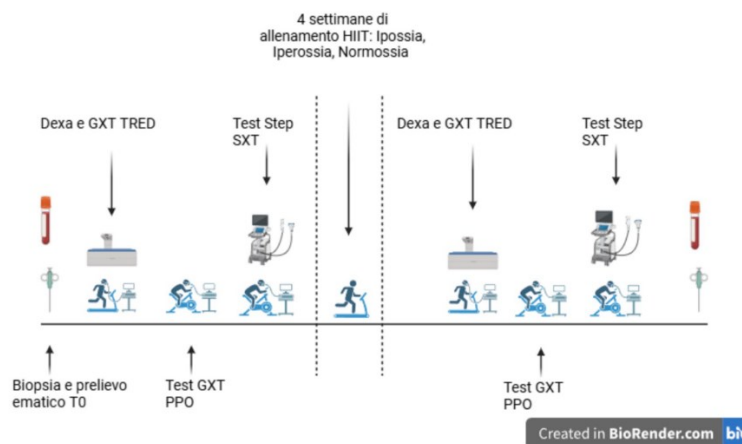


Figura 9- Rappresentazione grafica della cronologia degli interventi dello studio

Durante il periodo di allenamento viene chiesto ai soggetti di mantenere il volume di allenamento medio da loro seguito nelle 4 settimane precedenti ai test, in modo da prevenire un calo drastico del carico allenante, inoltre è anche chiesto ai soggetti di non effettuare allenamenti intensi al di fuori dell'intervento dello studio. Tutti i test e il protocollo allenante sono stati condotti presso i laboratori

dell'Università degli studi di Verona sotto supervisione del responsabile scientifico e tecnico, mentre le biopsie muscolari e controlli cardiaci sono stati svolti presso l'ospedale di Borgo Roma, Verona, in un ambiente clinico controllato.

2.2 Partecipanti

Criteri di inclusione/esclusione (età, sesso, livello di attività fisica)

I partecipanti vengono scelti seguendo precisi criteri di inclusione ed esclusione. Sono inclusi partecipanti sani tra i 18 e i 40 anni, non affetti da alcun tipo di malattia cronica, e che non assumano farmaci che possano compromettere la risposta cardiorespiratoria all'esercizio. Vengono invece esclusi dallo studio i partecipanti con le seguenti condizioni: malattie cardiache, malattie polmonari, cancro, insufficienza renale o epatica, o qualsiasi tipo di malattia renale o epatica, disturbi della coagulazione, storie di abuso di cannabis, oppioidi o altre sostanze, portatori di malattie infettive, malattie muscolo-scheletriche, malattie mentali o incapacità di collaborare, condizioni cardiache note come pacemaker, gravi aritmie e disturbi della conduzione cardiaca, neuropatia periferica. Possono essere inclusi partecipanti con aritmie solo se non presentano malattie cardiache strutturali, il burden aritmico rimane inferiore all'1% durante il monitoraggio ECG Holter delle 24 ore e non aumenta alla prova di sforzo durante le atmosfere controllate. I partecipanti sono stati assegnati a uno di tre gruppi specifici per condizione: normossia, ipossia o iperossia. Sulla base delle tabelle analitiche, 27 partecipanti hanno contribuito agli esiti principali dell'esercizio, mentre il campione disponibile è variato leggermente per le variabili della composizione corporea e derivate da biopsia (generalmente 24-27 partecipanti a seconda dell'endpoint). Tutti i test sono stati eseguiti prima (T0) e dopo (T1) il periodo di intervento.

2.3 Protocolli di allenamento

Descrizione dettagliata degli allenamenti HIIT utilizzati (numero di allenamenti, intensità, durata, recupero) e descrizione delle differenti condizioni ambientali (ipossia, normossia, iperossia)

Il protocollo di allenamento dura quattro settimane, nelle quali devono essere svolte un totale di 12 sessioni allenanti ad alta intensità. La sessione di allenamento si sviluppa di 4 ripetute da 4 minuti di corsa su treadmill impostato ad una pendenza del 5%, tra le ripetute ce un recupero attivo di 3 minuti. Durante ogni allenamento veniva registrata la frequenza cardiaca tramite fascia Polar per monitorare la risposta interna, ci si basava sui riferimenti rispetto alla frequenza massima di ciascun soggetto per

monitorare e controllare l'intensità dell'allenamento. Concentrandosi maggiormente sulla seduta, l'allenamento era composto da un riscaldamento di 10 minuti al 70% della MAS (*Max Aerobic Speed*) calcolata tramite i dati del test incrementale ad esaurimento sul treadmill, e come range di frequenza cardiaca si stava tra il 70% e il 75% della frequenza cardiaca massima (FCmax). Successivamente si passa al fulcro dell'allenamento, composto da 4 serie da 4 minuti al 95% della MAS, e range di frequenza cardiaca tra il 90% e il 95% della FCmax, tra una serie e l'altra 3 minuti di recupero attivo al 70% della MAS. Conclusi gli ultimi 3 minuti di recupero il soggetto poteva continuare il defaticamento con una camminata di 5 minuti a ritmi bassi. Durante l'allenamento veniva inoltre chiesto ai soggetti l'RPE (*Rating Perceived Exertion*) con la scala CR10, distinguendo lo sforzo percepito a livello respiratorio e a livello muscolare durante i 4 minuti di lavoro. Le condizioni di ossigenazione dell'intervento, normossia, iperossia e ipossia, sono tutte state fatte all'interno dei laboratori dell'Università degli studi di Verona. Per la condizione normossia non venivano richieste particolari preparazioni, mentre per l'ipossia e l'iperossia era necessario un particolare allestimento. Il gruppo in ipossia si allenava all'interno del CeRiSM, Rovereto, nella camera che simula condizioni di ridotta concentrazione di ossigeno (FiO_2 15-16%), e manteneva questa condizione per tutta la durata dell'allenamento. Per quanto riguarda il gruppo che lavorava in iperossia, le sessioni di allenamento erano condotte utilizzando uno specifico strumento che permetteva di simulare condizioni iperossiche ($\text{FiO}_2 > 40\%$), l'AltiTrainer (SMTEC). In questo caso i soggetti completavano in condizioni di iperossia solamente la parte centrale dell'allenamento, mentre riscaldamento e defaticamento erano svolti in condizioni di normossia.

2.4 Valutazioni metaboliche

Test incrementali per VO_2max (TRED/PPO)

I test incrementali svolti in questo protocollo sono di due tipologie e sono stati importanti per la valutazione dello stato iniziale ed anche per le variazioni fisiologiche e prestazionali che l'intervento ha portato. Il CPET (*Cardiopulmonary Exercise Test*) è un test incrementale ad esaurimento per determinare il massimo consumo di ossigeno (VO_2max e VO_2peak), la massima velocità aerobica (MAS) e la massima potenza erogata (*Peak Power Output*, PPO). I test incrementali sono stati svolti su treadmill (Cosmed, Roma) e su ergometro semi-reclinato (Ergoline, Ergoselect 1200). È stata utilizzata spirometria a circuito aperto con camera di mescolamento collegata ad un analizzatore di gas (Cosmed Quark, Roma). Volumi e flussi sono stati calibrati con una stringa da 3L prima di ogni test. La calibrazione dei gas è stata completata prima di ogni utilizzo seguendo le indicazioni del costruttore. Durante ogni test sono stati registrati VO_2 , VCO_2 , VE e FC. Inoltre, sono aggiunte misure

indirette di funzione cardiaca svolte grazie al software Physioflow, registrando valori come FC, Qs e Q. Il protocollo CPET su treadmill (TRED) consisteva in tre minuti iniziali di registrazione basale dei livelli di VO_2 e FC mentre il soggetto era stato istruito a restare il più rilassato possibile. Di seguito il soggetto eseguiva cinque minuti di riscaldamento ad una velocità costante di 7 km/h con inclinazione del 5%, concluso il riscaldamento iniziava il vero e proprio test incrementale, il treadmill aumentava la velocità di 0,5 km/h per ogni step, che era della durata di 1 minuto, fino ad esaurimento. La velocità (V_{max}) veniva calcolata prendendo l'ultimo step interamente concluso dal soggetto, se il soggetto si fosse fermato nel mezzo di uno step, il tempo sarebbe stato convertito in velocità tramite un'equazione specifica che modifica da watt a km/h ($V_{\text{max}} = \text{velocità ultimo step completato} + (\text{tempo dello step non completato} / \text{durata dello step} * \text{velocità step})$) (Michalik et al., 2021). Veniva inoltre fornito forte incoraggiamento verbale da parte del team di ricerca nei confronti del soggetto in modo da tenere alta la volontà e la concentrazione, si chiedevano i valori di RPE distinti in dispnea e fatica muscolare ogni due step del test. Il $\text{VO}_{2\text{max}}$ veniva definito come la media mobile più alta per 30 secondi (plateau), nell'eventualità che questo non si constatasse, venivano presi in considerazione altri dati per valutare il raggiungimento del picco di esercizio ($\text{RPE} > 9/10$, $\text{FC}_{\text{max}} > 90\%$ della FC_{max} teorica). Si definivano anche le soglie tramite la misurazione degli equivalenti ventilatori, osservando la relazione VE/VO_2 e VE/VCO_2 . Concluso il test incrementale, deve essere svolto un secondo test ad esaurimento, questo è un test di validazione che consiste nel correre ad una velocità costante per il maggior tempo possibile. Questo test viene eseguito nella stessa giornata del test incrementale a distanza di almeno 30 minuti per poter recuperare. La velocità di corsa dipendeva dalla velocità massima raggiunta nel test incrementale calcolata come specificato precedentemente, e a quella specifica velocità venivano aggiunti 0,5 km/h, i soggetti dovevano mantenere questa velocità fino ad esaurimento (*Time To Exhaustion; TTE*). Il tempo per ciascun soggetto veniva registrato in secondi, in questo modo si è in grado di validare il $\text{VO}_{2\text{max}}$ raggiunto nel test a rampa. In una seconda giornata a distanza di almeno 48h dal precedente test, per garantire un recupero adeguato, si effettua il secondo test ad esaurimento. Il protocollo CPET su ergometro semi-reclinato (PPO), seguiva le stesse tempistiche e misurazioni del precedente test, per quanto riguarda i valori basali e per il riscaldamento. Completati i cinque minuti di riscaldamento a 20 Watt per tutti i soggetti, iniziava la rampa, composta da un incremento di 20 Watt per ogni minuto fino ad esaurimento volontario. Il picco di potenza viene calcolato utilizzando la formula sopra citata ($\text{PPO} = \text{PO ultimo step completato} + (\text{tempo step non completato} / \text{durata step} * \text{Watt step})$) (Michalik et al., 2021). Durante il test si chiedeva al soggetto di mantenere la cadenza di pedalata tra 60/70 rpm (rivoluzioni per minuto), anche durante questo test veniva fornito un forte incoraggiamento verbale per mantenere alta la motivazione del soggetto durante il test. Si chiedevano i valori di RPE ogni due step, suddividendo

dispnea e fatica muscolare. Il VO_2max anche in questo caso veniva definito come la media mobile più alta per 30 secondi consecutivi (plateau) e, se non dovesse raggiungersi un plateau, si utilizzano altri dati per valutare il raggiungimento di un picco di esercizio ($\text{RPE} > 9/10$, $\text{FCmax} > 90\%$ della FCmax teorica). Le soglie venivano definite tramite gli equivalenti ventilatori, osservando i flessi della relazione VE/VO_2 e VE/VCO_2 .



Figura 10- Ergometro Cosmed



Figura 11- Treadmill Cosmed

Test sottomassimale SXT (spiegazione delle misurazioni effettuate: VO_2 , spirometrie, ecocardio, flussi femorali, lattato ematico, rpe, nirs)

In una terza giornata, ad almeno 24 ore dal precedente test, i partecipanti effettuavano un ultimo test di laboratorio, questo consisteva in un test metabolico sottomassimale (*Submaximal Exercise Test; SXT*). Il protocollo consisteva in sei step della durata di 6 minuti a carico progressivo, veniva svolto su ergometro semi-reclinato, e il carico di ciascuno step veniva differenziato in 3 step a carico assoluto (50/100/150 Watt), mentre nei restanti step i valori di potenza si basavano sui valori del test incrementale su ergometro (25%, 50%, 75% del PPO). L'ordine cronologico degli step doveva garantire un incremento del lavoro meccanico effettuato, di conseguenza i valori relativi al PPO venivano inseriti in base alla grandezza dei valori assoluti. Questo test comprende una serie di misurazioni fisiologiche molto importanti che riguardano funzioni respiratorie, emodinamiche e di estrazione muscolare. Venivano effettuate calibrazioni dei flussi e dei gas, si utilizzava il Physioflow per la misurazione della gittata cardiaca. I valori di VO_2 , VCO_2 , VE , FC e ossigenazione tissutale

venivano misurati e registrati ininterrottamente tramite Nirs per l'intera durata del test. Durante il test le misurazioni erano prese seguendo un ordine preciso: spirometrie (tra 1° e 2° minuto), ecocardio (tra 4° e 5° minuto), pressione arteriosa (SBP e DBP), prelievo del lattato ematico (tra 4° e 5° minuto), flussi dell'arteria femorale (tra 5° e 6° minuto) e RPE (fine step). Le misure di ecografia cardiaca e femorale dovevano essere prese per una durata di almeno 30 secondi di registrazione ad ogni step. Le diverse misurazioni ci permettono di avere una valutazione completa delle diverse funzioni fisiologiche, tramite la spirometria basale si è in grado di valutare la meccanica polmonare dinamica e statica così da identificare i valori prima dell'esercizio come FVC (capacità vitale forzata), FEV₁ (volume espirato forzato in 1 secondo), indice di Tiffenau (FEV₁/FVC). Durante il test veniva analizzata la curva flusso-volume per valutare la presenza di limiti nel flusso espirato. Tramite ecografia cardiaca si è in grado di osservare la struttura cardiaca, la grandezza delle camere (atri e ventricoli), lo spessore delle pareti e lo stato delle valvole cardiache, e con la misurazione dei flussi ematici si riesce a determinare contrattilità cardiaca e gli indici di funzionalità cardiaca. Si misura la pressione arteriosa ad ogni step per valutare l'andamento medio della pressione arteriosa (*Mean Arterial Pressure; MAP*). Le misurazioni del lattato ematico venivano eseguite tramite un prelievo di sangue ematico del lobo dell'orecchio, e si analizzava la concentrazione di lattato, indicatore dello stato di attivazione del sistema glicolitico. L'ecografia all'arteria femorale permette la valutazione del flusso ematico ai distretti muscolari, diametro arterioso a riposo e misure volumetriche del flusso sanguigno (*TA Mean, Femoral Blood Flow*). Infine, tramite la Nirs si effettuano valutazioni sull'ossigenazione tissutale (deossiemoglobina, ossiemoglobina).

2.5 Misurazioni emodinamiche

Flusso femorale: metodologia (ecografia Doppler)

La metodologia utilizzata per la misurazione dei flussi arteriosi è stata quella del Doppler ad ultrasuoni. Tramite questa tecnologia si riesce, in modo non invasivo ed in tempo reale, ad osservare i flussi ematici in numerosi vasi (arterie e vene). I parametri registrati durante il test SXT erano i seguenti: Velocità di picco (*TA_{peak}; cm/s*), Velocità media (*TA_{mean}; cm/s*), Flusso medio (*FBF; ml/min*), diametro arterioso (cm).

2.6 Composizione corporea

Analisi DXA e variazioni strutturali

La composizione corporea è stata valutata mediante assorbimetria a raggi X a doppia energia (DXA) prima dei test di esercizio a T0 e T1. Per la presente sezione Risultati, sono stati presi in considerazione solo la massa corporea, la massa magra totale e la massa grassa totale.

2.7 Biopsie muscolari

Tecnica di prelievo e analisi istologiche

I campioni di muscolo scheletrico sono stati prelevati dal vasto laterale utilizzando un ago di Bergstrom in anestesia locale. Un'aliquota di tessuto fresco è stata utilizzata per la respirometria ad alta risoluzione dopo permeabilizzazione delle fibre, seguendo un protocollo di titolazione substrato-disaccoppiante-inibitore per quantificare la respirazione leak, la fosforilazione ossidativa supportata dal complesso I, la fosforilazione ossidativa combinata supportata dai complessi I e II e la capacità massima del sistema di trasferimento degli elettroni. I flussi respiratori sono stati espressi come tassi specifici per la massa e alcune variabili selezionate sono state ulteriormente normalizzate per il contenuto di DNA mitocondriale. Una seconda aliquota della stessa biopsia è stata utilizzata per la quantificazione del DNA mitocondriale, espresso come rapporto tra il target mitocondriale ND2 e il gene nucleare di riferimento AGO.

2.8 Analisi statistica

Test statistici utilizzati

I dati sono presentati come media $\pm$ DS. Come indicato nella cartella di lavoro pronta per la pubblicazione, gli esiti sono stati analizzati utilizzando un'analisi della varianza a modelli misti con il gruppo (normossia, ipossia, iperossia) come fattore tra i soggetti e il tempo (T0, T1) come fattore entro i soggetti (within-subject). Gli effetti principali di gruppo e tempo, insieme all'interazione gruppo per tempo, sono stati riportati per ciascuna variabile. Ove appropriato, sono stati eseguiti confronti post hoc intra-gruppo T0 contro T1 e aggiustati utilizzando la procedura di Holm. La significatività statistica è stata accettata per $p < 0,05$.

3. Risultati

3.1 Composizione corporea

Analisi DXA

La composizione corporea totale derivata dalla DXA è rimasta in gran parte invariata nel tempo e non ha differito tra i gruppi. La massa corporea è rimasta stabile dal pre- al post-intervento in tutte le condizioni (normossia: da $70,2 \pm 9,4$ a $70,8 \pm 10,4$ kg; ipossia: da $70,6 \pm 11,8$ a $70,6 \pm 11,8$ kg; iperossia: da $72,6 \pm 7,6$ a $72,7 \pm 7,4$ kg), senza alcun effetto principale di gruppo, tempo o interazione gruppo per tempo (tutti i $p \geq 0,282$). Anche la massa magra totale è rimasta invariata (normossia: da $56089,8 \pm 8791,7$ a $56516,1 \pm 9560,6$ g; ipossia: da $57047,4 \pm 10554,4$ a $56756,4 \pm 10629,3$ g; iperossia: da $58279,6 \pm 7302,4$ a $58044,6 \pm 7142,7$ g; $p_{\text{Gruppo}} = 0,714$, $p_{\text{Tempo}} = 0,929$, $p_{\text{Gruppo} \times \text{Tempo}} = 0,375$). Al contrario, la massa grassa totale ha mostrato un effetto principale del tempo ($p = 0,008$) senza un effetto di gruppo o un'interazione ($p_{\text{Gruppo}} = 0,607$, $p_{\text{Gruppo} \times \text{Tempo}} = 0,885$). I test post hoc hanno indicato che questo effetto temporale è stato guidato da un aumento solo nel gruppo ipossia (da $9534,2 \pm 1778,9$ a $9795,9 \pm 1732,6$ g, p aggiustato con Holm = 0,010), mentre i cambiamenti in normossia e iperossia non sono stati significativi (rispettivamente $p = 0,096$ e $p = 0,104$). Va tuttavia osservato che anche i gruppi normossia e iperossia hanno mostrato un incremento numerico della massa grassa totale (rispettivamente +509 g e +446 g), che non ha raggiunto la soglia di significatività statistica dopo la correzione di Holm. L'assenza di effetti significativi in questi gruppi può riflettere la maggiore variabilità interindividuale o la ridotta potenza statistica associata alla dimensione campionaria, piuttosto che una reale assenza di effetto biologico.

Variabili	Normossia T0	Normossia T1	Ipossia T0	Ipossia T1	Iperossia T0	Iperossia T1
Whole body fat mass (g)	11107.1 ± 3502.6	11616.5 ± 3190.7	9534.2 ± 1778.9	9795.9 ± 1732.6*	10715.2 ± 3364.2	11161.2 ± 3321.4
Whole body lean mass (g)	56089.8 ± 8791.7	56516.1 ± 9560.6	57047.4 ± 10554.4	56756.4 ± 10629.3	58279.6 ± 7302.4	58044.6 ± 7142.7
Whole body mass (g)	68979.0 ± 9008.2	69802.4 ± 10078.2	69393.9 ± 11327.2	69386.6 ± 11489.2	71718.5 ± 7256.9	71718.5 ± 7256.9
Whole body fat (%)	16.0 ± 5.1	16.5 ± 4.7	14.0 ± 3.6	14.4 ± 3.5*	15.1 ± 5.0	15.6 ± 4.8

Tabella 1- La tabella illustra i cambiamenti nella composizione corporea dei tre gruppi sperimentali (normossia, ipossia e iperossia), misurati prima(T0) e dopo(T1) l'intervento di allenamento.

3.2 Effetti dell'intervento dell'HIIT

Performance al ciclo ergometro semi-reclinato

Durante il test semi-reclinato, il picco di potenza erogata (PPO) è aumentato nel tempo ($p_{\text{Tempo}} = 0,002$) senza differenze significative di gruppo o un'interazione gruppo per tempo ($p_{\text{Gruppo}} = 0,064$, $p_{\text{Gruppo} \times \text{Tempo}} = 0,496$). I confronti a coppie hanno mostrato che il PPO è aumentato in normossia (da $258,4 \pm 50,0$ a $271,2 \pm 57,2$ W, $p = 0,041$) e in ipossia (da $333,3 \pm 75,6$ a $346,7 \pm 78,1$ W, $p = 0,041$), mentre il cambiamento in iperossia non è stato significativo (da $295,0 \pm 61,9$ a $300,0 \pm 57,9$ W, $p = 0,415$). La FC_{picco} è diminuita nel tempo (da $179,1 \pm 8,8$ a $171,4 \pm 13,1$ battiti $\cdot \text{min}^{-1}$ in normossia; da $178,8 \pm 9,5$ a $175,8 \pm 10,6$ in ipossia; da $181,6 \pm 7,1$ a $175,6 \pm 4,3$ in iperossia; $p_{\text{Tempo}} < 0,001$), con una riduzione intra-gruppo significativa solo in normossia ($p = 0,021$). Il $\dot{V}O_2$ di picco assoluto è aumentato modestamente nel tempo ($p_{\text{Tempo}} = 0,027$), così come il $\dot{V}CO_2$ di picco ($p_{\text{Tempo}} = 0,024$) e il $\dot{V}O_2$ di picco normalizzato per la massa magra ($p_{\text{Tempo}} = 0,045$), ma nessuna di queste variabili ha mostrato cambiamenti intra-gruppo post hoc

significativi dopo la correzione di Holm. La frequenza respiratoria all'apice dell'esercizio ha mostrato un'interazione gruppo per tempo ($p = 0,013$), sebbene nessun singolo confronto a coppie abbia raggiunto la significatività.

Variabili	Normossia T0	Normossia T1	Ipossia T0	Ipossia T1	Iperossia T0	Iperossia T1
PPO (W)	258.4 ± 50.0	271.2 ± 57.2*	333.3 ± 75.6	346.7 ± 78.1*	295.0 ± 61.9	300.0 ± 57.9
HR _{peak} (beats·min ⁻¹)	179.1 ± 8.8	171.4 ± 13.1*	178.8 ± 9.5	175.8 ± 10.6	181.6 ± 7.1	175.6 ± 4.3
VCO _{2peak} (L·min ⁻¹)	3.66 ± 0.76	3.95 ± 0.86	4.35 ± 1.07	4.43 ± 1.07	4.22 ± 0.83	4.30 ± 0.81
VO _{2peak} (L·min ⁻¹)	3.31 ± 0.77	3.42 ± 0.84	4.03 ± 0.86	4.14 ± 0.84	3.70 ± 0.80	3.79 ± 0.83

Tabella 2- La tabella illustra e riassume le prestazioni e i parametri cardiorespiratori rilevati durante il test massimale su cicloergometro semi-reclinato, misurati prima(T0) e dopo(T1) l'intervento nei tre gruppi sperimentali.

Performance sul treadmill

Il test sul tapis roulant ha rivelato un modello di risposta diverso, con diverse variabili di prestazione che hanno mostrato interazioni significative gruppo per tempo. Il VO₂ di picco assoluto è cambiato significativamente all'interno di tutti e tre i gruppi (normossia: da $3,70 \pm 0,75$ a $3,89 \pm 0,75$ L·min⁻¹, $p = 0,008$; ipossia: da $4,28 \pm 0,87$ a $4,11 \pm 0,84$ L·min⁻¹, $p = 0,049$; iperossia: da $4,13 \pm 0,74$ a $4,32 \pm 0,81$ L·min⁻¹, $p = 0,048$), insieme a un termine di interazione significativo ($p_{\text{Gruppo} \times \text{Tempo}} = 0,002$). Questa differenza direzionale, incremento del VO_{2peak} in normossia e iperossia, decremento in ipossia, rappresenta il dato fisiologicamente più rilevante dell'intero set prestazionale sul treadmill e suggerisce che le quattro settimane di allenamento HIIT in condizioni ipossiche abbiano privilegiato adattamenti di efficienza intracellulare (mediati da HIF-1 α) a scapito dell'incremento della potenza meccanica assoluta, limitata dalla ridotta pressione parziale di ossigeno disponibile durante le frazioni di lavoro. Anche il VO₂ di picco relativo ha mostrato interazioni significative quando espresso per kg di massa magra corporea ($p_{\text{Gruppo} \times \text{Tempo}} = 0,015$) e per kg di massa corporea ($p_{\text{Gruppo} \times \text{Tempo}} = 0,006$); tuttavia, miglioramenti post hoc sono stati rilevati solo in normossia (da $70,4 \pm 10,5$ a $72,9 \pm 10,4$ mL·min⁻¹·kg LBM⁻¹, $p = 0,029$; da $54,3 \pm 8,4$ a $56,6 \pm 7,9$ mL·min⁻¹·kg⁻¹, $p = 0,022$). La

normossia ha mostrato anche aumenti significativi nel VCO₂ di picco (da $4,01 \pm 0,74$ a $4,31 \pm 0,75$ L·min⁻¹, $p < 0,001$), nella VE_{picco} (da $133,9 \pm 25,5$ a $142,7 \pm 24,2$ L·min⁻¹, $p = 0,005$), nel VT_{picco} (da $2,4 \pm 0,4$ a $2,5 \pm 0,4$ L, $p = 0,005$) e nella velocità di picco sul tapis roulant (da $12,6 \pm 1,7$ a $13,2 \pm 1,6$ km·h⁻¹, $p = 0,009$). L'iperossia ha mostrato un aumento della velocità di picco sul tapis roulant (da $13,2 \pm 1,9$ a $14,2 \pm 2,3$ km·h⁻¹, $p = 0,031$), mentre non è stato rilevato alcun cambiamento significativo in ipossia per questa variabile ($p = 0,621$). Il VCO₂ di picco ha esibito anche un'interazione significativa gruppo per tempo ($p_{\text{Gruppo} \times \text{Tempo}} = 0,016$), guidata nuovamente dall'aumento in normossia. La VE_{picco} è aumentata complessivamente nel tempo ($p_{\text{Tempo}} < 0,001$) senza un'interazione significativa ($p_{\text{Gruppo} \times \text{Tempo}} = 0,081$). La FC_{picco} e la frequenza respiratoria hanno mostrato effetti principali del tempo (rispettivamente $p = 0,019$ e $p = 0,022$), ma non è stato identificato alcun contrasto a coppie significativo dopo l'aggiustamento.

Variabili	Normossia		Normossia		Ipossia		Ipossia		Iperossia		Iperossia	
	T0		T1		T0		T1		T0		T1	
HR _{peak}	177.8	±	123.4	±	187.2	±	185.6	±	191.4	±	179.6	±
(beats·min ⁻¹)	51.9		95.7		7.7		6.5		9.0		25.4	
ṀCO _{2peak}	4.01 ± 0.74		4.31	±	4.69	±	4.54	±	4.55	±	4.69	±
(L·min ⁻¹)			0.75*		1.12		1.02		0.81		0.69	
ṀO _{2peak}	3.70 ± 0.75		3.89	±	4.28	±	4.11	±	4.13	±	4.32	±
(L·min ⁻¹)			0.75*		0.87		0.84*		0.74		0.81*	
V _{peak}	12.6 ± 1.7		13.2 ± 1.6*		15.1	±	15.2	±	13.2 ± 1.9		14.2	±
(km·h ⁻¹)					0.4		0.8				2.3*	

Tabella 3- La tabella illustra e riassume le prestazioni e i parametri metabolici rilevati durante il test massimale sul treadmill, misurati prima(T0) e dopo(T1) l'intervento nei tre gruppi sperimentali.

Contenuto di DNA mitocondriale

Il contenuto muscolare di mtDNA non è cambiato in modo significativo nel tempo e non ha differito tra i gruppi (normossia: da $63,3 \pm 50,0$ a $71,2 \pm 47,8$ a.u.; ipossia: da $94,7 \pm 61,6$ a $134,2 \pm 110,9$ a.u.; iperossia: da $58,6 \pm 34,3$ a $73,0 \pm 43,4$ a.u.; $p_{\text{Gruppo}} = 0,201$, $p_{\text{Tempo}} = 0,145$, $p_{\text{Gruppo} \times \text{Tempo}} = 0,600$). Nessun confronto post hoc intra-gruppo è risultato significativo (tutti i $p \geq 0,604$).

Respirometria ad alta risoluzione

I flussi respiratori mitocondriali specifici per la massa hanno mostrato modesti cambiamenti dipendenti dal tempo che non erano specifici per la condizione. Il flusso allo Step 1 è diminuito nel

tempo (pTempo = 0,041), così come la Clp(ADP) (pTempo = 0,039), la capacità ETS (E; pTempo = 0,036) e la capacità OXPHOS attraverso i complessi I e II (P(CI+II); pTempo = 0,034). Effetti temporali simili erano presenti per le variabili riassuntive duplicate P (pTempo = 0,034). Tuttavia, non ci sono stati effetti di gruppo significativi o interazioni gruppo per tempo per nessuna di queste misurazioni (tutti i pGruppo $\geq$ 0,193, tutti i pGruppoTempo $\geq$ 0,580), e nessuno dei confronti post hoc intra-gruppo aggiustati con Holm ha raggiunto la significatività. Quando i flussi respiratori sono stati normalizzati per il contenuto di mtDNA, solo il flusso allo Step 1/mtDNA ha mostrato un effetto principale significativo del tempo (pTempo = 0,019), senza effetto di gruppo o interazione (pGruppo = 0,506, pGruppoTempo = 0,853). Tutti gli altri flussi normalizzati per l'mtDNA sono rimasti invariati (tutti i pTempo $\geq$ 0,247) e nessun confronto a coppie post hoc è risultato significativo.

Variabili	Normossia T0	Normossia T1	Ipossia T0	Ipossia T1	Iperossia T0	Iperossia T1
mtDNA content (ND2/AGO, a.u.)	63.3 $\pm$ 50.0	71.2 $\pm$ 47.8	94.7 $\pm$ 61.6	134.2 $\pm$ 110.9	58.6 $\pm$ 34.3	73.0 $\pm$ 43.4
P(CI+II)/mtDNA (a.u.)	2.1 $\pm$ 2.2	1.3 $\pm$ 0.9	1.5 $\pm$ 1.2	1.1 $\pm$ 1.2	1.6 $\pm$ 0.9	2.2 $\pm$ 3.5
E/mtDNA (a.u.)	2.2 $\pm$ 2.3	1.4 $\pm$ 1.0	1.6 $\pm$ 1.3	1.2 $\pm$ 1.2	1.7 $\pm$ 1.0	2.3 $\pm$ 3.7
Rot/CII (pmol·s ⁻¹ ·mg ⁻¹)	58.9 $\pm$ 18.5	52.4 $\pm$ 17.8	70.8 $\pm$ 22.6	56.8 $\pm$ 19.4	56.4 $\pm$ 10.4	51.1 $\pm$ 17.6

Tabella 4- La tabella descrive i dati molecolari e bioenergetici ottenuti dalle biopsie a carico del muscolo vasto laterale, focalizzandosi sulla densità del genoma mitocondriale e su specifici flussi respiratori.

4. Discussione

4.1 Interpretazione dei risultati

Stabilità della composizione corporea

La massa corporea totale e la massa magra totale sono rimaste invariate per tutta la durata dell'intervento, questo è un dato molto importante in quanto indica come le risposte funzionali e mitocondriali osservate non possono essere attribuite a variazioni macroscopiche delle dimensioni corporee o del tessuto magro. La massa grassa totale mostra un incremento nel tempo, ma non accompagnato da un'interazione significativa tra gruppo e tempo, nonostante l'aumento intra gruppo rilevato in ipossia tramite i confronti post hoc. Confrontando questo andamento con la letteratura esistente si nota come interventi HIIT di breve durata difficilmente inducano un rimodellamento corporeo sostanziale e rilevabile tramite DXA, soprattutto in partecipanti già allenati. Una spiegazione a livello meccanico è che il periodo di intervento sia stato sufficiente per influenzare le variabili legate alla prestazione, ma non per produrre cambiamenti misurabili nella massa del tessuto contrattile, questa metodologia stimola importanti adattamenti cardiovascolari e metabolici ma non possiede il volume totale di lavoro necessario per indurre un marcato rimodellamento ipertrofico del tessuto contrattile o alterazioni della composizione corporea. L'assenza di adattamenti a carico della massa magra restringe l'interpretazione verso adattamenti muscolari di natura puramente qualitativa, fattori neuromuscolari, emodinamici e metabolici, piuttosto che di natura quantitativa.

Analisi integrata delle prestazioni funzionali: specificità del gesto e adattamenti qualitativi

L'analisi comparativa dei risultati ottenuti tra il test massimale su ciclo ergometro semi-reclinato e il test su treadmill rileva il quadro fondamentale circa la natura e la tipologia degli adattamenti indotti dal protocollo di allenamento, ribadendo come i benefici funzionali siano principalmente veicolati da modificazioni di tipo qualitativo e strettamente dipendenti dalla biomeccanica di esercizio. Nel test su ciclo ergometro semi-reclinato, la potenza di picco (PPO) è aumentata in modo complessivo e significativo nel tempo ($p\text{-Tempo} = 0.002$), ma l'assenza di un'interazione significativa gruppo per tempo ($p\text{-Gruppo} \times \text{Tempo} = 0.496$) indica che né l'ipossia né l'iperossia hanno esercitato un effetto amplificativo o preferenziale rispetto alla normossia. Al contrario, il test su treadmill mostra un modello di risposta differente, caratterizzato da forti interazioni gruppo per tempo, per quanto riguarda il VO_2peak assoluto ($p\text{-Gruppo} \times \text{Tempo} = 0.002$), e relativo sia alla massa magra ($p = 0.015$) sia alla massa corporea ($p = 0.006$). Questa marcata differenza tra le due tipologie di test trova la sua spiegazione scientifica nel principio della specificità dell'allenamento e della coordinazione muscolare, il protocollo di intervento è stato somministrato interamente tramite corsa su treadmill, i

soggetti hanno sviluppato chiaramente un'ottimizzazione dell'economia del gesto specifico, che si è tradotta in un incremento coordinato di numerosi parametri ergometrici e ventilatori ($\dot{V}O_{2peak}$, $\dot{V}CO_{2peak}$, velocità di picco). È ampiamente documentato nella letteratura scientifica come il transfer degli adattamenti metabolici e cardiorespiratori da una modalità di esercizio all'altra sia fortemente limitato se non vi è un parallelo condizionamento della coordinazione motoria e del pattern di reclutamento delle unità motorie specifico del distretto muscolare interessato. Di conseguenza il miglioramento registrato della PPO su cicloergometro semi-reclinato, riscontrato in sede post hoc solo nei gruppi in normossia e ipossia, riflette con ogni probabilità i fattori aspecifici legati a una maggiore tolleranza generale allo sforzo ad alta intensità, a un miglioramento dell'efficienza della cinetica dell'ossigeno o ad una ottimizzazione del ritmo (pacing) in prossimità dell'esaurimento muscolare, piuttosto che ad un reale potenziamento della capacità biologica di trasporto e utilizzo dell'ossigeno in quella specifica modalità di pedalata. L'elemento di maggior rilevanza scientifica risiede tuttavia nell'eterogeneità delle risposte ottenute sul treadmill in base alla frazione di ossigeno inspirata durante le 4 settimane di intervento. Il gruppo in normossia ha esibito il profilo di adattamento più solido e integrativo, mostrando incrementi significativi non solo nel $\dot{V}O_{2peak}$ assoluto (da 3.70 a 3.89 L·min⁻¹) e relativo, ma anche nella produzione di anidride carbonica ($\dot{V}CO_{2peak}$), nella ventilazione di picco ($\dot{V}E_{peak}$), nel volume corrente ($\dot{V}T_{peak}$), nella ventilazione di picco ($\dot{V}E_{peak}$) e nella velocità di picco (V_{peak}). Questo eccezionale adattamento globale contrasta parzialmente con le risposte più ristrette e selettive registrate nei gruppi sottoposti a modificazioni della frazione inspirata di ossigeno. L'intervento in condizioni di iperossia ha mostrato un adattamento orientato principalmente alla performance meccanica estrinseca, evidenziato da un aumento significativo della velocità di picco sul treadmill (da 13,2 a 14,2 km·h⁻¹, $p = 0,031$) e del $\dot{V}O_{2peak}$ assoluto (da 4,13 a 4,32 L·min⁻¹, $p = 0,048$), senza tuttavia un transfer generalizzato sulle risposte ventilatorie globali o sui parametri relativi. Questo fenomeno si allinea con le evidenze scientifiche, le quali suggeriscono che sebbene l'iperossia agisca come un formidabile stimolo ergogenico acuto, rimuovendo in parte limiti centrali e permettendo di sostenere output di potenza superiori durante l'allenamento, l'esposizione cronica a breve termine non si traduce necessariamente in una rimodulazione superiore o differenziata delle vie di segnalazione intracellulari rispetto all'allenamento in condizioni di normale ossigenazione. Per quanto riguarda invece l'intervento in condizioni ipossiche, ha manifestato un comportamento caratterizzato da una riduzione statisticamente significativa del $\dot{V}O_{2peak}$ assoluto post-intervento (da 4.28 a 4.11 L·min⁻¹). Questo decremento del massimo consumo di ossigeno concorda con le più rigorose evidenze della letteratura scientifica che trattano l'argomento, l'allenamento HIIT condotto in condizioni di ridotta pressione parziale di ossigeno costringe l'organismo a lavorare a potenze meccaniche assolute inferiori per

mantenere la stessa intensità relativa o la frequenza cardiaca bersaglio. Di conseguenza lo stimolo meccanico ed emodinamico periferico risulta attenuato rispetto alla controparte in normossia. L'ipossia sposta il focus degli adattamenti verso l'efficienza estrattiva cellulare interna e la stabilizzazione dei fattori legati alla glicolisi anaerobica (HIF-1 α), ma l'effetto combinato di un minor sovraccarico meccanico cronico e di una potenziale fatica residua può determinare in sede di test un decremento o una mancata progressione del VO₂max sistemico. L'insieme di questi dati prestazionali dimostra come l'efficacia del protocollo HIIT a breve termine si esprime principalmente attraverso un affinamento qualitativo della prestazione, dove la normossia si conferma lo stimolo più bilanciato ed efficiente per ottenere un avanzamento funzionale coordinato a livello cardiorespiratorio e metabolico. Le condizioni alterate di ossigeno non hanno generato un fenotipo adattivo uniformemente superiore, confermando che la specificità biomeccanica del movimento e la gestione della potenza meccanica assoluta rimangono i fattori cardine che governano la traduzione dello stress dell'allenamento in reali miglioramenti prestazionali.

Analisi del contenuto di DNA mitocondriale (mtDNA): dinamiche temporali e limiti della biogenesi organulare a breve termine

L'analisi quantitativa del contenuto di DNA mitocondriale (mtDNA), espresso attraverso il rapporto molecolare tra il target mitocondriale ND2 e il gene di riferimento nucleare AGO, rappresenta un biomarcatore fondamentale per stimare la densità e la biogenesi del reticolo all'interno del miocita. I dati riguardanti il contenuto muscolare di mtDNA emersi in questo studio indicano che non ci sono state variazioni statisticamente significative a seguito delle quattro settimane di intervento HIIT (p-Tempo = 0.145, p-Gruppo = 0.201, p-Gruppo $\times$ Tempo = 0.600), restando privo di contrasti post hoc significativi in ognuno dei gruppi sperimentali. Un esame prettamente numerico rivela una tendenza all'incremento del pool genomico mitocondriale in tutte e tre le condizioni, con una variazione percentuale particolarmente marcata nel gruppo sottoposto a stress ipossico (Normossia: + 12.5%, Ipossia: + 41.7%, Iperossia: + 24.6%). L'assenza statistica di significatività a fronte di questi incrementi apparenti si spiega principalmente attraverso l'estrema eterogeneità interindividuale della risposta plastica, riflessa in deviazioni standard eccezionalmente ampie (specialmente nel gruppo Ipossia a T1: 134.2 \pm 110.9 a.u.).

	<i>T0</i>	<i>T1</i>
<i>Normossia</i>	63.3 ± 50.0	71.2 ± 47.8
<i>Ipossia</i>	94.7 ± 61.6	134.2 ± 110.9
<i>Iperossia</i>	58.6 ± 34.3	73.0 ± 43.4

Tabella 5- Andamento del contenuto di mtDNA

Questo pattern di risposta si inserisce in un cruciale dibattito all'interno della letteratura scientifica, riguardante la fisiologia molecolare dell'esercizio. La mancata espansione generalizzata e stabile del mtDNA concorda con la teoria dei trascrizionali transitori postulata da Perry et al. (2010). Secondo questo modello, ogni singola sessione di HIIT evoca picchi acuti nell'espressione dell'mRNA di PGC-1 α , ma la traduzione cronica in proteine strutturali e la successiva replicazione coordinata del genoma organulare richiedono un tempo di accumulo dello stimolo (*training volume*) sensibilmente superiore alle 12 sessioni somministrate ai soggetti in questo protocollo. I risultati suggeriscono che quattro settimane di HIIT non siano sufficienti a determinare un aumento statisticamente rilevabile del contenuto di mtDNA. L'assenza di una variazione statisticamente significativa del rapporto mtDNA/nDNA, è da attribuirsi in larga parte all'elevata variabilità interindividuale della risposta plastica, riflessa nelle ampie deviazioni standard osservate, in particolare nel gruppo ipossia a T1 (134,2 ± 110,9 u.a.). Tale dispersione riduce la potenza statistica del confronto e impedisce di escludere con certezza un effetto biologico reale sulla biogenesi organulare.. Osservando questi dati l'asse interpretativo si sposta dai meccanismi adattivi subcellulari e dai parametri bioenergetici quantitativi, verso modificazioni prettamente qualitative di natura metabolica o legate all'efficienza dei sistemi di conduzione e di estrazione periferica.

Fisiologia della catena respiratoria

I dati ottenuti tramite respirometria ad alta risoluzione (HRR) su fibre muscolari permeabilizzate, offrono una prospettiva di straordinario interesse bioenergetico, mettendo in luce una parziale divisione tra i miglioramenti prestativi sistemici e le modificazioni della capacità ossidativa mitocondriale. I flussi respiratori massa-specifici hanno mostrato un modesto e inatteso decremento tempo-dipendente: il flusso allo Step 1 (p-Tempo = 0,041), la capacità OXPHOS mediata dal complesso I, CIP(ADP) (p-Tempo = 0,039), la capacità massima del sistema di trasferimento degli elettroni, ETS (p-Tempo = 0,036), e la capacità combinata P(CI+II) (p-Tempo = 0,034), sono tutti diminuiti in modo statisticamente significativo nel tempo, in assenza di qualsiasi effetto di gruppo o interazione gruppo per tempo (tutti i p-Gruppo x Tempo $\geq$ 0,580). Un'ipotesi plausibile per spiegare

questo inatteso decremento dei flussi massa-specifici è che l'allenamento HIIT abbia indotto un'espansione della massa mitocondriale totale (anche se non statisticamente rilevabile nell'arco delle quattro settimane) che ha diluito la concentrazione degli enzimi respiratori per unità di massa tissutale, senza tuttavia comprometterne la funzionalità intrinseca per organello, come confermato dalla stabilità dei flussi normalizzati per mtDNA. Questo fenomeno, descritto in letteratura come "*dilution effect*" (Jacobs & Lundby, 2013), è distinto da un reale deterioramento della catena respiratoria e va interpretato come un marker precoce di rimodellamento quantitativo del reticolo. Quando i flussi sono stati normalizzati per il contenuto di mtDNA, al fine di isolare la funzionalità intrinseca dell'organello (intrinsic function), solo la respirazione basale al primo step ha mantenuto l'effetto principale del tempo ($p = 0.019$), mentre tutti gli altri flussi normalizzati sono rimasti geometricamente stabili. L'insieme delle evidenze respirometriche raccolte dimostra che le misurazioni mitocondriali non supportano l'idea che l'alterazione dell'ossigeno inspirato abbia prodotto un fenotipo respiratorio del muscolo scheletrico distinto. Nonostante le variazioni imposte alle pressioni parziali dei gas durante il protocollo HIIT, la catena di trasporto degli elettroni e la funzionalità intrinseca dell'organello hanno mantenuto un pattern adattativo omogeneo in tutti i gruppi sperimentali. Questo indica che lo stress ipossico o iperossico cronico a breve termine non si traduce in una riprogrammazione bioenergetica differenziata a livello della membrana mitocondriale interna, confermando che lo stimolo ambientale alterato non ha esercitato un ruolo modulatore selettivo sulla plasticità respiratoria del miocita.

4.2 Implicazioni pratiche

I risultati emersi da questo studio sperimentale offrono numerosi spunti di rilevanza pratica per i professionisti delle scienze motorie, e per quanto riguarda i preparatori atletici e gli specialisti della riabilitazione, delineando nuove strategie per l'ottimizzazione dell'allenamento ad alta intensità in diverse condizioni ambientali.

I dati dimostrano come un protocollo HIIT a breve termine, composto da 4 settimane e 12 sessioni di allenamento, sia in grado di indurre significativi guadagni funzionali e prestativi, in assenza di macroscopici cambiamenti della composizione corporea o di un'espansione quantitativa della massa mitocondriale. Questo dimostra come l'efficacia dell'alta intensità nel breve periodo si realizza attraverso un miglioramento qualitativo dei sistemi di conduzione, di estrazione microvascolare e tolleranza metabolica periferica. Nella programmazione di un allenamento la normossia si conferma il pilastro centrale, è lo stimolo più bilanciato e completo per incrementare parametri cardiorespiratori (VO_2max , VCO_2max , ventilazione e velocità di picco). Per gli sport di endurance e misti la normossia

si conferma come lo strumento primario per innalzare la capacità aerobica complessiva dell'atleta. Per quanto riguarda l'iperossia, l'utilizzo di miscele iperossiche va ad agire come un potente supporto ergogenico acuto. Tramite questo tipo di allenamento si è in grado di sostenere velocità e output di potenza superiori rispetto alla normossia. L'inserimento all'interno di una programmazione di allenamenti in iperossia ben strutturati permette di ricercare un sovraccarico neuromuscolare e meccanico selettivo, riducendo al contempo la barriera imposta dal limite convettivo centrale e dalla fatica respiratoria. L'ipossia evoca invece un forte stress metabolico interno, riducendo però l'erogazione meccanica di forza da parte dell'atleta per via della ridotta disponibilità di ossigeno. L'inserimento di sessioni in ipossia deve essere inserito in una programmazione a seguito di attente valutazioni, è utile per stimolare l'efficienza estrattiva cellulare e i meccanismi anaerobici, ma deve essere evitata nelle fasi immediatamente precedenti ad eventi agonistici in cui è richiesta la massima espressione della potenza aerobica assoluta.

Per comprendere la traslabilità dei risultati di questo lavoro sperimentale nel panorama dello sport d'élite, è fondamentale analizzare i modelli prestazionali delle discipline caratterizzate da un impegno metabolico e neuromuscolare di tipo intermittente, come il calcio o il rugby. A differenza degli sport di endurance puri, in cui la richiesta energetica è prevalentemente lineare e costante, gli sport di squadra intermittenti sono caratterizzati da una costante e imprevedibile alternanza tra espressioni di potenza massimali o sottomassimali (sprint, decelerazioni, cambi di direzione e contrasti) e fasi di recupero a intensità moderate. In questo contesto si delinea un apparente paradosso a livello bioenergetico, le azioni decisive ai fini del risultato, in queste tipologie di sport, sono sostenute principalmente dai sistemi anaerobico alattacido e lattacido, ma la capacità di reiterare tali sforzi per l'intera durata della competizione dipende dall'efficienza del sistema aerobico. Negli sport di squadra intermittenti si può considerare la partita come una forma di HIIT, chiaramente totalmente aciclico, imprevedibile e caotico, a differenza del protocollo HIIT standardizzato, gli sport di squadra prevedono un'azione intermittente non controllata (Spencer et al., 2005). Diventa evidente come i protocolli ad alta intensità standardizzati rappresentino uno strumento insostituibile non solo per il condizionamento atletico generale, ma per la struttura di strategie di allenamento e riabilitazione altamente specifiche. L'HIIT 4x4 in normossia ha generato un incremento coordinato di velocità di picco e delle risposte ventilatorie, e questa metodologia si conferma, come specificato anche in precedenza, l'ideale per determinate tipologie di preparazione precampionato in modo da aumentare la massima velocità aerobica (MAS) dell'atleta, migliorando inoltre la sua efficienza locomotoria specifica sul campo. Per quanto riguarda le diverse condizioni di ossigenazione, anch'esse si possono inserire all'interno di una programmazione ben strutturata, il protocollo in iperossia può essere inserito all'interno di un mesociclo di allenamento, quando si deve affrontare un periodo denso di

impegni in modo da poter mantenere alti gli stimoli neuromuscolari senza gravare eccessivamente sulla fatica respiratoria accumulata nei match, garantendo un overload qualitativo a fronte di un minor dispendio energetico. L'allenamento in ipossia sposta l'asse verso i meccanismi di tamponamento e la glicolisi anaerobica, può essere introdotto strategicamente nelle pause all'interno dei campionati per stressare la capacità dell'atleta di tollerare l'acidosi metabolica profonda, accelerando i tassi di rimozione dei metaboliti inibitori.

Il percorso di riabilitazione dell'atleta è limitato spesso dal severo decondizionamento cardiorespiratorio e della perdita di efficienza microvascolare periferica dovuta al disuso. Il protocollo HIIT ha indotto significativi miglioramenti delle funzionalità in solamente 4 settimane, dimostrandosi adeguato a percorsi di riabilitazione. L'iperossia nelle prime fasi del carico dinamico può essere utilizzata in modo da permettere di ridurre il deficit di ossigeno e la fatica percepita, consentendo un lavoro che si concentra maggiormente sugli stimoli più rilevanti per i muscoli locomotori, preservando il soggetto da stress respiratori precoci e frustranti tipici delle prime fasi del return to play. In quelle situazioni in cui le strutture articolari o tendine in via di guarigione non possono ancora tollerare carichi pesanti o impatti ripetuti ad alte velocità, l'inserimento all'interno della programmazione di protocolli in ipossia, possono essere utilizzati come prevenzione per il sovraccarico articolare e lo stress tendineo. Allenandosi a velocità inferiori in ambiente ipossico l'atleta subisce un minor impatto meccanico, ma per quanto riguarda lo stress metabolico interno sarà proporzionalmente elevato a fronte di un carico meccanico assoluto ridotto, salvaguardando in questo modo l'integrità anatomica del distretto lesionato.

4.3 Limitazioni

Il riconoscimento e l'analisi critica delle limitazioni metodologiche e sperimentali costituisce un passaggio fondamentale per interpretare correttamente la reale portata dei risultati ottenuti. La durata complessiva dell'intervento di allenamento è di sole 4 settimane, strutturate in un totale di 12 sessioni di HIIT. Lo stimolo indotto da questo protocollo è stato sufficiente per evocare adattamenti prestativi macroscopici e sistemici, ma al contempo la durata totale rappresenta una finestra biologica ristretta per l'osservazione di rimodellamenti strutturali stabili a livello subcellulare. La replicazione del genoma organulare e la sintesi stabile delle proteine della membrana interna richiedono volumi cumulativi di allenamento e tempi cronici di esposizione superiori rispetto alle sessioni somministrate in questo studio. La coorte finale di partecipanti che hanno partecipato allo studio è di 27 soggetti totali. Questa contrazione del campione determina una distribuzione interna di 9 partecipanti per ciascun gruppo di ossigenazione. Un campione numericamente limitato riduce il potere statistico dei

modelli di analisi nel rilevare differenze microscopiche o interazioni significative tra i gruppi per le variabili biologiche e respirometriche. L'impatto di questa ridotta numerosità campionaria è ulteriormente amplificato dall'estrema variabilità biologica interindividuale. Questo fenomeno lo si nota dalle deviazioni standard eccezionalmente ampie nei dati, tale notevole dispersione dei dati ha reso difficoltoso per i modelli statistici isolare un chiaro segnale di adattamento. Un altro aspetto che può considerarsi un limite dello studio è lo svolgimento del protocollo esclusivamente su treadmill, i risultati mostrano che i miglioramenti cardiorespiratori e prestativi più evidenti si sono manifestati proprio sul treadmill, mentre le risposte sul cicloergometro semi-reclinato sono risultate marginali e aspecifiche. Questa modalità di adattamento neuromuscolare ed energetico evidenzia possibili limiti di trasferibilità dei risultati ad altre modalità di esercizio che coinvolgono pattern biomeccanici o cinetiche di reclutamento differenti. Le valutazioni post allenamento (T1) sono state condotte nelle due settimane immediatamente successive alla conclusione delle 12 sessioni di HIIT. Il disegno sperimentale non ha previsto un ulteriore periodo di monitoraggio o follow up a distanza di tempo dalla cessazione dello stimolo allenante. L'assenza di questa misurazione tardiva impedisce di valutare la cinetica di decadimento o la persistenza a lungo termine degli adattamenti qualitativi sistemici, microvascolari e cardiorespiratori ottenuti dai soggetti a seguito del protocollo di allenamento.

Conclusioni

Il presente lavoro sperimentale ha indagato l'interazione tra lo stress metabolico indotto dall'allenamento intervallato ad alta intensità (HIIT) e la modulazione delle pressioni parziali di ossigeno ambientale, focalizzandosi sulla plasticità funzionale e strutturale del miocita. L'insieme delle evidenze raccolte permette di tracciare un quadro interpretativo chiaro, si evidenzia un netto primato degli adattamenti qualitativi su quelli quantitativi: il protocollo HIIT 4x4 della durata di 4 settimane si è dimostrato un potente stimolo funzionale capace di innalzare la prestazione e i parametri cardiorespiratori sistemici, senza però evocare una macroscopica biogenesi mitocondriale o un incremento del contenuto di mtDNA nel muscolo scheletrico. Ciò dimostra come l'efficacia dell'alta intensità nel breve periodo è interamente veicolata da un raffinamento qualitativo, riconducibile ad un miglioramento dell'economia del gesto e dell'efficienza delle soglie metaboliche ventilatorie. Le indagini della catena respiratoria hanno dimostrato che le misurazioni mitocondriali non supportano l'idea che l'alterazione dell'ossigeno inspirato abbia prodotto un fenotipo respiratorio del muscolo scheletrico distinto. Nonostante l'alterazione dell'ossigeno inspirato, la funzionalità mitocondriale intrinseca ha mantenuto un pattern omogeneo, confermando che i miglioramenti sistemici dipendono primariamente dalla specificità del gesto biomeccanico. In conclusione, in risposta all'HIIT l'organismo ottimizza prioritariamente l'efficienza dei sistemi di estrazione e trasporto periferico esistenti, prima di investire nella complessa sintesi di un nuovo genoma mitocondriale. Tali evidenze forniscono solide basi per perfezionare la periodizzazione del carico e la programmazione negli sport intermittenti e strutturare protocolli avanzati di riabilitazione e recupero funzionale.

Bibliografia

Baldissera, F., & Porro, C. A. (2009). *Fisiologia e biofisica medica* (4a ed.). Poletto Editore.

Bassett, D. R., & Howley, E. T. (1997). Maximal oxygen uptake: "classical" versus "contemporary" viewpoints. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 29(5), 591-603. <https://doi.org/10.1097/00005768-199705000-00002>

Bassett, D. R., & Howley, E. T. (2000). Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 32(1), 70-84. <https://doi.org/10.1097/00005768-200001000-00012>

Bishop, D. J., Botella, J., Genders, A. J., Lee-Young, R. S., Saner, N. J., Kuang, J., Yan, X., Granata, C., ... & Kuang, J. (2019). High-intensity exercise and mitochondrial biogenesis: current controversies and future perspectives. *Physiology*, 34(1), 56-70. <https://doi.org/10.1152/physiol.00038.2018>

Brooks, G. A. (2018). The science and translation of lactate shuttle theory. *Cell Metabolism*, 27(4), 757-785. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.008>

Cannon, W. B. (1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews*, 9(3), 399-431. <https://doi.org/10.1152/physrev.1929.9.3.399>

Cardinale, D. A., & Ekblom, B. (2018). Hyperoxia for performance and training. *Journal of Sports Sciences*, 36(13), 1515-1522. <https://doi.org/10.1080/02640414.2017.1398893>

Chrøis, K. M., Dohlmann, T. L., Sogaard, D., Hansen, C. V., Larsen, S., & Dela, F. (2020). Mitochondrial adaptations to high intensity interval training in older females and males. *European Journal of Sport Science*, 20(1), 135-144. <https://doi.org/10.1080/17461391.2019.1615556>

Collins, J. A., Rudenski, A., Gibson, J., Howard, L., & O'Driscoll, R. (2015). Relating oxygen partial pressure, saturation and content: the haemoglobin-oxygen dissociation curve. *Breathe*, 11(3), 194-201. <https://doi.org/10.1183/20734735.001415>

Dominelli, P. B., Wiggins, C. C., Roy, T. K., Secomb, T. W., Curry, T. B., & Joyner, M. J. (2021). The Oxygen Cascade During Exercise in Health and Disease. *Mayo Clinic Proceedings*, 96(4), 1017-1032. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.06.063>

Gastin, P. B. (2001). Energy system interaction and relative contribution during maximal exercise. *Sports Medicine*, 31(10), 725-741. <https://doi.org/10.2165/00007256-200131100-00003>

Geng, T., Li, P., Okutsu, M., Yin, X., Kwek, P., Hossain, M. D., & Yan, Z. (2010). PGC-1 α plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 298(3), C572-C579. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00481.2009>

Gifford, J. R., et al. (2016). Symmorphosis and skeletal muscle $\dot{V}O_2$ max: in vivo and in vitro measures reveal differing constraints in the exercise-trained and untrained human. *The Journal of Physiology*, 594(6), 1741-1751. <https://doi.org/10.1113/JP271229>

- Gnaiger, E. (2001). Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respiration Physiology*, 128(3), 277-297. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(01\)00307-3](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(01)00307-3)
- Gnaiger, E., Steinlechner-Maran, R., Méndez, G., Eberl, T., & Margreiter, R. (1995). Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 27(6), 583-596. <https://doi.org/10.1007/bf02111656>
- Helgerud, J., Høydal, K., Wang, E., Karlsen, T., Berg, P., Bjerkaas, M., ... & Hoff, J. (2007). Aerobic high-intensity intervals improve VO₂max more than moderate training. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 39(4), 665-671. <https://doi.org/10.1249/mss.0b013e3180304570>
- Hood, D. A. (2009). Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 34(3), 465-472. <https://doi.org/10.1139/H09-045>
- Jacobs, R. A., & Lundby, C. (2013). Mitochondria express enhanced quality as well as quantity in association with aerobic fitness across recreationally active individuals up to elite athletes. *Journal of Applied Physiology*, 114(3), 344-350. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01081.2012>
- Keir, D. A., Iannetta, D., Mattioni Maturana, F., Kowalchuk, J. M., & Murias, J. M. (2022). Identification of Non-Invasive Exercise Thresholds: Methods, Strategies, and an Online App. *Sports Medicine*, 52(2), 237–255. <https://doi.org/10.1007/s40279-021-01581-z>
- Laursen, P., & Buchheit, M. (2019). Science and application of high-intensity interval training. *Human Kinetics*.
- Levine, B. D. (2008). VO₂max: what do we know, and what do we still need to know?. *The Journal of Physiology*, 586(1), 25-34. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.147629>
- Little, J. P., Safdar, A., Wilkin, G. P., Tarnopolsky, M. A., & Gibala, M. J. (2010). A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. *The Journal of Physiology*, 588(6), 1011-1022. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.181743>
- McArdle, W. D., Katch, F. I., & Katch, V. L. (2015). *Exercise physiology: nutrition, energy, and human performance* (8th ed.). Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Michalik, K., Danek, N., & Zatoń, M. (2021). Comparison of the Ramp and Step Incremental Exercise Test Protocols in Assessing the Maximal Fat Oxidation Rate in Youth Cyclists. *Journal of Human Kinetics*, 80(1), 163-172. <https://doi.org/10.2478/hukin-2021-0104>
- Michiels, C. (2004). Physiological and pathological responses to hypoxia. *The American Journal of Pathology*, 164(6), 1875-1882. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63747-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63747-9)
- Midgley, A. W., McNaughton, L. R., & Wilkinson, M. (2007). Is there an optimal training intensity for enhancing the maximal oxygen uptake of distance runners?. *Sports Medicine*, 37(10), 857-880. <https://doi.org/10.2165/00007256-200737100-00003>

Noakes, T. D. (2012). Fatigue is a brain-derived emotion that regulates the exercise behavior to ensure the protection of whole body homeostasis. *Frontiers in Physiology*, 3, 82. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00082>

Patton, K. T., & Thibodeau, G. A. (2017). *Anatomia e fisiologia* (21a ed.). Edra.

Pedersen, B. K., & Saltin, B. (2015). Exercise as medicine—evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 25, 1-72. <https://doi.org/10.1111/sms.12581>

Perry, C. G., Lally, J., Holloway, G. P., Heigenhauser, G. J., Bonen, A., & Spriet, L. L. (2010). Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 588(23), 4795–4810. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.199448>

Richardson, R. S., Grassi, B., Gavin, T. P., Haseler, L. J., Tagore, K., Roca, J., & Wagner, P. D. (1999). Evidence of O₂ supply-dependent VO₂ max in the exercise-trained human quadriceps. *Journal of Applied Physiology*, 86(3), 1048-1053. <https://doi.org/10.1152/jappl.1999.86.3.1048>

Richardson, R. S., Noyszewski, E. A., Kendrick, K. F., Leigh, J. S., & Wagner, P. D. (1995). Myoglobin O₂ desaturation during exercise. Evidence of limited O₂ transport. *Journal of Clinical Investigation*, 96(4), 1916-1926. <https://doi.org/10.1172/JCI118237>

Sahlin, K. (1982). Intracellular pH and energy metabolism in skeletal muscle of man. With special reference to exercise. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, 508, 1-83.

Sahlin, K., Tonkonogi, M., & Söderlund, K. (1998). Energy supply and muscle fatigue in humans. *Acta Physiologica Scandinavica*, 162(3), 261-266. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.1998.0298.x>

Schofield, C. J., & Ratcliffe, P. J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(5), 343-354. <https://doi.org/10.1038/nrm1366>

Seiler, S. (2010). What is best practice for training intensity and duration distribution in endurance athletes?. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 5(3), 276-291. <https://doi.org/10.1123/ijsp.5.3.276>

Selye, H. (1956). *The stress of life*. McGraw-Hill.

Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148(3), 399-408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>

Spencer, M., Bishop, D., Dawson, B., & Goodman, C. (2005). Physiological and metabolic responses of repeated-sprint activities. *Sports Medicine*, 35(12), 1025-1044. <https://doi.org/10.2165/00007256-200535120-00003>

Wagner, P. D. (1991). Central and peripheral aspects of oxygen transport and adaptations with exercise. *Sports Medicine*, 11(3), 133-142. <https://doi.org/10.2165/00007256-199111030-00001>

Wagner, P. D. (1996). Determinants of maximal oxygen transport and utilization. *Annual Review of Physiology*, 58(1), 21-50. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.58.030196.000321>

West, J. B. (2012). Respiratory physiology: the essentials (9th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.

Yakovlev, N. N. (1955). Outline of sports biochemistry. Fizkultura i Sport.

Zwetsloot, K. A., John, C. S., Lawrence, M. M., Battista, R. A., & Shanely, R. A. (2014). High-intensity interval training induces a modest systemic inflammatory response in active, young men. *Journal of Inflammation Research*, 7, 9-17. <https://doi.org/10.2147/JIR.S54721>