



UNIVERSITA' DI PISA
Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria

*Attivazione del sistema simpato-
adrenergico durante esercizio intenso di
breve durata al treadmill (tappeto
ruotante) nel cavallo*

Candidato: Panniello Cristina Relatori: Prof. Sighieri Claudio

Prof. Preziuso Fabrizio

ANNO ACCADEMICO 2006-2007

*Ai miei genitori,
con la speranza di riuscire sempre
a renderli orgogliosi come in questo momento...*

RIASSUNTO

Parole chiave: cavallo, sistema simpato-adrenergico, treadmill, catecolamine, spirometria, VO_{2max}

Lo scopo del presente studio è quello di fare una valutazione dell'attivazione del sistema simpato-adrenergico nel cavallo sottoposto ad esercizio fisico submassimale di breve durata al treadmill mediante dosaggio delle catecolamine plasmatiche.

I problemi legati alla brevissima emivita di queste molecole nel sangue sono stati superati mediante la messa a punto di un originale sistema di prelievo di sangue in continuo durante gli esercizi su treadmill che ha permesso lo studio della cinetica delle catecolamine plasmatiche "durante" esercizio.

E' stato studiato l'effetto dell'allenamento sui livelli di catecolamine in corso d'esercizio e, dal confronto fra le cinetiche di adrenalina e noradrenalina, sono emerse evidenze riguardanti il maggior ruolo svolto dalla midollare del surrene nel cavallo rispetto all'uomo in corso di attivazione simpato-adrenergica evocata dall'esercizio fisico.

SUMMARY

Keywords: horse, sympato-adrenergic system, treadmill, catecholamines, spirometry, VO_{2max}

The aim of the present study is that to make an evaluation of the activation of sympato-adrenergic system in the horse during submassimal short-term physical exercise on treadmill through the levels of plasmatic catecholamines.

The problems related to the short half-life of these molecules in the blood were overcome by the development of an original constant blood withdrawal system that has allowed the study of the kinetics of the plasmatic catecholamines during exercise.

Has been studied The effect of training on the levels of catecholamines during exercise was studied; from the comparison between the kinetics of adrenaline and noradrenaline, derived a more remarkable role played by the adrenal medulla in horse compared to man in response to the activation of sympato-adrenergic system evoked by exercise.

INDICE

pag.

PARTE I: parte generale

1.0 INTRODUZIONE	6
1.1 Aumento del trasporto di ossigeno nel sangue.....	10
1.2 Aumento della gittata cardiaca.....	10
1.3 Aumentata estrazione di ossigeno dai tessuti.....	12
1.4 VO_{2max}	12
1.5 Accoppiamento respirazione-locomozione.....	15
1.6 La soglia anaerobia.....	16
1.7 La termoregolazione.....	18
2.0 LE CATECOLAMINE	20
2.1 Sistema nervoso simpatico.....	21
2.2 La midollare del surrene.....	24
2.3 Sintesi delle catecolamine.....	26
2.4 Recettori.....	28
2.5 Catecolamine ed esercizio fisico.....	34
2.6 Catecolamine e sistema immunitario.....	41

PARTE II: parte speciale

1.0 SCOPO DELLA RICERCA

1.1 Primo esperimento.....	45
1.2 Secondo esperimento.....	47
1.3 Terzo esperimento.....	48

2.0 MATERIALI E METODI

2.1 PRIMO ESPERIMENTO

2.1.1 Animali.....	49
2.1.2 Prelievo in continuo.....	49
2.1.2.1 Applicazione dei cateteri endovenosi.....	53
2.1.3 Treadmill.....	54
2.1.4 Protocollo esercizio.....	56
2.1.5 Protocollo allenamento.....	57
2.1.6 Gestione dei campioni.....	58
2.1.7 Analisi statistiche utilizzate.....	59

2.2	SECONDO ESPERIMENTO	
2.2.1	Animali	59
2.2.2	Treadmill	60
2.2.3	Spirometria	60
2.2.4	Cardiofrequenzimetro	68
2.3	TERZO ESPERIMENTO	
2.3.1	Animali	68
2.3.2	Treadmill	69
2.3.3	Protocollo di esercizio	69
2.3.4	Prelievo in continuo	69
2.3.4.1	Applicazione dei cateteri endovenosi	70
2.3.4.2	Modalità e tempistica dei prelievi	71
2.3.4.3	Metodica di dosaggio delle catecolamine	72
3.0	RISULTATI	
3.1	PRIMO ESPERIMENTO	73
3.2	SECONDO ESPERIMENTO	78
3.2.1	VO _{2max}	78
3.2.2	VO ₂ e frequenza cardiaca	87
3.3	TERZO ESPERIMENTO	92
3.3.1	Catecolamine	92
3.3.2	Recettori	97
4.0	DISCUSSIONE	
4.1	Discussione primo esperimento	100
4.2	Discussione secondo esperimento	102
4.3	Discussione terzo esperimento	103
4.3.1	Catecolamine	103
4.3.2	Recettori	104
5.0	CONCLUSIONI	106
PARTE III:		
1.0	BIBLIOGRAFIA	109
2.0	RINGRAZIAMENTI	129

PARTE I: parte generale

1.0 INTRODUZIONE

Il cavallo è stato un fattore di sviluppo della società umana a partire dalla notte dei tempi.

Per quanto riguarda la sua storia sul nostro pianeta i fossili più antichi del genere Equus, rinvenuti nel continente americano, sono stati datati a circa 3 milioni di anni fa e a questo periodo risalgono quindi le origini del cavallo.

Attraverso lo stretto di Bering, istmo formatosi dopo la glaciazione con l'abbassamento del livello del mare, questa specie migrò e si diffuse in Eurasia e in Africa sviluppando caratteristiche morfologiche diverse in base all'aspetto climatico del territorio in cui si veniva a trovare.

Si pensa che la doma sia cominciata solo tra il 1700 e il 1500 a.C. e che le ossa di cavallo che sono state rinvenute in insediamenti archeologici del neolitico (circa 5 mila anni a.C.), indicassero unicamente che il cavallo era a quel tempo ancora utilizzato esclusivamente come cibo.

Dopo l'addomesticamento il cavallo è stato utilizzato in molteplici aspetti della vita dell'uomo: da forza lavoro nelle attività agricole o sui campi di battaglia o lungo le vie commerciali come mezzo di trasporto e comunicazione.

Ha costituito lo strumento di una civiltà in crescita, la base dello sviluppo delle civiltà moderne, dalle comunicazioni, agli scambi commerciali e culturali.

Il compito del cavallo è terminato nel momento in cui ha cominciato ad essere svolto dalle macchine e l'industrialismo della

seconda metà del XVIII secolo ha preso il sopravvento con un'autentica rivoluzione che in poco più di un secolo mutò completamente le condizioni di vita dell'umanità.

Questo non ha però causato la completa estromissione del cavallo dalla vita dell'uomo che invece ha cominciato ad osservarlo e a sfruttarne le caratteristiche a scopi ludico-sportivi.

Sono proprio le caratteristiche anatomiche e fisiologiche che lo hanno reso adatto ad essere utilizzato prima, come forza lavoro in campo agricolo e militare, ed oggi come animale per svago e sport nelle discipline equestri.

Con i primi decenni del 1900 inoltre l'attenzione s'è concentrata sullo studio della fisiologia del cavallo in esercizio, e questo interesse si è accresciuto in modo esponenziale a partire dagli anni '50.

Le conoscenze acquisite nel corso degli anni permettono oggi di ottimizzare l'utilizzo del cavallo in molteplici discipline, sfruttando le caratteristiche anatomo-fisiologiche che lo contraddistinguono.

Il cavallo mostra una evidente superiorità atletica nei confronti delle altre specie atletiche come il cane e l'uomo.

Le sue attitudini naturali possono essere anche ricondotte alla sua base etologica che lo vede preda in natura.

La sua sopravvivenza è quindi intimamente connessa alle potenzialità che gli hanno consentito di sfuggire ai predatori, le stesse che oggi vengono sfruttate in campo agonistico.

La domesticazione e la selezione genetica hanno poi contribuito ad affinarne le caratteristiche e farne un vero e proprio atleta.

La differenza tra il cavallo e le altre specie atletiche, non riguarda gli aspetti qualitativi dei meccanismi fisiologici che stanno alla base dell'esecuzione di un esercizio fisico.

La meccanica respiratoria, cardiocircolatoria e muscolare, la capacità di dissipare calore e le modalità di produzione d'energia, sono sostanzialmente le stesse nelle diverse specie.

Ciò che rende speciale il cavallo è l'aspetto "quantitativo" dei meccanismi fisiologici messi in campo durante l'attività fisica (Snow, 1985 ; Erickson, 1993).

Intraprendere e sostenere un'esercizio richiede di possedere risorse energetiche e la capacità di utilizzarle nel migliore dei modi sia in campo umano che in campo animale.

La caratteristica fondamentale del cavallo è quella di saper ricavare l'energia per la locomozione dal metabolismo aerobico in quantità e per tempi più lunghi rispetto ad un'atleta d'altra specie.

Ha una soglia anaerobica particolarmente elevata che risulta anche positivamente influenzabile dall'allenamento.

Il rifornimento energetico e la sua utilizzazione a livello muscolare rappresentano la componente fondamentale della performance in qualunque tipo di attività atletica e principalmente nella corsa. L'energia viene utilizzata nell'organismo veicolata da molecole di adenosina trifosfato (ATP).

L'idrossilazione dell'ATP fornisce energia necessaria per lo svolgimento delle attività dell'organismo compresa quella della contrazione muscolare. Le maggiori riserve per la produzione di energia sono costituite da carboidrati e grassi sia intracellulari che extracellulari.

Le risorse intracellulari includono glicogeno e trigliceridi e quelle extracellulari glucosio e acidi grassi non essenziali (NEFA) apportati ai muscoli con la circolazione ed il loro contributo dipende sia dalla velocità e durata dell'esercizio sia dallo stato di allenamento del cavallo.

La produzione di ATP può avvenire mediante metabolismo aerobio (fosforilazione ossidativa) oppure mediante metabolismo anaerobio (essenzialmente glicolisi).

Il muscolo scheletrico del cavallo contiene abbondanti riserve di glicogeno e una concentrazione di mitocondri per unità di massa muscolare maggiore rispetto all'uomo, come maggiore risulta il rapporto percentuale tra la massa muscolare rispetto a quella corporea totale a paragone con altre specie animali (Kearns et al. 2002).

Queste ottime caratteristiche anatomiche, si associano alla capacità del cavallo di farne il migliore uso utilizzando le riserve di glicogeno mediante metabolismo aerobico in misura maggiore rispetto agli altri mammiferi.

Il cavallo ha una capacità aerobia superiore all'uomo (Kearns et al., 2002). La richiesta ed il consumo di ossigeno in corso di esercizio fisico aumentano in modo esponenziale e direttamente proporzionale all'intensità dello sforzo.

Quando la richiesta d'ossigeno da parte dei tessuti periferici aumenta, il sistema di trasporto dell'O₂ deve adeguarsi a tutti i livelli per garantirne l'adeguato apporto, nel caso dell'esercizio fisico, soprattutto ai muscoli.

Il cavallo sottoposto ad esercizi massimali è in grado di aumentare il consumo di ossigeno di circa 40 volte rispetto ai valori di riposo (Swenson, M.J. e Reece, W.O., 2002).

Questa maggiore disponibilità di ossigeno è assicurata mediante tre principali meccanismi:

1. aumento del trasporto di ossigeno nel sangue
2. aumento della gittata cardiaca
3. aumentata estrazione dell'ossigeno dal sangue ai tessuti

1.1 AUMENTO DEL TRASPORTO DI OSSIGENO NEL SANGUE

Nel cavallo e, in minima misura nel cane, la milza costituisce una riserva di eritrociti che in condizioni di richiesta da parte dell'organismo vengono liberati nel circolo sistemico sotto controllo del sistema nervoso ortosimpatico e delle catecolamine circolanti (Evans and Rose, 1988; Stevenson, 1994; Kearns et al., 2002). Il risultato è un incremento dell'ematocrito e un aumento nella concentrazione di emoglobina nel sangue arterioso e quindi del contenuto di ossigeno, con conseguente maggiore capacità di estrazione dell'ossigeno libero da parte del muscolo scheletrico (Evans and Rose, 1988; Rose et al., 1990).

L'aumento della componente corpuscolata del sangue non è comunque tale da innalzare la viscosità ematica al punto da compromettere l'emodinamica sistemica.

Risulta inoltre facilitata l'estrazione dell'ossigeno dal sangue grazie all'incremento della differenza artero-venosa di ossigeno che aumenta del 23% rispetto ai valori a riposo.

1.2 AUMENTO DELLA GITTATA CARDIACA

Le richieste metaboliche provenienti dal comparto muscolare sono accolte anche dall'apparato cardiovascolare che risponde con una redistribuzione del flusso ematico a favore del muscolo che passa da un 15% ad un 80% della perfusione totale in corso di esercizio intenso.

L'aumento del volume di sangue espulso dal cuore ad ogni battito (gittata sistolica) costituisce un aspetto importante dell'aumento del trasporto di O₂ nel cavallo.

Nel cane e nell'uomo la gittata cardiaca può quadruplicare in corso di esercizio massimale, ma nel cavallo può aumentare da 5 a 8 volte rispetto ai valori a riposo.

L'elevata gittata cardiaca è anche legata al rapporto peso del cuore/peso corporeo (g/Kg) che nel purosangue è in media 8,6 mentre nell'uomo è circa 4.

Il grosso aumento della gittata è dovuto alle elevate frequenze cardiache che il cavallo può raggiungere durante un esercizio massimale (per un galoppatore allenato anche 240-250 bpm).

L'aumento della frequenza cardiaca è, al di sopra dei 120 bpm, proporzionale ai carichi di lavoro richiesti, mentre al di sotto di questo valore gioca un ruolo predominante la componente emotiva.

Parametro	Riposo	Esercizio
Frequenza cardiaca (battiti/minuto)	30	210-250
Gittata cardiaca (litri/minuto)	30	150-240
Concentrazione di emoglobina (g/dl)	13	17-24
Concentrazione di ossigeno (ml/min/Kg)	3-4.	120-160
Pressione arteriosa sistolica/diastolica (mmHg)	130/80	230/110
Pressione pulsatoria (mmHg)	50	150-200
Pressione nell'arteria polmonare (mmHg)	20-30	80-90

Dati ricavati da von Engelhardt 1977, 1979; Meixner et al., 1981; Rose 1985.

1.3 AUMENTATA ESTRAZIONE DI OSSIGENO DAI TESSUTI

La captazione di ossigeno aumenta in modo lineare al crescere dell'intensità dell'esercizio fino ad un certo punto, oltre il quale non si ha un ulteriore incremento nonostante l'aumento dell'intensità dell'esercizio. Questo valore viene indicato come il massimo flusso di ossigeno che può essere fornito all'organismo e che questo è in grado di utilizzare come fonte aerobica per la produzione di energia (VO_{2max}).

1.4 VO_{2max}

Rappresenta il parametro ideale per stimare la capacità atletica di un cavallo come di un uomo ed è indicato come un rapporto litri / minuto oppure litri / Kg di peso corporeo / minuto; tuttavia la sua determinazione risulta piuttosto complessa (Kearns et al. 2002).

L'importanza della stima di questo parametro è facilmente comprensibile nel caso in cui si voglia paragonare la reale capacità atletica di due cavalli sottoposti ad un esercizio di uguale intensità: questo verrà eseguito dai due soggetti in modo differente, raggiungendo percentuali del proprio VO_{2max} differenti sulla base delle caratteristiche genetiche oltre che del livello di allenamento che li contraddistinguono. L'allenamento determina infatti un'importante innalzamento della soglia anaerobica in quanto aumenta la potenza aerobia del cavallo ovvero la sua capacità di utilizzare fonti aerobie per la produzione di energia.

Il tutto ha ripercussioni positive sulla capacità aerobia del cavallo e sul VO_{2max} che può aumentare in media del 25% in soggetti sottoposti ad allenamento aerobico su treadmill (Evans and Rose 1988; Knight et al. 1991; Thorton et al. 1991; Art and Lekeux 1993; Evans et al. 1995; Mc Donought et al. 2002; Rose et al. 2006).

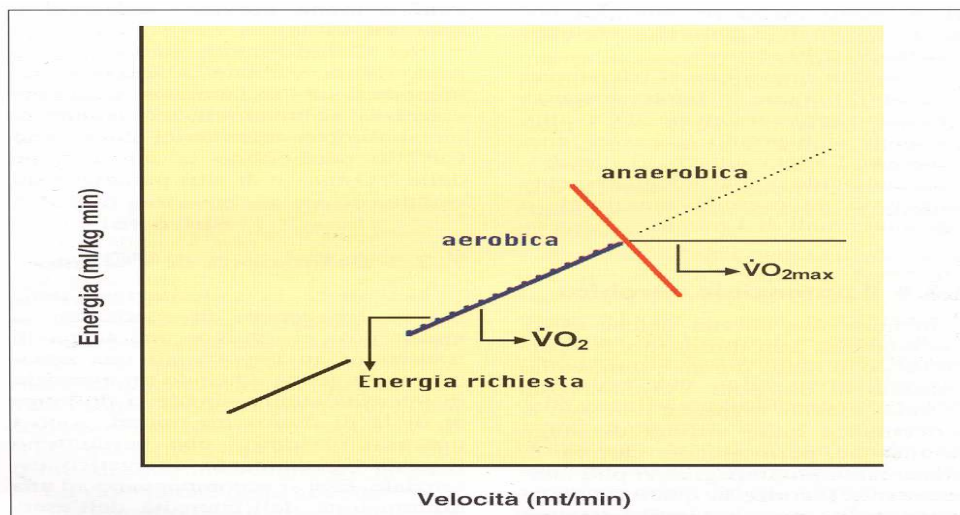


Fig. 7.3 Consumo di ossigeno in funzione della velocità di corsa. La $\dot{V}O_2$ aumenta sino ad un valore massimo ($\dot{V}O_{2max}$), oltre il quale l'energia richiesta proviene da sorgenti anaerobiche.

130

(Immagine tratta da “Fisiologia dell’esercizio fisico del cavallo” edizione Edagricole Bologna, 2001, Giovanni Caola)

Quindi per valutare la performance di un cavallo non ci si basa sull’intensità dell’esercizio richiesto, quanto più sulla capacità atletica dimostrata ad una certa percentuale di $\dot{V}O_{2max}$ stimata utilizzando il dosaggio dei gas respiratori mediante spirometria.

I cavalli, rispetto ad altre specie, in proporzione hanno valori molto elevati di $\dot{V}O_{2max}$, infatti il $\dot{V}O_{2max}$ è stato oggetto di studio anche in campo umano come metro di valutazione della capacità atletica di un individuo (Taylor et al. 1955), e ne è stata fatta una stima anche per altre specie di mammiferi.

I valori ottenuti dai diversi studi hanno dimostrato l’assoluta superiorità del cavallo atleta rispetto alle altre specie esaminate proprio per il suo potenziale aerobio (Evans and Rose 1988; Rose et al. 1988).

Purosangue allenati raggiungono valori di 160 ml/Kg/min, circa 40 volte il valore a riposo, mentre nei migliori atleti umani è stato stimato un aumento di 18-24 volte rispetto ai valori a riposo.

Specie	VO _{2max}
Uomo	69-85
Cavallo	160
Cane	100
Cammello	51

(Valori tratti da “The athletic” horse Hodgson, D.R. and Rose, R.J. Edizione Saunders company USA. 1994)

E' stato inoltre dimostrato che l'età (Betros et al 2002) e la massa muscolare (Kearns et al. 2002) hanno effetto rispettivamente positivo e negativo sulla capacità aerobia e sul VO_{2max}.

Il VO_{2max} può essere determinato sottoponendo il cavallo a protocolli d'esercizio incrementale, opportunamente preceduti da un adeguato periodo di riscaldamento (Rose et al. 1990), applicando la spirometria.

Rose et al. nel 1990 compararono 5 differenti metodi di esercizio attraverso i quali stimarono il VO_{2max} di otto trottatori in condizioni standard di temperatura e umidità.

Il risultato dell'esperimento ha dimostrato che qualunque protocollo d'esercizio incrementale basato sull'aumento progressivo della velocità del treadmill o della sua inclinazione preceduto da un adeguato periodo di riscaldamento, permette di raggiungere intensità d'esercizio pari al 100% del VO_{2max}.

1.5 ACCOPPIAMENTO

RESPIRAZIONE-LOCOMOZIONE

E' poi da considerare che per importanti aspetti la respirazione del cavallo in corsa è diversa da quella dell'uomo in corsa, infatti la locomozione in un bipede ha scarse ripercussioni sulla meccanica toracica perciò l'uomo è in grado di realizzare la più efficace combinazione di volume tidalico (quantità d'aria che entra ed esce dal polmone ad ogni atto respiratorio) e frequenza respiratoria (numero di atti respiratori nell'unità di tempo).

Se il cavallo non può realizzare analoga combinazione, è però in grado di cambiare andatura per minimizzare la spesa energetica.

Si può parlare di un accoppiamento meccanico tra frequenza respiratoria e locomozione che, nel canter (6 m/s) e nel galoppo (> 8,5 m/s), si trovano in un rapporto di 1:1 e ciò regola l'attività respiratoria limitando l'espansione polmonare e impedendo un eccessivo aumento della frequenza respiratoria e del volume respiratorio (Butler et al., 1993). Il primo tempo di canter e galoppo è caratterizzato dal sollevamento da terra degli arti anteriori, in questo modo il peso dei visceri addominali è spinto verso il treno posteriore e trascina con sé il diaframma ampliando la cavità toracica e facilitando l'inspirazione; nel secondo tempo invece, quando gli arti anteriori del cavallo toccano terra contemporaneamente inducono uno spostamento del pistone viscerale che va a premere sul diaframma esercitando in un cavallo di 450 Kg una forza pari a 130 Kg facilitando l'espirazione.

A queste andature il rapporto tra atti respiratori e locomotori è fissato ad 1:1 e non può in alcun modo variare. In questo modo il costo energetico della meccanica respiratoria risulta minimo.

Nel trotto (4 m/s) invece il rapporto tra la frequenza respiratoria e l'andatura varia tra 1:2, 1:3 e 2:3. A conclusione si può dire che ad elevate velocità gli atti respiratori non possono superare il numero dei passi effettuati.

Il cavallo ha quindi la capacità di cambiare andatura per ridurre al minimo il costo energetico richiesto da una corsa, qualunque sia la velocità. Per ogni andatura c'è infatti una velocità ottimale alla quale corrisponde il minimo consumo di ossigeno.

Andature di canter e galoppo vedono la frequenza del passo sincronizzata a quella del respiro 1:1 perciò durante il galoppo la frequenza respiratoria e quella del passo sono di solito comprese fra 130 e 140, con respiri relativamente poco profondi per cui il volume tidalico raramente supera un terzo della capacità vitale (valore ottenuto dalla somma di volume tidalico, volume di riserva inspiratorio ed espiratorio).

1.6 LA SOGLIA ANAEROBIA

Inoltre il cavallo e il cane, in corrispondenza di sforzi sovramassimali, mostrano e sopportano concentrazioni ematiche di lattato superiori a quelle dell'uomo.

Ricordiamo che l'accumulo di lattato porta ad un abbassamento muscolare del pH che inibisce le vie metaboliche causando un rallentamento nella glicolisi e nella produzione di ATP.

Negli esercizi brevi ed intensi la caduta del pH, la deplezione di ATP e di fosfocreatina, è senza dubbio la causa del manifestarsi della

fatica che è rappresentata dall'incapacità del cavallo a mantenere un determinato esercizio all'intensità e per il tempo richiesti.

Negli esercizi di lunga durata invece, i fattori che causano l'insorgere della fatica sono più di frequente l'esaurimento delle scorte di glicogeno muscolare, la disidratazione e uno sbilanciamento dei meccanismi di termoregolazione.

Comunque nel cavallo la concentrazione di lattato ematico non si discosta dal valore a riposo fin quando la FC non oltrepassa i 155-160 bpm e al di sotto di questo valore si tratta essenzialmente di un lavoro aerobio.

L'acido lattico rappresenta la misura dell'attività anaerobia dell'organismo.

E' possibile, eseguendo il dosaggio del lattato ematico, stabilire qual è il momento di passaggio tra una produzione di energia esclusivamente attraverso la via aerobica del metabolismo, e la produzione di energia anaerobia, in corso di esercizio fisico.

Si può individuare questo punto di passaggio, definito soglia anaerobia, rilevando concentrazioni di lattato uguali o superiori a 4 mmol/l.

Questo valore derivato sostanzialmente dalla medicina sportiva umana, è utilizzato anche per valutare la performance nel cavallo, associandolo alla velocità alla quale si muove quando raggiunge la soglia anaerobia (V4).

Indica la velocità massima che il cavallo può raggiungere prima che i meccanismi di smaltimento dell'acido lattico siano sbilanciati.

Un soggetto con soglia anaerobia elevata mostra una resistenza nella comparsa della fatica in quanto ha una maggiore capacità di trasporto ed utilizzo dell'ossigeno e sfrutta la produzione aerobia di energia ritardando l'accumulo di acido lattico nel sangue.

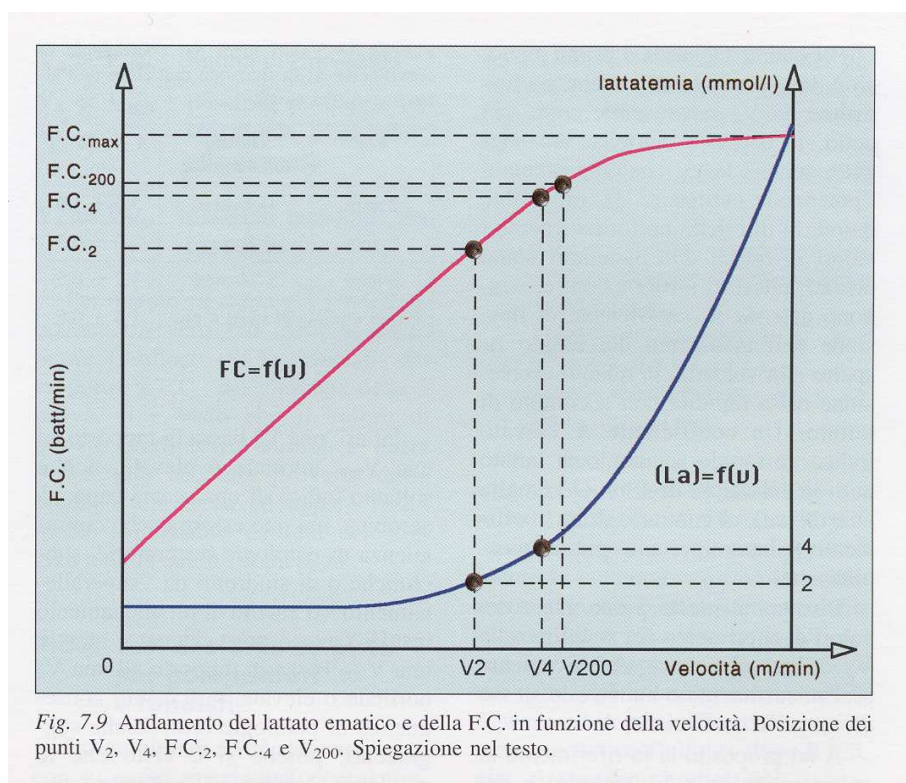


Fig. 7.9 Andamento del lattato ematico e della F.C. in funzione della velocità. Posizione dei punti V_2 , V_4 , $F.C._2$, $F.C._4$ e V_{200} . Spiegazione nel testo.

(Immagine tratta da “Fisiologia dell’esercizio fisico del cavallo”
edizione Edagricole Bologna 2001, Giovanni Caola)

1.7 LA TERMOREGOLAZIONE

Negli atleti umani e probabilmente anche nel cane e nel cavallo atleta solo il 25% dell’energia chimica messa in gioco è convertibile in lavoro meccanico.

L’energia rimanente è trasformata in calore che deve essere smaltito per mantenere costante la temperatura corporea.

Quando l’intensità dell’esercizio è molto elevata la produzione calorica del cavallo può arrivare a 30-40 volte i livelli basali.

I meccanismi messi in atto dal cavallo per disperdere calore sono gli stessi di tutti gli altri omeotermi ma risulta svantaggiato rispetto

all'uomo a causa dello spessore del mantello che quanto è maggiore, tanto influisce negativamente sulla termodispersione per la sua azione di isolante termico, e il rapporto svantaggioso superficie disperdente/peso corporeo.

Nel cavallo il più importante meccanismo termodispersivo è caratterizzato dall'evaporazione che si verifica attraverso la superficie corporea e in misura molto minore attraverso l'apparato respiratorio.

L'evaporazione è consentita dall'intensa sudorazione regolata anche dallo stimolo adrenergico sulle ghiandole sudoripare.

Il sudore del cavallo ha inoltre particolari caratteristiche che lo rendono molto diverso da quello dell'uomo: risulta ipertonico rispetto al plasma e contiene elevate concentrazioni di laterina, una glicoproteina che conferisce al sudore aspetto schiumoso e ha l'effetto tensioattivo di distribuire uniformemente il sudore sulla superficie cutanea aumentando l'efficacia dell'evaporazione.

Le perdite di calore attraverso il tratto respiratorio invece non sono imponenti come nei carnivori; il cavallo non può manifestare polipnea in quanto, a causa del particolare sviluppo del palato molle che si sovrappone all'epiglottide durante gli atti respiratori, non può utilizzare la cavità orale come via d'accesso respiratoria secondaria.

Il meccanismo termodispersivo per mezzo delle vie aeree si basa sull'emissione d'aria espirata riscaldata e saturata di vapore acqueo all'85%.

L'aumento della ventilazione polmonare in corso d'esercizio fisico aumenta anche le perdite di calore attraverso questa via; è stata calcolata una perdita di 0,03 gr di acqua per ogni litro d'aria respirata.

2.0 LE CATECOLAMINE

Tutte le modificazioni endogene che si verificano in un cavallo che affronti uno sforzo fisico, sono regolate dall'attivazione del sistema neuro-endocrino ed in modo particolare del sistema nervoso simpatico con conseguente rilascio di catecolamine dalla midollare del surrene e dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, con rilascio di ormone adrenocorticotropo (ACTH), e di corticosteroidi (Snow et al. 1992; Nagata et al. 1999).

L'esercizio intenso comporta in modo particolare un'imponente attivazione del sistema nervoso simpato-adrenergico che gioca un ruolo fondamentale nel mediare le risposte cardiovascolari e metaboliche (Christensen, 1983).

Poiché l'attivazione del sistema simpato-adrenergico da parte dell'esercizio fisico ha come risposta primaria l'aumento dei livelli plasmatici di catecolamine, come riportato nell'uomo (Peronnet, 1981; Leuenberger, 1993; Silverman 1996; Gullestad, 1997; Greiwe, 1999), l'attivazione stessa può essere monitorata misurando l'aumento nelle concentrazioni plasmatiche di Noradrenalina (NA), determinata dallo "spillover" a livello sinaptico, e Adrenalina (A), causate dall'aumentata secrezione da parte della midollare del surrene (Shah, 1984).

E' riconosciuto il ruolo fondamentale delle catecolamine nella modulazione della risposta all'esercizio; tuttavia ci sono ancora delle incertezze riguardo la loro cinetica in corso d'esercizio, dovute alle difficoltà incontrate nello studio a causa della loro breve emivita nel sangue.

2.1 SISTEMA NERVOSO SIMPATICO

Il sistema nervoso ortosimpatico insieme al parasimpatico, costituisce sostanzialmente la parte efferente del sistema nervoso autonomo deputato alla regolazione di funzioni “viscerali” che non sono sottoposte a controllo volontario diretto.

Il concetto di “viscere” non va inteso limitatamente ai soli organi cavitari, va bensì esteso anche a quelle strutture extracavitari dotate di muscolatura liscia che non ricevono innervazione dal sistema nervoso somatico (vasi sanguigni, ghiandole sudoripare ecc.)

Il sistema nervoso simpatico ed il parasimpatico, modulano la funzione di cellule ed organi in risposta a sollecitazioni ambientali ed emotive generando quadri sintomatologici caratteristici: l’ortosimpatico è responsabile della cosiddetta “reazione di lotta e fuga” mentre l’attività del parasimpatico è più strettamente connessa a funzioni di tipo “digestivo” ed anaboliche in genere.

La reazione di lotta e fuga è caratterizzata da una serie di risposte viscerali che mettono in condizione l’individuo di affrontare un’attività in cui sia richiesta forza, resistenza e rapidità d’azione:

il sistema cardiovascolare risulta intensamente stimolato, si ha una redistribuzione del flusso ematico con maggiore perfusione del distretto muscolare, si ha contrazione splenica con immissione di eritrociti in circolo, si ha stimolazione dell’apparato respiratorio con dilatazione bronchiale e inibizione delle secrezioni per assicurare maggiore capacità respiratoria, aumentano le mobilitazioni delle riserve di acidi grassi e glucosio dai tessuti per fornire l’energia necessaria alla contrazione muscolare, viene stimolata la sudorazione e altri meccanismi che si attivano per far fronte alle nuove richieste in termini di ossigeno ed energia.

La suddivisione in sistema nervoso simpatico e parasimpatico è stata proposta da Langley sulla base della differente sede d'origine della componente motrice e si applica solamente alla componente effettrice di questi sistemi, ma non è stata estesa alla componente sensitiva.

Il simpatico ha i suoi neuroni pregangliari efferenti localizzati nella sostanza grigia intermedio-laterale del midollo spinale, limitatamente al tratto toraco-lombare, mentre i gangli motori, da cui originano i neuriti postgangliari che completano la via efferente, hanno i corpi cellulari nei gangli paravertebrali, a ridosso dei corpi vertebrali, oppure nei gangli prevertebrali, più in periferia ma sempre ad una certa distanza dall'organo effettore.

Le fibre efferenti pregangliari fuoriescono dal midollo con le radici ventrali dei nervi spinali che abbandonano poco dopo il passaggio attraverso i fori vertebrali per dar luogo a fibre mieliniche che penetrano nella catena dei gangli del simpatico a ridosso dei corpi vertebrali.

Qui una parte delle fibre si interrompe contraendo rapporti sinaptici con neuroni gangliari, l'altra parte li attraversa e termina in gangli più periferici.

I prolungamenti che originano dai neuroni gangliari sono costituiti da fibre amieliniche postgangliari che si dirigono ai distretti periferici.

Le fibre dei primi tre-quattro metameri toracici per lo più attraversano la catena dei gangli paravertebrali dirigendosi cranialmente e terminano in tre gangli simpatici disposti lungo il collo denominati cervicale medio, inferiore e superiore, da cui originano fibre effettrici post-gangliari destinate a strutture del collo e della testa.

Il ganglio cervicale inferiore unendosi con i primi gangli toracici della catena del simpatico forma il ganglio stellato dal quale originano

fibre postgangliari deputate all'innervazione dei visceri della cavità toracica e alle strutture viscerali del quarto anteriore dell'animale.

Le fibre pregangliari del restante tratto toraco-lombare che non si interrompono nei gangli della catena paravertebrale, proseguono verso gangli periferici in senso craniale e caudale e formano dei tronchi nervosi che terminano nei gangli prevertebrali (celiaco, mesenterico superiore e mesenterico inferiore) da cui originano le fibre postgangliari amieliniche.

Tutte le fibre che innervano gli effettori sono fibre postgangliari; l'unica eccezione è costituita dalla midollare del surrene che riceve fibre simpatiche che non subiscono interruzioni e vanno ad innervare direttamente le cellule cromaffini.

La midollare del surrene viene pertanto stimolata direttamente dall'attivazione ortosimpatica tanto da essere definita il "braccio ormonale" dell'ortosimpatico.

Il simpatico e il parasimpatico partecipano all'innervazione degli stessi effettori ma l'azione su questi esercitata risulta in molti casi antagonista: dove l'uno stimola, l'altro deprime e viceversa, in altri si comportano in modo del tutto indipendente mentre altre volte possono agire in correlazione sinergica tra loro (Aguggini et al, 2006).

La trasmissione degli impulsi nervosi vegetativi agli organi effettori è mediata dalla liberazione di agenti chimici che intervengono a livello delle sinapsi gangliari e delle giunzioni tra fibre postgangliari ed effettori viscerali.

Nelle sinapsi gangliari di entrambi i sistemi ed anche in quelle postgangliari del parasimpatico, il mediatore liberato è l'acetilcolina.

Le fibre postgangliari del simpatico invece liberano, generalmente, noradrenalina (NA).

La NA è immagazzinata a livello dei bottoni sinaptici contenuta in granuli e vescicole.

L'attivazione ortosimpatica ne libera grandi quantità mentre piccole quantità vengono rilasciate continuamente sotto stimoli tonici dei centri superiori.

I neurotrasmettitori agiscono per favorire l'evento depolarizzante nell'organo effettore con conseguente risposta di quest'ultimo.

La noradrenalina viene liberata solo dalle terminazioni nervose postgangliari simpatiche a livello della giunzione neuroeffettrice o in minima parte dalle cellule cromaffini della midollare del surrene che producono l'adrenalina come catecolamina maggioritaria e la rilasciano direttamente nel circolo sanguigno.

2.2 LA MIDOLLARE DEL SURRENE

Le ghiandole surrenali, responsabili della secrezione soprattutto di A, sono costituite da una zona corticale esterna ed una midollare interna.

La corticale è divisa in tre zone ciascuna responsabile della produzione e liberazione di un ormoni sintetizzati a partire dalla molecola del colesterolo: cortisolo, aldosterone e precursori degli ormoni sessuali.

La midollare invece è deputata alla produzione di catecolamine, adrenalina e noradrenalina e costituisce circa 1/5 del peso delle surrenali.

La secrezione del cortisolo è regolata dalla concentrazione ematica di ACTH, mentre quella dell' aldosterone dal sistema renina-angiotensina.

Le catecolamine invece vengono liberate dalla midollare sotto diretta stimolazione di fibre nervose pregangliari colinergiche del sistema nervoso simpatico che decorrono all'interno del nervo splanchnico. La midollare come è già stato detto, produce una bassissima quota di noradrenalina che per la maggior parte viene prodotta dalle terminazioni nervose postgangliari del simpatico, mentre libera per lo più adrenalina.

Ha una ricca vascolarizzazione, prevalentemente indipendente da quella della corteccia, che le conferisce colore rossastro, in contrasto col colore giallastro più chiaro della corticale; tuttavia sono presenti alcune venule che provenendo dalla corticale finiscono per confluire nei sinusoidi della midollare veicolando glicocorticoidi.

La presenza di questo circolo intrasurrenalico ha importanza rilevante in quanto i glicocorticoidi sono in grado di regolare la sintesi di catecolamine inducendo nel tessuto cromaffine la sintesi dell'enzima N-metil trasferasi che interviene nella trasformazione della NA in A.

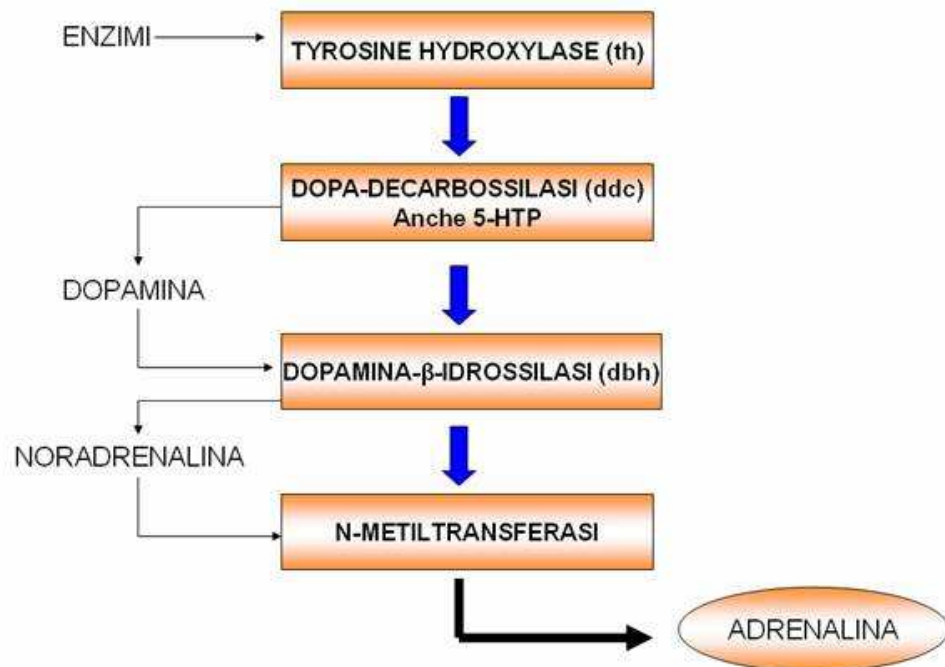
Le cellule che costituiscono la midollare sono relativamente grandi e tondeggianti; per la loro affinità per i fissativi a base di cromo utilizzati nelle colorazioni, vengono chiamate cellule cromaffini. Sono organizzate in cordoni e sono in stretto contatto con le vene che drenano il sangue dalla zona corticale e con le terminazioni nervose delle fibre pregangliari del simpatico.

Contengono numerosi granuli citoplasmatici contenenti oltre ad adrenalina e noradrenalina, altri peptidi, lipidi, molecole energetiche, β -endorfine. La sintesi degli ormoni catecolaminergici avviene in parte all'interno dei granuli e in parte nel citoplasma delle cellule cromaffini (Aguggini, et al 2006; Paoletti et al., 2004).

2.3 SINTESI DELLE CATECOLAMINE

Le catecolamine prendono il nome dalla loro composizione chimica in quanto possiedono un gruppo aromatico con due ossidrili in posizione orto (catecolo) e un gruppo aminico.

Il meccanismo di sintesi delle catecolamine fu proposto in umana per la prima volta da Blaschko nel 1939 e negli anni seguenti è stato rivisto e perfezionato e segue le tappe riassunte nel seguente schema:



La prima reazione catalizzata dall' enzima tirosina idrossilasi (TH) presente esclusivamente nei tessuti che sintetizzano catecolamine ed altamente specifico per la tirosina, avviene all' interno del citoplasma e determina la conversione dell'aminoacido tirosina (paraidrossifenilalamina) che viene dapprima idrossilato a diidrossifenilalanina (DOPA); la conversione a dopamina è catalizzata da una L-aminoacido aromatico decarbossilasi non specifica; la dopamina viene quindi ricaptata all' interno dei granuli cromaffini dove

subisce successive modificazioni ad opera della dopamina- β -idrossilasi presente solo all' interno dei granuli, che la trasforma in noradrenalina (NA).

L' enzima feniletanolamina N-metiltransferasi (PNMT) aggiunge un gruppo metilico al gruppo aminico terminale della NA formando l'adrenalina (A) che viene ricaptata e immagazzinata all' interno dei granuli di secrezione insieme ad una proteina, la cromogranina (Aguggini, et al., 2006 ; Clementi e Fumagalli, 2004).

Le catecolamine vengono riversate nel sangue come ormoni e circolano nel plasma sia in forma libera che in forma coniugata con le proteine plasmatiche, ma solamente la parte libera (5% A, 30% NA) risulta essere biologicamente attiva .

L'adrenalina e la noradrenalina circolanti hanno un periodo di attività estremamente breve che garantisce una rapida interruzione dei loro molteplici effetti biologici.

La loro emivita varia da 30 a 60 secondi nel cavallo ed è significativamente più breve rispetto all' uomo dove è circa 2-3 minuti (Snow et al. 1992).

Il controllo della secrezione di catecolamine è quasi esclusivamente nervoso: quando le terminazioni pregangliari simpatiche vengono stimulate liberano il loro neurotrasmettitore (acetilcolina) che depolarizza la membrana delle cellule cromaffini e permette l' esocitosi dei granuli contenenti le catecolamine. Altri agenti che determinano la liberazione di catecolamine da parte della midollare del surrene sono l'istamina, la bradichinina, la serotonina e il glucagone.

Gli stimoli più efficaci per la liberazione di catecolamine sono lo stress, il dolore, l'ipovolemia, l'ipoglicemia, l'ipotensione (Aguggini, et al., 2006) Le catecolamine intervengono nella regolazione della

funzionalità di molti sistemi e possono essere studiate nella valutazione dello stress indotto dall' esercizio (Nagata et al. 1999).

Sono infatti coinvolte nella regolazione di molteplici funzioni omeostatiche come la frequenza cardiaca, l' inotropismo cardiaco, il tono della muscolatura bronchiale, il metabolismo dei carboidrati e dei lipidi.

La produzione di catecolamine avviene in modo tonico, sono condizioni particolari stressogene a determinare una imponente attivazione del sistema simpato-adrenergico e con esso un'importante aumento delle concentrazioni ematiche di catecolamine con conseguenti loro azioni sugli organi bersaglio.

2.4 RECETTORI:

NA e A agiscono attraverso siti particolari a composizione prevalentemente proteica (recettori) presenti sulla membrana delle cellule bersaglio per mezzo dei quali esercitano i loro effetti inibitori e/o eccitatori sugli organi.

Ahlquist per primo nel 1948 propose l'esistenza di diversi tipi di recettori adrenergici introducendo la generica denominazione di alfa (α) e beta (β) per due distinte classi recettoriali presenti sulle membrane delle cellule muscolari lisce, dove le catecolamine inducono risposte eccitatorie o inibitorie rispettivamente. Negli anni seguenti è stata dimostrata la presenza di molteplici sottotipi recettoriali nei tessuti degli animali domestici, all'interno della stessa classe recettoriale (Badino et al. 2005). Questi sottotipi sono stati classificati secondo un modello che prevede l' esistenza di 3 differenti sottofamiglie α_1 , α_2 e β .

All'interno della sottofamiglia beta sono stati individuati 3 differenti sottotipi indicati come β_1 , β_2 , β_3 sulla base della differente potenza d'azione di A e NA su questi siti (Badino et al., 2005).

I β_1 sono molto rappresentati nel miocardio dove mediano l'aumento della contrattilità, la frequenza cardiaca, la velocità di conduzione dell'impulso nervoso e l'attivazione automatica delle fibre nervose del miocardio specifico; i β_2 si trovano in maggior concentrazione nel muscolo liscio dove la loro attivazione è responsabile di miorilassamento, mediano la liberazione di renina e di insulina oltre alla bronco- e vasodilatazione; i β_3 sono stati individuati nell'uomo dall'isolamento del gene che codifica questi siti recettoriali e sono considerati i maggiori responsabili della regolazione della lipolisi e dell'effetto termogenico.

L'ipotesi dell'esistenza di recettori β_4 proposta da Kaumann and Molenaar nel 1997 e confermata da Lowe et al., nel 1998, è stata smentita nel 2001 da Guimaraes and Moura che hanno dimostrato che si tratta solo di un differente stato conformazionale dei β_1 .

Sui recettori β_2 l'azione dell'adrenalina risulta essere maggiore rispetto a quella della NA, il contrario si verifica sui β_3 , mentre mostrano azione equipotente sui β_1 (Badino et al., 2005).

Gli α invece costituiscono un'eterogenea famiglia di recettori che è stata classificata secondo l'affinità farmacologica di ogni ligando per i diversi sottotipi (Badino et al., 2005). La sottofamiglia α_1 comprende al suo interno 3 differenti sottotipi:

α_{1A} che contribuiscono al mantenimento del tono vascolare basale e della pressione arteriosa dei soggetti in stato cosciente;

α_{1B} deputati al controllo della pressione sanguigna e della omeostasi del glucosio;

α_{1D} sembrano essere coinvolti nella attivazione di contrazioni della muscolatura liscia vasale e nella regolazione delle correnti di K^+ nei miociti ventricolari.

Per quanto riguarda gli α_2 , risultano anch'essi suddivisi in 3 sottotipi: α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} (Badino et al., 2005). Era stata identificata una classe α_{2D} nella ghiandola salivare sottomascellare del topo e nell'ipofisi di bovino ma è oggi considerata una variante del sottotipo α_{2A} .

Gli α_2 giocano un ruolo importante nel controllo della vasocostrizione; sono responsabili del feed-back inibitorio presinaptico regolando il rilascio di neurotrasmettitore dalle fibre nervose adrenergiche, mediano effetti ipnotici e sedativi e sono coinvolti nel controllo della percezione del dolore e del comportamento.

I sottotipi α_2 sono responsabili degli effetti analgesici degli α_2 -agonisti, mentre l'effetto sedativo è il risultato della stimolazione degli α_{2A} . Il sottotipo α_{2C} è implicato nella modulazione del comportamento e della memoria (Bjorklind et al., 1999; Scheinin et al., 2001).

La distribuzione dei differenti sottotipi recettoriali degli α_2 nelle vene e nelle arterie varia in rapporto alla specie animale (Civantos Calzada and De Artinano, 2001).

Generalmente la stimolazione degli α_2 causa una risposta bifasica della pressione ematica caratterizzata da una breve fase ipertensiva mediata dagli α_{2B} ed una fase prolungata di caduta della pressione del sangue mediata dal sottotipo α_{2A} (Badino et al., 2005).

Nel cavallo, a livello cardiaco in soggetti sani, sembra essere più rappresentato il sottotipo β_1 ma in corso di patologie cardiache potrebbe aumentare l'espressione dei β_2 (Horn et al., 2002).

Come nell'uomo, anche sui linfociti di cavallo è espressa una quasi del tutto omogenea popolazione di recettori β_2 e questo può essere

considerata un'utile risorsa per studiare la regolazione di questi recettori di membrana in condizioni fisiologiche di benessere, stressanti o patologiche (Abraham et al., 2001; Abraham et al 2002).

Nell'uomo è stato dimostrato che se i recettori subiscono una prolungata stimolazione da parte delle catecolamine o di agonisti sintetici, manifestano refrattarietà e down regulation con diminuzione del loro numero.

Tecniche di binding hanno permesso di mappare i recettori adrenergici dell' organismo, in questo modo si conoscono le sedi di localizzazione di ogni sottotipo recettoriale:

- alfa 1 muscolatura liscia vasale
 - muscolo dilatatore della pupilla
 - muscoli erettori dei peli
 - alcune fibre cardiache dell' atrio
 - uretere
 - sfintere vescicale interno
 - ghiandole sudoripare apocrine
 - neuroni del SNC
 - bronchi e bronchioli

- alfa 2 soma dei neuroni noradrenergici
 - membrane presinaptiche simpatiche e parasimpatiche
 - piastrine
 - linfociti
 - muscolatura liscia intestinale
 - adipociti

beta 1 cellule del miocardio specifico ed aspecifico atriali e ventricolari
 linfociti
 adipociti

beta 2 membrane presinaptiche dei muscoli scheletrici e del distretto splancnico
 linfociti
 cellule muscolari lisce vasali, bronchiali, uterine, intestinali
 cellule beta pancreatiche

beta 3 depositi di grasso
 adipociti

Il seguente schema, tratto da “Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia” II edizione UTET di Aguggini, Beghelli, Giulio, riporta gli effetti della stimolazione del sistema nervoso simpatico e i tipi di recettori coinvolti:

Effettore viscerale	Recettore	Risposta
<i>Occhio</i>		
Iride	α	Midriasi
Muscolo ciliare	β	Rilasciamento
<i>Cuore</i>		
Frequenza	β	Accelerazione
Gittata	β	Aumento
Ritmo	β	Tachicardia
<i>Vasi sanguigni</i>		
Coronarie	α_1	costrizione
	β_2	dilatazione

Cute e mucose	α	costrizione
Muscoli scheletrici	α e β	dilatazione;costrizione
Cervello	α	costrizione
Polmoni	α	costrizione
Visceri addominali	α e β	costrizione,dilatazione
<i>Polmoni</i>		
Muscoli bronchiali	β	rilasciamento
<i>Stomaco e intestino</i>		
Motilità e tono Sfinteri	β	diminuzione
	α	contrazione
<i>Fegato</i>	α_1 e β_2	glicogenolisi
<i>Pancreas</i>		
Acini	α	inibizione
Isolotti	α	inibizione secr. insulina
	β_2	secr. insulina
<i>Vescica urinaria</i>		
Detrusore	β	rilasciamento
Trigono e sfintere interno	α	contrazione
<i>Cute</i>		
Muscoli erettori dei peli	α	contrazione
Ghiandole sudoripare	α	secrezione modicalocalizzata
<i>Capsula lienale</i>	α	Contrazione
<i>Ghiandole salivari</i>		
Sottomascellare e sottolinguale	α	secreto denso
<i>Tessuto adiposo</i>	β_1	Lipolisi
<i>Cellule iuxta-glomerulari</i>	β	sintesi di renina
<i>Pineale</i>	β	sintesi di melatonina

2.5 CATECOLAMINE ED ESERCIZIO FISICO

L'esercizio fisico costituisce una condizione stressante per l'organismo e come tale è in grado di determinare un'imponente liberazione di catecolamine attraverso l'attivazione del sistema nervoso simpatico.

Sono stati eseguiti diversi studi che riguardano la cinetica delle catecolamine e l'effetto sui recettori in soggetti sottoposti ad esercizio fisico, sia in umana che in medicina veterinaria e i risultati ottenuti sono risultati a volte non concordi.

Per quanto attiene all'uomo sono stati ottenuti risultati differenti, che mostrano cioè up o down regulation recettoriale, in base alla durata e all'intensità d'esercizio al quale il soggetto viene sottoposto e allo stato di fitness del soggetto stesso (Butler et al., 1982; Graafsma et al., 1990; Jost et al., 1990; Fry et al., 2006).

In realtà, nonostante questo tipo di studio dia informazioni riguardo intensità e durata dell'allenamento, non è stato ancora del tutto chiarito l'impatto che i diversi tipi d'esercizio hanno su funzione e regolazione dei recettori adrenergici.

Jost et al. nel 1990 hanno condotto un studio in umana che paragonava la risposta delle catecolamine e rispettivi recettori in corso d'esercizio di endurance con quella rilevata in corso di esercizio breve ad alta intensità.

Hanno riscontrato che l'attività di endurance, caratterizzata dal percorso di lunghe distanze a bassa intensità di sforzo e con maggiore consumo aerobio d'energia, è accompagnata da una riduzione dell'attività simpatica con diminuzione della concentrazione di catecolamine plasmatiche e down regulation dei recettori β_2 presenti sui linfociti di soggetti allenati.

Nell'esercizio intenso invece in cui predomina un metabolismo di tipo anaerobio, si osserva un'imponente attivazione del sistema simpato-adrenergico con massiva liberazione di catecolamine circolanti e up-regulation recettoriale.

E' stata inoltre riscontrata una differenza nel rapporto NA/A che nell'endurance risulta molto più basso rispetto a quanto si verifica nell'esercizio intenso.

E' stato quindi ipotizzato che le funzioni noradrenergiche e adrenergiche dell'attività simpatica possono rispettivamente essere responsabili per una regolazione inversa della funzione dei recettori adrenergici in corso di differenti tipi di allenamento.

La più forte stimolazione adrenergica in corso di endurance potrebbe essere responsabile della diminuzione della densità dei β -recettori, come se si verificasse una down-regulation causata da livelli costantemente alti di adrenalina.

Questo darebbe anche spiegazione del perché durante l'esercizio fisico intenso le più basse concentrazioni di A determinerebbero una up-regulation recettoriale.

Studi più recenti hanno mostrato una diminuzione della concentrazione di NA, mentre quella di A rimarrebbe abbastanza costante (Chwalbinska 2005).

La correlazione esistente tra il grado di forma fisica e la densità recettoriale è stata osservata anche da altri autori secondo i quali l'allenamento determinerebbe una diminuzione della sensibilità alle catecolamine in seguito alla down-regulation recettoriale e con l'aumento del livello di fitness si avrebbe riduzione della densità dei β -recettori linfocitari (Butler et al., 1982).

Già Butler et al. nel 1982 sostennero la tesi secondo la quale l'esercizio, in ogni condizione sia eseguito, determina un'importante

attivazione simpato-adrenergica e l'allenamento, caratterizzato da costanti alti livelli di catecolamine, risulta in una diminuzione della sensibilità linfocitaria alla stimolazione delle amine simpaticomimetiche collegata alla diminuzione della densità dei recettori di membrana.

Si tratterebbe di una sorta di meccanismo difensivo che l'organismo mette in campo per difendersi dalla cronica stimolazione esercitata dal sistema nervoso simpatico (Butler et al., 1982).

Graafsma et al. nel 1990 dimostrarono che anche un esercizio submassimale se eseguito da soggetti non allenati ha come conseguenza un aumento nella concentrazione dei recettori β_2 sui linfociti di circa il 56%.

Anche carichi d'esercizio d'eccessiva intensità o durata hanno effetti importanti sull'attività simpato-adrenergica e la conseguente concentrazione plasmatica di catecolamine.

Fry et al. nel 2006 hanno definito infatti le caratteristiche neuroendocrine della sindrome da eccesso di allenamento o overtraining individuandone 2 fasi consequenziali: la prima mostra un aumento acuto della concentrazione plasmatica di catecolamine con down-regulation dei recettori β_2 del muscolo scheletrico ma nel caso di un overtraining prolungato sopraggiunge una seconda fase di attenuazione dell'attività simpatica per diminuita sensibilità recettoriale con conseguente abbassamento dei livelli plasmatici di amine simpaticomimetiche; il tutto è causa di poor performance (Fry et al., 2006).

Anche per la specie equina sono stati fatti studi riguardanti la regolazione simpato-adrenergica in corso d'esercizio fisico ed è stata riscontrata come per l'uomo una elevata concentrazione di

catecolamine plasmatiche (Peronnet, 1981; Leuenberger, 1993; Silverman 1996; Gullestad, 1997; Greiwe, 1999).

Nel cavallo l'aumento nella concentrazione di questi ormoni in soggetti sottoposti ad esercizio fisico, segue un andamento esponenziale e raggiunge il picco quando il cavallo incorre nella fatica (Kurosawa et al. 1998) raggiungendo livelli molto più elevati rispetto all'uomo (Snow et al. 1992; Colahan et al. 2006).

Sembra che questo effetto sia dovuto alla componente medullo-adrenergica dell'attivazione del sistema simpato-adrenergico che sembra essere maggiore nel cavallo rispetto all'uomo giocando un ruolo fondamentale nel mediare le risposte cardiovascolari e metaboliche all'esercizio che contribuiscono alla superiorità atletica del cavallo (Kurosawa et al. 1998).

Tutti gli studi che hanno trattato di questo aspetto della medicina sportiva, hanno quindi fatto una valutazione dell'attività simpatica in modo indiretto, cioè mediante dosaggio delle concentrazioni plasmatiche di adrenalina e noradrenalina, incontrando molte difficoltà per arrivare a questo scopo.

Sono in realtà infatti ancora pochi gli studi riguardanti la cinetica delle catecolamine in corso di esercizio fisico (Martinez et al., 1988; Freeston et al., 1991; Snow et al., 1992; Gandini, 1995; Gonzalez et al., 1998; Kurosawa et al., 1998; Jimenez et al., 1998; Nagata et al., 1999).

Questo è dovuto alla rapidità con cui si verificano aumento o diminuzione della concentrazione di A e NA nel circolo ematico ed al loro breve tempo di emivita che è circa 30-60 secondi nel cavallo, mentre nell'uomo varia da 2 a 3 minuti (Snow et al., 1992).

Gli aspetti importanti da considerare in questo tipo di ricerca, anche per il cavallo come per l'uomo, riguardano le caratteristiche dell'esercizio eseguito, in termini di intensità e durata, che risultano

fondamentali per fare una stima della grandezza della risposta catecolaminergica.

Per esempio, in cavalli sottoposti ad esercizi incrementali, è stata riscontrata una concentrazione di catecolamine molto più alta negli steps che richiedevano uno sforzo sovramassimale confermando la tesi proposta da Snow nel 1992 (Gandini et al., 1995).

Jimenez et al. hanno dato ulteriore conferma della relazione esistente tra l'intensità del lavoro e la concentrazione plasmatica di catecolamine nel 1998.

Lo studio eseguito da Jimenez ha messo in luce questa relazione, stimando l'intensità dell'esercizio espressa in termini di VO_{2max} , e ne ha dato rappresentazione con la seguente formula, per l'adrenalina:

$$\log_{10}([A]) = - 1.4 + 0.0199[\% VO_{2max}]$$

e la relazione tra la concentrazione plasmatica di catecolamine e la corrispondente intensità di lavoro può essere descritta con la formula per la noradrenalina:

$$\log_{10}([NA]) = - 0.580 + 0.0158[\% VO_{2max}]$$

La presenza del logaritmo nella formula indica la relazione di tipo esponenziale.

Il marcato incremento nella concentrazione plasmatica di catecolamine che si verifica quando l'intensità dello sforzo raggiunge valori fra l'80% e il 90% del VO_{2max} (Jimenez et al., 1998) è simile a

quello osservato nell'uomo (Lehmann et al., 1981; Kraemer et al., 1990).

Nell' uomo è stata però riscontrata una concentrazione di A tra il 25% e il 50% di quella di NA anche dopo una singola sessione d'allenamento, ed è stato ipotizzato che ciò sia dovuto ad una maggior liberazione di NA da parte delle terminazioni nervose delle fibre postsinaptiche del sistema nervoso simpatico (Lehmann et al., 1981,1983,1985).

Nel cavallo sembra che la concentrazione di adrenalina raggiunga valori più elevati rispetto alla NA (Snow et al., 1992; Jimenez et al., 1998) di conseguenza il rapporto $[NA]/[A]$ diminuisce durante l'esercizio.

Questo rifletterebbe un maggior contributo fornito dalla midollare del surrene all'increzione di catecolamine plasmatiche in relazione all'intensità dell'esercizio, che non si riscontra nell'uomo, ma è simile a quanto avviene nel cane (Snow et al. 1992; Gandini et al. 1995; Jimenez et al., 1998).

Studi più recenti hanno però mostrato nell'uomo, da prelievi fatti durante attività di endurance della durata di 45 minuti al 70% del VO_{2max} eseguita dopo 3 settimane di allenamento, una diminuzione della concentrazione di NA, mentre quella di A rimarrebbe abbastanza costante (Chwalbinska 2005).

Tuttavia questo aspetto non è stato ancora del tutto chiarito, infatti altri studi riportano una concentrazione di NA durante e dopo l'esercizio nel cavallo più elevata rispetto a quella di A esattamente come avviene nella maggior parte degli studi eseguiti sull'uomo (Martinez et al. 1988).

Non si conosce ancora la causa di queste differenze, tuttavia si può ipotizzare risieda in differenze legate alla razza di cavalli utilizzata

per lo studio, al protocollo di esercizio, alle condizioni in cui viene eseguito, al prelievo e all'analisi dei campioni ematici.

Da sottolineare che proprio la difficoltà nell'eseguire un dosaggio accurato delle catecolamine a causa della loro breve emivita, è stata spesso indicata come la causa di risultati contrastanti.

I primi studi di Martinez et al. del 1988, riscontrarono un aumento di 6-7 volte rispetto al valore basale, di A e NA, ricavate però da un dosaggio effettuato su un singolo campione di sangue prelevato con prelievo manuale dalla vena giugulare 5 minuti dopo la fine dell'esercizio.

Gli studi successivi hanno sottolineato l'importanza di effettuare prelievi utilizzando cateteri endovenosi, durante lo svolgimento dell'esercizio fisico (Gonzalez et al. 1998; Snow et al., 1992), che eliminassero la componente stressogena dovuta alle singole manualità ripetute già ipotizzata da Persson nel 1967 e permettessero l'esecuzione di dosaggi ad intervalli di pochi secondi l'uno dall'altro.

Questo ha permesso di osservare una tendenza all'incremento esponenziale di A e NA all'aumentare dell'intensità dello sforzo. Tuttavia si trattava ancora di un metodo di prelievo manuale.

Snow et al. nel 1992 hanno riscontrato un aumento rispetto ai valori basali, di 148 volte per l'adrenalina e 67 volte per la noradrenalina.

Tuttavia la prima certa conferma di accumulo esponenziale statisticamente provato fu fornita da Kurosawa et al. nel 1998.

La cinetica particolarmente rapida di queste molecole, tuttavia, potrebbe rendere insufficienti anche prelievi eseguiti a distanza di tempo di 30 secondi l'uno dall'altro.

La tecnica utilizzata dagli autori sopra citati risulta comunque non standardizzabile ne' riproducibile in quanto influenzata ancora dalle manualità dell'operatore.

Da ciò è derivata l' esigenza di mettere a punto un sistema di prelievo automatizzato di campioni di sangue in continuo nel corso dello svolgimento dell'esercizio fisico su treadmill (Baragli et al., 2001), già applicato all' uomo (Martin et al. 1993) e ad altre specie animali (Sir-Peterman et al., 1995).

2.6 CATECOLAMINE E SISTEMA IMMUNITARIO

La presenza di recettori adrenergici su cellule del sistema immunitario ha portato a considerare l' ipotesi che queste cellule possano costituire un target del segnale catecolinergico e studi di medicina umana già riportati, hanno affrontato questo tema.

Dal punto di vista immunologico l'importanza della presenza di recettori adrenergici su cellule deputate alla difesa dell'organismo e di come questa difesa possa essere modulata attraverso le variazioni delle concentrazioni di catecolamine, è di enorme interesse sia in campo umano dove questo aspetto è stato già affrontato, che in campo veterinario.

Il sistema immunitario si avvale di 2 diversi meccanismi d'azione: l'uno aspecifico o naturale, sostenuto dalle cellule preesistenti nell'organismo, l'altro specifico o acquisito indotto dal contatto con un agente patogeno.

L'immunità specifica può a sua volta essere suddivisa in immunità umorale mediata da anticorpi prodotti dai linfociti B attivati

(plasmacellule), ed immunità cellulomediata, mediata dai linfociti T che interviene nel caso di microrganismi patogeni intracellulari.

I linfociti T sono così chiamati perché sviluppano nel timo da cui escono 2 tipi di linfociti: CD8+ e CD4+ definiti anche T helper (Th), distinti nei sottotipi Th1 e Th2, o T citotossici.

I linfociti T riconoscono gli antigeni che vengono presentati già processati da altre fondamentali cellule del sistema immunitario chiamate Antigen Presenting Cells (APC) come per esempio i macrofagi o le cellule dendritiche.

L'attività dei Th1 consiste nell'eliminare il patogeno intracellulare e la reazione infiammatoria che aveva causato, mentre i Th2 agiscono stimolando la risposta umorale e sono coinvolti nelle reazioni di tipo allergico o nelle malattie parassitarie.

Queste 2 classi linfocitarie si influenzano vicendevolmente e il bilancio corretto tra le due determinerà l'appropriata risposta immunitaria all'antigene.

I macrofagi per richiamare i linfociti Th1, in risposta ad un patogeno, producono interleuchina-12 (IL-12), una citochina che induce la differenziazione e la proliferazione dei Th1 e la produzione di altre citochine fondamentali per l'eliminazione del patogeno.

Le catecolamine intervengono in questo processo in quanto sono in grado di determinare una deviazione immunitaria Th2 e una down-regulation della risposta infiammatoria.

I recettori adrenergici β_2 presenti sui linfociti, quando stimolati da sostanze simpaticomimetiche, determinano una diminuzione della produzione di IL-12 e della differenziazione e maturazione dei Th1.

Inoltre i recettori β_2 sono presenti sui Th1 e sui macrofagi, ma non sui Th2.

Questo dimostra che la regolazione di immunosensibilizzazione esercitata dalle catecolamine in condizioni di stress si esplica attraverso i recettori β_2 , di cui risulta quindi fondamentale studiare la reazione di up- o down- regulation legata all'esercizio fisico.

L'attività atletica potrebbe infatti modulare la risposta immunitaria attraverso la comunicazione tra il sistema neuroendocrino e le sue amine, e il sistema immunitario; questo rende l'esercizio un modello di studio di questa interazione in soggetti sottoposti a stress (Itoh et al., 2004).

E' stato già riportato nell'uomo che l'esercizio di moderata intensità stimola la funzione immunitaria determinando una down-regulation recettoriale, mentre un esercizio intenso deprime il sistema immunitario (Altman et al., 1991).

Itoh et al. nel 2004 hanno indagato lo stesso aspetto sul topo ed hanno confermato le considerazioni fatte sull'uomo riscontrando una diminuzione dei livelli di recettori β_2 nelle cellule della linea monocito-macrofagica in seguito ad un allenamento di 3 settimane, caratterizzato da esercizio di moderata intensità che sembra essere dovuto ad un adattamento alle elevate concentrazioni di catecolamine che si verificavano durante ogni sessione d'esercizio (Itoh et al., 2004).

La down regulation dei recettori β_2 presenti su macrofagi di topo, si riflette in un diminuzione dell'effetto soppressivo delle catecolamine sulla produzione di interleuchine (IL-12) che risulta in una up-regulation della risposta dei linfociti T helper classe 1 (Th1) e questo ha un importante effetto immunologico che potrebbe essere approfondito per valutare la gestione terapeutica di infezioni o disordini mediati dai Th2.

Sui linfociti di cavallo è espressa una popolazione del tutto eterogenea di recettori beta (Badino et al., 2005).

La sottofamiglia β_2 costituisce circa il 90% di questa popolazione recettoriale, mentre il restante 10% sembra essere costituito da β_1 (Abraham et al., 2001).

Per quanto riguarda il cavallo, gli studi eseguiti negli ultimi anni, si sono concentrati sulla caratterizzazione dei recettori adrenergici presenti sulle cellule del sistema immunitario ed hanno solamente dato indicazione della possibilità di valutare la reazione di questi siti all'attivazione del sistema simpato-adrenergico durante esercizio fisico e il suo possibile effetto immunomodulatore (Kurosawa et al., 1998; Abraham et al., 2001; Badino et al., 2004).

PARTE II: parte speciale

1.0 SCOPO DELLA RICERCA

1.1 PRIMO ESPERIMENTO

Il primo esperimento aveva l'obiettivo di misurare la cinetica delle catecolamine durante esercizio standardizzato submassimale al treadmill da eseguire in cavalli non allenati e da ripetere a seguito di un mese di allenamento, in modo da valutare l'effetto dell'allenamento sulle concentrazioni plasmatiche delle catecolamine.

E' riconosciuto il ruolo giocato da queste molecole nella modulazione della risposta all'esercizio ma non è stato facile negli anni studiare la loro cinetica a causa della loro breve emivita.

Studiare le catecolamine significa valutare come e con quale intensità agisce il sistema nervoso simpatico in corso d'esercizio fisico.

E' stato infatti dimostrato come le catecolamine, quali "ormoni dello stress", aumentino in condizioni stressanti (Pacak e Palkovits, 2001), e l'esercizio fisico può rappresentare uno stress fisiologico.

Tuttavia non è ancora stata del tutto chiarita la loro cinetica nel cavallo in corso di esercizio e soprattutto sono presenti in letteratura risultati contrastanti riguardo la cinetica del rapporto NA/A.

L'esperimento aveva lo scopo di valutare anche questo aspetto.

Molti degli aggiustamenti in corso d'esercizio sono regolati dalla risposta simpato-adrenergica all'esercizio, e molte risposte ormonali risultano influenzate dall'allenamento (Kramer and Ratamess, 2003).

Conoscere la cinetica delle catecolamine nel cavallo in corso d'esercizio è importante per indagare i meccanismi fisiologici come la sudorazione, la redistribuzione del flusso sanguigno, l'uso dei substrati energetici (McKeever and Hinchcliff, 1995) ed altro.

Come già ricordato, la scarsa letteratura che tratta dello studio delle catecolamine plasmatiche è dovuta alla difficoltà conseguente alla breve emivita di queste molecole oltre alle rapide modificazioni della loro concentrazione in corso d'esercizio.

Una delle maggiori difficoltà è l'esecuzione dei prelievi, e quindi la realizzazione di un sistema che fosse in grado di prelevare campioni di sangue in continuo mentre l'animale esegue l'esercizio su treadmill, a breve distanza di tempo gli uni dagli altri e in modo standardizzato e fedelmente riproducibile.

Allo scopo è stato utilizzato il metodo di prelievo in continuo adattato al cavallo e realizzato da Baragli et al., nel 2001.

I cavalli utilizzati per lo studio sono stati sottoposti ad un prelievo precedente un periodo di allenamento di un mese a termine del quale è stata eseguita una seconda serie di prelievi.

Gli effetti dell'allenamento sono stati monitorati misurando nelle prove standardizzate prima e dopo l'allenamento i valori della V4 (velocità della corsa alla quale corrispondono concentrazioni ematiche di lattato pari a 4 mmol/l; viene definita "soglia anaerobica") e della V200 (velocità della corsa alla quale corrisponde una frequenza cardiaca di 200 battiti/minuto).

1.2 SECONDO ESPERIMENTO:

Nel primo esperimento i cavalli erano stati sottoposti ad un esercizio fisico la cui intensità era misurata sulla base della V_{200} e quindi in termini di FC e velocità, tuttavia, come in precedenza è stato affermato, il parametro più accurato per fare una corretta valutazione dell'intensità dello sforzo fisico è la valutazione del consumo di ossigeno in termini di % del VO_{2max} .

Nel presente studio è stata utilizzata la maschera spirometrica per la valutazione dei gas respiratori e la misurazione del VO_{2max} di 4 cavalli che hanno eseguito un esercizio incrementale al treadmill.

Durante l'esecuzione dell'esercizio è stato utilizzato in contemporanea un cardiofrequenzimetro per la rilevazione della frequenza cardiaca.

Lo scopo del presente esperimento è stato quello di avvalorare i risultati ottenuti nello studio precedente basato sulla valutazione dell'intensità dello sforzo mediante la V_{200} , attraverso la correlazione fra la VO_2 registrata con lo spirometro e la corrispondente frequenza cardiaca.

1.3 TERZO ESPERIMENTO:

In questa parte della ricerca sono state studiate le modificazioni della concentrazione delle catecolamine in corso di esercizio fisico al treadmill e le ripercussioni che la cinetica di queste molecole ha a livello recettoriale.

Lo scopo era valutare l'attivazione simpato-adrenergica in corso di esercizio fisico e le modificazioni che si verificano a carico dei recettori beta presenti sui linfociti. In letteratura questo tipo di studio è stato affrontato nell'uomo da diversi autori (Butler et al., 1982; Graafsma et al., 1990; Jost et al., 1990; Fry et al., 2006) ma i risultati ottenuti riguardo le modificazioni della densità recettoriale alla cinetica delle catecolamine in corso di esercizio fisico, sono contrastanti.

Ad oggi nel cavallo questo aspetto non è ancora stato studiato.

Le modificazioni dell'espressione di recettori adrenergici sulle cellule del sistema immunitario, alle differenti concentrazioni di catecolamine plasmatiche, potrebbero essere poi studiate per valutare la possibilità che l'esercizio moduli l'attività del sistema immunitario, come è stato studiato per l'uomo (Itoh et al., 2004; Altman et al., 1991).

2.0 MATERIALI E METODI

2.1 PRIMO ESPERIMENTO

2.1.1 Animali

Sono stati utilizzati 4 trottatori castroni di età compresa fra 8-11 anni, in buona salute e già abituati all'esercizio su treadmill.

Per i 2 mesi antecedenti l'inizio dello studio sono stati stabulati in box (4x4 m) e trasferiti quotidianamente in paddock dove rimanevano per un'ora, in modo che si trovassero allo stesso livello d'allenamento.

2.1.2 Prelievo in continuo

Prelevare sangue in continuo, mentre il cavallo esegue un esercizio su treadmill, è fondamentale per lo studio di molecole endogene che cambiano molto rapidamente la loro concentrazione nel sangue come per esempio ormoni o prodotti del metabolismo o altri parametri ematologici, e che possono fornire informazioni importanti delle modificazioni fisiologiche che si verificano in corso di attività fisica.

Un esempio di queste molecole sono le catecolamine che hanno emivita brevissima e per le quali il prelievo post-esercizio fornirebbe una sottostima.

Il sistema di prelievo dovrebbe permettere di prelevare campioni di sangue dal cavallo a determinati intervalli di tempo durante l'esercizio su treadmill, oltre alla possibilità di eseguire prelievi ante e

post esercizio evitando lo stress di punture singole ed eventuali reazioni nel sito di prelievo.

Nel caso di singoli prelievi, risulterebbe inoltre necessario interrompere l'esecuzione dell'esercizio con conseguenze importanti sulle concentrazioni delle molecole endogene portando ad errate valutazioni sulla base dei dati ottenuti.

In letteratura sono stati proposti ed utilizzati 2 diversi metodi di prelievo di sangue in corso di attività fisica:

1. metodo del campionamento multiplo
2. metodo del prelievo continuo di sangue

Il metodo del campionamento multiplo si basa sul prelievo rapido di campioni consecutivi utilizzando un catetere ed una linea di collegamento. Con questo metodo l'intensità del flusso di sangue che scorre attraverso il catetere e la linea di connessione dipende dall'operatore (Mori et al., 1979).

Questa tecnica è stata utilizzata in studi di fisiologia nell'uomo (Hughson et al., 1995), in altre specie (Peronnet et al., 1988) e nel cavallo in esercizio su treadmill (Persson, 1967; Harris and Snow, 1992; Snow et al., 1992; Kurosawa et al., 1998) o in campo (Alexander et al., 1991).

Questa è tuttavia una tecnica di prelievo inadeguata, in quanto influenzata dall'abilità manuale dell'operatore e ciò costituisce un limite alla riproducibilità del test.

Il metodo di prelievo in continuo prevede che il flusso di sangue che esce dall'animale sia regolato da una pompa e raccolto da un

collettore automatico di frazioni (McKendry, 1968; Kowarski et al., 1971; Koninckx et al., 1974; Sir-Petermann et al., 1995).

Huang et al. nel 1991, paragonando i due metodi ha dimostrato che in entrambi si verifica un mescolamento di sangue all'interno del catetere e della linea di connessione durante l'aspirazione, dovuto alle caratteristiche del flusso ematico (turbolento o laminare).

E' stato poi dimostrato che, nel caso in cui il rapporto tra il flusso di sangue espresso in ml/min e il volume dello spazio morto espresso in ml, sia uguale o maggiore di 1, il mescolamento di sangue che si verifica risulta da un flusso laminare perciò causa errori trascurabili (Berthoud et al., 1986).

Il sistema di prelievo in continuo utilizzato nell'uomo, è stato adattato al cavallo (Baragli et al., 2001), ed è il metodo utilizzato nel presente studio.

E' un sistema che permette di prelevare campioni di sangue durante l'esecuzione di un esercizio fisico in modo automatico, attendibile, standardizzabile e riproducibile.

Il tutto è permesso dalla applicazione di un catetere, all' interno della vena giugulare, collegato ad una pompa peristaltica attraverso una linea di connessione.

Il flusso di sangue attraverso la linea e la velocità del collettore di frazioni possono essere regolati indipendentemente in modo da poter ottenere la più appropriata combinazione tra il volume di sangue prelevato in continuo nell' unità di tempo e gli intervalli di tempo tra il prelievo di un campione e quello successivo (Baragli et al. 2001).

Questo permette di ottenere campioni di sangue con caratteristiche di volume e tempo di raccolta molto precise.

Ogni campione di sangue prelevato corrisponde inoltre ad un preciso istante dello svolgimento dell'esercizio e questo è un aspetto

estremamente rilevante quando si sottopone un cavallo ad un esercizio incrementale in quanto è possibile far corrispondere ad ogni variazione dell'intensità dello sforzo, una precisa modificazione dei valori endogeni oggetto di ricerca.

Con questo metodo inoltre si riduce il numero di operatori necessari.

Nel presente studio, il sistema è stato tarato per ottenere campioni ogni 15 secondi, prelevati durante i 2 minuti d'esercizio in cui la frequenza cardiaca è 200 bpm.

E' stato inoltre stabilito il rapporto ideale fra la quantità di flusso e il volume dello spazio morto in modo che fosse superiore ad 1.0 utilizzando un flusso di 12 ml/min con lo scopo di evitare che si verificasse emolisi (Berthoud et al., 1986).

Utilizzando un flusso di 12 ml/min è stato possibile ottenere un tempo di rimpimento della linea di 24.9 ± 0.6 sec che è ideale per lo studio di molecole a breve emivita come le catecolamine.

La linea ematica utilizzata per il prelievo in continuo è stata lavata con soluzione fisiologica prima dell'uso in modo da eliminare eventuali residui della sterilizzazione.

Per ogni cavallo sottoposto al test è stata utilizzata una linea ematica nuova.

Ogni campione di sangue raccolto, grazie alla procedura standardizzata ed al preciso intervallo di tempo esistente fra la fuoriuscita del sangue dal catetere e la raccolta del campione, ha permesso di risalire ad un preciso istante dell'esecuzione dell'esercizio.

2.1.2.1 APPLICAZIONE DEI CATETERI PER IL PRELIEVO IN CONTINUO

Il giorno antecedente l'esecuzione della prova, a tutti i cavalli sono stati inseriti i cateteri endovenosi, (modello GSK-815 della ditta svedese Gambro), all'interno della vena giugulare sinistra per il prelievo in continuo secondo le seguenti manualità:

- i cavalli sono stati sedati con somministrazione ev di Acepromazina;
- è stata eseguita tricotomia della zona scelta per l'inserimento dei cateteri per circa 5x5 cm lungo la doccia giugulare sinistra del cavallo;
- è stata eseguita anestesia locale con iniezione sottocutanea di lidocaina al 2% a formare pomfi a lento rilascio intorno alla sede di inserimento del catetere;
- è stata fatta una piccola incisione della cute utilizzando una lama da bisturi n° 20; è stato quindi scollato il sottocute;
- è stato inserita nella vena giugulare sinistra la guida in plastica del catetere all'interno della quale è stato fatto scorrere il mandrino d'acciaio;
- la guida è stata estratta ed è stato inserito il catetere all'interno del mandrino che contemporaneamente veniva lentamente estratto;
- il catetere è stato fissato alla cute con tre punti in filo non riassorbibile 1;

- è stato eseguito un flushing di fisiologica, 10 cc di fenilbutazone e una soluzione di fisiologica ed eparina (20cc fisiologica e 0,5 cc di eparina);
- è stata fatta disinfezione locale con Fatroximin Spray e fasciatura con vetrap.

2.1.3 Treadmill

Il treadmill, o tappeto ruotante, (tapis roulant) è costituito da un sistema di rulli posto sotto un tappeto in gomma che può essere regolato a diverse velocità e gradi di pendenza.

Il primo treadmill fu utilizzato da Persson negli anni '60 e messo a punto per effettuare lavori leggeri di passo e trotto.

Già nei primi anni in cui venne utilizzato, il treadmill dimostrò la propria utilità nello studio della fisiologia dell'esercizio fisico in quanto permetteva di fare misurazioni accurate degli scambi respiratori e delle modificazioni di richiesta e captazione di ossigeno durante l'allenamento consentendo di riscontrare relazioni tra la variazione della richiesta di ossigeno e l'intensità del lavoro (Persson 1967).

Fu da subito usato come "performance test" nel cavallo sottoposto a protocolli di esercizio standardizzati e monitoraggio di frequenza cardiaca, soglia del lattato, VO_2 ed ematocrito.

Gli studi più recenti e contemporanei, effettuati su cavalli in esercizio su treadmill a differenti intensità d'esercizio sostenute per tempi più o meno prolungati, hanno permesso di creare un quadro più completo delle risposte fisiologiche dell'organismo esaminando le

reazioni degli apparati cardiovascolare e respiratorio, le modificazioni ormonali, metaboliche ed ematologiche, la termoregolazione.

Ciò che manca nell'uso del treadmill sono la presenza del fantino, l'impatto col terreno, l'attrito con l'aria; tuttavia permette di eliminare i fattori di disturbo e distrazione ambientali legati ad un allenamento in campo, oltre all'esecuzione di esercizi fedelmente riproducibili in quanto standardizzabili sulla base di molte variabili come la temperatura, l'umidità relativa, la V_{200} , la V_4 oppure il VO_{2max} .

Per ovviare alle carenze di un allenamento su treadmill sono stati presi degli accorgimenti che simulassero nel miglior modo possibile, le condizioni di un allenamento in pista, come la pendenza del tappeto per mimare l'attrito col terreno, l'attrito con l'aria simulato dalla presenza di un ventilatore di fronte al T, e le diverse velocità del tappeto per muovere il cavallo a tutte le andature.

E' fondamentale un periodo di acclimatemento del cavallo al treadmill onde evitare che le misurazioni effettuate in corso d'esercizio siano compromesse da fattori quali eccitazione o paura.

Secondo quanto riportato da R.J. Rose e D.R. Hodgson nel 1994, sono sufficienti 4 corse sul treadmill perché il cavallo si abitui e per ottenere così risultati riproducibili. Hanno previsto anche un protocollo di acclimatemento che consiste per il cavallo, in un primo momento in un contatto visivo e uditivo del treadmill e successivamente un esercizio da eseguire 2 volte al dì per 2 giorni consecutivi, così organizzato:

4 min a 1,5-2 m/s (passo)

3 min a 4 m/s (trotto)

2 min a 6 m/s (canter)

1 min a 8 m/s (galoppo)

E' stato dimostrato che solo l'1-2% dei cavalli mostrano una iniziale riluttanza all'esercizio che scompare generalmente con l'abitudine.

I treadmill moderni sono progettati per raggiungere velocità di almeno 14 m/s con rapide accelerazioni e pendenze del 10%, capacità che caratterizzano un buon treadmill e che risultano indispensabili per raggiungere il plateau del VO_{2max} (Rose et al., 1990).

Sono presenti sul mercato due principali compagnie produttrici di treadmill: una compagnia svizzera che produce treadmill modello Mustang, e una compagnia svedese che produce il modello T. Sätö.

Il modello utilizzato per il presente studio è un modello T. Sätö che possiede tutte le caratteristiche di un buon treadmill.

L'uso di questo strumento è stato fondamentale per il presente studio.

Per valutare la cinetica delle catecolamine in corso d'esercizio fisico è fondamentale che non vi siano variabili che potrebbero in qualche modo influenzarla, quali le condizioni esterne (Gandini et al., 1995).

2.1.4 Protocollo esercizio

I cavalli non allenati hanno eseguito un protocollo d'esercizio su treadmill (modello Sato II, Stockholm, Sweden), così impostato:

4,5 min a 1,8 m/s

2 min a 3.5 m/s

2 min a 5.5 m/s

2 min a frequenza cardiaca costante di 200 bpm

La frequenza cardiaca è stata monitorata costantemente mediante l'uso di un cardiofrequensimetro (modello Polar Electro Oy, Kempele, Finland).

Il protocollo è stato ripetuto con le stesse modalità al termine del periodo di allenamento.

2.1.5 Protocollo allenamento

I progressi fatti con l'allenamento sono stati valutati sulla base della velocità raggiunta alla soglia anaerobica e sulle variazioni della velocità raggiunta alla frequenza cardiaca di 200 battiti al minuto.

Per valutare la V_4 è stato eseguito un primo dosaggio del lattato prima del periodo di allenamento, quindi ripetuto al termine del mese di allenamento.

E' stata monitorata anche la V_{200} in corso d'esercizio prima e dopo l'allenamento.

Il protocollo di allenamento è stato così impostato:

Protocollo	Lunedì	Martedì	Mercoledì	Giovedì	Venerdì	Sabato
1.8 m/s	500 m	500 m	500 m	500 m	500 m	500 m
7 m/s	3000 m	1000 m	3000 m	1000 m	3000 m	1000 m
1.8 m/s	500 m	500 m	500 m	500 m	500 m	500 m
8 m/s		1000 m		1000 m		1000 m
1.8 m/s		500 m		500 m		500 m
9 m/s		1000 m		1000 m		1000 m
1.8 m/s		500 m		500 m		500 m

2.1.6 Gestione dei campioni

I campioni di sangue sono stati raccolti in provette contenenti eparina immerse in acqua e ghiaccio in modo da rallentare la rapida degradazione delle catecolamine.

Al termine della fase di raccolta, tutte le provette sono state sottoposte a centrifugazione a 3000 giri per 10 minuti alla temperatura di 10°C per ottenere la separazione tra plasma e parte corpuscolata del sangue.

Il plasma così ottenuto è stato prelevato e trasferito in provette contenenti acido perclorico per la deproteinizzazione.

L'intera procedura viene effettuata in una stanza adiacente a quella del treadmill e passano solo 20 minuti dal prelievo dell'ultimo campione alla fase di estrazione delle proteine dal plasma.

Il plasma dopo la deproteinizzazione è stato conservato a - 70 °C per 2 mesi prima di essere sottoposto ad analisi (Boomsma et al. 1993).

L'estrazione e la determinazione della concentrazione delle catecolamine plasmatiche è stata eseguita utilizzando kit commerciali in sistema di cromatografia liquida ad alta pressione, HPLC (HPLC F1).

Il sistema HPLC utilizza la pompa (PU-158) e il rilevatore fluorimetrico (FP 920) che determinano eccitazione ed emissione di lunghezze d'onda rispettivamente di 285 nm e 315 nm per A e NA.

La cromatografia era realizzata su una colonna LiChroCART 250-4,6 Purospher STAR RP 18 5 µm alla temperatura di 35°C in condizioni isocratiche della fase mobile e flusso di 1 ml/min.

La sensibilità del sistema era di 0.3 nmol adrenalina/ l e 0.2 nmol noradrenalina/l con variazione tra analisi ripetute di un valore inferiore al 7% per adrenalina e 5% per noradrenalina.

2.1.7 Analisi statistiche utilizzate

Le variazioni della soglia anaerobica (V_4) e della velocità a 200 bpm (V_{200}) sono state esaminate con una analisi di varianza ANOVA, mentre per le variazioni nella concentrazione plasmatica delle catecolamine tra il primo ed il secondo esercizio, è stato utilizzato il test di Wilcoxon. (Glantz, 2002)

2.2 SECONDO ESPERIMENTO

2.2.1 Animali

Sono stati utilizzati 4 cavalli (A, B, C, D), castroni di età compresa fra gli 8 e gli 11 anni e peso medio di 475 Kg.

Tutti sono stati sottoposti ad un periodo di adattamento al treadmill durante il quale hanno potuto abituarsi all'uso della maschera spirometrica prima dell'esecuzione del test per la valutazione del VO_{2max} .

I cavalli sono stati stabulati in box (4x4m) e trasferiti in paddock di mattina, da dove venivano prelevati per essere condotti nella stanza del treadmill per l'esecuzione dell'esercizio per la valutazione del VO_{2max} .

2.2.2 Treadmill

E' stato utilizzato il treadmill dello studio precedente, modello T. Sato II, Sweden.

2.2.3 Spirometria

Ai cavalli è stata applicata la maschera spirometrica per misurare il VO_{2max} , mentre mediante cardiofrequenzimetro veniva costantemente rilevata e registrata la frequenza cardiaca.

Lo spirometro è uno strumento fondamentale per misurare la capacità atletica di un soggetto, e fu applicato per la prima volta in campo umano dal Dr. John Hutchinson per misurare ciò che noi oggi chiamiamo VO_{2max} ma che lui definiva “capacità vitale”, intendendo con questo la ricerca della limitazione al flusso respiratorio nell'uomo affetto dal vizio del fumo e in cui i polmoni avrebbero potuto esserne stati compromessi (Hutchinson 1846).

Col tempo la spirometria si è affermata come strumento diagnostico di primaria importanza per la ricerca di patologie polmonari di carattere ostruttivo o restrittivo che determinino una limitazione al flusso d'aria esalata (Wallace et al. 2006).

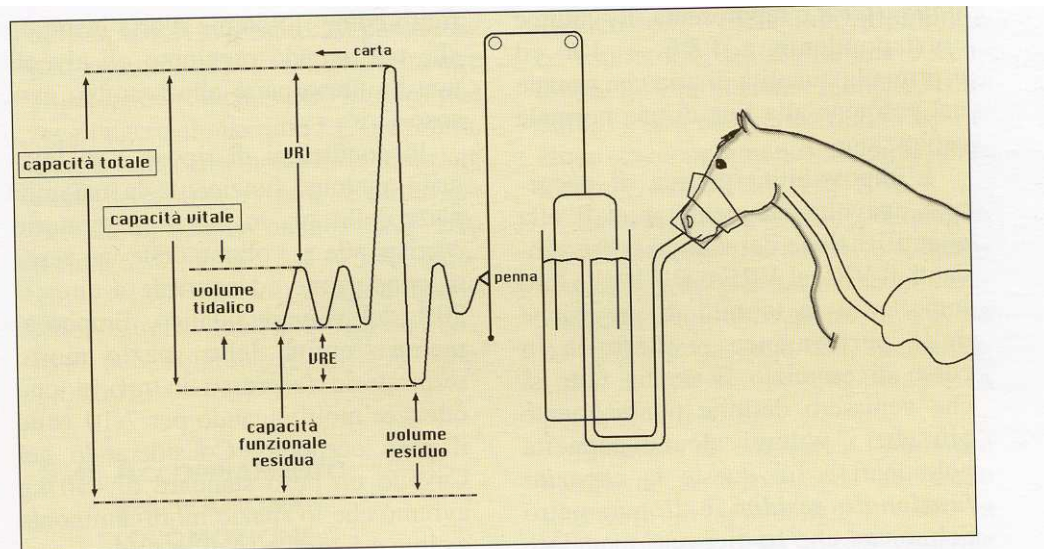


Fig. 5.3 Tracciato spirografico del Cavallo: volumi e capacità polmonari. VRE, volume di riserva espiratorio; VRI, volume di riserva inspiratorio.

(Immagine tratta da “Fisiologia dell’esercizio fisico del cavallo” edizione Edagricole 2001, Giovanni Caola)

Lo spirometro utilizzato per l’uomo è costituito da un tubo collegato ad un computer ad una estremità e terminante con una pipetta all’estremità opposta all’interno della quale il paziente compie atti respiratori caratterizzati da inalazioni ed esalazioni forzate, mentre il computer registra ed elabora i dati.



Insieme all’idea di applicare la spirometria nel cavallo si presentarono i problemi fondamentali legati al design di un oggetto a sostituzione della pipetta utilizzata nell’uomo da applicare sulle narici del cavallo.

Fu progettata quindi una maschera che non determinasse un aumento della resistenza dell'aria ne' dello spazio morto respiratorio, da applicare sul naso del cavallo e dotata di un sensore all'estremità collegato ad un computer che registra e mostra i dati rilevati.



Lavoro su treadmill

Sono oggi disponibili differenti tipi di maschere spirometriche applicabili in soggetti in esercizio sul treadmill oppure in campo (Curtis at al., 2005).

Un test spirometrico permette di misurare, calcolare e derivare le seguenti variabili:

- concentrazione di ossigeno nell'aria inspirata ed espirata, indicato in unità di volume percentuale (FIO_2 , FEO_2)
- concentrazione di anidride carbonica nell' aria inspirata ed espirata, indicata in unità di volume e in percentuale ($FICO_2$, $FECO_2$)
- ossigeno captato (VO_2 BTPS: ossigeno captato in condizioni standard di temperatura corporea e pressione atmosferica saturata con vapore acqueo; espresso in litri / minuto)
- litri / minuto di anidride carbonica captata (VCO_2 BTPS: anidride carbonica captata in condizioni standard di

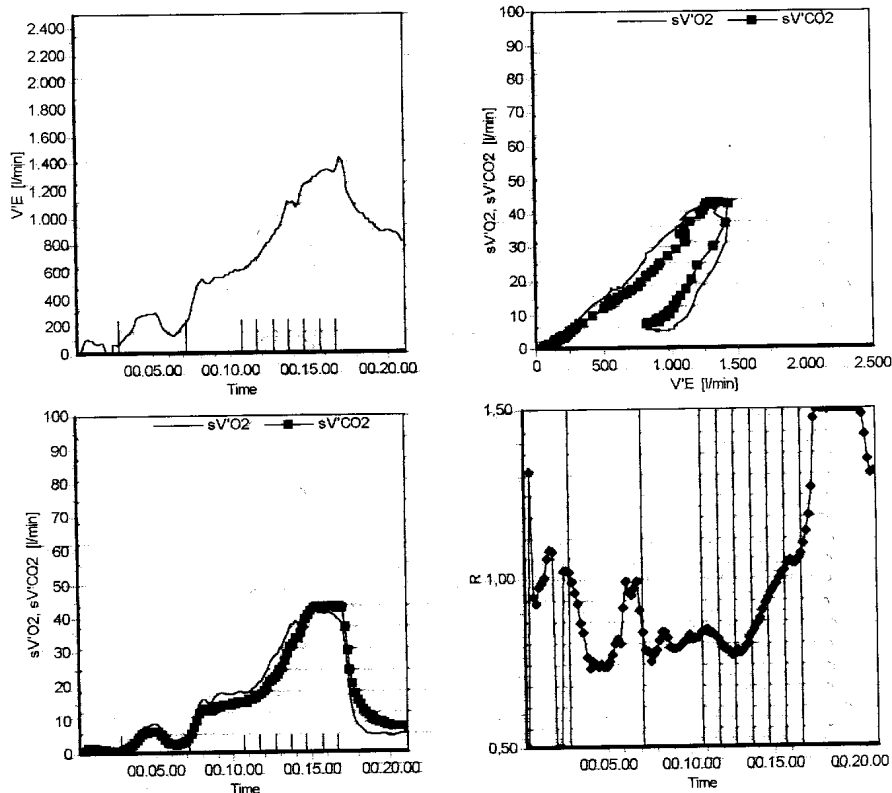
temperatura corporea e pressione atmosferica saturata con vapore acqueo; espresso in litri / minuto)

- assoluto O_2 captato (VO_2 STPD: ossigeno captato alle condizioni fisiche normali: temperatura $0^\circ C$, pressione 1013 hPa)
- assoluta espulsione di CO_2 (VCO_2 STPD: anidride carbonica espulsa alle condizioni fisiche normali: temperatura $0^\circ C$, pressione 1013 hPa)
- ossigeno captato (spec VO_2 : litri / minuto / Kg)
- di anidride carbonica espulsa (spec VCO_2 : litri / minuto / Kg)
- massimo consumo di ossigeno (VO_2 max in litri / minuto / Kg)
- Rapporto dello scambio respiratorio (RQ: VCO_2 / VO_2)
- Soglia anaerobica (AT)
- Frequenza cardiaca (HR) grazie al collegamento con un polar
- Cinetica dell'ossigeno espressa in litri/minuto
- Frequenza respiratoria (BF: breath/min)
- Flusso massimo espiratorio (PEF), Volume nell'unità di tempo (V/t), flusso (t), flusso/volume (F/V)
- Volume tidalico (V_T : litri/atto respiratorio)
- Volume minuto (V_E : litri/minuto)
- Equivalente della respirazione per l' O_2 (V_E/VO_2)
- Equivalente della respirazione per la CO_2 (V_E/VCO_2)

Nel nostro caso lo strumento utilizzato era il modello MetaSoft Vet 1.2.5 by Cortex, Lipsia, Germania, 2000.

Il computer riceve i dati, li elabora e li ordina in modo crescente in una serie di tabelle dalle quali ricava automaticamente i seguenti 4 grafici:

Ergospirometry Report



	AT	sV'O2 Max.	R = 1
Time	[h:m:s]	0.15.20	0.01.10
sV'O2	[l/min]	43,44	1,52
spec.V'O2	[l/s]	113,73	3,98
sV'CO2	[l/min]	43,44	1,50
R		1,00	1,00
V'E	[l/min]	1296,36	97,26
HR	[1/min]	221	50

I grafici riportati dallo strumento riguardano:

1. correlazione tra volume minuto (l/min) e tempo (min). I minuti corrispondono ai diversi steps dell'esercizio fisico; in questo caso si tratta di un esercizio incrementale, per questo si può osservare l'aumento del volume di aria che lascia il polmone ogni minuto, al trascorrere del tempo, ovvero all'aumentare dell'intensità dello sforzo, e la diminuzione del V_E durante il recupero, rappresentato dagli ultimi minuti riportati nel grafico.
2. correlazione tra VO_2 e VCO_2 (l/min) e volume minuto (l/min). Il rapporto riportato graficamente tra queste variabili, dimostra la correlazione diretta tra il consumo di ossigeno e l'emissione di anidride carbonica e il volume minuto: all'aumentare di VO_2 e VCO_2 corrisponde l'aumento del V_E e viceversa al diminuire di VO_2 e VCO_2 corrisponde la diminuzione del V_E .
3. correlazione tra VO_2 e VCO_2 (l/min) e tempo (min). Rappresenta graficamente l'andamento del consumo di ossigeno e dell'emissione di anidride carbonica durante l'esercizio fisico rappresentato dal trascorrere del tempo; l'andamento della curva mostra una crescita delle variabili in rapporto all'aumentata richiesta dell'organismo a causa dell'aumento di intensità dello sforzo. La fase di recupero, rappresentata dagli ultimi minuti riportati lungo l'asse x, mostra una diminuzione del consumo di ossigeno e con esso una diminuzione all'emissione di CO_2 in relazione alla riduzione dell'intensità dello sforzo.
4. correlazione tra rapporto dello scambio respiratorio (RQ: VCO_2/VO_2) e tempo. Rappresenta graficamente le

variazioni di richiesta di ossigeno rispetto all'emissione di anidride carbonica: dove la curva decresce il consumo di ossigeno supera la quantità di CO₂ espulsa, viceversa dove la curva tende a salire, il consumo di ossigeno diminuisce rispetto all'emissione di anidride carbonica. Come dimostra il grafico, quindi, l'aumento dell'intensità dello sforzo, ha come conseguenza l'emissione di anidride carbonica in grandi quantità, mentre la capacità di utilizzo dell'O₂ tende a diminuire.

La maschera utilizzata nell' esperimento è dotata di una camera d'aria che viene gonfiata per farla aderire al naso del cavallo in modo da eliminare possibili dispersioni di gas respiratori e viene mantenuta in sede mediante una cinghia allacciata dietro le orecchie del cavallo.

Dal momento in cui la maschera viene apposta, il sensore collegato all'estremità inizia a percepire il flusso dei gas respiratori che viene tradotto e registrato dal computer.

La determinazione del VO_{2max} è stata eseguita sottoponendo i cavalli utilizzati nel presente studio a 2 protocolli di esercizio incrementale su treadmill.

Studi precedenti hanno dimostrato, paragonando risultati ottenuti in seguito all'esecuzione di protocolli d'esercizio differenti, che per determinare il valore di VO_{2max} è necessario sottoporre il cavallo ad un esercizio che richieda intensità di sforzo crescente attraverso l'aumento della velocità del treadmill e/o della sua inclinazione, purchè sia preceduto da una fase adeguata di riscaldamento (Rose et al., 1990).

Nel presente studio sono stati utilizzati i seguenti protocolli per la determinazione del VO_{2max} :

PROTOCOLLO 1 (cavalli A, C, D)

Velocità del treadmill	Tempo
1,8 m/s	4 minuti
3,5 m/s	4 minuti
4,5m/s	1 minuto
5,5 m/s	1 minuto
6,5 m/s	1 minuto
7,5 m/s	1 minuto
8,5 m/s	1 minuto
9,5 m/s	1 minuto
10,5 m/s	1 minuto

PROTOCOLLO 2 (cavallo B)

Velocità del treadmill	Tempo
1,8 m/s	3 minuti
3,5 m/s	4 minuti
5m/s	1 minuto
6 m/s	1 minuto
7 m/s	1 minuto
8 m/s	1 minuto
9 m/s	1 minuto
10 m/s	1 minuto

2.2.9 Cardiodfrequenzimetro

E' stato utilizzato un polar per rilevare costantemente la frequenza cardiaca dei cavalli in esercizio. E' stato utilizzato un modello Baumann & Haldi della Polar Group Company, Svizzera. Viene applicato sul fascione apposto sul dorso del cavallo in modo da garantirne stabilità e precisione nel rilevamento dei dati. Prima che venga applicato il fascione, il dorso del cavallo dev'essere bagnato con acqua per garantire la rilevazione da parte del polar della scarica di corrente liberata ad ogni battito cardiaco. Il polar è stato collegato al computer tramite un'interfaccia che ha permesso il trasferimento dei dati registrati al pc.

2.3 TERZO ESPERIMENTO

2.3.1 Animali

Sono state utilizzate 4 femmine di pony Esperia (E, F, G, H) di 2 anni di età e peso medio di 300 Kg che ancora non erano state sottoposte a doma. Rispetto al primo esperimento si cercava in questo modo di avere animali il più omogenei possibile evitando di inserire ulteriori elementi di variabilità. Sono state stabulate in box (4x4 m) e mantenute in paddock la mattina da dove venivano prelevate per essere condotte nella stanza del treadmill dove eseguivano l'esercizio.

2.3.2 Il treadmill

E' stato utilizzato il treadmill degli esperimenti precedenti, modello T. Sätö II, Sweden.

2.3.2 Protocollo di esercizio

Le cavalle sono state sottoposte ad un periodo di acclimatamento al treadmill durante il quale sono state gradatamente abituate ad eseguire protocolli di esercizio incrementale. Il protocollo che è stato poi scelto per l'esecuzione del test con prelievo in continuo dei campioni di sangue, è il seguente:

300 metri a 1,8 m/s

1000 metri a 3,6 m/s

2 minuti a 6,5 m/s a frequenza cardiaca di circa 200 bpm
con inclinazione costante del treadmill a 5%.

2.3.3 Prelievo in continuo

E' stato applicato un protocollo simile a quello utilizzato nel primo studio riportato in questa tesi, ma con un maggiore numero di campioni di sangue prelevati attraverso il catetere endovenoso in quanto sono stati destinati non solo al dosaggio delle catecolamine ma anche al trattamento per l'isolamento dei linfociti e il mappaggio dei siti recettoriali.

2.3.4.1 APPLICAZIONE DEI CATETERI ENDOVENOSI

I cateteri endovenosi sono stati inseriti il giorno antecedente l' esecuzione dell' esercizio su treadmill, con la seguente metodica:

- le cavalle sono state sedate con somministrazione ev di circa 0,15cc di Domosedan;
- è stata eseguita tricotomia della zona scelta per l' inserimento dei cateteri della dimensione di circa 5x5 cm lungo la doccia giugulare sinistra del cavallo;
- è stata fatta anestesia locale con iniezione sottocutanea di lidocaina al 2% a formare pomfi a lento rilascio intorno alla sede di inserimento del catetere;
- è stata fatta una piccola incisione della cute utilizzando una lama di bisturi n° 20 e il sottocute è stato successivamente scollato;
- è stata quindi inserita nella vena giugulare sinistra la guida in plastica all' interno della quale scorre il mandrino d' acciaio;
- è stata quindi estratta la guida e inserito il catetere all' interno del mandrino che contemporaneamente veniva estratto;
- il catetere è stato fissato alla cute con tre punti staccati semplici in filo non riassorbibile 1;
- è stato eseguito un flushing con soluzione fisiologica, 10 cc di fenilbutazone e una soluzione di fisiologica ed eparina (20cc fisiologica e 0,5 cc di eparina);
- la zona è stata disinfettata con Fatroximin Spray e protetta mediante fasciatura con vetrap.

2.3.4.2 MODALITA' E TEMPISTICA DEI PRELIEVI

Il primo prelievo (basale) durante il quale sono state raccolte 4 provette destinate ad essere trattate per l'isolamento dei linfociti e una provetta destinata ad essere utilizzata per il dosaggio delle catecolamine plasmatiche, è stato eseguito in box al tempo zero. I prelievi successivi sono stati effettuati durante gli ultimi due minuti di esercizio a 6,5 m/s che corrispondevano ad una frequenza cardiaca di circa 200 bpm (V_{200}).

La linea ematica veniva allacciata all'inizio dei due minuti e il primo campione veniva prelevato dopo 30 secondi, tempo necessario al riempimento della linea ematica, attraverso il collettore automatico di frazioni; i campioni successivi sono stati raccolti ad intervalli di 30 secondi, per un totale di 5 campioni ottenuti nei due minuti di prelievo in continuo in corso di esercizio che venivano raccolti in provette vacutainer e immersi in acqua e ghiaccio per rallentare l'attività enzimatica.

Gli ultimi campioni sono stati prelevati con i cavalli in box rispettivamente a 30 e 60 minuti dal termine dell'esercizio.

A 30 minuti sono state riempite 4 provette destinate all'isolamento dei linfociti; il prelievo in singolo a 60 minuti è stato invece destinato al dosaggio delle catecolamine.

SCEMA RIASSUNTIVO DEI PRELIEVI

Tempo	Catecolamine	Linfociti
0	1 provetta	4 provette
2 minuti a 6,5 m/s a V_{200}	5 provette	
30 minuti post esercizio		4 provette
60 minuti post esercizio	1 provetta	
180 minuti post esercizio	1 provetta	

2.3.4.3 METODICA DI DOSAGGIO DELLE CATECOLAMINE

Per la determinazione delle catecolamine i campioni di plasma venivano estratti su gel di acido borico. Il gel era reidratato per 24 ore con acqua bidistillata ed attivato seguendo la metodica descritta da Imai (Imai et al., 1988).

Ad ogni provetta, contenente il gel di acido borico attivato, venivano aggiunti 25 μ l di Na₂S₂O₅ (25 mmoli/l), 20 μ l di DHBA (standard interno per le catecolamine, 100 ng/20 μ l in HCl 0.05 M) ed infine 1 ml plasma addizionato con 500 μ l di tampone fosfato pH 7.75.

Le provette dopo agitazione su agitatore rotante orizzontale per 10' venivano centrifugate a 10000 rpm per 2'. La parte liquida era aspirata e scartata ed il gel era lavato per tre volte con 1 ml di acqua, dopo ogni lavaggio era eseguita una centrifugazione a 10000 rpm per 2' e la fase acquosa veniva rimossa. Alla fine del ciclo di lavaggi venivano aggiunti 100 μ l di acido acetico (0.75M), l'estrazione era effettuata su vortex per 1' e su agitatore orizzontale per 3', a questo seguiva una centrifugazione a 10000 rpm per 2', il sopranatante era trasferito in una provetta e 20 μ l erano iniettati in HPLC. La curva di taratura era ottenuta aggiungendo 500 μ l di soluzioni scalari di catecolamine (100 - 75 -50- 7.5 - 5 - 4 - 2 ng in HCl 0.05M) a provette contenenti 500 μ l di tampone fosfato ed estraendole come i campioni.

Strumentazione: il sistema HPLC utilizzato consisteva in una pompa PU-1580 Jasco (Japan), equipaggiata con colonna Synergi Hidro-RP 80A, 250x4,60 mm, 4 μ e rilevatore fluorimetrico FP-920 Jasco ($\lambda_{ecc}=280$, $\lambda_{em}=315$).

La fase mobile isocratica era costituita da potassio fosfato (20mM) a pH 2.5, il flusso era di 1 ml/min.

3.0 RISULTATI

3.1 Primo esperimento

L'allenamento eseguito si è dimostrato efficace ed ha determinato un aumento della V_4 che è passata da valori di 7.3 ± 1.3 m/s, prima del periodo d'allenamento, a 8.8 ± 0.9 m/s al termine del mese d'esercizio.

	V4 (m/sec) prima dell'allenamento	V4 (m/sec) dopo l'allenamento
scoop	6,24	8,15
rimaggio	6,13	7,76
berbero	7,92	9,8
zucchino	8,71	9,4
media	7,25	8,78
DS	1,27	0,98

La V_{200} è passata dal valore di 8.4 ± 1.3 m/s del primo esercizio, a 10.3 ± 1.3 m/s al termine del mese d'allenamento.

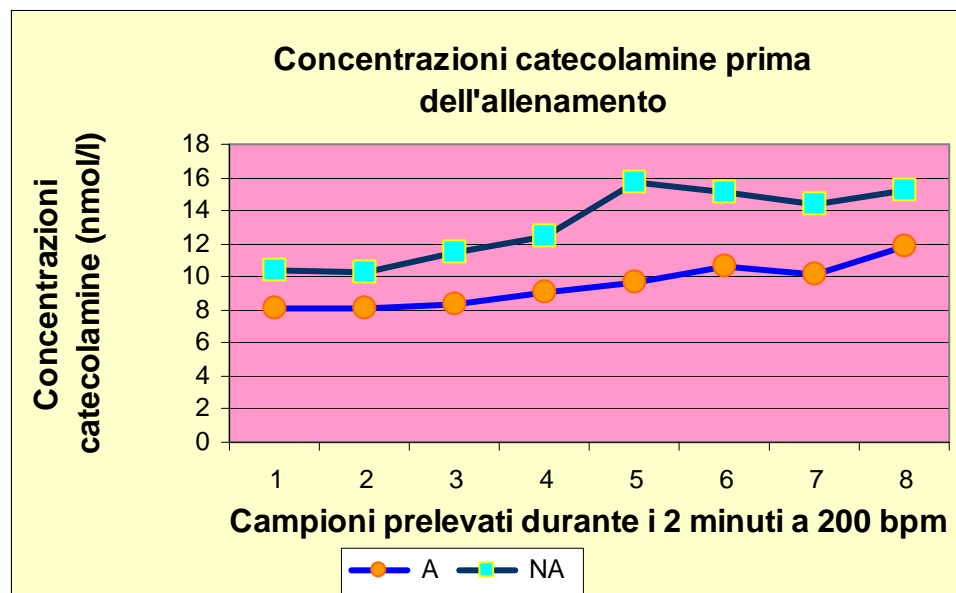
	V200 prima dell'allenamento	V200 dopo l'allenamento
Scoop	7,7	9
Zucchino	9	10,2
Berbero	10	10,7
Rimaggio	7	7,8
Media	8,425	9,425
DS	1,3	1,3

Dall'indagine statistica eseguita su questi risultati, si è ottenuto che le variazioni riscontrate possano essere considerate significative ($P < 0.05$).

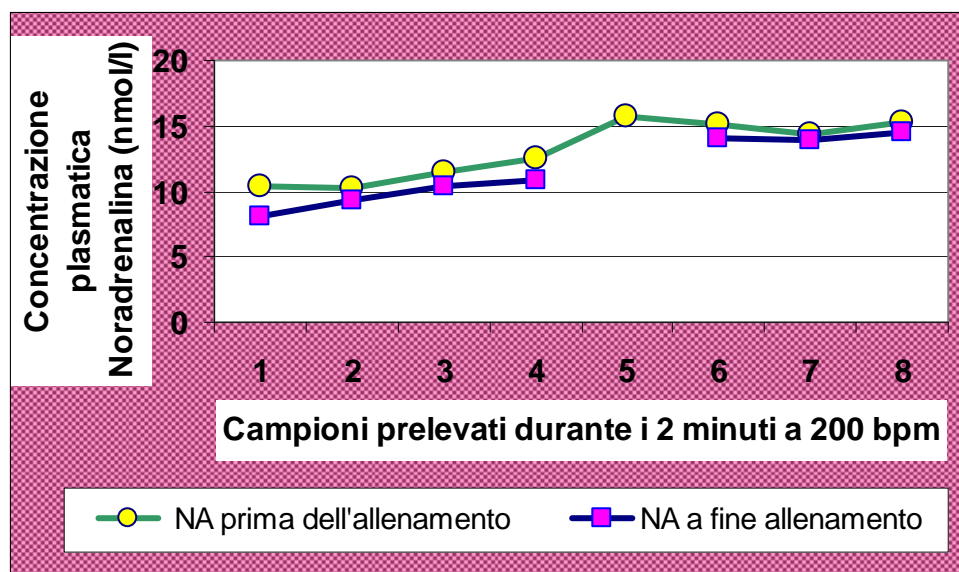
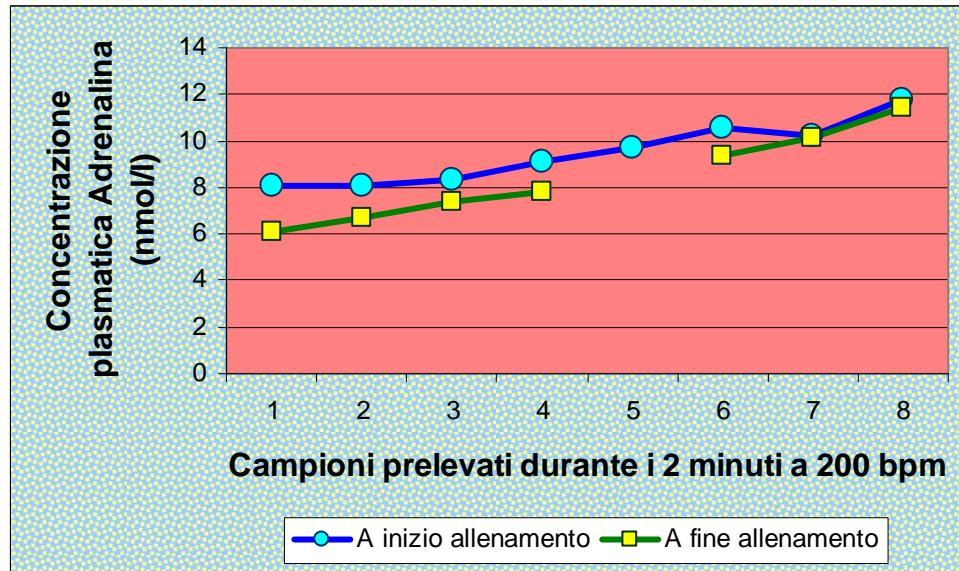
Questo dimostra che questi cavalli che quotidianamente sono stati sottoposti ad un programma di esercizio per la durata complessiva di un mese, hanno fatto importanti progressi nelle loro capacità atletiche.

I dosaggi delle catecolamine ricavati dai prelievi eseguiti in continuo con la metodica e tempistica già menzionate, sono serviti ad ottenere la curva che descrive la cinetica di queste molecole durante un esercizio submassimale eseguito a FC costante di 200 battiti al minuto per 2 minuti.

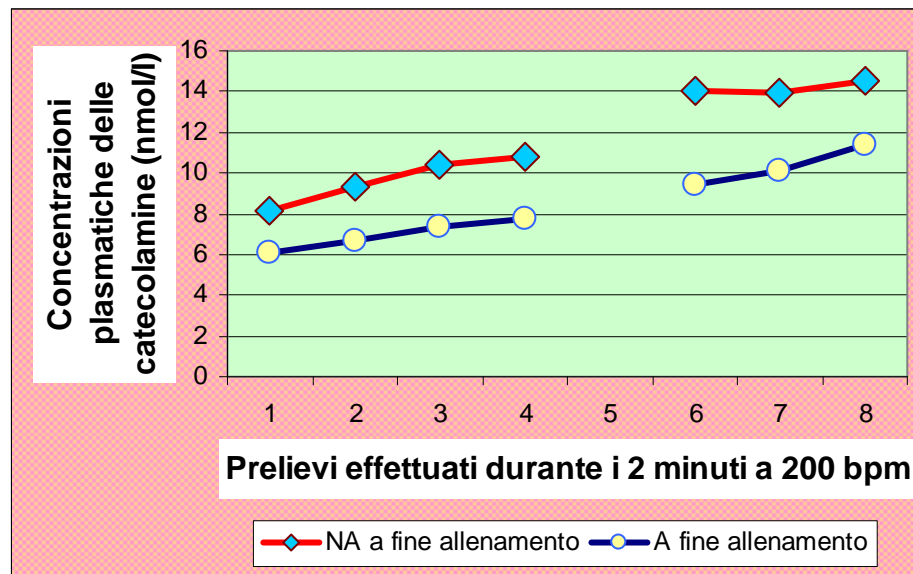
Il grafico seguente riporta i valori di catecolamine ottenuti dai prelievi effettuati prima dell'allenamento:



I grafici seguenti mostrano le differenze riscontrate nella concentrazione plasmatica di adrenalina e noradrenalina tra i prelievi eseguiti prima e quelli eseguiti dopo il periodo di allenamento:



La curva che descrive l'andamento delle concentrazioni delle catecolamine al termine del mese di allenamento, risulta comunque simile per A e NA.



Tra il primo e l'ultimo campione prelevato nel corso dei due minuti di esercizio alla V_{200} è stato rilevato un aumento delle concentrazioni di catecolamine, ma, nonostante questo, i livelli di A e NA diminuiscono dai prelievi effettuati prima e quelli dopo un mese di allenamento.

Dalle analisi statistiche questo decremento è stato ritenuto significativo sia per A che per NA.

Si è manifestata una lieve differenza tra le concentrazioni di catecolamine (nmol/l) ricavate dal primo campione prelevato al raggiungimento della V_{200} e l'ultimo prelevato al termine dei 2 minuti d'esercizio a 200 bpm.

	Prima dell'allenamento	Dopo allenamento
NA (nmol/l) nel primo campione dei 2 minuti di prelievo	1764 ± 224	1377 ± 202
NA (nmol/l) nell'ultimo campione dei 2 minuti di prelievo	2575 ± 466	2447 ± 81
A (nmol/l) nel primo campione dei 2 minuti di prelievo	1480 ± 106	1124 ± 83
A (nmol/l) nell'ultimo campione dei 2 minuti di prelievo	2157 ± 495	2094 ± 443

3.2 SECONDO ESPERIMENTO

3.2.1 VO_{2max}

Ogni cavallo ha raggiunto il proprio VO_{2max} a velocità differenti:

Tabella: Velocità alla quale i cavalli hanno raggiunto il VO_{2max}

cavallo A	8,5 m/s
cavallo B	7 m/s
cavallo C	10 m/s
cavallo D	8,5 m/s

I risultati ottenuti hanno dimostrato che i cavalli si trovavano in condizioni di preparazione atletica molto differenti tra loro, ma tutti erano in grado di sostenere l'esercizio previsto dal protocollo.

I grafici riportati nelle prossime pagine riportano l'andamento della curva che descrive il consumo di ossigeno dei cavalli durante l'esecuzione dell'esercizio di valutazione del VO_{2max}.

Sono state divise per soggetto e per ciascun cavallo vengono riportate le tabelle con i dati dai quali sono stati ottenuti i rispettivi grafici.

CAVALLO A

GRAFICO 1: è stato ottenuto formulando la media minuto per minuto dei valori degli steps di esercizio, come riportato in tabella:

Velocità treadmill	Medie per minuto d'esercizio VO ₂ max ml/min/Kg	Deviazione Standard
1,8 m/s	3,1	3,35
1,8 m/s	11,03	2,5
1,8 m/s	13,32	0,6
3,5 m/s	19,1	5,2
3,5 m/s	35,8	2,9
3,5 m/s	34	0,8
3,5 m/s	35	0,4
4,5 m/s	34,8	2,6
5,5 m/s	43,2	2,9
6,5 m/s	50,35	2
7,5 m/s	58,4	1,9
8,5 m/s	62,4	1,6
1,8 m/s	32,4	12,7

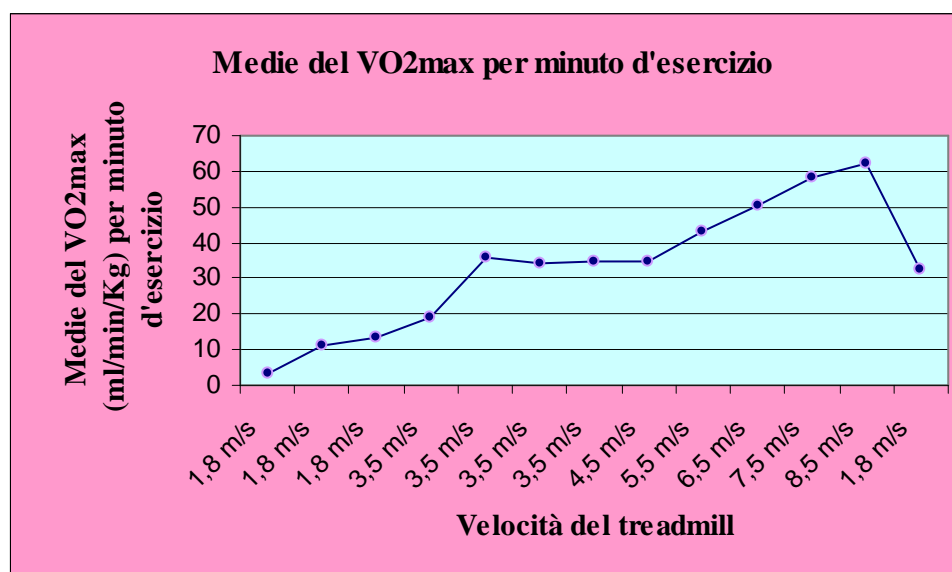
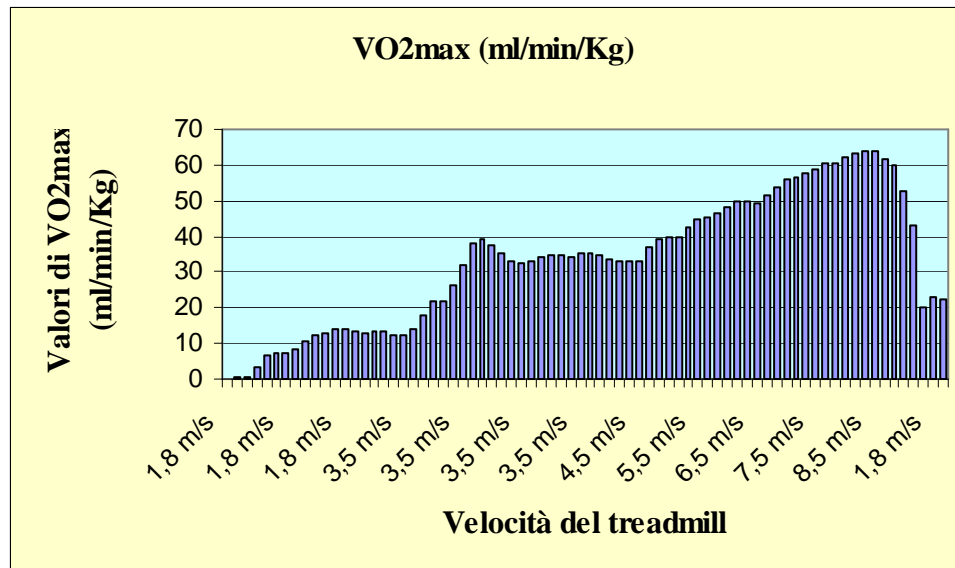


GRAFICO 2: riporta esattamente tutti i valori registrati durante l'esecuzione del test:



La curva ha andamento crescente e raggiunge valori più elevati quando il cavallo si muove a velocità pari a 8,5 m/s per mantenersi abbastanza costante durante questo step di esercizio, dove la curva mostra un breve plateau.

Il valore massimo registrato corrisponde al VO_{2max} del cavallo A ed è risultato 63,96 ml/min/Kg.

CAVALLO B

GRAFICO 1: è stato ottenuto formulando la media minuto per minuto dei valori degli steps di esercizio, come riportato in tabella:

Velocità treadmill	Medie per minuto d'esercizio VO2max ml/min/Kg	Deviazione Standard
1,8 m/s	8,9	1,4
1,8 m/s	13,1	1,2
1,8 m/s	11,7	0,9
3,5 m/s	18,1	6,7
3,5 m/s	32,8	3
3,5 m/s	29,16	5,2
3,5 m/s	34	1,4
5 m/s	42,3	6,2
6 m/s	60,2	5,5
7 m/s	74,4	3,6
1,8 m/s	53,7	17,7

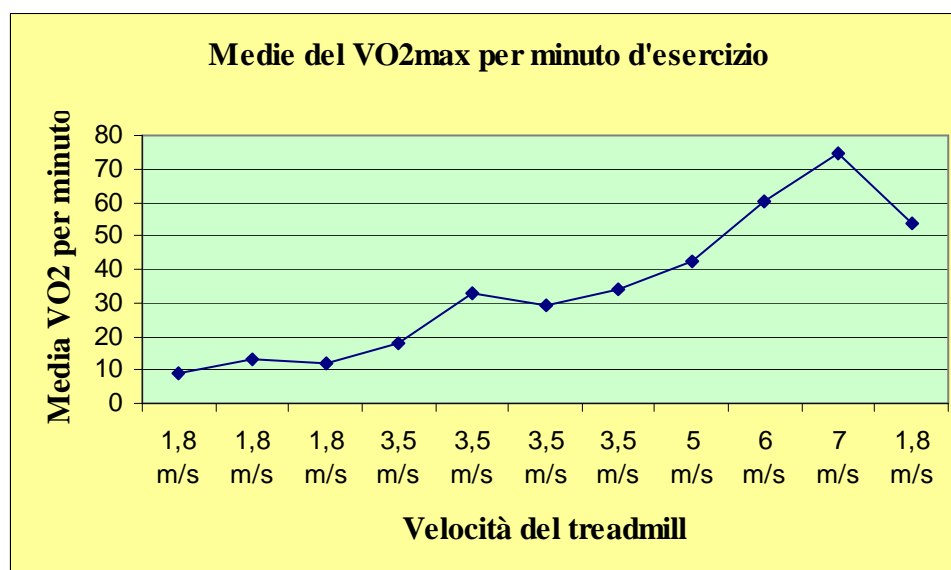
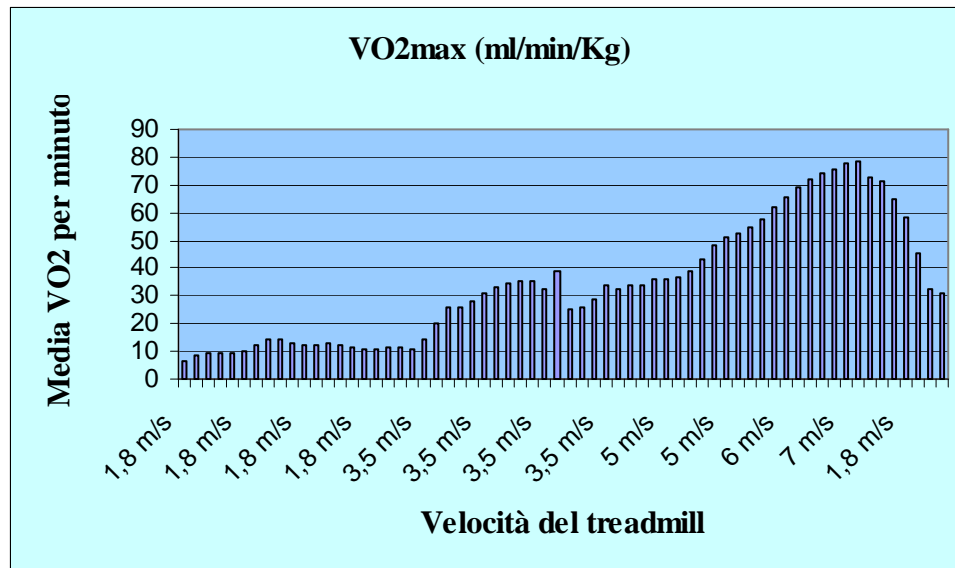


GRAFICO 2: riporta esattamente tutti i valori registrati durante l'esecuzione del test:



La curva ha andamento crescente e raggiunge valori più elevati quando il cavallo si muove a velocità pari a 7 m/s.

Il valore massimo registrato corrisponde al VO_{2max} del cavallo B ed è risultato 78,55 ml/min/Kg.

CAVALLO C

GRAFICO 1: è stato ottenuto formulando la media minuto per minuto dei valori degli steps di esercizio, come riportato in tabella:

velocità treadmill	medie per minuto d'esercizio VO ₂ max ml/min/Kg	Deviazione standard
1,8 m/s	5,2	2,5
1,8 m/s	11,9	1,9
1,8 m/s	16,1	0,7
3,5 m/s	22,7	5,4
3,5 m/s	33,2	3
3,5 m/s	35,3	1,2
3,5 m/s	36,1	0,2
4,5 m/s	39,1	3
5,5 m/s	49,1	3,2
6,5 m/s	55,7	1,9
7,5 m/s	42,1	13,6
8,5 m/s	38,1	4,9
9,5 m/s	43,8	10,1
10,5 m/s	61,4	12,7
1,8 m/s	39,2	15,2

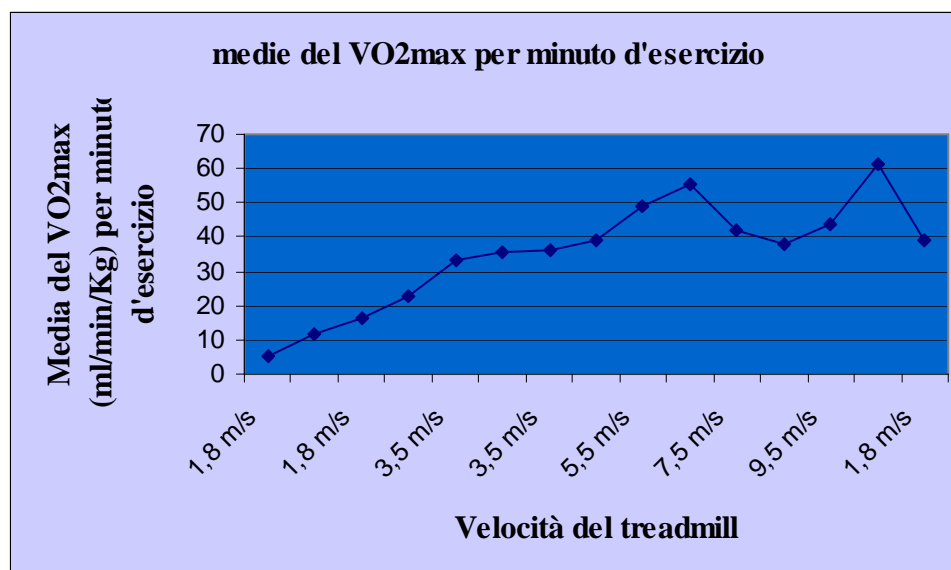
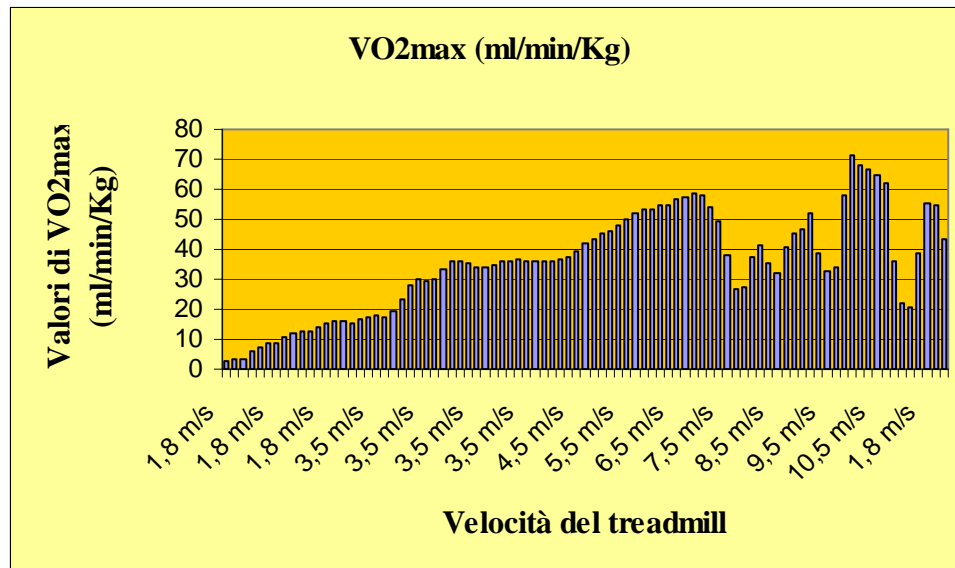


GRAFICO 2: riporta esattamente tutti i valori registrati durante l'esecuzione del test:



La curva mostra un andamento non lineare. Si sono verificate delle alterazioni nella misurazione dei valori compresi tra 8,5 e 9,5 m/s, che non risultano attendibili. Nel complesso si osserva comenque, come nei grafici precedente, l'aumento del consumo di ossigeno all'aumentare dell'intensità dell'esercizio, fino al raggiungimento del valore massimo alla velocità di 10,5 m/s.

Il valore massimo registrato corrisponde al VO_{2max} del cavallo C ed è risultato 71,45 ml/min/Kg.

CAVALLO D

GRAFICO 1: è stato ottenuto formulando la media minuto per minuto dei valori degli steps di esercizio, come riportato in tabella:

velocità treadmill	medie per minuto d'esercizio VO2max ml/min/Kg	Deviazione standard
1,8 m/s	9,6	5,4
1,8 m/s	21,8	1,5
1,8 m/s	14,9	5,7
1,8 m/s	8,3	1,4
3,5 m/s	29	11,5
3,5 m/s	41,7	2,8
3,5 m/s	46,1	0,4
3,5 m/s	47,5	0,5
4,5 m/s	49,4	2,4
5,5 m/s	63,7	7,3
6,5 m/s	83,4	6,5
7,5 m/s	101,4	2,4
8,5 m/s	112	1,5
9,5 m/s	108,1	0,7
1,8 m/s	90,1	25

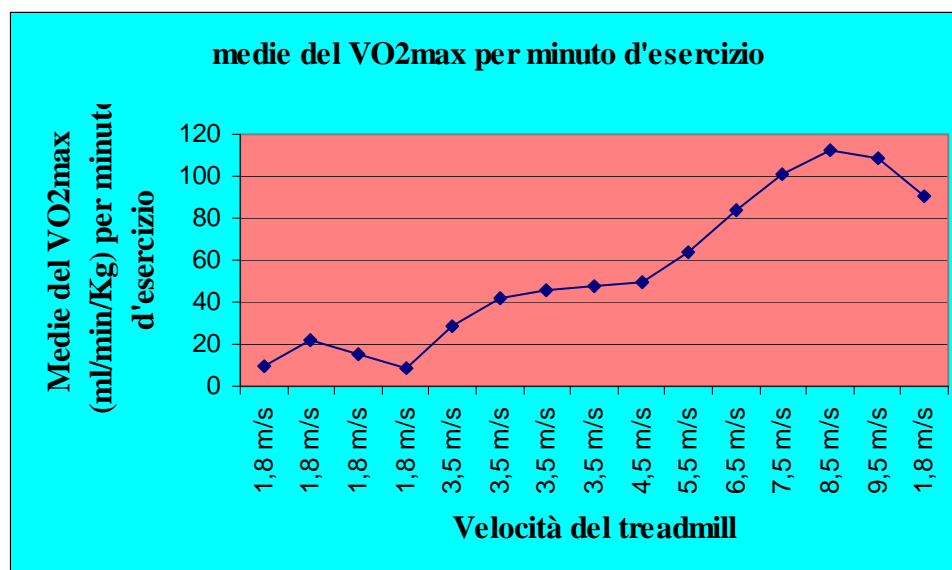
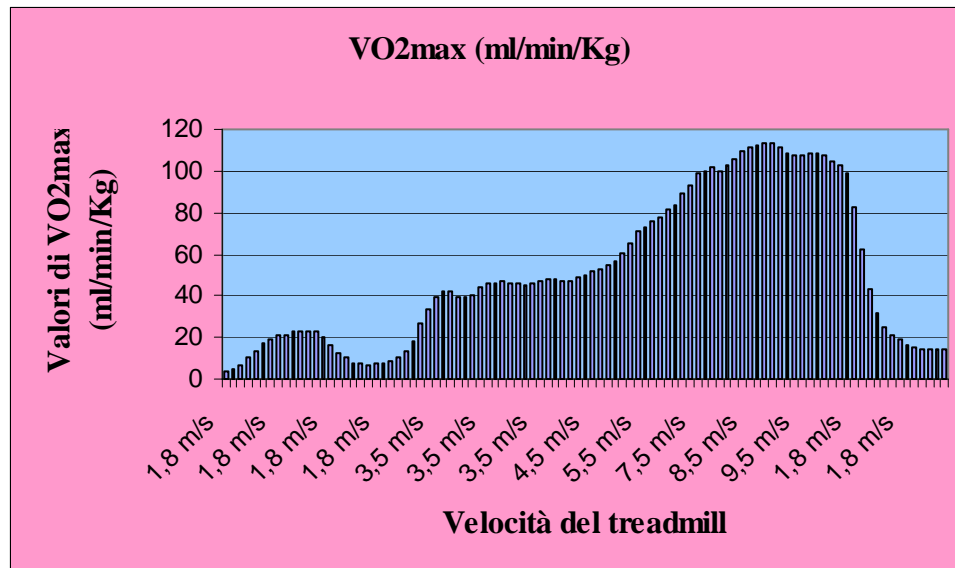


GRAFICO 2: riporta esattamente tutti i valori registrati durante l'esecuzione del test:



La curva ha andamento crescente e raggiunge valori più elevati quando il cavallo si muove a velocità pari a 8,5 m/s, dove la curva raggiunge un plateau.

Il valore massimo registrato corrisponde al VO_{2max} del cavallo D ed è risultato 113,73 ml/min/Kg.

I risultati ottenuti sono in accordo con la letteratura riguardo le modificazioni del VO_2 in corso di esercizio fisico nel cavallo (Art et al., 1990, 1993; Bayly et al., 1999; Butler et al., 1993; Curtis et al., 2006; Evans e Rose, 1988; Geor et al., 2000; Langestmo et al., 1999; Hoyt et al., 2006; Caola, 2001); è risultato infatti evidente l'aumento della richiesta di ossigeno da parte dell'organismo nel procedere dell'esecuzione di un esercizio di intensità crescente, e il conseguente raggiungimento del plateau corrispondente al VO_{2max} .

3.2.2 VO_2 e frequenza cardiaca:

Sono stati analizzati i cambiamenti relativi di VO_2 e FC utilizzando il metodo statistico di correlazione-regressione tra variabili (Glantz, 2002).

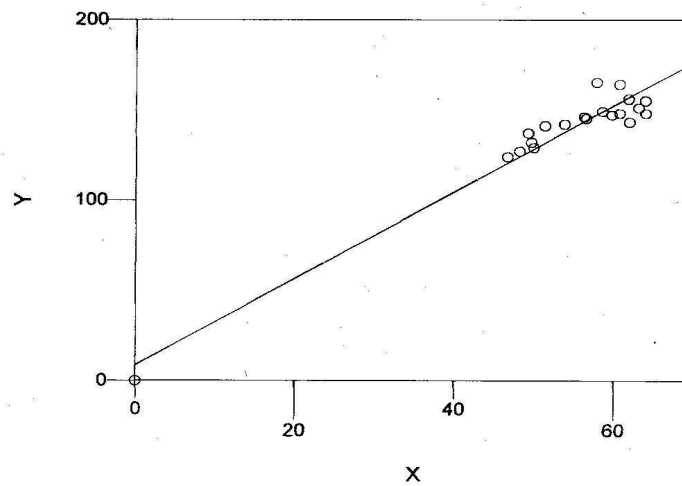
Si cerca la correlazione a partire da valori di FC superiori a 120 bpm in quanto al di sotto di questo valore si ritiene che le influenze legate al carattere del cavallo giochino ancora un ruolo predominante sulla funzionalità cardiaca (Caola, 2001). Tra i 120 bpm e i 210 bpm invece, la frequenza cardiaca secondo gli stessi autori, è funzione lineare dell'intensità dello sforzo, mentre per valori superiori ai 210 bpm l'andamento lineare diventa iperbolico a causa dell'accumulo di acido lattico nel sangue. I risultati ottenuti mostrano una correlazione statisticamente significativa tra le due variabili, per tutti i cavalli. Sono riportati di seguito i grafici che rappresentano questa relazione con il corrispondente valore P, ritenuto indice di rilevanza statistica dei dati quando $<0,05$. Per i cavalli A, B, D, la correlazione fra le due variabili si è rivelata altamente significativa. I valori ottenuti per il cavallo C, pur risultando nel complesso una correlazione significativa fra VO_2 e FC,

non possono essere considerati del tutto attendibili in quanto comprendono anche gli step in cui lo strumento ha mostrato alterazioni nel rilevamento e nella registrazione dei dati.

CAVALLO A

--- Regressione lineare e Correlazione ---

n:	20
Pendenza:	2.396
Intercetta:	8.826
ES della pendenza:	0.1425
ES dell'intercetta:	7.887
ES della stima:	8.597
r:	0.9696
Test t sulla pendenza:	16.81
gl:	18
P:	0

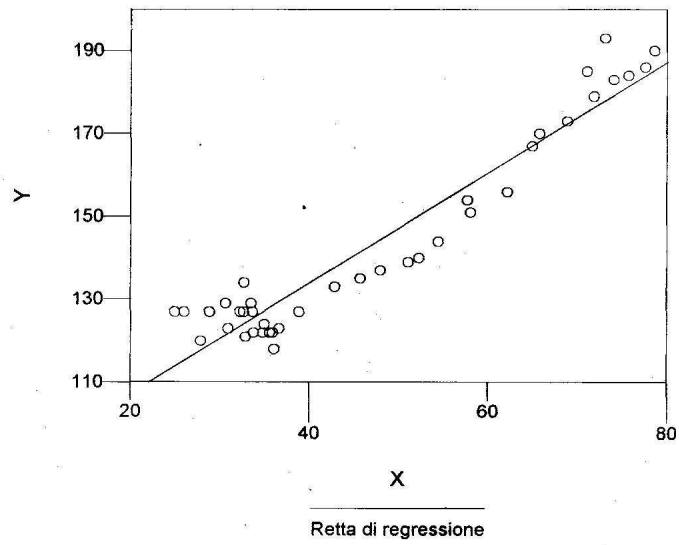


Retta di regressione

CAVALLO B

--- Regressione lineare e Correlazione ---

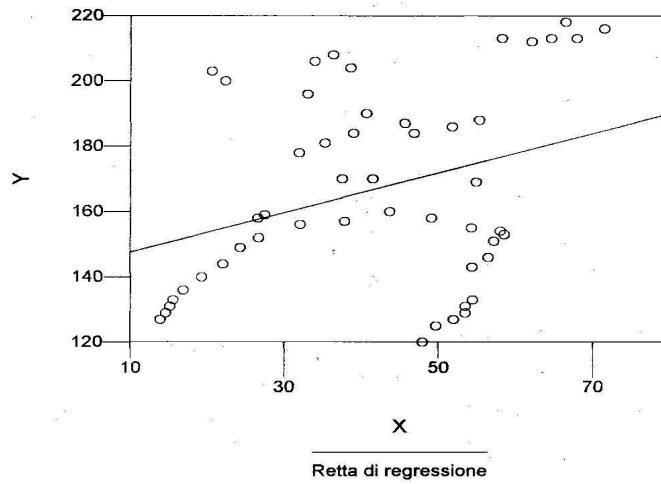
n: 40
Pendenza: 1.333
Intercetta: 80.57
ES della pendenza: 0.06435
ES dell'intercetta: 3.214
ES della stima: 6.981
r: 0.9585
Test t sulla pendenza: 20.72
gl: 38
P: 0



CAVALLO C

--- Regressione lineare e Correlazione ---

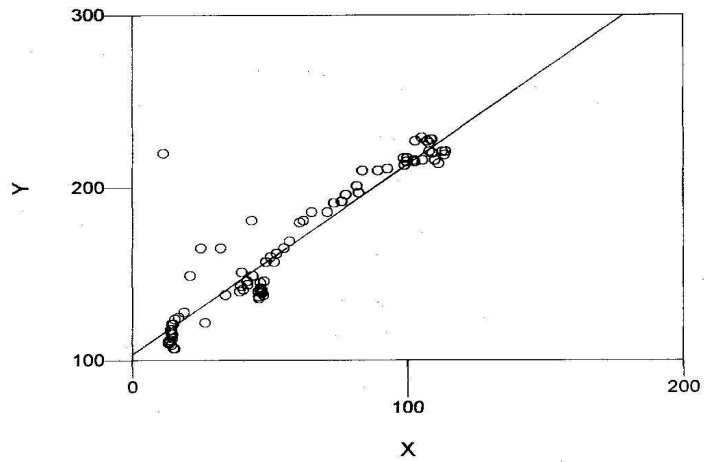
n: 50
Pendenza: 0.6056
Intercetta: 141.6
ES della pendenza: 0.2551
ES dell'intercetta: 11.4
ES della stima: 28.59
r: 0.3242
Test t sulla pendenza: 2.374
gl: 48
P: 0.02165



CAVALLO D

--- Regressione lineare e Correlazione ---

n: 83
Pendenza: 1.103
Intercetta: 103.4
ES della pendenza: 0.04961
ES dell'intercetta: 3.274
ES della stima: 15.57
r: 0.9269
Test t sulla pendenza: 22.23
gl: 81
P: 0



Retta di regressione

La correlazione tra le due variabili è stata eseguita anche per ogni singolo step di esercizio e ne è emerso che solamente per il cavallo B si mantiene sempre una correlazione statisticamente significativa tra le variabili, mentre per gli altri cavalli (A, D) si notano alterazioni nella correlazione per valori di $VO_2 > 93\%$.

I dati relativi al cavallo C non sono stati considerati in quanto ritenuti poco attendibili, a causa degli step durante i quali si era verificata una anomalia nella rilevazione dei dati da parte dello strumento.

3.3 TERZO ESPERIMENTO

3.3.1 Catecolamine

E' stato fatto un dosaggio delle concentrazioni di catecolamine plasmatiche con prelievi eseguiti prima (1), durante (2-6) e dopo l'esercizio (7), in modo da ricavare indicazioni sulla cinetica di queste molecole in soggetti sottoposti ad un esercizio su treadmill di tipo incrementale submassimale e di breve durata.

Il campione n°1 corrisponde al basale prelevato con il cavallo in box un ora prima dell'esecuzione della prova.

I campioni n°2-3-4-5-6 sono stati prelevati durante i due minuti di esercizio a frequenza cardiaca di circa 200 bpm corrispondente per i cavalli del presente studio alla velocità del treadmill di 6,5 m/s.

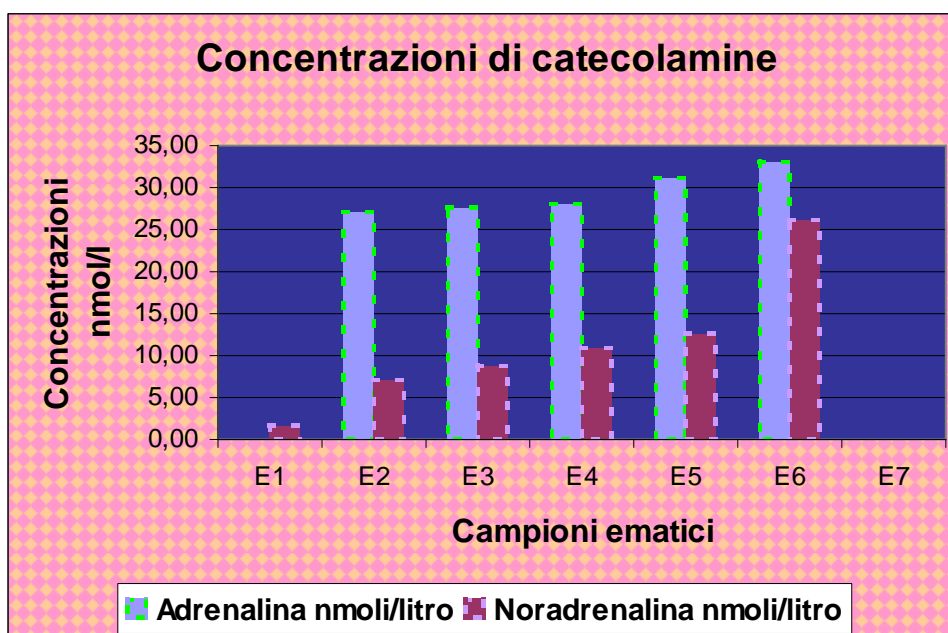
Il campione n°7 è stato prelevato un'ora dopo la fine dell'esercizio.

Grazie ai risultati ottenuti dalla metodica HPLC utilizzata per l'estrazione delle catecolamine, è stato possibile ricavare indicazioni sulla cinetica delle molecole. Sono riportati di seguito e distinti per ciascun cavallo (E, F, G, H) le tabelle e i grafici che rappresentano le concentrazioni di catecolamine ricavate dalle analisi dei campioni ematici.

CAVALLO E

	Adrenalina nmoli/litro	Noradrenalina nmoli/litro
E1	nd	1,56
E2	27,08	7,17
E3	27,53	8,86
E4	27,98	11,07
E5	31,09	12,67
E6	33,02	26,12
E7	nd	nd
media dei campioni 2-6	29,30	13,20
ds dei campioni 2-6	2,6	7,5

Per la A non è stato possibile determinare la concentrazione basale, mentre la concentrazione post esercizio non risulta determinabile per entrambe A e NA. Il grafico seguente riporta i dati della tabella:

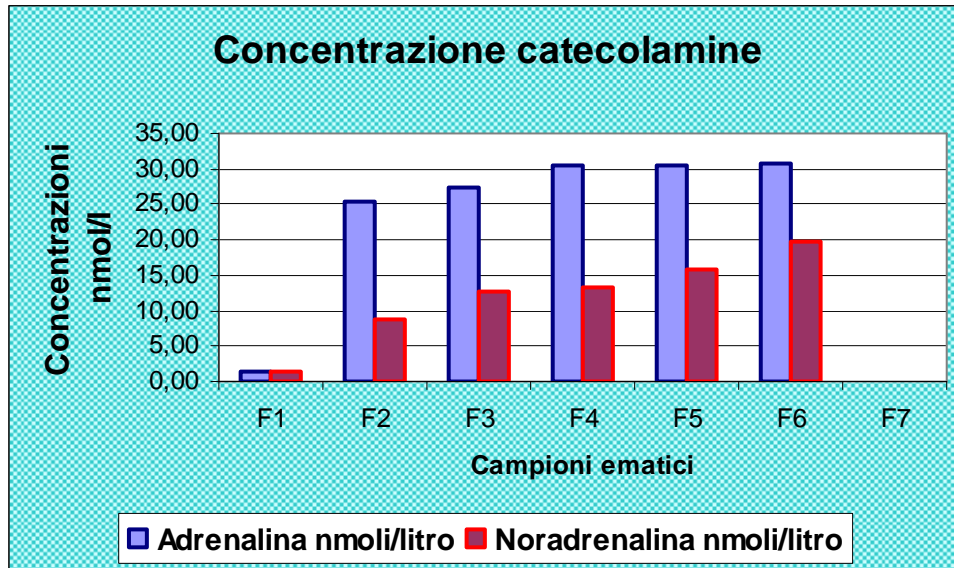


CAVALLO F

	Adrenalina nmoli/litro	Noradrenalina nmoli/litro
F1	1,54	1,54
F2	25,50	8,65
F3	27,46	12,69
F4	30,54	13,38
F5	30,53	15,88
F6	30,73	19,67
F7	nd	nd
media dei campioni 2-6	28,90	14,00
ds dei campioni 2-6	2,4	4,1

Non è stato possibile determinare le concentrazioni plasmatiche di A e NA dal prelievo post esercizio a causa della breve emivita di queste molecole. Il prelievo è stato infatti eseguito dopo un'ora dal

termine dell'esercizio e considerando che l'emivita delle catecolamine nel plasma del cavallo è molto rapida, è ragionevole non riscontrare da questo prelievo concentrazioni significative.

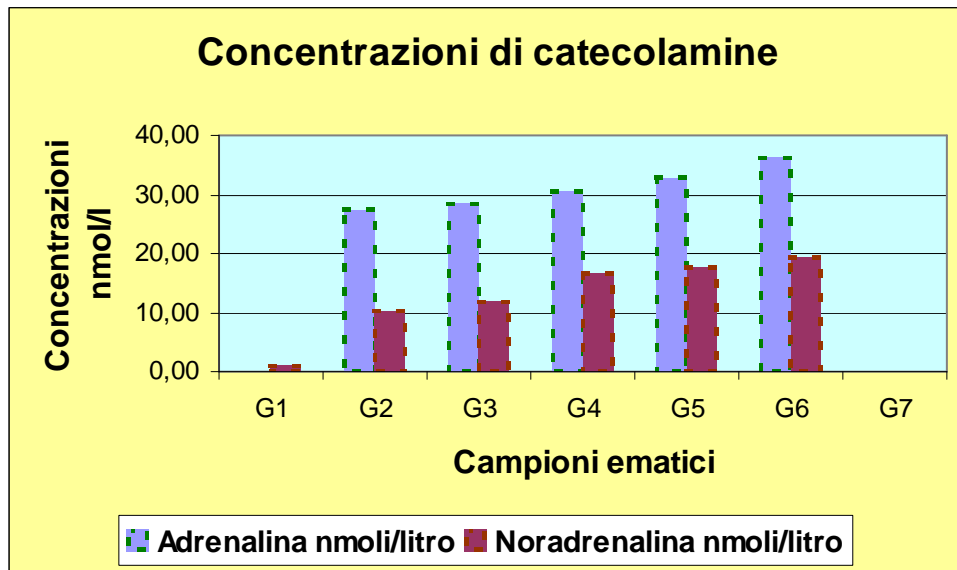


CAVALLO G

	Adrenalina nmoli/litro	Noradrenalina nmoli/litro
G1	nd	1,12
G2	27,39	10,25
G3	28,45	11,76
G4	30,38	16,57
G5	32,74	17,73
G6	36,35	19,21
G7	nd	nd
media dei campioni 2-6	31,10	15,10
ds dei campioni 2-6	3,6	3,9

Come nei casi precedenti, non è stato possibile determinare le concentrazioni basali di adrenalina e le concentrazioni post esercizio di A e NA in quanto si trattava di valori troppo bassi.

Il grafico seguente illustra i valori riportati in tabella.

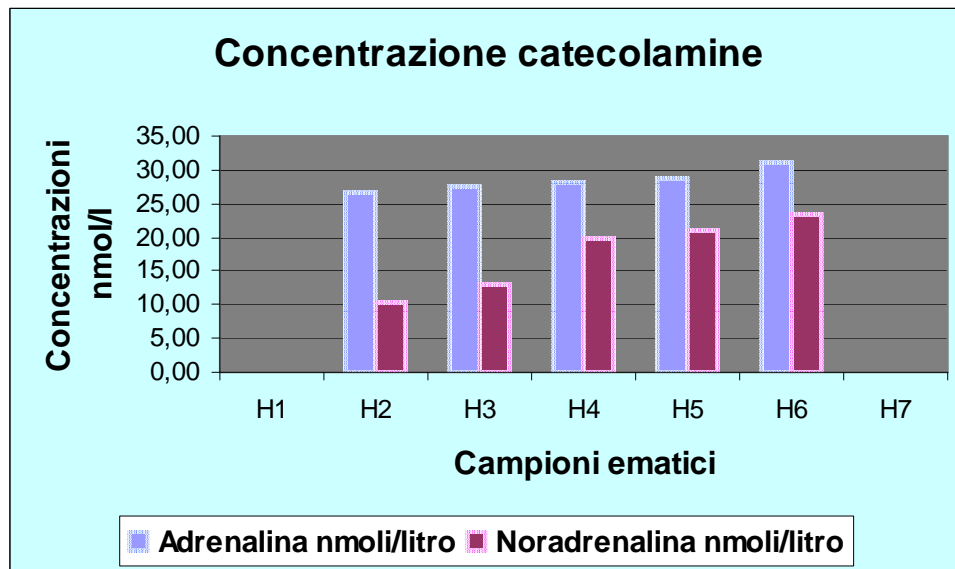


CAVALLO H

	Adrenalina nmoli/litro	Noradrenalina nmoli/litro
H1	nd	nd
H2	26,70	10,26
H3	27,46	13,00
H4	28,14	19,83
H5	28,72	21,00
H6	31,11	23,47
H7	nd	nd
media dei campioni 2-6	28,40	17,50
ds dei campioni 2-6	1,7	5,6

Anche in questo caso non sono stati determinati i valori delle catecolamine dal prelievo a riposo prima e dopo l'esercizio.

Il grafico seguente illustra i valori riportati in tabella:



3.3.2 Recettori

Con tecnica di binding sono stati mappati i recettori β presenti sui linfociti di cavallo da campioni di sangue prelevati prima e dopo l'esecuzione dell'esercizio su treadmill con lo scopo di valutarne le modificazioni in relazione alle variazioni dei livelli delle catecolamine causate dall'esercizio (Dipartimento di Patologia animale Settore Farmacologia e Tossicologia, Università di Torino).

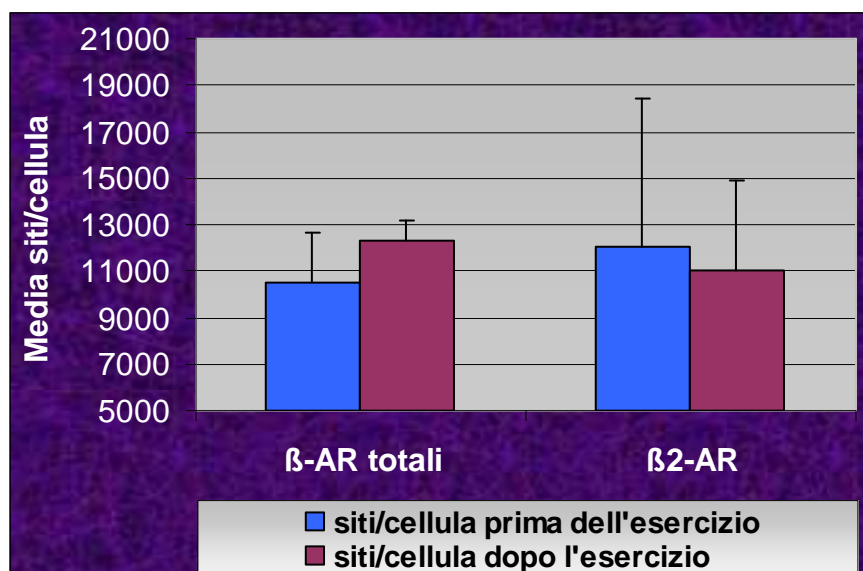
I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle seguenti:

	β_2 -AR fmol/ml	siti/cell
E1	11	16560,5
F1		
G1	5	7527,5
H1		
media	8	12044
ds	4,2	6387,3
E7	7	10538,5
F7	8	12044
G7	7	10538,5
H7		
media	7,3	11040,3
ds	0,6	869,2

	β -AR totali fmol/ml	siti/cell
E1	6	9033
F1	7	10538,5
G1	7	10538,5
H1	8	12044
media	7	10538,5
ds	0,8	2129,1
E7	11	16560,5
F7		
G7	7,5	11291,25
H7	6	9033
media	8,2	12294,9
ds	2,6	3862,8

Le tabelle mostrano che sono stati presi in esame distintamente la totalità dei recettori β e i soli recettori β_2 che costituiscono il 90% dei tipi recettoriali espressi sui linfociti.

Con i valori medi e le rispettive deviazioni standard, è stato ricavato il seguente grafico:



Nel grafico sono stati ricavati dalla seguente tabella:

	β-AR totali	β2-AR
siti/cellula prima dell'esercizio	10538,5 ± 2129,1	12044 ± 6387,3
siti/cellula dopo l'esercizio	12294,9 ± 3862,8	11040,3 ± 869,2

Tra il prelievo eseguito prima e quello eseguito dopo l'esecuzione dell'esercizio, sono emerse differenze legate al numero di siti recettoriali presenti sui linfociti: per quanto riguarda l'andamento dei recettori β_2 , dai prelievi post-esercizio è emersa una diminuzione della concentrazione dei siti recettoriali espressi sui linfociti rispetto al primo prelievo, mentre per quanto riguarda la totalità dei recettori β , dai dati ottenuti con il primo prelievo a quelli ricavati dal prelievo post esercizio il numero di siti risulta aumentato.

4.0 DISCUSSIONE

4.1 PRIMO ESPERIMENTO

L'incremento rilevato nella concentrazione di catecolamine dopo un'unica sessione d'esercizio ha dimostrato nell'uomo l'importanza di queste molecole nell'ottimizzare la produzione d'energia (Bush et al., 1999).

Questo incremento potrebbe determinare l'up o down regulation dei recettori necessari per mediare l'effetto ormonale del metabolismo energetico (Kraemer and Ratamess, 2005).

Dopo un periodo di allenamento, a seguito di esercizio, si ha una diminuzione nella risposta catecolaminergica, tuttavia aumenta la sensibilità ormonale, in modo da agevolare il metabolismo energetico (McMurray and Hackney, 2005).

Uno studio ha riscontrato che questo incremento nella sensibilità potrebbe essere dovuto ad una maggiore sensibilità dei recettori β -adrenergici (Martin et al., 1993).

Nonostante sia stato dimostrato nell'uomo che l'allenamento determina una riduzione della risposta catecolaminergica (Poehlmann et al., 1986; Helyar et al., 1997), tuttavia ancora non è chiaro ciò che si verifica in seguito ad adattamento cronico all'esercizio (Kraemer and Ratamess, 2005).

I risultati del presente studio concordano con quanto dimostrato per l'uomo, specialmente per quanto riguarda l'andamento dei livelli plasmatici della noradrenalina che tendono a diminuire nel cavallo quanto nell'uomo allenati (Chwalbinska-Moneta et al., 2005).

Per quanto riguarda l'adrenalina, gli stessi autori, hanno

dimostrato che nell'uomo 3 settimane di allenamento non ne determinerebbero diminuzioni nella concentrazione in risposta ad una singola sessione d'esercizio, mentre Lehmann et al. in studi eseguiti nei primi anni '80 (1981,1983,1985), avevano riscontrato che nell'uomo la diminuzione nella concentrazione plasmatica di adrenalina era tale da raggiungere valori tra il 25% e il 50% della concentrazione di NA, anche dopo una singola sessione d'allenamento.

E' stato ipotizzato che ciò sia dovuto ad una maggior liberazione di NA da parte delle terminazioni nervose delle fibre postsinaptiche del sistema nervoso simpatico.

Nel cavallo questo aspetto è stato indagato da diversi autori (Snow et al., 1992; Gandini et al., 1995; Jimenez et al., 1998), i quali hanno dimostrato che l'A diminuisce molto più lentamente rispetto alla NA. Il presente studio sulla base dei risultati ottenuti sembra concordare con questa tendenza.

Questo potrebbe essere dovuto a differenti ruoli giocati dalla midollare del surrene nella fisiologia dell'esercizio del cavallo rispetto all'uomo, come già affermato da Snow et al. nel 1992.

Da sottolineare infine l'importanza che diversi autori attribuiscono al fatto che i cavalli si siano abituati al protocollo di esercizio per spiegare la diminuzione nella concentrazione di catecolamine.

D'altra parte i cavalli utilizzati per l'esperimento avevano già lavorato precedentemente sul treadmill, nonostante cominciassero la fase d'allenamento dopo un breve periodo di assoluto riposo.

4.2 SECONDO ESPERIMENTO

La valutazione della VO_{2max} , come è stato riportato precedentemente, costituisce il miglior parametro per lo studio dello sforzo fisico sofferto da un soggetto, che può essere indicato in termini di % dello stesso VO_{2max} .

Il presente studio ha voluto studiare la correlazione esistente tra la VO_2 e la frequenza cardiaca in corso di esercizio fisico al treadmill nel cavallo.

Dalle analisi statistiche effettuate, è emersa una correlazione esistente altamente significativa esistente tra le due variabili prese in esame per i cavalli A, B, D.

(Il cavallo C ha mostrato una correlazione significativa con valore $P=0,02$ ma, considerando la scarsa attendibilità dei dati, si è ritenuto corretto non considerare i valori riferiti a questo cavallo).

Dalla analisi di correlazione dei dati eseguita per ogni step di esercizio è emerso che nel nostro studio, a valori superiori al 93% della VO_{2max} , si verifica una dispersione maggiore dei dati con conseguente mancanza di correlazione statisticamente significativa tra VO_2 e FC.

Queste considerazioni confortano i risultati ottenuti nel primo studio di questa tesi che utilizzava la frequenza cardiaca e la velocità (V_{200}) come strumento di valutazione dell'intensità dello sforzo.

4.3 TERZO ESPERIMENTO

4.3.1 Catecolamine

L'attivazione del sistema simpato-adrenergico in corso di esercizio è stata valutata mediante la determinazione della concentrazione delle catecolamine plasmatiche.

I prelievi sono stati eseguiti durante l'esecuzione di un esercizio al treadmill di intensità regolata alla V_{200} corrispondente per i cavalli del presente studio, ad una velocità del treadmill di 6,5 m/s.

Sono stati eseguiti anche due prelievi con i cavalli a riposo, rispettivamente prima e dopo l'esecuzione dell'esercizio dai quali è stato possibile notare che le concentrazioni basali di queste molecole, talvolta non sono determinabili in quanto estremamente basse.

Dai prelievi 2, 3, 4, 5 e 6 è stato possibile dosare le concentrazioni di A e NA e valutarne la cinetica.

Dai grafici ottenuti è quindi emersa una evidente attivazione del sistema simpato-adrenergico in corso di esercizio, che si manifesta con alte concentrazioni di catecolamine plasmatiche.

Le concentrazioni di A e NA hanno entrambe andamento crescente in prelievi consecutivi, tuttavia i valori raggiunti dalla adrenalina risultano maggiori rispetto a quelli della noradrenalina come riportato nella tabella seguente che mette a confronto le medie calcolate per ogni cavallo e la media totale delle concentrazioni di A e NA.

	Adrenalina nmoli/litro	Noradrenalina nmoli/litro
Cavallo E		
media dei campioni 2-6	29,30	13,20
ds dei campioni 2-6	2,6	7,5
Cavallo F		
media dei campioni 2-6	28,90	14,00
ds dei campioni 2-6	2,4	4,1
Cavallo G		
media dei campioni 2-6	31,10	15,10
ds dei campioni 2-6	3,6	3,9
Cavallo H		
media dei campioni 2-6	28,40	17,50
ds dei campioni 2-6	1,7	5,6
MEDIA TOTALE	29,43	14,95
DS TOTALE	1,2	1,9

I livelli maggiori raggiunti dalla A confermerebbero l'ipotesi indagata nel primo studio di questa tesi e in letteratura da diversi autori (Snow et al., 1992; Gandini et al., 1995; Jimenez et al., 1998), secondo la quale nel cavallo rispetto all'uomo, la midollare del surrene giocherebbe un ruolo maggiore nella regolazione della fisiologia dell'esercizio fisico.

4.3.2 Recettori

I risultati ottenuti non risultano facilmente spiegabili: la modificazione della concentrazione dei recettori β_2 tra il prelievo pre e quello post esercizio rispecchia una down-regulation recettoriale dovuta all'aumento della concentrazione di catecolamine plasmatiche; la differenza di concentrazione notata invece tra i campioni pre esercizio e

quelli post esercizio da cui sono stati mappati la totalità dei recettori β , lascia dei dubbi sulla attendibilità del valore, in quanto inoltre i recettori β_2 costituiscono il 90% dei recettori β espressi sui linfociti (Abraham et al., 2001) e il ruolo da loro giocato nella determinazione della concentrazione totale dovrebbe essere preponderante.

In letteratura umana da studi sui recettori adrenergici presenti sulle cellule del sistema immunitario, sono emerse molte incongruenze (Butler et al., 1982; Graafsma et al., 1990; Jost et al., 1990; Fry et al., 2006), tuttavia in questo caso non siamo in grado di dire se i risultati ottenuti siano frutto di una reale differenza di reazione dei siti recettoriali β_2 , rispetto al totale, a seguito delle variazioni delle concentrazioni plasmatiche di catecolamine in corso di esercizio fisico, oppure se si tratti in realtà di una incongruenza legata alla scarsità di elementi secondaria alla difficoltà di isolamento dei linfociti dai campioni e alla tecnica di binding che, non per tutti i campioni, è andata a buon fine.

5.0 CONCLUSIONI

Gli studi effettuati in questa tesi si sono rivolti alla valutazione dell'attività del sistema nervoso simpatico, mediante dosaggi delle catecolamine plasmatiche, in corso di esercizio fisico nel cavallo.

La difficoltà incontrata nell' eseguire uno studio su molecole a breve emivita come le catecolamine, è stata superata mediante l' utilizzo di un sistema di prelievo in continuo adattato al cavallo da Baragli et al., nel 2001, fondato sull'uso di un catetere endovenoso collegato mediante una linea ematica per emodialisi ad un collettore automatico di frazioni che ha permesso di raccogliere campioni di sangue ad intervalli di tempo prestabiliti, mentre il cavallo eseguiva l'esercizio su treadmill.

Questa tecnica applicata ai cavalli del primo studio (4 trottatori castroni età compresa fra 8 e 11 anni) ha permesso di dosare le concentrazioni di catecolamine in campioni ematici prelevati durante 2 minuti di esercizio a frequenza cardiaca di 200 bpm.

I prelievi sono stati eseguiti, in una prima fase, con i cavalli non allenati e i risultati ottenuti hanno mostrato che le concentrazioni di catecolamine tendono ad aumentare con l'aumento dell'intensità dello sforzo e che la NA si mantiene a concentrazioni leggermente superiori rispetto alla A.

L'esperimento è stato ripetuto con le stesse modalità dopo un mese di allenamento e dai risultati delle analisi eseguite sui campioni è emerso che le catecolamine raggiungono concentrazioni plasmatiche inferiori rispetto a quelle riscontrate dai prelievi pre-allenamento. Da sottolineare il fatto che la NA diminuisce in concentrazione di più rispetto alla A tra i dosaggi pre e post allenamento.

Questo effetto potrebbe essere dovuto alla attività della midollare del surrene che giocherebbe un ruolo maggiore nel cavallo rispetto all'uomo nel mediare le risposte fisiologiche all'esercizio, come è già stato ipotizzato da altri autori (Snow et al. 1992; Gandini et al. 1995; Kurosawa et al. 1998; Jimenez et al., 1998).

I nostri studi sembrano concordare con queste ipotesi apportando un importante contributo al chiarimento di alcuni aspetti dell'attivazione simpato-adrenergica nel cavallo in risposta allo sforzo fisico.

Il secondo studio ha permesso di giustificare l'utilizzo della frequenza cardiaca abbinata alla velocità (V_{200}) come strumento di valutazione dell'intensità dello sforzo, grazie alla correlazione statisticamente significativa riscontrata fra FC e VO_2 misurato mediante spirometria in corso di esercizio.

Con il terzo studio sono stati effettuati dosaggi delle catecolamine facendo ricorso al sistema di prelievo in continuo utilizzato con le stesse modalità del primo studio ma applicato ad un gruppo di animali omogenei (Pony Esperia femmine di 2 anni di età) e ciò ha permesso di limitare la variabilità relativa ai cavalli confermando comunque in termini generali gli andamenti dei livelli di catecolamine plasmatiche in corso di esercizio.

Dai dati ricavati col terzo esperimento è stato confermato l'andamento crescente delle concentrazioni di catecolamine plasmatiche in relazione all'aumento dell'intensità dello sforzo.

Tuttavia sono state riscontrate concentrazioni superiori di adrenalina rispetto alla NA per tutte le puledre impiegate nello studio rispetto a quello che si è verificato nel primo studio dove la NA si è mantenuta sempre su livelli maggiori rispetto alla A. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che le puledre utilizzate nel terzo studio erano

animali abituati a vivere allo stadio brado fino a poco tempo prima delle prove per cui, nonostante siano state sottoposte ad un periodo di doma (etologica) e successivamente ad un periodo di acclimatamento al treadmill, potrebbero aver mantenuto un atteggiamento particolarmente nevriale, mentre i cavalli del primo studio erano adulti già abituati ad eseguire esercizio su treadmill. Di conseguenza si può ritenere che i livelli alti di adrenalina nelle pony possano essere causati in parte da una concomitante forte componente emotiva in questi soggetti, che si aggiunge all'effetto dell'esercizio fisico.

Il terzo studio ha anche affrontato il tema delle modificazioni che si verificano a carico dei recettori β -adrenergici presenti su cellule del sistema immunitario in risposta alle variazioni della concentrazione delle catecolamine plasmatiche durante l'esercizio fisico.

Si tratta di un aspetto già studiato per l'uomo ma tuttavia non ancora chiarito nelle sue manifestazioni che sono risultate non concordi tra i diversi autori che se ne sono occupati (Butler et al., 1982; Graafsma et al., 1990; Jost et al., 1990; Fry et al., 2006).

Nel cavallo non sono ancora stati eseguiti studi al riguardo e i risultati ottenuti con il nostro esperimento purtroppo non ci consentono di proporre ipotesi, anche se possono costituire un importante punto di partenza per avviare ricerche in questo settore anche nel cavallo.

PARTE III

1.0 Bibliografia

Abraham, G., Brodde, O.E. and Ungemach, F.R. *Identification and characterisation of β -adrenoceptors on intact equine peripheral blood lymphocytes with the radioligand (-)-[¹²⁵I]-iodocyanopindolol*. Equine Vet. J. 33 (5): 487-493. 2001

Abraham, G., Brodde, O.E. and Ungemach, F.R. *Regulation of equine lymphocyte β -adrenoreceptors under the influence of clenbuterol and dexamethasone*. Equine vet. J. 34 (6): 587-593. 2002

Aguggini, G., Beghelli, V., Clement, M.G., d'Angelo, A., Debenedetti, A., Facello, C., Giulio, L.F., Guglielmino, R., Lucaroni, A., Maffeo, G., Marongiu, A., Naitana, S., Nuvoli, P., Piazza, R. *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia*. II edizione UTET Torino, 2006

Alexander, S.L., Irvine, C.H.G., Ellis, M.J. and Donald, R.A. *The effect of acute exercise on the secretion of corticotropin-releasing factor, arginine, vasopressin and adrenocorticotropin as measured in pituitary venous blood from the horse*. Endocrinol. 128, 65-72. 1991

Altman, D.G., *Comparing group-continuous data*, in: Practical Statistics for Medical Research, Chapman and Hall, London, pp. 68-77. 1991

Art, T. and Lekeux, P. *Training-induced modifications in cardiorespiratory and ventilatory measurements in Thoroughbred horses*. Equine vet. J. 25(6), 532-536, 1993

Art, T. and Lekeux, P. *Ventilatory and arterial blood gas tension adjustments to strenuous exercise in Standardbreds*. Am. J. Vet Res, Vol 56, No 10, october 1995

Art, T., Anderson, L., Woakes, A.J., Roberts, C., Butler, P.J., Snow, D.H. and Lekeux, P. *Mechanics of breathing during strenuous exercise in Thoroughbred horses*. Respiration Physiology, 82, 279-294, 1990

Art, T., Duvivier, D.H., van Erck, E., De Moffarts, B., Votion, D., Bedoret, D., Lejeune, J.P., Lekeux, P. and Serteyn, D. *Validation of a portable equine metabolic measurement system*. Equine Exercise Physiology 7, Equine vet. J. Suppl., 36: 557-561. 2006

Art, T., Duvivier, D.H., Votion, D., Anciaux, N., Vandenput, S., Bayly, W.M. and Lekeux, P. *Does an acute COPD crisis modify the*

cardiorespiratory and ventilatory adjustments to exercise in horse?
Journal of Applied Physiology 84: 845-852, 1998

Badino, P., Odore, R., Re, G. *Are so many adrenergic receptor subtypes really present in domestic animal tissues? A pharmacological perspective.* The Veterinary Journal 170, 163-174. 2005

Baragli, P., Tedeschi, D., Gatta, D., Martelli, F. and Sighieri, C. *Application of a constant blood withdrawal method in equine exercise physiology studies.* Equine. Vet J. 33, 543-546. 2001

Bayly, W.M., Redman, M.J. and Sides, R.H. *Effect of breathing frequency and airflow on pulmonary function in high-intensity equine exercise.* Equine vet. J. Suppl. 30: 19-23. 1999

Berthoud, H.R., Laughton, W.B. and Powley, T.L. *A method for large volume blood sampling and transfusion in rats.* Am J. Physiol. 250, E331-E337. 1986

Betros, C.L., McKeever, K.H., Kearns, C.F. and Malinowski, K. *Effects of ageing and training on maximal heart rate and VO_{2max} .* Equine Vet. J. Suppl. 34, 100-105, 2002

Bjorklind, M., Sirvio, J., Sallinen, J., Scheinin, M., Kobilka, B.K., Riekkien, P. *α_2C -Adrenoceptor overexpression disrupts execution of spatial and non-spatial search patterns.* Neuroscience, 88: 1187-1198. 1999

Boomsma, F., Alberts, G., Van Eijk, L., Man in't Veld, A.J. and Schalekamp, M.A. *Optimal collection and storage conditions for catecholamine measurements in human plasma and urine.* Clin. Chem. 39: 2503-2508. 1993

Buckwalter, J.B., Naik, J.S., Valic, Z. and Clifford, P.S. *Exercise attenuates α -adrenergic-receptor responsiveness in skeletal muscle vasculature.* J. Appl. Physiol. 90: 172-178. 2001

Bush, J.A., Kraemer, W.J., Mastro, A.M., Triplett-Mcbride, N.T., Volek, J.S., Putukian, M., Sebastianelli, W.J. and Knuttgen, H.G. *Exercise and recovery responses of adrenal medullary neurohormones to heavy resistance exercise.* Med. Sci. sports Exerc. 31: 554-559. 1999

Butler, J., O'Brien, M., O'Malley, K. and Kelly, J.G.. *Relationship of α -adrenoceptor density to fitness in athletes.* Nature, Vol. 298: 61-62. 1982

Butler, P.J., Woakes, A.J., Smale, K., Roberts, C.A., Hillidge, C.J., Snow, D.H. and Marlin, D.J. *Respiratory and cardiovascular adjustments during exercise of increasing intensity and during recovery in Thoroughbred racehorses*. J. Exp Biol. 179: 159-180. 1993

Chwalbinska-Moneta, J., Kruk, B., Nazar, K., Krzeminski, K., Kaciuba-Uscilko, H., Ziemba, A. *Early effects of short-term endurance training on hormonal responses to graded exercise*. Journal of Physiol. And Pharmac, 56, 1, 87-99. 2005

Civantos Calzada, B., De Artinano, A.A. *α -Adrenoceptor subtypes*. Pharmacological Research, 44: 195-208. 2001

Colahan, P.T., Savage, K.A., Tebbett, I.R., Rice, B.L., Jackson, C.A. and Freshwater, L. *The effect of adrenergic suppression induced by guanabenz administration on exercising thoroughbred horses*. Equine Vet. J., Suppl. 36, 262-266. 2006

Curtis, R.A., Kusano, K. and Evans, D.L. *Observations on respiratory flow strategies during and after intense treadmill exercise to fatigue in Thoroughbred racehorses*. Equine vet. Suppl. 36, 567-572, 2006

Curtis, R.A., Kusano, K., Evans, D.L., Lovell, N.H., Hodgson, D.R. *Reliability of cardiorespiratory measurements with a new ergospirometer during intense treadmill exercise in Thoroughbred horses.* The veterinary Journal 169, 223-231, 2005

Evans, D.L and Rose, R.J. *Cardiovascular and respiratory responses in thoroughbred horses during treadmill exercise.* J. Exp. Biol. 134: 397-408. 1988

Evans, D.L. and Rose, R.J. *Effect of a respiratory gas collection mask on some measurements of cardiovascular and respiratory function in horses exercising on a treadmill.* Research in Veterinary Science, 44: 220-225. 1988

Evans D.L., Rainger, J.E., Hodgson, D.R., Eaton, M.D. and Rose, R.J. *The effects of intensity and duration of training on blood lactate concentrations during and after exercise.* Equine Vet. J. Suppl, 18: 422-425. 1995

Freeston, J.F., Wolfsheimer, K.J., Kamerling, S.G., Church, G., Hamra, J., Bagwell, G. *Exercise induced hormonal and metabolic changes in Thoroughbred horses: effects of conditioning and acepromazine.* Equine vet. J. 23 (3): 219-233. 1991

Fry, A.C., Schilling, B.K., Weiss, L.W. and Chiu, L.Z.F. *β_2 -Adrenergic receptor downregulation and performance decrements during high-intensity resistance exercise overtraining.* J. Appl. Physiol. 101: 1664-1672. 2006

Gandini, G., Bargossi, A.M. and Venturoli, M. *Variazioni delle catecolamine e dell' ammonio plasmatici nel cavallo atleta a seguito dell' esecuzione di diversi tipi di esercizio.* Rivista militare di Med. Veterinaria No 9 Suppl. No 4. 1995

Gauvreau, G.M., Young, S.S., Staempfli, H., McCutcheon, L.J., Wilson, B.A. and McDonell, W.N. *The relationship between respiratory exchange ratio, plasma lactate and muscle lactate concentrations in exercising horses using a valved gas collection system.* Can J. Res. 60: 161-171. 1996

Geor, R.J., McCutcheon, L.J., Hinchcliff, K.W. *Effects of warm-up intensity on kinetics of oxygen consumption and carbon dioxide production during high-intensity exercise in horses.* AJVR, Vol. 61 No. 6, June 2000

Giovanni Caola. *Fisiologia dell'esercizio fisico del cavallo*
I edizione Edagricole, Bologna. 2001

Glantz S.T “Statistica per discipline biomediche” Versione 5, edizione McGraw-Hill, 2002

Gonzalez, O., Gonzalez, E., Sanchez, C., Pinto, J., Gonzalez, I., Enriquez, O., Martinez, R., Filguira, G. And White, A. *Effect of exercise on erythrocyte β -adrenergic receptors and plasma concentration of catecholamines and thyroid hormones in Thoroughbred horses.* Equine. Vet. J. 30: 72-78. 1998

Greiwe, J.S., Hickner, R.C., Shah, S.D., Cryer, P.E., Holloszy, J.O. *Norepinephrine response to exercise at the same relative intensity before and after endurance exercise training.* J. Appl. Physiol.;86(2):531-5. 1999

Graafsma, S.J., Van Tits, L.J.H., Willems, P.H.G.M., Madga, P.C., Hectors, J.F., Rodriguez de Miranda, J.J.H.H.M., de Pont and Thien, T. *β_2 -adrenoceptor up-regulation to cAMP production in human lymphocytes after physical exercise.* Br. J. clin. Pharmac., 30: 142S-144S. 1990

Gullestad, L., Myers, J., Bjornerheim, R., Berg, K.J., Djoseland, O., Hall, C., Lund, K., Kjekshus, J., Simonsen, S. *Gas exchange and neurohumoral response to exercise: influence of the exercise protocol.* Med. Sci. Sports. Exerc.;29(4):496-502. 1997

Hardee, G.E., Lai, J.W., Semrad, S.D. and Trim, C.M. *Catecholamines in equine and bovine plasmas*. J. Vet. Pharmacol. Therap. 5: 279-284. 1982

Harris, P. and Snow, D.H. *Plasma potassium and lactate concentrations in Thoroughbred horses during exercise of varying intensity*. Equine vet. J. 23: 220-225. 1992

Helyar, R., Green, H., Zappe, D. and Sutton, J. *Blood metabolite and catecholamine responses to prolonged exercise following either acute plasma volume expansion or short-term training*. Eur. J. appl. Physiol. 75: 268-273. 1997

Herholz, C., Straub, R., Gerber, V., Wampfler, B., Lüthi, S., Imhof, A., Moens, Y. and Busato, A. *Relationship between clinical signs and pulmonary function estimated by the single breath diagram for CO₂ (SBD-CO₂) in horses with chronic obstructive pulmonary disease*. The Veterinary Journal, 163: 187-195. 2002

Hodgson, D.R. and Rose, R.J. *The athletic horse*. Edizione Saunders company USA. 1994

Hopkins, S.R., Bayly, W.M., Slocombe, R.F., Wagner, H. and Wagner, P.D. *Effect of prolonged heavy exercise on pulmonary gas exchange in horses.* J. Appl. Physiol. 84(5): 1723-1730, 1998

Horn, J., Bailey, S., Berhane, Y., Marr, C.M., Elliott, J. *Density and binding characteristics of β -Adrenoceptors in the normal and failing equine myocardium.* Equine Veterinary Journal, 34: 411-416. 2002

Hoyt, D.F., Wickler, S.J. and Garcia, S.F. *Oxygen consumption (VO_2) during trotting on a 10% decline.* Equine vet. J., Suppl. 36, 573-576, 2006

Huang, Y.F., Upton, R.N., Mather, L.E. and Runciman, W.B. *An assessment of methods for sampling blood to characterise rapidly changing blood drug concentration.* J. pharm. Sci. 80: 847-851. 1991

Hughson, R.L., Green, H.J. and Sharratt, M.T. *Gas exchange, blood lactate and plasma catecholamines during incremental exercise in hypoxia and normoxia.* J. Appl. Physiol. 69, 1134-1141. 1995

Hutchinson, J. *On the capacity of the lungs, and on the respiratory functions, with a view of establishing a precise and easy*

method of detecting disease by the spirometer. Medico-Chirurgical Transactions (London), 29: 137-161. 1846

Imai, Y., Ito, S., Maruta, K., Fujita, K. *Simultaneous determination of catecholamines and serotonin by liquid chromatography, after treatment with acid boric gel. Clin. Chem. 33/3; 528-30. 1988*

Itoh, C., Kizaki, T., Hitomi, Y., Hanawa, T., Kamiya, S., Ookawara, T., Suzuki, K., Izawa, T., Saitoh, D., Haga, S. and Ohno, H. *Down-regulation of β_2 -adrenergic receptor expression by exercise training increase IL-12 production by macrophages following LPS stimulation. Biochemical and Biophysical Research Communications 322: 979-984. 2004*

Jimenez, M., Hinchcliff, K.W. and Farris, J.W. *Catecholamine and cortisol responses of horses to incremental exertion. Veterinary Research Comm., 22: 107-118. 1998*

Jost, J., Weiss, M. and Weicker, H. *Sympatoadrenergic regulation and the adrenoceptor system. Appl. Physiol. 68(3), 897-904. 1990*

Kearns, C.F., McKeever, K.H., John-Alder, H., Abe T. and Brechue, W.F., *Relationship between body composition, blood volume and maximal oxygen uptake*. Equine vet. J., Suppl. 34 (2002) 485-490

Knight, P.K., Sinha, A.K. and Rose, R.J. *Effects of training intensity on maximum oxygen uptake*. Equine Exercise Physiology 3: 77-82, 1991

Koninckx, P.H., De Moor, P. and Brosens, I.. *Continuous blood-sampling*. Lancet 12: 904. 1974

Kowarski, C.R. and Kowarski, A. *Constant blood withdrawal method for area under plasma concentration-time curve*. J. pharm. Sci. 67, 875-876. 1978

Kraemer, M.J., Dziados, J.E., Gordon, S.E., Marchitelli, L.J., Fry, A.C. and Reynold, K.L. *The effects of graded exercise on plasma proenkephalin peptide F and catecholamine responses at sea level*. European Journal of Applied Physiology, 61: 214-217. 1990

Kramer, W.J. and Ratamess, N.A. *Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training*. Sports. Med. 35, 339-361. 2005

Kurosawa, M., Nagata, S., Takeda, F., Mima, K., Hiraga, A., Kai, M. and Taya, K. *Plasma catecholamine, adrenocorticotropin and cortisol responses to exhaustive incremental treadmill exercise of the Thoroughbred Horse*. Equine J. Sci. Vol. 9, No 1, pp. 9-18. 1998

Langestmo, I. and Poole, D.C. *VO₂ kinetics in the horse following moderate, heavy, and severe exercise*. J. Appl. Physiol. 86(4): 1170-1177, 1999

Langsetmo, I., Weigle, G.E., Fedde, M.R., Erickson, H.H., Barstow, T.J. and Poole, D.C. *VO₂ kinetics in the horse during moderate and heavy exercise*. J. Appl. Physiol. 83(4) 1997

Lehmann, M., Kapp, R., Hemelsbach, M. and Keul, J. *Time and intensity dependent catecholamines responses during graduated exercise as an indicator of fatigue and exhaustion*. Biochemistry of Exercise, 13: 738-748. 1983

Lehmann, M., Keul, J., Huber, G. and Daprada, M. *Plasma catecholamines in trained and untrained volunteers during graduated exercise*. International Journal of Sports Medicine, 2: 143-147. 1981

Lehmann, M., Schmid, P., and Keul, J. *Plasma catecholamines and blood lactate cumulation during incremental exhaustive exercise.* International Journal of Sports Medicine, 6:78-81. 1985

Leuenberger, U., Sinoway, L., Gubin, S., Gaul, L., Davis, D., Zelis, R. *Effects of exercise intensity and duration on norepinephrine spillover and clearance in humans.* J Appl Physiol.;75(2):668-74. 1993

Martin, W.H., Dalsky, G.P., Hurley, B.F., Mathews, D.E., Bier, D.M., Hagberg, J.M., Rogers, M.A., King, D.S. and Holloszy, J.O. *Effects of exercise training on plasma free fatty acid turnover and oxidation during exercise.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 75: E708-E714. 1993

Martinez, R., Godoy, A., Naretto, E. and White, A. *Neuroendocrine changes produced by competition stress on the thoroughbred race horse.* Comp. Biochem. Physiol., 91, A599-A602. 1988

McDonough, P., Kindig, C.A., Erickson, H.H. and Poole, D.C. *Mechanistic basis for the gas exchange threshold in thoroughbred horses.* J Appl Physiol 92: 1499-1505, 2002

McDonough, P., Kindig, C.A., Ramsel, C., Poole, D.C. and Erickson, H.H. *The effect of treadmill incline on maximal oxygen uptake, gas exchange and the metabolic response to exercise in the horse*. Departments of anatomy, physiology and kinesiology, Kansas State University, Manhattan, KS 66506, USA 2002

Mckeever, K.H. and Hinchcliff, K.W. *Neuroendocrine control of blood volume, blood pressure and cardiovascular function in horses*. Equine vet. J. Suppl. 18, 77-81. 1995

McKendry, J.B. *A technic for continuous in vivo sampling of blood through an 18-gauge channel*. Metabolism 17, 148-154. 1968

McMurray, R.G. and Hackney, A.C. *Interactions of metabolic hormones, adipose tissue and exercise*. Sports. Med. 35, 393-412. 2005

Mori, Y., Sawasaki, T., Yeh, J.T. and Kano, Y. *An apparatus for automatic blood sampling*. Jpn. J. vet. Sci. 41: 677. 1979

Nagata, S., Takeda, F., Kurosawa, M., Mima, K., Hiraga, A., Kai, M. and Taya, K. *Plasma adrenocorticotropin, cortisol and catecholamines responses to various exercises*. Equine vet. J. Suppl. 30: 570-574. 1999

Padilla, D.J., McDonough, P., Kindig, C.A., Erickson, H.H. and Poole, D.C. *Ventilatory dynamics and control of blood gases after maximal exercise in the Thoroughbred horse*. J. Appl. Physiology 96: 2187-2193. 2004

Pacák, K., Palkovits, M. *Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders*. Endocr. Rev.;22(4):502-48. 2001

Paoletti et al., *Farmacologia generale e molecolare* III edizione UTET Torino, 2004

Peronnet, F., Beliveau, L., Boudreau, L., Trudeau, G., Brisson, F., G. and R. Nadeau. *Regional plasma catecholamine removal and release at rest and exercise in dogs*. Am. J. Physiol. 254, R663-R672. 1988

Persson, S. *On blood volume and working capacity in horses. Studies of methodology and physiological and pathological variations*. Acta vet. Scand., Suppl 19: 189. 1967

Podolak, M., Kedzierski, W. and Bergero, D. *Comparison of the blood plasma catecholamines level in Thoroughbred and Arabian*

horses during the same-intensity exercise. Polish Journal of Veterinary Sciences Vol. 9, No 1: 71-73. 2006

Poehlmann, E.T., Tremblay, A., Nadeau, J., Dussault, J., Theriault, G. and Bouchard, C. *Heredity and changes in hormones and metabolic rates with short-term training. Am. J. Physiol. 250: E711-E717. 1986*

Ramer Mikkelsen, U., Gissel, H., Fredsted, A. and Clausen, T. *Excitation-induced cell damage and β_2 -adrenoceptor agonist stimulated force recovery in rat skeletal muscle. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 290: R265-R272. 2006*

Ronsen O., Pedersen, B.K., Rasmussen Øritsland, T., Bahr, R. and Kjeldsen-Kragh, J. *Leukocyte counts and lymphocyte responsiveness associated with repeated bouts of strenuous endurance exercise. J. Appl. Physiol. 91: 425-434. 2001*

Rose, R.J., Hendrickson, D.K. and Knight, P.K. *Clinical exercise testing in the normal thoroughbred racehorse. Australian Veterinary Journal, Vol 67, No 10, October 1990*

Rose, R.J., Hodgson, D.R., Bayly, W.M. and Gollnick, P.D. *Kinetics of VO_2 and VCO_2 in the horse and comparison of five methods*

for determination of maximum oxygen uptake. Equine vet. J. Suppl. 9: 39-42. 1990

Scheinin, M., Sallinen, J., Haapalinna, A. *Evaluation of the α_2C -adrenoceptor as a neuropsychiatric drug target studies in transgenic mouse model. Life Science, 68: 2277-2285. 2001*

Silverman, H.G., Mazzeo, R.S. *Hormonal responses to maximal and submaximal exercise in trained and untrained men of various ages. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 51(1):B30-7. 1996*

Sir-Petermann, T., Recabarren, S.E., Bittl, A., Jager, W., Zimmerman, U. and Wildt, L. *A simple device for serial blood collection in human subjects and animals. Expt. Clin. Endocrinol. Diabetes 103, 398-401. 1995*

Snow, D.H., Harris, R.C. *Thoroughbred and greyhounds: biochemical adaptations in creatures of nature and of man. Circulation, Respiration and Metabolism. Ed: R. Gilles. Springer-Verlag, Berlin: 227-259. 1985*

Snow, D.H., Harris, R.C., McDonald, I.A., Forster, C.D. and Marlin, D.J. *Effects of high-intensity exercise on plasma*

catecholamines in the Thoroughbred horse. Equine Vet. Journal., 24: 462-467. 1992

Stevenson, E.T., Davy, K.P., Seals, D.R. *Maximal aerobic capacity and total blood volume in highly trained middle-aged and older female endurance athletes. J. Appl. Physiol.;77(4):1691-6. 1994*

Swenson M.J., Reece, W.O. *Fisiologia degli animali domestici^{dukes}*. Edizione italiana Gruppo Editoriale Idelson-Gnocchi, Napoli. 2002

Taylor, H.L., Buskirk, E., Henschel, A. *Maximal oxygen intake as an objective measure of cardio-respiratory performance. J Appl Physiol.;8(1):73-80. 1955*

Thomas, D.P. and Fregin, G.F. *Cardiorespiratory and metabolic responses to treadmill exercise in the horse. J. Appl. Physiology: Respirat. Environ. Exercise Physiol. 50(4): 864-868. 1981*

Thornton, J.R., Dowsett, K.F., Mann, R. and Boderio D.A.V. *Influence of anabolic steroids on the response to training of 2-year-old horses. Equine Exercise Physiology: 503-508. 1991*

Tyler, C.M., Golland, L.C., Evans, D.L., Hodgson, D.R. and Rose, R.J. *Changes in maximum oxygen uptake during prolonged training, overtraining, and detraining in horses.* J. Appl. Physiology 81(5): 2244-2249. 1996

Wallace, L.D. and Troy, K.E. *Office-based spirometry for early detection of obstructive lung disease.* Journal of the American of Nourse Practitioners 18, 414-421, 2006

2.0 RINGRAZIAMENTI

I ringraziamenti più sentiti sono rivolti ai miei genitori ai quali ho dedicato questa tesi, con lo scopo di scusarmi perché tutti i giorni dovrei ricordarmi di dirvi grazie, un grazie per avermi lasciato scegliere liberamente la mia strada, grazie per avermi permesso di percorrerla, grazie per avermi aiutato a farlo e per avermi sostenuto quando credevo che non ci sarei riuscita e grazie per il bene che mi volete e per la comprensione che avete avuto tutte le volte che sono stata insopportabile.

Un ringraziamento speciale per Molly e Blue, compagni pazienti durante le ore di studio e amici fedeli in quelle di svago.

Ringrazio gli amici che ho incontrato in questi anni e che avranno sempre un posto importante nel mio cuore.

Grazie a Claudia per avermi aiutato negli ultimi due anni a creare questa tesi con allegria ed affetto.

Grazie a Paolo per avermi aiutato e sopportato negli ultimi mesi.

Grazie al personale del dipartimento di Anatomia, Biochimica e Fisiologia per i sorrisi, l'aiuto e l'amicizia mostratami.

Ringraziamenti al Dipartimento di Produzioni animali con sede a San Piero a Grado per aver offerto l'utilizzo del treadmill e delle strutture di stabulazione per i cavalli oltre ad aiuti importanti durante l'esecuzione dei test.

Un ringraziamento ai relatori.

Un grazie speciale al Prof. Sighieri per la pazienza e la comprensione.

