



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

BIOLOGIA E BIOCHIMICA DELL'UOMO E DELL'AMBIENTE

Ciclo XXVIII

**IL PRECONDIZIONAMENTO ISCHEMICO E LA
REGOLAZIONE DELL'APPARATO CARDIOVASCOLARE:
RUOLO DELLE TERMINAZIONI NERVOSE LIBERE III E IV**

Settore scientifico disciplinare di afferenza

Bio/09

Presentata da:	Dott. Francesco Corona
Coordinatore Dottorato	Prof. Emanuele Sanna
Tutor	Dott. Antonio Crisafulli

Esame finale anno accademico 2014 – 2015

Indice

1. Introduzione	3
1.1. <i>Regolazione cardiovascolare in corso di esercizio</i>	3
1.2. <i>Riflesso pressorio d'esercizio: metaboriflessi e ruolo delle fibre afferenti di tipo III e IV</i>	7
1.3. <i>Il preconditionamento ischemico</i>	12
1.4. <i>Effetti del preconditionamento ischemico sulla prestazione sportiva</i>	20
2. Scopo del lavoro	21
3. Materiali e metodi	22
3.1. <i>Popolazione studiata</i>	22
3.2. <i>Protocollo</i>	22
3.3. <i>Valutazione emodinamica durante l'attivazione dei metaboriflessi</i>	25
3.4. <i>Analisi dei dati</i>	27
4. Risultati	29
5. Discussione	35
6. Limiti dello studio	38
Bibliografia	39

1. INTRODUZIONE

1.1 Regolazione cardiovascolare in corso d'esercizio

La regolazione cardiovascolare in corso di esercizio fisico è un fenomeno estremamente complesso che coinvolge più meccanismi di controllo dell'apparato cardiovascolare al fine di rispondere a due esigenze fondamentali dell'organismo: da un lato fornire un'adeguata quantità d'ossigeno che soddisfi la domanda metabolica dei muscoli in esercizio e un adeguato smaltimento dei metaboliti prodotti, dall'altro mantenere un'adeguata perfusione degli organi vitali evitando eccessive variazioni della pressione arteriosa [1]. La stretta relazione tra domanda energetica muscolare e funzione cardiovascolare appare evidente se si mettono in relazione la portata cardiaca (CO) e il consumo di O₂ durante esercizio fisico dinamico. La CO infatti, normalmente, aumenta linearmente in funzione del O₂ consumato [2-8]. Le attività sportive che coinvolgono grandi masse muscolari, come la corsa e il ciclismo, inducono una notevole vasodilatazione metabolica nelle arteriole che irrorano i muscoli, riducendo le resistenze vascolari sistemiche (SVR). Questa riduzione delle SVR, se non prontamente tamponata dai meccanismi di controllo tramite un contemporaneo aumento della CO, sarebbe causa di un marcato calo della pressione arteriosa con conseguente compromissione della perfusione dei muscoli, del cervello e degli altri organi vitali. L'esercizio dinamico è infatti caratterizzato da un piccolo aumento della pressione arteriosa media (MAP) e questo aumento avviene e si mantiene nonostante la forte riduzione delle SVR indotta dalla vasodilatazione metabolica [3, 9-11].

Durante la contrazione il muscolo scheletrico rilascia diversi metaboliti con effetto vasodilatatorio, tra cui potassio, adenosina, ioni idrogeno, biossido di carbonio e fosfato. Durante l'esercizio fisico si ha anche un aumento della produzione di ossido nitrico (NO), altra sostanza con potente effetto vasodilatatore [12,13]. L'aumento della CO viene ottenuta tramite un aumento della frequenza cardiaca (HR) e della gittata sistolica (SV) che vanno a contrastare la riduzione delle SVR. Questa regolazione cardiovascolare, frutto dell'interazione di più meccanismi, è estremamente efficace e consente un raggiungimento della pressione arteriosa

ottimale anche in assenza di risposta di una delle variabili regolatorie del sistema [14,15].

Queste risposte sono sorrette da meccanismi meccanici, pompe respiratorie e muscolo-scheletriche, che spingono il sangue verso il cuore migliorando in questo modo il precarico cardiaco e la SV e da meccanismi nervosi che regolano il tono vagale e il flusso al fine di soddisfare le richieste metaboliche dei muscoli in esercizio. Per quanto riguarda i meccanismi meccanici, entrambe le pompe, contribuiscono all'aumento della SV e della CO durante esercizi dinamici anche se la pompa muscolo-scheletrica sembrerebbe giocare un ruolo più importante in virtù di una maggiore capacità di incidere sul ritorno venoso al cuore migliorando il precarico cardiaco e aumentando la SV tramite il reclutamento del meccanismo di Frank-Starling [11, 16-21].

Per quanto riguarda invece i meccanismi nervosi di questa regolazione, l'esercizio fisico induce una riduzione del tono parasimpatico e un aumento del tono simpatico, in funzione dell'intensità della prestazione e delle dimensioni delle masse muscolari coinvolte [22, 23]. La riduzione del tono parasimpatico causa l'aumento della frequenza cardiaca mentre l'aumento del tono simpatico, oltre che aumentare la frequenza cardiaca, migliora la contrattilità miocardica al fine di incrementare la SV, induce veno-costrizione per favorire il ritorno venoso, aumenta le resistenze vascolari dei visceri addominali e dei distretti muscolari non interessati dall'esercizio, preserva la maggior parte della CO per la perfusione della muscolatura attiva, dove avviene, come detto in precedenza, una vasodilatazione metabolico-mediata.

La modulazione autonoma della risposta cardiovascolare necessita per funzionare di un meccanismo neurale centrale e di alcuni meccanismi periferici. Il meccanismo centrale, chiamato "Central Command", attiva quelle regioni del cervello responsabili del reclutamento delle unità motorie e delle aree di controllo cardiovascolare situate nel midollo. Presumibilmente il Central Command stabilisce il livello basale di attività simpatica per l'apparato cardiovascolare in base all'intensità dell'attività motoria che si sta compiendo [24-26].

Questo schema di base dell'attività autonoma viene a sua volta regolato dalle informazioni periferiche provenienti dai recettori meccanici e metabolici presenti

all'interno della muscolatura scheletrica che, di riflesso, modulano il tono simpatico sulla base delle condizioni registrate nel muscolo in attività, secondo un meccanismo noto come "riflesso pressorio d'esercizio". L'aumento del tono simpatico derivante dall'attivazione del Central Command e del riflesso pressorio d'esercizio è causa dei suddetti aggiustamenti della frequenza cardiaca, della contrattilità miocardica e del ritorno venoso che insieme concorrono all'aumento della CO [24, 25, 27-30].

La stimolazione simpatica è a sua volta modulata dai baro-riflessi, presenti principalmente a livello del seno carotideo e nell'arco aortico. I baro-riflessi si attivano qualora sia necessario contrastare eventuali incongruenze tra resistenze vascolari e CO che porterebbero a variazioni eccessive della pressione arteriosa, intervenendo sul controllo della vasodilatazione nei muscoli e sul cronotropismo cardiaco [27, 31, 32].

Un altro meccanismo che contribuisce a questa modulazione del simpatico è costituito dagli input sensoriali provenienti dai chemocettori arteriosi [33]. I chemocettori arteriosi sono piccoli gruppi di cellule situati in prossimità dei barocettori che inviano al sistema nervoso centrale segnali che inducono una stimolazione simpatica in risposta ad una diminuzione della pressione parziale di O₂, o ad un aumento della pressione parziale di CO₂ nel sangue arterioso.

In estrema sintesi, possiamo affermare che lo stato emodinamico in corso di esercizio viene modulato dal sistema nervoso tramite una fine integrazione di segnali centrali provenienti dal cervello (Central Command) e di segnali periferici provenienti da diversi meccanismi di controllo (meccanoriflessi, metaboriflessi, baroriflessi, chemoriflessi arteriosi). Il risultato finale di questa complessa regolazione è una prevalenza dell'attività simpatica sull'apparato cardiovascolare a discapito di quella parasimpatica con conseguente aumento della frequenza e della contrattilità cardiaca e vasocostrizione arteriosa del letto vascolare di organi e tessuti non impegnati dall'esercizio. Inoltre, la venocostrizione indotta dall'aumento del tono del simpatico e l'attivazione della pompa muscolare indotta dall'attività, favoriscono un migliore ritorno venoso e un incremento del precarico cardiaco, che sostengono l'aumento della SV e della CO comunemente osservati durante esercizio dinamico.

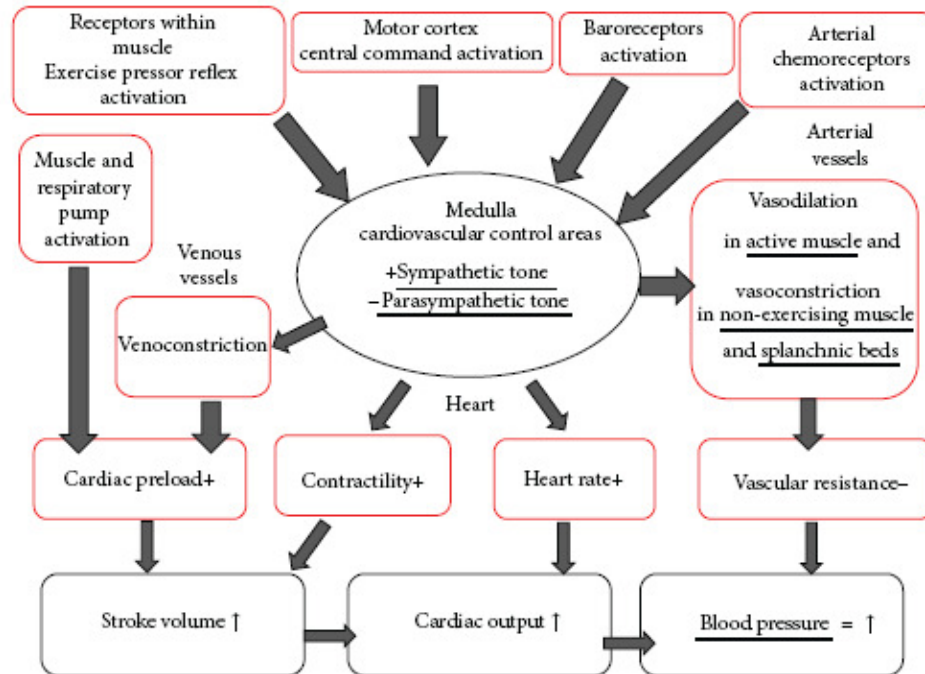


Figura 1. La figura mostra sinteticamente gli aggiustamenti cardiovascolari in corso di esercizio fisico dinamico e mette in evidenza la stretta interrelazione tra informazioni centrali e periferiche che permettono la fine modulazione dello stato emodinamico [34].

Al termine dell'esercizio questa situazione viene prontamente invertita, il Central Command riduce o abolisce del tutto la sua attività e cessano gli stimoli provenienti dai recettori metabolici e meccanici del muscolo. Questa nuova situazione porta alla riduzione dell'attività del simpatico e all'aumento del tono parasimpatico con conseguente diminuzione di frequenza e contrattilità cardiaca, di SV, di CO e MAP [19, 21, 35, 36].

Inoltre, alla fine dello sforzo la pompa muscolare riduce o, in caso di recupero passivo, cessa l'attività e il riempimento cardiaco diminuisce rapidamente riducendo di conseguenza anche la SV, evento che comporterebbe una brusca caduta della MAP se contemporaneamente non intervenissero una vasocostrizione periferica e un aumento di HR mediata dai baro riflessi [19, 37, 38].

1.2 Riflesso pressorio d'esercizio: metaboriflessi e ruolo delle fibre afferenti di tipo III e IV

Sulla base delle caratteristiche anatomiche ed elettrofisiologiche le fibre nervose afferenti dalla muscolatura scheletrica vengono suddivise in 4 gruppi: I, II, III, IV [39]. Di queste si ritiene che le fibre a conduzione lenta dei gruppi III e IV possano essere attivate da stimoli di tipo meccanico e chimico [40,41].

Mentre le fibre afferenti del gruppo III, maggiormente sensibili a distorsioni di tipo meccanico, agirebbero da meccanocettori muscolari, quelle del gruppo IV sembrerebbero particolarmente adatte a rispondere a stimoli di tipo chimico e agirebbero come metabocettori, dando origine nel loro complesso, al riflesso pressorio d'esercizio [42, 43, 44].

Sebbene le fibre di tipo IV presentino un tempo di insorgenza lento, compatibile con i tempi occorrenti alla formazione dei metaboliti muscolari e la loro frequenza di scarica si sia vista aumentare gradualmente col perdurare della contrazione e quindi dell'accumulo di metaboliti, è probabile che non siano le uniche coinvolte in questa risposta. Infatti sembrerebbe che esista una sottopopolazione delle fibre afferenti dei gruppi III e IV a carattere polimodale, con la capacità di rispondere a stimoli sia meccanici che chimici [42, 45] e evidenze che suggeriscono la possibilità di una sensibilizzazione dei meccanocettori ad opera dei metaboliti muscolari [43].

Le informazioni relative alle condizioni meccaniche (lunghezza e tensione del muscolo, compressione dei tessuti, deformazione causata dalle contrazioni) e metaboliche (quantità di accumulo dei metaboliti) dei muscoli coinvolti nell'esercizio vengono quindi trasmesse alle aree di controllo cardiovascolare che opereranno gli adattamenti emodinamici necessari al fine di regolare il flusso sanguigno.

Le afferenze muscolari dei Gruppi III e IV proiettano al corno dorsale del midollo spinale. Per quanto riguarda le vie centrali di questo complesso meccanismo sembrerebbe che le cellule responsive al riflesso pressorio d'esercizio si trovino nel midollo allungato, localizzate nel nucleo del tratto solitario, nel midollo rostrale ventrale, nel midollo caudale ventrolaterale, nel campo tegmentale laterale, nel nucleo ambiguo e nella regione ventromediale della sostanza grigia periacqueduttale [25, 43, 46, 47, 48, 49].

Per quanto riguarda i metabocettori, ossia le fibre nervose attivate dall'accumulo dei metaboliti nel muscolo, sembrerebbero essere sensibili a varie sostanze come l'acido lattico, il potassio, la bradichinina, i prodotti dell'acido arachidonico, l'ATP, il fosfato diprotonato e l'adenosina [49-51]. Per quanto concerne il meccanismo d'innescio della reazione non è ancora chiaro se esista una soglia di stimolazione per i metabocettori e se questi operino solo in determinate condizioni, ossia quando l'intensità del lavoro è abbastanza elevata per fare sì che ci sia un reale accumulo di metaboliti nel muscolo, o se operino anche in condizioni di lavoro blando quando la sostanziale assenza di discrepanza fra richiesta e apporto di sangue al muscolo fa sì che non ci sia un reale accumulo di queste sostanze. Alcuni autori riportano un valore di pH intorno alle 6,9 unità come valore soglia di attivazione del riflesso metabolico muscolare e mettono in evidenza come la MAP aumenti linearmente alla diminuzione del pH [52]. Altri studi, inoltre, riportano come decrementi del pH intramuscolare siano associati all'aumento di attività del simpatico, suggerendo così una possibile relazione tra glicolisi e produzione di lattato nel muscolo e attivazione del riflesso [53-55]. Questi risultati consentono di ipotizzare che i metaboriflessi siano attivati dall'accumulo di metaboliti ossia ogni volta che il flusso di sangue al muscolo non sia sufficiente a garantire un apporto d'ossigeno adeguato e un efficiente smaltimento dei metaboliti, agendo sostanzialmente per correggere eventuali incongruenze tra flusso di sangue al muscolo e metabolismo, sovrapponendosi all'attività del Central Command [25, 28, 55].

Tuttavia in un lavoro di Andreani e collaboratori sui gatti [43] viene riportato come fibre del gruppo IV siano sensibili anche ad un basso livello di attività quando ancora non vi sia nessuna discrepanza tra afflusso di sangue e esigenze metaboliche della muscolatura. Questo suggerirebbe un ruolo attivo nella regolazione cardiovascolare da parte del riflesso metabolico anche in assenza di accumulo di metaboliti e di discrepanze tra richieste e perfusione del muscolo.

Questi dati confermano i risultati di Strange e colleghi [24], che in un loro lavoro mettono in evidenza come il ruolo del riflesso metabolico nell'uomo sia essenziale per raggiungere una normale risposta pressoria anche in esercizi di bassa intensità e non in grado di suscitare una risposta, in termini di HR, al di sopra dei 100 bpm. Questi risultati descrivono uno scenario in cui il riflesso metabolico sia responsabile

di un feedback tonicamente attivo nelle aree di controllo cardiovascolare sin dall'inizio della contrazione muscolare e dell'attivazione del metabolismo [56, 57].

Dal punto di vista emodinamico l'attivazione del riflesso metabolico si traduce in un incremento della pressione arteriosa ad opera della vasocostrizione periferica simpatica con conseguente aumento delle SVR [25, 28, 30, 58].

Per quanto riguarda gli effetti del riflesso sulla HR, durante l'esercizio, l'aumento del tono simpatico al nodo del seno, derivante dalla sua attivazione, dovrebbe portare ad un suo incremento che a sua volta dovrebbe ripercuotersi sulla CO e sulla SV. Questo effetto tuttavia non è sempre rilevabile e in buona parte dipende dal tipo di protocollo utilizzato sperimentalmente per l'evocazione del riflesso pressorio, ovvero se sul muscolo interessato dall'esercizio viene indotta una riduzione del flusso sanguigno durante il lavoro o al cessare dello stesso per creare una condizione di ischemia finalizzata ad intrappolare i metaboliti prodotti durante la contrazione muscolare, il cosiddetto metodo del post-exercise muscle ischemia (PEMI) [27, 59, 60]. Questa metodica consente di isolare gli effetti dei metaboriflessi da quelli dovuti all'attivazione dei meccanoriflessi e al Central Command. In questo caso gli effetti sulla HR possono essere mascherati dal concomitante aumento del tono parasimpatico dovuto alla disattivazione del controllo centrale poiché il muscolo in questa fase si trova in uno stato di riposo [60]. Inoltre, in questa condizione, è possibile un'attivazione dei baro-riflessi arteriosi, che in risposta all'aumento pressorio causato dai metaboriflessi, porta ad un ulteriore aumento del tono parasimpatico che funge da tampone dell'elevata attività simpatica sul cuore e sui vasi arteriolari [29]. Il risultato finale di questo meccanismo è una riduzione della HR nonostante il tono simpatico verso il cuore venga mantenuto alto [27, 61].

Mentre l'effetto del riflesso metabolico sulle SVR e sulla HR è ben definito e accettato, meno si sa circa la sua influenza sull'emodinamica centrale, cioè su CO, SV, contrattilità miocardica e precarico cardiaco.

In uno studio condotto sui cani, O'Leary e Augustyniak [62], hanno messo in evidenza come il riflesso metabolico fosse in grado di aumentare le prestazioni ventricolari e mantenere la SV costante nonostante un concomitante aumento di HR e la conseguente riduzione del tempo di riempimento diastolico. Diversi studi inoltre riportano come anche nell'uomo la contrattilità miocardica e la SV possano

aumentare durante l'attivazione dei metaboriflessi indotta da ischemia post esercizio [30, 63-66]. L'obiettivo di questa risposta è il mantenimento della CO ostacolato dall'aumento del post carico che si verifica a seguito della vasocostrizione [56]. Tuttavia questi effetti non trovano unanime condivisione poiché in letteratura sono presenti risultati contrastanti e alcuni lavori sostengono che la SV non venga coinvolta nella risposta a questo riflesso [61, 67, 68].

Questa diversità di risultati potrebbe risiedere nelle diverse metodiche sperimentali utilizzate, infatti mentre in alcuni studi vengono utilizzati esercizi dinamici, in altri gli esercizi proposti sono di tipo isometrico, modalità che potrebbe indurre una maggiore risposta pressoria con conseguente aumento del post carico e impossibilità di una risposta in termini di aumento della SV. Invece, nei protocolli con esercizi dinamici che evocano i metaboriflessi durante ischemia post esercizio, l'aumento di contrattilità cardiaca e di SV appare più evidente e sostanzialmente si pone come unico sistema dell'apparato cardiovascolare per mantenere la CO in risposta alla bradicardia e alla vasocostrizione [30].

Un altro meccanismo d'azione indotto dai metaboriflessi sembrerebbe essere rappresentato dalla capacità di aumentare la pressione di riempimento cardiaco attraverso vasocostrizione splancnica e venocostrizione per migliorare il ritorno venoso e sostenere la SV e la CO [67, 69, 70].

In generale la risposta emodinamica all'attivazione dei metaboriflessi sembrerebbe essere un fenomeno altamente integrato in grado di incidere su più parametri come HR, funzioni cardiache, precarico e post-carico e che la regolazione cardiovascolare derivante non dipenda esclusivamente da un aumento delle SVR. Sembrerebbe inoltre che la strategia scelta per ottenere la risposta pressoria sia legata alla presenza di riserva cardiaca (possibilità del cuore di aumentare la contrattilità), condizione necessaria per poter aumentare la SV e strettamente dipendente dall'intensità dell'esercizio. Se questa riserva è presente la risposta pressoria indotta dai metaboriflessi si orienterà principalmente sull'aumento della SV e della CO, in caso contrario, come in attività di alta intensità, dove questo non è più possibile, il sistema baserà la sua risposta sulla vasocostrizione periferica e sull'aumento delle SVR [30, 71].

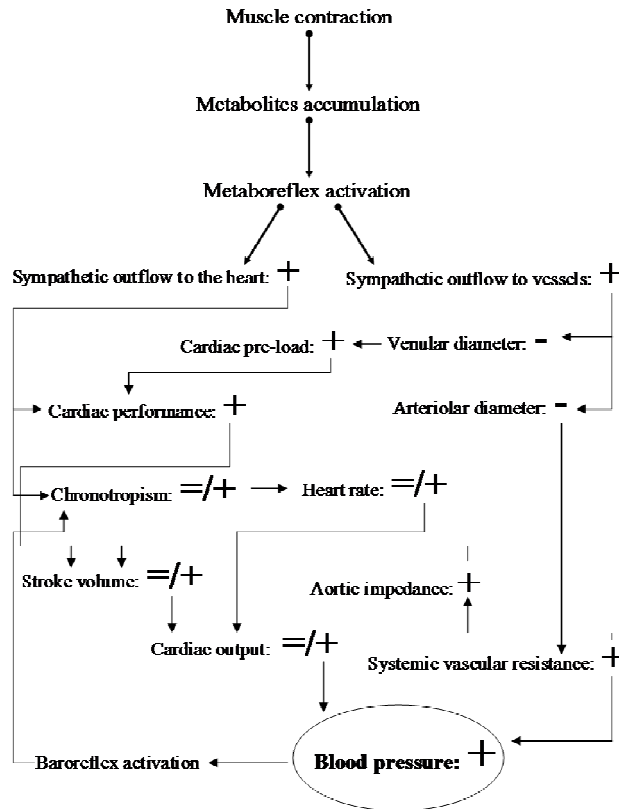


Figura 2. La Figura 2 mostra i presunti meccanismi attraverso i quali i metaboriflessi agiscono per aumentare la pressione arteriosa [72].

Un punto dibattuto è se i metaboriflessi agiscono come meccanismo di innalzamento del flusso per preservare la perfusione muscolare durante l'esercizio fisico. Sembrerebbe che, per mantenere la pressione di perfusione sistemica, durante esercizi dinamici di intensità moderata o alta, che coinvolgono grandi masse muscolari (per esempio correre, nuotare, andare in bicicletta etc.), questo riflesso possa intervenire nel limitare l'eccessiva vasodilatazione e l'eccessivo flusso sanguigno al muscolo indotto dall'accumulo di metaboliti. In questo caso il riflesso interverrebbe in risposta alla vasodilatazione più per preservare la pressione sistemica che per migliorare la perfusione del muscolo in attività. Nell'uomo, le evidenze di un effetto di innalzamento del flusso da parte dei metaboriflessi durante esercizio dinamico moderato sono molto limitate. Presumibilmente un effetto di innalzamento del flusso può verificarsi durante esercizio sub massimale in

presenza di una ridotta produzione di metaboliti vasodilatatori nel muscolo in esercizio e di una sufficiente riserva di CO [73].

Gli effetti dell'attivazione dei metaboriflessi si ripercuotono anche a livello della circolazione coronarica. In esperimenti condotti su cani [74, 75] si è visto che, durante esercizio dinamico, l'aumento del tono simpatico, indotto dall'attivazione del riflesso, è in grado di attivare i recettori coronarici α -adrenergici con conseguente effetto di vasocostrizione che andrebbe a limitare la vasodilatazione metabolica indotta a livello dell'albero coronarico dovuta al sostanziale aumento del lavoro cardiaco (maggiore CO nei confronti di un post-carico più elevato). Questi effetti sono stati osservati nell'uomo in test di occlusione circolatoria post esercizio dove si è visto che alla diminuzione del lavoro cardiaco e all'attivazione dei metaboriflessi faceva seguito una significativa vasocostrizione coronarica che veniva invertita in una vasodilatazione dopo blocco α -adrenergico [74-76].

M. Coutsos e collaboratori [77], in un loro esperimento condotto su cani, riportano inoltre come questa limitazione simpatica alla vasodilatazione coronarica in corso di esercizio si traduca in una limitazione funzionale all'aumento di contrattilità ventricolare.

In sintesi, è possibile affermare che il riflesso pressorio d'esercizio opera regolando tutti i quattro modulatori emodinamici per conseguire l'obiettivo della regolazione della pressione sanguigna: HR, contrattilità, precarico e post-carico cardiaco. Una perdita di risposta in uno o più di questi modulatori porta ad aggiustamenti emodinamici anormali durante esercizio fisico [34].

1.3 Il preconditionamento ischemico

Molti dei metaboliti visti in precedenza implicati nella risposta circolatoria ai metaboriflessi sono coinvolti anche nel fenomeno noto come preconditionamento ischemico (IP), ossia in un meccanismo in grado di rendere il cuore maggiormente resistente ad un'ischemia prolungata tale da determinare una necrosi delle cellule miocardiche.

Il cuore è in grado di adattarsi e di cambiare il proprio fenotipo in risposta a vari tipi di stress con lo scopo di diventare più resistente al ripetersi nel tempo degli stessi

eventi stressanti. Diversi fenomeni, come miocardio stordito, miocardio ibernato e preconditionamento, testimoniano questa capacità [78].

Il preconditionamento identifica la proprietà di vari tipi di stimoli quali l'ischemia, lo stress da calore, alcuni farmaci e l'esercizio fisico di creare una serie di adattamenti a livello cardiaco in grado di rendere il cuore maggiormente resistente a successivi insulti di carattere ischemico.

La forma classica di preconditionamento è il preconditionamento ischemico e consiste nella capacità di brevi periodi di ischemia miocardica di proteggere il cuore da episodi ischemici successivi di maggiore entità e in grado di indurre infarto del miocardio. L'esistenza di questo fenomeno è nota già dagli anni ottanta e si deve a Murry e collaboratori che in un loro lavoro condotto su cani hanno messo in evidenza come il IP sia in grado di ridurre in modo significativo le dimensioni dell'infarto del miocardio [79]. Dai dati presentati in questo lavoro l'effetto di riduzione della necrosi da infarto appare estremamente marcato con una diminuzione da un previsto 30% ad un effettivo 7% dell'area a rischio e questo effetto era indipendente allo sviluppo di circoli collaterali.

Successivamente diversi lavori hanno riportato sovrapponibili effetti di riduzione dell'infarto da parte del IP anche in numerose altre specie di mammiferi [80-84], tanto che da allora il fenomeno viene riconosciuto come la forma più efficace di protezione in vivo contro danno da ischemia del miocardio [78].

Oltre a questo effetto di riduzione della necrosi, il IP si è dimostrato efficace anche nel proteggere il cuore dai danni causati da ischemia-riperfusioni come le aritmie ventricolari e il miocardio stordito [85-88]. Inoltre, il IP sembrerebbe interessare anche la reattività coronarica, diminuendo il flusso totale e riducendo il tempo di picco di flusso nell'iperemia reattiva coronarica. Mentre il primo effetto è attribuito ad una riduzione del metabolismo del miocardio attraverso l'attivazione dei recettori A1 per l'adenosina, quest'ultimo invece, è probabilmente dovuto ad un aumento del rilascio endoteliale di NO, suggerendo che, oltre ad un effetto protettivo sul miocardio, il IP esercita anche un effetto diretto sulla capacità di risposta dell'endotelio vascolare coronarico (preconditionamento vascolare) [83].

Gli effetti del preconditionamento ischemico nel ridurre la dimensione dell'infarto nell'uomo non possono essere dimostrati direttamente per l'ovvia impossibilità di

indurre un infarto ad esseri umani per motivi sperimentali. Tuttavia l'ipotesi che il fenomeno possa essere efficace come nei modelli animali e che anche i cardiomiociti umani possano essere condizionati è sostenuto da diverse prove indirette. Studi in vitro su miociti atriali umani hanno dimostrato che la contrattilità e il tempo di recupero dopo un'ischemia sostenuta è significativamente più breve se quest'ischemia viene preceduta da una manovra di preconditionamento [89, 90]. Inoltre studi condotti in corso di angioplastica coronarica riportano come i segni elettrocardiografici (innalzamento del tratto ST) e clinici (dolore al petto) di ischemia del miocardio siano attenuati dopo il gonfiaggio del catetere a palloncino, che può essere considerato come una manovra di preconditionamento [91-93]. Un'altra prova indiretta può essere considerata la casistica che vede l'infarto del miocardio preceduto da angina, che può essere assimilato ad una vera e propria manovra di preconditionamento, di dimensioni più piccole e con esiti più favorevoli dopo la terapia trombolitica rispetto all'infarto non preceduto da angina [94-98].

Il IP è contraddistinto da 2 fasi o "finestre" temporali, descritte per la prima volta nel 1993 da Kuzuya e collaboratori e da Marbel e collaboratori [99, 100]. Una prima fase nota come prima finestra di protezione (FWOP) o preconditionamento precoce, ed una seconda fase detta seconda finestra di protezione (SWOP) o preconditionamento tardivo.

Nel preconditionamento precoce gli effetti protettivi si estrinsecano immediatamente e hanno una durata di circa 2-3 ore per poi svanire, mentre il preconditionamento tardivo si sviluppa 12-24 ore dopo l'ischemia iniziale e i suoi effetti si estendono per 72-90 ore.

Oltre che per la durata FWOP e SWOP differiscono anche negli effetti che hanno a livello del miocardio. Infatti, mentre SWOP sembrerebbe più efficace nell'attenuazione del miocardio stordito, FWOP sembrerebbe esercitare un effetto più efficace nella riduzione della dimensione infartuale [101, 102].

Il meccanismo e la catena di eventi cellulari che portano a questo effetto cardioprotettivo non è allo stato attuale ancora del tutto conosciuto.

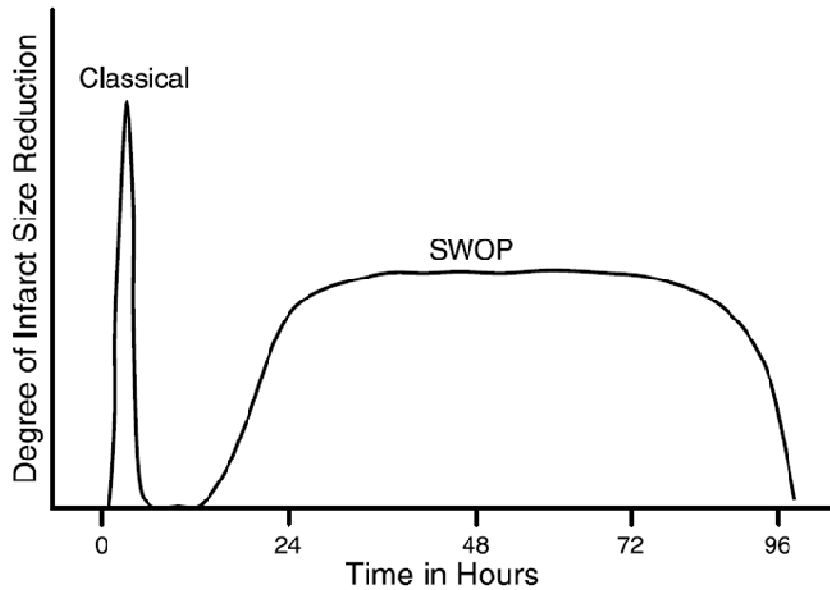


Figura 3. La Figura 3 rappresenta schematicamente le due fasi del preconditionamento ischemico, precoce (Classical) e tardivo (Second Window of Protection, SWOP) [84].

Diversi lavori riferiscono del ruolo dell'adenosina in questo processo. Sembrerebbe che l'accumulo di adenosina intracellulare prodotta dalla degradazione dell'ATP che avviene durante i periodi di ischemia indotti dalle manovre di preconditionamento, precedenti ad un'ischemia più prolungata, vada a stimolare i recettori dell'adenosina A1 e A2, dando inizio ad una complessa cascata metabolica che ha come risultato finale questa protezione [80, 103].

Questo importante ruolo dell'adenosina viene evidenziato anche da alcuni lavori che mettono in evidenza come la somministrazione di agonisti dell'adenosina siano in grado di conferire protezione, effetto che svanisce alla somministrazione di bloccanti del recettore A1 [80, 104]. Inoltre nella sperimentazione in vivo è stato riferito come l'infusione di adenosina sarebbe in grado di attenuare i segni ischemici causati dal gonfiaggio del catetere a palloncino durante gli interventi di angioplastica [105, 106].

Esistono inoltre diverse altre sostanze rilasciate dal cuore durante i periodi di ischemia, come le specie reattive dell'ossigeno (ROS), le specie reattive dell'azoto (RNS), la bradichinina e gli oppioidi, che attualmente vengono riconosciuti in grado

di indurre cardioprotezione [107-110]. Sembrerebbe che tutte queste sostanze lavorino di concerto, tramite le interazioni con i loro specifici recettori, il cui risultato finale sia l'attivazione della proteina chinasi C (PKC). Si ipotizza che l'effetto di preconditionamento si attivi solo al raggiungimento di una determinata soglia che non può essere raggiunta esclusivamente grazie all'accumulo di un singolo metabolita ma che necessita della sommazione degli effetti di tutti e, anzi, se uno di questi viene eliminato con la somministrazione di un antagonista la soglia non può più essere raggiunta [103].

Un ruolo molto importante viene attribuito alle specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto che, oltre ad essere coinvolti nella normale regolazione cellulare, nel mantenimento dello stato redox e nella trasduzione del segnale, vengono riconosciute tra i principali responsabili dell'attivazione reversibile della PKC osservata dopo ischemia e la loro attivazione può indurre attivazione reversibile o irreversibile di diverse proteine ed enzimi [111-116]. Questo ruolo viene confermato da alcuni studi che riferiscono come l'aumento degli scavengers (agenti "spazzini") atti a rimuovere e a ridurre la concentrazione di ROS e RNS blocchino l'effetto di cardioprotezione indotto dal preconditionamento [113, 117-119]. In sostanza, adeguate concentrazioni di ROS e RNS durante la riperfusione sarebbero in grado di modulare processi di segnalazione cellulare essenziali per la cardioprotezione indotta da IP [113, 120].

Gli eventi metabolici dopo l'attivazione della PKC sono solo parzialmente compresi. La PKC una volta attivata da questi metaboliti fosforila alcuni effettori, ad oggi non ancora identificati, che sarebbero i responsabili della resistenza all'ischemia. Oltre alla PKC anche altre chinasi sono state identificate come potenzialmente coinvolte nella cascata metabolica del IP, tra cui la tirosina chinasi e diverse proteine chinasi attivate da mitogeni (MAPK) che sembrerebbero avere un ruolo successivo all'attivazione della PKC [84, 121].

Se gli agenti coinvolti nella cascata metabolica dopo l'attivazione della PKC sono ancora fondamentalmente sconosciuti, almeno per quanto riguarda il processo che porta alla prima finestra di protezione, sembrerebbe che gli effettori finali della cardioprotezione indotta dal IP siano i canali del potassio ATP-sensibili (KATP), anche se l'esatto meccanismo che porta alla resistenza cellulare all'ischemia non è

ancora noto. Probabilmente, l'apertura di canali KATP può innescare diverse azioni efficaci nel limitare i danni cellulari, infatti è in grado di indurre depolarizzazione della membrana cellulare e accorciamento del potenziale d'azione, condizione che permette un risparmio energetico e impedisce l'ingresso di Ca^{2+} nella cellula e il fenomeno del sovraccarico, evento che può portare alla morte cellulare. Tutti questi effetti sono potenzialmente benefici e potrebbero spiegare l'azione protettiva dell'apertura dei KATP. Questi canali rimangono normalmente chiusi nel cuore non ischemico ma, durante ischemia, il calo dei livelli di ATP intracellulare ne causa l'apertura. Oltre che dai livelli di ATP l'apertura di questi canali è modulata anche da ADP, NO, Ph, acidi grassi, proteina G e vari ligandi quali adenosina e acetilcolina [122-124]. Questa ipotesi sulla loro funzione trova ampia conferma in letteratura dove è dimostrato come bloccanti dei KATP siano in grado di abolire la cardioprotezione indotta dal IP mentre molecole come cromakalim, bimakalim e pinacidil, in grado di indurre l'apertura dei canali del potassio, possano imitarne l'effetto [125-128].

Un altro meccanismo attraverso cui si ipotizza che il IP estrinsechi il suo effetto cardioprotettivo è rappresentato dalla sua azione sui pori di transizione della permeabilità mitocondriale (mPTP) [113, 120, 129]. È noto che i primi momenti della riperfusione dopo ischemia prolungata siano quelli maggiormente incriminati per l'instaurarsi di più o meno significativi danni d'organo, come lesioni da riperfusione, aritmie, disfunzione meccanica transitoria, lesioni micro vascolari e infiammazione [120, 130]. Nel periodo di riperfusione, quando il pH tende ad aumentare dopo la sua riduzione nel periodo di ischemia, si è visto che i mPTP sono aperti e la loro apertura prolungata causa il collasso del potenziale di membrana mitocondriale, gonfiore della matrice, rottura della membrana e infine apoptosi. Il IP sembrerebbe essere in grado di rallentare questo aumento post-ischemico del pH intracellulare bloccando così l'apertura dei mPTP e gli effetti dannosi a loro collegati [120, 131].

Gli eventi cellulari che portano alla protezione ritardata, ossia il periodo SWOP, sono ancora più complessi e meno conosciuti rispetto alla cascata molecolare della FWOP.

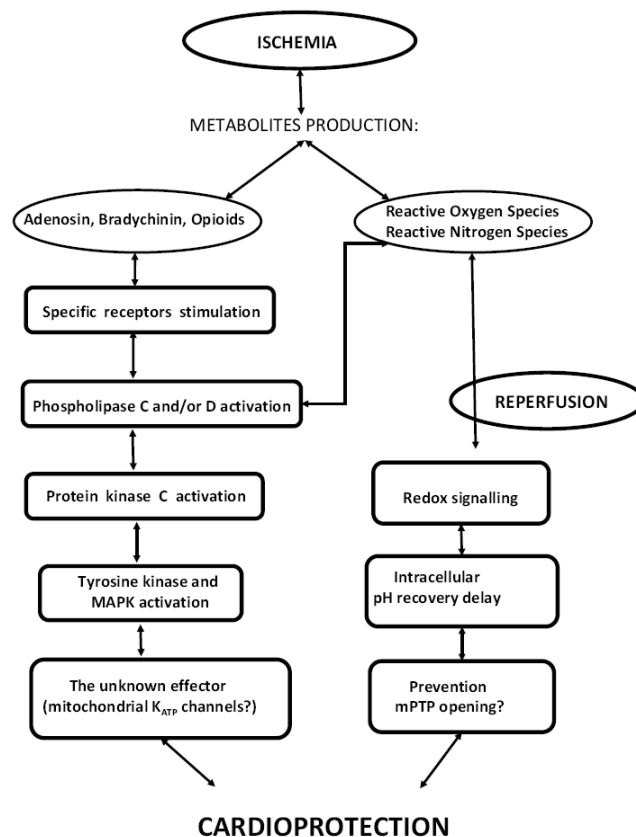


Figura 4. La figura 4 mostra schematicamente i presunti meccanismi della cascata indotta dal preconditionamento ischemico durante la prima finestra di protezione (FWOP) [132].

La sua comparsa 12-24 ore dopo il preconditionamento e la sua durata di circa 72-90 ore è presumibilmente legata al fatto che, perché si inneschi la protezione da essa accordata, è necessario che si completi l'espressione genica e la nuova sintesi proteica [101, 133].

Gli stessi stimoli che innescano FWOP, adenosina, bradichinina, radicali liberi dell'ossigeno e oppioidi, sembrerebbero essere responsabili anche nell'indurre SWOP [134-142]. Inoltre è ampiamente riconosciuto che le chinasi cellulari responsabili dell'apertura dei canali mKATP nel preconditionamento precoce possano anche attivare la trascrizione di geni che codificano alcune proteine cardioprotettive tra cui probabilmente sintetasi inducibile dell'ossido nitrico (iNOS),

ciclo ossigenasi 2 (COX-2), aldoso reduttasi, superossido dismutasi e proteine da shock termico (HSP) [143-155].

Gli effettori finali del preconditionamento ritardato rimangono ad oggi sconosciuti e si presume che siano costituiti da una complessa attivazione di più geni la cui espressione contemporanea indirizzi il cuore verso un fenotipo più resistente all'insulto ischemico [101].

Alcuni dati suggeriscono che i canali $mKATP$ siano una componente anche del preconditionamento ritardato e che la loro apertura sia necessaria per l'instaurarsi di questa protezione [156].

Un ruolo fondamentale nel fenomeno SWOP è svolto dall'ossido nitrico che si ritiene partecipi al percorso di segnalazione dalla prima finestra di protezione alla seconda ed agirebbe inoltre da innesco per quest'ultima. Durante le manovre di preconditionamento, la riduzione del pH, che abbiamo visto precedentemente verificarsi nei vasi coronarici, attiva una chininogenasi che promuove la produzione di bradichinina che attraverso l'interazione coi recettori B_2 endoteliali, a sua volta, stimola la produzione di NO da eNOS (ossido nitrico sintasi endoteliale) [102, 145].

L'NO generato da eNOS attiva la PKC che a sua volta attiva le chinasi responsabili per la trascrizione dei geni che codificano per le proteine cardioprotettive di SWOP, tra cui iNOS che sembrerebbe essere un mediatore essenziale nel preconditionamento ritardato [101, 143, 146, 157, 158].

Il ruolo dell'NO nell'innescare il fenomeno della protezione tardiva sarebbe legato alla sua capacità di aprire direttamente i canali $mKATP$, rendendo in tal modo la cellula cardiaca maggiormente resistente a periodi di ischemia [159]. Il meccanismo ipotizzato vede l'NO generato inizialmente da eNOS coinvolto nell'innescare della cascata metabolica del preconditionamento precoce e nell'attivazione di iNOS che, a sua volta, produrrebbe l'NO coinvolto nella protezione ritardata [160]. Il ruolo dell'NO nel fenomeno del preconditionamento è confermato anche da diversi lavori, sia su animali che sull'uomo, che riportano come pretrattamento con donatori di NO, sia in condizioni di normossia che di ischemia, possa mimare gli effetti di SWOP [161-164].

1.4 Effetti del preconditionamento ischemico sulla prestazione sportiva

Oltre ai sopracitati effetti a livello cardiaco, recenti ricerche hanno messo in evidenza effetti positivi del IP anche sulle prestazioni muscolari. Nello specifico, sembrerebbe che se applicato precedentemente ad uno sforzo fisico, il IP sarebbe in grado di migliorare le prestazioni fisiche dei soggetti coinvolti. Questo effetto è stato visto in attività fisiche come handgrip, ciclismo, corsa e nuoto [165-171]. Questa capacità di migliorare la prestazione fisica non è tuttavia unanimemente accettata ed esistono diversi lavori che non hanno trovato alcuna relazione positiva tra IP e performance [172-175], mentre Paixao e collaboratori riportano addirittura degli effetti negativi [176].

I meccanismi attraverso i quali il IP condizionerebbe positivamente l'esercizio fisico sono ancora tutti da chiarire e le ipotesi formulate sinora rimangono in gran parte speculative. Considerato che alcuni studi hanno dimostrato come questi effetti si verificano indipendentemente dalla risposta cardiaca [165, 166, 168, 177], è probabile che i meccanismi coinvolti siano correlati sia a fenomeni locali a livello muscolare che a livello vascolare e alla sensazione di fatica percepita. Nel muscolo preconditionato si è visto che l'aumento di formazione di NO migliora la funzione vascolare e la perfusione contrastando così la vasocostrizione simpatica [166, 177, 178]. Inoltre le manovre di IP possono promuovere un moderato effetto di risparmio dell'ATP rendendo la contrazione muscolare più economica e quindi più efficace [179, 180]. Infine è stato ipotizzato che il IP sia in grado di mitigare la sensazione di stanchezza riducendo la frequenza di scarica delle terminazioni afferenti del gruppo III e IV il cui feedback inibirebbe il controllo centrale delle unità motorie aumentando la fatica centrale e limitando in tal modo la performance [165, 181, 182].

2. Scopo del lavoro

Come detto in precedenza le terminazioni nervose di tipo III e IV esercitano un contributo essenziale nella regolazione cardiovascolare durante attività fisica attivando il riflesso pressorio d'esercizio, che, insieme con il central command, è responsabile dell'aumento dell'attività simpatica durante esercizio fisico [34, 57, 183]. La loro stimolazione inoltre inibirebbe il controllo centrale delle unità motorie aumentando la sensazione di fatica centrale [181, 182]. In sintesi le terminazioni nervose di tipo III e IV esercitano un duplice ruolo:

- a. garantiscono adattamenti cardiovascolari efficaci durante l'esercizio
- b. inducono la sensazione di fatica.

Se il IP può effettivamente ridurre l'attività delle afferenze di tipo III e IV, allora è possibile ipotizzare che, oltre all'effetto sulla fatica, possa anche ridurre la risposta emodinamica all'attivazione dei metaboriflessi.

In base a questa ipotesi, il presente lavoro si prefigge lo scopo di indagare se il IP sia in grado di esercitare effetti sulla risposta emodinamica durante l'attivazione dei metaboriflessi tramite la riduzione della frequenza di scarica delle fibre del gruppo III e IV.

Se questo fosse vero, il IP dovrebbe ridurre la risposta pressoria durante l'attivazione dei metaboriflessi, riducendo la risposta di uno o più dei principali modulatori emodinamici su cui il riflesso opera: frequenza cardiaca, contrattilità miocardica, pre-carico e post-carico.

3. Materiali e metodi

3.1 Popolazione studiata

Il presente studio ha coinvolto quattordici soggetti maschi di età compresa tra 25-48 anni (media \pm deviazione standard (SD) $33,2 \pm 6,4$ anni), di altezza e massa rispettivamente di $175,4 \pm 7,6$ centimetri e $71,5 \pm 7,2$ kg. Tutti sono stati giudicati sani sulla base di un esame medico preliminare. Dalla visita è emerso che nessuno aveva sofferto di malattie cardiache o respiratorie o stava assumendo alcun farmaco al tempo della sperimentazione. Tutti i soggetti esaminati erano normotesi e non fumatori e sono stati tenuti all'oscuro della natura dell'esperimento. Inoltre è stato chiesto loro di astenersi da bevande alcoliche e caffeina nelle 24 ore precedenti le sessioni sperimentali. Lo studio è stato eseguito secondo la Dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal comitato etico locale. Il consenso informato scritto è stato firmato da tutti i partecipanti prima della somministrazione dei test.

3.2 Protocollo

Esame preliminare. I soggetti sono stati sottoposti a un esame medico generale con ECG ed ecocardiogramma per escludere la presenza di un qualsiasi problema cardiovascolare. La visita medica è stata seguita da un test cardiopolmonare (CPX) con un analizzatore di gas (ULTIMA CPX, MedGraphics St. Paul, MN) su un cicloergometro elettromagneticamente frenato con monitoraggio ECG (CUSTO Med, Ottobrunn, Germania) per valutare la loro capacità fisica.

Test per la valutazione dei metaboriflessi. Dopo un intervallo di 4-7 giorni dalla visita preliminare, i soggetti sono stati sottoposti ad un test per misurare la loro contrazione massima volontaria (MVC) durante handgrip. I soggetti dovevano premere per 1 s un dinamometro idraulico (MAP 1.1, Kern, Balingen, Germania) con la massima forza possibile. Come MVC è stato considerato il picco raggiunto in 5 compressioni massimali, intervallate da almeno 30 s ed eseguite in posizione

seduta. Il test è stato eseguito col braccio dominante. Una volta stabilita l'MVC è stato applicato il protocollo per studiare la risposta cardiovascolare all'attivazione dei metaboriflessi e per valutare gli effetti del IP sull'emodinamica durante la sua attivazione, con prove assegnate in modo casuale e con sessioni distanziate da intervalli di tempo di almeno quattro giorni (range 4-9 giorni). Il test ha previsto 3 sessioni:

a. *Ischemia muscolare post esercizio (PEMI).*

Questa sessione era composta da tre minuti di riposo seguiti da tre minuti di esercizio fisico dinamico-ritmico all'handgrip ad una frequenza di 30 compressioni al minuto, scandite da un metronomo, con lo stesso dinamometro utilizzato per la valutazione della MVC e nella stessa posizione seduta. Il carico di lavoro è stato fissato al 30% di MVC. La fase di esercizio è stata seguita da tre minuti di occlusione del braccio interessato dal lavoro. L'ischemia è stata indotta rapidamente (in meno di tre secondi) gonfiando alla fine dell'esercizio un bracciale pneumatico posto all'altezza del bicipite e gonfiato ad una pressione di 50 mmHg sopra la pressione sistolica massima raggiunta durante l'esercizio stesso. Al termine dell'occlusione sono stati monitorati altri tre minuti di recupero. Pertanto, la durata totale della seduta è stata di 12 minuti. Questo protocollo, anche se eseguito con un carico di lavoro blando, è stato riconosciuto in grado di intrappolare i metaboliti muscolari nell'arto in esercizio e di mantenere la stimolazione dei metabocettori provocando in tal modo risposte emodinamiche sostanziali in termini di contrattilità cardiaca, precarico, e modulazione del post-carico [30, 64, 184-187]. Inoltre, questo protocollo consente di isolare l'attività dei metaboriflessi da quella derivante dal central command e dall'attivazione dei meccanoriflessi, dal momento che durante il PEMI questi due riflessi cardiovascolari non operano più [34,60,67].

b. *Controllo del recupero dopo esercizio (CER).*

Questa sessione prevedeva sostanzialmente lo stesso protocollo utilizzato per PEMI ma nei minuti di recupero dopo l'esercizio non veniva indotta nessuna occlusione e venivano monitorati così i restanti 6 minuti del test.

c. *Ischemia muscolare post esercizio dopo preconditionamento ischemico (IP-PEMI).*

In questa sessione i soggetti sono stati sottoposti allo stesso protocollo descritto per la sessione PEMI ma la prova veniva preceduta da una manovra di preconditionamento ischemico. Il IP è stato ottenuto occludendo la circolazione dell'avambraccio tramite il gonfiaggio di un bracciale pneumatico posto all'altezza del bicipite e gonfiato ad una pressione di 50 mmHg al di sopra della pressione arteriosa sistolica del soggetto. Il protocollo durava 30 minuti ed era composto dall'alternanza di 5 minuti di occlusione e di 5 minuti di riperfusione per un totale di 15 minuti di occlusione. I soggetti iniziavano il PEMI dopo 5 minuti dal termine di IP. Questo protocollo è già stato utilizzato in studi simili [165, 188].

Durante le fasi del preconditionamento della sessione IP-PEMI, per valutare la presenza o meno di flusso arterioso è stato utilizzato un Eco-Doppler (M5 Diagnostic Ultrasound System Mindray Bio-Medical Electronics Co., Shenzhen, Cina) dotato di trasduttore lineare a 5,0 MHz. Il trasduttore è stato posizionato a livello della tabacchiera anatomica per visualizzare l'arteria radiale. La velocità del sangue è stata ripresa con un angolo di insonazione di 60°. Inoltre, durante le manovre di preconditionamento, è stata utilizzata la sonda di uno spettroscopio nello spettro infrarosso (NIRS) (PortaMon, Atrinis Medical Systems, Elst, Olanda) posizionata sull'avambraccio nel punto di maggiore circonferenza e coperta con un panno scuro per evitarne l'esposizione alla luce ambientale. Questo dispositivo è dotato di un sistema di onde continue a doppia lunghezza d'onda ed utilizza contemporaneamente la legge di Beer-Lambert modificata e la spettroscopia risolta

spazialmente [189, 190]. Il PortaMon è in grado di valutare i cambiamenti di ossiemoglobina (O_2Hb) nei tessuti analizzati. Durante il test il sistema NIRS è stato collegato ad un computer portatile tramite Bluetooth per l'acquisizione e la conversione dei dati ad una frequenza di campionamento di 10 Hz. Questa metodica è stata applicata per vedere se durante il preconditionamento ci fosse o meno una riduzione dell'ossigenazione muscolare che confermasse ulteriormente la presenza di ischemia.

Task failure. Al termine dei test PEMI e CER e dopo la prova IP-PEMI, ciascun soggetto ha eseguito una serie di contrazioni all'handgrip con un ritmo di 1 contrazione al secondo, nella stessa posizione, con lo stesso braccio e con lo stesso dinamometro descritto per il protocollo MVC. È stata impostata sul dinamometro una forza pari al 45% della MVC ed è stato chiesto di eseguire l'esercizio sino ad esaurimento, considerato come il momento in cui non erano in grado di mantenere il livello di potenza richiesto per almeno tre contrazioni consecutive. Un simile protocollo è già stato utilizzato per indagare gli effetti del IP sulla fatica [167]. Il tempo necessario per raggiungere il task failure è stato preso con un cronometro manuale. Sia i partecipanti alla sperimentazione che gli operatori sono stati tenuti all'oscuro dei tempi realizzati dai soggetti nelle varie prove. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in un ambiente a temperatura costante e controllata (22 ° C - umidità relativa 50%).

3.3 Valutazione emodinamica durante l'attivazione dei metaboriflessi

Nel corso delle sessioni sperimentali, durante l'attivazione dei metaboriflessi, i dati emodinamici dei vari soggetti sono stati raccolti tramite cardiografia a impedenza (NCCOM 3, BoMed Inc., Irvine, CA). Questa metodica consente la valutazione emodinamica continua e non invasiva ed è stata ampiamente utilizzata in contesti sperimentali analoghi [30, 60, 64, 70, 184]. In sintesi, la procedura di acquisizione dei dati prevede diversi passaggi. Inizialmente, le tracce analogiche dell'elettrocardiogramma, dell'impedenza toracica (Z_0) e della derivata dell'impedenza toracica ottenute col cardiografo a impedenza vengono registrate e

salvate per mezzo di un registratore digitale (ADInstruments, PowerLab 8SP, Castle Hill, Australia) ad una frequenza di 500Hz. In seguito le tracce memorizzate vengono usate per calcolare HR e SV battito per battito. Nello specifico la frequenza cardiaca è stata calcolata come il reciproco dell'intervallo R-R dell'elettrocardiogramma, la gittata sistolica è stata determinata utilizzando l'equazione di Sramek-Bernstein [191] e la gittata cardiaca è stata calcolata con la formula $SV \cdot HR$. Dalle tracce impedenziometriche sono stati valutati inoltre: il periodo di pre-eiezione (PEP) e il tempo di eiezione ventricolare (LVET) [30, 192], il tempo diastolico (DT) valutato sottraendo la somma di PEP e LVET dalla durata del ciclo cardiaco e il tasso di riempimento ventricolare (VFR) ottenuto dividendo SV per DT [30, 185, 186, 193].

Per la misurazione della pressione arteriosa sistolica (SBP) e diastolica (DBP) è stato utilizzato uno sfigmomanometro manuale standard posizionato sull'arto non dominante e quindi non interessato dall'esercizio nel protocollo, mentre la pressione arteriosa media è stata calcolata utilizzando la formula proposta da Moran e collaboratori [194]. Le resistenze vascolari sistemiche (SVR) sono state calcolate come $(MAP/CO) \cdot 80$, dove 80 è un fattore di conversione per ottenere un'unità di misura standard di resistenza.

Sono state raccolte anche le misure del ventricolo sinistro con l'utilizzo dell'ecocardiografia bidimensionale (M5 Diagnostic Ultrasound System Mindray Bio-Medical Electronics Co., Shenzhen, Cina). Grazie all'impiego di una sonda ecografica manuale da 3,5 MHz sono stati misurati il volume telediastolico (EDV) e il volume telesistolico (ESV) in posizione apicale delle quattro camere. I volumi sono stati calcolati automaticamente dal software tramite una formula tradizionale: $8A^2 / 3\pi L$, dove A è l'area del ventricolo sinistro e L la massima lunghezza del ventricolo [195]. La zona ventricolare è stata determinata tracciando manualmente il bordo interno dell'endocardio e la sua lunghezza è stata misurata come distanza tra l'apice del ventricolo sinistro e il punto medio della mitrale.

Inoltre sono state acquisite e salvate immagini ecocardiografiche a riposo e durante il terzo minuto di recupero sia nel test PEMI che nei test CER e IP-PEMI. Se le immagini venivano considerate di buona qualità da parte dell'operatore, veniva registrato un frame di 6 s e analizzato in seguito da un operatore esterno che non era a conoscenza del protocollo di studio. Per l'analisi dei dati di ogni singola prova

sono stati presi in considerazione almeno tre battiti (range 3-6 battiti). La frazione di eiezione ventricolare sinistra (EF) è stata calcolata secondo la formula $(EDV-ESV/EDV) \cdot 100$.

Dalle stesse registrazioni utilizzate per la valutazione dei volumi ventricolari sinistri sono stati rilevati anche il picco di velocità di riempimento ventricolare protodiastolico (E vel), il picco di velocità di riempimento ventricolare telediastolico (A vel) e il loro rapporto (E/A). Queste misure sembrerebbero correlare bene con la funzione diastolica ventricolare sinistra [196, 197].

3.4 Analisi dei dati.

Tutti i dati dello studio sono riportati come media \pm SD.

I dati emodinamici raccolti tramite la cardiografia a impedenza durante i test sono stati riportati come la media di oltre un minuto di monitoraggio. Per l'analisi statistica sono stati presi in considerazione i valori a riposo, al terzo minuto di esercizio e al sesto minuto di recupero. I parametri emodinamici raccolti dall'ecocardiografia (EDV, ESV, e EF) sono stati rilevati solo a riposo e al terzo minuto di recupero. L'analisi della varianza a due vie (ANOVA) è stata utilizzata per confrontare i dati emodinamici delle varie fasi dei test (riposo, esercizio fisico, recupero) con le tre sessioni proposte (PEMI, CER, IP-PEMI) seguita da Bonferroni post-hoc quando opportuno.

Per valutare ulteriormente l'attività dei metaboriflessi è stata impiegata la seguente procedura: è stata calcolata la differenza delle variabili registrate tra il periodo di ischemia post-esercizio del PEMI e quelle dei test IP-PEMI e CER al terzo minuto di recupero. Questa procedura consente di valutare la risposte dovute all'attività dei metaboriflessi [186, 198]. Le differenze delle variabili misurate dovute alla risposta dei metaboriflessi sono state analizzate mediante il t test per dati appaiati.

Per esaminare le differenze nelle tre sessioni del task failure è stata applicata l'ANOVA a una via per misure ripetute, seguita dal Tukey post-hoc quando necessario.

I dati della NIRS raccolti durante la fase di preconditionamento del test IP-PEMI sono il risultato della media di oltre cinque minuti di misurazione. I dislivelli di O_2Hb

sono stati analizzati con l'ANOVA a una via per misure ripetute, seguita da Tukey post-hoc, se necessario.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software GraphPad Prism e la significatività statistica è stata stabilita come $P < 0.05$ in tutti i casi.

4. Risultati

Il protocollo di studio è stato completato da tutti i soggetti reclutati. Non sono emersi durante l'esame preliminare e il CPX incrementale segni o sintomi di malattie né cardiache né respiratorie.

Il massimo consumo d'ossigeno rilevato è stato di $43,5 \pm 6,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$.

L'analisi statistica ha dimostrato che i parametri emodinamici iniziali, cioè i valori registrati prima dell'inizio dei test previsti dal protocollo, non differivano tra loro, indicando così che il IP non è stato in grado di influenzarne i valori a riposo.

Le misurazioni ecografiche Echo-Doppler durante le manovre di IP hanno dimostrato l'assenza di qualunque flusso arterioso nel distretto interessato, dimostrando che la pressione di 50 mmHg superiore a SBP è stata adeguata a creare ischemia. Questo è stato confermato anche dall'analisi NIRS che ha evidenziato una riduzione dei livelli di O₂Hb, rispetto al riposo, durante tutti i 3 cicli di 5 minuti di occlusione arteriosa. Questo parametro riaumentava verso i valori a riposo durante le fasi di riperfusione (Grafico 1).

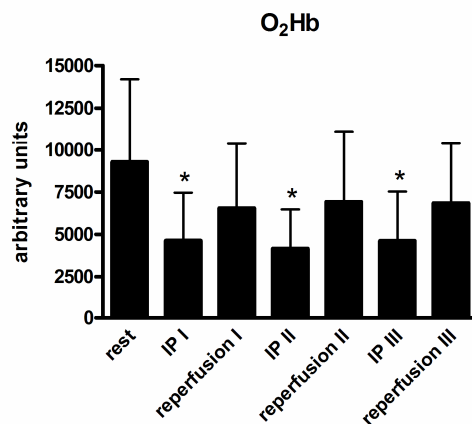
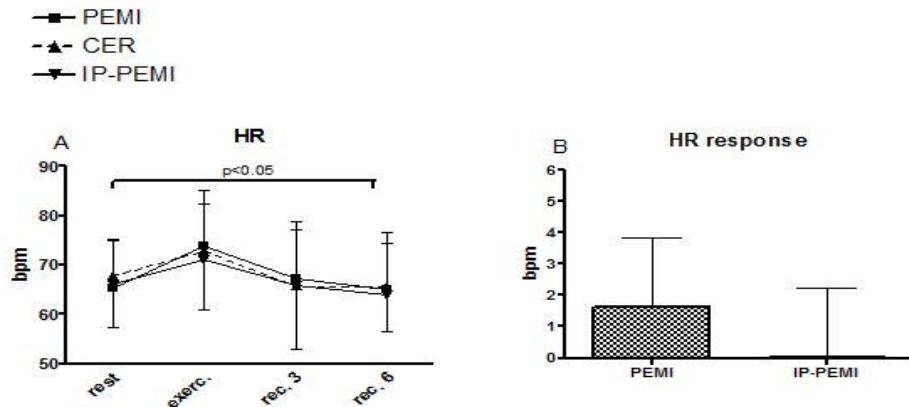


Grafico 1. Andamento di O₂Hb nelle diverse fasi del preconditionamento ischemico.

I valori medi di MVC raggiunti dai soggetti sono stati di $33,1 \pm 2,6 \text{ kg}$. Le compressioni all'handgrip nei test per la valutazione dei metaboliflessi sono state eseguite al 30% di MVC, ossia a $9,9 \pm 0,7 \text{ kg}$ mentre quelle per il test Task Failure al 45% di MVC, ossia a $14,9 \pm 1,1 \text{ kg}$.

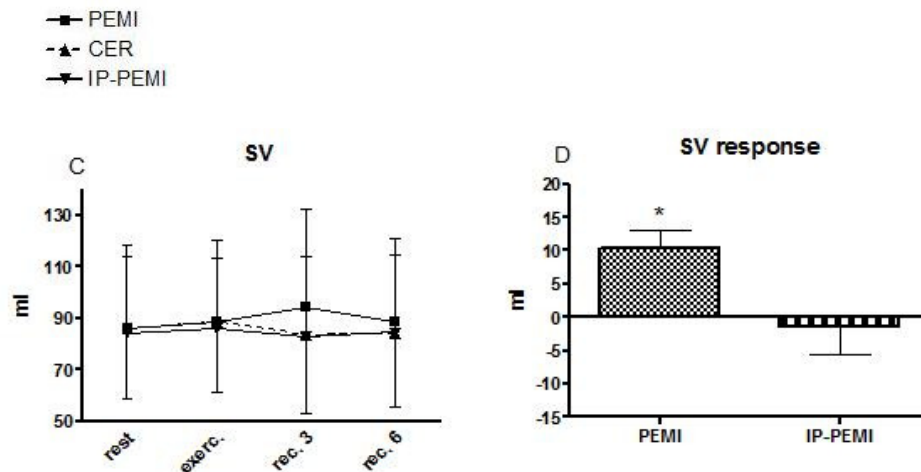
Le variazioni dei parametri emodinamici rilevate durante tutte le sessioni del protocollo vengono mostrate nei grafici seguenti.

L'HR non ha mostrato differenze tra i vari test ma è stata influenzata significativamente dal tempo (Grafico 2). Non sono state rilevate inoltre differenze statisticamente significative per HR tra il PEMI e il IP-PEMI (Grafico 3).



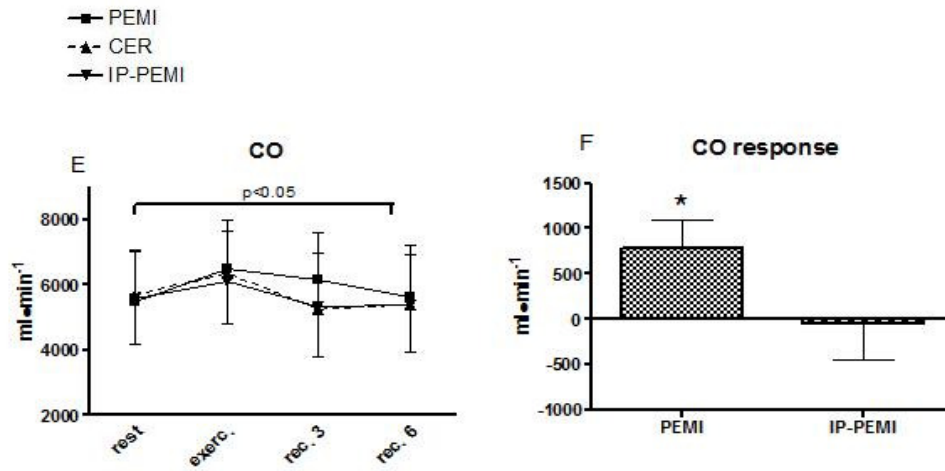
Grafici 2 & 3. Andamento della HR nelle tre sessioni di test e differenze nella risposta di HR tra PEMI e IP-PEMI.

La Gittata sistolica (Grafico 4) non è stata influenzata né dal tempo né dal tipo di test. Tuttavia, il test PEMI ha indotto una risposta della SV significativamente maggiore rispetto al test IP-PEMI (Grafico 5).



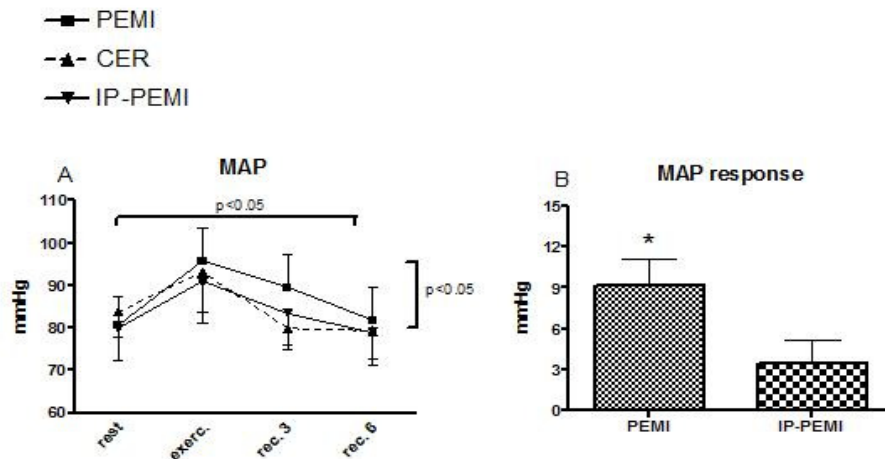
Grafici 4 & 5. Andamento della SV nelle tre sessioni di test e differenze nella risposta di SV tra PEMI e IP-PEMI.

Il comportamento di HR e SV ha portato nel corso del tempo ad un effetto significativo sulla CO (Grafico 6), mentre il tipo di test non ha esercitato alcun effetto. Inoltre, la risposta della CO era maggiore durante il PEMI che durante il test IP-PEMI (Grafico 7).



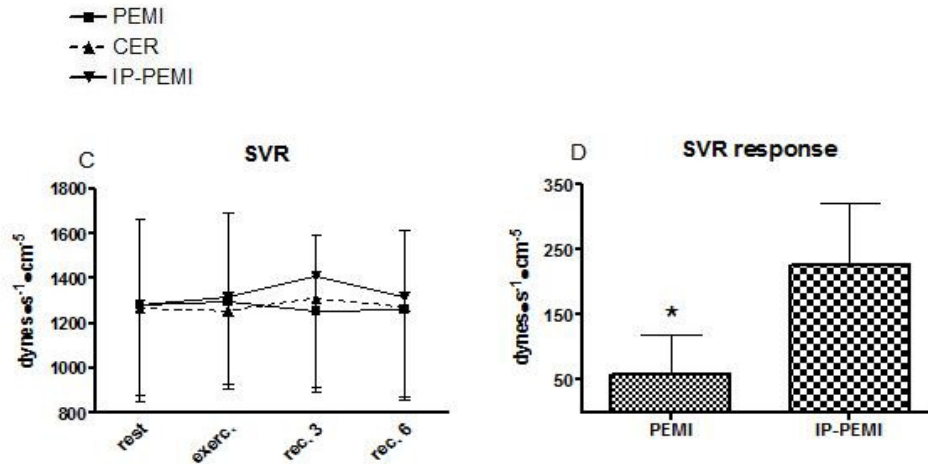
Grafici 6 & 7. Andamento della CO nelle tre sessioni di test e differenze nella risposta di CO tra PEMI e IP-PEMI.

La Pressione arteriosa media è stata significativamente influenzata sia dal tempo che dal tipo di test, ma non è emerso nessun effetto di interazione (Grafico 8). La risposta di MAP era più alta durante il PEMI che durante il test IP-PEMI (Grafico 9).



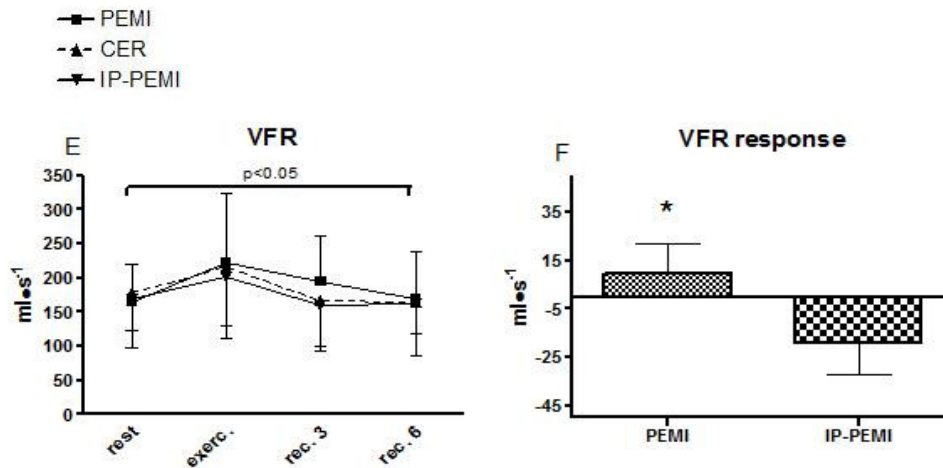
Grafici 8 & 9. Andamento di MAP nelle tre sessioni di test e differenze nella risposta di MAP tra PEMI e IP-PEMI.

Le SVR non sono state influenzate né dal tempo né dal tipo di test (Grafico 10). Tuttavia, come mostra il Grafico 11, la risposta delle SVR è stata più alta durante il IP-PEMI rispetto al PEMI.



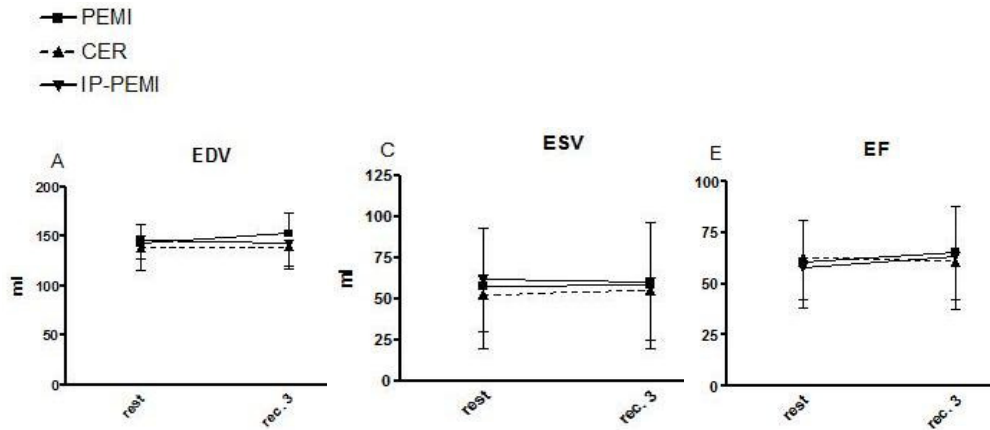
Grafici 10 & 11. Andamento di SVR nelle tre sessioni di test e differenze nella risposta di SVR tra PEMI e IP-PEMI.

Il tempo ha cambiato in modo significativo il decorso di VFR mentre i tipi di test non hanno influenzato questo parametro (Grafico 12). La risposta di questo parametro è stata maggiore durante il test PEMI rispetto al test IP-PEMI (Grafico 13).



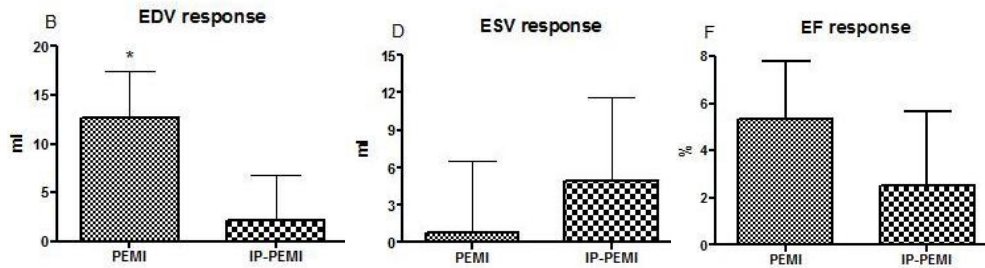
Grafici 12 & 13. Andamento di VFR nelle tre sessioni di test e differenze nella risposta di VFR tra PEMI e IP-PEMI.

I parametri EDV, ESV, e EF non sono stati influenzati né dal tempo né dal tipo di test (Grafici 14-16).



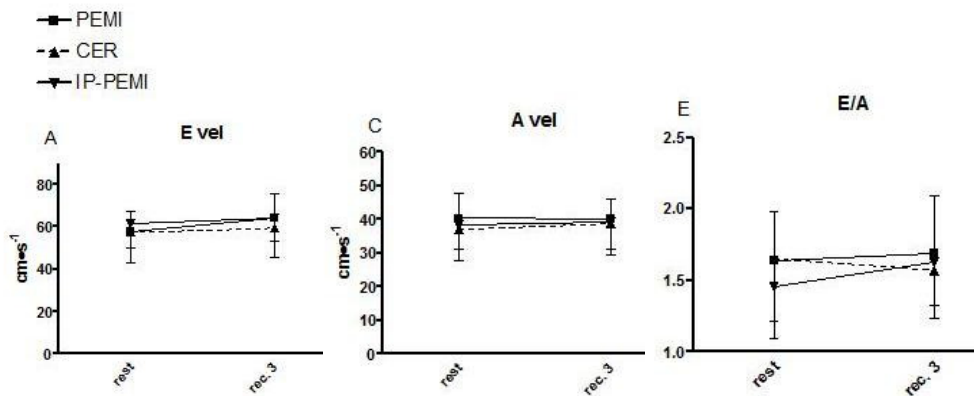
Grafici 14, 15 & 16. Andamento di EDV, ESV e EF nelle tre sessioni di test.

Nel confronto dei valori di questi parametri tra PEMI e IP-PEMI non sono emerse differenze per ESV e EF (Grafici 18 e 19) mentre si è trovata significatività per quanto riguarda EDV che è stato più alto durante il test PEMI (Grafico 17).

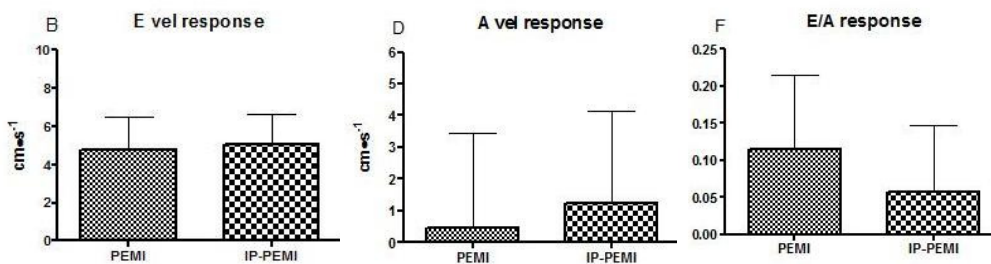


Grafici 17, 18 & 19. Differenze nelle risposte di EDV, ESV e EF tra PEMI e IP-PEMI.

Gli indici di funzionalità diastolica miocardica rilevati con ecografia Echo-Doppler, E vel, A vel, e E/A, non sono stati influenzati né dal tempo né dal tipo di test (Grafici 20-22). Inoltre non sono emerse differenze significative in questi parametri nel confronto tra il test PEMI e il test IP-PEMI (Grafici 23-25).



Grafici 20, 21 & 22. Andamento di E vel, A vel e E/A nelle tre sessioni di test.



Grafici 23, 24 & 25. Differenze nelle risposte di E vel, A vel e E/A tra PEMI e IP-PEMI.

I tempi misurati nel Task Failure eseguito alla fine di ogni sessione di test non hanno mostrato nessuna differenza statisticamente significativa ($p = 0.42$) (Grafico 26). Nel dettaglio, i tempi registrati, sono stati: 118.1 ± 92.81 s per il PEMI, 132.22 ± 92.38 s per il CER e 125.13 ± 85.51 s per IP-PEMI.

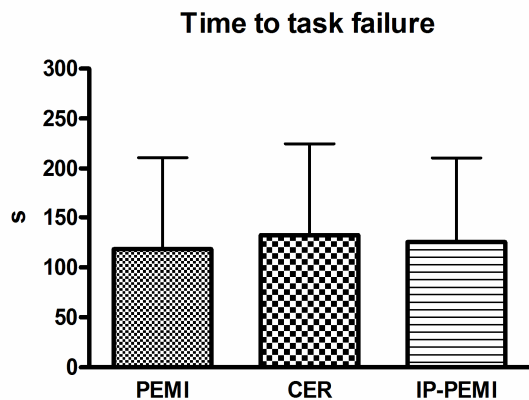


Grafico 26. Tempi ottenuti nel Task Failure nelle sessioni PEMI, CER e IP-PEMI.

5. Discussione

Dai dati del presente lavoro il principale risultato che emerge è che il preconditionamento ischemico è stato in grado di ridurre la normale risposta pressoria durante l'attivazione dei metaboriflessi. Dopo la manovra classica di preconditionamento eseguita nel test IP-PEMI, la tipica risposta pressoria, che normalmente viene osservata durante l'ischemia post-esercizio, è stata notevolmente ridotta. Di fatto abbiamo osservato una riduzione della risposta della MAP durante il test IP-PEMI rispetto al test PEMI. L'ipotesi iniziale del lavoro era quella di verificare se il preconditionamento ischemico fosse in grado di ridurre l'attività delle fibre nervose afferenti di tipo III e IV del muscolo.

Seppure i dati raccolti non siano in grado di confermare inequivocabilmente questa ipotesi, essa appare come la spiegazione più aderente allo scenario emodinamico emerso. La riduzione della MAP è stata la conseguenza di una ridotta risposta della SV dopo IP che ha determinato anche una ridotta risposta della CO che non è stata controbilanciata da un'adeguata variazione della HR. Infatti nei due impianti sperimentali, PEMI e IP-PEMI, la risposta della HR è stata del tutto simile. La riduzione della SV, presumibilmente, è da attribuire ad un'influenza negativa da parte del preconditionamento ischemico sul ritorno venoso al cuore che ha portato a valori di precarico diversi tra i due scenari. Durante il test IP-PEMI infatti i valori registrati di EDV e di VFR sono stati inferiori rispetto al test PEMI.

Ampie evidenze dimostrano che le funzioni diastoliche e la capacità di aumentare il pre-carico cardiaco sono importanti per raggiungere l'emodinamica normale durante l'attivazione dei metaboriflessi [67, 70, 185, 186] e che la capacità di centralizzare volumi di sangue mediante costrizione viscerale e venosa supporta la prestazione ventricolare reclutando il meccanismo di Frank-Starling durante questo riflesso [66, 67, 69,]. Inoltre, è stato recentemente riportato che, se tale meccanismo viene compromesso inducendo dilatazione venosa, l'incremento della MAP CO-mediata che avviene normalmente durante PEMI viene ridotta [185].

Nel presente lavoro, la riduzione di EDV e delle VFR, osservata dopo le manovre di IP, sono stati alquanto inaspettati. Dai dati raccolti non è possibile dare una spiegazione definitiva sul perché IP abbia causato una riduzione di questi parametri

ma è altamente improbabile che il preconditionamento abbia influito in maniera negativa alterando le proprietà diastoliche del cuore. In realtà gli indici di funzionalità diastolica analizzati (velocità onde E e A), non risultano esser stati influenzati. L'ipotesi più probabile è che la riduzione di EDV sia stata la conseguenza di una ridotta capacità di indurre costrizione venosa dopo IP. Questa ipotesi è supportata dal fatto che, come ampiamente riportato in letteratura, il IP può promuovere la produzione di NO a livello vascolare [132, 157]. Di recente, inoltre, è stato dimostrato come la somministrazione di "donatori" di NO prima dell'attivazione dei metaboriflessi possa compromettere il precarico cardiaco inducendo vasodilatazione venosa e riducendo la capacità di spingere volumi di sangue verso il cuore con conseguente impossibilità di reclutare il meccanismo di Frank-Starling [185]. Questo fenomeno è stato in parte responsabile di una minore risposta della SV e della MAP [185].

Anche nel presente impianto sperimentale è quindi possibile ipotizzare che le manovre di preconditionamento, eseguite prima del test per l'evocazione dei metaboriflessi, abbiano potuto aumentare la produzione di NO che a sua volta ha determinato una ridotta possibilità di indurre costrizione venosa. Coerentemente con questa ipotesi, durante il test IP-PEMI, sono stati registrati valori più bassi di SV e di CO che hanno portato ad una risposta minore della MAP. Tuttavia, non avendo avuto la possibilità di raccogliere misure dirette della produzione di NO durante l'esperimento, questa ipotesi non può essere confermata.

Inoltre, poiché NO induce vasodilatazione arteriolare, se la sua concentrazione fosse stata aumentata come ipotizzato, le SVR sarebbero dovute diminuire, mentre nella realtà sono aumentate. Questo andamento delle SVR si pone in netto contrasto anche con l'ipotesi iniziale che il IP sia in grado di ridurre l'attività delle afferenze di tipo III e IV, riducendo così la risposta della pressione arteriosa durante l'attivazione dei metaboriflessi. Una ridotta attività di queste afferenze avrebbe dovuto determinare un'attenuata attivazione simpatica e una riduzione delle SVR.

Una possibile spiegazione per l'aumento delle SVR riportate durante il test IP-PEMI è che la riduzione della MAP abbia determinato l'attivazione dei baroriflessi inducendo costrizione arteriolare per contrastare la ridotta CO attraverso l'aumento del post carico. Questo a sua volta ha parzialmente corretto la risposta della MAP

che però è rimasta a livelli inferiori rispetto al test PEMI. Questo fenomeno potrebbe aver mascherato ogni possibile dilatazione arteriolare indotta dall'aumento di produzione di NO dovuta al IP.

È possibile ipotizzare che la ridotta risposta della MAP dopo IP non sia dovuta tanto ad una riduzione dell'attività dei metabocettori quanto piuttosto alla capacità di IP di aumentare la produzione di NO e di indurre dilatazione venosa impedendo così la possibilità di aumentare il flusso diastolico per sostenere EDV e SV.

Lo scenario emodinamico così proposto vede il normale meccanismo flusso-mediato che fa aumentare la MAP durante l'attivazione dei metaboriflessi alterato dopo IP a causa dell'impossibilità di aumentare adeguatamente il precarico cardiaco. In questa situazione, i baroriflessi sono riusciti, almeno parzialmente, a sostenere la pressione arteriosa inducendo costrizione arteriolare.

Questa ipotesi è in linea con il concetto che la normale risposta emodinamica dovuta ai metaboriflessi dipenda dalla possibilità di regolare tutti i quattro principali modulatori emodinamici (HR, funzioni cardiache, pre-carico e post-carico) e che la possibilità di migliorare il precarico cardiaco sia un fattore chiave di questo meccanismo [66, 67, 69, 185].

Per quanto riguarda il test di Task Failure, il IP non è stato in grado di influenzare in alcun modo il tempo dell'esercizio. Questo fatto contrasta con l'ipotesi che il preconditionamento possa avere un ruolo nel migliorare la prestazione muscolare, almeno quando applicato a gruppi muscolari limitati come nel presente lavoro. In questa sperimentazione pertanto, non emerge nessun dato che possa avvalorare l'ipotesi che IP possa ridurre con successo la sensazione di fatica tramite la riduzione dell'attività afferente di tipo III e IV.

Va comunque considerato che, come riportato in precedenza, da un lato, queste afferenze inducono la sensazione di stanchezza, mentre dall'altro, assicurano aggiustamenti cardiovascolari efficaci per l'esercizio. Così, bloccando queste fibre si può inibire la sensazione di fatica, ma si ostacola anche la risposta cardiovascolare, limitando in tal modo la prestazione fisica [57, 183].

6. Limiti dello studio

Il presente studio presenta alcune limitazioni potenziali. Una prima limitazione potrebbe essere rappresentata dal fatto che non si sia somministrato un test falso. La scelta è stata dettata dal fatto che è praticamente impossibile allestire un test placebo di controllo che imiti le manovre del IP. Classicamente questo viene fatto gonfiando il manicotto pneumatico ad una pressione di 20 mmHg [175], tuttavia, i soggetti riconoscono chiaramente la differenza tra 20 mmHg e i 50 mmHg superiori alla pressione sistolica utilizzati in questo impianto sperimentale. Inoltre, anche una pressione così bassa potrebbe riuscire potenzialmente a bloccare il flusso sanguigno provocando accumulo di metaboliti e innesco della cascata metabolica del IP. Questo paradossalmente fornirebbe ulteriori risultati confondenti.

Un altro potenziale limite è costituito dall'impossibilità di raccogliere dati sulla produzione di NO. Il dosaggio di questo metabolita avrebbe potuto confermare l'ipotesi che l'aumento di produzione di NO dopo IP sia stato il responsabile della ridotta capacità di venocostrizione che non ha permesso di sostenere il precarico cardiaco durante l'attivazione dei metaboriflessi.

Bibliografia

1. Ichinose M, Maeda S, Kondo N, and Nishiyasu T, - **Blood pressure regulation II: what happens when one system must serve two masters: oxygen delivery and pressure regulation?** - Eur J Appl Physiol, 2014; vol. 114, no. 3, pp. 451–465.
2. Faulkner JA, Heigenhauser GF, and Schork MA, - **The cardiac output-oxygen uptake relationship of men during graded bicycle ergometry** - Med Sci Sports Exerc, 1977; vol. 9, no. 3, pp. 148–154.
3. Lewis SF, Taylor WF, Graham RM, Pettinger WA, Schutte JE, and Blomqvist CG, - **Cardiovascular responses to exercise as functions of absolute and relative work load** - J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1983; vol. 54, no. 5, pp. 1314–1323,.
4. Lewis SF, Snell PG, Taylor WF et al., - **Role of muscle mass and mode of contraction in circulatory responses to exercise** - J Appl Physiol, 1985; vol. 58, no. 1, pp. 146–151.
5. Yamaguchi I, Komatsu E, and Miyazawa K, - **Intersubject variability in cardiac output-O₂ uptake relation of men during exercise** - J Appl Physiol, 1986; vol. 61, no. 6, pp. 2168–2174.
6. Stringer WW, Hansen LE, and Wasserman K, - **Cardiac output estimated noninvasively from oxygen uptake during exercise** - J Appl Physiol, 1997; vol. 82, no. 3, pp. 908–912.
7. Crisafulli A, Melis F, Tocco F et al. - **Anaerobic threshold and the oxygen consumption-cardiac output relationship during exercise** - Sport Sci Health, 2005; vol. 1, no. 2, pp. 75–80.
8. Crisafulli A, Piras F, Chiappori P et al., - **Estimating stroke volume from oxygen pulse during exercise** - Physiol Meas, 2007; vol. 28, no. 10, pp. 1201–1212.
9. Crisafulli A, Tocco F, Pittau G et al. - **Detection of lactate threshold by including haemodynamic and oxygen extraction data** - Physiol Meas, 2006; vol. 27, no. 1, pp. 85–97.

10. Miles DS, Sawka MN, and Hanpeter DE - **Central hemodynamics during progressive upper- and lower-body exercise and recovery** - J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1984; vol. 57, no. 2, pp. 366–370.
11. Higginbotham MB, Morris KG, Williams S, McHale PA, Coleman RE, and Cobb FR, - **Regulation of stroke volume during submaximal and maximal upright exercise in normal man** - Circ Res, 1986; vol. 58, no. 2, pp. 281–291.
12. Nakano T, Tominaga R, Nagano I, Okabe H, and Yasui H - **Pulsatile flow enhances endothelium-derived nitric oxide release in the peripheral vasculature** - Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000; vol. 278, no. 4, pp. H1098–H1104.
13. Whyte JJ and Laughlin MH - **The effects of acute and chronic exercise on the vasculature** - Acta Physiol, 2010; vol. 199, no.4, pp. 441–450.
14. N´obrega ACL, Williamson JW, Garcia JA, and Mitchell JH - **Mechanisms for increasing stroke volume during static exercise with fixed heart rate in humans** - J Appl Physiol, 1997; vol. 83, no. 3, pp. 712-717.
15. Rowland TW - **Circulatory responses to exercise: are we misreading fick?** - Chest, 2005; vol. 127, no. 3, pp. 1023–1030.
16. Laughlin MH - **Skeletal muscle blood flow capacity: role of muscle pump in exercise hyperaemia** - Am J Physiol, 1987; vol. 253, no. 5, pp. H993–H1004.
17. Magder S - **Venous mechanics of contracting gastrocnemius muscle and the muscle pump theory** - J Appl Physiol, 1995; vol. 79, no. 6, pp. 1930–1935.
18. Plotnick GD, Becker LC, and Fisher ML - **Use of the Frank-Starling mechanism during sub-maximal versus maximal upright exercise** - Am J Physiol, 1986; vol. 251, no. 6, pp. H1101–H1105.
19. Crisafulli A, Orrù V, Melis F, Tocco F, and Concu A - **Hemodynamics during active and passive recovery from a single bout of supramaximal exercise** - Eur J Appl Physiol, 2003; vol. 89, no. 2, pp. 209–216.
20. Crisafulli A, Carta C, Melis F et al. - **Haemodynamic responses following intermittent supramaximal exercise in athletes** - Exp Physiol, 2004; vol. 89, no. 6, pp. 665–674.

21. Crisafulli A, Tocco F, Pittau G et al. - **Effect of differences in post-exercise lactate accumulation in athletes' haemodynamics** - Appl Physiol Nutr Metab, 2006; vol. 31, no. 4, pp. 423–431.
22. Savard G, Strange S, Kiens B, Richter EA, Christensen NJ, and Saltin B - **Noradrenaline spillover during exercise in active versus resting skeletal muscle in man** - Acta Physiol Scand, 1987; vol. 131, no. 4, pp. 507–515.
23. Seals DR - **Influence of muscle mass on sympathetic neural activation during isometric exercise** - J Appl Physiol, 1989; vol. 67, no. 5, pp. 1801–1806.
24. Strange S, Secher NH, Pawelczyk JA et al. - **Neural control of cardiovascular responses and of ventilation during dynamic exercise in man** - J Physiol, 1993; vol. 470, pp. 693–704.
25. Rowell LB and O'Leary DS - **Reflex control of the circulation during exercise: chemoreflexes and mechanoreflexes** - J Appl Physiol, 1990; vol. 69, no. 2, pp. 407–418.
26. Thornton JM, Aziz T, Schlugman D, and Paterson DJ - **Electrical stimulation of the midbrain increases heart rate and arterial blood pressure in awake humans** – J Physiol, 2002; vol. 539, no. 2, pp. 615–621.
27. O'Leary DS - **Autonomic mechanisms of muscle metaboreflex control of heart rate** - J Appl Physiol, 1993; vol. 74, no. 4, pp. 1748–1754.
28. Piepoli M, Clark AL, and Coats AJS - **Muscle metaboreceptors in hemodynamic, autonomic, and ventilatory responses to exercise in men** - Am J Physiol, 1995; vol. 269, no. 4, pp. H1428–H1436.
29. Iellamo F, Pizzinelli P, Massaro M, Raimondi G, Peruzzi G, and Legramante JM - **Muscle metaboreflex contribution to sinus node regulation during static exercise: insights from spectral analysis of heart rate variability** - Circulation, 1999; vol. 100, no. 1, pp. 27–32.
30. Crisafulli A, Scott AC, Wensel R, et al. - **Muscle metaboreflex induced increases in stroke volume** - Med Sci Sports Exerc, 2003; vol. 35, no. 2, pp. 221–228.

31. Fadel PJ, Ogoh S, Watenpaugh DE, et al. - **Carotid baroreflex regulation of sympathetic nerve activity during dynamic exercise in humans** - Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001; vol. 280, no. 3, pp. H1383–H1390.
32. Sheriff DD, - **Baroreflex resetting during exercise: mechanisms and meaning** - Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006; vol. 290, no. 4, pp. H1406–H1407.
33. Dempsey JA - **New perspectives concerning feedback influences on cardiorespiratory control during rhythmic exercise and on exercise performance** - J Physiol, 2012; vol. 590, pp. 4129–4144.
34. Nobrega ACL, O’Leary D, Moreira Silva B, Marongiu E, Piepoli MF, and Crisafulli A, - **Neural Regulation of Cardiovascular Response to Exercise: Role of Central Command and Peripheral Afferents** - BioMed Res Int, 2014; 2014:478965
35. Arai Y, Saul JP, Albrecht P, et al. - **Modulation of cardiac autonomic activity during and immediately after exercise** - Am J Physiol Heart Circ Physiol, 1989; vol. 256, no. 1, pp. H132–H141.
36. Goldberger JJ, Le FK, Lahiri M, Kannankeril PJ, Ng J, and Kadish AH, - **Assessment of parasympathetic reactivation after exercise** - Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006; vol. 290, no. 6, pp. H2446–H2452.
37. Carter III R, Watenpaugh DE, Wasmund WL, Wasmund SL, and Smith ML, - **Muscle pump and central command during recovery from exercise in humans** - J Appl Physiol, 1999; vol. 87, no. 4, pp. 1463–1469.
38. Crisafulli A, Melis F, Orrù V, Lener R, Lai C, and Concu A, - **Hemodynamic during a postexertional asystolia in a healthy athlete: a case study** - Med Sci Sports Exerc, 2000; vol. 32, no. 1, pp. 4–9.
39. Mathews PB, - **Muscle Receptors and Their Central Actions** - Arnold, London, UK, 1972.
40. Kaufman MP, Waldrop TG, and Rybicki KJ, - **Effects of static and rhythmic twitch contractions on the discharge of group III and IV muscle afferents** - Cardiovasc Res, 1984; vol. 18, no. 11, pp. 663–668.
41. Leshnower BG, Potts JT, Garry MG, and Mitchell JH, - **Reflex cardiovascular responses evoked by selective activation of skeletal muscle ergoreceptors** - J Appl Physiol, 2001; vol. 90, no. 1, pp. 308–316.

42. Matsukawa K, Wall PT, Wilson LB, and Mitchell JH, - **Reflex stimulation of cardiac sympathetic nerve activity during static muscle contraction in cats** - Am J Physiol Heart Circ Physiol, 1994; vol. 267, no.2,pp. H821–H827.
43. Adreani CM, Hill JM, and Kaufman MP - **Responses of group III and IV muscle afferents to dynamic exercise** – J Appl Physiol, 1997; vol. 82, no. 6, pp. 1811–1817.
44. Haouzi P, Hill JM, Lewis BK, and Kaufman MP, - **Responses of group III and IV muscle afferents to distension of the peripheral vascular bed** - J Appl Physiol, 1999; vol. 87, no. 2, pp. 545–553.
45. Kaufman MP, Longhurst JC, and Rybicki KJ, - **Effects of static muscular contraction on impulse activity of groups III and IV afferents in cats** - J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1983; vol. 55, no. 1, pp. 105–112.
46. Alam M and Smirk FH, - **Observations in man upon a blood pressure raising reflex arising from the voluntary muscles** - J Physiol, 1937; vol. 89, pp. 372–383.
47. Kaufman MP and Rybicki KJ, - **Discharge properties of group III and IV muscle afferents: their responses to mechanical and metabolic stimuli** - Circ Res, 1987; vol. 61, no. 4, pp. 160–165.
48. Smith SA, Mitchell JH, and Garry MG, - **The mammalian exercise pressor reflex in health and disease** - Exp Physiol, 2006; vol. 91, no. 1, pp. 89–102.
49. Murphy MN, Mizuno M, Mitchell JH, and Smith SA, - **Cardiovascular regulation by skeletal muscle reflexes in health and disease** - Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011; vol. 301, no. 4, pp. H1191–H1204.
50. Kniffki KD, Mense S, and Schmidt RF, - **Responses of group IV afferent units from skeletal muscle to stretch, contraction and chemical stimulation** – Exp Brain Res, 1978; vol. 31, no. 4, pp. 511–522.
51. Mense S, and Stahnke M, - **Responses in muscle afferent fibres of slow conduction velocity to contractions and ischaemia in the cat** – J Physiol, 1983; vol. 342, pp. 383–397.
52. Nishiyasu T, Ueno H, Nishiyasu M, et al. - **Relationship between mean arterial pressure and muscle cell pH during forearm ischaemia after sustained handgrip** - Acta Physiol Scand, 1994; vol. 151, no. 5, pp. 143–148.

53. Victor RG, Bertocci LA, Pryor SL, and Nunnally RL, - **Sympathetic nerve discharge is coupled to muscle pH during exercise in humans** – J Clin Invest, 1988; vol. 82,no. 4, pp. 1301–1305.
54. Sinoway L, Prophet S, Gorman I, et al. - **Muscle acidosis during static exercise is associated with calf vasoconstriction** – J Appl Physiol, 1989; vol. 66, no. 1, pp. 429–436.
55. Cornett JA, Herr MD, Gray KS, Smith MB, Yang QX, and Sinoway LI, - **Ischemic exercise and the muscle metaboreflex** - J Appl Physiol, 2000; vol. 89,no. 4, pp. 1432–1436.
56. Amann M, Blain GM, Proctor LT, Sebranek JJ, Pegelow DF, and Dempsey JA, - **Implications of group III and IV muscle afferents for high-intensity endurance exercise performance in humans** – J Physiol, 2011; vol. 589, no. 21, pp. 5299–5309.
57. Amann M, Blain GM, Proctor LT, Sebranek JJ, Pegelow DF, and Dempsey JA, - **Group III and IV muscle afferents contribute to ventilatory and cardiovascular response to rhythmic exercise in humans** - J Appl Physiol, 2010; vol. 109, no. 4, pp. 966–976.
58. Mitchell JH, Kaufman MP, and Iwamoto GA, - **The exercise pressor reflex: its cardiovascular effects, afferent mechanisms, and central pathways** – Annu Rev Physiol, 1983; vol. 45, pp. 229–242.
59. Clark AL, Piepilo M, and Coats AJS, - **Skeletal muscle and the control of ventilation on exercise: evidence for metabolic receptors** – Eur J Clin Invest, 1995; vol. 25,no. 5, pp. 299–305.
60. Crisafulli A, Piras F, Filippi M, Piredda C, Chiappori P, Melis F, Milia R, Tocco F, Concu A, - **Role of Heart Rate and Stroke Volume during Muscle Metaboreflex-induced Cardiac Output increase: differences between activation during and after exercise** - J Physiol Sci; 2011; vol. 61. 385-394.
61. Nishiyasu T, Tan N, Morimoto K, Nishiyasu M, Yamaguchi Y, and Murakami N, - **Enhancement of parasympathetic cardiac activity during activation of muscle metaboreflex in humans** - J Appl Physiol, 1994; vol. 77, no. 6, pp. 2778–2783.

62. O'Leary DS, and Augustyniak RA, - **Muscle metaboreflex increases ventricular performance in conscious dogs** – Am J Physiol, 1998; vol. 275, no. 1, pp. H220–H224.
63. Crisafulli A, Salis E, Pittau G, et al. - **Modulation of cardiac contractility by muscle metaboreflex following efforts of different intensities in humans** – Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006; vol. 291, no. 6, pp. H3035– H3042.
64. Crisafulli A, Milia R, Lobina A, et al. - **Haemodynamic effect of metaboreflex activation in men after running above and below the velocity of the anaerobic threshold** – Exp Physiol, 2008; vol. 93, no. 4, pp. 447–457.
65. Choi HM, Stebbins CL, Lee OT, et al. - **Augmentation of the exercise pressor reflex in pre-hypertension: roles of the muscle metaboreflex and mechanoreflex** - Appl Physiol Nutr Metab, 2013; vol. 38, pp. 209–215.
66. Shoemaker JK, Mattar L, Kerbeci P, Trotter S, Arbeille P, and Hughson RL, - **WISE 2005: stroke volume changes contribute to the pressor response during ischemic handgrip exercise in women** - J Appl Physiol, 2007; vol. 103, no. 1, pp. 228–233.
67. Bastos BG, Williamson JW, Harrelson T, and N'obrega AC - **Left ventricular volumes and hemodynamic responses to postexercise ischemia in healthy humans** – Med Sci Sports Exerc, 2000; vol. 32, no. 6, pp. 1114–1118.
68. Kiviniemi AM, Frances MF, Rachinsky M, et al. - **Non alpha adrenergic effects on systemic vascular conductance during lower-body negative pressure, static exercise and muscle metaboreflex activation** - Acta Physiol, 2012; vol. 206, pp. 51–61.
69. Sheriff DD, Augstyniak RA, and O'Leary DS, - **Muscle chemoreflex-induced increases in right atrial pressure** - Am J Physiol Heart Circ Physiol, 1998; vol. 44, no. 275, pp. H767–H775.
70. Crisafulli A, Milia R, Vitelli S, et al. - **Hemodynamic responses to metaboreflex activation: insights from spinal cord-injured humans** - Eur J Appl Physiol, 2009; vol. 106, no. 4, pp. 525–533.
71. Augustyniak RA, Collins HL, Ansorge EJ, Rossi NF, and O'Leary DS, - **Severe exercise alters the strength and mechanisms of the muscle metaboreflex** - Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001; vol. 280, no. 4, pp. H1645–H1652.

72. Piepoli MF, Dimopoulos K, Concu A, and Crisafulli A, - **Cardiovascular and ventilatory control during exercise in chronic heart failure: role of muscle reflexes** – Int J Cardiol, 2008; vol. 130, no. 1, pp. 3–10.
73. Boushel R, - **Muscle metaboreflex control of the circulation during exercise** - Acta Physiol, 2010; vol. 199, no. 4, pp. 367–383.
74. Ansorge EJ, Shah SH, Augustyniak RA, Rossi NF, Collins HL, and O’Leary DS, - **Muscle metaboreflex control of coronary blood flow** - Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002; vol. 283, no. 2, pp. H526–H532.
75. O’Leary DS, Sala-Mercado JA ,Hammond RL, et al. - **Muscle metaboreflex-induced increases in cardiac sympathetic activity vasoconstrict the coronary vasculature** – J Appl Physiol, 2007; vol. 103, no. 1, pp. 190–194.
76. Momen A, Gahremanpour A, Mansoor A, et al. - **Vasoconstriction seen in coronary bypass grafts during handgrip in humans** - J Appl Physiol, 2007; vol. 102, no. 2, pp. 735–739.
77. Coutsos M, Sala-Mercado JA, Ichinose M, Li Z, Dawe EJ, and O’Leary DS, - **Muscle metaboreflex-induced coronary vasoconstriction functionally limits increases in ventricular contractility** - J Appl Physiol, 2010; vol. 109, no. 2, pp. 271–278.
78. Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E, et al. - **Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning** – Circulation, 1998; 97: 1848-67.
79. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA, - **Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium** – Circulation, 1986; 74: 1124-36.
80. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AWH, Olsson RA, Downey JM, - **Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart** – Circulation, 1991; 84: 350-6.
81. Liu Y, Downey JM, - **Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart** - Am J Physiol, 1992; 263: H1107-12.
82. Vahlhaus C, Schultz R, Post H, Onallah R, Heusch G, - **No prevention of ischemic preconditioning by the protein kinase C inhibitor staurosporine in swine** - Circ Res 1996; 79: 407-14.

83. Gattullo D, Linden RJ, Losano G, Pagliaro P, Westerhof N, - **Ischemic preconditioning changes the pattern of coronary reactive hyperaemia in the goat: role of adenosine and nitric oxide** - Cardiovasc Res, 1999; 42: 57-64.
84. Yellon DM, Downey JM, - **Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology** - Physiol Rev, 2003; 83: 1113-51.
85. Shiki K, Hearse DJ, - **Preconditioning of ischemic myocardium: reperfusion-induced arrhythmias** - Am J Physiol 1987; 272: H1470-6.
86. Asimakis GK, Innerd-McBride K, Medellin G, Conti VR, - **Ischemic preconditioning attenuates acidosis and postischemic dysfunction in isolated rat heart** - Am J Physiol 1992; 263: H887-94.
87. Parratt J, Vegh A, - **Pronounced antiarrhythmic effects of ischemic preconditioning** - Cardioscience 1994; 5: 9-18.
88. Cohen MV, Yang XM, Downey JM, - **Smaller infarct after preconditioning does not predict extent of early functional improvement of reperfused heart** - Am J Physiol 1999; 277: H1754-61.
89. Speeclly-Dick ME, Grover GH, Yellon DM, - **Does ischemic preconditioning in the human involve protein kinase C and the ATPdependent K⁺ channel? Studies of contractile function after simulated ischemia in an atrial in vitro model** - Circ Res 1995; 77: 1030-5.
90. Carr CS, Hill RJ, Masamune H, et al, - **Evidence for a role of both A1 and A3 receptors in protection of isolated human atrial muscle against simulated ischemia** - Cardiovasc Res 1997; 36: 52-9.
91. Deutsch E, Berger M, Kussmaul WG, Hirshfeld JW, Herrman HC, Lashey WL, - **Adaptation to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty: clinical, hemodynamic, and metabolic features** - Circulation 1990; 82: 2044-51.
92. Tomai F, Crea F, Gaspardone A, et al. - **Mechanisms of cardiac pain during coronary angioplasty** - J Am Coll Cardiol 1993; 22: 1892-6.
93. Laskey WK. - **Beneficial impact of preconditioning during PTCA on creatine kinase release** - Circulation 1999; 99: 2085-9.

94. Kloner RA, Shook T, Przyklenk K, et al. - **Previous angina alters inhospital outcome in TIMI-4** - Circulation 1995; 91: 37-47.
95. Ottani F, Galvani M, Ferrini D, et al. - **Prodromal angina limits infarct size: a role for ischemic preconditioning** - Circulation 1995; 91: 291-7.
96. Andreotti F, Pasceri V, Hackett DR, Davies GJ, Harder AW, Maseri A, - **Preinfarction angina as a predictor of more rapid coronary thrombolysis in patients with acute myocardial infarction** - N Engl J Med 1996; 334: 7-12.
97. Ishihara M, Sato H, Tateishi H, et al. - **Implications of prodromal angina pectoris in anterior wall acute myocardial infarction: acute angiographic findings and long-term prognosis** - J Am Coll Cardiol 1997; 30: 970-5.
98. Noda T, Minatoguchi S, Fujii K, et al. - **Evidence for the delayed effect in human ischemic preconditioning: prospective multicenter study for preconditioning in acute myocardial infarction** - J Am Coll Cardiol 1999; 34: 1966-74.
99. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, et al. - **Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia** - Circ Res 1993; 72: 1293-9.
100. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM, - **Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction** - Circulation 1993; 88: 1264-72.
101. Bolli R, - **The late phase of preconditioning** - Circ Res 2000; 87: 972-83.
102. Pagliaro P, Gattullo D, Rastaldo R, Losano G, - **Ischemic preconditioning: from the first to the second window of protection** - Life Sci 2001; 69: 1-15.
103. Cohen MV, Baines CP, Downey JM, - **Ischemic preconditioning: from adenosine receptor to KATP channel** - Ann Rev Physiol 2000; 62: 79-109.
104. Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, Downey JM, - **Intravenous pretreatment with A1-selective adenosine analogues protects the heart against infarction** - Circulation 1992; 85: 659-65.
105. Leeser MA, Stoddard M, Ahmed M, Broadbent J, Bolli R, - **Preconditioning of human myocardium with adenosine during coronary angioplasty** - Circulation 1997; 95: 2500-7.

106. Leesar MA, Stoddard MF, Xuan YT, Tang XL, Bolli R, – **Non electrocardiographic evidence that both ischemic preconditioning and adenosine preconditioning exist in humans** - J Am Coll Cardiol 2003; 42: 437-45.
107. Parrat JR, - **Protection of the heart by ischemic preconditioning: mechanisms and possibilities for pharmacological exploitation** - Trends Pharmacol Sci 1994; 15: 19-25.
108. Goto M, Liu Y, Yang X-M, Ardell JL, Cohen MV, Downey JM, - **Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts** - Circ Res 1995; 77: 611-21.
109. Schultz JEJ, Hsu AK, Gross GJ, - **Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart** - Circ Res 1996; 78: 1100-4.
110. Baines CP, Goto M, Downey JM, - **Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium** - J Moll Cell Cardiol 1997; 29: 207-16.
111. Becker LB, - **New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology** - Cardiovasc Res 2004; 61(3): 461-70.
112. Pagliaro P, Moro F, Tullio F, Perrelli MG, Penna C, - **Cardioprotective pathways during reperfusion: focus on redox signaling and other modalities of cell signalling** - Antioxid Redox Signal 2011; 14: 833-50.
113. Tullio F, Angotti C, Perrelli MG, Penna C, Pagliaro P, - **Redox balance and cardioprotection** - Basic Res Cardiol 2013; 108(5): 371.
114. Clerk A, Michael A, Sugden PH, - **Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes** - Biochem J 1998; 333: 581-9.
115. Andreaka P, Zang J, Dougherty C, Slepak TI, Webster KA, Bishopric NH, - **Cytoprotection by Jun kinase during nitric oxide-induced cardiac myocyte apoptosis** - Circ Res 2011; 88: 305-12.
116. Pham FH, Sugden PH, Clerk A, - **Regulation of protein kinase B and 4E-BP1 by oxidative stress in cardiac myocytes** - Circ Res. 2000; 86: 1252-8.

117. Pagliaro P, Chiribiri A, Mancardi D, Rastaldo R, Gattullo D, Losano G, - **Coronary endothelial dysfunction after ischemia and reperfusion and its prevention by ischemic preconditioning** - Ital Heart J. 2003; 4: 383-94.
118. Skyschally A, Schulz R, Gres P, Korth HG, Heusch G, - **Attenuation of ischemic preconditioning in pigs by scavenging of free oxyradicals of ascorbic acid** - Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 284: 698-703.
119. Tritto I, Ambrosio G, - **Role of oxidants in the signaling pathway of preconditioning** - Antioxid Redox Signal. 2001; 3: 3-10. Erratum in: Antioxid Redox Signal 2001; 3(5): 937.
120. Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C, - **Ischemia/reperfusion injury cardioprotective mechanism: Role of mitochondria and reactive oxygen species** - World J Cardiol 2011; 3: 186-200.
121. Baines CP, Wang L, Cohen MV, Downey JM, - **Protein tyrosine kinases is downstream of protein kinase C for ischemic preconditioning's anti-infarct effect in the rabbit heart** - J Mol Cell Cardiol 1998; 30: 383-92.
122. Gross GJ, Auchampach JA, - **Role of ATP-dependent potassium channels in myocardial ischemia** - Cardiovasc Res 1992; 26: 1011-6.
123. Edwards G, Weston AH, - **KATP-fact or artefact? New thoughts on the mode of action of the potassium channel openers** - Cardiovasc Res 1994; 28: 735-7.
124. Hiraoka M, Furukawa T, - **Functional modulation of cardiac ATPsensitive K⁺ channels** - News Physiol Sci 1998; 13: 131-7.
125. Gross GJ, Auchampach JA, - **Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs** - Circ Res 1992; 70: 223-33.
126. Van Winkle DM, Chien GL, Woff RA, Soifer BE, Kuzume K, - Davis RF, **Cardioprotection provided by adenosine receptor activation is abolished by blockade of the KATP channel** - Am J Physiol (Heart Circ Physiol)1994; 266: H829-39.
127. Grover GJ, - **Protective effects of ATP-sensitive potassium-channel openers in experimental myocardial ischemia** - J Cardiovasc Pharmacol 1994; 24: S18-27.

128. Gross GJ, Fryer RM, - **Sarcolemmal versus mitochondrial ATPsensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning** - Circ Res 1999; 84: 973-9.
129. Di Lisa F, Bernardi P, - **Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole** - Cardiovasc Res 2006; 70: 191-9.
130. Takagi H, Matsui Y, Sadoshima J, - **The role of autophagy in mediating cell survival and death during ischemia and reperfusion in the heart** - Antioxid Redox Signal 2007; 9: 1373-81.
131. Baines CP. - **The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury** - Basic Res Cardiol 2009; 104: 181-8.
132. Marongiu E, Crisafulli A, - **Cardioprotection acquired through exercise: the role of ischemic preconditioning** - Current Cardiology Reviews, 2014; 10: 336-348
133. Yellon DM, Baxter GF, - **“A second window of protection” or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection?** - J Mol Cell Cardiol 1995; 1023-4.
134. Baxter GF, Marber MS, Patel VC, Yellon DM, - **Adenosine receptor involvement in a delayed phase of myocardial protection 24 hours after ischemic preconditioning** - Circulation 1994; 90: 2993-3000.
135. Kudo M, Wang Y, Xu M, et al. - **Adenosine A1 receptor mediates late preconditioning via activation of PKC- signaling pathway** - Am J Physiol 2002; 283: H296-301.
136. Ebrahim Z, Yellon DM, Baxter GF, - **Bradykinin induces delayed cardioprotection in the rat heart via nitric oxide dependent mechanism** - Am J Physiol (Heart Circ Physiol) 2001; 281: H1458-64.
137. Kostitprapa C, Ockaili RA, Kukreja RC, - **Bradykinin B2 receptor is involved in the late phase of preconditioning in rabbit heart** - J Mol Cell Cardiol 2001; 33: 1355-62.
138. Sun J-Z, Tang X-L, Park S-W, Qiu Y, Turrens JF, Bolli R, - **Evidence for an essential role of reactive oxygen species in the genesis of late preconditioning against myocardial stunning in conscious pigs** - J Clin Invest 1996; 97: 562-76.

139. Zhou XB, Zhai XL, Ashraf M, - **Direct evidence that initial oxidative stress triggered by preconditioning contributes to second window of protection by endogenous antioxidant enzyme in myocytes** - Circulation 1996; 93: 1177-84.
140. Kaeffer N, Richard V, Thuillez C, - **Delayed coronary endothelial protection 24 hours after preconditioning: role of free radicals** - Circulation 1997; 96: 2311-6.
141. Fryer RM, Hsu AK, Eells JT, Nagase H, Gross GJ, - **Opioid-induced second window of cardioprotection: potential role of mitochondrial KATP channels** - Circ Res 1999; 84: 846-51.
142. Patel HH, Moore J, Hsu AK, Gross GJ, - **BW373U86, a delta opioid agonist, partially mediates delayed cardioprotection via a free radical mechanism that is independent of opioid receptor stimulation** - J Moll Cell Cardiol 2001; 33: 1455-65.
143. Guo Y, Jones WK, Xuan YT, et al. - **The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene** - Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 11507-12.
144. Imagawa J, Yellon DM, Baxter GF, - **Pharmacological evidence that inducible nitric oxide synthase is a mediator of delayed preconditioning** - Br J Pharmacol 1999; 126: 701-8.
145. Pagliaro P, Gattullo D, Rastaldo R, Losano G, - **Involvement of nitric oxide in ischemic preconditioning** - Ital Heart J 2001; 2: 660-8.
146. Xi L, Tekin D, GURSOY E, et al. - **Evidence that NOS2 acts as a trigger and a mediator of late preconditioning induced by acute systemic hypoxia** - Am J Physiol (Heart Circ Physiol) 2002; 283: H5-12.
147. Shinmura K, Tang X-L, Wang Y, et al. - **Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits** - Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 10197-202.
148. Guo Y, Bao W, Wu W-J, Shinmura K, Tang X-L, Bolli R, - **Evidence for an essential role of cyclooxygenase-2 as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning in mice** - Basic Res Cardiol 2000; 95: 480-5.

149. Shinmura K, Liu S-Q, Tang X-L, et al. - **Aldose reductase is an obligatory mediator of the late phase of ischemic preconditioning** – Circ Res 2002; 91(3):240-6.
150. Yamashita N, Nishida M, Hoshida S, et al. - **Induction of manganese superoxide dismutase in rat cardiac myocytes increases tolerance to hypoxia 24 hours after preconditioning** - J Clin Invest 1994; 94: 2193-9.
151. Hoshida S, Yamashita N, Otsu K, et al. - **The importance of manganese superoxide dismutase in delayed preconditioning: involvement of reactive oxygen species and cytokines** - Cardiovasc Res 2002; 55: 495-505.
152. Locke M, Tanguay R, Klabunde R, et al. - **Enhanced post-ischemic myocardial recovery following induction of HSP72** - Am J Physiol 1995; 38: H320-5.
153. Plumier JCL, Ross BM, Currie RW, et al. - **Transgenic mice expressing the human heat-shock protein 70 have improved postischemic myocardial recovery** - J Clin Invest 1995; 95: 1854-60.
154. Dana A, Skarli M, Papakrivopoulou J, Yellon DM, - **Adenosine A1 receptor induced delayed preconditioning in rabbits: induction of p38 MAPK activation and Hsp27 phosphorylation via tyrosine kinase and protein kinase C-dependent mechanism** - Circ Res 2000; 86: 989-97.
155. Powers SK, Locke M, Demirel HA, - **Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury** - Med Sci Sports Exerc 2001; 33: 386-92.
156. Loubani M, Hassouna A, Galinanes M, - **Delayed preconditioning on the human myocardium: signal transduction and clinical implications** - Cardiovasc Res 2004; 61: 600-9.
157. Dawn B, Bolli R, - **Role of nitric oxide in myocardial preconditioning** - Ann N Y Acc Sci 2002; 962: 18-41.
158. Xi L, Tekin D, Gursoy E, Salloum F, Levasseur JE, Kukreja RC, - **Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced by acute systemic hypoxia** - Am J Physiol (Heart Circ Physiol) 2002; 283: H5-12.
159. Sasaki N, Sato T, Ohler A, O'Rourke B, Marban E, - **Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide** - Circulation 2000; 101: 439-45.

160. Bolli R, Dawn B, Tang X-L, et al. - **The nitric oxide hypothesis of late preconditioning** - Basic Res Cardiol 1998; 93: 325-38.
161. Crisafulli A, Melis F, Tocco F, et al. - **Exercise-induced and nitroglycerin-induced myocardial preconditioning improves hemodynamics in patients with angina** - Am J Physiol (Heart Circ Physiol) 2004; 287: H235-42.
162. Leesar MA, Stoddard M, Dawn B, Jasti VG, Masden R, Bolli R, - **Delayed preconditioning-mimetic action of nitroglycerin in patients undergoing coronary angioplasty** - Circulation 2001; 103: 2935-41.
163. Hill MF, Takano H, Tang XL, Kodani E, Shirk G, Bolli R, - **Nitroglycerin induces late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits despite development of nitrate tolerance** - Circulation 2001; 104: 694-9.
164. Jneid H, Chandra M, Alshaher M, et al. - **Delayed preconditioning mimetic actions of nitroglycerin in patients undergoing exercise tolerance tests** - Circulation 2005; 111: 2565-71.
165. Crisafulli A, Tangianu F, Tocco F, Concu A, Mameli O, Mulliri G, Caria MA, - **Ischemic preconditioning of the muscle improves maximal exercise performance but not maximal oxygen uptake in humans** - J Appl Physiol 2011; 111: 530-536.
166. Bailey TG, Jones H, Gregson W, Atkinson G, Cable NT, Thijssen DHJ, - **Effect of ischemic preconditioning on lactate accumulation and running performance** - Med Sci Sport Exerc 2012; 44: 2084-2089.
167. Barbosa TC, Machado AC, Braz ID, Fernandes IA, Vianna LC, Nobrega AC, Silva BM, - **Remote ischemic preconditioning delays fatigue development during handgrip exercise** - Scand J Med Sci Sports 2015; 25: 256-364.
168. de Groot PCE, Thijssen DHJ, Sanchez M, Ellenkamp R, Hopman MTE, - **Ischemic preconditioning improves maximal performance in humans** - Eur J Appl Physiol 2010; 108: 141-146.
169. Kjeld T, Rasmussen MR, Jattu T, Nielsen HB, Secher NH, - **Ischemic preconditioning of one forearm enhances static and dynamic apnea** - Med Sci Sports Exerc. 2014; 46: 151-155.
170. Jean-St-Michel E, Manlhiot C, Li J, Tropak M, Michelsen MM, Schmidt MR, McCrindle BW, Wells GD, Redington AN, - **Remote preconditioning**

- improves maximal performance in highly-trained athletes** - Med Sci Sports Exerc 2011; 43: 1280-1286
171. Patterson SD, Bezodis NE, Glaister M, Pattison JR, - **The Effect of Ischemic Preconditioning on Repeated Sprint Cycling Performance** - Med Sci Sports Exerc. 2015 Aug;47(8):1652-8.
172. Clevidence MW, Mowery RE, Kushnick MR, - **The effects of ischemic preconditioning on aerobic and anaerobic variables associated with submaximal cycling performance** - Eur J Appl Physiol 2012; 112:3649-3654
173. Gibson N, White J, Neish M, Murray A, - **Effect of ischemic preconditioning on land-based sprinting in team-sport athletes** - Int J Sports Physiol Perform 2013; 8:671-676.
174. Hittinger EA, Maher JL, Nash MS, Perry AC, Signorile JF, Kressler J, Jacobs KA, - **Ischemic preconditioning does not improve peak exercise capacity at sea level or simulated high altitude in trained male cyclists** - Appl Physiol Nutr Metab 2015; 40:65-71.
175. Tocco F, Marongiu E, Ghiani G, Sanna I, Palazzolo G, Olla S, Pusceddu M, Sanna P, Corona F, Concu A, Crisafulli A, - **Muscle ischemic preconditioning does not improve performance during self-paced exercise** - Int J Sports Med 2015; 36: 9-15.
176. Paixao RC, da Mota GR, Marocolo M, - **Acute Effect of Ischemic Preconditioning is Detrimental to Anaerobic Performance in Cyclists** - Int J Sports Med 2014; 35: 912-915.
177. Bailey TG, Birk GK, Cable NT, Atkinson G, Green DJ, Jones H, Thijssen DHJ, - **Remote ischemic preconditioning prevents reduction in brachial artery flow-mediated dilation after strenuous exercise** - Am J Physiol (Heart Circ Physiol) 2012; 303: H533-H538.
178. Horiuchi M, Endo J, Thijssen DH, - **Impact of ischemic preconditioning on functional sympatholysis during handgrip exercise in humans** - Physiol Rep 2015; 22: 3(2). pii: e12304.
179. Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Khan A, Zhong A, Moses M, Forrest CR, Pang CY, - **Noninvasive remote ischemic preconditioning for global**

- protection of skeletal muscle against infarction** - Am J Physiol (Heart Circ Physiol) 2003; 285: H1435-1443.
180. Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B, Forrest CR, - **Acute ischemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig** - Cardiovasc Res 1995; 29: 782-788.
181. Amann M, Proctor LT, Sebranek JJ, Eldridge MW, Pegelow DF and Dempsey JA, - **Somatosensory feedback from the limbs exerts inhibitory influences on central neural drive during whole body endurance exercise** - J Appl Physiol 2008; 105:1714-1724.
182. Gandevia SC. - **Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue** - Physiol Rev 2001; 81: 1725-89.
183. Amann M, Runnels S, Morgan DE, Trinity JD, Fjeldstad AS, Walter Wray D, Reese VR, Richardson RS, - **On the contribution of group III and IV muscle afferents to the circulatory response to rhythmic exercise in humans** - J Physiol 2011; 589: 3855-3866.
184. Crisafulli A, Salis E, Tocco F, Melis F, Milia R, Pittau G, Caria MA, Solinas R, Meloni L, Pagliaro P, Concu A, - **Impaired central hemodynamic response and exaggerated vasoconstriction during muscle metaboreflex activation in heart failure patients** - Am J Physiol (Heart Circ Physiol) 2007; 292: H2988-H2996.
185. Marongiu E, Piepoli MF, Milia R, Angius L, Pinna M, Bassareo P, Roberto S, Tocco F, Concu A, Crisafulli A, - **Effects of acute vasodilation on the hemodynamic response to muscle metaboreflex** - Am J Physiol (Heart Circ Physiol) 2013; 305: H1387-H1396.
186. Milia R, Roberto S, Mulliri G, Loi A, Marcelli M, Sainas G, Milia N, Marongiu E, Crisafulli A, - **Effect of aging on hemodynamic response to metaboreflex activation** - Eur J Appl Physiol 2015; 115: 1693-703.
187. Roberto S, Marongiu E, Pinna M, Angius L, Olla S, Bassareo P, Tocco F, Concu A, Milia R, Crisafulli A, - **Altered hemodynamics during muscle metaboreflex in young, type 1 diabetes patients** - J Appl Physiol 2012; 113: 1323-1331.
188. Lalonde F, Curnier DY, - **Can anaerobic performance be improved by remote ischemic preconditioning?** - J Strength Cond Res 2015; 29: 80-5.

189. Ferrari M, Muthalib M, Quaresima V, - **The use of near-infrared spectroscopy in understanding skeletal muscle physiology: recent developments** - Philos Trans A Math Phys Eng Sci. 2011; 369: 4577-90.
190. Jones B, Dat M, Cooper CE, - **Underwater near-infrared spectroscopy measurements of muscle oxygenation: laboratory validation and preliminary observations in swimmers and triathletes** - J Biomed Opt 2014; 19: 127002.
191. Bernstein DP. - **A new stroke volume equation for Thoracic Electrical Bioimpedance: Theory and rationale** - Crit Care Med 1986; 14: 904-909.
192. Crisafulli A, Melis F, Orrù V, Lener R, Lai C, Concu A, - **Impedance cardiography for non invasive assessment of systolic time intervals during exercise** - Sports Med Train Rehab 2001; 10: 13-27.
193. Gledhill N, Cox D, Jamnik R, - **Endurance athletes' stroke volume does not plateau: major advantage is diastolic function** - Med Sci Sports Exerc 1994; 26: 1116-1121.
194. Moran D, Y Epstein, G Keren, A Laor, J Sherez, Y Shapir, - **Calculation of mean arterial pressure during exercise as a function of heart rate** - Appl Human Sci 1995; 14: 293-295.
195. Christie J, Sheldahl LM, Tristani FE, Sagar KB, Ptacin MJ, Wann S, - **Determination of stroke volume and cardiac output during exercise: comparison of two-dimensional and Doppler echocardiography, Fick oxymetry, and thermodilution** - Circulation 1987; 76: 539-547.
196. Cohen GI, Pietrolungo JF, Thomas JD, Klein AL, - **A practical guide to assessment of ventricular diastolic function using Doppler echocardiography** - J Am Coll Cardiol 1996; 27: 1753-1760.
197. Gardin JM, Dabestani A, Takenaka K, Rohan MK, Knoll M, Russell D, Henry WL, - **Effect of imaging view and sample volume location on evaluation of mitral flow velocity by pulsed Doppler echocardiography** - Am J Cardiol 1986; 57: 1335-1339.
198. Crisafulli A, Tocco F, Milia R, Angius L, Pinna M, Olla S, Roberto S, Marongiu E, Porcu M, Concu A, - **Progressive improvement in hemodynamic response**

to muscle metaboreflex in heart transplant recipients - J Appl Physiol 2013;
114: 421-427.