

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Veterinarie

Ciclo XXVI

Settore Concorsuale di afferenza: **07/H5**

Settore Scientifico disciplinare: **VET/10**

La Sindrome da Asfissia Perinatale nel puledro neonato:  
protocolli diagnostico-terapeutici

Presentata da: **Dott.ssa Carlotta Antonelli**

Coordinatore Dottorato

**Prof. Carlo Tamanini**

Relatore

**Prof.ssa Carolina Castagnetti**

Correlatore

**Prof.ssa Gloria Isani**

**Esame finale anno 2014**

# Indice

---

<b>Introduzione</b>	<b>6</b>
<b>1 La Sindrome da Asfissia Perinatale (PAS) nel puledro neonato</b>	<b>7</b>
1.1 Patogenesi	7
1.1.1 Cause	8
1.1.2 Meccanismi fisiopatologici	13
1.2 Risposta del feto e del neonato all'ipossia	16
1.3 Segni clinici	21
1.3.1 Disfunzioni del Sistema Nervoso	23
1.3.2 Disfunzioni renali	29
1.3.3 Disfunzioni dell'apparato gastrointestinale	31
1.3.4 Disfunzioni dell'apparato respiratorio	33
1.3.5 Disfunzioni dell'apparato cardiocircolatorio	38
1.3.6 Disfunzioni epatiche ed endocrine	40
1.3.7 Squilibri metabolici	40
1.3.8 Altri segni	41
1.4 Diagnosi precoce e prevenzione della PAS nel peripartum	43
1.5 Trattamento della PAS	52
1.5.1 Terapie di supporto	53
1.5.2 Terapia anticonvulsiva	54
1.5.3 Supporto nutrizionale	55
1.5.4 Fluidoterapia	56
1.5.5 Terapia antibiotica	57
1.5.6 Terapia delle disfunzioni gastrointestinali	58
1.5.7 Supporto respiratorio	58

1.5.8	Terapie specifiche per la PAS	59
1.6	Prognosi	63
<b>2</b>	<b>Determinazione della concentrazione plasmatica di magnesio totale nel puledro affetto da PAS</b>	<b>66</b>
2.1	Funzioni del magnesio	66
2.2	Ipomagnesemia e ipermagnesemia	70
2.3	Scopi del lavoro	77
2.4	Materiali e metodi	78
2.4.1	Selezione degli animali	78
2.4.2	Raccolta dei dati e determinazioni degli ormoni tiroidei	80
2.4.3	Analisi statistica	83
2.5	Risultati	84
2.6	Discussione e conclusione	89
<b>3</b>	<b>Determinazione della concentrazione degli ormoni tiroidei nel puledro affetto da PAS</b>	<b>95</b>
3.1	Tiroide e ormoni tiroidei	95
3.1.1	Gli ormoni tiroidei nel feto	97
3.1.2	Gli ormoni tiroidei nel puledro	98
3.2	Euthyroid sick sindrome	100
3.2.1	L'Euthyroid Sick Syndrome in neonatologia umana	102
3.3	Scopi del lavoro	103
3.4	Materiali e metodi	104

3.4.1	Selezione degli animali	104
3.4.2	Raccolta dei dati e determinazioni degli ormoni tiroidei	106
3.4.3	Analisi statistica	107
3.5	Risultati	108
3.6	Discussione e conclusione	113
<b>4</b>	<b>Studio della proteomica del liquido amniotico nella specie equina</b>	<b>119</b>
4.1	La proteomica	119
4.2	Funzione e composizione del liquido amniotico	121
4.2.1	Proteomica del liquido amniotico	124
4.3	Scopi del lavoro	126
4.4	Materiali e metodi	127
4.4.1	Selezione degli animali	127
4.4.2	Raccolta dei dati e determinazioni dei profili proteomici	129
4.4.3	Analisi statistica	132
4.5	Risultati	133
4.6	Discussione e conclusione	143
<b>5</b>	<b>Determinazione dello stress ossidativo nel puledro affetto da PAS</b>	<b>149</b>
5.1	Lo stress ossidativo nella PAS	149
5.2	Funzione del Glutathione	154
5.3	Scopi del lavoro	157

5.4	Materiali e metodi	158
5.4.1	Selezioni degli animali	158
5.4.2	Raccolta dei dati e determinazioni del glutatione totale	159
5.4.3	Analisi statistica	163
5.5	Risultati	164
5.6	Discussione e conclusione	169
<b>6</b>	<b>Conclusione</b>	<b>174</b>
<b>7</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>176</b>

# Introduzione

---

La Sindrome da Asfissia Perinatale presenta nel puledro un'incidenza dell'1-2%. È associata ad eventi che avvengono nel periparto, ma si conosce molto poco sulla sua fisiopatologia.

Studi condotti in medicina umana su neonati e su animali da laboratorio suggeriscono che l'ipossia e l'ischemia scatenino una serie di reazioni a cascata; le reazioni infiammatorie, la citotossicità, l'attivazione delle proteasi e la produzione di radicali liberi da queste indotte, conducono alla morte neuronale.

I segni clinici neurologici possono essere visibili alla nascita o svilupparsi 24-72 ore più tardi e possono presentarsi da lievi, come lo sviluppo di alterazioni del comportamento, a molto gravi come cecità, coma e convulsioni. Ad oggi la diagnosi di PAS si basa sui segni clinici e sulla diagnosi differenziale con altre patologie.

L'individuazione di markers biochimico-clinici e ormonali in corso di patologia potrebbe essere utile nella diagnosi di PAS nel puledro neonato. Lo scopo di questo studio è proprio la ricerca e la valutazione di alcuni di questi per una diagnosi precoce e il corretto trattamento dei puledri affetti da PAS.

Abbiamo valutato la concentrazione plasmatica totale di magnesio, la concentrazione ematica degli ormoni tiroidei (T3 e T4), il profilo proteomico del liquido amniotico e la concentrazione plasmatica totale di Glutazione.

# 1 Sindrome da Asfissia Perinatale nel Puledro

---

La Sindrome da Asfissia Perinatale (PAS) è una patologia multi-sistemica causata da una combinazione di ipossia e di ischemia del feto/puledro. È caratterizzata da deficit neurologici ad esempio perdita di interesse per la madre, convulsioni, alterazione dei riflessi di suzione e di deglutizione e vocalizzazioni anomale, ma una ha sintomatologia molto variabile in base alla durata e all'intensità dell'insulto e al tipo di organo maggiormente colpito (Vaala, 1994).

Reynolds fu il primo nel 1930 a descrivere una sindrome neonatale caratterizzata dallo sviluppo di un comportamento insolito.

Qualche decennio più tardi, i puledri affetti da PAS, vennero classificati in base alle manifestazioni neurologiche in Barkers (abbaiatori), Dummies (stupidi), Wonderers (vagabondi) e Convulsives (convulsivi) e si iniziò ad utilizzare la terminologia "Sindrome da Maladattamento Neonatale" (NMS) coniata da Rossdale nel 1968, ponendo quindi un particolare accento sulla sintomatologia nervosa (Vaala, 1994).

## 1.1 Patogenesi

---

L'asfissia perinatale può essere provocata da qualsiasi evento che determini una ossigenazione e un nutrimento tissutale insufficiente del feto/neonato. Ciò si può verificare prima del parto, durante il parto o nel primo periodo neonatale.

L'asfissia può verificarsi secondo quattro meccanismi: a) interruzione del flusso sanguigno fetale per occlusione del cordone ombelicale; b)

alterazione degli scambi gassosi attraverso la placenta, (ad esempio per distacchi placentari); c) inadeguata perfusione placentare, (ad esempio per ipotensione materna); d) mancata espansione del polmone o alterata circolazione polmonare alla nascita (Alonso-Spilsbury et al., 2005).

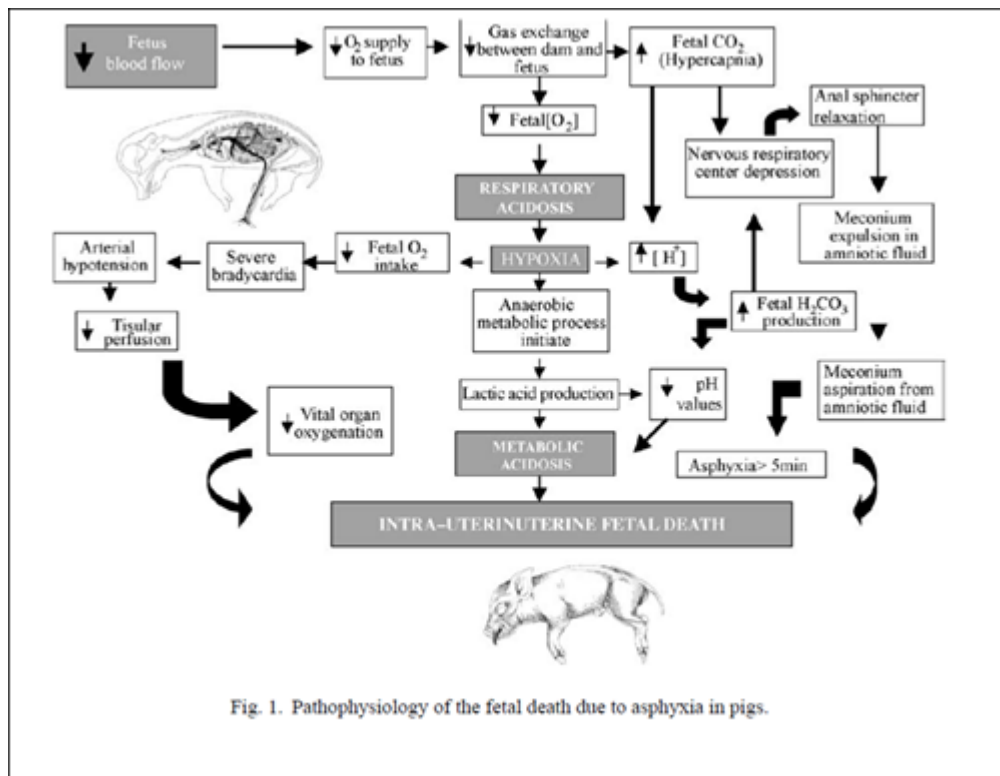


Figura 1.1: Alonso-Spilsbury et al., 2005

### 1.1.1 Cause

La PAS nel puledro è stata associata a placentiti, insufficienza placentare, distacco prematuro della placenta, gravidanza prolungata, distocia, parto cesareo, parto indotto, parto gemellare, anomalie del cordone ombelicale, aspirazione di meconio, gravi malattie materne e avvelenamento da Festuca. È stata inoltre riscontrata anche in soggetti nati da parti rapidi e apparentemente eutocici (Vaala, 1994; Santschi e



LeBlanc, 1997). Possono essere colpiti indifferentemente puledri prematuri o nati a termine, senza particolari predisposizioni di razza.

Le placentiti, sebbene esitino più comunemente in setticemia neonatale, a seconda della gravità e della durata, possono anche causare asfissia acuta o cronica (Vaala, 1994).

Il distacco placentare prematuro può presentarsi in forma acuta al momento del parto o in forma cronica durante la gestazione, solitamente associato a placentite (Santschi e LeBlanc, 1997). Il grado di asfissia dipende dalla durata e dal grado di distacco placentare. Nel caso di distacco prematuro e completo, l'asfissia fetale sarà facilmente diagnosticabile, mentre i distacchi parziali di placenta sono più insidiosi e difficili da valutare (Vaala, 1994).

L'insufficienza placentare è un processo che porta al deterioramento progressivo della funzione della placenta con una diminuzione nel trasferimento transplacentare di ossigeno e sostanze nutritive al feto. L'ipossiemia fetale è lo stimolo principale coinvolto nella riduzione della crescita fetale, quasi un tentativo dell'organismo di ridurre le richieste metaboliche per la crescita del feto (Lackman et al., 2001).

Anche gravidanze prolungate sono state spesso associate alla nascita di puledri sottopeso talvolta affetti da PAS (Vaala, 1994). Nella cavalla la durata della gravidanza ha un range molto ampio e non si può parlare di gravidanza prolungata se non sono trascorsi almeno 365 giorni dall'ultimo salto (Santschi e LeBlanc, 1997).

Durante il parto distocico può verificarsi una compressione del cordone ombelicale che causa ipossia fetale acuta. Parti difficili possono inoltre provocare traumi toracici che determinano nel neonato una compressione cardio-polmonare e contribuiscono a prolungare l'ipossia post-partum.

Durante il parto cesareo è invece l'ipotensione materna causata dagli anestetici o l'ipocapnia dovuta ad una ventilazione forzata inadeguata, a mettere in pericolo la perfusione utero-placentare. Inoltre, il posizionamento della fattrice in decubito dorsale, necessario per l'intervento, provoca un spostamento di tutto il peso dei visceri addominali sull'aorta e sulla vena cava della madre, andando ad ostacolare il flusso placentare.

L'induzione del parto invece può contribuire all'asfissia fetale stimolando contrazioni uterine molto violente, con prematuro distacco della placenta o distocia (Vaala, 1994).

Durante la gravidanza gemellare, le superfici dell'allantocorion che vengono in contatto sono prive di villi, a discapito ovviamente della nutrizione fetale, in quanto la placenta della cavalla è di tipo epiteliocoriale diffuso completo. In questa condizione lo sviluppo del feto non è quindi ottimale, in quanto con l'avanzare dello stato di gestazione aumentano i fabbisogni nutritivi che non possono essere pienamente soddisfatti, essendo la placentazione strutturata per un solo feto. In molti casi la vescicola embrionale più piccola viene riassorbita oppure il feto che riceve meno nutrimento muore, permettendo il normale sviluppo dell'altro gemello. Tuttavia la morte di un feto può talvolta abbassare il tasso di progesterone a livelli tali da provocare l'apertura della cervice e contrazioni uterine, con conseguente aborto di entrambi i feti. Non tutte le gravidanze gemellari esitano in morte fetale ed aborto. Si può avere infatti la nascita di uno o di entrambi i puledri vivi, ma spesso disvitali. In questo caso è il secondo feto ad essere maggiormente a rischio di asfissia perinatale, per la più lunga esposizione a contrazioni energiche e attive durante il travaglio (Ambrosi et al., 2000).

**Table 1. Causes of hypoxia in the fetus and neonate\*.**

**Maternal Causes**

- Reduced maternal oxygen delivery
  - Maternal anemia
  - Maternal pulmonary disease with hypoxemia
  - Maternal cardiovascular disease
- Reduced uterine blood flow
  - Maternal hypotension (endotoxemia/colic)
  - Maternal hypertension (laminitis/painful conditions)
  - Abnormal uterine contractions
  - Anything that increases uterine vascular resistance

**Placental Causes**

- Premature placental separation
- Placental insufficiency e.g., twins
- Placental dysfunction
  - Fescue toxicity
  - Postmaturity
  - Placentitis
  - Placental edema
- Reduced umbilical blood flow
  - General anesthesia of the dam
  - Congenital cardiovascular disease
  - Inappropriate fetal blood distribution
  - Fetal hypovolemia
  - Excessive length of umbilical cord

**Intrapartum Causes**

- Dystocia
- Premature placental separation
- Uterine inertia
- Oxytocin induction of labor
- Caesarian section
  - General anesthesia
  - Poor uterine blood flow due to maternal positioning
  - Decreased maternal cardiac output
  - Reduced umbilical blood flow
  - Effects of anesthetic drugs on fetus
- Anything that prolongs Stage 2 labor

Figura 1.2: Wilkins, 2003

Le anomalie del cordone ombelicale sono in genere rappresentate da eccessiva lunghezza con conseguente torsione. Un cordone ombelicale lungo più di 80 cm può causare, nei casi più gravi, morte fetale e aborto. La torsione del cordone diminuisce l'afflusso di sangue al feto e quindi di ossigeno e nutrienti, con ripercussioni più o meno gravi. Se l'insulto è talmente prolungato nel tempo da divenire cronico, generalmente non si verifica la morte del feto, bensì un arresto o una diminuzione dello sviluppo fetale, con un elevato rischio di danno neuronale (Rossdale e Ousey, 2002).

L'espulsione del meconio in utero, con conseguente imbrattamento del feto, dei fluidi fetali e della placenta è stato associato a stress fetale e soprattutto a ipossia. L'aspirazione del meconio, sia in utero che durante il parto, determina ipertensione polmonare, polmonite chimica, ostruzione delle vie aeree, atelettasia e disfunzioni del surfattante. Questi eventi causano alterazione degli scambi gassosi e quindi un peggioramento dell'ipossia nel periodo neonatale (Vaala, 1994).

L'ultima causa riportata è l'avvelenamento da piante del genere *Festuca*, che abbonda nei pascoli del Nord America. Quando queste piante vengono infestate dal fungo endofita *Acremonium coenophialum* e vengono ingerite dalla fattrice gravida, possono avere effetti negativi sulle ultime fasi della gravidanza, in quanto provocano un prolungamento della gestazione, distocia e ipogalassia. La placenta in questo caso è spesso ispessita ed edematosa (Santschi e LeBlanc, 1997).

## 1.1.2 Meccanismi fisiopatologici

---

L'asfissia è causata dalla diminuzione della disponibilità di ossigeno a livello cellulare come risultato della combinazione di ipossiemia e ischemia. Come conseguenza andrà a determinare, in base al grado e alla durata della stessa, ipercapnia e acidosi metabolica più o meno gravi.

L'ipossiemia determina una diminuzione di ossigeno nel torrente circolatorio, mentre rimane inalterato il flusso sanguigno, cosicché i tessuti, aumentando l'affinità per l'ossigeno e incrementandone l'assunzione, riescono a compensare.

L'ischemia, riducendo la perfusione tissutale, esita invece in danni molto più gravi in quanto porta ad un metabolismo anaerobico, con conseguente aumento della concentrazione del lattato ematico, acidosi intracellulare e alterazioni di circolo (Koterba et al., 1990).

Tra gli eventi biochimici associati a ipossia-ischemia, ci sono: consumo di ATP, depolarizzazione di membrana, eccesso di neurotrasmettitori nello spazio presinaptico, produzione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (radicali liberi), perossidazione lipidica ed edema cerebrale. Tutti questi fattori contribuiscono alla distruzione cellulare, con gravi conseguenze fino alla morte cerebrale (Calvert e Zhang, 2005).

Probabilmente l'aumentata permeabilità capillare, la formazione di edemi e il danno tissutale sono causati soprattutto dalla formazione di radicali liberi dell'ossigeno che si hanno in conseguenza della redistribuzione del flusso ematico ai tessuti ischemici (Koterba et al., 1990).

Le informazioni che riguardano la fisiopatologia dell'encefalopatia ipossico-ischemica neonatale (HIE), sono state prese ed estrapolate da studi condotti in neonatologia umana e riportate in neonatologia equina, in quanto le informazioni specifiche sull'encefalopatia neonatale del puledro sono scarse. Le conoscenze dei probabili meccanismi fisiopatologici che si hanno nelle altre specie, ci possono quindi fornire dati importanti per eseguire una corretta diagnosi e terapia anche nel puledro (Wong et al., 2011).

La sintomatologia neurologica è legata ad una serie di eventi biochimici e fisiologici che, in seguito ad un insulto ipossico-ischemico transitorio e reversibile, culminano con la morte delle cellule neuronali in due fasi distinte (Vaala, 1994; Wong et al., 2011).

Durante la prima fase si verifica il *danno neuronale primario*: la carenza di ossigeno e di glucosio a livello centrale causa una diminuzione della fosforilazione ossidativa, la sempre minore produzione di ATP, aumenta ancora di più la carenza energetica e l'accumulo di acido lattico per l'instaurarsi di un metabolismo anaerobico (Wilkins, 2003). Tutto ciò determina il malfunzionamento della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-dipendente che non riesce più a mantenere il gradiente ionico e in seguito all'annullamento del potenziale di membrana si hanno ingresso di sodio e quindi di acqua nella cellula.

Inoltre, a causa della carenza di glucosio indispensabile al loro funzionamento, si ha il fallimento dei meccanismi di rilascio e di ricaptazione energia-dipendente del neurotrasmettitore eccitatorio glutammato. In questo modo si ha un accumulo del neurotrasmettitore nello spazio presinaptico, il che stimola ulteriormente l'apertura delle pompe ioniche, aumentando l'ingresso di sodio, cloro e acqua all'interno della cellula fino alla lisi osmotica cellulare. Tale accumulo

inoltre, modificando i recettori NMDA, strettamente collegati ai canali calcio dipendenti, ne determina l'apertura. L'entrata di calcio nella cellula scatena una serie di reazioni a cascata coinvolte nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Wong et al., 2011). La seconda fase del danno neuronale, *morte neuronale ritardata o secondaria* è associata allo stress ossidativo causato da un danno da ri-perfusione post ischemica (*post ischemic reperfusion injury*) che comprende edema citotossico, accumulo intracellulare di calcio, attivazione di numerosi enzimi e di reazioni a cascata, infiammazione e apoptosi.

L'accumulo di calcio nel comparto intracellulare attiva una serie di meccanismi enzimatici tra cui l'attivazione della fosfolipasi, della nucleasi e della proteasi, le quali portano a morte cellulare (Wong et al., 2011).

L'encefalo è particolarmente sensibile al danno ossidativo perché contiene basse concentrazioni endogene di antiossidanti e alte concentrazioni di acidi grassi polinsaturi, facilmente soggetti alla perossidazione lipidica. L'ipossia determina inoltre nei tessuti una modificazione dello stato redox delle macromolecole con formazione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), rilasciati nella fase di ri-perfusione ematica. I radicali liberi causano la perossidazione dei fosfolipidi di membrana, con conseguente rottura della stessa e morte cellulare (Kumar et al., 2008). Si può in definitiva affermare che l'effetto combinato di energia cellulare insufficiente, acidosi, rilascio di glutammato, accumulo di calcio intracellulare, neurotossicità data dalla perossidazione lipidica e dai ROS, crea un meccanismo patologico che conduce alla perdita dei componenti cellulari essenziali e alla sua morte (Volpe, 2001; Grow e Barks, 2002).

Molti dei meccanismi patologici che portano al danno neuronale iniziano già durante l'insulto acuto ipossico-ischemico, ma la sintomatologia si manifesta da 6 a 48 ore dopo (Kumar et al. 2008).

Nella patogenesi dei danni neurologici sono probabilmente coinvolte anche le citochine pro-infiammatorie in corso di placentite e la risposta infiammatoria fetale. Le cellule della microglia possono essere attivate anche da un insulto di tipo ipossico-ischemico e produrre citochine pro-infiammatorie quali IL-1, IL-8, IL-18 e TNF. La conseguente risposta infiammatoria aumenta il flusso ematico regionale cerebrale e altera le funzioni dei neuroni e della microglia, con conseguente danno cerebrale ed edema citotossico (Wong et al., 2011).

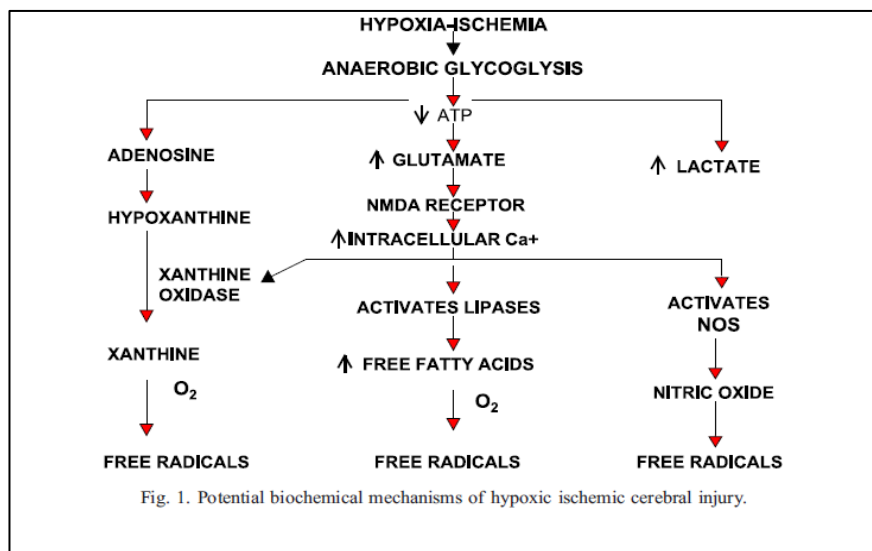


Figura 1.3: Shalak e Perlman, 2004

## 1.2 Risposta del feto e del neonato all'ipossia

Il primo segno vitale che viene compromesso nei feti umani sottoposti a privazione di ossigeno è il movimento respiratorio. Dopo un iniziale



aumento della frequenza cardiaca e di quella respiratoria, si ha un transitorio periodo di apnea primaria. Se la privazione di ossigeno continua, il feto comincia a “boccheggiare” in atteggiamento di fame d’aria e segue un periodo di apnea secondaria. La frequenza cardiaca inizia a diminuire nello stesso tempo in cui il feto entra in apnea primaria, ma la pressione del sangue viene mantenuta normale fino alla comparsa dell’apnea secondaria (Provis e Moynihan, 1999; Kattwinkel e Sort, 2000; Shalak e Perlman, 2004). A questo punto il centro del respiro è inibito e non risponde all’ipercapnia. In queste fasi iniziali, la risposta del feto avviene con un meccanismo neuro-ormonale rilasciando l’angiotensina II, l’ormone antidiuretico, le catecolamine e i glucocorticoidi. Proprio l’azione combinata di questi mediatori neuro-ormonali provoca una redistribuzione di sangue dagli organi non vitali a quelli fondamentali per la sopravvivenza del feto. Per questa priorità di circolo, avremo quindi una vasocostrizione a livello polmonare, intestinale, renale, muscolare e dermico, mentre il flusso di sangue agli organi vitali, come il cuore e il cervello, rimane inalterato.

Se la privazione di ossigeno continua, la funzione miocardica e la gittata cardiaca diventano insufficienti e viene quindi a mancare l’irrorazione sanguigna degli organi (Koterba, 1990; Kattwinkel e Sort, 2000).

Lo scambio di gas a livello placentare avviene per semplice diffusione e dipende dai gradienti di pressione tra sangue materno e sangue fetale. Nei suinetti l’apnea alla nascita è frequente conseguenza dell’anossia intra-partum e della depressione del centro della respirazione, dovuta ad una maggiore concentrazione di anidride carbonica e minori concentrazioni di ossigeno. Quando vi è una

alterazione dello scambio gassoso che causa una diminuzione della disponibilità di ossigeno, vengono stimolati diversi meccanismi fisiologici nel feto. Una di queste risposte fisiologiche è la capacità del feto di rilasciare peptidi oppioidi nella circolazione sanguigna dopo un'ipossia intrauterina durante il parto. Questi peptidi, noti come beta-endorfine, riducono la percezione del dolore fetale e la loro concentrazione nel sangue è stata positivamente correlata al grado di acidosi nei suinetti durante il parto (Shalak e Perlman, 2004).

Uno studio molto recente sul ruolo dei progestageni nello sviluppo della sintomatologia neurologica dei puledri affetti da PAS è stato condotto da Aleman e collaboratori (2013). Gli autori hanno evidenziato come i puledri sani abbiano una significativa diminuzione della concentrazione di progestageni, dalla nascita alle prime 48 ore di vita, mentre nei puledri affetti da PAS e nei malati non-PAS hanno riscontrato un aumento significativo rispetto ai sani. In particolare i valori di progesterone e pregnenolone nei malati non-PAS comincia a calare a 48 ore di età, mentre in quelli affetti da PAS rimane elevato. Gli autori ipotizzano che queste concentrazioni elevate indichino un ritardo o un'interruzione della transizione dalla vita fetale a quella extra-uterina. Questi steroidi, infatti, attraversano la barriera emato-encefalica e ad elevate concentrazioni presentano un effetto neuromodulatore inibitore del SNC, portando ad alterazioni del comportamento e dello stato di coscienza nei puledri affetti da PAS dopo la nascita. Il feto in utero è sottoposto ad elevati livelli di progesterone e degli altri progestageni che svolgono un'azione neuromodulatrice dell'attività cerebrale. Con la diminuzione di questi ormoni a livello placentare alla nascita e concomitante passaggio di quelli adrenergici si ha un calo della concentrazione dei progestageni

subito dopo la nascita che permette l'adattamento rapido alla vita extra-uterina.

Uno stress fetale come l'ipossia, fa aumentare la concentrazione di neurosteroidi progestinici nel cervello come meccanismo neuroprotettivo endogeno. L'ipossiemia fetale è inoltre lo stimolo principale coinvolto nella riduzione della crescita del feto, quasi un tentativo dell'organismo di ridurre le richieste metaboliche durante lo sviluppo fetale (Lackman et al., 2001). Quando le richieste metaboliche aumentano, intervengono meccanismi fisiologici in grado di incrementare il trasporto e l'estrazione dell'ossigeno dal sangue. Se la distribuzione è ridotta e anche tale meccanismo viene meno, il consumo comincia a diminuire e l'energia necessaria alla cellula viene prodotta mediante il metabolismo anaerobio. La carenza di ossigeno determina negli organismi eucarioti l'attivazione di una serie specifica di adattamenti cellulari (Baird et al., 2006).

L'adattamento del feto equino allo stato ipossico comprende:

- a) aumento dell'affinità dell'emoglobina fetale per l'ossigeno;
  - b) aumento della capacità dei tessuti di estrarre l'ossigeno;
  - c) maggiore resistenza dei tessuti all'acidosi
- (Vaala, 1994).

Quando l'ipossia persiste, vengono stimolati anche altri meccanismi compensatori con conseguente:

- a) bradicardia;
- b) diminuzione del consumo di ossigeno;
- c) glicolisi anaerobia;
- d) redistribuzione del flusso ematico;
- e) contrazione splenica;

f) aumento della pressione sanguigna.

Queste risposte sono dovute all'attivazione di chemocettori arteriosi periferici, che fanno aumentare il tono vagale portando appunto ad una diminuzione dei battiti cardiaci e ad un aumento dell'attività simpatica che induce alla vasocostrizione periferica con conseguente ipertensione (Da Silva et al, 2000; Alonso Spilbury et al., 2005).

Il feto umano, a differenza di quello equino, possiede elevate riserve di glicogeno che saranno la sua fonte energetica nelle prime ore di vita; cospicue concentrazioni di questo substrato energetico a livello cardiaco sono importanti per il neonato, in quanto gli permettono di mantenere la circolazione ematica durante l'asfissia. L'esaurimento delle riserve di glicogeno porta a ipoglicemia, la quale contribuisce all'insufficienza cardiaca, alle convulsioni e al danno neuronale. Quando l'ossigeno contenuto nel sangue è esaurito, la capacità del cuore di continuare a pompare dipende dall'energia prodotta tramite la glicolisi anaerobia che utilizza le riserve di glicogeno cardiaco. Sembra che ripetuti episodi di ipossiemia durante la gestazione portino lentamente all'esaurimento del glicogeno cardiaco, con diminuzione progressiva della capacità del cuore di pompare sangue in eventuali successivi episodi (Shalak e Perlman, 2004).

Nel puledro, la concentrazione di glucosio alla nascita è circa il 50-60% di quella materna e raggiunge i valori più bassi 2 ore dopo la nascita (Palmer, 2006). L'ipoglicemia (<40 mg/dL) precedente alla prima poppata è stata associata a insufficienza placentare e PAS (Vaala, 1999) ed è dovuta alle scarse riserve di glicogeno presenti alla nascita o a una condizione di iperinsulinismo. Poiché le riserve di glicogeno possono essere ridotte nei neonati prematuri, essi possono sviluppare ipoglicemia se non ricevono un apporto di glucosio

dall'esterno. Le riserve di glicogeno sono ridotte anche nei neonati che hanno presentato malnutrizione intrauterina a causa di insufficienza placentare e, se aggravata da asfissia perinatale, ogni riserva di glicogeno viene rapidamente consumata durante la glicolisi anaerobia. I neonati che presentano deficit di glicogeno possono sviluppare ipoglicemia in qualunque momento nei primi giorni di vita, specialmente se c'è stato un prolungato intervallo tra i pasti o se l'apporto nutritivo è scarso (Axon e Palmer, 2008).

La contrazione splenica mediata dalle catecolamine aumenta la quantità di globuli rossi circolanti e aumenta la quantità di ossigeno portata ai tessuti (Koterba et al., 1990).

## 1.3 Segni clinici

---

L'asfissia perinatale nel puledro interessa spesso più di un organo (Vaala, 1994) e determina numerose disfunzioni clinicamente manifeste (Furr, 1997). Sebbene la PAS si manifesti primariamente con un'encefalopatia ipossico-ischemica (HIE - Hypoxic Ischemic Encephalopathy), il tratto gastrointestinale e i reni sono coinvolti di frequente. Possono essere interessati anche l'apparato respiratorio e il cardiovascolare e sono comuni anche disordini endocrini (Wilkins, 2003). Il tipo di tessuto colpito e l'estensione del danno dipendono dalla durata dell'asfissia (acuto o cronico), dalla gravità dell'insulto ipossico (parziale o completo) e dall'età gestazionale del feto/neonato (prematuro o a termine) (Vaala, 1994; Koterba, 1990).

<i>Organi</i>	<i>Segni clinici</i>	<i>Esami collaterali</i>	<i>Lesioni anatomico-patologiche</i>
<b>Sistema nervoso centrale</b>	Ipotonia/ipertonia muscolare, coma, perdita del riflesso di suzione, deficit propriocettivi, apnea, convulsioni, comportamenti anomali	Aumento della pressione intracranica, aumento della permeabilità della barriera emato-encefalica, della quantità di albumina	Emorragia, edema, necrosi ischemica
<b>Reni</b>	Oliguria, anuria, edema generalizzato	Azotemia, iponatremia, ipocloremia, proteinuria, aumento della GGT urinaria	Necrosi tubulare
<b>Apparato gastrointestinale</b>	Colica, addome acuto, distensione addominale, diarrea sanguinolenta, rigurgito	Sangue occulto nelle feci e nel reflusso gastrico, pneumatosi intestinale	Necrosi ischemica delle mucose, enterocolite, ulcera
<b>Apparato respiratorio</b>	Tachipnea, dispnea, retrazione delle coste	Ipossiemia, ipercapnia, acidosi respiratoria	Formazione di membrane ialine, atelettasia, aspirazione di meconio, ipertensione polmonare
<b>Apparato cardiocircolatorio</b>	Aritmia, tachicardia, polso periferico debole, edema generalizzato, ipotensione	Ipossiemia, aumento degli enzimi del miocardio	Infarti del miocardio, insufficienza valvolare, persistenza della circolazione fetale
<b>Fegato</b>	Ittero, anormale stato mentale	Iperbilirubinemia, aumento degli enzimi epatici	Necrosi epatocellulare, stasi biliare
<b>Apparato endocrino. Surrenali e paratiroidi</b>	Debolezza, apnea, convulsioni	Ipocortisolemia, ipocloremia	Necrosi, emorragie

Tabella 1.1: (modificata da Vaala, 1994).

### 1.3.1 Disfunzioni del Sistema Nervoso

---

I segni clinici di un puledro con la PAS sono molto variabili e poco specifici e possono comprendere uno o più dei seguenti sintomi: debolezza (ipotonia), depressione mentale (stupor, sonnolenza, difficoltà nello svegliarsi, letargia, coma), convulsioni da moderate a gravi, tremori e ipertonìa. Altri segni clinici molto comuni sono l'incapacità di trovare la mammella ed alimentarsi autonomamente, la perdita del riflesso di suzione e di interesse nei confronti della madre, i vocalizzi anomali, la disfagia, la perdita del tono della lingua, la cecità centrale, l'irregolarità della frequenza e dei caratteri del respiro (apnea, bradipnea, respiro superficiale) e i deficit propriocettivi. È molto importante riconoscere precocemente questi segni molto evidenti, senza sottovalutare la possibilità che vi possa essere anche il coinvolgimento di altri organi (Wilkins, 2011).

I puledri che presentano questi segni clinici, sono stati distinti in due categorie:

Categoria 1: puledri nati a termine (>320 giorni), da parto eutocico, che non presentano sintomi nell'immediato post-partum e che cominciano a manifestare una sintomatologia evidente da 6 a 24-48 ore dopo la nascita. In assenza di patologie concomitanti e di parametri di laboratorio alterati non specifici, si potrebbe dire che questi puledri rientrano nella Sindrome da Maladattamento Neonatale descritta da Rosedale nel 1972. Le possibili cause sono: compressione temporanea del cordone ombelicale, trauma toracico, mentre il puledro è impegnato nel canale del parto con conseguente compressione miocardica e insufficienza cardiaca, aumento della pressione intracranica con possibili emorragie subaracnoidee, distocia,

distacco prematuro di placenta, inerzia uterina, parto indotto con ossitocina, parto cesareo e tutto ciò che prolunga la seconda fase del parto.

Categoria 2: puledri che presentano alti fattori di rischio di sviluppare HIE, quali malattie della madre, anomalie placentari e/o alterazioni del comportamento immediatamente dopo la nascita. Probabilmente l'insulto ipossico per questi soggetti è avvenuto già in utero. Questi puledri presentano una prognosi infausta con una percentuale di sopravvivenza del 50% (Green, 1990; Hesse-Dudan e Rosedale, 2003; Knottenbelt, 2004; MacKay, 2005; ).

I segni clinici sono riconducibili principalmente a disfunzioni cerebrali, ma alcuni puledri (di solito della categoria 2) mostrano ulteriori segni che indicano un coinvolgimento del tronco cerebrale o del midollo spinale. Di solito ci sono anomalie comportamentali, tra cui mancanza di affinità o di interesse per la madre, irrequietezza, iperreattività alla manipolazione, postura anomala, protrusione della lingua, movimenti inconsueti della mandibola e della faccia, sguardo stuporoso, movimenti involontari della testa e della lingua e vocalizzazione anomala. Sono comuni crisi convulsive ricorrenti; i segni variano da lievi movimenti anomali del viso e della mascella a crisi generalizzate di tipo tonico clonico e movimenti "di pedalamento" degli arti. In aggiunta alle anomalie comportamentali, ci possono essere letargia o torpore, head tilt, paralisi facciale, dispnea, atassia e debolezza degli arti. Segni di disfunzione multipla d'organo, che coinvolgono polmoni, reni, cardiocircolatorio, gastroenterico e fegato, possono complicare il quadro clinico di HIE (Vaala e House, 2002; Wilkins, 2004).



L'HIE è la principale manifestazione causata dalla PAS, a cui è associata un'ampia gamma di segni clinici che variano da una modesta depressione con perdita del riflesso di suzione, fino allo status epilepticus (Wilkins, 2003).

L'asfissia provoca una encefalopatia associata a emorragia, edema e necrosi, poiché distrugge i meccanismi che preservano l'ossigenazione dell'encefalo, portando così all'ischemia tissutale. Il tempo necessario per passare dal danno ischemico alla morte cellulare non è ancora noto. Se l'episodio di asfissia è breve e si è verificata solo una transitoria ischemia tissutale, allora può essere prevenuto il danno al tessuto cerebrale e ci sarà una reversibilità delle conseguenze neurologiche. Una ischemia prolungata provoca necrosi con rottura delle gap-junction tra le cellule dell'endotelio dei capillari e passaggio di molecole osmoticamente attive nel vicino interstizio cerebrale. Queste molecole vengono seguite dalle molecole d'acqua provenienti dagli spazi intravascolari, generando edema. In presenza di un'estesa necrosi dell'encefalo, aumenta la pressione intracranica e ciò contribuisce ad aumentare ulteriormente la richiesta di ossigeno dell'encefalo (Vaala, 1999). Nei puledri in condizioni critiche, l'aumento della pressione intracranica e dell'edema cerebrale, sono stati associati ad ernia del cervelletto (Kortz et al., 1992). Oltre ai meccanismi fisiopatologici, visti in precedenza, che creano il danno cerebrale (danno neuronale primario e secondario) anche le convulsioni, che si riscontrano comunemente nelle gravi encefalopatie, producono una serie di ulteriori danni cerebrali tramite vari meccanismi:

- ipoventilazione ed apnea che esitano in ipossiemia e ipercapnia;

- aumento della pressione arteriosa e del flusso ematico cerebrale, quindi aumento della pressione intracranica;
- progressivo danno neuronale dovuto ad eccessivo rilascio di aminoacidi eccitatori come il glutammato;
- esaurimento delle limitate scorte di energia dell'encefalo per supportare l'attività convulsiva

(Volpe, 1987).

Nei bambini neonati, l'HIE può essere divisa in diverse categorie in base alle conseguenze (Robertsen e Finer, 1985; Hill e Volpe, 1989).

Un'encefalopatia di lieve gravità è caratterizzata da uno stato di ipervigilanza, irritabilità, nervosismo o agitazione, che spesso dura meno di 24 ore e non è associata a conseguenze neurologiche a lungo termine. Un'encefalopatia di media gravità è accompagnata da ipotonia, letargia e convulsioni, che possono durare anche più di una settimana; approssimativamente il 20-40% dei neonati che rientrano in questa categoria soffre di danni neurologici cronici. Nelle gravi encefalopatie si riscontrano convulsioni, alterata funzionalità del tronco encefalico, flaccidità e coma; in questo caso la maggior parte dei neonati svilupperà danni neurologici permanenti come ritardo mentale, epilessia e paralisi cerebrale. Le convulsioni sono una manifestazione comune dell'HIE e si manifestano nel 50% dei neonati con asfissia (Hill and Volpe, 1989).

I puledri con HIE presentano una grande varietà di forme convulsivo-simili. L'irrequietezza è associata ad ipossia lieve e non è una vera e propria convulsione quanto piuttosto un'alterazione del movimento rappresentata da tremori che possono essere fermati da una contenzione delicata. I tremori sono spesso ritmici, con frequenza e ampiezza costanti. Le convulsioni lievi vengono chiamate

automatismi motori, caratterizzati da eventi parossistici, tra cui ammiccamento oculare, deviazione oculare, nistagmo, “pedalamento degli arti”, da una varietà di movimenti linguali come protrusione della lingua intermittente e succhiare a vuoto, da altre alterazioni vasomotorie quali apnea, dispnea e variazioni nella frequenza cardiaca. La postura rigida è un'altra forma convulsiva di tipo lieve, caratterizzata da iperestensione o flessione simmetrica degli arti ed è spesso accompagnata da movimenti oculari anomali e apnea. Veri e propri attacchi epilettici sono le convulsioni tonico-cloniche, caratterizzate da movimenti rigidi a scatti e impossibili da bloccare con il contenimento. I neonati umani con convulsioni epilettiformi hanno un migliore esito neurologico a breve termine rispetto a quelli che presentano crisi epilettiche sottili.

Non tutte le alterazioni neurologiche nei puledri appena nati sono dovute alla PAS .

Altre cause di malattia neurologica neonatale sono:

- disturbi metabolici: ipocalcemia, ipomagnesiemia, iponatriemia, ipernatremia, iperosmolalità (iperlipemia, iperglicemia), grave azotemia, encefalopatia epatica;
- malattie infettive: meningite settica, setticemia / endotossiemia, infezioni da EHV1;
- malformazioni: idrocefalo, agenesia o malformazioni del corpo calloso, vertebrale e del midollo spinale, atrofia cerebellare, malformazione occipitoatlantoassiali;
- trauma cranico o vertebrale;
- tossine;

(Vaala,1999; Furr, 1996).

L'anamnesi deve riguardare:

- razza, sesso ed età gestazionale del puledro;
- parto (ad esempio se è stato assistito o distocico);
- informazioni riguardanti lo stato di salute di fattrice e stallone ed eventuali vaccinazioni, trattamenti antiparassitari e altre cure mediche;
- esame della placenta;
- concentrazione ematica delle IgG del puledro;
- età del puledro alla comparsa del problema neurologico;
- decorso e gravità del disturbo;
- caratteristiche di ogni episodio convulsivo: età in cui si è verificato, durata, frequenza con cui si manifesta, descrizione;
- terapie effettuate e risposta al trattamento;
- fattori che contribuiscono ad aggravare o esacerbare i segni neurologici: movimento, improvvisi cambiamenti nelle condizioni ambientali (luce, rumore o temperatura), somministrazione di farmaci;
- eventuali traumi;
- eventuale esposizione del puledro o della fattrice a potenziali tossine;

(Green e Mayhew, 1990).

È evidente che un'accurata conoscenza del comportamento fisiologico del puledro facilita un riconoscimento precoce di una qualsiasi anormalità che può suggerire un problema neurologico. Entro pochi minuti dalla nascita i puledri sani/normali raggiungono da soli la posizione sternale, presentano il riflesso di suzione e rispondono a stimoli esterni. I primi atteggiamenti di socializzazione, come seguire

la madre e cercare riparo, compaiono generalmente circa dopo un'ora e mezzo e sono in grado di assumere la posizione eretta, camminare e nutrirsi entro le due ore. Nei primi giorni di vita un puledro sano si nutrirà dalla fattrice in media sette volte in un'ora. Un movimento ritmico della testa in alto e in basso mentre è alla ricerca della mammella è un comportamento normale che serve per stimolare la produzione di latte. Circa tre ore dopo la nascita, il puledro si addormenta per la prima volta; successivamente questo accadrà regolarmente dopo ogni poppata. Durante il sonno il puledro assume normalmente una posizione in decubito laterale con arti distesi. Già dopo 24 ore dalla nascita i puledri sani appaiono forti, vigili e sono in grado di correre con la madre (Green e Mayhew, 1990). L'atteggiamento di flessione della testa, movimenti della testa in avanti e indietro, la stazione a base ampia, passo ipermetrico e assenza di risposta alla minaccia sono segni normalmente riscontrati e sono una manifestazione della fisiologica immaturità cerebellare (Adams e Mayhew, 1985; Mayhew, 1988).

### 1.3.2 Disfunzioni renali

---

Il rene è uno degli organi metabolicamente più attivi. In situazioni fisiologiche, in virtù del sistema dei vasa recta contro-corrente, la tensione di ossigeno nella midollare è relativamente bassa e per questa ragione il rene è particolarmente sensibile all'ipossia (Corley, 2003). La redistribuzione della portata cardiaca fetale in risposta all'ipossia intrauterina provoca una diminuzione della perfusione del rene (Cohn et al., 1974) e vari gradi di danno renale. I segni più gravi sono la necrosi acuta tubulare, l'insufficienza renale e l'oliguria/anuria

(Corley, 2003). Se il danno renale è invece solo parziale si può avere una necrosi tubulare acuta poliurica caratterizzata da abbondante produzione di urine isostenuriche che non variano modificando la fluidoterapia, perdita renale di elettroliti (sodio, calcio e potassio) e squilibri elettrolitici sistemici (iponatremia, ipo o iperkaliemia) (Koterba, 1990). Nei bambini neonati è comprovato che il danno renale è indice di asfissia perinatale di grado medio (Perlman e Tack, 1988). Il rene del neonato equino è più precoce rispetto a quello dei neonati di altre specie, perciò l'extrapolazione di parametri renali da altre specie, così come dal cavallo adulto, non si può considerare attendibile (Brewer, 1990). Nei puledri neonati in caso di danno renale indotto da ipossia, si riscontra oliguria, edema periferico, elevati livelli di creatinina sierica. La creatinemia elevata alla nascita è segno di insufficienza placentare/placentite che nelle ore successive al parto diminuisce se non sono presenti danni renali (Vaala, 1999) con aumento della  $\gamma$ -glutamyl-transferasi (GGT) nelle urine. Nel neonato umano l'oliguria persistente, nonostante una corretta fluidoterapia, è un segno prognostico sfavorevole. Disturbi elettrolitici come l'ipocalcemia, l'iponatremia e l'ipocloremia possono derivare da danni tubulari (Vaala, 1994 e 1999).

### 1.3.3 Disfunzioni dell'apparato gastrointestinale

---

Una riduzione del flusso ematico splancnico in risposta all'ipossia provoca ischemia di vario grado a livello intestinale. Questo porta al rilascio degli ormoni fetali dello stress, angiotensina II e vasopressina, che determinano nell'intestino una potente vasocostrizione (Koterba, 1990). Gli effetti clinici risultanti da enterocolite ischemica includono reflusso gastroduodenale, ileo, intolleranza alla nutrizione enterale, coliche, addome acuto, distensione addominale, diarrea ed Enterocolite Necrotizzante (NEC) che è la più grave forma di disfunzione gastro-intestinale. Questa si riscontra più spesso in soggetti prematuri con un basso peso corporeo alla nascita e che hanno subito un grave stress perinatale. Sebbene intestino tenue e colon distale prossimale siano più frequentemente coinvolti, l'intero tratto gastrointestinale, dallo stomaco al retto, è sensibile a tale patologia.

Nei neonati a rischio sono tre le condizioni necessarie per sviluppare la NEC: danno ischemico ipossico intestinale; presenza di batteri nel lume; nutrizione enterale.

Una grave asfissia provoca un'ischemia gastrointestinale e una ipoperfusione mesenterica; queste causano una diminuzione del metabolismo delle cellule della mucosa intestinale e una riduzione del muco che protegge la mucosa, quindi gli enzimi proteolitici presenti nel lume iniziano un processo di autodigestione, attaccando la barriera mucosale. I batteri presenti nel lume intestinale possono quindi invadere e colonizzare la parete del viscere e moltiplicarsi. Il latte con cui si alimenta il neonato costituisce un substrato prontamente

disponibile per i batteri e una sua fermentazione da parte di questi porta ad accumulo di gas nella parete (pneumatosi intestinale). L'invasione batterica si può estendere al fegato sia per via linfatica, sia tramite la circolazione portale, provocando una setticemia grave. Le lesioni sono di tipo necrotico e coinvolgono la mucosa e la sottomucosa di tutto l'apparato gastroenterico. In caso di rottura dell'intestino, si andrà invece incontro a peritonite e pneumoperitoneo. Nei puledri l'ecografia transaddominale è usata per identificare un eventuale ispessimento focale della parete intestinale e l'accumulo di gas intramurale (Magdesian, 2005). *Klebsiella* spp., *Escherichia coli* (Cudd e Wilson, 1990) e Clostridi (Corley, 2003) sono tra i batteri più frequentemente implicati nella NEC.

Altro problema comune del tratto digestivo nei puledri con PAS è l'ulcera gastrica, la cui eziologia è ancora sconosciuta ma a cui sono state associate alcune condizioni frequenti come lo stress (di qualsiasi origine), l'asfissia, la gastrite o il ritardato svuotamento gastrico (Cudd e Wilson, 1990). Le lesioni sono state spesso osservate nella mucosa lungo il *margo plicatus* e lungo la grande curvatura dello stomaco, con coinvolgimento del fondo cieco o proventricolo e del fondo ghiandolare e sono state notate molto meno frequentemente lungo la piccola curvatura (Murray et al., 1990). I neonati non mostrano i segni clinici associati all'ulcera gastrica tipici dei puledri più grandi, come il bruxismo o lo ptialismo, ma possono essere semplicemente inappetenti o mostrare segni colici (Cudd, 1990). La diagnosi di ulcera gastrica avviene tramite endoscopia. Nella maggior parte delle forme di sindrome da ulcera gastrica (EGUS) nel cavallo, l'acido cloridrico è stato descritto come un importante fattore intrinseco (Murray, 1992; Andrews et al., 199). I cavalli secernono



acido gastrico continuamente e i puledri sono in grado di mantenere un ambiente acido nello stomaco già a 2 giorni di vita (Sanchez et al., 1998). Studi condotti su puledri pony e su puledri malati hanno dimostrato una diminuzione del pH gastrico già al primo giorno di vita (Baker e Gerring, 1993; Sanchez et al., 2001). Il meccanismo con il quale avviene la produzione di acido gastrico nei puledri non è ancora chiaro, ma i neonati umani prematuri sono in grado di secernere acido cloridrico già a partire da 28 settimane di gestazione (Kuusela, 1998). L'introduzione di latte ha un immediato e profondo effetto sul pH gastrico nei puledri neonati, alzando il pH da circa 1,5 a 6 entro 30 secondi dall'inizio della suzione (Sanchez et al., 1998). Altri fattori estrinseci che possono contribuire alla formazione dell'ulcera sono la somministrazione di farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS), lo stress, fattori legati alla dieta o alla gestione dell'animale e altri disturbi gastrointestinali, soprattutto quelli con conseguente svuotamento gastrico ritardato (Mertz e Walsh, 1991; Murray, 1999). Nei neonati umani, lo stress dovuto alla gestione di un disturbo clinico primario è stato associato allo sviluppo di ulcera gastrica. Fattori protettivi primari propri dello stomaco includono un adeguato flusso ematico della mucosa, la secrezione di muco e di bicarbonato, la produzione di prostaglandine E2 e una corretta motilità gastrica e duodenale (Mertz e Walsh, 1991).

### 1.3.4 Disfunzioni dell'apparato respiratorio

Le alterazioni a carico dell'apparato respiratorio sono particolarmente comuni nel periodo perinatale, sia come condizioni primarie che secondarie ad altri processi patologici (Koterba, 1990).

La risposta del sistema vascolare polmonare all'ipossia e all'acidemia comprende un aumento delle resistenze vascolari polmonari, ipertensione polmonare, aumento della pressione atriale e persistenza della circolazione fetale con shunt destro-sinistro (ad esempio, persistenza del dotto arterioso e del forame ovale). Un'ipossia perinatale cronica esita in una resistenza arteriolare polmonare dovuta all'ipertrofia della muscolatura vasale liscia, con diminuzione del lume e riduzione del flusso ematico (Vaala, 1994). Questa vasocostrizione polmonare compromette la funzionalità degli pneumociti e la produzione di surfattante con conseguente atelettasia polmonare secondaria (Vaala, 1999). Un deficit secondario di surfattante si sviluppa come conseguenza di una sua alterata composizione o come risultato di una disfunzione degli pneumociti di tipo II. La produzione di surfattante necessita di una adeguata disponibilità del suo precursore lipidico presente nel sangue e la vasocostrizione polmonare compromette la disponibilità di questo substrato, portando ad una diminuzione della sua produzione. La carenza di surfattante indurrà un'alterata espansione alveolare (atelettasia), mismatch ventilazione/perfusione (VQ) o shunt polmonare, aumento dello sforzo respiratorio e insufficienza respiratoria secondaria (Fenger, 1998). In casi di grave insufficienza respiratoria, la prognosi nei puledri neonati è infausta, nonostante una terapia aggressiva con ventilazione meccanica e somministrazione di ossigeno terapia (Paradis, 1989).

Nei puledri prematuri o affetti da Sindrome da Asfissia Perinatale è stato osservato un respiro irregolare, caratterizzato da periodi di tachipnea o di respirazione normale, alternato ad apnee di 10-30 secondi (Koterba, 1990). La PAS può alterare il tipo di respirazione

attraverso i suoi effetti sul centro della respirazione o mediante una generale soppressione dell'attività riflessa (Sasidharan, 1992).

Nei puledri affetti da PAS le più comuni affezioni riguardanti l'apparato respiratorio sono: sindrome da stress respiratorio, sindrome da aspirazione di meconio e ipertensione polmonare.

- Sindrome da stress respiratorio (RDS - Respiratory Distress Syndrome) o malattia delle membrane ialine (HMD - Hyaline Membrane Disease): è una patologia caratterizzata prevalentemente da un'inadeguata ed insufficiente produzione di surfattante polmonare e correlata all'immaturità delle cellule epiteliali (pneumociti di II tipo) deputate, appunto, alla sintesi di surfattante. La funzione fisiologica primaria del surfattante è di ridurre la tensione superficiale a livello dell'interfaccia aria-liquido all'interno del polmone, conferendo quindi stabilità agli alveoli e prevenendo il collasso al termine dell'espiazione.

Nel feto, una volta escreto dai pneumociti di II tipo, il surfattante viene riversato nel liquido che riempie gli alveoli (FLP) in concentrazioni sempre crescenti con il progredire dell'età gestazionale. L'FLP è un ultrafiltrato del plasma fetale e alla nascita viene sostituito isovolumetricamente dall'aria ed ha un volume corrispondente alla capacità funzionale residua del polmone. Mentre durante la vita intrauterina non sembra subire notevoli variazioni, alla nascita viene eliminato con due meccanismi: il primo è tramite la fuoriuscita dalla trachea a causa della compressione del torace durante il passaggio del feto attraverso il canale del parto, mentre il secondo e principale meccanismo è il riassorbimento nel circolo ematico attraverso i vasi linfatici. La velocità di riassorbimento è direttamente correlata alla maturità fetale, infatti nei casi di prematurità il flusso

linfatico e quindi la velocità di riassorbimento sono molto più lenti rispetto al neonato a termine (Cosmi, 2001).

La maturazione del polmone comprende la capacità di produzione del surfattante, ma anche un assottigliamento della barriera alveolo-capillare, una diminuzione della permeabilità dell'epitelio alveolare ed un completo sviluppo della cassa toracica (Jobe, 1983). La formazione di membrane ialine, tipica lesione patologica associata alla RDS, è causata dall'aggregazione di proteine e detriti cellulari negli alveoli, come risultato di un aumento della permeabilità alveolare. Queste proteine non solo alterano la struttura alveolare, ma interagiscono direttamente con il surfattante, inattivandolo. Quindi, mentre una carenza di surfattante predispone ad un aumento della permeabilità capillare ed allo sviluppo di edema, altri fattori possono peggiorare la permeabilità, provocando un ulteriore deterioramento del surfattante e della funzionalità polmonare (Jobe, 1983; Koterba e Paradis, 1990).

- Sindrome da aspirazione di meconio: è causata da stress fetale, come asfissia in utero o compressione del cordone ombelicale, che comporta l'espulsione del meconio nel liquido amniotico per un aumento del tono vagale. Infatti durante l'ipossia, la diminuzione del flusso ematico può provocare ischemia intestinale, iperperistalsi transitoria, rilassamento dello sfintere anale ed espulsione del meconio (Vaala, 1994). Se il feto si sforza di respirare in utero, cosa che avviene comunemente nell'asfissia, questo materiale viscoso si può depositare nelle vie aeree provocandone una ostruzione meccanica. Nel caso vengano ostruite le grandi vie aeree si ha il soffocamento del neonato, mentre una ostruzione delle piccole vie esita in una deviazione intrapolmonare di sangue attraverso le zone del polmone prive di aria e in polmonite di tipo chimico (Cabal et al., 1980).

- Ipertensione polmonare persistente (PPH - Persistent Pulmonary Hypertension) o circolazione fetale persistente (PFC - Persistent Fetal Circulation): è una sindrome perinatale causata da alterazioni vascolari polmonari che possono interessare sia i neonati umani che i puledri. L'ipertensione polmonare è caratterizzata da un significativo aumento della pressione arteriosa polmonare e da cianosi causata dallo shunt destro-sinistro del sangue attraverso il dotto arterioso e il forame ovale. La vascolarizzazione polmonare è molto sensibile all'ipossia e all'acidemia e il risultato è un aumento delle resistenze polmonari, ipertensione polmonare, aumento della pressione atriale. Queste risposte sono mediate da un temporaneo spasmo causato da una vasoattività o da cambiamenti anatomici permanenti nelle arteriole polmonari. L'ipertrofia muscolare delle arteriole polmonari è considerata il segno distintivo di PPH ed è stato principalmente correlata all'asfissia cronica. La PPH si traduce in aumento dello stato di ipossia, della acidosi metabolica e in un ulteriore peggioramento della vasocostrizione polmonare (Drummond, 1987).

### 1.3.5 Disfunzioni dell'apparato cardiocircolatorio

---

Durante la vita fetale l'arteria polmonare e l'aorta discendente sono connesse da un grosso vaso, il dotto arterioso o di Botallo, e le resistenze vascolari polmonari sono più elevate rispetto a quelle del circolo sistemico. La funzione del dotto arterioso è quella di fare da bypass per il circolo polmonare, permettendo al sangue di passare dal ventricolo destro direttamente alla placenta per gli scambi di  $O_2$  e  $CO_2$ . Il sangue ritorna per i due terzi alla placenta tramite la vena ombelicale, raggiunge la vena cava e poi arriva all'atrio destro, dove si immette direttamente nell'atrio sinistro attraverso il forame ovale. In questo modo il sangue più ricco di ossigeno è disponibile per il cuore e per il cervello, mentre la parte restante passa nell'aorta discendente (Lombard, 1990). Con la nascita il polmone si espande, la  $PO_2$  aumenta, le resistenze vascolari polmonari diminuiscono rapidamente e il flusso di sangue nel polmone aumenta di circa dieci volte. Allo stesso tempo, con la cessazione della circolazione placentare, aumentano le resistenze nel circolo sistemico. Il sangue che ritorna all'atrio destro scorre attraverso la circolazione polmonare e da qui ritorna all'atrio sinistro provocando un aumento di pressione al suo interno, mentre quella dell'atrio destro diminuisce per la mancanza del sangue di ritorno dalla vena ombelicale. Quando la pressione nell'atrio sinistro è maggiore rispetto a quella dell'atrio destro il forame ovale si chiude. Il sangue di ritorno dai polmoni raggiunge il ventricolo sinistro e viene pompato nell'arco aortico dove incontra il dotto arterioso ancora aperto. In questo periodo di tempo la circolazione viene chiamata di "transizione", perché il sangue passa da sinistra a destra attraverso il dotto per ritornare ai polmoni. Quindi il

forame ovale è chiuso, ma il dotto arterioso continua ad essere parzialmente aperto. Nel puledro il dotto arterioso si chiude nei primi quattro giorni di vita (Lombard, 1990).

Se il puledro è compromesso da disfunzioni respiratorie, prematurità o setticemia, è molto probabile che il dotto arterioso rimanga pervio. L'ipossiemia, la setticemia e l'endotossiemia possono causare ipertensione polmonare con reflusso di sangue attraverso il dotto di Botallo. Il ritorno alla circolazione fetale provoca ipossiemia, che a sua volta accentua la vasocostrizione e l'ipertensione polmonare. Ciò crea un circolo vizioso tra ipossiemia, ipertensione polmonare e ipotensione sistemica, aumentando ulteriormente lo shunt (Bernard e Reimer, 1994). Sul miocardio, invece, gli effetti negativi dell'asfissia riguardano una ridotta contrattilità, insufficienza della valvola tricuspide, disfunzioni transitorie del ventricolo sinistro e collasso cardiaco (Cabal et al., 1980; Donnelly et al., 1980; Walther et al., 1985). L'ischemia e gli infarti a livello subendocardico, miocardico e dei muscoli papillari sono alla base di questa disfunzione del miocardio. L'insufficienza cardiaca che ne consegue conduce ad un'ipotensione sistemica, alla diminuzione del flusso sanguigno renale e alla diminuzione della perfusione polmonare (Donnelly et al., 1980; Drummond e Koterba, 1990). La risposta dell'endotelio vascolare all'ipossia è data dalla produzione di ossido nitrico che causa vasodilatazione e "capillary leak syndrome" (perdita di continuità dei vasi capillari). La vasodilatazione porta a ipotensione, diminuzione della perfusione tissutale e oliguria (Corley, 2003).

### 1.3.6 Disfunzioni Epatiche ed Endocrine

---

L'asfissia è stata associata a danni epatocellulari e a stasi biliare, sebbene durante la redistribuzione della portata cardiaca, indotta dall'ipossia, il flusso ematico epatico venga preservato grazie a meccanismi locali di protezione.

I neonati affetti da questa disfunzione solitamente appaiono itterici. La concentrazione sierica degli enzimi epatici risulta moderatamente elevata, probabilmente per una alterazione della permeabilità della membrana cellulare degli epatociti o per necrosi degli epatociti stessi (Saili et al., 1990). Elevate concentrazioni sieriche della GGT sono associate a stasi biliare. Le endocrinopatie associate alla PAS non sono ancora state chiaramente definite; in caso di ipocortisolemia si può riscontrare emorragia e necrosi delle ghiandole surrenali (Vaala, 1994). La secrezione del paratormone può non essere normale, contribuendo all'ipocalcemia (Tsang et al., 1974). Con la morte cellulare indotta dall'asfissia vengono rilasciati fosfati inorganici capaci di formare complessi insolubili con il calcio, provocando una ulteriore diminuzione della concentrazione sierica di calcio. Dato che l'ipocalcemia è stata riconosciuta come causa di convulsioni, apnea neonatale e disfunzioni del miocardio, questo elettrolita nei puledri affetti da PAS deve essere accuratamente monitorato (Vaala, 1994).

### 1.3.7 Squilibri metabolici

---

L'acidosi interferisce con le funzioni cellulari e può provocare un danno cellulare irreversibile. È il sintomo clinico più indicativo di asfissia neonatale. La perfusione ridotta dei tessuti porta alla



produzione eccessiva di lattato e quando non viene fisiologicamente compensata si arriva all'acidosi metabolica sistemica. Questa porta ad una riduzione della contrattilità del miocardio e ad una riduzione della risposta delle catecolamine causando ipotensione. Si riduce anche la perfusione glomerulare con conseguente oliguria e riduzione del flusso sanguigno capillare.

Queste alterazioni circolatorie provocano ipotermia. In alcuni casi, il flusso di sangue e le alterazioni endoteliali nei piccoli vasi sanguigni causano adesione piastrinica e attivazione della cascata della coagulazione. Questi cambiamenti possono condurre a deplezione dei fattori della coagulazione predisponendo i neonati a coagulopatie, emorragie e ulteriore perdita di volume di sangue (Seri e Evans, 2001; Alonso-Spilsbury et al., 2005). Mota e collaboratori (2003) hanno anche dimostrato che i suinetti nati con ipossiemia e aspirazione di meconio hanno un ridotto riempimento capillare e una maggiore suscettibilità a sviluppare emorragie multisistemiche. Proprio come gli adulti, i neonati hanno diversi meccanismi innati per compensare gli effetti negativi dell'asfissia e dell'acidosi. Diversi studi hanno dimostrato come i neonati con acidosi metabolica sviluppino tachicardia e tachipnea. Queste alterazioni compensatorie della frequenza cardiaca e dei movimenti respiratori sono particolarmente importanti nella regolazione dell'equilibrio acido-base nel neonato (De Backer, 2003).

### 1.3.8 Altri segni

---

La crescita rallentata riflette la redistribuzione del flusso ematico. La testa e le ossa vengono risparmiate, mentre fegato, timo, tessuto

adiposo e intestino subiscono una diminuzione della perfusione. Il risultato è un feto più piccolo del normale, con una testa relativamente grande e un corpo piccolo e sottopeso. Questo fenomeno viene definito come Ritardo di Crescita Intrauterina (IUGR - IntraUterine Growth Restriction) asimmetrico. Nonostante la crescita sia più lenta, la maturazione di alcuni organi vitali, come ad esempio il polmone, è aumentata. Questo effetto è probabilmente mediato dalla stimolazione delle ghiandole surrenali del feto (Vaala, 1994).

L'Oligoidroamnios è caratterizzato da una diminuita produzione di liquido amniotico. I maggiori costituenti del liquido amniotico verso la fine della gravidanza sono rappresentati da urina, saliva e secrezioni naso-faringee del feto. Il liquido amniotico protegge il feto stesso dagli shock, impedisce l'adesione tra la cute del feto e la membrana amniotica e favorisce la dilatazione del collo dell'utero e la lubrificazione del canale pelvico al momento del parto (Richter e Götze, 1986). È stato ipotizzato che l'ipossia, inducendo una redistribuzione della portata cardiaca, provochi una diminuzione del flusso di sangue al polmone e al rene, con una diminuzione della produzione di urina e di secrezioni naso-faringee e di conseguenza del volume del liquido amniotico. L'oligoidroamnios è quindi associato ad asfissia intrapartum e a deficit neurologici postpartum. Predispone ad ostruzioni meccaniche del cordone ombelicale durante i movimenti fetali e le contrazioni uterine, con calo della frequenza cardiaca fetale e ulteriori episodi di ipossia (Vaala, 1994).

## 1.4 Diagnosi precoce e prevenzione della PAS nel peripartum

---

Le patologie del feto e della placenta sono spesso difficili da individuare nel periodo perinatale. Una gravidanza può essere considerata “a rischio” o sulla base dei dati anamnestici relativi alle gravidanze precedenti o nel caso in cui la fattrice presenti patologie nella gravidanza in corso (Santschi e Vaala, 2011). Una accurata valutazione clinica di una fattrice con gravidanza potenzialmente ad alto rischio inizia sempre con la raccolta dettagliata di alcuni dati anamnestici, quali le informazioni sul passato riproduttivo dell'animale, eventuali casi di parto prematuro, distacco prematuro della placenta, gravidanza gemellare, emorragie, ernia addominale o rottura del tendine prepubeo a fine gestazione. Devono essere raccolti inoltre dati di interesse medico come la presenza di laminite cronica e di problemi a livello pelvico (Santschi e Vaala, 2011). Si devono poi raccogliere i dati relativi alla gravidanza in corso. Le informazioni devono riguardare lo stato dell'endometrio prima del parto precedente e dopo il concepimento, la data esatta di copertura, il tipo di seme utilizzato e le coperture vaccinali. Il tutto deve essere completato dall'esame clinico della fattrice, comprendente palpazione transrettale, esame ecografico ed esami ematobiochimici. Informazioni utili sono anche quelle legate al postpartum sia della madre che del neonato, comprese la qualità del colostro e l'esame macroscopico della placenta (Bucca, 2006). Il riconoscimento delle cavalle con gravidanza a rischio è il primo passo per ridurre la possibilità di riscontrare alla nascita un puledro affetto da Sindrome da Asfissia Perinatale. L'identificazione precoce di qualsiasi segno di patologia in

atto nella fattrice gravida può salvare la vita sia della fattrice che del puledro stesso.

Nella specie equina, per monitorare la salute dell'unità feto-placentare durante la gravidanza, si effettuano il monitoraggio ormonale e il monitoraggio ecografico dell'unità feto-placentare. Durante una grave ipossia in utero avviene una perdita sequenziale dei riflessi fetali: 1) la reattività cardiaca fetale (aumento della frequenza cardiaca in risposta all'attività fetale); 2) la respirazione fetale; 3) l'attività fetale (movimenti); 4) il tono fetale. Queste caratteristiche biofisiche, unite alla valutazione del volume dei liquidi fetali e dell'integrità placentare, possono e dovrebbero essere valutate nelle fattrici gravide nelle ultime settimane di gestazione tramite ecografia trans addominale e trans rettale (Vaala,1994).

I segni clinici che possono indicare la presenza di asfissia fetale già nel periodo intrauterino sono: bradicardia fetale persistente (<60 bpm), diminuzione/perdita dei movimenti fetali e della reattività cardiaca, oligoidroamnios, presenza di distacco placentare in aree ampie ed estese.

Una valutazione precoce dello stato di salute generale del puledro appena nato può essere condotta attraverso il sistema di APGAR (Appearance, Pulse, Grimace, Activity, Respiration), uno score ideato e utilizzato in medicina umana per individuare precocemente il neonato che necessita di cure. Nel bambino viene eseguito a 1 e a 5 minuti dalla nascita e ripetuto fino ad un massimo di 30 minuti, se il punteggio continua a rimanere basso.

Nel puledro i 5 parametri che vengono valutati sono:

1. colore delle mucose;
2. frequenza cardiaca;

3. frequenza respiratoria;
4. tono muscolare;
5. risposta allo stimolo nasale, che può essere accompagnato dallo stimolo del padiglione auricolare o da quello toracolombare, facendo scorrere il pollice e l'indice lungo la colonna vertebrale dalla nuca alla base della coda; il puledro normale, in risposta a questa manualità muove gli arti, alza la testa e cerca di alzarsi (Vaala e Sertich, 1994).

A ciascuno dei parametri presi in considerazione viene attribuito un punteggio numerico da 0 a 2 (Vaala, 2002). Un punteggio totale di 8-10 è normale, un punteggio di 6-8 è indicativo di una lieve asfissia e un punteggio inferiore a 6 indica una grave asfissia che necessita un intervento immediato (Vaala, 2002).

Nel bambino, la diagnosi di encefalopatia neonatale si basa sull'anamnesi, sull'esame neurologico e sui risultati della diagnostica collaterale, incluse l'elettroencefalografia e la diagnostica per immagini dell'encefalo (tomografia computerizzata e risonanza magnetica) (Volpe, 2001a).

Nel puledro, la diagnosi di encefalopatia neonatale si effettua prendendo in considerazione l'anamnesi, valutando la presenza di deficit neurologici ed escludendo altre possibili cause che possono compromettere il sistema nervoso centrale, come infezioni, anomalie congenite, alterazioni dello sviluppo e disfunzioni metaboliche. La valutazione di alcuni parametri diagnostici, come le analisi ematobiochimiche, l'emogasanalisi del sangue arterioso, l'analisi dell'urine e la valutazione dell'IgG sieriche, può essere utile per discriminare tra le possibili patologie e per valutare il coinvolgimento dei vari apparati. Nei puledri i sintomi che si riscontrano in corso di

PAS sono frequenti anche in presenza di altre patologie, come la sepsi e la prematurità. Inoltre, l'encefalopatia neonatale può presentarsi nei puledri come problema primario o come complicazione di altre condizioni cliniche. In neonatologia equina non è stato ancora individuato nessun indice clinicopatologico specifico per fare diagnosi di HIE (Bernard et al., 1995).

Come già detto in precedenza, per valutare le condizioni cliniche del puledro neonato può essere utile prendere in considerazione alcuni parametri ematobiochimici.

Tra questi, quelli più importanti per escludere la presenza di PAS sono: ematocrito, glicemia, lattato ematico, cretinina, ipocalcemia, emogas analisi arteriosa, GGT, creatinichinasi, elettroliti e biomarkers.

- Ematocrito: aumenta gradualmente durante la vita fetale fino a raggiungere i valori dell'adulto a 300 giorni di gestazione. Alla nascita l'ematocrito (PCV), compreso tra 40 e 52%, è elevato a causa del trasferimento del sangue placentare al feto (Jeffcott et al. 1982; Harvey, 1990), ma solitamente diminuisce già dopo 24 ore con l'ingestione delle proteine del colostro e l'espansione del volume di sangue (Palmer, 2004). Il fegato fetale è l'organo principale di ematopoiesi in utero, mentre il midollo osseo non contribuisce significativamente all'ematopoiesi fino al termine della gestazione. Vi è un aumento del numero dei globuli rossi (RBC), della concentrazione di emoglobina (Hb) e del valore di ematocrito (PCV) a livelli massimi alla nascita (Jeffcott et al., 1982). C'è anche una progressiva diminuzione delle dimensioni degli eritrociti durante la seconda metà della gestazione, rispecchiando i diversi siti di ematopoiesi (Jeffcott et al., 1982; Harvey et al., 1984). Subito dopo la nascita ,PCV e Hb aumentano transitoriamente a causa appunto della

trasfusione di sangue placentare (Axon e Palmer, 2008). I valori poi diminuiscono approssimativamente del 10% nelle successive 12 -24 ore di vita. Un valore elevato di ematocrito alla nascita (>50%) con eritrocitosi può essere associato a ipossia cronica in utero (Axon, 2011).

- Glicemia: i puledri appena nati hanno una concentrazione di glucosio relativamente bassa che aumenta dopo la prima poppata (Baumann et al., 2002). Nel feto equino l'attività corticosurrenalica è minima fino a poco prima del parto, e non si ha l'aumento di glicogeno e glucosio plasmatico dipendente dal cortisolo visto in altre specie. Questo potrebbe essere la causa di una ridotta capacità gluconeogenetica a livello epatico (Axon, 2011). Valori di glucosio ematico <35-40 mg/dl nel neonato prima dell'assunzione di colostro indicano insufficienza placentare e ipossia fetale, quindi sono sicuramente puledri a rischio di PAS (Vaala, 1999). Nelle ore successive, l'ipoglicemia è causata ovviamente dal digiuno, da un aumento delle richieste metaboliche (sepsi, SIRS) e da una ridotta gluconeogenesi (sepsi, SIRS, prematurità, stress intrauterino) (Axon, 2011).

- Lattato ematico: nei neonati umani l'aumento della lattatemia nel sangue cordonale al momento della nascita è considerato un indicatore di ipossia prenatale ed è paragonabile al pH come strumento prognostico (Borruto et al., 2006). Inoltre, una elevata concentrazione di lattato nel sangue prelevato dallo scalpo o dal cordone ombelicale durante il parto, o una acidosi lattica persistente sono stati considerati utili indicatori di stress fetale (Eguiluz et al., 1983; Suidan et al., 1984; Borruto et al., 2006). La concentrazione ematica di lattato è stata valutata anche in puledri neonati ricoverati in

terapia intensiva: l'iperlattatemia al momento del ricovero e una ridotta clearance nelle ore successive sono utili indicatori prognostici (Corley et al., 2005; Henderson et al., 2008; Wotman et al., 2009). In uno studio prospettico su 88 puledri ricoverati in condizioni critiche, Castagnetti et al. (2010) hanno rilevato che negli animali non sopravvissuti, l'iperlattatemia riscontrata al ricovero si protraeva durante tutto il periodo di ospedalizzazione, mentre nei sopravvissuti la clearance del lattato avveniva entro le prime 24 ore di ospedalizzazione. Gli stessi autori hanno suggerito che l'iperlattatemia non è uno strumento diagnostico, ma un utile indicatore della gravità della patologia e della necessità di un intervento precoce e aggressivo. In un recente studio di Pirrone e collaboratori (2013) è stata valutata la concentrazione di lattato nel liquido amniotico di cavalle che hanno partorito puledri sani e malati. Gli autori hanno notato che nel liquido amniotico dei puledri malati la concentrazione di lattato è significativamente più basso che nei sani. Probabilmente durante la gravidanza, il lattato è fornito al feto dalla produzione e dal trasferimento placentare (Burd et al., 1975; Sparks et al., 1982), quindi la minore concentrazione di lattato nei puledri malati rispetto a quelli sani potrebbe essere dovuta ad una insufficienza placentare, con una ridotta capacità di soddisfare le necessità metaboliche del feto. Il lattato durante la vita fetale non è solo un prodotto metabolico ma anche un substrato energetico per il feto stesso. Questa ipotesi è sostenuta dalla correlazione positiva che gli autori hanno trovato tra la concentrazione di lattato nel liquido amniotico e la glicemia materna, poichè i tessuti placentari producono lattato dal metabolismo del glucosio (Sparks et al., 1982; Carter et al., 1993; Pere, 1995). Inoltre i puledri malati hanno presentato una minore concentrazione di



glucosio nel sangue rispetto a quelli sani, e l'ipoglicemia precedente alla prima poppata è stata associata a insufficienza placentare e PAS (Vaala, 1999).

- Creatinina: nel neonato risulta fisiologicamente più elevata durante le prime 36 ore dal parto. Nei puledri neonati, l'ipercreatininemia alla nascita può essere causata da problemi dei tessuti fetoplacentari ed è considerata un indicatore di compromissione dello stato di salute del puledro (Adams, 1990). La placenta, infatti, durante la gravidanza svolge una funzione simile a quella del rene, aiutando il feto a rimuovere la creatinina dal circolo (Vaala, 1999). In uno studio retrospettivo effettuato su 78 puledri neonati affetti da encefalopatia neonatale, gli autori hanno riscontrato che il 32% dei soggetti mostrava un aumento della concentrazione della creatinina sierica (Bernard et al., 1995). Se l'aumento è causato da problemi placentari, la concentrazione della creatinina diminuisce rapidamente nei giorni successivi al parto; se invece la concentrazione di creatinina rimane elevata, o diminuisce lentamente, andrebbero presi in considerazione anche la presenza di concomitanti problemi renali o altre cause di azotemia (Vaala e Sertich, 1994; Vaala, 1999).

- Ipocalcemia: è reperto comune nella fase post asfissia anche in medicina umana. È dovuta a diversi fattori: 1) la rottura delle cellule dopo la loro morte per asfissia provoca il rilascio di fosfato inorganico PO<sub>4</sub> nel plasma e nello spazio interstiziale e ioni calcio e ioni fosfato formano complessi insolubili nei tessuti danneggiati (calcificazioni distrofiche); 2) la disfunzione delle paratiroidi può provocare un'alterazione del normale meccanismo di omeostasi del calcio; 3) il concomitante rilascio di glucagone e la disfunzione renale possono portare ad una perdita di calcio con le urine (Koterba, 1990).

- Emogasanalisi arteriosa: in medicina umana il prelievo di sangue dal cordone ombelicale viene usato per la determinazione della concentrazione dei gas ematici e del pH. Questa misurazione è un utile strumento per fare diagnosi di asfissia fetale, in quanto tramite questi esami si potrà riscontrare un aumento della  $PCO_2$ , una diminuzione della  $PO_2$ , una diminuzione del pH e quindi la presenza di acidosi metabolica e respiratoria (Goodwin et al., 1992). Anche nella specie equina l'emogasanalisi del sangue del cordone ombelicale si è dimostrata un ottimo strumento per determinare lo stato di salute del puledro appena nato (Vaala, 1994).

$PaO_2$ ,  $PaCO_2$  e pH nel puledro appena nato variano a pochi minuti dal parto, mentre rimangono sostanzialmente invariati da 12 ore a 7 giorni dopo la nascita (Stewart et al., 1984). In un puledro sano i valori che si hanno poco dopo la nascita riflettono uno stato di ipossiemia e di eucapnia fisiologica. Una ipossiemia ( $PaO_2 < 60$  mm Hg) associata a un basso o normale valore di  $PaCO_2$ , può essere dovuta a ipoventilazione, insufficiente espansione polmonare, ventilazione/perfusione mismatching e da shunt vascolare destro-sinistro (shunt intra ed extrapolmonare). Un'ipossiemia grave che non risponde a insufflazione di ossigeno endonasale suggerisce la presenza di uno shunt destro-sinistro e può essere rivelatrice di malattia cardiaca congenita.

L'ipercapnia è indicativa di ipoventilazione e se associata a ipossiemia può essere attribuibile a difficoltà respiratoria per debolezza dei muscoli respiratori, traumi della cassa toracica o alterazione neurologiche centrali dovute alla PAS (Koterba, 1990).

- GGT: l'attività della GGT aumenta transitoriamente tra il quinto e il quattordicesimo giorno di vita, per poi portarsi a valori simili a

quelli dell'adulto (Axon e Palmer, 2008). Questo aumento può essere spiegato dall'induzione enzimatica epatica dovuta alla maturazione epatocellulare che avviene dopo la nascita. L'aumento di questo enzima si è notato in concomitanza di sepsi, PAS, SIRS e di altre patologie epatiche, oltre che in caso di infezioni ascendenti del dotto biliare o ulcere gastriche (Divers e Perkins, 2003).

- Creatinichinasi (CK): i valori di questo enzima nel puledro sono molto simili a quelli dell'adulto. Un aumento può essere dovuto a traumi al parto, decubito prolungato, convulsioni e patologia del muscolo bianco. Puledri sani alla nascita spesso possono avere valori molto bassi di CK, mentre puledri nati in seguito a distocia possono avere sia valori elevati che valori molto bassi di questo enzima. È stato invece riscontrato che quelli nati con stress fetale causato da asfissia perinatale o placentite possono avere concentrazioni 10 volte superiori al limite di riferimento. Questo aumento è una conseguenza diretta di morte cellulare e liberazione dei suoi costituenti, detta "sick cell syndrome" (Bauer, 1990; Axon e Palmer, 2008). In uno studio condotto da Agrawal e collaboratori (2012) si è riscontrato che la concentrazione di CK in bambini nati con encefalopatia ipossico-ischemica varia a seconda della gravità della patologia: più la patologia è grave più si eleva la concentrazione indicando in particolare un severo danno cardiaco.

- Elettroliti: uno squilibrio elettrolitico in un puledro neonato riflette una insufficienza placentare e uno sviluppo del feto in un'ambiente uterino sfavorevole. Una grave patologia uterina può portare a iponatremia, ipocloremia, ipo o ipercaliemia, ipo o ipercaliemia e iperfosfatemia. Alla nascita il calcio totale o ionizzato è del 25-30% più elevato che nell'adulto. Ciò è probabilmente causato

da un trasporto attivo di questo ione attraverso la placenta. Nelle prime ore di vita si abbassa notevolmente portandosi a valori simili a quelli dell'adulto. Alla nascita il magnesio presenta nel puledro più che in ogni altra specie valori molto elevati e rimane costante nei primi giorni di vita. Una grave PAS o setticemia può danneggiare l'integrità cellulare e liberare i suoi costituenti portando ad un aumento della concentrazione di questi elettroliti e della CK nel sangue (De Backer, 2003; Koterba, 1990).

- Biomarkers: un recente studio di Ringger e collaboratori (2011) ha valutato l'utilità di due marker plasmatici, l'Ubiquitina C-terminale idrolisata 1(UCHLI) e la forma assonale fosforilata del neurofilamento H (Pnf-h), come biomarker diagnostici antemortem di danno da encefalopatia neonatale. L'autore riporta che l'UCHLI è molto più attendibile di Pnf-h per la diagnosi di encefalopatia e che la sua concentrazione è significativamente più alta che nei puledri sani. La sensibilità e la specificità sono rispettivamente del 70 e del 90%. La misurazione di questo parametro tuttavia non è ad oggi facilmente attuabile.

## 1.5 Trattamento della PAS

---

Il trattamento dei puledri e dei bambini affetti da asfissia perinatale è principalmente di supporto ed è rivolto al controllo delle disfunzioni che si possono riscontrare a carico dei diversi apparati coinvolti.

La terapia è finalizzata quindi al controllo delle manifestazioni della PAS e comprende:

- ✓ Terapie di supporto
- ✓ Prevenzione e controllo delle convulsioni;

- ✓ Nutrizione del puledro;
- ✓ Mantenimento della perfusione tissutale e della funzionalità renale e correzione delle alterazioni metaboliche
- ✓ Prevenzione/controllo/trattamento precoce di eventuali infezioni secondarie;
- ✓ Trattamento delle disfunzioni gastrointestinali;
- ✓ Mantenimento dei valori normali dei gas ematici arteriosi;
- ✓ Terapie specifiche della PAS (Vaala, 1994; Wilkins, 2003).

### 1.5.1 Terapie di supporto

---

Il puledro che presenta ipereccitabilità e convulsioni dovrebbe essere tenuto in un luogo tranquillo e buio per minimizzare il più possibile l'effetto degli stimoli esterni. È necessario mantenere i puledri comatosi in un luogo caldo e asciutto, in decubito sternale su di un giaciglio morbido o su un materasso, cercando di evitare paglia e sabbia e cambiando il decubito frequentemente per evitare piaghe da decubito. Gli occhi devono essere coperti e il puledro durante gli episodi convulsivi deve essere trattenuto in modo delicato per evitare autotraumatismi (Green e Mayhew, 1990).

Nel puledro in terapia intensiva, è fondamentale il monitoraggio dei parametri vitali per valutare il decorso clinico e la risposta alle terapie:

- Temperatura: i valori normali sono di 37.8°-38.9° C; l'ipotermia può essere trattata riscaldando l'animale con lampade ad infrarossi, bottiglie piene di acqua calda, coperte e somministrando fluidi tiepidi EV.
- Frequenza cardiaca e respiratoria: la normale frequenza cardiaca varia da 70 a 120 bpm e può aumentare quando il puledro è eccitato o

addolorato; la frequenza respiratoria normale è di 30-40 atti al minuto e si dovranno valutare le caratteristiche del respiro.

- Funzionalità gastrointestinale: osservare la consistenza e il volume delle feci, la frequenza di emissione, la presenza di borborigmi e l'eventuale reflusso gastrico.

- Funzionalità urinaria: valutare il volume di urina, il suo colore, il peso specifico e la frequenza della minzione.

- Cute e apparato muscolo-scheletrico: nel puledro in decubito compaiono frequentemente abrasioni, piaghe, ulcere da decubito e per questo la cute va costantemente pulita ed asciugata; le articolazioni di tutti gli arti devono essere palpate per evidenziare un'eventuale ipertermia, tumefazione ed edema.

È importante inoltre cercare di fare avvicinare il più presto possibile il puledro alla fattrice (Koterba 1990; Vaala, 1999; Galvin e Collins, 2004).

## 1.5.2 Terapia anticonvulsiva

---

Le convulsioni provocano un incremento della richiesta di ossigeno sia a livello encefalico che muscolare, incrementando l'insulto ipossico. Lo scopo del controllo delle convulsioni è di prevenire un ulteriore danno del sistema nervoso centrale e di ridurre il rischio di traumi.

Il diazepam (da 0,11 a 0,44 mg/Kg di peso corporeo) può essere somministrato EV con il fine di controllare i primi episodi convulsivi, ma il suo effetto è di breve durata. Il fenobarbitale è invece efficace anche nel controllo di gravi episodi convulsivi. Viene somministrato

EV (da 2 a 10 mg/Kg di peso corporeo BID), lentamente, per evitare l'insorgere di depressione respiratoria (Furr, 1996; Vaala, 2009).

Se le convulsioni sono refrattarie ai due farmaci di elezione si utilizza Midazolam in infusione continua (0,01-0,02 mg/Kg/h). Invece in caso di status epilepticus è necessario ricorrere ad una anestesia con Propofol EV (MacKay, 2005).

Il mannitolo (antidiuretico osmotico) viene usato per trattare l'edema cerebrale e per neutralizzare i radicali liberi, tramite somministrazione EV (5-7 ml/kg/h) (Vaala, 1999), Green e Mayhew (1990) e Furr (1997) sconsigliano l'uso di questo farmaco nei puledri in quanto può esacerbare emorragie intracraniche e aumentare la perdita di elettroliti.

### 1.5.3 Supporto nutrizionale

---

Per la nutrizione del puledro in terapia intensiva si può ricorrere all'uso della nutrizione enterale o di quella parenterale. Un puledro neonato deve ricevere una quantità di latte al giorno pari al 20% del suo peso corporeo. Se vi è la presenza di una normale funzionalità del tratto gastrointestinale, quella enterale è sicuramente più fisiologica poiché stimola la maturazione delle cellule del tratto gastrointestinale e l'attività enzimatica, agendo come un fattore trofico. In mancanza del riflesso di suzione, il latte deve essere somministrato attraverso un sondino rino-gastrico.

Nei puledri affetti da PAS, la nutrizione enterale dovrebbe essere sospesa fino a quando il pH, la PO<sub>2</sub> e la glicemia non siano rientrati nella norma, la perfusione dei tessuti sia adeguata, la temperatura corporea superi i 38°C, i borborigmi intestinali siano apprezzabili e il meconio sia stato espulso. Infatti in questi puledri la nutrizione

enterale avrebbe l'unico effetto di aggravare la distensione gastrica e di contribuire allo sviluppo della NEC (Vaala, 2002). In questo caso, ma anche se sono presenti disfunzioni gastrointestinali (colica, ileo, diarrea e reflusso gastrico), la nutrizione enterale deve essere assolutamente evitata. La nutrizione parenterale deve essere usata come unica fonte di nutrimento. Essa consiste nella somministrazione in infusione continua di soluzioni ipertoniche contenenti destrosio, aminoacidi, lipidi, vitamine, elettroliti e minerali tramite un catetere venoso giugulare (Buechner-Maxwell, 2005).

Le complicazioni più comuni sono l'iperglicemia e la glicosuria, il rischio di infezioni per la contaminazione del catetere venoso, l'iperlipemia, l'azotemia e l'alterazione del bilancio elettrolitico. Per questo motivo il paziente sottoposto alla nutrizione parenterale deve essere costantemente monitorato (Vaala, 2002).

#### 1.5.4 Fluidoterapia

---

Lo scopo della terapia in questo caso sarà quello di evitare una prolungata ipoperfusione tissutale e limitare i danni dell'ipossia e della ri-perfusione. L'ipotensione può presentarsi improvvisamente senza evidenti segni clinici ed è per questo importante monitorare costantemente la pressione sanguigna nei puledri a rischio. La pressione arteriosa media è direttamente dipendente dalla portata cardiaca e dalle resistenze vascolari. Lo scopo iniziale della terapia deve essere quello di mantenere la portata cardiaca fin quando non vengono notati miglioramenti. La portata cardiaca dipende dalla frequenza cardiaca e dalla gittata. Raramente la frequenza cardiaca del puledro è al di sotto dei 40 bpm, ma se ciò dovesse avvenire sarà



necessario prepararsi rapidamente per la rianimazione dell'animale. L'intento iniziale sarà quindi quello di garantire un adeguato volume di sangue circolante mediante la somministrazione di una terapia fluida. Si possono somministrare a questo scopo 20 ml/Kg di soluzioni cristalloidi in bolo o 3 ml/Kg di Hetastarch (colloide sintetico) alla velocità di 10 ml/Kg/h. Se la pressione sanguigna aumenta in seguito a fluidoterapia, viene confermata la presenza di ipovolemia. Allo stesso tempo dovrebbe aumentare l'emissione di urina. Se il puledro risponde bene alla fluidoterapia, si può continuare la somministrazione di fluidi ma in dosi di mantenimento, 5 ml/Kg/h per i cristalloidi e 0,5 ml/Kg/h per i colloidali.

Per mantenere un'adeguata pressione sanguigna, inoltre, si possono utilizzare farmaci inotropi positivi e/o vasopressori come Dobutamina (2-15  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ), Noradrenalia (0,5-1,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) e Vasopressina (0,25-1 mU/kg/min) (Corley, 2004).

### 1.5.5 Terapia antibiotica

---

Nelle prime ore di vita i puledri ricoverati corrono il rischio di contrarre infezioni. Il neonato ha infatti un sistema immunitario immaturo ed anche infezioni localizzate tendono a diventare sistemiche, esitando in setticemia. Gli antibiotici vengono somministrati quindi sia a scopo profilattico che per curare infezioni già esistenti. Puledri comatosi sono ad altissimo rischio d'infezione. Emocultura negativa e leucogramma normale possono non essere indicativi di assenza di setticemia.

Nei puledri con la PAS, una concomitante setticemia o una setticemia sviluppata secondariamente sono indicatori di prognosi infausta (Wilkins, 2011).

### 1.5.6 Terapia delle disfunzioni gastrointestinali

Il puledro in stato di asfissia può inizialmente presentare un aumentato tempo di svuotamento gastrico e una diminuzione della motilità intestinale. Può quindi essere utile inserire un sondino rino-gastrico ed effettuare successivamente una decompressione per escludere la presenza di liquido/gas all'interno dello stomaco. Per aumentare la motilità gastrica e del piccolo intestino, si può somministrare metoclopramide in infusione (0,25-0,5 mg/Kg QID) o anche eritromicina (2 mg/Kg QID) (Vaala, 2002).

Una valutazione ecografica dell'addome può fornire informazioni su eventuali presenze di intussuscezioni o altre lesioni ostruttive. L'ischemia intestinale dovuta all'ipossia predispone alla presenza di ulcere ed è perciò utile somministrare gastroprotettori, inibitori della pompa protonica e antagonisti dell'H-2 a scopo preventivo (Vaala, 1999).

### 1.5.7. Supporto respiratorio

Molti puledri affetti da PAS traggono beneficio dalla somministrazione intranasale di ossigeno umidificato. I gas ematici sono dei validi indicatori della  $PO_2$ , soprattutto nel periodo in cui il puledro è in decubito. Mantenere il puledro in posizione sternale si è dimostrato un buon metodo per aumentare la  $PO_2$  (Furr, 1996).

Periodi di apnea, la cui causa può essere sia una somministrazione di fenobarbitale che una conseguenza del danno ipossico a livello di centri respiratori, possono essere trattati con caffeina (10 mg/kg PO o per rectum come loading dose e 2,5-3 mg/kg PO SID come mantenimento) o doxapram. Un sovradosaggio può portare a ipereccitabilità del sistema nervoso centrale e del miocardio e aumento della stimolazione gastrointestinale (Vaala, 1999).

### 1.5.8 Terapie specifiche per la PAS

Le terapie specifiche per la PAS prevedono l'utilizzo di sostanze antiossidanti e antiradicaliche, quali DMSO, Vitamina E e Selenio, Vitamina C, Tiamina e Magnesio Solfato.

- ✓ DMSO (1g/Kg EV o 0,5kg/kg in soluzione al 10%): è un agente organico di derivazione farmaceutica appartenente alla categoria dei sulfossidi, che presenta una varietà di azioni biologiche differenti (Jacob e De la Torre, 2009). Neutralizza i radicali liberi con un effetto diretto su di essi, rompendo i legami idrogeno e agendo sui radicali ossidrilici (Santos et al., 2003; Kashino et al., 2010). Riduce l'edema cerebrale e la pressione intracranica. Studi condotti sui conigli con edema cerebrale hanno dimostrato che diminuisce la pressione del 45%. Svolge anche azione antinfiammatoria sistemica e impedisce l'aggregazione piastrinica. Ha anche una lieve capacità antibiotica e antimicotica ed un effetto diuretico. È quindi somministrato in caso di trauma cranico, infiammazione, edema e ischemia. Non viene utilizzato in concentrazioni superiori al 20%, in quanto potrebbe causare emolisi. Gli effetti secondari possono comprendere ipotensione, coliche, fascicolazioni e sudorazione diffusa. (Palmer e

Rossdale, 1975; Brayton, 1986; Furr, 1996; Vaala, 1999 e 2009; Hess-Dudan e Rossdale, 2003);

- ✓ Vitamina E-Selenio (4000 IU PO SID): Vitamina E è un termine generico che si riferisce solitamente a quattro tocoferoli e a quattro differenti tocotrienoli tutti liposolubili.  $\alpha$ -Tocoferolo è la forma predominante, in quanto agisce nelle attività biologiche ed è anche l'unica forma che si trova nel plasma umano (Mayne, 2003). È il più potente antiossidante liposolubile e agisce a livello di membrane cellulari e di lipoproteine inibendo la perossidazione lipidica (Vatassery, 1992), impedendo, soprattutto a livello di membrana neuronale, che vi sia una perdita di permeabilità ed integrità della stessa con conseguente edema cerebrale (Polidori et al., 2001).

Il selenio è un elemento che può essere tossico se somministrato in quantità eccessiva, ma alle concentrazioni fisiologiche è considerato essenziale per gli organismi viventi (Neve, 2000). Previene le disfunzioni mitocondriali con la sua capacità di “spazzare via” i radicali liberi, in quanto è cofattore della glutatione perossidasi (Xiong et al, 2004). Uno dei maggiori benefici del selenio, a livello neuronale, è quello di prevenire i danni al DNA bilanciando le attività della chinasi e della fosfatasi (prevenzione del danno ossidativo cellulare, prevenzione della perossidazione lipidica e protezione della membrana plasmatica) (Brauer e Savaskan, 2004).

Secondo la “teoria antiossidante”, quando la concentrazione plasmatica della Vitamina E è scarsa, la perossidazione lipidica aumenta e questo causa danni alla membrana cellulare. Selenio e Vitamina E giocano un'azione sinergica antiossidante contro i radicali liberi: la Vitamina E è una componente della membrana cellulare e previene la formazione di perossidi, mentre il selenio distrugge le

perossidasi (Kiymaz et al., 2007). A causa della sua natura liposolubile, la vitamina E deve essere somministrata per diversi giorni affinché raggiunga delle buone concentrazioni a livello cerebrale ed ematico. Si consiglia la somministrazione di questa vitamina associata al selenio alle fattrici che presentano gravidanze a rischio come prevenzione (Slovis, 2009).

- ✓ Vitamina C (50-100 mg/kg SID): l'acido L-ascorbico è un antiossidante idrofilico a basso peso molecolare utilizzato per la sintesi del collagene, l'ematopoiesi, l'assorbimento del ferro, il mantenimento dello stato redox delle cellule, la rigenerazione della Vitamina E e di altre biomolecole ossidate, la sintesi delle catecolamine e la neutralizzazione dei radicali liberi (Englard e Seifter, 1986; Chan, 1993). La Vitamina C si trova diffusa in tutto l'organismo, in particolare nella ghiandola surrenale e nel cervello. La concentrazione più alta viene raggiunta a livello di sistema nervoso centrale (Gruneald, 1993) ed il suo effetto neuroprotettivo è stato dimostrato in diversi studi eseguiti su modelli animali (Ranjan et al., 1993; Miura et al., 2006). Il cervello fetale presenta una concentrazione ancora più alta di Vitamina C rispetto a quello dell'adulto; l'acido ascorbico si accumula infatti in questo organo già nei primi mesi di gravidanza, grazie ad un trasporto attivo attraverso la placenta e la sua concentrazione è qui 10 volte superiore a quella plasmatica. Nel feto è infatti uno dei principali sistemi antiossidanti. Il passaggio attraverso la placenta diminuisce con l'aumentare dell'età gestazionale e, immediatamente dopo la nascita, l'acido ascorbico passa dal sistema nervoso centrale al circolo sanguigno diminuendo così il suo effetto neuroprotettivo (Berger et al., 1998; Slovis, 2009). Nella terapia della PAS si somministra affinché abbia un effetto

neuromodulatore impedendo al neurotrasmettitore di legarsi ai recettori NMDA (Vaala, 2009).

- ✓ Tiamina (10-20 mg/kg BID): è una vitamina liposolubile essenziale per il metabolismo cellulare. Una deficienza può comportare un rischio per la sopravvivenza (Wooley, 2008). Nell'organismo la tiamina esiste sotto diverse forme: tiamina, tiamina monofosfato e tiamina pirofosfato (TPP) (o difosfato) che è la forma più importante ed è un indispensabile coenzima per la decarbossilazione ossidativa dei mitocondri (Sica, 2007). La TPP è essenziale per produrre energia con il ciclo di Krebs a partire dal glucosio, quindi un suo deficit può portare alla produzione di acido lattico, peggiorando uno stato di acidosi già presente in un paziente critico. I livelli di tiamina totale nel sangue sono molto più bassi nell'uomo che nelle altre specie e la maggior concentrazione si ha nei muscoli e solo l'1% si trova nel sangue, principalmente negli eritrociti. La concentrazione di tiamina nel cervello è molto bassa e per questo il sistema nervoso umano è particolarmente sensibile a un suo deficit. Inoltre la tiamina ha un'emivita molto breve e non vi sono riserve endogene, quindi una supplementazione giornaliera è necessaria nei pazienti critici (Manzanares e Hardy, 2011).
- ✓ Magnesio solfato (50mg/kg/h per 1 ora e poi 25mg/kg/h): è un neuromodulatore antagonista dei recettori NMDA. Blocca l'entrata di calcio nella cellula diminuendo il rilascio di glutammato nello spazio sinaptico. Sono stati pubblicati studi con risultati discordanti sull'uso e sull'efficacia del magnesio nella PAS (Wilkins, 2011).

## 1.6 Prognosi

---

Con adeguata assistenza medica e specifiche terapie di supporto i puledri affetti da PAS hanno buone probabilità di sopravvivere. Con una diagnosi precoce e senza complicazioni secondarie si ha un tasso di sopravvivenza del 70-75%. La maggior parte dei puledri sopravvissuti si riprende completamente e può avere una normale carriera agonistica. I puledri che presentano complicazioni (ad esempio sepsi), non mostrano miglioramenti della sintomatologia neurologica nei primi cinque giorni di vita, rimangono comatosi con assente risposta a stimoli esterni e con convulsioni ricorrenti e gravi, hanno prognosi da riservata a infausta (Wong et al., 2011). I puledri prematuri o dismaturi che subiscono una prolungata ipossia in utero sono quelli più a rischio (Vaala, 1999). L'HIE è relativamente comune tra i disordini del sistema nervoso centrale nei neonati e le informazioni riguardanti i meccanismi patofisiologici nel puledro derivano da studi della medicina umana e da modelli su animali di laboratorio. (Wong et al., 2011).

<b>Table 1. Potential Therapeutics for Foals With Perinatal Asphyxia Syndrome</b>		
<b>Body System</b>	<b>Dose</b>	<b>Comment or Reference</b>
<b>Central nervous system: perform regular neurologic examinations</b>		
Control of seizures		
Diazepam	0.1–0.4 mg/kg IV, as needed	
Phenobarbital	2–10 mg/kg IV q12h for persistent seizures	Monitor serum concentrations
Pentobarbital	2–10 mg/kg IV	
Midazolam	0.04–0.1 mg/kg IV, as needed 0.02–0.06 mg/kg/h CRI for persistent seizures	50 mg added to 90 mL of 0.9% NaCl produces a 0.5-mg/mL solution
NMDA antagonists		
Magnesium sulfate	0.05 mg/kg/h IV CRI, loading dose 0.025 mg/kg/h IV CRI, maintenance dose	
Reduction of CNS edema		
Mannitol	0.25–1.0 g/kg IV as a 20% solution over 20 min, q12–24h	Contraindicated if cerebral hemorrhage is present
Dimethyl sulfoxide	0.5 g/kg IV as a 10% solution over 30–60 min, q12–24h	
Free radical scavengers/antioxidants		
Vitamin E	5000 IU PO q24h	
Vitamin C	100 mg/kg/d IV	
Thiamine	10 mg/kg IV	
Dimethyl sulfoxide	0.5 g/kg IV as a 10% solution	
Allopurinol	44 mg/kg PO within first 4 hr	
<b>Respiratory system: monitor arterial blood gas (<math>P_{aO_2}</math>, <math>P_{aCO_2}</math>, pH, <math>HCO_3^-</math>)</b>		
Hypoxemia		
Intranasal $O_2$	3–5 L/min humidified oxygen	Maintain patient in sternal recumbency
Hypercapnia		
Doxapram	0.02–0.05 mg/kg/h CRI	May be more effective than caffeine
Caffeine	10 mg/kg PO or per rectum, loading dose; 2.5 mg/kg PO or per rectum, as needed	
Persistent/severe hypoxemia and hypercapnia		
Mechanical ventilation	—	Palmer JE. Ventilatory support of the critically ill foal. <i>Vet Clin North Am Equine Pract</i> 2005;21(2):457–486.
Surfactant replacement	Consider if surfactant dysfunction or deficiency is suspect	
<b>Antiinflammatory medications</b>		
Pentoxifylline	10 mg/kg PO q12h	Specific pharmacologic information not available for foals
<b>Renal system: monitor urinalysis, urine output, body weight, and fractional excretion of electrolytes in urine; medications may not be very helpful; it is important to give IV fluids judiciously</b>		
Fenoldopam	0.04 µg/kg/min CRI	Dopamine-1 receptor agonist
Furosemide	0.5–1.0 mg/kg IV q8–12h 0.12 mg/kg IV, loading dose; 0.12 mg/kg/h CRI	Monitor serum electrolytes
Mannitol	0.5–1.0 g/kg IV as a 20% solution over 20 min	Osmotic diuretic

Figura 1.3: Terapie per il puledro affetto da PAS (Wong et al., 2011).



<b>Table 1. Potential Therapeutics for Foals With Perinatal Asphyxia Syndrome (cont.)</b>		
<b>Body System</b>	<b>Dose</b>	<b>Comment or Reference</b>
<b>Cardiovascular system:</b> monitor indirect or direct blood pressure, blood lactate level, and fluid therapy (body weight, central venous pressure)		
Dopamine	2–5 µg/kg/min CRI (as an inotrope) 5–10 µg/kg/min CRI (as a vasopressor)	Monitor heart rate and rhythm and blood pressure
Dobutamine	1–3 µg/kg/min CRI	Monitor heart rate and rhythm and blood pressure
Norepinephrine	0.1–1.5 µg/kg/min CRI	Monitor heart rate and rhythm and blood pressure Corley <sup>24</sup>
Fluid therapy	2–5 mL/kg/h IV, maintenance rate	Evaluate fluid therapy frequently Palmer <sup>25</sup>
<b>Gastrointestinal system:</b> place nasogastric tube to evaluate for gastric reflux; if gastric reflux is significant, delay feeding and provide parenteral nutrition		
Antibulcer medication/gastrointestinal protectants		
Sucralfate	20–40 mg/kg PO q6h	
Omeprazole	4 mg/kg PO q24h	Not labeled for foals younger than 4 weeks of age, but frequently used in neonates
Bismuth subsalicylate	0.5–4.0 mL/kg PO q6–24h	
Prokinetic medication		
Erythromycin	0.1–1.0 mg/kg/h CRI	
Lidocaine	1.3 mg/kg slow IV, loading dose; 0.05 mg/kg/min CRI	
Metoclopramide	0.1–0.3 mg/kg IV over 30 min q6h 0.04 mg/kg/h CRI 0.1–0.25 mg/kg PO q6h	Koenig J, Cote N. Equine gastrointestinal motility—ileus and pharmacological modification. <i>Can Vet J</i> 2006;47(6):551-559.
<b>Nutritional Support:</b> avoid enteral feedings if gastric reflux is significant		
Enteral feeding	Mare's milk; feed 10% to 25% of foal's body weight per day, divide into every-other-hour feedings	
Parenteral nutrition	10 g/kg/d of dextrose; 2 g/kg/d amino acids; 1 g/d of lipids	Starting formula provides 53 kcal/kg
Hypoglycemia		
Dextrose	4–8 mg/kg/min CRI	Avoid hyperglycemia Buechner-Maxwell VA. Nutritional support for neonatal foals. <i>Vet Clin North Am Equine Pract</i> 2005;21(2):487-510.
<b>Correction of metabolic derangements and prevention of secondary infection</b>		
Metabolic acidosis	Provide NaHCO <sub>3</sub> supplementation only after foal has been properly hydrated with balanced IV crystalloid solution	May cause hypernatremia or hypokalemia
Electrolyte derangements	Correct electrolyte derangements with oral or IV supplementation	
Prophylactic antimicrobials	Consider administering broad-spectrum antimicrobials (i.e., cefiofur, amikacin [monitor for concurrent or developing renal injury])	Haggett EF, Wilson WD. Overview of the use of antimicrobials for the treatment of bacterial infections in horses. <i>Equine Vet Educ</i> 2008;20(8):433-447. Corley KTT, Hollis AR. Antimicrobial therapy in neonatal foals. <i>Equine Vet Educ</i> 2009;21(8):436-448.
	Ensure adequate passive transfer of maternal antibodies	
	Administer plasma and colostrum	If there is failure of passive transfer

Tabella: Terapie per il puledro affetto da PAS (Wong et al., 2011).

## 2 Determinazione della concentrazione plasmatica di magnesio nel puledro affetto da PAS

---

Il Magnesio (Mg) è un catione intracellulare essenziale in molti importanti processi metabolici, come la sintesi delle proteine e degli acidi nucleici, il funzionamento delle pompe ioniche, la glicolisi e la fosforilazione ossidativa. È fondamentale inoltre nella regolazione dei canali calcio dipendenti e nel controllo del rilascio di neurotrasmettitori, quindi dell'eccitazione neuronale, della contrazione muscolo-scheletrica, del tono vasale e dell'eccitabilità cardiaca. Un'alterazione dell'omeostasi del magnesio determina perciò inevitabili ripercussioni sull'organismo (Romani, 2011). Nonostante sia un elemento dall'importanza biologica fondamentale, è ancora poco studiato in medicina veterinaria; in particolare, gli studi condotti sul magnesio nel cavallo adulto e nel puledro sono esigui molto scarsi.

### 2.1 Funzioni del Magnesio

---

Il Magnesio nei mammiferi è il quarto catione più abbondante dopo il calcio, il sodio e il potassio e il secondo catione intracellulare dopo il potassio. È contenuto per il 60% nelle ossa, che rappresentano la riserva principale e per il 38% nei tessuti molli, principalmente muscoli e sistema nervoso e in generale negli organi ad alta attività metabolica, come miocardio e fegato. Solo il 2% del Mg ha localizzazione extracellulare, in particolare nei globuli rossi, e nel plasma. Il Mg plasmatico è presente in tre frazioni: il 55% ionizzato, il

30% legato alle proteine, principalmente all'albumina, e il 15% complessato ad anioni come il citrato, il fosfato e il bicarbonato. Di queste 3 frazioni solo quella ionizzata (iMg) ha attività biologica (Wacker e Parisi, 1968; Rude e Oldham, 1990; Elin, 1994; Altura e Altura, 1994; Hebert, 1997; Stewart, 2011). Nel cavallo la forma ionizzata rappresenta una percentuale ancora più alta rispetto all'uomo, il 65-80% sul totale extracellulare (Stewart, 2011). Il Mg è inoltre presente in abbondanza nel liquido cerebro-spinale, tanto che qui la concentrazione è più elevata rispetto a quella sierica. In particolare, nei suinetti la barriera emato-encefalica permette il passaggio del Mg, capacità che viene poi persa nel periodo post-natale (Rivera et al., 1991). Il Mg è un cofattore essenziale in più di 300 reazioni enzimatiche che coinvolgono l'utilizzo di ATP, come la replicazione, la trascrizione e la trasduzione delle informazioni genetiche oltre che nelle reazioni metaboliche del metabolismo cellulare: glicolisi e fosforilazione ossidativa (Wacker e Parisi, 1968; Elin, 1988; Romani, 2011). Il magnesio è necessario per la stabilizzazione delle membrane, la conduzione nervosa, il trasporto ionico, la regolazione dei canali del calcio e per la normale funzione della pompa sodio potassio ATP dipendente, che permette di mantenere il gradiente ionico e di regolare il bilancio del potassio intracellulare (Rude e Oldham, 1990); di conseguenza, ha un ruolo fondamentale sull'eccitabilità di membrana. Un difetto nella regolazione delle pompe e dei canali ionici, come avviene nella PAS ad esempio, produce modificazioni del gradiente ionico e quindi del potenziale di membrana con successivo disturbo nella sua ripolarizzazione e conseguente alterazione nel funzionamento neuromuscolare e cardiovascolare (Elin, 1988; White e Hartzell, 1989;

McLean, 1994; Marino, 1995;). Un ulteriore ruolo del Mg si esplica nella regolazione del passaggio del calcio nei miociti, assicurandogli così un importante controllo sulla contrattilità cardiaca, sul tono vascolare periferico e sulla peristalsi viscerale (White e Hartzell, 1989).

La regolazione dell'assorbimento intestinale e dell'escrezione renale del magnesio è regolata da richieste metaboliche e da stimoli ormonali. Nell'uomo è assorbito uniformemente lungo tutto il tratto del piccolo intestino, mentre nel cavallo il 25% è assorbito nella prima metà dell'intestino tenue, il 35% nel tratto distale e solo il 5% nel grosso intestino. L'escrezione del Mg avviene per via gastroenterica, renale, mammaria, durante la lattazione, con il sudore. Questo ione passa anche attraverso la placenta, dove giungerà al feto per aiutarlo nello sviluppo. Nel puledro, in particolare, l'assorbimento è maggiore che nell'adulto. (Stewart, 2001).

Durante la crescita, la lattazione e l'esercizio fisico si ha una grossa richiesta di Mg. La ghiandola mammaria nella prima settimana di lattazione secerne una quantità elevata di Mg, che poi si dimezzerà nelle settimane successive. Perciò mentre nel cavallo la dose di mantenimento è di 13mg/kg die di Mg in una fattrice in lattazione il fabbisogno giornaliero va da 15 a 30 mg/kg die (Stewart, 2004). La regolazione dell'omeostasi del magnesio è supportata da meccanismi ormonali non specifici, a differenza di quello che avviene per il calcio. Il paratormone, la vitamina D, la calcitonina, l'arginina-vasopressina, l'aldosterone, l'insulina, il glucagone e la concentrazione di calcio regolano l'assorbimento e l'escrezione del Mg. Il paratormone agisce a livello di tubulo renale aumentandone il riassorbimento. L'insulina modula il passaggio di magnesio dallo spazio extracellulare a quello

intracellulare. L'ipercalcemia attiva i recettori calcio sensibili a livello di ansa di Henle, aumentando l'escrezione di calcio e magnesio. Il riassorbimento è inoltre compromesso da varie condizioni patologiche come l'iperglicemia, ipercalciuria, l'ipercalcemia, l'ipermagnesemia, l'ipofosfatemia, l'ipocaliemia, l'acidosi tubulare e l'acidosi metabolica (Kayne e Lee, 1993; Toribio et al., 2007; Toribio, 2010). La concentrazione di Mg è mantenuta fisiologicamente in uno stretto range di oscillazione da complessi meccanismi di riassorbimento e di rilascio, localizzati sulla membrana plasmatica così come pure nel citosol (Levine e Coburn, 1984; Quamme, 1993; Romani et al., 1993). Normalmente il passaggio tra lo spazio intra ed extracellulare avviene con un flusso lento e soltanto in condizioni patologiche molto gravi, come l'ipossia, si può manifestare un rapido scambio di Mg tra i due compartimenti (Quamme, 1993; Romani et al., 1993).

La concentrazione sierica totale di Mg dipende da diversi fattori, come la concentrazione delle proteine, la presenza di emolisi e lo stato acido-base del sangue. Una emolisi importante porta ad un aumento del Mg ematico, dato che la sua concentrazione all'interno dei globuli rossi è 3 volte superiore a quella sierica. Una diminuzione nella concentrazione plasmatica delle proteine totali farà sì che si abbia un aumento di magnesio ionizzato. Anche l'acidosi fa aumentare i valori di Mg totale, mentre l'alcalosi la fa diminuire; in uno studio effettuato da Galtstein e collaboratori (2011) su neonati umani sani, ai quali veniva somministrato bicarbonato di sodio tramite infusione endovenosa per ridurre l'acidosi metabolica, è stata evidenziata una contemporanea diminuzione del Mg totale; risultati ancora più rilevanti sono stati riscontrati in neonati malati, in particolare affetti da

ipomagnesemia, come prematuri, IUGR, neonati di madri diabetiche e affetti da asfissia (Glatstein et al., 2011; Stewart, 2011). E' quindi molto importante valutare attentamente la correzione dell'acidosi con bicarbonato di sodio nei malati critici che soffrono di ipomagnesemia. (Papageorgiu e Bardin, 1999; Whitsett et al., 1999). Inoltre in risposta ad una diminuzione di Mg si ha un aumento della produzione e del rilascio di PTH o una ridotta produzione di calcitonina (Mimouni, 1996). Probabilmente nei neonati, l'omeostasi del Mg non è efficace come negli adulti e la risposta al PTH è incompleta. In aggiunta, ci sono diverse condizioni neonatali, come il diabete mellito materno (Mimouni et al., 1990), la prematurità (Venkataraman et al., 1985) o l'asfissia neonatale, in cui il meccanismo di feedback del calcio ionizzato sulla calcitonina risulta alterato (Venkataraman et al., 1987).

## 2.2 Ipomagnesemia e Ipermagnesemia

---

L'ipomagnesemia e l'ipermagnesemia sono tra i più comuni e non diagnosticati squilibri elettrolitici riportati in medicina umana nell'adulto e nel bambino.

Il deficit di Mg è stato documentato rispettivamente nel 61% e nel 65% dei pazienti post operatori e in quelli ricoverati in condizioni critiche (Reinhart e Desbiens, 1985; Ryzen et al., 1985; Chernow et al., 1989). Inoltre, una ipomagnesemia subclinica, comune nelle unità di terapia intensiva, ha dimostrato essere associata ad una prognosi infausta (Tong e Rude, 2005). Il magnesio ha un ruolo protettivo nei confronti dei danni provocati a livello nervoso e cardiaco dagli stati

infiammatori sistemici e da quelli provocati dai radicali liberi-ROS/NOS e dalle endotossine. L'ipomagnesemia, se associata a una aumentata produzione di citochine e a un'inflammatione sistemica, predispone il paziente ad una maggiore sensibilità ai danni provocati dai radicali liberi, quali formazioni di lesioni miocardiche ed endoteliali (Stewart, 2004). Uno studio sperimentale ha rilevato come la somministrazione di endotossine nel cavallo abbia portato a una diminuzione nella concentrazione totale e ionizzata di magnesio. La somministrazione di magnesio solfato sembra avere un effetto protettivo contro i danni provocati da tale situazione patologica. (Toribio et al., 2005). Il ruolo del magnesio dovrebbe essere preso maggiormente in considerazione, poiché il 40% dei cavalli con sintomatologia colica presenta anche endotossiemia e che i radicali liberi, che vengono prodotti a livello intestinale a causa dell'ipossia-ischemia, provocano gravi danni alla parete stessa (Salem et al., 1995). In medicina veterinaria, in uno studio recente, è stata riscontrata la presenza di squilibri del magnesio con una percentuale dal 30 al 40% in cani e gatti ricoverati in terapia intensiva (Khanna et al., 1995; Toll et al., 2002). In uno studio retrospettivo di Johansson e collaboratori (2003) è stata rilevata una ipomagnesemia nel 50% dei cavalli ricoverati per patologie intestinali, respiratorie e sindromi multisistemiche. Gli autori non hanno riscontrato una correlazione positiva con la sopravvivenza, ma hanno evidenziato un aumento di mortalità degli animali che presentavo ipomagnesemia. Nel 54% dei pazienti operati per colica addominale, in cui è stato diagnosticato un ileo paralitico, è stata riscontrata anche una ipomagnesemia grave (Garcia-Lopez et al., 2001). La sepsi, ad esempio, produce ipocalcemia e ipomagnesemia a causa dell'aumento dei livelli di

adrenalina che determinano l'ingresso del Mg nel comparto intracellulare e liberazione di acidi grassi che chelano il magnesio sierico (Martin et al., 1993; Rude, 1993; Al-Ghamdi et al., 1994). L'ipocalcemia nella sepsi e nell'endotossiemia è conseguenza dell'ipomagnesemia, in quanto una bassa concentrazione di magnesio, antagonista del calcio, può far aumentare l'entrata di calcio nella cellula (Salem et al., 1995). Il Mg è considerato un antagonista fisiologico del calcio poiché riduce il suo rilascio da parte del reticolo endoplasmatico e perché ha un effetto protettivo sull'accumulo intracellulare che avviene durante una condizione di ipossia-ischemia (Stewart, 2004). Nei cavalli e nei puledri settici, è stata evidenziata una ipocalcemia e una ipomagnesemia, in particolare nei soggetti con patologie gastroenteriche (Toribio et al., 2001).

I tipici segni clinici dell'ipomagnesemia sono debolezza, fascicolazioni muscolari, aritmie ventricolari, convulsioni, atassia e coma. L'ipomagnesemia tetanica è stata sperimentalmente indotta in puledri ai quali è stata somministrata una dieta carente di Mg; questi puledri hanno manifestato nervosismo, tremori, atassia e collasso, sudorazione profusa, apnee e convulsioni (Harrington, 1974; Stewart, 2004). Un deficit di Mg inoltre è stato frequentemente associato in medicina veterinaria e umana ad aritmia e a tachicardia ventricolare, poiché la sua carenza interferisce col corretto funzionamento dei canali del sodio e del potassio voltaggio-dipendenti, determinando la fuoriuscita di potassio dalla cellula cardiaca interferendo così con la ripolarizzazione delle membrane e con la propagazione del potenziale d'azione. A causa di questi effetti si ha un aumento dell'eccitabilità



cardiaca, predisponendo il paziente ad aritmia cardiaca, a tachicardia e a fibrillazione atriale (Marr, 2004).

Il Mg svolge un ruolo fondamentale nella regolazione della neuro-eccitabilità a livello del sistema nervoso centrale. Nell'asfissia perinatale, l'ipossia cerebrale (diminuzione di ossigeno e glucosio) che si viene a creare esita in una diminuzione della produzione di energia, con conseguente incapacità della cellula di mantenere il gradiente ionico transmembrana. Con la perdita del potenziale di membrana si avrà un'entrata di calcio intracellulare che condurrà all'attivazione di reazioni a cascata che porteranno all'entrata di altro calcio. L'ipossia inoltre stimola il rilascio del neurotrasmettitore glutammato, già di per sé neurotossico, che si accumulerà nello spazio presinaptico e, poiché i meccanismi di ricaptazione cellulare sono inefficienti a causa della carenza energetica, vi sarà un ulteriore entrata di calcio. Un accumulo di questo ione porta a morte cellulare per l'attivazione di proteasi, lipasi ed endonucleasi (Seelig et al., 1983; Thordstein et al., 1993; Zhang et al., 1996; Leonard e Kirby, 2002)

Sempre a livello cerebrale, il magnesio è fondamentale anche per la regolazione dell'apertura e chiusura del canale NMDA calcio-dipendente. In uno stato di riposo, in cui non si ha lo stimolo da parte del glutammato, il Mg blocca il canale NMDA del calcio, prevenendo l'entrata di questo ione nella cellula e inibendo il rilascio di neurotrasmettitore. Oltre a questo canale il Mg blocca anche il canale del calcio voltaggio-dipendente localizzato sulla membrana presinaptica e anche a livello di muscolatura liscia dei vasi sanguigni cerebrali, regolando la vasodilatazione. Una diminuzione della

presenza di Mg cerebrale causata dall'ipomagnesemia o dall'attivazione di meccanismi di sequestro o chelazione, porterà a un aumento del tono vascolare, potenziando il vasospasmo e diminuendo ulteriormente l'apporto di ossigeno e nutrienti all'encefalo. In questo modo il Mg non potrà svolgere la sua azione neuro-protettiva contro i danni neuronali primari causati dall'ipossia ischemica e quelli secondari causati dalla riperfusione (Stewart, 2004). L'utilizzo dell'infusione di magnesio solfato in femmine gravide di ratto sottoposte a ipossia ha dimostrato di avere un effetto protettivo sul cervello fetale riducendo gli effetti negativi dell'ipossia (Hallak et al., 2000). In medicina umana la dimostrazione del possibile beneficio nella somministrazione di magnesio in gravidanze a rischio non è ancora stato chiarito (James, 2009). L'utilizzo della terapia con magnesio solfato nei puledri affetti da PAS e nei cavalli con trauma cranico potrebbe avere effetti positivi nella riduzione dei danni cerebrali e della sintomatologia neurologica (Wilkins, 2001).

L'ipermagnesemia è stata documentata molto meno frequentemente dell'ipomagnesemia; è infatti molto rara in tutte le specie studiate e solitamente è iatrogena, o causata da eccessiva supplementazione nella dieta, o da insufficienza renale acuta, in quanto si ha una diminuzione della filtrazione glomerulare e una minore escrezione di Mg (Stewart, 2004; Martin, 1994). I segni clinici di ipermagnesemia sono la depressione, la debolezza, l'ipotensione, la perdita dei riflessi tendinei profondi, i tremori muscolari e la paralisi flaccida. L'ipotensione è dovuta alla perdita del tono vascolare. Se l'ipermagnesemia è molto grave si può arrivare fino alla depressione respiratoria dovuto al blocco neuromuscolare per l'inibizione del

rilascio di acetilcolina calcio-dipendente nella giunzione presinaptica neuromuscolare. La sintomatologia cardiaca inizialmente si presenta con tachicardia e aumento della gittata cardiaca e peggiora con l'aggravarsi dell'ipermagnesemia fino alla fibrillazione ventricolare, all'asistolia e all'arresto cardiaco (Sachter, 1992; Nakayama, 1999; Hansen, 2000; Stewart, 2004).

Un aumento nella concentrazione sierica di magnesio, associato a ipercaliemia e iperfosfatemia, è stato riscontrato in patologie che causano un grave danno cellulare: rabdomiolisi, emolisi, grave sepsi e ipossia-ischemia. L'aumentata permeabilità cellulare che si viene a creare in queste condizioni patologiche fino alla completa perdita strutturale della cellula porta a una liberazione importante di Mg nel torrente circolatorio. Inoltre, il legame di questo ione alle proteine plasmatiche è influenzato dal pH sanguigno. Uno stato di acidosi determina il distacco del Mg dai propri siti di legame, determinando un incremento della quota ionizzata in circolo (Stewart et al., 2004). Nei neonati umani ricoverati in terapia intensiva, l'ipermagnesemia e l'ipocalcemia sono state riscontrate rispettivamente nel 43% e nel 17% dei pazienti e sono positivamente correlate ad una prognosi sfavorevole e alla lunghezza del periodo di ricovero (Broner et al., 1990).

In medicina veterinaria equina gli studi sulla concentrazione del Mg sono scarsi. In uno studio recente Berlin e Aroch (2009) hanno determinato la concentrazione di magnesio totale ad un solo tempo nei puledri sani (da 1 a 7 giorni di vita) e lo hanno confrontato con l'adulto, evidenziando una concentrazione molto più elevata nel neonato. Mentre Hurcombe e collaboratori (2009) hanno determinato

la concentrazione di magnesio al momento dell'ammissione in puledri settici, in malati critici non settici e in quelli sani (tra 24 e 72 ore). La concentrazione di Mg è risultata più bassa nei neonati sani rispetto agli adulti e non sono state riscontrate differenze significative tra sani e settici, anche se gli autori riferiscono di aver rilevato una ipomagnesemia ( $<0,4\text{mmol/L}$ ) in alcuni puledri settici non correlabile con la sopravvivenza.

## 2.3 Scopi del lavoro

---

Nel puledro gli studi che hanno misurato la concentrazione di magnesio nei primi giorni di vita sono molto scarsi e quelli presenti non hanno valutato l'andamento nel tempo nei primi giorni di vita o di ricovero sia nei sani che nei malati. In bibliografia sono assenti studi sulla determinazione del Magnesio totale (tMg) nei puledri affetti da PAS.

Gli scopi del nostro lavoro sono quindi stati:

- Comparazione tra due metodiche analitiche (analizzatore automatico e spettrofotometro ad assorbimento atomico) per la determinazione delle concentrazioni plasmatiche di Mg totale nel puledro neonato;
- Determinazione delle concentrazioni plasmatiche di Mg totale nei puledri sani nelle prime 72 ore di vita;
- Determinazione delle concentrazioni plasmatiche di Mg totale nei puledri malati nelle prime 72 ore di ricovero;
- Comparazione delle concentrazioni plasmatiche di Mg totale tra i puledri sani e quelli patologici, che includono i seguenti sottogruppi diagnostici: puledri affetti da PAS, quelli settici e quelli prematuri/dismaturi;
- Valutazione del valore prognostico della magnesemia nel puledro ricoverato in terapia intensiva.

## 2.4 Materiali e Metodi

---

### 2.4.1 Selezione degli animali

---

In questo studio sono stati inclusi tutti i puledri neonati di età inferiore ai 7 giorni di vita ricoverati durante le stagioni riproduttive 2010-2013 presso l'Unità di Perinatologia Equina “Stefano Belluzzi” (UPE) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna.

Tali soggetti sono stati divisi in due gruppi:

**Gruppo 1– Sani:** puledri nati presso l'UPE da fattrici ricoverate per il monitoraggio della gravidanza e l'assistenza al parto, con Apgar score  $\geq 9$ , esame clinico ed esami collaterali nei limiti della norma durante tutto il periodo di ricovero e concentrazione sierica di IgG  $\geq 800$  mg/dL a 18 ore di vita.

**Gruppo 2– Malati:** puledri nati da fattrici con gravidanza a rischio ricoverate per il monitoraggio e l'assistenza al parto o puledri ricoverati dopo la nascita presso l'UPE che richiedevano cure di II-III livello (Koterba et al., 1990). I puledri che sono stati inizialmente curati e poi sottoposti a eutanasia per motivi compassionevoli sono stati ugualmente inclusi nello studio.

I puledri sono stati in seguito distinti in base alla diagnosi secondo le seguenti definizioni:

Sepsi- emocoltura positiva eseguita momento del ricovero, isolamento di un patogeno da un sito di infezione o da un organo prelevato post-mortem.

Shock settico- presenza di setticemia, tachicardia o bradicardia nel paziente ipotermico, (temperatura rettale  $<37,2$ ) con segni che indicano uno stato di ipoperfusione (come ipotensione (MAP $<60$  mm Hg come diminuzione del polso periferico, alterato stato mentale, tempo di riempimento capillare diminuito aumentato ( $>2''$ ), estremità fredde diminuzione dell'output urinario) e che non risponde alla fluido terapia (Levy et al 2003).

Sindrome da Asfissia Perinatale (PAS) – presenza di dati anamnestici e segni clinici specifici, in particolare quelli neurologici riferibili a encefalopatia ipossico-ischemica (HIE) (Knottenbelt et al., 2004) dopo aver escluso altre malattie neurologiche, quali la meningite o traumi. Sono stati inclusi in questo gruppo puledri che all'anamnesi presentavano: distocia, red bag, alterazione dell'aspetto macroscopico della placenta e tipici segni clinici di PAS, tra cui riflesso di suzione assente o diminuito, disinteresse per la madre, ricerca anomala della mammella, disfagia, convulsioni, iper reattività e debolezza, associata ad un aumento delle creatinemia a meno di 24 ore di vita.

Prematurità/dismaturità – rispettivamente puledri nati prima di 320 giorni di gestazione e puledri nati a termine, dopo 320 giorni, ma con caratteristiche fisiche di immaturità. Le due classi di puledri sono state comunque associate essendo identici sia l'approccio al paziente che la terapia (Knottenbelt et al., 2004).

A tutti i puledri malati è stato eseguito un completo esame clinico all'ammissione, il profilo ematobiochimico, l'emocoltura e la determinazione della concentrazione ematica di IgG dopo le 18 ore di vita. I puledri sopravvissuti sono quelli che sono stati dimessi vivi dall'unità.

Tutte le procedure sugli animali sono state eseguite previa approvazione del Comitato Etico dell'Università di Bologna, ai sensi del DL 116/92, approvato dal Ministero della Salute. Un consenso informato orale è stato fornito dai proprietari.

## 2.4.2 Raccolta dei dati e determinazioni degli ormoni tiroidei

---

Nei puledri appartenenti al Gruppo 1, i campioni ematici per la determinazione della concentrazione totale plasmatica del magnesio sono stati prelevati dalla vena giugulare nell'immediato post-partum (T0) e successivamente ogni 12 ore fino a 72 ore di vita (T12, T24, T36, T48, T60, T72).

Nei puledri del Gruppo 2, i campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena giugulare al momento dell'ammissione (T0) e ogni 12 ore fino a 72 ore di ricovero (T12, T24, T36, T48, T60, T72).

Il campione di sangue è stato posto in provette S-Monovette Sarstedt contenenti sodio-citrato e centrifugato per 10 minuti a 3000 rpm (Beckman Coulter, TJ25) immediatamente dopo il prelievo; il surnatante è stato conservato in aliquote congelate a -20°C, per un massimo di 2 mesi.



## Spettrofotometria ad Assorbimento Atomico (AAS)

---

Per la determinazione del Mg totale plasmatico i campioni sono stati scongelati a temperatura ambiente e agitati manualmente; sono stati manipolati con i guanti per evitare le contaminazioni che avrebbero potuto alterare la determinazione. Da ogni campione sono stati prelevati 100 $\mu$ l di plasma tramite pipetta monouso, quindi posti in provette e in seguito portati al volume di 5 ml con acqua bidistillata "metal-free" (Merck). Dopo aver eseguito le diluizioni, si è proceduto alla lettura dei campioni tramite spettrofotometria ad assorbimento atomico (AAS) in fiamma (Spettrofotometro IL11, Instrumental Laboratories, USA). Il campione in soluzione viene aspirato in fiamma dove è convertito in vapore termico: la maggior parte dei metalli rimane allo stato fondamentale ed è perciò in grado di assorbire le radiazioni della propria lunghezza d'onda emesse da una lampada a catodo cavo contenente il relativo elemento analizzato, in questo caso il Mg. All'accensione della lampada, il gas in essa contenuto si ionizza e gli ioni accelerati verso il catodo lo bombardano, provocando l'emissione di un vapore atomico in cui gli atomi di quell'elemento si trovano in uno stato elettronico eccitato. Nel tornare allo stato elettronico fondamentale, gli atomi emettono radiazioni che attraversano la fiamma e vengono assorbite dal vapore atomico generato dal campione, in modo direttamente proporzionale alla concentrazione del metallo nel campione stesso. Questo metodo è molto sensibile e specifico in quanto solamente l'elemento testato può assorbire specificatamente tali radiazioni. Il valore della concentrazione del metallo analizzato nel campione viene ottenuto mediante interpolazione di una retta standard di calibrazione ottenuta

con concentrazioni note di magnesio. La sensibilità della metodica è di 3 ng/ml. Le concentrazioni del magnesio nel plasma sono riportate in µg/ml.

Tabella 2.1 : Parametri di lettura del Mg tramite AAS

<b>PARAMETRI</b>	<b>MAGNESIO</b>
<b>Lunghezza d'onda</b>	285,2 nm
<b>Corrente della lampada</b>	3mA
<b>Banda passante</b>	1 nm
<b>Linearità</b>	Fino a 0,14 µg/ml

## Analizzatore automatico Chemistry Analyzer AU400

La determinazione del Mg plasmatico totale al T0 è stata determinata anche con l'analizzatore automatico Chemistry Analyzer AU400 (Mishima Olympus Co Ltd., Shizouka, Japan) che utilizza kit commerciali (Olympus Systems Reagents, Olympus life and Material Science Europe GmbH, Hamburg, Germany). Questa metodica permette la determinazione quantitativa di Mg nel plasma tramite l'utilizzo di un test colorimetrico. Il reagente Olympus si basa su un metodo diretto in cui gli ioni Mg formano un complesso colorato con un cromogeno (blu di xilidolo) in ambiente basico. L'intensità del colore viene misurata spettrofotometricamente a 520/800 nm ed è proporzionale alla concentrazione di Mg nel campione. L'interferenza del Ca viene eliminata con acido glicoleterdiammino tetra acetico (GEDTA).

### 2.4.3 Analisi Statistica

---

Il grado di correlazione tra le concentrazioni di Mg plasmatico totale ottenuto con AAS e con l'analizzatore automatico Chemistry Analyzer AU400 è stato calcolato usando il metodo descritto da Bland and Altman (1968) con approccio grafico. Il grafico è uno scatterplot XY (a dispersione), dove l'asse Y indica le differenze tra i due valori (A-B) e l'asse X presenta la media di queste misure  $(A+B)/2$ . In questo metodo, l'errore (bias) è determinato dalla media delle differenze tra i due metodi e la precisione è data dalla deviazione standard (2DS) della media delle differenze.

Il test ANOVA a un via per misure ripetute con la correzione del Bonferroni, è stato utilizzato per valutare l'andamento nel tempo della concentrazione del tMg plasmatico nei puledri sani (gruppo 1) e nei puledri malati (gruppo 2).

Lo stesso test è stato usato per valutare l'andamento nel tempo della concentrazione del tMg plasmatico nei puledri malati (gruppo 2) all'interno dei sottogruppi diagnostici (sepsi, PAS, prematurità/dismaturità) e per comparare la concentrazione di tMg tra i sottogruppo diagnostici e i sani a T0.

Il t-test è stato usato per confrontare le concentrazioni di tMg a T0 tra i puledri sopravvissuti e quelli non sopravvissuti.

I risultati dell'analisi statistica descrittiva sono espressi come media  $\pm$ DS. Un valore di  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando un software commerciale (Analyse-it, version 2.03, Analyse-it Software, Ltd, Leeds, UK).

## 2.5 Risultati

---

Nello studio sono stati inclusi 117 puledri divisi in due gruppi: 20 puledri sani nel Gruppo 1; 97 puledri malati nel Gruppo 2.

In quest'ultimo gruppo, i puledri sono stati a loro volta distinti in 3 sottogruppi diagnostici: 20 puledri affetti da PAS, 13 puledri prematuri/dismaturi e 42 puledri settici.

Tutti i puledri sani sono stati dimessi, 77 puledri malati su 97 (79,4%) sono sopravvissuti e sono stati dimessi, mentre 20 puledri sono deceduti (8 puledri sono stati soppressi).

### Comparazione tra le due metodiche

---

Il confronto tra le concentrazioni plasmatiche del Mg ottenute con AAS e con l'analizzatore automatico Chemistry Analyzer AU400 è stato effettuato su 117 campioni di plasma ottenuto da 20 puledri del Gruppo 1 e 97 del Gruppo 2. Il range dei valori (minimo-massimo), è 0,56-1,53 mmol/L con l'analizzatore automatico e 0,44-1,29 mmol/L con AAS. Il coefficiente di correlazione di Pearson tra le coppie di valori mostra un buon grado di correlazione tra le due metodiche ( $r=0,63$  con  $p<0,01$ ). La regressione lineare ha mostrato un buon grado di accordo tra i due metodi: coefficiente di correlazione  $R^2=0,40$ ; pendenza 0,46 con l'intervallo di confidenza al 95% tra 0,35 e 0,57; intercetta è 0,31 con intervallo di confidenza al 95% tra 0,23 e 0,43.

Il grado di correlazione valutato col metodo grafico descritto da Bland-Altman ha confermato che c'è accordo tra le due metodiche, in quanto la variazione considerata per tutte le misurazioni è vicina allo zero (errore o bias -0,13; la DS della media delle differenze  $\pm 0,17$ ; intervallo di confidenza 95% va da 0,46 a 0,19) (Figura 2.1)

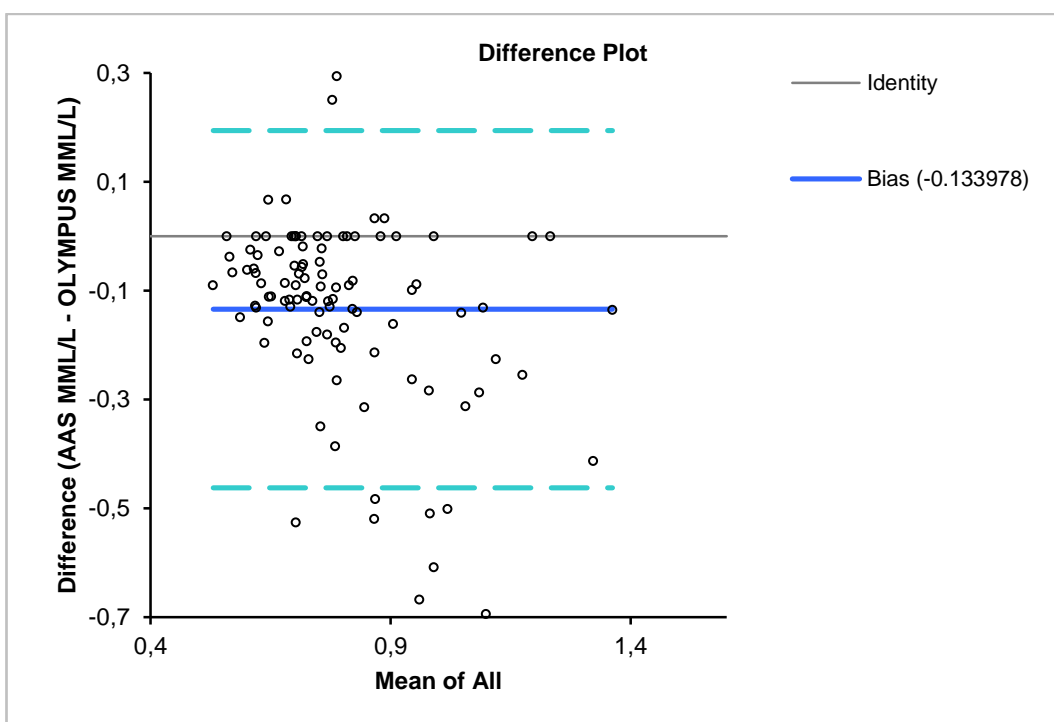


Figura 2.1: Il grado di correlazione ottenuto con il grafico di Bland-Altman mostra la media delle differenze (errore o bias)  $\pm 2SD$  tra l'analizzatore automatico e l'AAS.

## Determinazione delle concentrazioni plasmatiche di Mg totale

---

La concentrazione plasmatica totale nei puledri del Gruppo 1 non presenta nessuna variazione statisticamente significativa nelle prime 72 ore di vita come riportato in Tabella 2.2.

Tabella 2.2: Media  $\pm$ SD, mediana e range della concentrazione plasmatica di magnesio totale e il numero di campioni dei puledri sani (Gruppo 1) nelle prime 72 ore di vita (T0 a T72).

<b>Tempo</b>	<b>Numero di campioni</b>	<b>Media <math>\pm</math>SD mml/L</b>	<b>Mediana (mmol/L)</b>	<b>min-max (mmol/L)</b>
<b>T0</b>	17	0,64 $\pm$ (1,12)	0,60	1,01-0,52
<b>T12</b>	18	0,74 $\pm$ (0,10)	0,74	0,92-0,55
<b>T24</b>	19	0,71 $\pm$ (0,10)	0,69	0,96-0,54
<b>T36</b>	14	0,68 $\pm$ (0,11)	0,70	0,84-0,44
<b>T48</b>	16	0,71 $\pm$ (0,20)	0,69	1,33-0,49
<b>T60</b>	14	0,63 $\pm$ (0,09)	0,61	0,81-0,50
<b>T72</b>	13	0,63 $\pm$ (0,09)	0,64	0,76-0,46

Nel Gruppo 2 la concentrazione plasmatica di tMg (Tabella 2.3) presenta una differenza significativa ( $p < 0,01$ ) tra T0 e tutti gli altri tempi. All'ammissione la concentrazione è molto più elevata per poi calare già a T12 e mantenersi costante fino a T72.

La comparazione delle concentrazioni plasmatiche al momento dell'ammissione (T0) di tMg plasmatico totale tra puledri sani, affetti da PAS, settici e prematuri/dismaturi ha messo in evidenza una concentrazione di tMg plasmatico significativamente più elevata ( $p < 0,01$ ) nei puledri affetti da PAS rispetto a quelli degli altri sottogruppi.

Tabella 2.3: Media  $\pm$ SD, mediana e range della concentrazione plasmatica di magnesio totale e il numero di campioni dei puledri malati (Gruppo 2) nelle prime 72 ore di ricovero (T0 a T72). Con le lettere a-b-c sono state contraddistinte le 3 patologie

<b>Tempo numero di campioni per patologia</b>	<b>Prematurità/ Dismaturitàa Media <math>\pm</math>DS Mediana Min-Max</b>	<b>PASb Media <math>\pm</math>DS Mediana Min-Max</b>	<b>Sepsi/shock setticoc Media <math>\pm</math>DS Mediana Min-Max</b>
<b>T0</b> (n=13) a (n=31) b (n=49) c	0,76 $\pm$ 0,19 0,70 0,55-1,12	0,78 $\pm$ 0,19 0,72 0,44-1,3	0,71 $\pm$ 0,15 0,68 0,53-1,22
<b>T12</b> (n=10) a (n=26) b (n=34) c	0,62 $\pm$ 0,07 0,62 0,52-0,72	0,71 $\pm$ 0,11 0,7 0,51-0,97	0,65 $\pm$ 0,09 0,64 0,51-0,82
<b>T24</b> (n=10) a (n=28) b (n=36) c	0,71 $\pm$ 0,1 0,71 0,56-0,89	0,69 $\pm$ 0,1 0,69 0,49-0,96	0,65 $\pm$ 0,09 0,66 0,46-0,91
<b>T36</b> (n=9) a (n=27) b (n=33) c	0,70 $\pm$ 0,09 0,71 0,51-0,73	0,71 $\pm$ 0,11 0,69 0,42-0,99	0,64 $\pm$ 0,09 0,64 0,48-0,91
<b>T48</b> (n=10) a (n=24) b (n=30) c	0,63 $\pm$ 0,7 0,64 0,5-0,73	0,68 $\pm$ 0,11 0,7 0,43-0,85	0,65 $\pm$ 0,08 0,64 0,45-0,84
<b>T60</b> (n=10) a (n=24) b (n=30) c	0,62 $\pm$ 0,09 0,6 0,46-0,78	0,66 $\pm$ 0,12 0,66 0,37-0,82	0,66 $\pm$ 0,1 0,65 0,42-0,89
<b>T72</b> (n=11) a (n=22) b (n=25) c	0,61 $\pm$ 0,11 0,6 0,45-0,81	0,68 $\pm$ 0,12 0,69 0,47-0,88	0,64 $\pm$ 0,13 0,66 0,27-0,92

Il confronto tra le concentrazioni di tMg tra i puledri sopravvissuti e quelli non sopravvissuti a T0 ha evidenziato una differenza significativa ( $p < 0,01$ ). I puledri malati e non sopravvissuti, presentavano all'ammissione una concentrazione di tMg molto più elevata di quelli sopravvissuti.

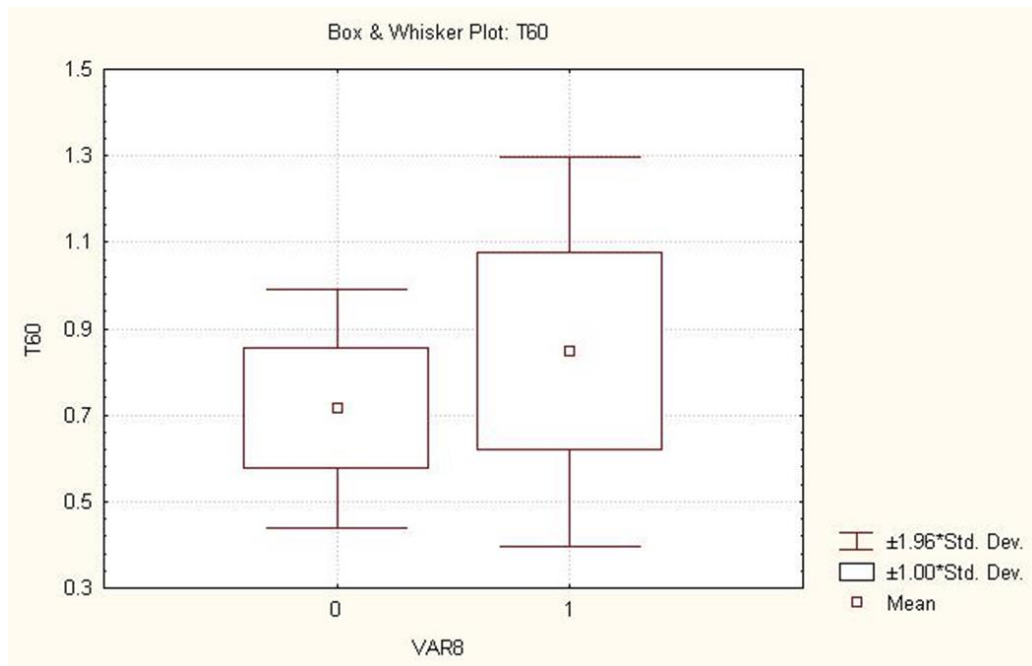


Figura 2.2: grafico rappresenta le differenti concentrazioni di tMg nei puledri sopravvissuti (0) e non sopravvissuti (1)



## 2.6 Discussione e Conclusione

---

*Determinazione del tMg plasmatico*- Molti studi presenti in letteratura riguardanti la determinazione del magnesio plasmatico riportano difficoltà nell'eseguire analisi precise ed accurate (Elin, 1987; Elin, 1994; Fawcett et al., 1999; Saris et al., 2000; Huijen et al., 2000;). Delle tre frazioni in cui il magnesio è presente a livello ematico, la sola ad avere attività biologica è quella ionizzata e quindi l'unica in realtà a essere effettivamente indicativa come parametro clinico (Garcia-Lopez et al., 2001). La misurazione della frazione ionizzata è però possibile soltanto tramite l'utilizzo di un analizzatore automatico provvisto di un elettrodo selettivo per lo ione  $Mg^{2+}$  (Ise analyzer, Nova CRT8), non comunemente in dotazione ai laboratori di analisi cliniche (Altura e Altura, 1996; Saris et al., 2000; Koch et al., 2002; Gilroy et al., 2006). In uno studio di Koch e collaboratori (2002) è stato dimostrato che esiste una elevata correlazione tra la concentrazione di Mg ionizzato e Mg totale in pazienti umani critici, a differenza del calcio per il quale non è presente una stretta correlazione tra le due frazioni. Quindi, la concentrazione di Mg totale si dimostra attendibile nella valutazione della magnesemia reale ed è stata valutata in diversi studi condotti in medicina umana e veterinaria, inclusa la specie equina, essendo comunque una frazione indicativa dello stato del magnesio plasmatico (Ilves et al., 1996; Ilves et al., 2000; Johansson et al., 2003; Gilroy et al., 2006). Nel nostro lavoro, è stata eseguita la determinazione del magnesio totale, poiché di più facile attuazione nella pratica clinica, utilizzando una metodica che fosse il più possibile sensibile e specifica per l'elemento. Le misurazioni sono state eseguite mediante spettrofotometria ad

assorbimento atomico (AAS) e successivamente confrontate con quelle ottenute tramite metodo colorimetrico, con l'analizzatore automatico normalmente utilizzato per la determinazione degli altri elettroliti del profilo biochimico. Dal confronto tra le due metodiche analitiche è emersa una buona correlazione. In considerazione della metodica sicuramente più sensibile su cui si basa l'AAS, possiamo confermare l'attendibilità del metodo colorimetrico nella misurazione del magnesio plasmatico totale. Il metodo automatico, benché meno sensibile rispetto a AAS, presenta il vantaggio di essere pratico e più veloce e perciò è consigliato nella routine clinica.

In questo studio abbiamo valutato per la prima volta la concentrazione plasmatica del magnesio totale in puledri neonati sani e malati (PAS, sepsi e prematurità/dismaturità) ricoverati in terapia intensiva nelle prime 72 h di vita o di ricovero.

Mg nei puledri sani- Nei puledri sani la concentrazione plasmatica di tMg non presenta variazioni significative ( $0,68 \pm 0,12$  mmol/L; min: 0,46; max: 1,33 mmol/L) nelle prime 72 ore di vita con valori analoghi a quanto riportato in bibliografia (Berlin e Aroch, 2009; Hurcombe et al., 2009). Nello studio di Berlin e Aroch (2009) il tMg e il iMg (magnesio ionizzato) nei puledri è stato misurato in animali sani di età compresa tra 1 e 7 giorni di vita e comparato con la concentrazione di Mg negli adulti divisi in 3 gruppi (adulti, fattrici in lattazione e gravide). Gli autori hanno confermato che il magnesio (tMg e iMg) nei puledri è significativamente più alto rispetto agli adulti (tMg adulti =  $0,77 \pm 0,09$  mmol/L; tMg puledri =  $0,84 \pm 0,15$  mmol/L). Un lavoro condotto nella nostra struttura con lo stesso analizzatore automatico (Mariella et al., 2014) ha misurato la

concentrazione di tMg in fattrici Standardbred gravide in lattazione e in un gruppo di controllo (femmine non gravide e non in lattazione). Non sono state evidenziate differenze significative tra le concentrazioni di Mg delle cavalle del gruppo di controllo e i range dei valori di Mg nei puledri sani (Antonelli et al., 2012), in accordo anche con Sato e collaboratori (1979), mentre nelle fattrici gravide a fine gestazione e in lattazione le concentrazioni di Mg risultano superiori a quelle dei puledri sani, in disaccordo con Berlin e Aroch (2009).

Mg nei puledri malati- Non sono state riscontrate differenze significative nella concentrazione plasmatica di Mg tra i puledri sani e quelli settici, in accordo con Hurcombe e collaboratori (2009). Nei puledri malati la concentrazione di tMg misurata al momento dell'ammissione (T0) è significativamente più elevata rispetto ai tempi successivi (T12, T24, T36, T48, T60, T72), quando le concentrazioni ritornano all'interno del range determinato per i puledri sani, probabilmente grazie al trattamento medico a cui sono stati sottoposti i puledri. Un dato molto rilevante è rappresentato dalla differenza statisticamente significativa riscontrata tra i puledri affetti da PAS e gli altri sottogruppi diagnostici. I neonati del sottogruppo PAS hanno una concentrazione più alta di tMg all'ammissione rispetto a quelli affetti dalle altre patologie e a quelli sani. Questo è il primo studio presente in letteratura che riporta una ipermagnesemia in puledri affetti da PAS. Essendo il magnesio uno dei maggiori cationi intracellulari, la rottura delle cellule determina rilascio di questo elemento in circolo e per questo motivo l'ipermagnesemia potrebbe essere considerata un utile indicatore di grave danno tissutale (Broner

et al., 1990; Johnston , 1993; Greenamyre e Porter, 1994; Delivoria-Papadopoulos e Mishra,1998). Perciò, l'ipermagnesemia da noi evidenziata nei puledri affetti da PAS potrebbe essere il risultato di un grave danno tissutale, con morte cellulare e rilascio del Mg intracellulare; questo evento potrebbe essere collegato anche all'acidosi che frequentemente si riscontra in medicina neonatale equina, nei puledri affetti da PAS o ricoverati in terapia intensiva (Vaala, 2009).

Hurcombe e collaboratori (2009) hanno misurato iMg in campioni sierici di puledri settici (0,62-0,57 mmol/L) e di puledri malati non settici (0,57-0,54 mmol/L) all'ammissione in due stagioni riproduttive successive e fatto un confronto con un gruppo di puledri sani con meno di 72 ore di vita (0,62-0,58 mmol/L). Dal confronto è emerso che non esistono differenze significative tra i 3 gruppi anche se alcuni animali settici presentavano ipomagnesemia (<0,4 mmol/L); i puledri sani hanno presentato concentrazioni di magnesio più alte comparate con i valori degli adulti presenti in bibliografia (Berlin e Aroch, 2009). Johansson e collaboratori (2003) hanno condotto uno studio per valutare la frequenza con cui si presenta l'ipomagnesemia in cavalli con patologie differenti ed età differenti ricoverati in clinica. Hanno prima stabilito un range di normomagnesemia su cavalli sani (1.7–2.5 mg/dL). Più del 50% degli animali in questo studio è risultato ipomagnesemico (tMg range: da 0.6 a 1.6 mg/dL) e presentava patologie gastroenteriche e acidosi. L'ipomagnesemia, inoltre, è stata riscontrata meno frequentemente nei cavalli giovani, in particolare nei puledri sani, che negli adulti o negli anziani; la concentrazione di Mg nei cavalli sani non ha subito variazioni con l'età e i puledri sani

hanno presentato valori compresi nei range di riferimento di Sato e collaboratori (1979).

I dati riguardanti le variazioni nella concentrazione di tMg nei neonati umani affetti da asfissia sono discordanti. Alcuni autori descrivono ipermagnesemia (Engel e Elin, 1970; Jukarinen, 1971; Caddell e Reed, 1989; Ilves et al., 2000) altri ipomagnesemia (Tsang et al., 1977; Geven et al., 1993; Ilves et al., 1996; Ilves et al., 2000) nei bambini neonati che hanno sofferto di asfissia in utero.

Ilves e collaboratori (1996) hanno riscontrato una concentrazione notevolmente più bassa di Mg nel sangue prelevato dal cordone durante il parto, nei bambini che presentavano Encefalopatia Ipossico-Ischemica (HIE) da moderata a grave rispetto ai neonati sani. I pazienti con HIE lieve presentavano un aumento non significativo. La durata e la gravità dell'insulto ipossico ischemico sembrerebbero influenzare la concentrazione di tMg. È inoltre possibile che le variazioni nelle concentrazioni dipendano dal tipo di ipossia (acuto o cronico). Ad esempio, nei bambini con Intrauterine Growth Retardation (IUGR) è stata descritta la presenza di ipomagnesemia (Geven et al., 1993).

I risultati ottenuti da Ilves e collaboratori (2000), invece, hanno evidenziato che i neonati con lievi segni di HIE presentavano una concentrazione di tMg nel sangue del cordone ombelicale significativamente più alta alla nascita rispetto al gruppo di controllo.

A differenza di altri studi (Johansson et al., 2003; Hurcombe et al., 2009) i puledri sopravvissuti ( $0,71 \pm 0,13$ ; mediana 0,68; min-max 0,49-1,29) presentano valori di tMg plasmatico significativamente più

elevati rispetto ai non sopravvissuti (  $0,80 \pm 0,22$ ; mediana 0,74; min-max 0,44-0,74). Nello studio di Ilves e collaboratori (2000) è stato osservato un aumento della magnesemia anche nei bambini affetti da una grave forma di HIE, concomitante a ipocalcemia e ad iponatremia 24-48 h dopo la nascita ed è stato associato ad una prognosi sfavorevole. L'ipermagnesemia è stata riscontrata anche in bambini ricoverati in terapia intensiva ed è stata associata a una prognosi sfavorevole e/o ad un aumento nella lunghezza del periodo di ospitalizzazione (Broner et al., 1990).

In conclusione nel nostro studio i puledri neonati sani presentano una concentrazione di magnesio costante nelle prime 72 ore di vita. I puledri affetti da PAS presentano ipermagnesemia al ricovero rispetto a quelli sani, ai settici e ai prematuri/dismaturi. L'ipermagnesemia potrebbe essere causata da un grave danno cellulare con rilascio in circolo del Mg intracellulare ed è associata a una prognosi sfavorevole. Riteniamo quindi utile misurare il Mg plasmatico totale sia al momento del ricovero che dopo la correzione dell'acidosi metabolica e utilizzare questo dato come utile biomarker diagnostici e prognostico.

## 3 Determinazione della concentrazione degli ormoni tiroidei nel puledro affetto da PAS

---

L'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide (HPT) ha specifiche funzioni correlate all'attività metabolica, alla differenziazione cellulare e allo sviluppo corporeo (Toribio, 2011). Gli ormoni tiroidei, oltre a giocare un ruolo fondamentale sul metabolismo energetico, sono lo stimolo essenziale per la formazione degli organi, per la maturazione neuromuscolare e scheletrica durante lo sviluppo prenatale e postnatale (Frank et al., 2002). Le informazioni sull'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide (HPT) e sulla concentrazione degli ormoni tiroidei (TSH) nei puledri critici sono molto scarse.

### 3.1 Tiroide ed Ormoni Tiroidei

---

Una tra le più importanti funzioni della tiroide è quella di captare attivamente ed immagazzinare lo iodio, il quale viene assorbito nella sua forma solubile I<sup>-</sup> (ioduro) (Toribio and Duckett, 2004). All'interno delle cellule tiroidee lo ioduro viene legato alla tireoglobulina per formare la monoiodotirosina e la diiodotirosina (Nitsch et al., 1985).

Accoppiandosi tra di loro formeranno le forme attive triiodotirosina (T3) e tetraiodotirosina (T4 o tiroxina) (Toribio and Duckett, 2004).

La maggior parte degli ormoni rilasciati è rappresentata da T4, la cui concentrazione sierica è 20 volte più elevata rispetto alla concentrazione sierica di T3 (Toribio and Duckett, 2004).

Gli ormoni tiroidei (TH-Thyroid Hormones) presenti nel circolo ematico sono T4, il quale proviene totalmente dalla ghiandola tiroidea, T3 e rT3 (reverse T3), che derivano invece dalla deionizzazione del T4 a livello di tessuti periferici (Toribio and Duckett, 2004).

La maggior parte degli ormoni tiroidei circolanti è legata a proteine trasportatrici, delle quali la globulina (TBG-Thyroxine Binding) è la principale (Kaptein et al., 1994).

Le forme biologicamente attive sono invece rappresentate dalle forme libere (ovvero non legate a proteine sieriche): fT4 (free thyroxine) e fT3 (free triiodothyronine). Gli ormoni nella loro forma non legata possono passare gli endoteli capillari ed essere così disponibili a livello tissutale, dove possono svolgere la loro funzione biologica (Toribio and Duckett, 2004).

La tireotropina (TSH - Thyroid Stimulating Hormone) è l'ormone che stimola la tiroide a secernere T4 e T3 ed è una glicoproteina rilasciata dall'ipofisi anteriore sotto il controllo del TRH (Thyrotropin stimulating hormone o ormone stimolante la tireotropina), tripeptide prodotto e immesso in circolo dai neuroni ipotalamici (Toribio and Duckett, 2004).

Gli ormoni tiroidei regolano l'attività della tiroide bloccandola (inibizione a lungo termine), tramite un feed-back negativo (Toribio and Duckett, 2004).

Il ruolo principale degli ormoni tiroidei è quello di stimolare il consumo di ossigeno. Inoltre promuovono sintesi e catabolismo delle proteine, aiutano a regolare il metabolismo dei lipidi (Breuhaus, 2011), convertono il colesterolo in sali biliari, attivano la lipasi delle lipoproteine, aumentano l'assorbimento dei carboidrati e il metabolismo del glucosio, stimolano l'eritropoiesi, aumentano la



sensibilità del tessuto adiposo alla lipolisi (Toribio and Duckett, 2004), stimolano il metabolismo basale e la produzione di calore corporeo (Breuhaus, 2011), aumentano la frequenza cardiaca, l'output cardiaco, il flusso ematico, la trasmissione nervosa e, negli animali giovani, lo sviluppo cerebrale e neuronale (Toribio and Duckett, 2004).

### 3.1.1 Gli ormoni tiroidei nel feto

---

Franklin e collaboratori (1985) affermano che esiste un passaggio transplacentare di piccole quantità di ormoni tiroidei dalla madre al feto, esponendo perciò l'encefalo del feto all'azione dei TH, ancor prima della loro sintesi endogena. Il feto è in grado di produrre ormoni tiroidei già a partire dall'ottava-decima settimana di gravidanza (Pop et al., 1995), tuttavia il ruolo degli ormoni della madre è centrale anche successivamente, in quanto il 30% del T4 riscontrato nel sangue del cordone ombelicale è di origine materna (Wier and Farley, 2006).

Bambini sani nati a termine presentano livelli più bassi di fT3 e livelli comparabili di fT4 rispetto all'adulto; durante le prime 24 ore di vita il TSH aumenta considerevolmente, con conseguente aumento sia di T3 e di T4 (Glinoe et al., 1992). Dopo 3-4 giorni di vita si ha una diminuzione dei valori del TSH dovuta al feed-back negativo dato dalla tiroxina (Kratzsch and Pulzer, 2008). Bambini prematuri presentano l'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide immaturo, con livelli di T4 più bassi, correlati all'età gestazionale e al peso alla nascita (Van Wassenaer et al., 1993). Patologie che causano bassi livelli di TH nei neonati umani sono la setticemia (Yildizdas et al., 2004), la sindrome da stress respiratorio (Ogilvy-Stuart, 2002) e l'asfissia (Borges et al., 1985). L'asfissia perinatale comprende una serie di alterazioni che

possono coinvolgere diversi organi e tessuti compreso l'alterazione nella concentrazione di alcuni ormoni (Procianoy et al., 1988; Pereira e Procianoy, 1997), ma solo pochi studi hanno valutato l'influenza di questa condizione patologica sui livelli ematici di TH (Borges et al., 1985; Pereira e Procianoy, 2003). Un recente studio condotto su bambini neonati affetti da asfissia ha evidenziato una bassa concentrazione di T3, T4 e TSH rispetto a quella del gruppo di controllo, suggerendo un ipotiroidismo secondario centrale dovuto all'asfissia (Pereira e Procianoy, 2003).

### 3.1.2 Gli ormoni tiroidei nel puledro

---

Gli ormoni tiroidei nei puledri sono fondamentali per garantire una normale crescita ed un adeguato sviluppo degli organi; nel neonato una loro deficienza sarà molto più grave rispetto agli adulti (Breuhaus, 2011). La concentrazione sierica di TH nella specie equina presenta valori molto più elevati nel neonato rispetto all'adulto, mostrando un lieve diminuzione nella prima settimana di vita (Irvine e Evans, 1975; Chen e Riley, 1981; Breuhaus e LaFevers, 2005). Durante la vita fetale la maggior parte del T4 viene trasformato in rT3 dalla deiodinasi, quindi la concentrazione di T3 è quasi irrilevabile, mentre i livelli di T4 e rT3 sono considerevoli (Irvine, 1984).

Questi livelli neonatali di ormoni tiroidei così elevati sono presenti solo nel puledro e non si rilevano in nessun'altra specie, in nessuno stadio fisiologico (Irvine, 1984); questo potrebbe rappresentare il motivo per cui questi animali hanno un'elevata capacità di termoregolazione e una notevole rapidità di crescita durante il periodo

pre e post natale, soprattutto a livello muscolo-scheletrico e di sistema nervoso (Irvine and Evans, 1975).

La carenza di T4, che si riscontra in caso di ipotiroidismo, può portare a mancata ossificazione e anormalità degli arti (McLaughlin e Doige, 1982).

Come già citato in precedenza, tra le funzioni più importanti svolte dagli ormoni tiroidei c'è sicuramente la differenziazione cellulare, soprattutto a livello di sistema nervoso (Grave et al., 1973), ma anche a livello di apparato respiratorio e gastro-enterico. Nel caso in cui l'ipotiroidismo si instauri nel primo periodo di gestazione, il puledro avrà difficoltà alla nascita nell'instaurare una normale funzionalità respiratoria e potrà presentare una immaturità del tratto intestinale; se il deficit di ormoni tiroidei avviene invece a fine gravidanza, avremo letargia e incapacità a mantenere la stazione e ad alimentarsi (Thorburn and Hopkins, 1972).

Sono stati rilevati bassi livelli ematici di ormoni tiroidei in puledri malati in condizioni non critiche (McLaughlin e Doige, 1982; Boosinger et al., 1995). Irvine (1984) ha ipotizzato che nei puledri malati una diminuzione del metabolismo, che si manifesta con inadeguata termoregolazione e letargia, può essere attribuita ad un deficit di ormoni tiroidei circolanti e che la gravità della sintomatologia è collegata al grado di deficienza.

Una disfunzione della ghiandola tiroidea è stata descritta in puledri nati da fattrici che avevano accesso a pascoli infestati da endofiti della festuca (Boosinger et al., 1995) ed in puledri con ipotiroidismo/gozzo congenito (McLaughlin e Doige, 1986; Allen et al., 1996). In uno studio recente di Panzani e collaboratori (2012) nel quale è stato valutato in che modo il tipo di parto può influenzare il profilo

ormonale e metabolico nei puledri neonati sani, confrontandolo con puledri malati è stato evidenziata una più bassa concentrazione di TH in questi rispetto ai sani senza distinzione per il tipo di parto, se indotto o spontaneo. In uno studio recente di Himler e collaboratori (2012) i valori del T4 e del T3 totali e del T4 e del T3 liberi sono risultati più bassi nei puledri setticemici che nei puledri malati non setticemici, nei puledri sani e nei puledri setticemici non sopravvissuti, ipotizzando la presenza di una Euthyroid Sick Syndrome direttamente correlata alla gravità della malattia ed alla mortalità. Risultati paragonabili sono stati ottenuti nei puledri prematuri che presentano concentrazioni molto basse di TH e una risposta esagerata del TSH alla somministrazione di TRH (Silver et al., 1991; Breuhaus e LaFevers, 2005).

### 3.2 Euthyroid Sick Syndrome

---

Gravi malattie sistemiche non tiroidee sono spesso associate ad alterazioni della concentrazione degli ormoni tiroidei in assenza di disfunzioni proprie della ghiandola tiroide (Adler e Wartofsky, 2007). Per questo motivo l'Euthyroid Sick Syndrome (ESS), anche conosciuta come Nonthyroidal Illness Syndrome (NTIS), non è vista come una condizione patologica isolata, ma come parte della risposta endocrina generalizzata nei confronti di una malattia.

Lo stress che si riscontra in malattie sistemiche (acute e croniche) e nella sepsi provoca un ipermetabolismo con aumento del consumo energetico, iperglicemia e perdita di tessuto muscolare (Plank et al., 1998). I parametri di laboratorio mostrano bassi livelli sierici di T3 ed

elevati livelli sierici di rT3, associati a normale o bassa concentrazione sierica di T4 e normali o bassi livelli di TSH. Questa situazione si può rilevare nel 60-70% dei pazienti affetti da patologie gravi sistemiche. In questi soggetti, la variazione dei valori sierici degli ormoni tiroidei sembra essere la conseguenza di alcune alterazioni del metabolismo periferico dei TH, della regolazione del TSH, del trasporto dei TH da parte delle proteine trasportatrici e dell'azione dei recettori che captano e trasportano all'interno delle cellule gli ormoni tiroidei (Economidou et al., 2011).

Il T3 è la forma biologicamente attiva degli ormoni tiroidei e una diminuzione della sua concentrazione sierica, in pazienti affetti da malattie sistemiche, riflette un'alterata omeostasi tiroidea e un adattamento alla condizione catabolica. L'inibizione dell'enzima che catalizza la conversione da T4 a T3, è considerata la possibile causa responsabile dell'ESS (Corssmit et al., 1995; Van der Poll et al., 1990). Il T4 si riduce in 24-48 ore. All'inizio il calo è dovuto a una diminuzione delle proteine trasportatrici circolanti (globulina, prealbumina e albumina) (Afandi et al., 2000). Tra le variazioni del metabolismo degli ormoni tiroidei, quella che richiede un maggior tempo di sviluppo è rappresentata dal calo del TSH, in quanto l'inibizione della sua produzione a livello di ipofisi avviene più lentamente e generalmente si verifica contemporaneamente alla diminuzione delle concentrazioni di T4 (Wehmann et al., 1985).

### 3.2.1 L'Euthyroid Sick Syndrome in neonatologia umana

---

Anche nei bambini si riscontra un'alterata risposta ai test per valutare la funzionalità tiroidea, situazione comune nei pazienti ricoverati nelle unità neonatali e pediatriche di terapia intensiva. I parametri biochimici, anche in questo caso, rivelano comunemente bassi livelli di fT3, con normali o basse concentrazioni di fT4 e di TT4 e normali di TSH. In pazienti con patologie gravi si rilevano basse concentrazioni anche di T4 e, nelle fasi iniziali della malattia, anche un'alterazione del TSH (Bursell e Warner, 2007).

Le variazioni delle concentrazioni circolanti di ormoni tiroidei sono tanto più significative tanto maggiore è la gravità della malattia (Hennemann et al., 1998).

L'asfissia perinatale nei neonati provoca alterazioni multiorganiche, provocate da variazioni nelle concentrazioni dei gas e del pH a livello ematico. Ciò porta alla priorità di circolo, con una redistribuzione del flusso ematico. Avremo quindi in questa situazione un rapido incremento delle secrezioni di alcuni ormoni, come le catecolamine, i glucocorticoidi, l'ormone adrenocorticotropo, le  $\beta$ -endorfine, l'ormone antidiuretico, l'aldosterone, la renina, il peptide natriuretico atriale e una riduzione dell'insulina (Pereira e Procianoy, 2001). Pereira e Procianoy (2001) hanno quindi voluto valutare se in caso di Asfissia Perinatale (definita in base a APGAR score < 7 e un pH < 7.2) ci fossero variazioni significative anche nelle concentrazioni degli ormoni tiroidei, in quanto studi precedenti davano risultati contrastanti. Le concentrazioni dei TH nel sangue del cordone ombelicale erano simili tra i neonati con asfissia perinatale e quelli

sani, ad eccezione di rT3 che risultava più elevato nel primo gruppo; ciò potrebbe indicare un'alterazione a livello periferico del metabolismo degli ormoni tiroidei. Sempre in questo studio, a distanza di 24-48 ore dal parto è stata rilevata una diminuzione dei valori di T4, T3, fT4 e TSH nel gruppo con asfissia perinatale, in contrapposizione a quelli sani in cui i livelli basali presenti nel sangue del cordone ombelicale tendono invece ad aumentare.

### 3.3 Scopi del lavoro

---

In bibliografia non esistono studi sulla valutazione della concentrazione degli ormoni tiroidei nei puledri affetti da Sindrome da Asfissia Perinatale (PAS).

Gli scopi del nostro lavoro sono quindi stati:

- Determinazione dei valori fisiologici della concentrazione venosa degli ormoni tiroidei T3 e T4 nel puledro sano durante i primi 7 giorni di vita;
- Valutazione dell'andamento degli ormoni tiroidei nel puledro affetto da PAS ricoverato in terapia intensiva, durante i primi 7 giorni di ricovero;
- Comparazione della concentrazione degli ormoni tiroidei tra puledri sopravvissuti e non sopravvissuti.
- Valutazione del valore diagnostico e prognostico della concentrazione degli ormoni tiroidei nel puledro ricoverato in terapia intensiva.

Questo studio è stato svolto in collaborazione con la Professoressa Maria Cristina Veronesi e con la Dottoressa Sara Panzani del Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinaria dell'Università di Milano.

## 3.4 Materiali e metodi

---

### 3.4.1 Selezione degli animali

---

In questo studio sono stati inclusi 55 puledri nati durante la stagione riproduttiva 2010-2011, divisi in due gruppi:

Gruppo 1– Sani: puledri sani, nati presso un allevamento di cavalli di razza trotatore italiano, nel Nord Italia.

I puledri sono stati classificati come sani in base ad un punteggio Apgar  $\geq 9$  (Vaala, 2002), esame clinico ed esami collaterali nei limiti della norma nella prima settimana di vita, e una concentrazione sierica di IgG  $\geq 800$  mg/dL a 18 ore di vita, determinato tramite metodo semiquantitativo SNAP Foal IgG Test kit, IDEXX, USA (Pusterla et al., 2002).

Gruppo 2– Malati: puledri affetti da Sindrome da Asfissia Perinatale ricoverati dopo la nascita presso l'Unità di Perinatologia Equina "Stefano Belluzzi" del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna, che richiedevano cure di II-III livello (Koterba, 1990).



I puledri sono stati classificati come affetti da PAS in base ai dati anamnestici ed ai segni clinici specifici, in particolare quelli neurologici riferibili ad encefalopatia ipossico-ischemica (Knottenbelt et al., 2004), dopo aver escluso altre malattie neurologiche quali la meningite o trauma.

Sono stati inclusi nel secondo gruppo puledri che all'anamnesi presentavano: distocia, red bag, alterazione dell'aspetto macroscopico della placenta e tipici segni clinici di possibile PAS tra cui riflesso di suzione assente o diminuito, disinteresse per la madre, ricerca anomala della mammella, disfagia, convulsioni, iperreattività e debolezza, associata ad un aumento delle creatinemia a meno di 24 ore di vita.

I puledri affetti anche da altre patologie (ad esempio sepsi, prematurità o isoeritrolisi) sono stati esclusi da questo studio.

A tutti i puledri appartenenti al Gruppo 2 sono stati eseguiti all'ammissione un esame clinico completo, il profilo ematobiochimico, l'emocoltura e la determinazione della concentrazione ematica di IgG dopo le 18 ore di vita.

Sono stati considerati sopravvissuti i puledri dimessi vivi dall'Unità.

Tutte le procedure sugli animali sono state effettuate previa approvazione del Comitato Etico dell'Università di Bologna, ai sensi del DL 116/92, approvato dal Ministero della Salute. Un consenso informato orale è stato fornito dai proprietari.

### 3.4.2 Raccolta dei dati e determinazioni degli ormoni tiroidei

---

Nei puledri appartenenti al Gruppo 1, i campioni ematici per la determinazione degli ormoni tiroidei sono stati prelevati nell'immediato post-partum (t0) e successivamente ogni 24 ore fino ai 7 giorni di vita (t1, t2, t3, t4, t5, t6, t7).

Nei puledri del Gruppo 2, i campioni di sangue sono stati raccolti al momento dell'ammissione (t0) e ogni 24 ore fino al settimo giorno di ricovero (t1, t2, t3, t4, t5, t6, t7).

Il campione di sangue è stato posto in provette S-Monovette Sarstedt contenenti litio-eparina e centrifugato per 10 minuti a 2200 giri/min immediatamente dopo il prelievo; il surnatante è stato conservato in aliquote congelate a -20°C, per un massimo di 2 mesi.

La determinazione degli ormoni è stata eseguita presso il Laboratorio di Fisiologia del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie. Per il dosaggio radioimmunologico degli ormoni tiroidei (T3 e T4) sono stati utilizzati dei kit commerciali della Izotop (Institute of Isotopes Co., Budapest) precedentemente validati presso lo stesso Laboratorio (Panzani S. et al., 2012).

L'anticorpo anti T3 o anti T4 è adsorbito alle pareti delle provette di polipropilene nelle quali si effettua il dosaggio. Alle provette viene aggiunto sia il plasma (rispettivamente 100 µL per il T3 e 25 µL per il T4) che una soluzione di T3 o T4 marcata con <sup>125</sup>I. Dopo un'incubazione di 2 ore a temperatura ambiente in agitazione costante, viene decantata la fase liquida e si procede al conteggio della

radioattività rimasta legata all'anticorpo. Il conteggio è stato effettuato mediante un contatore Packard modello Cobra II D5005. I valori sono espressi in nmol/mL. La sensibilità del metodo è risultata di 0,22 nmol/L e 14,5 nmol/L rispettivamente per T3 e T4. Il coefficiente di variazione intra e inter-assay è risultato essere di 2,6% e 11,2% per il T3, di 4,6% e 12,4% per il T4.

### 3.4.3 Analisi statistica

---

Un modello lineare generalizzato (GLM) per misure ripetute, post-hoc test con la correzione di Bonferroni, è stato utilizzato per valutare l'andamento nel tempo degli ormoni tiroidei (T3 e T4), sia nei puledri sani che nei malati.

Le concentrazioni degli ormoni tiroidei al momento del ricovero sono state confrontate mediante il test U di Mann-Whitney. I puledri malati sono stati quindi divisi in sottogruppi sulla base dell'età al momento dell'ammissione (da 0 a 12 h, da 13 a 36 ore, da 37 a 60 h) per confrontare la concentrazione degli ormoni tiroidei di questi soggetti rilevata a t0 con quella dei soggetti sani dell'età corrispondente. I risultati dell'analisi statistica descrittiva sono espressi come media  $\pm$ DS.

Il test U di Mann-Whitney è stato inoltre utilizzato per confrontare le concentrazioni di TH all'ammissione (t0) nei puledri sopravvissuti e nei non sopravvissuti, senza nessuna correzione con l'età.

Un valore di  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando un software commerciale (SPSS, Version 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL).

## 3.5 Risultati

### Gruppo 1

Nel Gruppo 1 sono stati inclusi 21 puledri clinicamente sani, di cui 13 maschi e 8 femmine.

Sulla base dei dati ottenuti è stato determinato il range di normalità della concentrazione degli ormoni tiroidei (T3 e T4), specifico per l'età.

L'andamento delle concentrazioni di T3 e T4 del Gruppo 1 è rappresentato nei due grafici sotto riportati. (Figura 3.1)

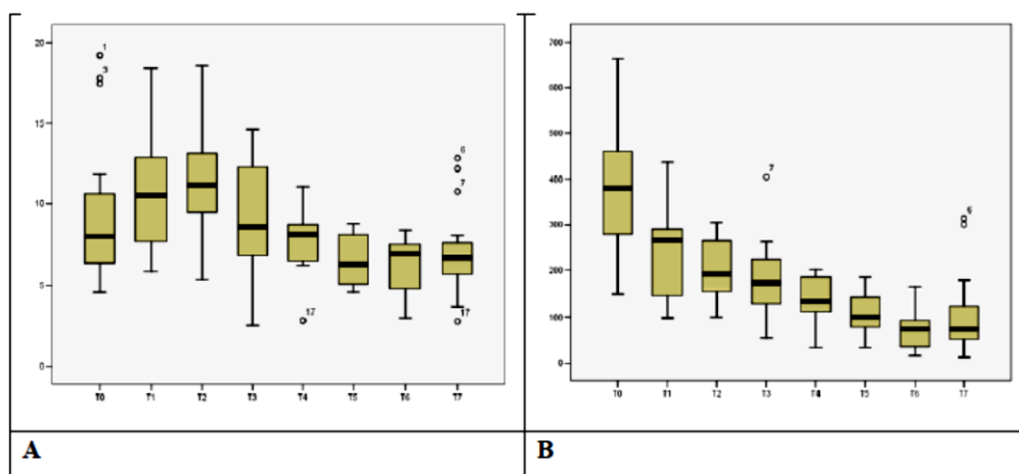


Figura 3.1: Andamento nel tempo della concentrazione di T3 (A) e T4 (B) espressa in nmol/mL nei primi 7 giorni di vita nei **puledri sani**. Il box centrale rappresenta i valori dal 25° al 75° percentile. La linea centrale rappresenta la mediana. Le linee orizzontali rappresentano il range, esclusi i valori "outside" e "far out" indicati come punti separati.

Tabella 3.1: Concentrazione degli ormoni tiroidei (T3 e T4) (nmol/mL) espressa come Media  $\pm$ DS nei **puledri sani**. Lettere differenti in apice indicano una differenza statisticamente significativa tra i diversi tempi con GLM analysis ( $p < 0,01$ ).

	t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7
<b>T<sub>3</sub></b>	9.63 <sup>ab</sup> $\pm 4.76$	11.00 <sup>b</sup> $\pm 2.76$	10.88 <sup>bc</sup> $\pm 2.53$	9.06 <sup>bc</sup> $\pm 3.50$	7.86 <sup>ac</sup> $\pm 1.72$	7.01 <sup>ac</sup> $\pm 1.18$	6.62 <sup>ac</sup> $\pm 1.24$	7.03 <sup>ac</sup> $\pm 2.42$
<b>T<sub>4</sub></b>	394.81 <sup>a</sup> $\pm 140.8$	249.5 <sup>b</sup> $\pm 82.73$	210.85 <sup>b</sup> $\pm 47.20$	178.91 <sup>b</sup> $\pm 73.96$	146.78 <sup>b</sup> $\pm 35.31$	116.35 <sup>b</sup> $\pm 34.27$	81.68 <sup>b</sup> $\pm 30.43$	100.67 <sup>b</sup> $\pm 79.68$

La concentrazione plasmatica di T3 e di T4 nei sani (Tabella 3.1), ha mostrato una variazione significativa ( $p < 0,01$ ) nel tempo. La concentrazione di T3 a t1 (11,00  $\pm$ 2,96 nmol/mL) mostra un aumento non statisticamente significativo rispetto ai valori riscontrati a t0 (9,63  $\pm$ 4,76 nmol/mL), e significativamente più basso a t4, t5, t6, t7 rispetto a t1 ( $p < 0,01$ ). La concentrazione di T3 riscontrata a t4 mostra un diminuzione statisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) rispetto al t1. Al momento della nascita, invece, la concentrazione di tiroxina (T4) è elevata (394,81  $\pm$ 140,8 nmol/mL) e decresce in modo statisticamente significativo ( $p < 0,01$ ) già a partire da t1 (249,5  $\pm$ 82,73 nmol/mL).

## Gruppo 2

Nel Gruppo 2 sono stati inclusi 24 puledri con meno di 7 giorni di vita (età media 22 ore), di cui 18 maschi e 6 femmine, affetti da PAS.

Del totale, 24 puledri (83%) sono sopravvissuti e sono stati dimessi, 4 (17%) sono deceduti.

L'andamento della concentrazione di T3 e T4 del Gruppo 2 è rappresentato nei due grafici sotto riportati (Figura 3.2).

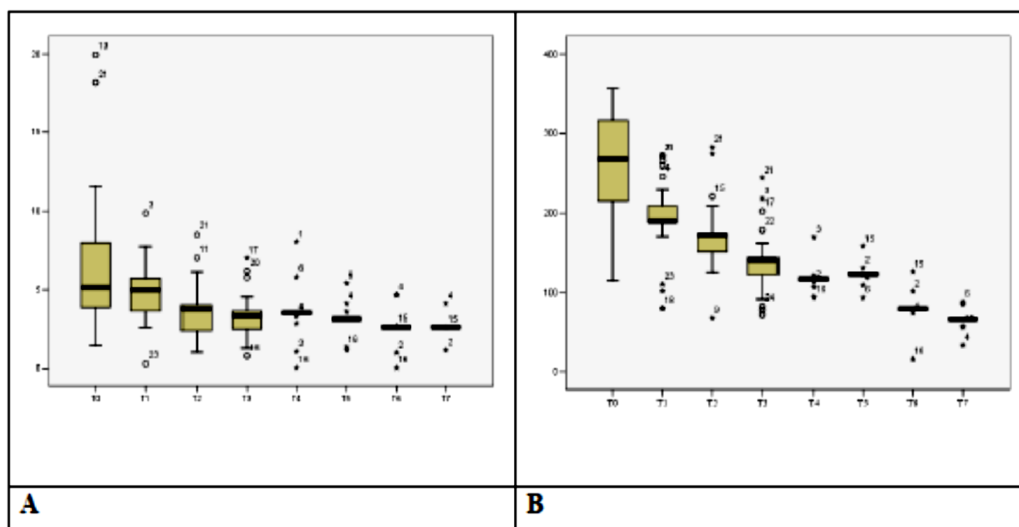


Figura 3.2: Andamento nel tempo della concentrazione di T3 (A) e T4 (B) espressa in nmol/mL nei primi 7 giorni di ricovero nei **puledri affetti da PAS**. Il box centrale rappresenta i valori dal 25° al 75° percentile. La linea centrale rappresenta la mediana. Le linee orizzontali rappresentano il range, esclusi i valori "outside" e "far out" indicati come punti separati.

Tabella 3.2: Concentrazione degli ormoni tiroidei (T3 e T4) (nmol/mL) espressa come Media  $\pm$ DS nei **puledri affetti da PAS**. Lettere differenti in apice indicano una differenza statisticamente significativa tra i diversi tempi con GLM analysis ( $p < 0,01$ ).

	t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7
<b>T<sub>3</sub></b>	6.57 <sup>ab</sup> $\pm 4.67$	5.47 <sup>b</sup> $\pm 2.27$	4.29 <sup>bc</sup> $\pm 2.02$	3.97 <sup>bc</sup> $\pm 1.83$	3.89 <sup>ac</sup> $\pm 1.57$	3.48 <sup>ac</sup> $\pm 1.16$	3.35 <sup>ac</sup> $\pm 1.22$	3.76 <sup>ac</sup> $\pm 1.01$
<b>T<sub>4</sub></b>	259.79 <sup>a</sup> $\pm 60.97$	188.87 <sup>b</sup> $\pm 55.78$	162.89 <sup>b</sup> $\pm 46.75$	141.85 <sup>b</sup> $\pm 41.03$	108.42 <sup>b</sup> $\pm 16.57$	101.54 <sup>b</sup> $\pm 16.32$	71.49 <sup>b</sup> $\pm 17.79$	58.78 <sup>b</sup> $\pm 15.72$

La concentrazione plasmatica di T3 e di T4 nei malati (Tabella 3.2), ha mostrato una variazione significativa ( $p < 0,01$ ) nel tempo. La concentrazione di T3 mostra un andamento non significativo decrescente da t0 a t4 e una concentrazione significativamente più bassa a t4, t5, t6 e t7 comparato con t1 ( $p < 0,01$ ); non mostra quindi il picco a t1 che si rileva invece nell'andamento delle concentrazioni di T3 del Gruppo 1.

La concentrazione plasmatica di T4 nei singoli soggetti, ha mostrato una differenza significativa ( $p < 0,01$ ) nei vari tempi, ed è significativamente più elevata all'ammissione (t0) rispetto a tutti gli altri tempi ( $p < 0,01$ ).

Il confronto statistico tra puledri sani e malati divisi in gruppi di età ha mostrato una concentrazione significativamente più bassa di T3 e T4 (Tabella 3.3) nei puledri malati solo nel gruppo di puledri che al momento del ricovero avevano meno di 12 ore di vita (Figura 3.3).

All'ammissione la concentrazione plasmatica di T3 nei puledri sopravvissuti ( $n=20$ ) è di  $6,57 \pm 4,67$  nmol/L e quella di T4 è  $259,79 \pm 60,97$  nmol/L; nei non sopravvissuti ( $n=4$ ) la concentrazione di T3 è di  $6,22 \pm 4,33$  nmol/L e quella di T4 è di  $263,64 \pm 67,00$  nmol/L. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata nelle concentrazioni plasmatiche di T3 e T4 al momento del ricovero tra puledri sopravvissuti e non sopravvissuti.

Tabella 3.3: Concentrazione degli ormoni tiroidei (T3 e T4) (nmol/mL) espressa come Media  $\pm$ DS nei puledri sani divisi in 3 sottogruppi di età e quelli affetti da PAS divisi in 3 sottogruppi in base all'età all'ammissione. Lettere differenti in apice indicano una differenza statisticamente significativa tra i diversi tempi con il test U di Mann-Whitney ( $p < 0,01$ ).

	Numero di campioni	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>
<b>Sani (t0)</b>	21	9.63 $\pm$ 4.76 <sup>a</sup>	394.81 $\pm$ 140.8 <sup>a</sup>
<b>PAS (0-12 h)</b>	11	3.95 $\pm$ 2.17 <sup>b</sup>	242.64 $\pm$ 61.85 <sup>b</sup>
<b>Sani (t1)</b>	21	11.00 $\pm$ 2.76 <sup>a</sup>	249.5 $\pm$ 82.73 <sup>a</sup>
<b>PAS (13-36 h)</b>	8	8.64 $\pm$ 5.12 <sup>a</sup>	288.97 $\pm$ 52.94 <sup>a</sup>
<b>Sani (t2)</b>	21	10.88 $\pm$ 2.53 <sup>a</sup>	210.85 $\pm$ 47.20 <sup>a</sup>
<b>PAS (37-60 h)</b>	5	9.01 $\pm$ 5.72 <sup>a</sup>	250.86 $\pm$ 65.55 <sup>a</sup>

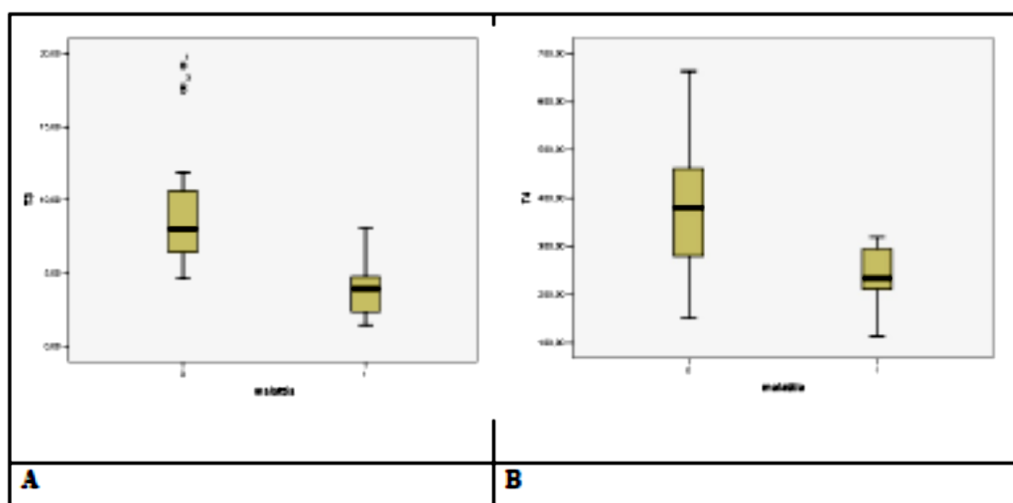


Figura 3.3: Concentrazione ematica espressa in nmol/mL di T3 (A) e T4 (B) nei puledri sani (0) e nei malati (1) a t0 per il sottogruppo di animali con meno di 12 ore di vita al momento del ricovero. Il box centrale rappresenta i valori dal 25° al 75° percentile. La linea centrale rappresenta la mediana. Le linee orizzontali rappresentano il range, esclusi i valori "outside" e "far out" indicati come punti separati



## 3.6 Discussione e Conclusione

---

In questo studio abbiamo valutato la concentrazione ematica degli ormoni tiroidei (T3 e T4) in puledri neonati affetti da PAS e ricoverati in terapia intensiva, confrontandoli con un gruppo di controllo di animali clinicamente sani utilizzati per determinare i range fisiologici dal momento della nascita a 7 giorni di vita.

Nei puledri sani la concentrazione della triiodotironina presenta un picco a 24 ore di vita, rimane elevata fino a 48 ore, ed infine decresce progressivamente fino a 7 giorni. Questi risultati sono in accordo con gli studi sul puledro neonato effettuati in precedenza (Irvine e Evans, 1975; Irvine, 1984), dove sono riportate concentrazioni di TT3 nel neonato 7 volte più elevate rispetto a quelle dell'adulto, con un aumento progressivo nelle prime dieci ore di vita, un picco massimo a 24-48 ore di vita e un successivo decremento. Tuttavia questi risultati sono in disaccordo con Panzani e collaboratori (2012) che riportano una diminuzione nel tempo nelle prime due settimane di vita.

Nel nostro studio la concentrazione di tiroxina è invece elevata al momento della nascita e decresce in modo statisticamente significativo già a partire dalle 24 ore di vita. Questi dati sono in accordo con Panzani e collaboratori (2012) che hanno rilevato un elevato livello di T4 alla nascita seguito da un calo nelle successive 12 ore. In letteratura sono riportate concentrazioni di TT4 alla nascita 14 volte superiori rispetto a quelle dell'adulto, con un successivo rapido decremento fino alle concentrazioni dell'adulto a 16 giorni di vita (Irvine e Evans, 1975; Irvine, 1984). Una ampia deviazione standard è stata riscontrata a t0 in accordo con altri autori (Panzani et al., 2012;

Himler et al., 2012). Concentrazioni degli ormoni tiroidei così elevate nel neonato sono state riscontrate solo nel puledro e non si rilevano in nessun'altra specie, in nessuno stadio fisiologico (Irvine, 1984); questo potrebbe rappresentare il motivo per cui questi animali hanno un'elevata capacità di termoregolazione e una notevole rapidità di crescita durante il periodo perinatale, soprattutto a livello muscolo-scheletrico e di sistema nervoso (Irvine and Evans, 1975).

Nei bambini nati a termine, invece, nelle prime ore di vita si ha un ulteriore aumento della concentrazione sia di T3 che di T4 (Fisher and Polk, 1989), grazie al passaggio da una predominante inattività tiroidea ad un suo stato di iperattività, che permette un adeguato adattamento del neonato all'ambiente extrauterino (Fisher et al., 2000). Inoltre, secondo Brien et al. (1974), l'aumento del TT4 è dovuto anche ad un incremento delle concentrazioni delle globuline plasmatiche che legano T4.

Nel bambino la variazione di temperatura tra l'ambiente intrauterino e quello extrauterino sembra in grado di stimolare l'asse HPT, con un aumento della secrezione di TRH e TSH subito dopo il parto; questo aumento ha un effetto di breve durata con un picco a circa 30 minuti dopo la nascita, seguito da una progressiva diminuzione dei valori plasmatici di TSH a 3-5 giorni di vita dovuto al feedback negativo del T4 (Fisher et al., 2000).

In questo studio, nei puledri affetti da PAS, il monitoraggio della concentrazione degli ormoni tiroidei ha mostrato una diminuzione significativa tempo-dipendente a partire dal quarto giorno di vita per quanto riguarda il T3 ( $p < 0,01$ ), e dalle 24 ore di vita per il T4

( $p < 0,01$ ). Si può notare l'assenza dell'incremento di T3 a t1 invece presente nei puledri sani. I risultati ottenuti nel Gruppo 2 non possono essere comparati con quelli di altri autori non essendo presente in bibliografia nessuno studio sulla concentrazione degli ormoni tiroidei nel puledro affetto da PAS.

La concentrazione di TH nei puledri malati è stata determinata da diversi autori. Silver et al. (1991) hanno valutato la concentrazione del T3 in puledri prematuri, riscontrando concentrazioni più basse rispetto ai puledri nati a termine. In uno studio recente effettuato su 26 puledri malati affetti da differenti patologie è stata riscontrata una concentrazione degli ormoni tiroidei più bassa rispetto a puledri sani nati da parto spontaneo (Panzani et al., 2012).

In uno studio di Himler et al. (2012) sono state riscontrate delle concentrazioni di ormoni tiroidei inferiori nei puledri ricoverati in terapia intensiva rispetto ai puledri sani, ad eccezione dell'rT3. Gli autori riportano infatti che sia la presenza di malattia che la prematurità sono associate ad una carenza di TH, riscontrando valori più bassi nei puledri malati e prematuri rispetto a quelli malati e nati a termine. Suggestiscono inoltre che l'immaturità dell'asse HPT presente nei puledri prematuri possa aggravare la sintomatologia in animali già debilitati da patologie sistemiche.

Nel bambino, le concentrazioni di T4 nei neonati prematuri sono più basse rispetto a quelle dei nati a termine; questo è legato all'immaturità dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide, e la concentrazione è correlata all'età gestazionale ed al peso alla nascita (Van Wassenaer et al., 1993).

I neonati affetti dalla Sindrome da Stress Respiratorio presentano concentrazioni di TSH, T3, T4 e fT4 normali al momento della nascita, ed una diminuzione significativa di T3, T4 e fT4 al quinto giorno di vita; i valori di TSH rimangono invece normali (Franklin et al., 1986). Gli stessi dati sono stati riscontrati da Pereira e Procianoy (2001) in bambini di 18-24 ore di vita che hanno subito un periodo di asfissia perinatale. Gli stessi autori in un altro studio hanno valutato gli effetti dell'asfissia perinatale sulle concentrazioni dei TH, ed hanno riscontrato valori statisticamente inferiori nei bambini con encefalopatia ipossico-ischemica di grado moderato/grave rispetto a bambini sani (Pereira e Procianoy, 2003).

Nel nostro studio, la concentrazione degli ormoni tiroidei riscontrata nei puledri malati di età inferiore alle 12 ore di vita è risultata significativamente più bassa rispetto a quella rilevata nei puledri sani alla nascita. Risultati simili sono stati ottenuti da Himler e collaboratori (2012) in uno studio su puledri prematuri (settici e non settici), malati nati a termine (settici e non settici) e sani. Questi autori hanno valutato le concentrazioni degli ormoni tiroidei solo al momento dell'ammissione e senza dividere i puledri in classi d'età. Panzani e collaboratori (2012) hanno ottenuto risultati simili in puledri prematuri, affetti da PAS e setticemici comparati con quelli sani.

Le basse concentrazioni degli ormoni tiroidei nei puledri affetti da PAS potrebbe essere legata all'Euthyroid Sick Syndrome, che probabilmente rappresenta una risposta adattativa ad una malattia sistemica, con una diminuzione del metabolismo per prevenire disfunzioni organiche o la morte (Plank et al., 1998).

In questa sindrome i parametri di laboratorio mostrano bassi livelli sierici di T3 ed elevati livelli sierici di rT3, associati a normale o bassa concentrazione sierica di T4 e normali o bassi livelli di TSH (Economidou et al., 2011). I meccanismi implicati nella patogenesi dell'Euthyroid Sick Syndrome sono molteplici. Tra le cause ricordiamo alterazioni dell'asse HPT, le quali possono derivare dalla riduzione della conversione del T4 in T3 a livello di tessuti periferici (De Groot, 1999). Altre cause possono essere rappresentate dalla presenza di citochine in circolo prodotte durante un'infezione, trattamenti con farmaci come i glucocorticoidi o l'amiodarone (Corssmit et al., 1995; Van der Poll et al., 1990).

Nel questo studio la concentrazione degli ormoni tiroidei non ha mostrato alcun valore prognostico al momento del ricovero, probabilmente a causa del basso numero di animali deceduti (n=4); sarebbe quindi necessario approfondire lo studio su un numero maggiore di animali. Un valore prognostico è stato riscontrato da Himler et al. (2012) in puledri con basse concentrazioni di ormoni tiroidei, rilevando percentuali più basse di sopravvivenza negli animali settici e prematuri (50%) rispetto ai settici nati a termine (72%).

Nel nostro studio, sia i puledri sani che quelli affetti da Sindrome da Asfissia Perinatale presentano un andamento decrescente delle concentrazioni di T3 e T4. Nei puledri malati con meno di 12 ore di vita sono state inoltre rilevate concentrazioni più basse rispetto ai sani. Questi valori più bassi potrebbero essere legati al coinvolgimento sistemico che si riscontra nei puledri affetti da PAS: l'organismo

risponde a questa condizione patologica diminuendo il metabolismo basale, così come avviene nell'Euthyroid Sick Syndrome, al fine di non disperdere ulteriore energia.

## 4 Approccio proteomico allo studio delle proteine del liquido amniotico nella specie equina

---

La composizione biologica del liquido amniotico si modifica durante il corso della gravidanza; il suo profilo proteico riflette le condizioni fisiologiche e patologiche della madre e del feto. I normali valori emato-biochimici non sono in grado di discriminare e di identificare molte delle patologie che si possono sviluppare durante la gestazione; il liquido amniotico è una potenziale e importante fonte di biomarkers di patologie fetali (Underwood et al., 2005). Perciò l'espressione di tali marker è studiata attivamente in medicina umana per patologie come la Sindrome di Down, la trisomia 13 e 18, le infezioni amniotiche, il parto prematuro, la pre-eclampsia, la rottura prematura delle membrane (PROM) e l'ipossia feto-placentare (Cho et al., 2007).

### 4.1 La proteomica

---

La proteomica è una disciplina molto complessa che, attraverso una combinazione di tecnologie, permette di separare e identificare tutte le proteine espresse da una cellula, da un tessuto o da un organismo (Anderson e Anderson, 1998; Hood et al., 2004). Questo approccio consente lo sviluppo di nuovi strumenti diagnostici, prognostici e terapeutici in diverse settori della medicina (Romero et al., 2006).

La variabilità nel contenuto proteico di una cellula, di un tessuto o di un organismo è da associare in generale a diverse possibili cause, quali cambiamenti dovuti a malattie, risposte a stimoli esterni oppure ai processi fisiologici che conducono a sviluppo e maturazione

l'organismo: a differenza del genoma che può essere considerato virtualmente stabile, il proteoma infatti cambia continuamente, in rapporto con lo stadio di sviluppo, la localizzazione tissutale specifica e le condizioni ambientali in cui si trova l'organismo. In tale ottica, è possibile correlare la presenza o l'assenza o il diverso livello di espressione di una proteina ad un determinato stato fisiologico oppure patologico (Gonzalez-Buitrago et al., 2008).

Le possibili applicazioni della proteomica sono vaste e spaziano dallo studio dei processi molecolari che si osservano in corso di malattia, allo sviluppo di nuovi biomarkers proteici specifici per determinate patologie. La definizione di proteomica clinica pubblicata sul *Proteomics - Clinical Applications* (Mischak et al., 2007) consiste “nell'applicazione delle tecniche proteomiche al campo della Medicina, allo scopo di risolvere un determinato quesito medico all'interno di uno studio clinico”. Sebbene per ora il principale approccio della proteomica clinica sia rivolto alla scoperta di nuovi biomarkers, tale disciplina comprenderà in futuro l'identificazione di nuovi target terapeutici, nuovi farmaci e nuovi vaccini, per migliorare il trattamento e la prevenzione di numerose patologie (Gonzalez-Buitrago et al., 2008).

Nel 2001 è stata creata l'Organizzazione del Proteoma Umano (HUPO), al fine di promuovere lo sviluppo della proteomica clinica e organizzare collaborazioni internazionali. In questi anni, la HUPO ha promosso diverse iniziative focalizzate sull'analisi proteomica del plasma sanguigno, dell'urina, del liquido cefalorachidiano, del liquido seminale, del liquido amniotico, del liquido sinoviale e del liquido di lavaggio bronco-alveolare (Hanash e Celis, 2002).



Negli ultimi 5 anni, le tecniche proteomiche per l'identificazione nel plasma materno e in altri fluidi biologici di biomarkers di anomalie fetali e disordini correlati alla gravidanza, hanno compiuto importanti passi in avanti. Attualmente, sono stati analizzati con successo numerosi fluidi biologici e tessuti fetali, alla ricerca di possibili marcatori di patologie correlate alla gravidanza; i campioni biologici più studiati sono il plasma materno, il liquido amniotico, il fluido cervico-vaginale, l'urina, la saliva, i trofoblasti placentari, le membrane amnio-coriali e il sangue cordonale.

La proteomica, inoltre, sta trovando un'importante applicazione nello studio e nella comprensione dei meccanismi biomolecolari coinvolti nelle varie fasi della gravidanza (Choolani et al., 2009).

## 4.2 Funzione e composizione del liquido amniotico

---

Il liquido amniotico è un fluido protettivo contenuto all'interno del sacco amniotico. Protegge fisicamente e biologicamente il feto ed è un elemento essenziale per il suo sviluppo e la sua maturazione durante la gravidanza. Le membrane che compongono il sacco amniotico sono l'amnios e l'allantoide, due foglietti strettamente uniti e costituiti da diversi tipi di cellule (mesenchimali, epiteliali e trofoblastiche incorporate in una matrice di collagene).

L'amnios è composto da 5 strati: epitelio, membrana basale, strato compatto, strato fibroblastico e strato spongioso. Il corion è costituito da strato reticolare, membrana basale e strato trofoblastico. Le cellule dei vari strati del corion e dell'amnios secernono proteine nel liquido amniotico (Parry, 1998).

In medicina umana è stato evidenziato che all'inizio dell'embriogenesi il liquido amniotico è formato solamente da un filtrato plasmatico materno che si diffonde attraverso le membrane fetali. Successivamente, tra la decima e la ventesima settimana di gestazione la composizione del liquido amniotico diventa più simile a quella del plasma fetale, a seguito del libero scambio bidirezionale tra liquido amniotico e feto attraverso la pelle fetale (prima che avvenga la cheratinizzazione), la placenta e il cordone ombelicale; vi sarà inoltre urina fetale, in seguito a sviluppo renale, secrezioni nasofaringee, orali e lacrimali (Moore e Persaud, 2003; Underwood et al., 2005). Il liquido amniotico è per il 98% costituito da acqua e per il restante 2% da elettroliti, proteine, peptidi, carboidrati, lipidi, ormoni ed enzimi (Liberatori et al., 1997). Oltre a questi componenti, Underwood e collaboratori (2005) hanno evidenziato la presenza di aminoacidi (taurina, glutamina e arginina), di fattori di crescita (epidermal growth factor, transforming growth factor  $\alpha$  e  $\beta$ -1 e insulin growth factor), di metaboliti (acido urico) e di citochine.

Un aumento di elettroliti ed enzimi è normale con l'avanzare dell'età gestazionale a seguito della maturazione degli organi interni e quindi delle loro secrezioni. Nella donna, nel secondo trimestre di gestazione le proteine presenti in maggior quantità nel liquido amniotico sono albumina, transferrina e IgG. Queste proteine sono deglutite e digerite dal feto, costituendo una preziosa fonte nutrizionale per la sua crescita e il suo sviluppo (Ross e Brace, 2001). La deglutizione fetale rappresenta il principale meccanismo di clearance delle proteine del liquido amniotico e la sua assenza è stata associata a Intrauterine Growth Restriction - IUGR in tutte le specie animali (Buchmiller et al., 1993) e nell'uomo (Ross e Brace, 2001).

Nella cavalla, il liquido amniotico è debolmente alcalino, e contiene diverse sostanze (acido lattico, glucosio, urea, acido urico e materiale in sospensione come cellule desquamate, ferro, enzimi, ecc), che si formano per accumulo di urina fetale, di secrezione delle ghiandole salivari e delle vie aeree e per interscambio di acqua tra la circolazione materna e quella fetale; il liquido amniotico viene continuamente rinnovato in poche ore per l'attività delle cellule dell'epitelio amniotico, in parte deglutito dal feto e quindi riassorbito ed in parte giunge fino alla mucosa uterina passando attraverso le varie membrane che avvolgono il feto (Veggetti, 1987). Inizialmente si presenta chiaro e trasparente, ma verso fine gravidanza diventa citrino, viscoso e più o meno torbido (Barone, 1994); col progredire della gravidanza aumenta la concentrazione delle secrezioni respiratorie, motivo per cui la composizione del liquido stesso cambia diventando mucoide (Asbury e LeBlanc, 1993). Nella cavalla a fine gestazione il volume di liquido amniotico oscilla tra i 3 e i 5 litri ed è quindi inferiore al volume di liquido allantoideo, che varia da 8 a 15 litri, ma durante la gravidanza si hanno delle variazioni nel rapporto tra i due fluidi. All'interno del liquido amniotico sono spesso presenti peli e frammenti di podofilla disgregatasi dallo zoccolo non ancora corneificato (Whitwell e Jeffcott, 1975). Il liquido amniotico rappresenta un mezzo per gli scambi di acqua tra la madre e il feto, il quale è in grado di richiamare acqua deglutendo o introducendo nei polmoni il liquido mediante i movimenti respiratori (Asbury e LeBlanc, 1993).

In tutte le specie, le funzioni principali del liquido amniotico sono di mantenere idratato l'embrione e di proteggerlo dagli shock termici, traumatici e compressivi (Aguggini et al., 1998) e di permettergli il

movimento e la crescita. Nell'uomo, inoltre, è stato evidenziato anche un ruolo difensivo dovuto alla presenza di immunoglobuline e di peptidi con effetto antimicrobico e antifungino (Tong et al., 2009).

## 4.2.1 Proteomica del liquido amniotico

---

La concentrazione proteica nel liquido amniotico nella donna varia in rapporto all'epoca gestazionale, con un intervallo che va dai 2-17 mg/ml a inizio gravidanza ai 2-7 mg/ml a termine (Hanash e Celis, 2002). Prima dell'undicesima settimana di gestazione possono esserci livelli di proteine anche più bassi, pari a 0,2 mg/ml (Jauniaux, 1991). L'aumento avviene tra la dodicesima e la diciottesima settimana di gestazione (Jauniaux, 1994).

La concentrazione totale di proteine nel secondo trimestre di gestazione è di  $6.48 \pm 3.85$  mg/ml (Tsangaris, 2006). Tong e collaboratori (2009) hanno misurato una concentrazione proteica totale di proteine nella seconda e terza parte della gestazione pari a 4,9 g/L, risultando molto più bassa di quella del siero materno e di quello prelevato dal cordone ombelicale. Dopo la ventesima settimana si ha una diminuzione nella concentrazione di proteine nel liquido amniotico.

Recenti studi utilizzando differenti metodiche, hanno identificato nel proteoma fisiologico del liquido amniotico numerose proteine. Liberatori e collaboratori (1997) hanno individuato 31 proteine nella diciassettesima settimana di gestazione; Park e collaboratori (2006) ne hanno identificate 37; Michaels e collaboratori (2007) hanno individuato 96 proteine presenti solamente nel liquido amniotico e 69 comuni tra siero materno e liquido amniotico nel secondo trimestre di

gestazione; Tsangaris e collaboratori (2006) hanno riportato la mappa proteomica di 136 proteine; Nilsson e collaboratori (2004) ne hanno individuate 43 dalla quindicesima alla diciottesima settimana di gestazione; Queloz e collaboratori (2006) hanno comparato il profilo proteomico di un liquido amniotico fisiologico ottenuto in differenti stadi della gestazione identificando le proteine maggiormente presenti nelle prime settimane; Cho e collaboratori (2007) hanno riportato il profilo proteico del secondo trimestre di gestazione più completo, in cui sono comprese 1026 proteine tradotte da 842 geni differenti. In questa lista sono incluse molte delle proteine correntemente utilizzate come biomarkers di patologie legate alla gravidanza come parto prematuro, infezioni intra-amniotiche, anomalie cromosomiche e fetali. Studi successivi hanno analizzato il proteoma del liquido amniotico in corso di infiammazione-infezione, proponendo diversi marcatori specifici di parto prematuro su base infettiva (Vaudens et al., 2003; Gravett et al., 2004; Buhimischi et al., 2007).

## 4.3 Scopi del lavoro

---

In bibliografia non esistono studi riguardanti lo studio del profilo proteomico nel liquido amniotico nella specie equina.

Quindi, gli scopi del nostro lavoro sono stati:

- Determinazione qualitativa del profilo proteomico nel liquido amniotico di cavalle che hanno partorito puledri sani e di cavalle che hanno partorito puledri malati.
- Valutazione semiquantitativa delle proteine più abbondanti presenti nel liquido amniotico di puledri sani e di puledri malati.
- Confronto qualitativo e semiquantitativo tra i profili proteomici dei liquidi amniotici di puledri malati e sani.

## 4.4 Materiali e metodi

---

### 4.4.1 Selezione degli animali

---

Sono state incluse nello studio tutte le cavalle ricoverate presso l'Unità di Perinatologia Equina “Stefano Belluzzi” nel corso di tre stagioni riproduttive. Le fattrici sono state ricoverate a circa 310 giorni di gestazione e sono state tenute in osservazione per almeno 7 giorni dopo il parto. Le cavalle sono state alloggiare in ampi box con lettiera in paglia ed alimentate con fieno ad libitum e concentrati due volte al giorno; durante il giorno avevano accesso ai paddock esterni.

La popolazione è stata quindi suddivisa in due gruppi:

**Gruppo 1: sani** - tutti i puledri nati da fattrici sane con gravidanza fisiologica con un punteggio Apgar  $\geq 9$ , esame clinico ed esami collaterali nei limiti della norma durante tutto il periodo di ricovero e concentrazione sierica di IgG  $\geq 800$  mg/dL a 18 ore di vita.

**Gruppo 2: malati** - tutti i puledri nati da fattrici con gravidanza” a rischio”, da distocia o che richiedevano cure di II-III livello (Koterba et al.,1990).

I puledri sono stati successivamente distinti in base alla diagnosi secondo le seguenti definizioni:

*Sepsi* - isolamento di un patogeno dall'emocoltura, ottenuta con sangue prelevato sterilmente al momento del ricovero, da un sito di sospetta infezione o da un organo prelevato post-mortem.

*Shock settico*- presenza di setticemia, tachicardia (o bradicardia in paziente ipotermico - temperatura rettale  $<37,2$ ) con segni che indicano uno stato di ipoperfusione (come ipotensione -MAP $<60$  mm Hg-, diminuzione del polso periferico, alterato stato mentale, tempo di riempimento capillare diminuito o aumentato  $>2''$ -, estremità fredde, diminuzione dell'output urinario) e che non risponda alla fluido terapia (Levy et al 2003).

*Sindrome da Asfissia Perinatale (PAS)* – presenza di dati anamnestici e segni clinici specifici, in particolare neurologici riferibili ad encefalopatia ipossico-ischemica (HIE) (Knottenbelt et al., 2004) dopo aver escluso altre malattie neurologiche quali la meningite o il trauma. In questo gruppo sono stati inclusi puledri che all'anamnesi presentavano: distocia, red bag, alterazione dell'aspetto macroscopico della placenta e tipici segni clinici di possibile PAS tra cui riflesso di suzione assente o diminuito, disinteresse per la madre, ricerca anomala della mammella, disfagia, convulsioni, iper-reattività e debolezza associata ad un aumento delle creatininemia a meno di 24 ore di vita.

*Prematurità/dismaturità* – rispettivamente, puledri nati prima di 320 giorni di gestazione e puledri nati a termine, dopo 320 giorni, ma con caratteristiche fisiche di immaturità. Le due classi di puledri sono state comunque associate essendo identici sia l'approccio al paziente che la terapia (Knottenbelt et al., 2004).

A tutti i puledri malati è stato eseguito un esame clinico completo all'ammissione, il profilo ematobiochimico, l'emocoltura e la determinazione della concentrazione ematica di IgG dopo le 18 ore di



vita. I puledri sopravvissuti sono stati dimessi dall'unità. La distocia è stata definita come una fase espulsiva di durata superiore ai 30 minuti, risolta dall'intervento veterinario mediante parto vaginale assistito o controllato (Norton et al., 2007).

#### 4.4.2 Raccolta dei dati e determinazioni dei profili proteomici

---

Per ogni fattrice sono stati raccolti i seguenti dati: età e numero di gravidanze, durata della gravidanza (giorni), lunghezza della fase espulsiva (minuti), concentrazione di glucosio e lattato nel sangue venoso al momento del parto, presenza di distocia, presenza di alterazioni all'esame macroscopico degli invogli fetali (edema, aree diffuse di ipoplasia dei villi, aree di distacco placentare, peso ridotto o aumentato).

Il liquido amniotico è stato raccolto entro 5 minuti dalla comparsa del sacco amniotico dalla vulva, utilizzando una siringa sterile da 60 ml. Il campione è stato immediatamente portato in laboratorio e centrifugato a 2200 g per 10 minuti; il surnatante è stato suddiviso in diverse aliquote in provette di polipropilene da 10 ml; i campioni sono stati conservati a -80° C e analizzati entro 2 mesi dalla raccolta.

La procedura alla quale sono stati sottoposti i campioni è stata standardizzata come segue:

- centrifugazione 2200 g x 10';
- stoccaggio aliquote surnatante a -80°C;

- determinazione delle proteine totali del liquido amniotico con il metodo del biureto;
- elettroforesi su gel di poliacrilamide in tampone sodio-dodecil-solfato (SDS-PAGE).

## Determinazione delle proteine totali con il metodo del BIURETO

---

Per quantificare le proteine presenti nei liquidi amniotici è stato utilizzato il metodo del biureto (Kingsley, 1942; Weichselbaum, 1950). Il biureto sfrutta la capacità degli ioni rameici di legarsi a residui di due o più amminoacidi in ambiente alcalino contenente tartrato di potassio, determinando una colorazione blu-viola della soluzione direttamente proporzionale alla quantità di proteine presenti.

### *Protocollo*

- 200 microlitri di campione.
- 800 microlitri di reagente biureto.
- Attendere 30 minuti.
- Lettura allo spettrofotometro a 540 nm.

## Elettroforesi SDS-PAGE

---

Tutti i campioni di liquido amniotico sono stati sottoposti a frazionamento elettroforetico mediante sistema per elettroforesi NuPAGE® su gel di poliacrilammide in tampone neutro con sodio-dodecil-solfato (SDS).

Questa metodica sfrutta la capacità del detergente SDS di legarsi agli amminoacidi delle proteine denaturate, fornendo carica negativa netta a tutte le proteine presenti e permettendo così la loro separazione in base al peso molecolare (PM). Il protocollo di separazione elettroforetica delle proteine del liquido amniotico ha previsto l'utilizzo di gel a gradiente di concentrazione di acrilammide 4-12 % e tampone di corsa MES. Tutti i reagenti e i materiali usati sono Novex-Thermo Fisher Scientific™ (Rockford, USA).

*Reagenti e materiali:*

- gel di poliacrilammide 4-12%, con tampone MES (2-N-morpholino ethane sulfonic acid) e antiossidante.
- Cella per elettroforesi XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System.
- Colorante: blu di Coomassie, PageBlue™.

Principi della colorazione e sensibilità

La colorazione con blue di Coomassie sfrutta la capacità del colorante G-250 di legarsi ai residui basici e idrofobici delle proteine. Il Coomassie permette di rilevare 25 nanogrammi per banda fino ad un minimo di 8-10 nanogrammi. L'intensità del colore è proporzionale alla quantità di proteine presenti per banda.

*Protocollo:*

- per ciascun campione sono stati prelevati i microlitri necessari per caricare 20 µg di proteine;
- aggiunta di LDS sample buffer e agente riducente;
- denaturazione a 70°C per 10 min;

- corsa elettroforetica con applicazione di una corrente costante di 200 Volt per 40 minuti;
- colorazione con blu di Coomassie;
- acquisizione dei ferogrammi mediante programma ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

## Calcolo dei pesi molecolari delle proteine separate

I pesi molecolari apparenti delle proteine presenti nelle bande, separate con l'elettroforesi in SDS-PAGE, sono stati ricavati utilizzando l'equazione della retta di calibrazione basata sulla relazione lineare tra il logaritmo del peso molecolare delle proteine standard presenti nel marker e la distanza percorsa da tali bande sul gel, espressa in rapporto alla lunghezza del gel (ratio of the front o Rf).

### 4.4.3 Analisi statistica

I dati relativi alla concentrazione delle proteine totali nei due gruppi sono stati ottenuti con un'analisi statistica descrittiva e sono espressi come media  $\pm$ DS, mediana, minimo e massimo.

## 4.5 Risultati

---

Per questa prova sono stati utilizzati i liquidi amniotici di 29 cavalle: 15 hanno partorito puledri sani nati con un parto eutocico (Gruppo 1: n. 1-15) e 14 hanno partorito puledri malati (Gruppo 2: n. 16-29). Cinque cavalle del gruppo 2 hanno presentato un parto distocico: una distocia è stata risolta mediante parto vaginale controllato, 2 con parto vaginale assistito e 1 con parto cesareo d'emergenza e soppressione della fattrice. Nel Gruppo 2, 8 cavalle presentavano una gravidanza ad "alto rischio", individuata sulla base dei dati anamnestici e/o dei rilievi ecografici e per intervento chirurgico addominale. Sette puledri del Gruppo 2 presentavano segni clinici riferibili alla Sindrome da Asfissia Perinatale (PAS), 5 puledri presentavano Sepsi e PAS e 4 puledri sono nati da fattrici considerate a rischio e per questo trattate preventivamente con terapia tocolitica. Nel Gruppo 1, tutti i puledri (100%) sono stati dimessi. Nel Gruppo 2, 6/14 (42,8%) puledri sono morti e 8 (57,2%) sono stati dimessi.

### Valutazione della concentrazione delle proteine totali

---

La concentrazione delle proteine totali nel liquido amniotico dei puledri sani compresi nel Gruppo 1 è  $1,48 \pm 0,96$  mg/ml (media  $\pm$ DS) (mediana = 1,3 mg/dl; min = 0,36 mg/ml, max = 3,7 mg/ml).

Nel Gruppo 2, la concentrazione proteica è di  $2,39 \pm 1,12$  mg/ml (mediana = 2,21 mg/dl; min = 1,02 mg/ml, max = 4,47 mg/ml).

## Analisi qualitativa delle proteine del liquido amniotico

---

### Elettroforesi con SDS-PAGE

Sono stati analizzati 29 campioni di liquido amniotico e 4 sieri prelevati al momento del parto da una madre e dal rispettivo puledro del Gruppo 1 e da una madre e dal rispettivo puledro del Gruppo 2. Tutti questi campioni sono stati frazionati mediante elettroforesi in SDS-PAGE e i gel sono stati colorati con il blu di Coomassie.

### Calcolo dei pesi molecolari

L'elettroferogramma di ogni campione è stato comparato con quello dello standard per calcolare il peso molecolare (PM) delle bande proteiche, così da poter assegnare alle singole bande il corrispondente peso molecolare apparente espresso in kDa e ricavato dalla distanza percorsa dalla banda sul gel (rf) (Figura 4.1).

L'equazione della retta di calibrazione (Figura 4.2) che ci ha permesso di calcolare i pesi molecolari delle bande proteiche è basata sulla relazione lineare tra il logaritmo del peso molecolare ( $\log_{10}PM$ ) degli standard proteici e la distanza percorsa da tali bande sul gel (Rf).

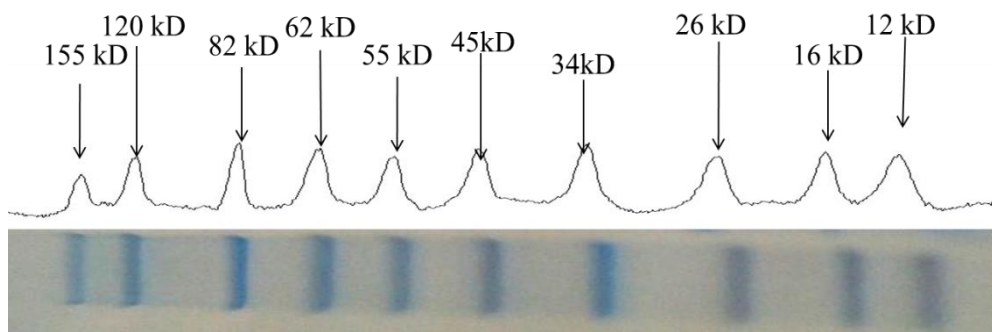


Figura 4.1 :Ferogramma con i pesi molecolari e gel dello standard dei pesi molecolari

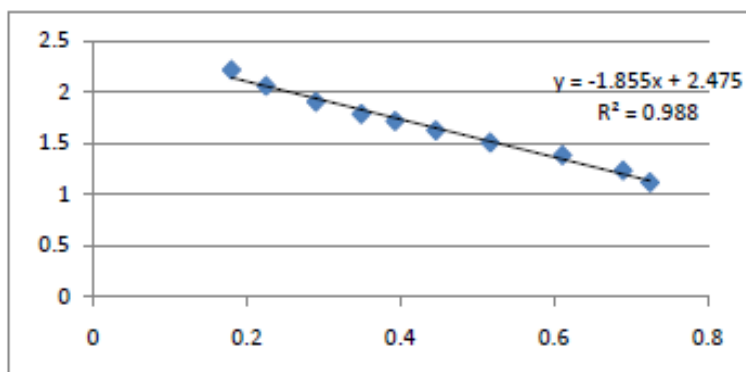


Figura 4.2. Retta di calibrazione ottenuta riportando il logaritmo del peso molecolare ( $\log_{10}PM$ ) delle bande del marker in funzione della distanza percorsa da tali bande nel gel ( $R_f$ ).

Le figure 4.3 e 4.4 mostrano come le bande proteiche presenti in ogni corsia siano state tradotte in un elettroferogramma che ha permesso una più facile identificazione delle differenti proteine. Ogni picco del ferogramma corrisponde a una banda proteica del gel; più la concentrazione della proteina è elevata, più la banda presenterà un colore blu intenso, più il picco espresso nel profilo sarà alto.

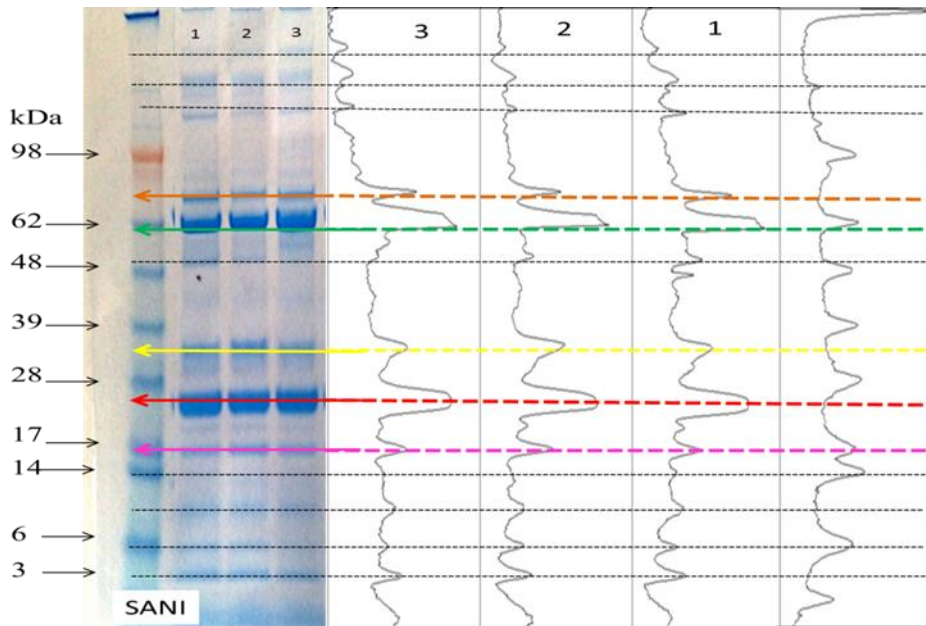


Figura 4.3: esempi di profili densitometrici di 3 campioni di liquido amniotico di puledri sani. Il ferogramma a destra fa riferimento al marker di pesi molecolari, che è presente nella prima corsia a sinistra nel gel. Le linee colorate identificano le bande che presentano meno variabilità e una maggiore intensità; le linee tratteggiate rappresentano i picchi comuni.

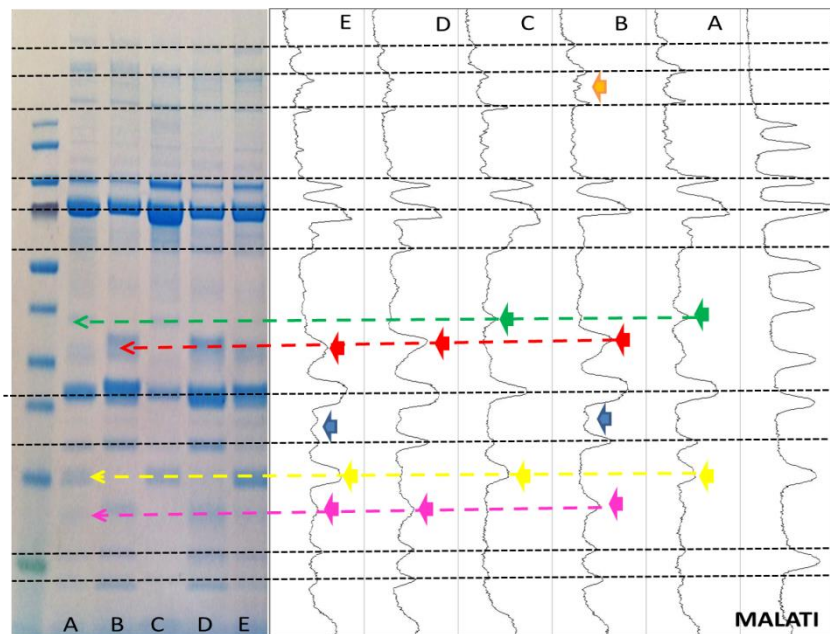


Figura 4.4: esempi di profili densitometrici di 5 campioni di liquido amniotico di puledri malati; il ferogramma a destra fa riferimento al marker di pesi molecolari, che è presente nella prima corsia a sinistra nel gel. Le frecce indicano differenze tra puledri malati, per quanto riguarda la stessa banda.



Per valutare in maniera più adeguata le differenze presenti nel proteoma del liquido amniotico di puledri sani e malati e per calcolare il numero di bande presenti nei due gruppi, il profilo elettroforetico è stato diviso in 4 zone in base ai pesi molecolari: >100 kDa, 100-62 kDa, 62-12 kDa, <12 kDa (Figura 4.5).

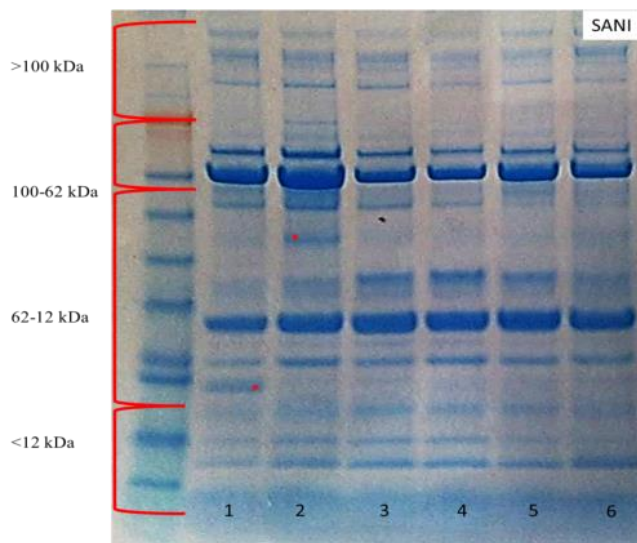


Figura 4.5: a titolo di esempio si riporta un gel con la divisione in 4 zone in base ai PM (>100 kDa, 100-62 kDa, 62-12 kDa, <12 kDa)

### Gruppo 1

I liquidi amniotici dei puledri sani (puledri n. 1-15) (figura 4.6 e figura 4.3) si presentano omogenei sia per il peso molecolare che per l'intensità. Sono presenti in media 16 bande, con alcune variazioni nel numero di bande nelle 4 zone a differente PM. Nella zona di pesi molecolari >100 kDa, le bande rilevate variano da 7 a 5: tre bande molto evidenti con PM >165e altre più deboli tra 90 e 160 kDa. Nella zona di PM compresa tra 62 e 100 kDa sono risultate 2 le bande ben evidenti: una banda sottile ma molto intensa con peso molecolare apparente di 80-85kDa e un'altra

banda molto più spessa e densa di circa 67 kDa; alcuni campioni presentavano una sottile banda intermedia. Tra 62 e 12 kDa è stato evidenziata la maggior variabilità; il numero di bande oscilla tra 4 e 5 ma con alcune differenze interindividuali; ad esempio, il puledro 1 e il 9 presentano una banda di peso molecolare di 15kDa non riscontrata negli altri, il campione 2 ha una banda di 42 kDa e il campione 12 una banda di 20 kDa. Nella quarta zona, quella con PM <12 kDa, le bande osservabili sono risultate 4 in tutti i campioni.

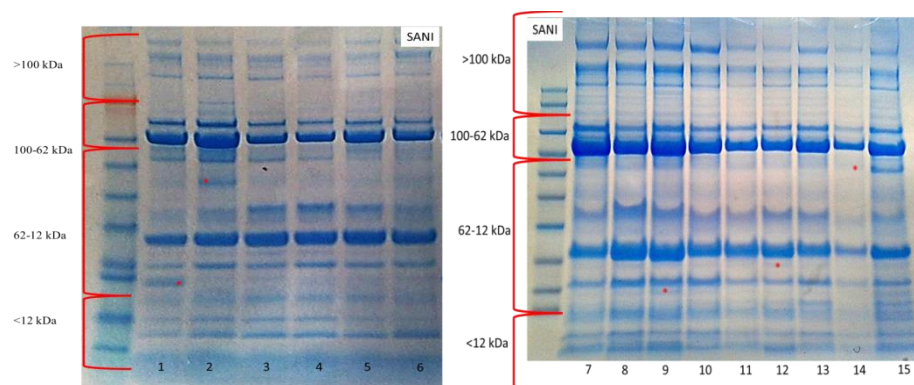


Figura 4.6: gel di tutti i campioni del Gruppo 1 contraddistinti con i numeri da 1 a 15 e con la divisione in 4 zone in base ai PM (>100 kDa, 100-62 kDa, 62-12 kDa, <12 kDa)

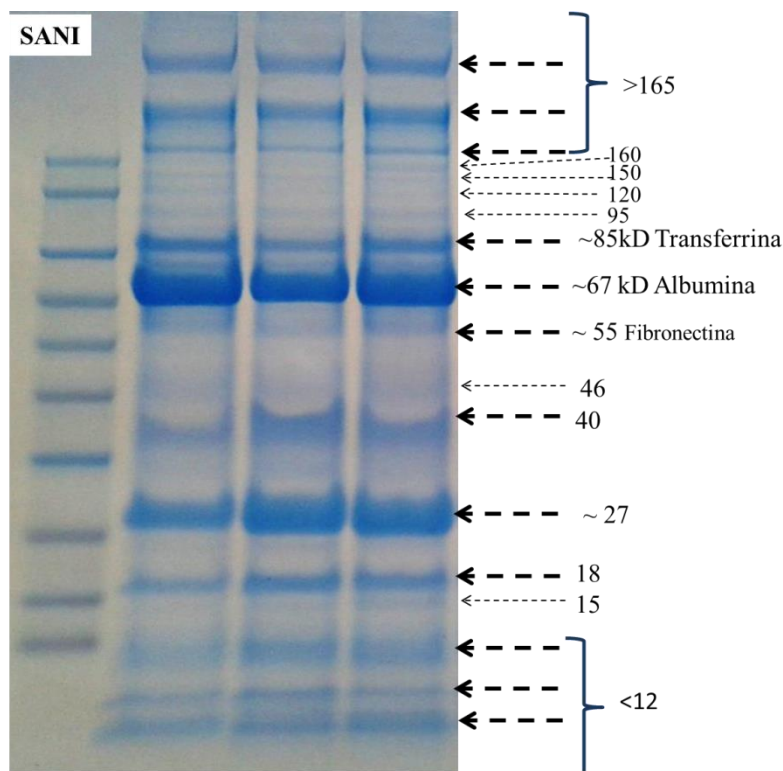


Figura 4.7: a titolo di esempio si riportano tre campioni rappresentativi del Gruppo 1 con la descrizione dei pesi molecolari apparenti delle bande proteiche. Le frecce più grandi indicano le bande più intense ed evidenti. In corsia 1 è riportato lo standard di pesi molecolari.

Tabella 4.1: sono riportati i numeri medi e il totale di bande nelle 4 zone a peso molecolare differente, >100 kDa, 100-62 kDa, 62-12 kDa, <12 kDa nel Gruppo 1 e nel Gruppo 2.

<b>Zone dei PM</b>	<b>Numero bande Gruppo 1 (media)</b>	<b>Numero bande Gruppo 2 (media)</b>
<b>&gt;100 kDa</b>	6	4
<b>100-62 kDa</b>	2	2
<b>62-12 kDa</b>	4	6
<b>&lt;12 kDa</b>	4	1
<b>TOTALE</b>	<b>16</b>	<b>13</b>

## **Gruppo 2**

Nei liquidi amniotici dei puledri malati (puledri n. 16-29) è stata evidenziata una notevole variabilità e solo alcune bande sono presenti in tutti i campioni (Figura 4.4-Figura 4.8-Figura 4.10).

Sono presenti in media 13 bande con notevoli variazioni tra i diversi campioni, nelle 4 zone a differente PM. Nella zona con peso molecolare >100 kDa sono risultate molto evidenti 3 bande comuni a tutti i campioni anche se con intensità differente; una quarta banda dello stesso peso (90 kDa) è risultata visibile anche se meno intensa nei campioni 18 e 20; i campioni 25, 27 e 29 presentavano una quarta banda ad un PM maggiore dei precedenti e il puledro 27 ha presentato anche una quinta banda di PM ancora maggiore.

Tra 100 e 62 kDa, analogamente ai puledri sani, sono evidenti solo 2 bande. La terza zona, quella compresa tra 62 e 12 kDa presentava la maggior variabilità. Alcuni campioni presentavano soltanto 3 bande mentre in altri erano visibili fino a 8 bande; la differenza è evidente anche nell'intensità e nei pesi molecolari delle bande stesse, come si può notare nella Figura 4.10. Nella zona con pesi <12 kDa la maggior parte dei campioni presentava 2 bande ad eccezione del 19 che non ne presentava e i campioni 23-25 e 27 in cui sono meno intense.

Tutti i puledri affetti da PAS e sepsi, eccetto il campione 23, e i campioni 20 e 22, presentavano un profilo elettroforetico simile per il numero di bande, il rispettivo PM e l'intensità delle stesse. Il liquido amniotico 19 presenta bande più deboli su tutto il profilo elettroforetico.

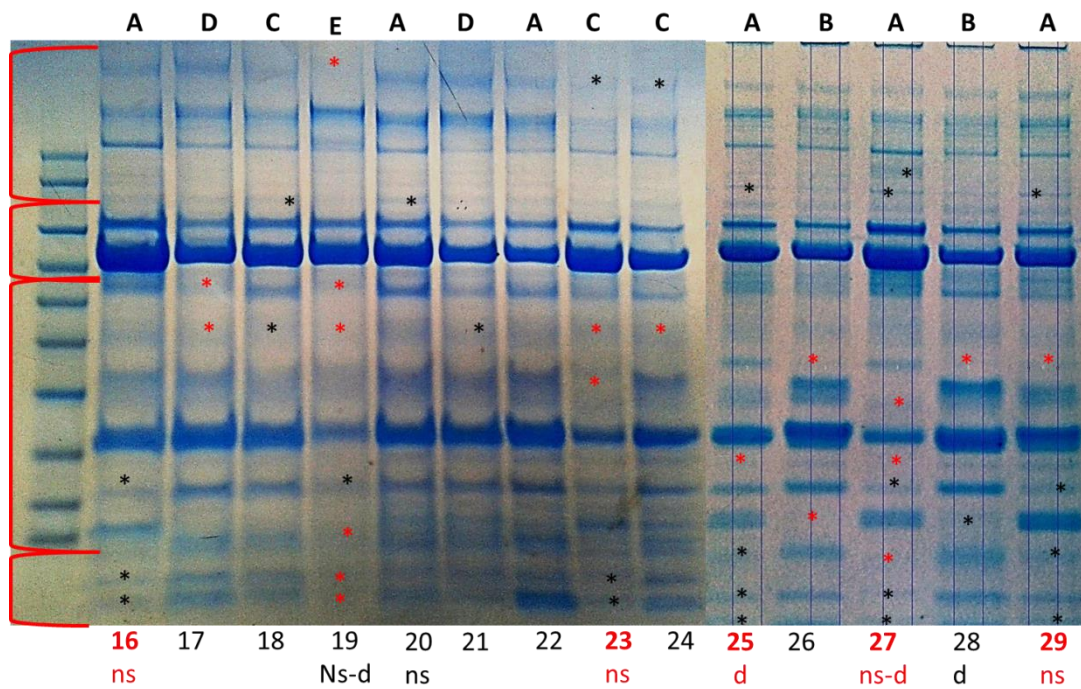


Figura 4.8: sono riportati tutti i profili elettroforetici dei puledri malati (16-29); i campioni che presentano un profilo simile sono stati contraddistinti con la stessa lettera (A-B-C-D); i campioni contrassegnati con il numero in rosso sono i puledri affetti da PAS e sepsi, quelli in nero solamente da PAS; *ns*, non sopravvissuti; *d*, distocia; \* bande di debole intensità; \* bande non presenti.

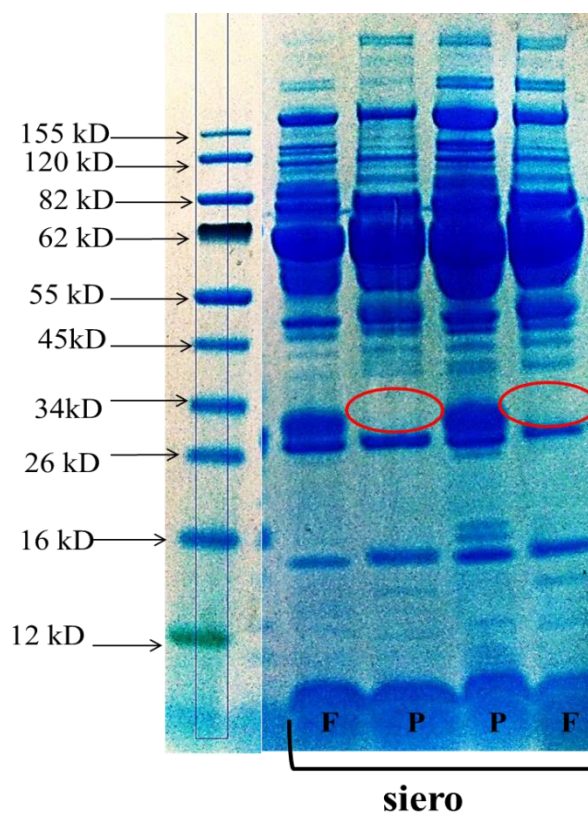


Figura 4.9: sieri di 2 fattrice (F) e dei rispettivi puledri (P), i cerchi rossi evidenziano la banda mancante nel siero dei puledri.

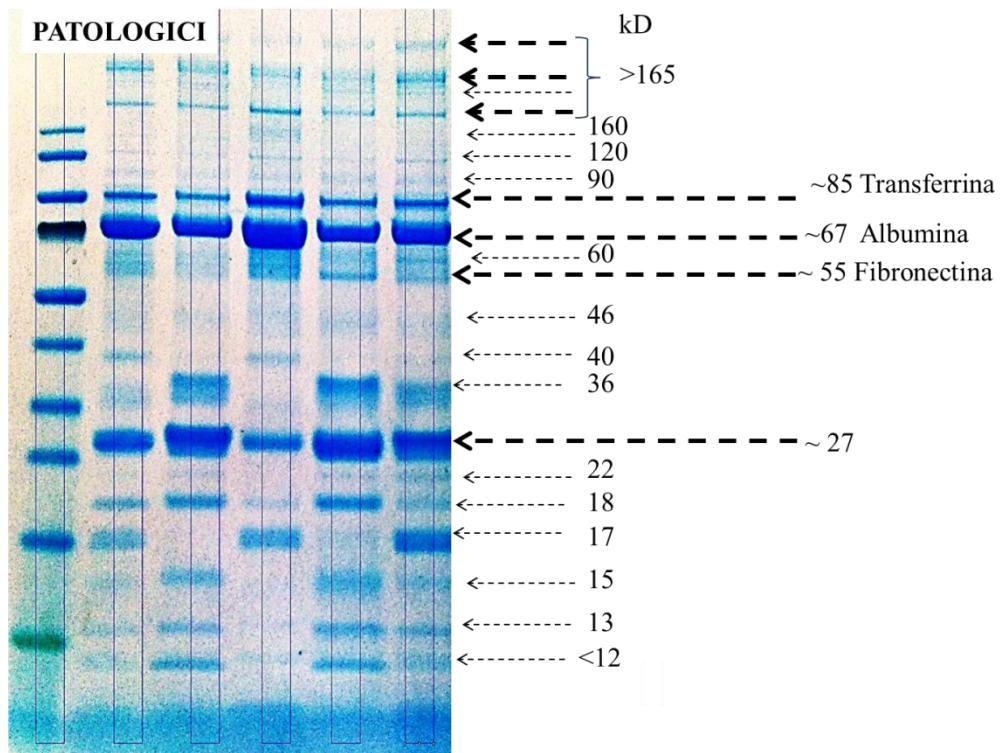


Figura 4.10: immagine di un gel di 5 campioni del Gruppo 2 e dello standard con i rispettivi PM apparenti delle bande presenti. Le frecce grandi indicano le bande più intense e presenti in tutti i campioni; le frecce piccole indicano le bande variabili tra i diversi campioni.

## 4.6 Discussione e Conclusione

---

La proteomica è attualmente considerata in medicina umana un potente strumento diagnostico. Le tecniche proteomiche sono state infatti applicate alla ricerca di biomarkers e alla definizione di profili proteici; sono molto utili per emettere una prognosi, nella diagnosi precoce e nel trattamento adeguato delle patologie. Grazie, infatti, ai significativi miglioramenti nelle tecnologie alla base della separazione e dell'identificazione delle proteine per l'individuazione di nuovi biomarcatori, la proteomica è diventata una delle più promettenti e innovative applicazioni in ambito clinico (Buhimischi et al., 2007)

Il liquido amniotico è una complessa miscela di molecole, che riflette lo stato fisiologico del feto in via di sviluppo. Inizialmente, la sua composizione è simile al plasma materno e poi si modifica col progredire della gravidanza e il suo profilo proteico riflette anche il genotipo del feto. Analizzando quindi la composizione del liquido amniotico, si possono ottenere informazioni molto utili riguardo allo stato di salute fetale (Perluigi et al., 2009).

Convenzionalmente il liquido amniotico è utilizzato in medicina umana per fare diagnosi prenatali, mentre in medicina veterinaria è una matrice ancora poco studiata, nonostante possa costituire una fonte importante di biomarcatori clinici. Probabilmente, nel cavallo, il rischio elevato nella procedura dell'amniocentesi, a causa della tipologia di placentazione, oltre alla difficoltà di prelievo durante il parto a causa della gestione del paziente e della difficoltà di determinare il momento esatto del parto, possono essere i motivi principali per i quali il liquido amniotico non viene comunemente prelevato. Il nostro lavoro, sebbene preliminare, rappresenta quindi il

primo approccio allo studio del proteoma del liquido amniotico del cavallo.

***Concentrazione delle proteine totali:*** questo valore è più elevato nei liquidi amniotici di puledri malati rispetto a quelli sani. Alcuni autori riportano una concentrazione di proteine totali (TP) nel liquido amniotico di fattrici sane pari a  $35.8 \pm 9.79$ ,  $51.9 \pm 11.0$  e  $30.7 \pm 10.93$  mg/dL in tre momenti della gravidanza in base all'età gestazionale, evidenziando una diminuzione della concentrazione delle proteine totali nella seconda e terza parte della gravidanza (Zanella et al., 2013). Kochhar e collaboratori (1995) hanno determinato la concentrazione proteica in cavalle con parto normale ( $0.91 \pm 0.2$ mg/dl) e distocico ( $0.97 \pm 0.37$ mg/dl). Nella pecora alcuni autori hanno evidenziato un aumento nella concentrazione proteica a fine gestazione (Chalhoub et al., 2001; Anitha e Thangavel, 2011) mentre Khadjeh e collaboratori (2007) hanno notato invece una diminuzione, , in accordo con Reddy e collaboratori (1995), i quali ipotizzano che una bassa concentrazione di proteine nel liquido amniotico possa essere attribuita all'assenza di fibrinogeno e di altre proteine a causa dell'imaturità del fegato fetale. Prestes e collaboratori (2001) nella pecora hanno invece evidenziato un aumento di proteine totali con il progredire della gravidanza (0.14, 0.23 e 0.24 g/dl). In medicina umana è stato riportato che all'inizio della gravidanza la composizione proteica è simile a quella del siero materno, anche se la concentrazione è più bassa; i valori aumenteranno dalla settima alla ventesima settimana, per poi calare gradualmente verso fine gestazione con una concentrazione che oscilla tra 0,5 e 9,5 g/L (Gao et al., 2009).



*Caratterizzazione del proteoma del liquido amniotico:* nelle cavalle che hanno partorito puledri sani (Gruppo 1), i profili elettroforetici si presentano omogenei sia qualitativamente che quantitativamente. Tra le bande comuni a tutti i ferogrammi, quelle di PM pari a 85 kDa e 67 kDa possono essere identificate rispettivamente con la transferrina e l'albumina in base al loro peso molecolare e al confronto con quanto riportato in medicina umana. L'albumina è la proteina più abbondante nel siero dei mammiferi e anche nel liquido amniotico di donna rappresenta il 70% delle proteine totali, mentre la seconda frazione più abbondante è costituita dalle immunoglobuline (Ross e Brace, 2001; Cho et al., 2007; Gao et al., 2008). Per quanto riguarda la transferrina, Gao e collaboratori (2008) hanno riscontrato che un aumento nella concentrazione della transferrina nel liquido amniotico può costituire un utile indice prognostico di parto prematuro, poiché un eventuale oligoidroamnios causato da una diminuzione nella perfusione placentare fa aumentare la concentrazione proteica amniotica e di conseguenza vi sarà anche un aumento della transferrina. Inoltre, l'anemia per deficit di ferro nella madre provoca una diminuzione nel trasporto di ossigeno dalla placenta al feto come pure una carenza fetale di ferro, causando anemia nel feto e aumento della transferrina amniotica.

peso molecolare apparente simile a quello delle catene leggere degli anticorpi (27 kDa), tuttavia i puledri nascono privi di difese immunitarie a causa dello scarso passaggio di immunoglobuline (Ig) attraverso la placenta. I puledri, che sono immunocompetenti, saranno in grado di produrre Ig proprie nel momento in cui verranno in contatto con l'antigene, anche se una concentrazione protettiva di immunoglobuline non può essere raggiunta prima dei due mesi di età.

Perciò l'immunità dei puledri neonati dipende quasi esclusivamente dall'assunzione e di anticorpi materni introdotti con il colostro nelle prime ore di vita (McClure, 1990). Per tentare di formulare ipotesi sulla natura della banda a 27 kDa, abbiamo analizzato anche sieri di 2 fattrici e dei rispettivi puledri prelevati al momento del parto, quindi prima dell'assunzione del colostro. Si può notare dall'immagine 4.9 che le bande che presumibilmente corrispondono alle catene leggere delle immunoglobuline, presenti in altri mammiferi e nell'uomo (Cho et al., 2007; Marques et al., 2011) mancano nel siero dei puledri prima dell'assunzione del colostro, mentre sono presenti nel siero delle fattrici. Quindi, la banda molto evidente presente nei nostri gel, che inoltre corrisponde ad un peso molecolare di poco superiore (PM apparente di circa 27 kDa) rispetto alla banda corrispondente alle catene leggere degli anticorpi (25 kDa) dovrebbe fare riferimento ad una o più proteine diverse dalla catene leggere.

Per quanto riguarda la banda di PM di circa 55/57 kDa (sottile banda sotto a quella dell'albumina) potrebbe essere fibronectina, proteina presente nel liquido amniotico umano (Cho et al., 2007; Marques et al., 2011).

Altre proteine identificate nel liquido amniotico della donna sono: complemento C3 (85 kDa), antitripsina (47 kDa), ceruloplasmina (120 kDa),  $\alpha$ -fetoproteina (68 kDa) che è presente nel plasma fetale con un picco tra la dodicesima e la sedicesima settimana di gestazione per poi calare con l'avanzare della gravidanza, attivina A (47 kDa), apolipoproteine (30 kDa), vitamin D-binding protein (53 kDa), periostina (90 kDa), antitrombina-III (53 kDa),  $\alpha$ 1-microglobulina (39 kDa) (Cho et al., 2007). Gao e collaboratori (2009) hanno identificato tramite elettroforesi capillare 8 picchi presenti nell'elettroferogramma

di liquido amniotico prelevato tramite amniocentesi tra la 15 e la 18 settimana di gestazione. Il primo picco da loro identificato rappresenta la tiamina o vitamina B, seguito da un picco elevato che è quello delle IgG e da uno meno evidente relativo alla transferrina, uno molto alto che rappresenta l'albumina seguito dall'acido urico (Gao, 2009).

Nei liquidi amniotici di fattrici che hanno partorito puledri malati la variabilità è maggiore sia da un punto di vista quantitativo che qualitativo. Le differenze si riscontrano in tutte le zone di peso molecolare, con una variabilità più evidente soprattutto nelle zone >100 kDa e da 62 a 12 kDa. Le bande sempre evidenti ed identificabili sono le ipotetiche transferrina, albumina, fibronectina e la banda di PM 27 kDa. Un riscontro interessante si ottiene confrontando i profili elettroforetici dei puledri affetti da PAS e sepsi, che presentano un profilo molto sovrapponibile tra di loro sia nel numero, nell'intensità e nel peso molecolare delle bande riscontrate. Alcuni autori hanno evidenziato che la proteomica del liquido amniotico rivela nell'uomo un profilo proteico caratteristico nelle infiammazioni intramniotiche (Buhimschi et al., 2005).

In conclusione, il protocollo di elettroforesi in SDS-PAGE da noi messo a punto ha permesso di separare le più importanti frazioni proteiche del liquido amniotico di cavallo, mettendo in evidenza similitudini e differenze qualitative e quantitative nei ferogrammi. Alcune bande sono presenti in tutti i campioni, ad esempio la banda con peso molecolare apparente di 65-67 kDa che potrebbe corrispondere verosimilmente all'albumina. Una maggiore variabilità è stata riscontrata nei profili dei liquidi amniotici dei

puledri malati ed è tra queste proteine espresse in modo differente che si potranno forse in futuro individuare nuovi biomarcatori clinici.

## 5 Determinazione dello stress ossidativo nel puledro affetto da PAS

---

Lo stress ossidativo gioca un ruolo importante nella mortalità perinatale del puledro. Nonostante la gravità dei danni ossidativi causati dai radicali liberi e la sua associazione ad una prognosi sfavorevole nei pazienti critici siano evidentemente riconosciute in medicina umana, studi condotti sull'evidenza terapeutica dell'uso di antiossidanti nel trattamento di questi stati patologici sono ancora scarsi. L'integrazione terapeutica con agenti antiradicalici ha messo in evidenza il miglioramento della capacità antiossidante dell'organismo, ma ad oggi i benefici clinici non sono ancora stati accertati. Il glutathione è un antiossidante endogeno che interviene nella neutralizzazione dei radicali liberi in caso di stress ossidativo ed è considerato uno dei biomarkers più attendibili.

### 5.1 Lo stress ossidativo nella PAS

---

Lo Stress Ossidativo è una particolare condizione che deriva dallo squilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (reactive oxygen species-ROS) e la capacità dei meccanismi protettivi dell'organismo di renderle inattive (antiossidanti endogeni) (Sies, 1991). Gli organismi aerobi producono energia partendo dall'ossidazione di substrati organici. Durante il normale processo di respirazione cellulare può accadere che l'ossigeno sia ridotto parzialmente, determinando la produzione di piccole quantità di radicale superossido (Frei, 1994; Gutteridge e Mitchell, 1999). Un

radicale libero è dunque una qualsiasi specie chimica che contiene uno o più elettroni spaiati. Oltre al radicale superossido, per successive riduzioni dell'ossigeno si possono formare perossido di idrogeno e radicale idrossile; questi tre tipi di derivati dell'ossigeno vengono chiamati ROS (Reactive Oxygen Species). La reattività chimica di questi composti li rende potenzialmente pericolosi in quanto attaccano vari substrati come lipidi, proteine e acidi nucleici (Mayne, 2003). Tuttavia, il radicale superossido in particolare, a livelli moderati, svolge un importante ruolo come mediatore in molti processi cellulari, ad esempio la regolazione del tono vascolare, il monitoraggio della tensione dell'ossigeno nel controllo della ventilazione, la produzione di eritropoietina, la trasmissione di segnali chimici in vari processi fisiologici, inoltre coadiuva i macrofagi e i neutrofili nell'uccisione e nella fagocitosi dei batteri patogeni (Mandelker, 2008). Sulla base di queste considerazioni, appare chiaro che lo stress ossidativo deriva da un accumulo di ROS dovuto sia ad aumentata produzione sia ad un'incapacità di neutralizzare queste molecole da parte degli antiossidanti (Djordjevic, 2004). Comuni cause di stress ossidativo includono tossiemia, infezioni, ipossia-ischemia, iperproteinemia, tumori, infiammazione (Mandelker, 2008) e shock circolatorio (Biasi, et al., 1994). In tutte queste situazioni di stress, viene messo in atto dall'organismo un sistema di difesa detto "scavenger system" nel quale gli antiossidanti endogeni agiscono in vari modi: rimuovendo le molecole di ossigeno, neutralizzando i ROS o i loro precursori, inibendo la loro formazione e aumentando le difese antiossidanti endogene (Halliwell, 1997).

Per antiossidante intendiamo "qualsiasi sostanza che, presente in concentrazione molto bassa rispetto a quella di un substrato ossidabile,

è in grado di ritardare o inibire significativamente l'ossidazione di quel substrato" (Halliwell e Gutteridge, 1989).

Per contrastare l'azione dei ROS, l'organismo ha a disposizione una serie di meccanismi enzimatici o non-enzimatici di difesa:

- ✓ enzimatici: superossido dismutasi (SOD), catalasi, glutazione perossidasi/riduttasi/s-transferasi, tireodossina reduttasi e eme reduttasi; molti oligoelementi essenziali, tra cui selenio, rame, manganese e zinco sono coinvolti nella struttura molecolare o nell'attività catalitica di questi enzimi.
- ✓ non-enzimatici: proteine (albumina, ferritina, transferrina, lattoferrina, ceruloplasmina e tioreodossina), molecole a basso peso molecolare (glutazione, bilirubina, tocoferolo, carotenoidi, ubiquinolo e ubiquinone, ascorbato, cisteina e urato) (Tsukahara, 2007).

L'alimentazione svolge un ruolo fondamentale nel mantenere l'efficacia delle difese enzimatiche antiossidanti.

## Patologie che causano stress ossidativo nel neonato umano

---

Il neonato è particolarmente predisposto al rischio di danno ossidativo, in conseguenza sia della maggiore produzione postnatale di specie reattive dell'ossigeno, sia dell'incapacità dei sistemi di protezione di limitare i danni da loro indotti. La nascita, comportando il passaggio da uno stato di ossigenazione fetale ( $\text{PaO}_2$  30-40 mmHg) ad uno di tipo neonatale ( $\text{PaO}_2$  60-70 mmHg), favorisce la formazione di Radicali Liberi (RL) in quantità tali da sovrastare le capacità di detossificazione ancora immature. La ridotta capacità dei sistemi

antiossidanti rende ancora più vulnerabile il neonato pre-termine, per l'accentuata scarsità di sistemi di protezione enzimatica, che giungono fisiologicamente a maturazione con il procedere della gestazione (Frank e Sosenko, 1987). Come riscontrato da molti autori (Gutteridge e Stocks, 1981; Sullivan e Newton, 1988), il plasma neonatale presenta un'attività antiossidante molto più bassa rispetto a quella dell'adulto, ha un profilo antiradicalico che presenta bassi livelli di glutazione, glutazione-perossidasi, superossido-dismutasi,  $\beta$ -carotene, riboflavina,  $\alpha$ -proteinasi, vitamina E, selenio, rame, zinco, ceruloplasmina, Tf e altri fattori plasmatici (Buonocore et al., 2001). La tossicità dei RL, nel neonato, coinvolge meccanismi complessi caratterizzati da una serie di reazioni difficilmente arrestabili, che, una volta innescate, si propagano a catena.

Il cervello del feto a termine è altresì a rischio, perché possiede oligodendrociti con sistemi di valida captazione del ferro e recettori NMDA sufficientemente maturi, oltre ad una maggiore disponibilità di substrati perossidabili a livello di SNC (acidi grassi insaturi), tali da agevolare la progressione della catena di eventi metabolici che portano alla generazione e al danno da RL (Mishra, 1992; Torbati, 1993; Ozawa, 1994).

I neonati malati, inoltre, risentono ancora di più dei danni ossidativi, proprio a causa della loro incapacità di difendersi da questi insulti. L'aumento dello stress ossidativo gioca un importante ruolo nella patogenesi di molte malattie neonatali: ipossia-asfissia e danni da ri-perfusione (encefalopatia ipossico-ischemica), sindrome da stress respiratorio, shock circolatorio, sepsi e shock settico, infiammazione (SIRS), prematurità e in tutti quei casi in cui il paziente sia in uno stato critico (Tsukahara, 2007).



## Patologie che causano stress ossidativo nel puledro

La neonatologia equina è un settore di studio in continua evoluzione e ricerca. La comprensione dei meccanismi fetali e neonatali sia fisiologici che patologici è in continua crescita, così come l'interesse nei confronti dell'approccio terapeutico. Le prime ore di vita del puledro sono fondamentali per un fisiologico adattamento alla vita extrauterina. Per prevenire le principali patologie neonatali, è importante assistere adeguatamente il puledro subito dopo la nascita, soprattutto perché le sue condizioni generali possono peggiorare molto rapidamente, in particolare durante la prima settimana di vita, e per evitare l'insorgenza di patologie gravi, è necessario un monitoraggio continuo e particolarmente attento. Le tre più comuni condizioni patologiche che vengono riscontrate nei puledri neonati, sono la Sindrome da Asfissia Perinatale (PAS), la setticemia, la prematurità/dismaturità e lo shock (Vaala, 2000). La Sindrome da Asfissia Perinatale è causata dalla combinazione di ipossia-ischemia-riperfusion e da una sintomatologia variabile in base alla durata e all'intensità dell'insulto e al tipo di organo maggiormente colpito, la sua patogenesi è molto complessa (vedi paragrafo 1.1 Patogenesi). L'ipossia, ma soprattutto la riperfusion, determinano nei tessuti una modificazione dello stato redox delle macromolecole con formazione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), rilasciati proprio nella fase di riperfusion ematica. I radicali liberi causano la perossidazione dei fosfolipidi di membrana, con conseguente rottura della stessa e morte cellulare. Il cervello è molto suscettibile al danno ossidativo, poiché contiene basse concentrazioni di antiossidanti endogeni ed elevate concentrazioni di acidi grassi polinsaturi, facilmente soggetti a

perossidazione lipidica. Gli acidi grassi polinsaturi, nei sistemi biologici, sono infatti fra le principali molecole soggette all'attacco dei radicali e la conseguente perossidazione può essere valutata attraverso la misura dei prodotti di degradazione generati dai ROS o dalla concentrazione dei "radical scavenger" (Lepage et al., 1991; Vaala, 1999; Calvert e Zhang, 2005; Kumar et al. 2008; Wong, 2011).

## 5.2 Funzione del Glutatione

---

Il glutatione ( $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH), un tripeptide contenente un gruppo sulfidrilico, che può reagire con i radicali superossido e idrossile (Saugstad, 2005) è probabilmente il più abbondante antiossidante presente nell'organismo, anche se nei neonati, specialmente nei prematuri, la sua disponibilità è limitata (Saugstad, 2005). Diversi lavori scientifici indicano come il Glutatione e gli enzimi correlati, come la Glutatione perossidasi (GSHPx), la Glutatione S-transferasi (GST) e la Glutatione reduttasi (GSHR), giocano un ruolo importante per la difesa delle cellule contro le specie reattive dell'ossigeno (Scibior et al., 2008). Il Glutatione quindi può essere considerato un "radical scavenger" ed è presente in elevate concentrazioni nel citosol delle cellule, anche se è soggetto a rapido turnover.

Tra gli enzimi che intervengono nella protezione cellulare contro lo stress ossidativo insieme al GSH, abbiamo ricordato la Glutatione Perossidasi; quest'enzima catalizza la riduzione del perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) e degli idroperossidi organici, con contemporanea ossidazione del glutatione (GSSH). Per questa ragione la differenza di concentrazione tra la forma ossidata e quella ridotta è usata come

biomarker di stress ossidativo ed è forse il più specifico di molti dei test di perossidazione in uso (Saugstad, 2005).

Nei tessuti umani esistono due tipi di GSHPx: una selenio dipendente, attiva sia nei confronti dell' $H_2O_2$  sia nei confronti degli idroperossidi organici; un'altra selenio-indipendente, che mostra reattività solo nei confronti degli idroperossidi organici (Jernstrom et al., 1993; Hayes e McLellan, 1999).

La Glutathione S-transferasi utilizza il GSH per inattivare sia componenti endogene, come le specie reattive dell'ossigeno e i radicali liberi, sia alcune componenti mutagene o cancerogene presenti nella dieta. Questo avviene perché catalizza la loro coniugazione con il glutathione, rendendo questi composti meno attivi biologicamente e più idrosolubili, facilitandone l'eliminazione con le urine o con la bile (Tsuchida e Sato, 1992; Cotton et al., 2000).

Infine la Glutathione reduttasi catalizza la riduzione del Glutathione ossidato (GSSG), in presenza di NADPH, a glutathione ridotto (2 GSH), mantenendo così un livello adeguato di substrato per l'attività dei due enzimi precedenti (GSHPx e GST) (Hayes e McLellan, 1999).

Il Glutathione non ha come unica attività quella antiossidante, ma è conosciuto per avere anche diverse funzioni fisiologiche come la detossificazione di xenobiotici elettrofili, la modulazione del segnale di trasduzione delle redox, il trasporto e lo stoccaggio della cisteina, la regolazione della proliferazione cellulare, la sintesi dei desossiribonucleotidi, la regolazione della risposta immunitaria, del metabolismo dei leucotrieni e delle prostaglandine (Jernstrom et al., 1993; Sen, 2000). La carenza di GSH contribuisce al peggioramento dello stress ossidativo e gioca un ruolo chiave nella patogenesi di molte patologie (Hultberg e Hultberg, 2006).

Nuttall e collaboratori (1998) hanno dimostrato che la concentrazione di GSH nel plasma è significativamente più bassa in soggetti anziani rispetto a soggetti giovani. Questo suggerisce che la vecchiaia può essere correlata con una diminuzione dei sistemi antiossidanti nel plasma e con un aumento contemporaneo dei danni ossidativi anche in soggetti apparentemente sani. In ambito pediatrico sono pochi gli autori che hanno valutato i livelli plasmatici di glutazione in soggetti sani e la maggior parte non ha rilevato differenze sostanziali tra adulti e bambini (Pastore et al., 1998). Nello studio preliminare di Ono et al. (2001) è stato invece dimostrato che neonati sani hanno livelli plasmatici di glutazione significativamente più bassi rispetto ai soggetti adulti, suggerendo che in questa fase ci possa essere un elevato stress ossidativo, non dovuto però alla presenza di stati patologici, ma probabilmente associato a un sistema immunitario immaturo.

Malattie cardiache, tumori e deficienze immunologiche sono invece associate a deplezione del glutazione (Galera et al., 1996); inoltre, allergie, incluse asma e dermatiti allergiche, e infezioni, che possono manifestarsi anche nel periodo infantile, portano a una deficienza di glutazione (Ono et al., 2001). Questo ha condotto diversi autori a considerare il glutazione plasmatico e il suo metabolismo come uno tra i più importanti indicatori dello stress ossidativo a livello tissutale (Dreher e Junod, 1996; Janes et al., 2000; Hussain et al., 2003).

## 5.3 Scopo del lavoro

---

In bibliografia non sono presenti studi che accertino l'efficacia dell'utilizzo di sostanze antiossidanti nei puledri affetti da PAS. Per definirne l'efficacia, sarà valutato lo stato ossidativo dei puledri affetti da PAS prima e dopo la terapia empirica antiradicalica, attraverso la determinazione dei livelli di glutazione ematico totale.

Gli scopi del nostro lavoro sono quindi stati:

- Determinazione della concentrazione plasmatica del glutazione totale (tGSH) nei puledri sani nelle prime 72 ore di vita.
- Determinazione della concentrazione plasmatica del glutazione totale nei puledri affetti da PAS nelle prime 72 ore di ricovero.
- Valutazione dell'influenza dei trattamenti antiradicalici sulla concentrazione plasmatica del glutazione totale nei puledri malati.
- Valutazione del significato diagnostico e prognostico della concentrazione del tGSH nel puledro ricoverato in terapia intensiva.

## 5.4 Materiali e Metodi

---

### 5.4.1 Selezione degli animali

---

In questo studio sono stati inclusi 24 puledri divisi in due gruppi:

**Gruppo 1: Sani** - 5 puledri nati da fattrici sane con gravidanza fisiologica con un punteggio Apgar  $\geq 9$ , esame clinico ed esami collaterali nei limiti della norma durante tutto il periodo di ricovero e concentrazione sierica di IgG  $\geq 800$  mg/dL a 18 ore di vita.

**Gruppo 2: Malati** -19 puledri affetti da Sindrome da Asfissia Perinatale nati da fattrici ricoverate per assistenza al parto e monitoraggio della gravidanza o ricoverati dopo la nascita presso l'Unità di Perinatologia Equina "Stefano Belluzzi" del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinaria dell'Università di Bologna, che richiedevano cure di II-III livello (Koterba, 1990). I puledri sono stati classificati come affetti da PAS in base ai dati anamnestici e ai segni clinici specifici, in particolare quelli neurologici riferibili a encefalopatia ipossico-ischemica (Knottenbelt et al., 2004), dopo aver escluso altre malattie neurologiche quali la meningite o trauma.

Sono stati inclusi nel secondo gruppo puledri che all'anamnesi presentavano: distocia, red bag, alterazione dell'aspetto macroscopico della placenta e tipici segni clinici di possibile PAS tra cui riflesso di suzione assente o diminuito, ricerca anomala della mammella, disinteresse nei confronti della madre, disfagia, convulsioni,

iperreattività e debolezza, associata ad un aumento delle creatinemia a meno di 24 ore di vita.

Gli animali sono stati suddivisi in 4 sottogruppi in base al trattamento con antiossidanti ricevuto durante il ricovero: A) DMSO (n=5), B) Vitamine (n=5), C) associazione di DMSO e Vitamine (n=4), D) Nessun Trattamento (n=5).

A tutti i puledri appartenenti al Gruppo 2 sono stati eseguiti all'ammissione un esame clinico completo, un profilo ematobiochimico, un'emocoltura e la determinazione della concentrazione ematica di IgG dopo le 18 ore di vita.

Sono stati considerati sopravvissuti i puledri dimessi vivi dall'Unità. Tutte le procedure sugli animali sono state effettuate previa approvazione del Comitato Etico dell'Università di Bologna, ai sensi del DL 116/92, approvato dal Ministero della Salute. Un consenso informato orale è stato fornito dai proprietari

#### 5.4.2 Raccolta dei dati e determinazioni del glutazione totale

---

A ogni puledro è stato prelevato un campione ematico alla nascita o al momento dell'ammissione, quindi prima della somministrazione della terapia, e ogni 24 h per i primi 3 giorni di ricovero (T0-T24-T48-T72).

Il campione di sangue è stato posto in provette S-Monovette Sarstedt contenenti sodio-citrato e centrifugato per 10 minuti a 3000 rpm (Beckman Coulter, TJ25) immediatamente dopo il prelievo; il

surnatante è stato conservato in aliquote congelate a -20°C, per un massimo di 2 mesi.

Il protocollo terapeutico standard da noi utilizzato prevede la seguente posologia:

SELEVIT® FATRO SpA (10 ml EV SID);

VITALENE C TIPO FORTE® ATI Srl (20 ml EV SID);

DODICILE® FATRO SpA (3ml EV SID);

Dimethylsulfoxide USP (DMSO) Fagron (1 mg/kg EV al 10% ogni 12h).

## Determinazione del Glutazione totale

---

La concentrazione del glutatione totale è stata determinata su un totale di 96 campioni di plasma ottenuti da 24 puledri. Come controllo sono state determinate anche le concentrazioni di tGSH plasmatico di 4 cavalle sane con età media di 11 anni non gravide e non in lattazione stabulate presso il DIMEVET.

La determinazione delle concentrazioni di Glutazione sono state effettuate tramite ApoGSH™ Glutathione Colorimetric Assay Kit (Bio Vision), ovvero un'analisi di tipo colorimetrico che rileva la presenza di glutatione totale. Il saggio si basa sul sistema di riciclo del glutatione ad opera del DNTB e dell'enzima glutatione reduttasi. Durante questo processo il glutatione e il DNTB reagiscono per formare l'acido 2-nitro-5-tiobenzico che assume un colore giallo. La concentrazione del glutatione è poi determinata grazie alla misurazione dell'assorbanza del campione a 412 nm.



Successivamente, il glutatione ossidato (GSSG), che si forma durante questa reazione, viene ridotto nuovamente ad opera della glutatione reduttasi in GSH, per poter reagire nuovamente con il DNTB e formare altro acido 2-nitro-5-tiobenzico. Questo sistema di riciclo porta però a una diminuzione della sensibilità della determinazione della concentrazione di glutatione totale.

### **Preparazione del campione di plasma:**

- centrifugare il sangue posto in una provetta con anticoagulante a 1000 rpm per 10 minuti a 4° C;
- prelevare il plasma e trasferirlo in una nuova provetta, addizionando successivamente ¼ di volume di acido solfo salicilico (SSA) al 5% e miscelare;
- centrifugare a 8000 rpm per 10 minuti a 4°C;
- trasferire in surnatante in una nuova provetta che verrà usata per il saggio del glutatione (conservare in ghiaccio al buio e dopo l'analisi conservare a -20°C).

## **Determinazione del Glutatione Totale**

---

### **Preparazione del Reaction Mix**

Ogni eppendorf contiene:

- 20µL di NADPH Generation Mix
- 20µL di Glutathione Reductase
- 120µL di Glutathione Reaction Buffer

Aggiungere 160µL di Reaction Mix in ogni pozzetto e incubare a temperatura ambiente per 10 minuti, affinché si formi NADPH.

Aggiungere 20µL alla soluzione di GSH Standard o ai campioni.

Incubare la piastra a temperatura ambiente per 5-10 minuti.

Aggiungere 20µL di Substrate Solution e incubare a temperatura ambiente per 5-10 minuti o di più, se i campioni contengono poco GSH.

Accendere lo spettrofotometro ed impostare la lettura ad una lunghezza d'onda di 405nm.

La concentrazione del Glutathione Totale si calcola con la seguente formula:

$$\text{Glutathione Totale} = (\text{O.D.}_{\text{campione}} - \text{O.D.}_{\text{bianco}})$$

### 5.4.3 Analisi statistica

---

Il test di Kolmogorov-Smirnov è stato utilizzato per valutare la distribuzione di tutti i parametri. Poiché i dati hanno mostrato una distribuzione normale, le variabili sono state analizzate con metodi parametrici.

Un modello lineare generale (GLM) per misure ripetute è stato utilizzato per valutare:

- 1) l'andamento della concentrazioni di Glutazione nei puledri sani;
- 2) le concentrazioni di Glutazione nel tempo tra puledri sani e malati dalla nascita alle 72 ore di vita o di ricovero ( $t_0$ - $t_{72}$ );
- 3) l'andamento concentrazioni di Glutazione nel tempo nei puledri malati sottoposti a differenti trattamenti;
- 4) le variazioni nel tempo delle concentrazioni di Glutazione tra puledri sopravvissuti e non sopravvissuti.

Un test ANOVA ad una via seguita dal post hoc Dunnett test è stata utilizzato per confrontare la concentrazione di glutazione plasmatico totale nei puledri sani nei differenti tempi di campionamento con quella di cavalli adulti.

## 5.5 Risultati

---

L'età media al ricovero nei puledri malati era di  $12,79 \pm 13,39$  ore. Tutti gli animali del Gruppo 1 sono sopravvissuti, mentre nel Gruppo 2, 12 su 19 (63,16%) puledri sono sopravvissuti e 7 su 19 (36,84%) sono deceduti.

**Puledri san i-**Nel Gruppo 1 la concentrazione di Glutazione è bassa al momento della nascita (T0)  $0,60 \pm 0,16$   $\mu\text{mol/L}$ ; mediana 0,62; min-max 0,38-0,76), con un andamento crescente fino a T24, per poi rimanere costante fino a T72, con una variazione nel tempo non significativa ( $p=0,44$ ) (Figura 5.1).

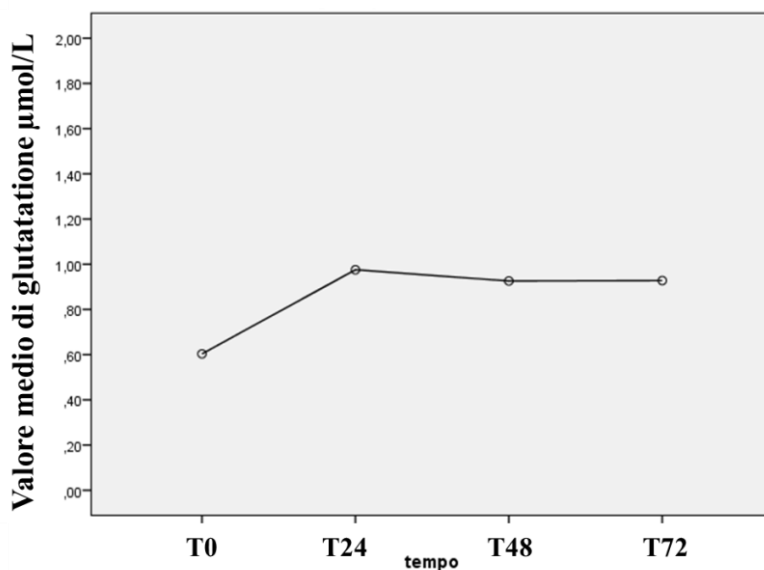


Fig. 5.1 Concentrazioni di Glutazione nei puledri sani (Gruppo 1).

La concentrazione di glutazione nei puledri sani è risultata significativamente più bassa ( $p<0,01$ ) per tutti i tempi esaminati (T0-T72) rispetto ai cavalli adulti (Figura 5.2 e Tabella 5.1).

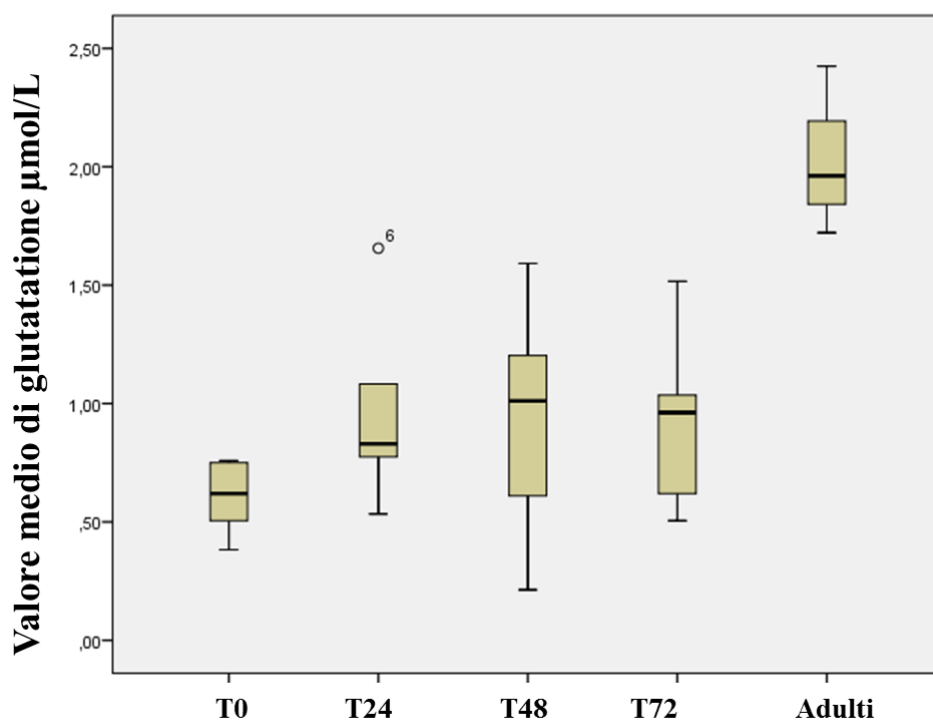


Figura 5.2: Concentrazione di Glutathione nei puledri sani nei diversi tempi di campionamento (T0-T72) e nei cavalli adulti. Il riquadro centrale rappresenta i valori dal quartile inferiore al superiore (25° al 75° percentile). La linea centrale rappresenta la mediana. Le linee orizzontali rappresentano il range ( $p < 0.01$ ).

Tabella 5.1: Concentrazione di Glutathione nei puledri sani nei diversi tempi di campionamento e nei cavalli adulti.

	<b>T0</b>	<b>T24</b>	<b>T48</b>	<b>T72</b>	<b>Adulti</b>
<b>Glutathione mmol/L</b>	0,60 ±0,16	0,98±0,43	0,93±0,53	0,93 ±0,40	2,036±0,35

**Puledri malati** -Nei puledri malati del Gruppo 2, al momento dell'ammissione la concentrazione media di glutazione è pari a  $0,84 \pm 0,45$  mmol/L; è stata riscontrata una diminuzione della concentrazione di glutazione nel tempo; in particolare, il test post-hoc con la correzione di Bonferroni ha individuato una variazione significativa tra T0 e T24 ( $p < 0,01$ ) (Figura 5.3). Non sono invece state rilevate differenze statisticamente significative tra i trattamenti ( $p < 0,01$ ) (Figura 5.4)

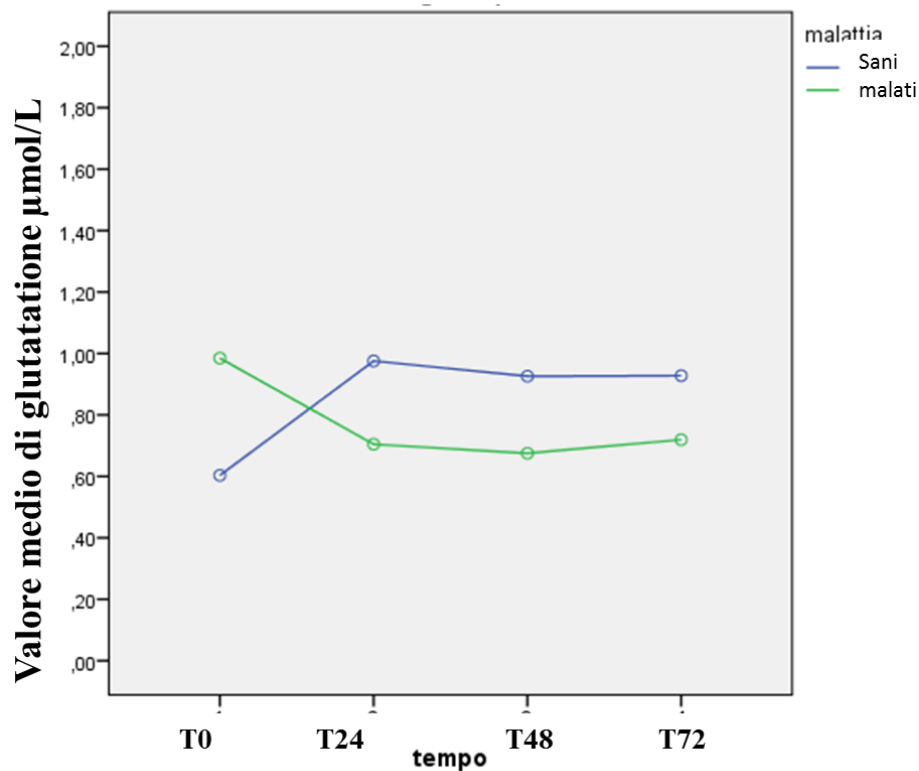


Fig. 5.3 Concentrazioni di Glutazione nei puledri malati e sani.

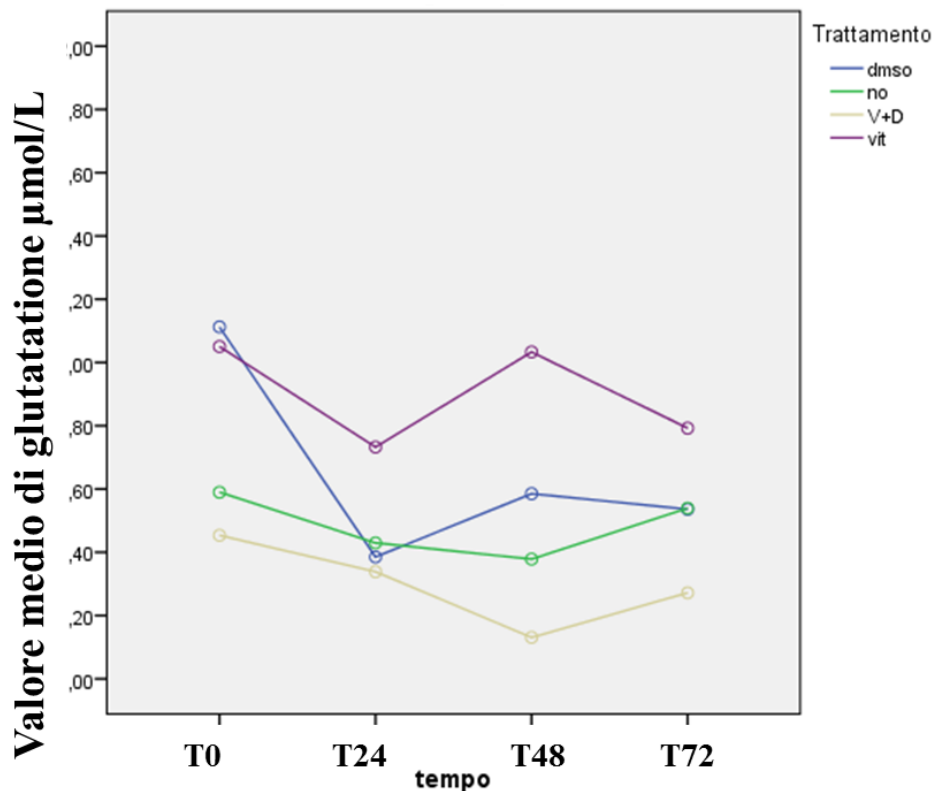


Figura 5.4: Concentrazioni di Glutazione nei puledri malati (Gruppo 2) divisi nei sottogruppi di trattamento.

Confrontando i valori medi di glutazione tra i puledri sani (n=5) e puledri malati (n=8) dalla nascita alle 72 ore di vita non sono state riscontrate differenze significative (Figura 5.3)

Una differenza statisticamente significativa è stata riscontrata tra puledri sopravvissuti e non sopravvissuti del Gruppo 2 per tutti i tempi di campionamento, con una concentrazione maggiore nei secondi ( $p < 0,01$ ); la non sopravvivenza non modifica l'andamento nel tempo del glutazione plasmatico (Figura 5.5).

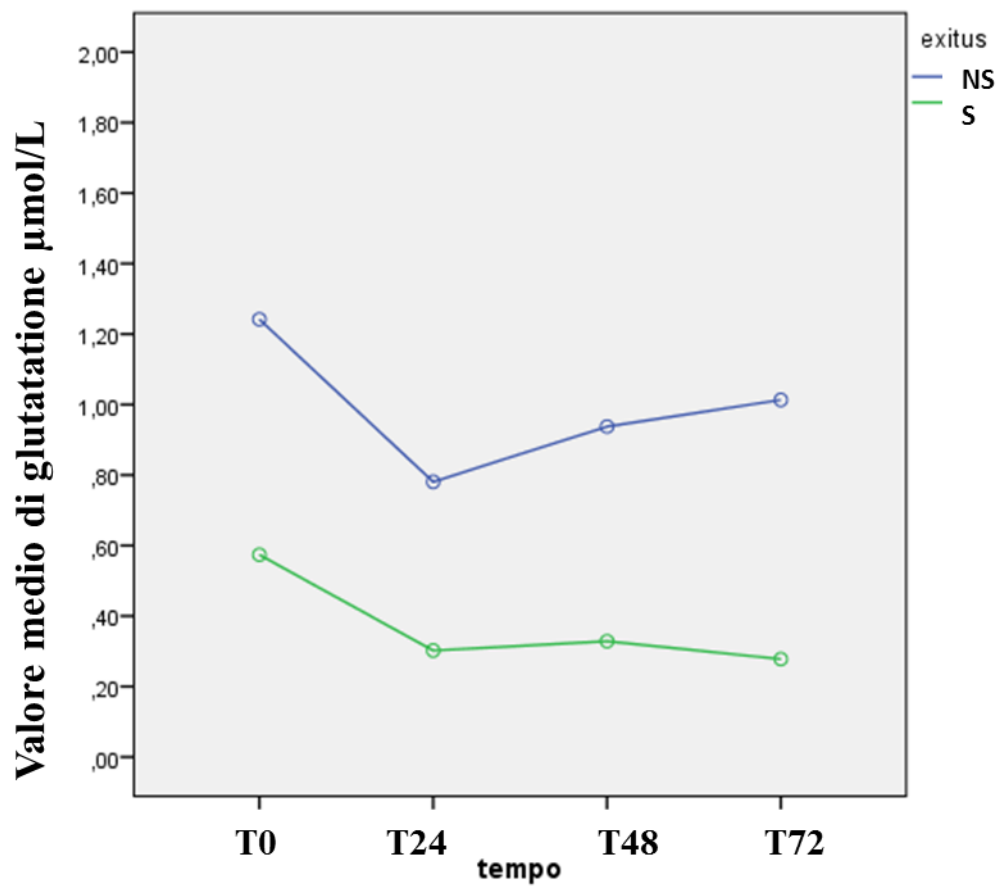


Figura 5.5: Concentrazioni di Glutazione nei puledri malati (Gruppo 2) sopravvissuti (S) e non sopravvissuti (NS).



## 5.6 Discussione e Conclusioni

---

In questo studio abbiamo determinato la concentrazione plasmatica del glutatione totale in puledri neonati affetti da PAS e ricoverati in terapia intensiva; questi dati di cui non abbiamo riscontri in letteratura, sono stati confrontati con quelli ottenuti da puledri clinicamente sani, utilizzati per determinare i valori fisiologici nei primi giorni di vita.

Nei puledri sani la concentrazione di tGSH, bassa al momento della nascita, presenta un andamento crescente fino 24 ore di vita per poi rimanere costante fino 72 ore; queste differenze, a causa dell'elevata variabilità tra gli individui, non risultano significative. In letteratura non sono riportati dati sui puledri con cui confrontare i valori da noi determinati e anche quelli riportati in medicina umana non sono comparabili per diverse ragioni, come ad esempio l'uso di matrici biologiche e metodiche analitiche differenti, età dei soggetti o analisi eseguite ad un solo tempo. Ono e collaboratori (2001) hanno ipotizzato che neonati (2-3 settimane di vita) sani presentino basse concentrazioni di tGSH probabilmente a causa delle condizioni di elevato stress ossidativo presenti nel primo mese di vita. I neonati hanno un sistema immunitario ancora immaturo e deficitario e un aumento di citochine può stimolare la produzione di ROS, con conseguente consumo delle molecole antiossidanti, incluso il glutatione. Frank e Sosenko (1987) hanno ipotizzato che le condizioni di stress ossidativo al momento della nascita favoriscano la formazione di radicali liberi in quantità tali da sovrastare le capacità di detossificazione ancora immature. Il glutatione totale plasmatico è un

ottimo indicatore dello stato del GSH e della gravità della patologia in soggetti con patologie critiche. Tuttavia non vi sono informazioni disponibili sulle variazioni nei livelli di glutatione nei pazienti neonati (Pastore et al., 2001).

In questo studio abbiamo inoltre confrontato la concentrazione plasmatica di tGSH tra puledri sani e cavalli adulti. Si può osservare che esiste una differenza significativa per tutti i tempi esaminati rispetto agli adulti. Questi dati sono in accordo con diversi autori che in medicina umana hanno confrontato le concentrazioni di tGSH tra adulti e neonati sani (Michelet et al., 1995; Ono et al., 2001). Il plasma neonatale presenta un'attività antiossidante molto più bassa rispetto a quella dell'adulto e la sua concentrazione varia sensibilmente con l'età, infatti come detto in precedenza, il neonato presenta un profilo antiradicalico deficitario con bassi livelli di glutatione (Gutteridge e Stocks, 1981; Sullivan e Newton, 1988; Michelet et al., 1995).

Nei puledri malati affetti da PAS del Gruppo 2, presi in considerazione senza distinzione di trattamento, i valori di tGSH presentano una variazione significativa nel tempo con un andamento decrescente dal momento del ricovero (T0) a T24 per poi rimanere costante. Questa diminuzione potrebbe essere dovuta ad una diminuita produzione di glutatione per carenza di cisteina e di selenio o a un eccessivo consumo dovuto all'utilizzo di questo antiossidante per proteggere le cellule dai ROS. In medicina umana è stato riportato che la quantità di cisteina è relativamente bassa rispetto alla grande richiesta metabolica del GSH nelle cellule nei neonati affetti da patologie che causano stress ossidativo (Wu et al., 2004).

In ogni caso, nei puledri malati è evidente che la diminuzione del tGSH avviene a 24 ore dall'inizio del trattamento terapeutico. Questo andamento è inverso a quello dei puledri sani. Durante la fase di riperfusione che avviene dopo l'asfissia, l'elevata quantità di ossigeno che arriva ai tessuti ipossico-ischemici porta ad una produzione enorme di ROS che amplificano ancora di più il danno dei tessuti colpiti (Vento et al., 2002). Schmidt e collaboratori (1996) hanno dimostrato che esiste una notevole e significativa diminuzione della concentrazione di GSH nel sangue del cordone ombelicale nei neonati che hanno sofferto di asfissia; questo dato indica un rapido consumo di glutazione nel periodo perinatale attraverso la reazione di perossidazione. Inoltre, la funzionalità epatica nel neonato che ha sofferto di asfissia è in parte compromessa e dato che il glutazione viene prodotto in gran quantità proprio dal fegato, può esserci anche una concomitante riduzione nella produzione di glutazione.

Nel gruppo 2 il confronto tra i diversi trattamenti mette in evidenza che sia i puledri trattati con terapie antiradicaliche che quelli non trattati non presentano una variazione significativa nella concentrazione di tGSH, anche se osservando il grafico nella figura 5.4 possiamo notare come i puledri trattati con DMSO presentino un dimezzamento delle concentrazioni di glutazione nelle prime 24 ore di ricovero; anche per quelli trattati con le vitamine si ha una diminuzione della concentrazione di tGSH nelle prime 24 ore pur non così evidente come per il DMSO. I sottogruppi DMSO e vitamine a T0 presentavano una concentrazione più elevata di tGSH rispetto agli altri due sottogruppi, questo potrebbe essere determinato da una differenza nella gravità e/o nella durata della sintomatologia.

De Moffarts e collaboratori (2005) hanno condotto uno studio su 2 gruppi di cavalli adulti in allenamento, al primo gruppo è stata somministrata un'integrazione con vitamine e oligoelementi per tre mesi, mentre il secondo gruppo è stato utilizzato come controllo. Gli autori hanno notato una diminuzione nella concentrazione del tGSH ematico sia nei cavalli che hanno ricevuto il supplemento sia in quelli di controllo. Nei cavalli che hanno avuto l'integrazione, l'attività della glutatione reduttasi e la concentrazione di selenio aumentano rispetto a quelli non trattati, nei quali questi due parametri calano. Gli autori hanno supposto che la terapia antiradicalica riduca l'attività della glutatione perossidasi e contrasti il calo della concentrazione di selenio, senza influire sul tGSH, che infatti cala in entrambi i gruppi.

Nel confronto tra puledri sani e malati (che al ricovero presentavano 0 ore di vita) non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nella concentrazione di tGSH, anche se, osservando il grafico riportato nella figura 5.3, possiamo notare come a T0 le concentrazioni siano basse nei sani ( $0,60 \pm 0,16$  mmol/L; mediana 0,62; min-max 0,38-0,76) e alte nei malati ( $0,84 \pm 0,53$  mmol/L; mediana 0,75 ; min-max 0,1-1,68 ) per aumentare e calare rispettivamente a 24 ore. Probabilmente, la differenza non risulta significativa per diversi motivi, inclusi sia i bassi valori delle concentrazioni di glutatione misurate in tutti i campioni, sia la grande variabilità tra gli individui. Schmidt e collaboratori (1996) hanno dimostrato che nei neonati a termine sono presenti livelli di GSH più elevati rispetto a quelli prematuri, in accordo anche con altri autori (Smith e al, 1993). Questo aumento può essere spiegato con l'incremento dell'attività di glutatione reduttasi e sintetasi che si ha a

fine gravidanza (Ripalda et al., 1989; Löckner e Kretzschmar, 1991; Serafini et al., 1991). Inoltre lo stesso aumento della produzione di ROS può essere causa di distruzione del GSH e un deficit antiossidante preesistente potrebbe essere responsabile in parte dello sviluppo di tutti i meccanismi infiammatori che andranno a danneggiare i tessuti, come quello intestinale causando la NEC (Nigel, 2005).

L'andamento nel tempo del glutatione nei puledri sopravvissuti e non sopravvissuti è comparabile, anche se dal grafico in figura 5.5 si può notare che i puledri deceduti partono da una concentrazione di GSH all'ammissione più alta rispetto ai puledri sopravvissuti; questa differenza probabilmente è dovuta alla gravità della sintomatologia e dello stress ossidativo.

In conclusione, nel nostro studio abbiamo osservato che i puledri neonati sani presentano una concentrazione più bassa di tGSH sia rispetto ai malati della stessa età che agli adulti, come riscontrato anche in medicina umana, ma con tendenza all'aumento nelle prime 24 ore di vita per i sani ed un calo nei malati. Nei puledri malati abbiamo visto, inoltre, come la somministrazione o meno di una terapia antiradicalica non influisca sulle concentrazioni di tGSH e che l'andamento nel tempo non è correlato con la sopravvivenza, anche se i puledri deceduti presentano concentrazioni più elevate. Sono necessari ulteriori studi per valutare se la concentrazione di tGSH possa essere un buon indice diagnostico e prognostico di PAS, soprattutto aumentando la numerosità della popolazione.

## 6 Conclusione

---

Nel puledro, la diagnosi di Sindrome da Asfissia Perinatale (PAS) al momento della nascita è un fattore critico, e l'associazione di dati clinici e di laboratorio, come quelli valutati in questo studio, potrebbe risultare utile.

I puledri neonati affetti da PAS presentano al ricovero ipermagnesiemia rispetto a quelli sani, ai settici e ai prematuri/dismaturi, probabilmente causata da un grave danno cellulare con rilascio in circolo del magnesio intracellulare. La misurazione del magnesio plasmatico totale al momento del ricovero, può essere un utile marker diagnostico e prognostico.

I puledri affetti da PAS presentano concentrazioni più basse degli ormoni tiroidei rispetto ai sani, con un andamento decrescente dall'ammissione al settimo giorno di ricovero. I risultati ottenuti in questo studio suggeriscono che la PAS può essere un'ulteriore causa di Euthyroid Sick Syndrome, con una diminuzione delle concentrazioni di T3 e T4 nei puledri malati rispetto a quelli sani della stessa età come riportato in letteratura per altre malattie sistemiche.

Lo studio del profilo proteomico ha permesso di separare le più importanti frazioni proteiche del liquido amniotico di cavalla, mettendo in evidenza similitudini e differenze qualitative e quantitative nei ferogrammi dei puledri sani e di quelli malati. Alcune bande sono presenti in tutti i campioni. nei profili dei liquidi amniotici dei puledri malati è stata riscontrata una maggiore variabilità e tra queste proteine si potrebbero individuare nuovi biomarcatori clinici.

I puledri neonati, sani presentano una concentrazione più bassa di tGSH sia rispetto ai malati della stessa età sia agli adulti, come riscontrato anche in medicina umana, ma con una tendenza all'aumento nelle prime 24 ore di vita per i sani ed un calo nei malati. La somministrazione della terapia antiradicalica non influisce sulle concentrazioni di tGSH, ed i puledri deceduti presentano concentrazioni più alte. Il glutatione è risultato poco espresso nel puledro neonato, sono perciò necessari ulteriori studi per valutarne la concentrazione su un numero maggiore di soggetti e su altre matrici biologiche.

## 7 Bibliografia

---

1. Adams R., Mayhew I.G.: Neurologic disease. *Veterinary of North America: Equine practice*; 1:209-234; 1985.
2. Adams R.: The urogenital system, in Koterba A.M., Drummond W.H., Kosch P.C., eds: "Equine clinical neonatology, Lea&Febiger, Philadelphia, 443-495; 1990.
3. Adler S.M., Wartofsky L.: The nonthyroidal illness syndrome. *Endocrinology and Metabolism of Clinics of North America*; 36:657-672; 2007.
4. Afandi B., Vera R., Schussler G.C., Yap M.G.: Concordant decreases of thyronine and thyroxinbinding protein concentrations durin sepsis. *Metabolism*; 49:753-754; 2000.
5. Agrawal J.L., Shah G.S., Poudel P., Baral N., Agrawal A., Mishra O.P.: Electrocardiographic and enzymatic correlations with outcome in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy, *Italian Journal of Pediatrics*; 38:33; 2012.
6. Aguggini G., Beghelli V., Giulio L.F., Clement M.G., d'Angelo A., Debenedetti A., Facello C., Guglielmo R., Lucaroni A., Maffeo G., Marongiu A., Naitana S., Nuvoli P., Piazza R.: *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia. Seconda Edizione. Casa Editrice Torinese*; 28-10125; 1998
7. Aleman M., Pickles K. J., Conley A. J., Stanley S., Haggett E., B.Toth, Madigan E.: Abnormal plasma neuroactive progestagen derivatives in ill neonatal foals presented to the neonatal intensive care unit. *Equine Veterinary Journal*; 45 : 661–665 EVJ Ltd; 2013



8. Al-Ghamdi S.M., Cameron E.C., Sutton R.A.: Magnesium deficiency: pathophysiologic and clinical overview. *Am J Kidney Dis.* Nov; 24(5):737-52; 1994.
9. Allen A.L., Townsend H.G., Doige C.E.: A case-control study of the congenital hypothyroidism and dismaturity syndrome foals. *Canadian Veterinary Journal*; 37:349-358; 1996.
10. Alonso-Spilsbury M., Mota-Rojas D., Villanueva-García D., Martínez-Burnes J., Orozco H., Ramírez-Necoechea R., Mayagoitia A.L., Trujillo M.E.: Perinatal asphyxia pathophysiology in pig and human: a review. *Anim Reprod Sci.*; Nov90(1-2):1-30; 2005.
11. Altura B.M., Altura B.T.: Role of magnesium in pathophysiological processes and the clinical utility of magnesium ion selective electrodes. *Scand J Clin Lab Invest* 56; suppl. 224; 211-234; 1996.
12. Altura B.T., Altura B.M.: A method for distinguishing ionized, complexed and protein-bound Mg in normal and diseased subjects. *Scand J Clin Lab Invest*; 54(suppl 217):83–87; 1994.
13. Ambrosi V., Morini G., Parmigiani E., Bigliardi E.: Gravidanza gemellare nella cavalla, approccio diagnostico e terapeutico. *Veterinaria Pratica Equina*; 2: 29-34; 2000.
14. Anderson N.L., Anderson L.G.: Proteome and proteomics: new technologies, new concepts and new words *Electrophoresis*;19:1853-61; 1998.
15. Andrews F.M., Bernard W.V., Byars T.D.: Recommendations for the diagnosis and treatment of equine gastric ulcer syndrome (EGUS). *Equine Vet Educ*; 1:122–34; 1999

16. Anitha A., Thangavel A.: biochemical profile of ovine amniotic and allantoic fluids. *Tamilnadu J. Veterinary & Animal Sciences*; 7 (6) 262-267, November – December; 2011
17. Antonelli C., Castagnetti C, Mariella J, Ferlizza E, Andreani G, Isani G, Carpenè E. Total plasma magnesium concentration in critically ill foals: preliminary results. *Atti del XVIII International SIVE Congress*, 217-218, Bologna, febbraio 2012.
18. Asbury A.C., LeBlanc M.M.: The Placenta, in McKinnon A.O. and Voss J. L.: *Equine Reproduction*, Lea & Febiger, Philadelphia, 509-515; 1993.
19. Axon J.E., Palmer J.E.: *Clinical Pathology of the Foal*, *Vet Clin Equine*; 24: 357–385; 2008.
20. Axon J.E.: *Critical Care – Assessment*, In: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D.D., eds, “*Equine Reproduction*”, Wiley-Blackwell; 167-176; 2011.
21. Baird N.A., Turnbull D.W., Johnson E.A.: Induction of the heat shock pathway during hypoxia requires regulation of heat shock factor by hypoxia-inducible factor-1, *J Biol Chem*; 281(50): 38675-38681; 2006.
22. Baker S.J, Gerring E.L.: Gastric pH monitoring in healthy, suckling pony foals. *AmJ Vet Res*; 54:959–64; 1993.
23. Barone R.: *Anatomia Comparata Dei Mammiferi Domestici vol 4*, Casa Editrice Ed agricole; 1994.
24. Barsinck R.J.I.M., Hurcombe S.D.A., Smith P.S., Slovis N.M., Sprayberry K.A., Saville W.J.A.: Insulin, glucagon and leptin in critically ill foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*; 25:123-131; 2011.

25. Bauer J.E.: Normal blood chemistry. In: Koterba AM, DrummondWH, Kosch PC, editors. Equine clinical neonatology. Philadelphia: Lea & Febiger; p. 602–14; 1990.
26. Baumann M.U., Deborde S., Illsley N.P.: Placental glucose transfer and fetal growth, *Endocrine*; 19(1): 13-22; 2002.
27. Berger H. M., Molicki, J. S., Moison, R. M., Van Zoeren-Grobbe, D.: Extracellular defense against oxidative stress in the newborn. *Seminars in Neonatology*; 3, 183-190; 1998.
28. Berlin D., Aroch I.: Concentrations of ionized and total magnesium and calcium in healthy horses: effects of age, pregnancy, lactation, pH and sample type. *Vet J. Sep*; 181(3):305-11; 2009
29. Bermudez, C.A., Merino, P.A., Alonso-Spilsbury, M.: Monitoreo del feto hipoxico in utero y al nacimiento en cerdas al parto tratadas con oxitocina. In: *Memorias IV Jornada Internacional en Produccion Porcina, FMVZ, UNAM, Mexico*; pp. 53–68; 2003.
30. Bernard W., Reimer J., Cudd T.: Historical factors, clinicopathologic findings, clinical features, and outcome of equine neonates presenting with or developing signs of central nervous system disease. *Proceedings AAEP*; 222-224; 1995.
31. Bernard W.V., Reimer J.M.: Examination of the foal. *The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*; 10:37-66; 1994.
32. Biasi F., Chiarpotto E., Lanfranco G., Capra A., Zummo U., Chiappino I., Poli G.: Oxidative stress in the development of human ischemic hepatitis during circulatory shock. *Free Radical Biology Medicine*, 17, 225-233; 1994.

33. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V.: Antioxidant oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*; 91, 179-194; 2003.
34. Boosinger T.R., Brendemuehl J.P., Bransby D.L., Wright J.C., Kemppainen R.J., Kee D.D.: Prolonged gestation, decreased triiodothyronine concentration, and thyroid gland histomorphologic features in newborn foals of mares grazing *Acremonium coenophialum*-infected fescue. *American Journal of Veterinary Research*; 56(1):66-69; 1995.
35. Borges M., Lanes R., Moret L.A., Balochi D., Gonzalez S.: Effect of asphyxia on free thyroid hormone levels in full term newborns. *Pediatr Res*; 19:1305-7; 1985.
36. Borruto F., Comparetto C., Wegher E., Treisser A.: Screening of foetal distress by assessment of umbilical cord lactate, *Clin Exp Obst & Gyn*; 33(4): 219-22; 2006.
37. Brauer, A.U., Savaskan, N.E.: Molecular actions of selenium in the brain: neuroprotective mechanism of an essential trace element. *Reviews in the Neurosciences*; 15(1), 19-32; 2004.
38. Brayton C.F.: Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review *Cornell Vet. J*; 76(1):61-90; 1986.
39. Breuhaus B.A., LaFevers D.H.: Thyroid function in normal, sick and premature foals, *J Vet Intern Med*; 19:445; 2005.
40. Breuhaus B.A.: Disorder of the equine thyroid gland. *Veterinary Clinics Equine*; 27:115-128; 2011.
41. Brewer B.D.: Renal disease. In: Koterba A.M., Drummond W.H., Kosch P.C. eds. *Equine Clinical Neonatology*. Lea e Febiger, Philadelphia;446-458; 1990.

42. Brien T.G., Fay J.A., Griffin E.A.: Thyroid status in the newborn infant: effective thyroxine ratio and free thyroxine index. *Arch Dis Child*; 49:225–7; 1974.
43. Broner C.W., Stidham G.L., Westenkirchner D.F., Tolley E.A.: Hypermagnesemia and hypocalcemia as predictors of high mortality in critically ill pediatric patients. *Crit Care Med*. Sep;18(9):921-8; 1990.
44. Bucca S.: Diagnosis of the compromised equine pregnancy, *Vet Clin North Am Equine Pract*; 22(3): 749-761; 2006.
45. Buchmiller T.L., Gregg J., Rivera F.A. Jr., Diamond J.M., Fonkalsrud E.W.: Effect of esophageal ligation on the development of fetal rabbit intestinal lactase. *J Pediatr Surg*; 28: 1473–1477; 1993.
46. Buechner-Maxwell VA.: Nutritional support for neonatal foals. *Vet Clin North Am Equine Pract*. Aug; 21(2):487-510; 2005
47. Buhimschi C.S., Bhandari V., Hamar B., Bahtiyar M.O., Zhao G., Sfakianaki A.K., et al. Proteomic profiling of the amniotic fluid to detect inflammation, infection, and neonatal sepsis. *PLoS Med*;4:-18; 2007.
48. Buhimschi I.A., Christner R., Buhimschi C.S.: Proteomic biomarker analysis of amniotic fluid for identification of intra-amniotic inflammation. *BJOG*;112:173-81; 2005
49. Buonocore, G., Perrone, S., Bracci, R. Free radicals and brain damage in the newborn. *Biology of the neonate*, 79, 180-186; 2001.
50. Burd L.I., Jones M.D. Jr, Simmons M.A., Makowski E.L., Meschia G., Battaglia F.C.: Placental production and fetal utilisation of lactate and pyruvate, *Nature*, 254: 710–711; 1975.

51. Bursell J.D.H., Warner J.T.: Interpretation of thyroid function in children. *Paediatrics and Child Health*; 17(9):361-366; 2007.
52. Cabal L.A., Devaskar U., Siassi B., Hodgman J.E., Emmanouilides G.: Cardiogenic shock associated with perinatal asphyxia in preterm infants. *Journal of Pediatrics*; 96:705-710;1980.
53. Caddell J.L., Reed G.F.: Unreliability of plasma magnesium values in asphyxiated neonates. *Magnesium*; 8(1):11-6; 1989
54. Calvert J.W. Zhang J.H.: Pathophysiology of a hypoxic-ischemic insult during the perinatal period. *Neurology Research*;7(4):249-253; 2005
55. Carter B.S., Moores R.R. Jr, Battaglia F.C., Meschia G.: Ovine fetal placental lactate exchange and decarboxylation at midgestation, *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 264: E221-225; 1993.
56. Castagnetti C., Della regina A.C., Mariella J., Serrazanetti G.P., Grandis A., Belluzzi S.: Evaluation of lung maturity in the equine fetus and in the neonatal foal. *Theriogenol*; 67:1455-1462; 2007.
57. Castagnetti C., Pirrone A., Mariella J., Mari G.: Venous blood lactate evaluation in equine neonatal intensive care; *Theriogenol*, 73: 343-357; 2010.
58. Chalhoub M.C.L, Lopes M.D, Takahira R.K: Amniocentesis and biochemical evaluation of amniotic fluid in ewes at 70, 100 and 145 days of pregnancy *Small Ruminant Research*; Volume 39, Issue 3, March, Pages 277–281; 2001
59. Chan, A. C.: Partners in defense, vitamin E and Vitamin C. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*; 71(9), 725-731; 1993.

60. Chen C.L., Riley A.M.: Serum thyroxine and triiodothyronine concentrations in neonatal foals and mature horses, *Am J Vet Res*; 42: 1415–7; 1981.
61. Chernow B., Bamberger S., Stocko M., et al.: Hypomagnesemia in patients postoperative intensive care unit. *Chest*; 95:391-397; 1989
62. Cho C.K. J., Shannon J. S., Winsor E.J., Diamandis E.P.: Proteomics Analysis of Human Amniotic Fluid. *Molecular & Cellular Proteomics*; 6:1406–1415; 2007.
63. Choolani M. et al.: Proteomic technologies for prenatal diagnostics: advances and challenges ahead *Expert Rev Proteomics*; 6(1), 87-101; 2009.
64. Cohn H.E., Saclis E.J., Heymann M.A.: Cardiovascular response to hypoxemia and acidemia in fetal lambs. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*; 120:817- 824; 1974.
65. Corley K.T.T., Donaldson L.L., Furr M.O.: Arterial lactate concentration, hospital survival, sepsis and SIRS in critically ill neonatal foals, *Equine Vet J*; 37: 53-59; 2005.
66. Corley KT.: Inotropes and vasopressors in adults and foals. *Vet Clin North Am Equine Pract. Apr*; 20(1):77-106; 2004.
67. Corley T.T: Perinatal Asphyxia Syndrome. Rossdale and Partners' foal care course-november; 21-26; 2003.
68. Corssmit E.P., Heyligenberg R., Endert E., Sauerwein H.P., Romijn J.A.: Acute effects of interferon-alpha administration on thyroid hormone metabolism in healthy men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 80:3140-3144; 1995.
69. Cosmi E.V. Somministrazione di surfattante in utero per la prevenzione della sindrome da distress respiratorio neonatale. *Leadership medica*; 3:34-60; 2001.

70. Cotton S.C., Sharp L., Little J., Brockton N.: Glutathione S-transferase polymorphism and colorectal cancer. *Am J Epidemiol*; 151:7-32; 2000.
71. Cudd T.A.: Gastrointestinal system dysfunction. In: Koterba A.M., Drummond W.H., Kosch P.C., editor. *Equine clinical neonatology*. 1st edition. Philadelphia: Lea e Febiger; p. 367–442; 1990.
72. Da Silva, S., Hennebert, N., Denis, R., Wayenberg, J.L.: Clinical value of a single postnatal lactate measurement after intrapartum asphyxia. *Acta Pediatr.*; 89, 320–323; 2000.
73. De Backer D.: Lactic acidosis, *Intensive Care Med*; 29: 699-702; 2003.
74. De Groot L.J.: Dangerous dogmas in medicine: the nonthyroidal illness syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*; 84:151–64; 1999.
75. De Moffarts B., Kirschvink N., Art T., et al: Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained Thoroughbred horses. *Vet J*; 169(1):65–74; 2005.
76. Delivoria-Papadopoulos M., Mishra O.P.: Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. *J Pediatr*; 132: 30S–4S; 1998.
77. Divers T.J., Perkins G.A.: Urinary and hepatic disorders in neonatal foals. *Clinical Techniques in Equine Practice*; 2(1):67–78; 2003.
78. Djordevic V.: Free radicals in cell biology. *International Review of Cytology*; 237, 57-89; 2004.
79. Donnelly W.H., Bucciarelli R.L., Nelson R.N.: Ischemic papillary muscle necrosis in stressed newborn infants. *Journal of Pediatrics*; 96:295-300; 1980.



80. Dreher D., Junod A.F.: Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer*; 32A:30-38; 1996.
81. Drummond W.H., Koterba A.M.: Neonatal asphyxia. In: Koterba A.M., Drummond W.H., Kosch P.C. eds. *Equine Clinical Neonatology*. Lea & Febiger, Philadelphia; 124-135; 1990.
82. Drummond W.H.: Neonatal pulmonary hypertension. *Equine Veterinary Journal*; 19:169-176; 1987.
83. Economidou F., Douka E., Tzanela M., Nanas S., Kotanidou A.: Thyroid function during critical illness. *Hormones*; 10(2):117-124; 2011.
84. Eguiluz A., Bernal A.L., McPherson K., Parrilla J.J., Abad L.: The use of intrapartum fetal blood lactate measurements for the early diagnosis of fetal distress, *Am J Obstet Gynecol*, 147: 949-954; 1983.
85. Elin R.J.: Assessment of Magnesium status. *Clin Chem*; 33-11;1965-70; 1987
86. Elin R.J.: Magnesium metabolism in health and disease. *Dis Mon*; 34(4): 161-218; 1988.
87. Elin R.J.: Magnesium: the fifth but forgotten electrolyte. *Am J Clin Pathol*; 102:616-622, 1994.
88. Engel R.R., Elin R.J.: Hypermagnesemia from birth asphyxia. *J Pediatr*; Oct;77(4):631-7; 1970.
89. Englard, S., Seifter, S.: The biochemical function of ascorbic acid. *Annual Review of Nutrition*; 71(9), 365-406; 1986.
90. Fawcett W.J., Haxby E.J., Male D.a: Magnesium: physiology and pharmacology. *British journal of anaesthesia*; 83 (2); 302-20; 1999.

91. Fenger, C.K.: Diseases of foals. *Equine Internal Medicine*. S. M. Reed and W. M. Bayly. Philadelphia, W.B. Saunders Company; 938-969; 1998.
92. Fisher D.A., Nelson J.C., Carlton E.I., Wilcox R.B.: Maturation of human hypothalamic-pituitary-thyroid function and control. *Thyroid*; 10:229; 2000.
93. Fisher D.A., Polk D.H.: Development of the thyroid. *Clinics of Endocrinology and Metabolism*; 3:627–657; 1989.
94. Frank N., Sojka J., Messer N.T.: Equine thyroid dysfunction. *The Veterinary Clinics Equine Practice*, Elsevier; 18:305-319; 2002.
95. Frank, L., Sosenko, R.: Development of lung antioxidant enzyme system in late gestation: possible implications for the prematurely born infant. *The Journal of Paediatrics*; 110, 9-14; 1987.
96. Franklin R.C., Carpenter I.M., O'Grady C.M.: Neonatal thyroid function: influence of perinatal factors. *Archives of Disease in Childhood*; 60:141-144; 1985.
97. Franklin R.C., Purdie G.L., O'Grady C.M.: Neonatal thyroid function: prematurity, prenatal steroids, and respiratory distress syndrome. *Archieve of Diseases of Children*; 61:589-592, 1986.
98. Frei, B.: Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanism of action. *The American Journal of Medicine*; 97(3A), 5S-13S; 1994
99. Furr M.: Perinatal asphyxia in foals. *Compendium Continuing Education for Veterinary*; 18:1342-1351; 1996.
100. Furr, M.: L'asfissia perinatale nel puledro. *Ippologia*; anno 8(3)settembre, 23-33; 1997.

101. Galera R.M.L., Glimenez J.C.J., Ronsano M., et al.: glutathione and cysteine in HIV-infected hemophiliacs. *Clin Chim Acta*; 254:63-72, 1996.
102. Galvin N., Collins D.: Perinatal asphyxia syndrome in the foal: review and a case report. *Ir Vet J. Dec*; 1;57(12):707-14; 2004.
103. Gao T., Zablith N.R., Burns D.H., Skinner C.D., Koski K.G.: Second trimester amniotic fluid transferrin and uric acid predict infant birth outcomes. *Prenat Diagn*; Sep;28(9):810-4; 2008.
104. Garcia-Lopez J.M., Provost P.J., Rush J.E., et al. Prevalence and prognostic importance of hypomagnesemia and hypocalcemia in horses that have colic surgery. *Am J Vet Res*; 62(1):7–12; 2001.
105. Geven WB., Monnens L.A., Willems J.L.: Magnesium metabolism in childhood. *Miner Electrolyte Metab*; 19(4-5):308-13; 1993.
106. Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D.: Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*; 40, 959-975; 2001.
107. Gilroy C.V., Horney B.S., Burton S.A., MacKenzie A.L.: Evaluation of ionized and total serum magnesium concentrations in hyperthyroid cats. *Can J Vet Res. Apr*;70(2):137-42; 2006
108. Glatstein M., Mimouni F.B., Dollberg S., Mandel D.: Effect of bicarbonate on neonatal serum ionized magnesium in vivo. *Am. J Ther. Nov*; 18(6):463-5; 2011.
109. Glinoyer D., Delange F., Laboureur I., De Nayer P., Lejeune B., Kinthaert J.: Maternal and neonatal thyroid function at birth in an area of marginally low iodine intake. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 75:800-805; 1992.

110. Gonzalez-Buitrago J.M., Ferreira L., Muniz M.C.: Proteomica clinica y nuevos biomarcadores en los liquidos biologicos Med Clin (Barc); 131(11):426-34; 2008
111. Goodwin T.M., Belai I., Hernandez P., Durand M., Paul R.H.: Asphyxial complications in the term newborn with severe umbilical acidemia. Am J Obstet Gynecol. Dec; 167(6):1506-12; 1992.
112. Grave G.D., Satterthwaite S., Kennedy C., Sokoloff L.: Accelerated post natal development of D(-) $\beta$ -hydroxy-butyrate dehydrogenase (EC 1.1.1.30) activity in the brain in hyperthyroidism. Journal of Neurochemistry; 20:495-501; 1973.
113. Gravett M.G. et al.: Diagnosis of intra-amniotic infection by proteomic profiling and identification of novel biomarkers. JAMA;292:462-9; 2004.
114. Green S.L. Mayhew I.G.: Neurologic disorders. In: Koterba A.M., Drummond W.H., Kosch P.C. eds. Equine Clinical Neonatology. Lea e Febiger, Philadelphia; 496-530, 1990.
115. Greenamyre J.T., Porter R.H.P.: Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. Neurology; 44: 7–12; 1994
116. Grow J., Barks D.E.: Pathogenesis of hypoxic–ischemic cerebral injury in the term infant: current concepts. Clin Perinatol; 29:585–602; 2002.
117. Grunewald R.A.: Ascorbic acid in the brain. Brain Research; Review. 18, 123–133; 1993.
118. Gutteridge, J. M., Mitchell, J.: Redox imbalance in the critically ill. British medical Bulletin.; 55(1), 49-75; 1999.
119. Hall N. J., Ali J., Pierro A., Eaton S.: Total glutathione is not decreased in infants with necrotizing enterocolitis Journal of Pediatric Surgery; 40, 769–773; 2005

120. Hallak M., Hotra J.W., Kupsky W.J.: Magnesium sulfate protection of fetal rat brain from severe maternal hypoxia. *Obstet Gynecol*; 96:124–8; 2000.
121. Halliwell, B. Antioxidants: the basics -what they are and how to evaluate them. *Advances in Pharmacology*; 38, 3-20; 1997.
122. Hanash S.M., Celis J.E.: The Human Proteome Organization: a mission to advance proteome knowledge. *Mol Cell Proteomics*; 1:413-4; 2002.
123. Hansen B.: Disorder of Magnesium, In: di Bartola S.P.: *Fluid Therapy in Small Animal Practice*, ed.2 Philadelphia, WB Saunders, 175-186; 2000.
124. Harrington D.D.: Pathological features of magnesium deficiency in young horses fed purified rations. *Am J Vet Res*; 35:503; 1974.
125. Harvey J.W.: Normal hematologic values. In: Koterba AM, Drummond WH, Kosch PC, editors. *Equine clinical neonatology*. Philadelphia: Lea e Febiger; p. 561–70, 1990.
126. Harvey R.W., Asquith R.L., McNulty P.K.: Haematology of foals up to one year old. *Equine Vet J*; 16(4):347–53; 1984.
127. Hayes J.D., McLellan L.I.: Glutathione e glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res*; 31:273-300; 1999.
128. Hebert P., Mehta N., Wang J., et al.: Functional magnesium deficiencies in critically ill patients identified using magnesium loading test. *Crit Care Med*; 25:749–755; 1997.
129. Henderson I.S.F., Franklin R.P., Wilkins P.A., Boston R.C.: Association of hyperlactatemia with age, diagnosis, and survival in equine neonates, *J Vet Emerg Crit Care*; 18(5): 496–502; 2008.

130. Hennemann G., Docter R., Krenning E.P.: Causes and effects of the low T3 syndrome during caloric deprivation and non-thyroidal illness: an overview. *Acta Medical Austriaca*; 15:42-45; 1998.
131. Hesse-Dudan F., Rossdale P.D.: Neonatal Maladjustment syndrome and other neurological signs in the newborn foal. Part 1: Definitions, aetiopathogenesis, clinical signs and diagnosis. *Equine Veterinary Education*; manual 6: 55-63; 2003.
132. Hill A., Volpe J. Perinatal asphyxia: clinical aspects. *Clinics in Perinatology*; 16:435-457; 1989.
133. Himler M., Hurcombe S.D.A., Griffin A., Barsnick R.J., Rathgeber R.A., MacGillivray K.C., Toribio R.E.: Presumptive nonthyroidal illness syndrome in critically foals. *Equine Vet J*; 44:43-46; 2012.
134. Hood L., Heath J.R. Phelps M.E., Lin B.: System biology and new technologies enable predictive and preventive Medicine Science; 306:640-3; 2004.
135. Hultberg, M., Hultberg, B.: The effect of different antioxidants on glutathione turnover in. *Chemico-Biological Interactions*; 163, 192-198; 2006.
136. Hurcombe S.D., Toribio R.E., Slovis N.M., Saville W.J., Mudge M.C., Macgillivray K., Frazer M.L.: Calcium regulating hormones and serum calcium and magnesium concentrations in septic and critically ill foals and their association with survival. *J Vet Intern Med*; Mar-Apr;23(2):335-43; 2009
137. Hussein S.P., Hofseth L.J., Harris C.C.: Radical causes of cancer. *Nar Rev Cancer*; 3:276-285; 2003.
138. Ilves P., Blennov M., Kutt E., Magi M.L., Kudrjavitseva G., Lagercrantz H., Talvik T.: Concentrations of magnesium and

- ionized calcium in umbilical cord blood in distressed term newborn infants with hypoxic –ischemic encephalopathy. *Acta Paediatr*; 85; 1348-50; 1996
139. Ilves P., Kiisk T., Talvik T.: Serum total magnesium and ionized calcium concentrations in asphyxiated term newborn infants with hypoxic –ischemic encephalopathy. *Acta Paediatr*; 89; 680-5; 2000.
140. Inder, T.E., Volpe, J.J.: Mechanism of perinatal brain injury. *Seminars in Neonatology*,5(1): 3-16; 2000.
141. Irvine C.H., Evans M.J.: Post-natal changes in total and free thyroxine and triiodothyronine in foal serum, *J Reprod Fertil*; 23:709–15; 1975.
142. Irvine C.H.G.: Hypothyroidism in the foal. *Equine Veterinary Journal*; 16(4):302-306; 1984.
143. Jacob S.W., De la Torre J.C.: Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage. *Pharmacol Rep*; 61:225-35; 2009.
144. James M.F.M.: Magnesium in obstetrics *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*; Jun;24(3):327-37; 2010.
145. Janes D.P., Carlson J.L., Mody V.C., Cai J., Lynn M.J., Sternberg P.: Redox state of glutathione in human plasma. *Free Rad Biol Med*; 28:625-635; 2000.
146. Jauniaux E., Jurkovic D., Gulbis B., Gervy C., Ooms H.A., Campbell S.: Bio-chemical composition of exocoelomic fluid in early human pregnancy. *Obstet Gynecol*;78:1124–8; 1991.
147. Jauniaux E., Jurkovic D., Gulbis B., Collins W.P., Zaidi J., Campbell S.: Investigation of the acid–base balance of coelomic and amniotic fluids in early human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*; 170:1365–9; 1994.

148. Jauniaux E., Jurkovic D., Gulbis B., Gervy C., Ooms H.A., Campbell S.: Bio-chemical composition of exocoelomic fluid in early human pregnancy. *Obstet Gynecol*; 78:1124–8; 1991.
149. Jeffcott L.B., Rossdale P.D., Leadon D.P.: Haematological changes in the neonatal period of normal and induced premature foals. *J Reprod Fertil Suppl*;32:537–44; 1982.
150. Jernstrom B., Morgenstern R., Moldeus P.: Protective role of glutathione, thiols, and analogues in mutagenesis as carcinogenesis. *Basic Life Sci*; 61:137-147; 1993.
151. Jobe A.: Respiratory distress syndrome – New therapeutic approaches to a complex pathophysiology. *Advance in Pediatrics*; 30:93-130; 1983.
152. Johansson A.M., Gardner S.Y., Jones S.L., et al.: Hypomagnesemia in hospitalized horses. *J Vet Intern Med*; 17(6):860–7; 2003.
153. Johnston M.V.: Cellular alterations associated with perinatal asphyxia. *Clin Invest Med*; 16: 122–32; 1993
154. Kaptein E.M., Hays M.T., Ferguson D.C.: Thyroid hormone metabolism: a comparative evaluation. *Veterinary Clinics North America: Small Animal Practice*; 24(3):431-466; 1994.
155. Kashino G., Liu Y., Suzuki M., Masunaga S., Kinashi Y., Ono K., Tano K., Watanabe M.: An alternative mechanism for radioprotection by dimethyl sulfoxide; possible facilitation of DNA double-strand break repair. *J Radiat Res*; 51:733-40; 2010.
156. Kattwinkel J., Sort J.: *Neonatal Resuscitation Textbook*, fourth ed. American Academy of Pediatrics, USA; pp. 1–6; 2000.
157. Kayne L., Lee D.: Intestinal magnesium absorption. *Miner Electrolyte Metab*; 19:21–217; 1993.



158. Khadjeh Gh. H., Ranjbar R., Salehi M., Banankhojasteh S. M.: Biochemical evaluation of amniotic fluid during different stages of gestation in the goat Iranian Journal of Veterinary Research, University of Shiraz, Vol. 8, No. 3, Ser. No. 20, 266; 2007
159. Khanna C., Lund E.M., Raffe M., Armstrong P.J.: Hypomagnesemia in 188 dogs: a hospital population-based prevalence study. J Vet Intern Med.; Jul-Aug; 12(4):304-9, 1998.
160. Kingsley G. R.: The direct biuret method for the determination of serum protein as applied to photoelectric and visual colorimetry. J. Lab. Clin. Med. 27:840–845; 1942
161. Kiymaz, N., Ekin, S., Yilmaz, N.: Plasma vitamin E and selenium levels in rats with head trauma. Surgical neurology; 68, 67-71; 2007.
162. Klooster A., Leuvenink H.G.D., Gans R.O.J.,: Tissue thiamine deficiency as potential cause of delayed graft function after kidney transplantation: thiamine supplementation of kidney donors may improve transplantation outcome. Med Hypotheses; 69:873–878; 2007.
163. Knottenbelt D., Holdstock N., Madigan J.E.: Equine neonatology: medicine and surgery. Edinburgh: W.B. Saunders; 2004.
164. Koch S.M., Warters R.D., Mehelhorn U.: The simultaneous measurement of ionized and total calcium and ionized and total magnesium in intensive care unit patients. J Crit Care; 17, (3); 203-205; 2002
165. Kochhar, H.P.S., Simran, P.S., Nanda, A.S., Kaur, Ripudaman; Comparative biochemical indices of fetal fluids in normal foaling

- and stressful delivery in Indian thoroughbred mares. *Journal of Equine Veterinary Science* vol. 17 issue 4 April,. p. 206-210; 1997
166. Kortz G.D., Madigan J.E, Lakritz J.: Cerebral oedema and cerebellar herniation in four equine neonates. *Equine Veterinary Journal*; 24:63-66; 1992.
167. Koterba A.M., Paradis M.P.: Specific Respiratory Conditions. In: Koterba A.M., Drummond W.H., Kosch P.C. eds. *Equine Clinical Neonatology*. Lea & Febiger, Philadelphia; 177-199; 1990.
168. Koterba A.M.: Management of the intensive care unit: levels of care, quality control, and care after discharge. In: Koterba A.M., Drummond W.H., Kosch P.C. eds. *Equine Clinical Neonatology*. Lea e Febiger, Philadelphia; 769-778, 1990.
169. Koterba A.M.: Nutritional support: enteral feeding. In: Koterba A.M., Drummond W.H., Kosch P.C. eds. *Equine Clinical Neonatology*. Lea & Febiger, Philadelphia; 728-746; 1990.
170. Koterba A.M.: Respiratory disease: approach to diagnosis. In: Koterba A.M., Drummond W.H., Kosch P.C. eds. *Equine Clinical Neonatology*. Lea & Febiger, Philadelphia; 153-176; 1990.
171. Kratzsch J., Pulzer F.: Thyroid gland development and defects. *Best Practice and Research of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 22:57-75; 2008.
172. Kumar A., Ramakrishna S.V.K., Basu S., Rao G.R.K.: Oxidative stress in perinatal asphyxia, *Pediatr Neurol*; 38: 181-185; 2008.
173. Kuusela A.L.: Long-term gastric pH monitoring for determining optimal dose of ranitidine for critically ill preterm and term neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*; 78(Suppl):F151-3; 1998.

174. Lackman F., Capewell V., Gagnon R., Richardson B.: Fetal umbilical cord oxygen values and birth to placental weight ratio in relation to size at birth, *Am J Obstet Gynecol*; 185(3): 674-82; 2001.
175. Landek M., Caturegli P.: *Anatomy of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis. Clinical Management of Thyroid disease*, Elsevier; 1:3-6; 2009.
176. Leonard S.E., Kirby R.: The role of glutamate, calcium and magnesium in secondary brain injury. *J Vet Emerg Crit Care*; 12:17–32; 2002.
177. Lepage G., Munoz G., Champagne J., Roy C.C.: Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*; 197(2): 277-283; 1991.
178. Levine B.S., Coburn J.W.: Magnesium, the mimic/antagonist of calcium. *N Eng J Med.*; 310: 1253–5; 1984.
179. Liberatori S., Bini L., De Felice C., Magi B., Marzocchi B., Raggiaschi R., et al.: A two-dimensional protein map of human amniotic fluid at 17 weeks' gestation. *Electrophoresis*; 18:2816–22; 1997.
180. Liu S. S.: Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. *Bioscience report*; 17(3), 259-72; 1997.
181. Löckner R., Kretzschmar M.: Perinatal glutathione levels in liver and brain of rats from large and small litters. *Biol Neonate*; 59:287–293; 1991
182. Lombard C.W.: Cardiovascular disease. In: Koterba A.M., Drummond W.H., Kosch P.C. eds. *Equine Clinical Neonatology*. Lea e Febiger, Philadelphia; 241-262; 1990.

183. MacKay R.J.: Neurologic disorders of neonatal foals. *Vet Clin North Am Equine Pract*; Aug; 21(2):387-406; 2005.
184. Magdesian K.G.: Neonatal Foal Diarrhea. *Vet Clin Equine*; 21, 295–312; 2005.
185. Mandelker, L. (2008) Introduction to oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Veterinary Clinics Small Animals Practice*; 38, 1-30.
186. Manzanares W., Hardy G.: Thiamine supplementation in the critically ill. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*; 14:610–617; 2011.
187. Mariella J, Pirrone A, Gentilini F, Castagnetti C Hematologic and biochemical profiles in Standardbred mares during peripartum. *Theriogenology*; Mar 1;81(4):526-34; 2014
188. Marino P.: Calcium and magnesium in critical illness: a practical approach. In: Sivak E., Higgins T., Seiver A., editors. *The high risk patient: management of the critically ill*. Baltimore (MD): Williams & Wilkins; p. 1183–95; 1995.
189. Marques P.X., O'Donovan J., Souda P., Gutierrez J., Williams E.J., Worrall S., McElroy M., Proctor A., Brady C., Sammin D., Basset H., Whitelegge J.P., Markey B.K., Nally J.E.: Amniotic and allantoic fluids from experimentally infected sheep contain immunoglobulin specific for *Chlamydia abortus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; Volume 140, Issues 1–2, 15 March, Pages 1–9; 2011
190. Marr C.M.: Cardiac emergencies and problems of the critical care patient. *Vet Clin North Am Equine Pract*; 20(1):217–30; 2004.
191. Martin L., Wingfield W., Van Pelt D., Timothy B. H.: Magnesium in the 1990's: Implications for Veterinary Critical Care.

- Journal of Veterinary Emergency and Critical Care; July 3(2):106–114; 1993.
192. Martin L., Matteson V., Wingfield W.: Abnormalities of serum magnesium in critically ill dogs: incidence and implications. *J Vet Emerg Crit Care*; 1:15–20; 1994.
193. Mayhew I.G.: Neurological and neuropathological observations in the equine neonate. *Equine Veterinary Journal*; Supplement 5;28-33; 1988.
194. Mayne, S.T.: Antioxidant nutrients and chronic disease:use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *Journal of Nutrition*; 133(suppl 3), 933S-940S; 2003.
195. McClure J.J.: Failure of passive transfer (FPT). In: Smith PB, editor. *Large Animal Internal Medicine*; CV Mosby. St Louis;1601–1604.; 1990
196. McLaughlin B.G., Doige C.E.: Congenital Musculoskeletal Lesions and Hyperplastic Goitre in Foals *Can Vet J*; May; 22(5): 130–133; 1981.
197. McLaughlin B.G, Doige C.E. A study of ossification of carpal and tarsal bones in normal and hypothyroid foals. *Can Vet J*; 23:164–8; 1982.
198. McLaughlin B.G., Doige C.E., McLaughlin P.S.: Thyroid-hormone levels in foals with congenital musculoskeletal lesions. *Can Vet J*; 27:264–7; 1986.
199. McLean R.: Magnesium and its therapeutic uses: a review. *Am J Med*; 96: 63–76; 1994.
200. Mertz H.R, Walsh J.H.: Peptic ulcer pathophysiology. *Med Clin NorthAm*; 75:799–814; 1991.

201. Michaels J.E., Dasari S., Pereira L., Reddy A.P., Lapidus J.A., Lu X., et al.: Comprehensive proteomic analysis of the human amniotic fluid proteome: gestational age-dependent changes. *J Proteome Res*;6:1277–85; 2007.
202. Michelet F., Gueguen R., Leroy P., Wellman M., Nicolas A., Siest G.: Blood and plasma glutathione measured in healthy subjects by HPLC: relation to sex, aging, biological variables, and life habits. *Clin Chem.*; Oct;41(10):1509-17; 1995
203. Mimouni F.: Pediatric magnesium disorders. In: *Pediatric endocrinology*, ed. F Lifshitz, 3rd edition. New York: Marcel Dekker Inc; pp. 547-52; 1996.
204. Mimouni F.B., Loughhead J.L., Tsang R.C., Khoury J.: Postnatal surge in serum calcitonin concentrations: no contribution to neonatal hypocalcemia in infants of diabetic mothers. *Pediatr Res*; 28: 493-5, 1990.
205. Mischak H., et al.: Clinical proteomics: a need to define the field and to begin to set adequate standards *Proteomics Clin Appl*; 1:148-56; 2007
206. Mishra OP, Delivoria Papadopoulos M.: NMDA receptor modification in the fetal guinea pig brain during hypoxia. *Neurochemical Research*; 17:1211-6; 1992.
207. Miura S., Ishida A., Nakajima W., Ohmura A., Kawamura M., Takada G.: Intraventricular ascorbic acid administration decreases hypoxic–ischemic brain injury in newborn rats *Brain Research*; 1095 :159 -166; 2006.
208. Moore K.L., Persaud T.V.N.: Placenta and fetal membranes. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. Saunders: Philadelphia, PA; 138–153; 2003.

209. Mota, R.D., Martinez-Burnes, J., Alonso-Spilsbury, M., Lopez-Mayagoitia, A., Ramírez-Necoechea, R., Trujillo, O.M.E., de la Cruz, N.D., García, C.A., Gallegos, S.R.: Meconium aspiration syndrome, a common pathology between newborn infants and piglets. In: 17th International Pig Veterinary Society Proceedings, June 2–5, Iowa, USA, p. 300, 2002c.
210. Mota, R.D., Trujillo, O.M.E., Martinez-Burnes, J., Lopez, M.A., Rosales, T.A.M., Ramirez, N.R., Orozco, H.G., Murray MJ, Grodinsky C, Cowles RR, et al. Endoscopic evaluation of changes in gastric lesions of Thoroughbred foals. *J Am Vet Med Assoc*; 196:1623–7, 1990.
211. Murray M.J.: Aetiopathogenesis and treatment of peptic ulcer in the horse: a comparative review. *Equine Vet J Suppl*; 13:63–74; 1992.
212. Murray M.J.: Pathophysiology of peptic disorders in foals and horses: a review. *Equine Vet J Suppl*; (29):14–8; 1999.
213. Nakayama T., Nakayama H., Miyamoto M., Hamlin R.L.: Hemodynamic and electrocardiographic effects of magnesium sulfate in healthy dogs. *J Vet Intern Med*; Sep-Oct;13(5):485-90; 1999.
214. Neve, J.: New approaches to assess selenium status and requirement. *Nutrition Reviews*; 58(12), 363-369; 2000.
215. Nilsson S, Ramström M, Palmblad M, Axelsson O, Bergquist J. Explorative study of the protein composition of amniotic fluid by liquid chromatography electro-spray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J Proteome Res*; 3:884–9; 2004.

216. Nitsch L., Tramontano D., Ambesi Impiombato F.S.: Morphological and functional polarity of an epithelial thyroid cell line. *European Journal of Cell Biology*; 38:57-66; 1985.
217. Nuttall S.L., Martin U., Sinclair A.J., Kendall M.J.: Glutathione: in sickness and in health. *Lancet*; 351:645-646; 1998.
218. Ogilvy-Stuart AL.: Neonatal thyroid disorders. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*; 87:165–71; 2002.
219. Olofsson K., Matthiesen G., Rudnicki M.: Whole blood ionized magnesium in neonatal acidosis and preterm infants: a prospective consecutive study. *Acta Paediatr*; 90: 1398- 1401; 2001.
220. Ono H., Sakamoto A., Sakura N.: Plasma total glutathione concentrations in healthy pediatric and adult subjects. *Clin Chim Acta*; 312:227-229, 2001.
221. Osame S., Ichajo S.: Clinicopathological observations on thoroughbred foals with enlarged thyroid gland. *Journal Veterinary Medicine Science*; 56:771-772; 1994
222. Ozawa H, Nishida A, Mito T, Takashima S.; Development of ferritin-positive cells in cerebrum of human brain. *Pediatric Neurology*; 10:44-8; 1994.
223. Palmer A.C. Rossdale P.D.: Neuropathology of the convulsive foal syndrome, *Journal of Reproduction and Fertility*; suppl 23;691-694, 1975.
224. Palmer J.E.: Fluid therapy in the neonate: not your mother's fluid space, *Vet Clin North Am Equine Pract*; 20(1): 63-75; 2004.
225. Palmer J.E.: Recognition and resuscitation of the critically ill foal, In: Paradis M.R., (ed), *Equine Neonatal Medicine: A Case-Based Approach*, Elsevier Saunders Inc; 135–148; 2006.



226. Panzani S., Comin A., Galeati G., Romano G., Villani M., Faustini M., et al. How type of parturition and health status influence hormonal and metabolic profiles in newborn foals. *Theriogenology*; 77: 1167–77; 2012.
227. Papageorgiu A., Bardin C.L.: The extremely low birth weight infant. In: *Neonatology. Physiology and management of the newborn*, ed. Avery GB, Fletcher MA, MacDonald MG, 5th Edition, Philadelphia: Lippincot Williams, Wilkins; p.458; 1999
228. Paradis, M. R.: Infectious diseases of the equine respiratory tract: from gestation to five months. *Veterinary Medicine*; 84(12): 1174-1177; 1989.
229. Park S.J., Yoon W.G., Song J.S. et al.: Proteome analysis of human amnion and amniotic fluid 2D-DIGE and MALDI-TOF-MS *Proteomics*; 6:4356-69; 2006.
230. Park, S. J., Yoon, W. G., Song, J. S., Jung, H. S., Kim, C. J., Oh S. Y., Yoon, B. H., Jung, G., Kim, H. J., and Nirasawa, T.: Proteome analysis of human amnion and amniotic fluid by two dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proteomics*; 6:349–363; 2006.
231. Parry, S., Strauss, J. F., III. Premature rupture of the fetal membranes. *N. Engl. J. Med*; 338 (10), 663-70; 1998.
232. Pastore A., Moussoud R., Motti C., et al.: Fully automated assay for total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, glutathione, cysteamine and 2-mercaptopropionylglycine in plasma and urine. *Clin Chem*; 44:825-832; 1998.
233. Pastore A., Piemonte F., Locatelli M., Lo Russo A., Gaeta L. M., Tozzi G., Federici G.: Determination of Blood Total, Reduced, and

- Oxidized Glutathione in Pediatric Subjects, *Clinical Chemistry*; 47, No. 8; 2001
234. Pere M.C.: Maternal and fetal blood levels of glucose, lactate, fructose, and insulin in the conscious pig, *J Anim Sci*, 73: 2994-2999; 1995.
235. Pereira D.N., Procianoy R.S.: Effect of perinatal asphyxia on thyroid hormones. *Journal of Pediatrics*; 77(3):175-178; 2001.
236. Pereira D.N., Procianoy R.S.: Transient elevation of aldosterone levels in perinatal asphyxia, *Acta Paediatr*; 86:851-3, 1997.
237. Perlman J.M., Tack E.D.: Renal injury in the asphyxiated newborn infant: relationship to neurologic outcome. *Journal of Pediatrics*; 113:875-879; 1988.
238. Perluigi M., Di Domenico F., Cini C., Coccia R., Giorlandino F.R., Giorlandino M., Cignini P., Mesoraca A., Giorlandino C.: Proteomic analysis for the study of amniotic fluid protein composition. *J Prenat Med*; Jul;3(3):39-41; 2009
239. Plank L.D., Connolly A.B., Hill G.L.: Sequential changes in the metabolic response in severely septic patients during the first 23 days after onset of peritonitis. *Annual of Surgery*; 228:146-158; 1998.
240. Polidori, M.C., Mecocci, P., Frei B.: Plasma vitamin C levels are decreased and correlated with brain damage in patients with intracranial hemorrhage or head trauma. *Stroke*; 32(4), 898-902; 2001.
241. Prestes N.C, M.C.L Chalhoub, M.D Lopes, R.K Takahira: Amniocentesis and biochemical evaluation of amniotic fluid in ewes at 70, 100 and 145 days of pregnancy. *Small Ruminant Research*; Volume 39, Issue 3, March, Pages 277-281; 2001

242. Procianoy R.S., Giacomini C.B., Oliveira M.L.: Fetal and neonatal cortical adrenal function in birth asphyxia, *Acta Paediatr Scand*; 77:671–4; 1988.
243. Provis, V.N., Moynihan, M.: Neonatal resuscitation in the isolated setting. *Aust. J. R. Health*; 7, 115–120; 1999
244. Pusterla N., Pusterla J.B., Spier S.J., Puget B., Watson J.L.: Evaluation of the SNAP Foal IgG test for the semiquantitative measurement of immunoglobulin G in foals. *The Veterinary Record*; 151(9):258-260; 2002.
245. Quamme G.A.: Magnesium homeostasis and renal magnesium handling. *Miner Electrolyte Metab*; 19: 218–25; 1993.
246. Queloz P.A., Crettaz D., Thadikkaran L., Sapin V., Gallot D., Jani J., et al.: Proteomic analyses of amniotic fluid: potential applications in health and diseases. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*; 850:336–42; 2006.
247. Ranjan, A., Theodore, D., Haran, R.P., Chandy, M.J.: Ascorbic acid and focal cerebral ischaemia in a primate model. *Acta Neurochirurgica*; 123, 87–91; 1993.
248. Ranjan, A., Theodore, D., Haran, R.P., Chandy, M.J.: Ascorbic acid and focal cerebral ischaemia in a primate model. *Acta Neurochirurgica*; 123, 87–91; 1993.
249. Rayton C.F.: Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet*; 76(1):61-90; 1986
250. Reddy A.P, Reddy V.S.C., Rao A.S., Sharma G.P., Reddy G.U.N, Reddy T.J., Reddy V.S. :Biochemical studies in the ewe (*Ovis aries*) amniotic fluid during different phases of gestation *Indian J. Anim. Sci.*; 10, pp. 321–323; 1995

251. Reinhart R.A., Desbiens N.A.: Hypomagnesemia in patients entering in ICU. *Crit Care Med.*; 13: 506-508; 1985
252. Richter J., Götze R.: *Ostetricia veterinaria. edizione italiana a cura di Oliva O., Editoriale Grasso, 1986.*
253. Ringger N.C., Giguere S., Morresey P.R., Yang C., Shaw G.: Biomarkers of Brain Injury in Foals with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *J Vet Intern Med*; 25:132–137; 2011.
254. Ripalda M.J., Rudolph N., Wong S.L.: Developmental patterns of antioxidant defense mechanisms in human erythrocytes. *Pediatr Res*; 26:366–369; 1989
255. Rivera L., Gootman P.M., Lin R.H., Gootman N.: Effects of elevated plasma magnesium concentration on cerebrospinal fluid levels of magnesium in neonatal swine. *Proc Soc Exp Biol Med.* May; 197(1):98-101; 1991.
256. Robertson C., Finer N. Term infants with hypoxic-ischemic encephalopathy: outcome at 3.5 years. *Developmental medicine and child neurology*; 27:473-484; 1985.
257. Romani A., Marfella C., Scarpa A.: Cell magnesium transport and homeostasis: Role of intracellular compartments. *Miner Electrolyte Metab*; 19: 282–9; 1993.
258. Romero R., Espinoza J., Gotsch F. et al.: The use of high-dimensional biology (genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics) to understand the preterm parturition syndrome *BJOG*; 113 (suppl.3):118-135; 2006.
259. Ross M.G., Brace R.A.: National Institute of Child Health and Development Conference summary: amniotic fluid biology—basic and clinical aspects. *J Matern Fetal Med*; 10: 2–19; 2001.

260. Rossdale P.D., Ousey J.C.: Fetal programming for athletic performance in the horse: potential effects of IUGR, *Equine vet Educ*; 14(2): 98-112, 2002.
261. Rude R.K., Oldham S.: Disorders of magnesium metabolism In: Bohlen R.D., ed. *The metabolic and molecular basis of acquired disease*. London: Balliere Tindall; 1124–1148; 1990.
262. Rude R.K.: Magnesium metabolism and deficiency *Endocrinol Metab Clin North Am*. Jun;22(2):377-95; 1993.
263. Ryzen E., Wagers P., Singer F.R., Rude R.K.: Magnesium deficiency in a medical ICU population. *Crit Care Med*; 13: 19-21; 1985
264. Sachter J.: Magnesium in the 1990s: Implications for acute care. *Topics in Emergency Medicine*. March; 14(1):23-50; 1992.
265. Saili A, Sarna MS, Gathwala G, Kumari S, Dutta AK. Liver dysfunction in severe birth asphyxia *Indian Pediatr*.; Dec;27(12):1291-4; 1990.
266. Salem M., Kasinski N., Munoz R., et al.: Progressive magnesium deficiency increases mortality from endotoxin challenge: protective effects of acute magnesium therapy. *Crit Care Med*; 23:108–18; 1995.
267. Sanchez LC, Lester GD, Merritt AM.: Effect of ranitidine on intragastric pH in clinically normal neonatal foals. *J Am Vet Med Assoc*; 212:1407–12; 1998.
268. Santos N.C., Figueira-Coelho J., Martins-Silva J., Saldanha C.: Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol*; 65:1035-41; 2003.

269. Santschi E.M., LeBlanc M.M.: Condizioni fetali e placentari che possono causare gravidanza ad alto rischio nelle fattrici. *Ippologia*; 8:53-62; 1997.
270. Santschi E.M., Vaala W.E.: Identification of the High-Risk Pregnancy. In: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D.D., eds, "Equine Reproduction", Wiley-Blackwell; 5-15; 2011.
271. Sarici S.U., Serdar M.A., Erdem G., Alpay F., Tekinalp G., Yurdakok M., Yigit S., Gokcay E.: Plasma Ionized Magnesium Levels in Neonatal Respiratory Distress Syndrome. *Biol Neonate*; 86 : 110-115; 2004
272. Saris N-E. L., Mervaala E., Karppanen H., Khawaja J.A., Lewenstam A.: Magnesium an update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin Chim Acta* 294; 1-26; 2000
273. Sasidharan P.: Breathing pattern abnormalities in full term asphyxiated newborn infants, *Arch Dis Child*; 67:440-442; 1992.
274. Sato T., Oda K., Kubo M.: Hematological and biochemical values of thoroughbred foals in the first six months of life. *Cornell Vet*; 69:3-19; 1979
275. Saugstad, O. D.: Bronchopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidants. *Seminary of Neonatology*; 8, 39-49; 2003.
276. Saugstad, O. D.: Oxidative stress in the newborn-A 30 year perspective. *Biology of the Neonate*; 88, 228-236; 2005.
277. Saugstand, O. D.: Mechanisms of tissue injury by oxigen radicals: implications for neonatal disease. *Acta Paediatric*, 85, 1-4; 1996.
278. Schmidt H, Grune T., Muller R., Siems W.G., Wauer R.R.: Increased biotransformations catalyzed by cytochrome P450, epoxide hydrolevels of lipid peroxidation products

- malondialdehyde and 4-hydroxynonenal levels, and glutathione S-transferase activities and their relationships to malondialdehyde and 4-hydroxynonenal after perinatal hypoxia. *Pediatr Res*; 40:15–20; 1996
279. Scibior D., Skrzycki M., Podsiad M., Czeczot H.: Glutathione level and glutathione-dependent enzyme activities in blood serum of patients with gastrointestinal tract tumors. *Clinical Biochemistry*; 41:852-858; 2008.
280. Seelig J.M., Wei E.P., Kontos H.A., et al.: Effect of changes in magnesium ion concentration on cat cerebral arterioles. *Am J Physiol*; 245:H22–6; 1983
281. Sen C.K.: Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul*; 36:1-30, 2000.
282. Serafini M.T., Arola L., Romeu A.: Glutathione and related enzyme activity in the 11-day rat embryo, placenta and perinatal rat liver. *Biol Neonate* 60:236–242; 1991
283. Seri I., Evans J.: Controversies in the diagnosis and management of hypotension in the newborn infant. *Curr Opin Pediatr*; Apr;13(2):116-23; 2001
284. Shalak L., Perlman J.M.: Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Hum Dev*; Nov; 80(2):125-41; 2004.
285. Sica D.A.: Loop diuretic therapy, thiamine balance, and heart failure. *Congest Heart Fail*; 13:244–247, 2007.
286. Sies, H.: Oxidative stress. II. Oxidants and Antioxidant. London: Academic Press; 1991
287. Silver M., Fowden A.L., Knox J., Ousey J, Cash R., Rosedale P.D.: Relationship between circulating tri-iodothyronine and

- cortisol in the perinatal period in the foal. *J Reprod Fertil Suppl*; 44:619–26; 1991.
288. Slovis N.M. Perinatal Asphyxia Syndrome (Hypoxic Ischemic Encephalopathy) Proceedings of the 11th International Congress of World Equine Veterinary Association; Guarujá, SP, Brazil; 2009.
289. Smith C.V., Hansen T.N., Martin N.E., McMicken H.W., Elliott S.J. Oxidant stress responses in premature infants during exposure to hyperoxia. *Pediatr Res*; 34:360–365; 1993
290. Sparks J.W., Hay W.W. Jr, Bonds D., Meschia G., Battaglia F.C.: Simultaneous measurements of lactate turnover rate and umbilical lactate uptake in the fetal lamb, *J Clin Invest*; 70: 179-92; 1982.
291. Stewart A.J. : Magnesium disorders In: Reed S.M., Bayly W.M., Sellon D.C. *Equine Internal Medicine* ed. Saunders 1375-79; 2004.
292. Stewart A.J., Hardy J., Kohn C.W., et al. Validation of diagnostic tests for determination of magnesium status in horses with reduced magnesium intake. *Am J Vet Res*; 65(4):422–30; 2004.
293. Stewart A.J.: Magnesium disorder in horses. *Vet Clin Equine*; 27:149-163; 2011.
294. Stewart J.H., Rose R.J., Barko A.M.: Respiratory studies in foals from birth to seven days old. *Equine Vet J*; 16(4):323–8; 1984.
295. Suidan J.S., Antoine C., Silverman F., Lustig I.D., Wasserman J.F., Young B.K.: Human maternal-fetal lactate relationships, *J Perinat Med*; 12(4): 211-217; 1984.



296. Thorburn G.D., Hopkins P.S.: Thyroid function in the foetal lamb. *Foetal and Neonatal Physiology*. Cambridge University Press; 488-504; 1973.
297. Thordstein M., Bagenholm R., Thiringer K., et al.: Scavengers of free oxygen radicals in combination with magnesium ameliorate perinatal hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Pediatr Res*; 34:23–6; 1993
298. Toll J., Erb H., Birnbaum N., Schermerhorn T.: Prevalence and incidence of serum magnesium abnormalities in hospitalized cats. *J Vet Intern Med*; May-Jun;16(3):217-21; 2002.
299. Tong G.M., Rude R.K.: Magnesium deficiency in critical illness. *J Intensive Care Med*; 1:3-17; 2005
300. Tong X.L., Wang L., Gao T.B., Qin Y.G., Qi Y.Q., Xu Y.P.: Potential function of amniotic fluid in fetal development---novel insights by comparing the composition of human amniotic fluid with umbilical cord and maternal serum at mid and late gestation. *J Chin Med Assoc.*; Jul;72(7):368-73; 2009.
301. Torbati D, Wafapoor H, Peyman GA.: Hyperbaric oxygen tolerance in newborn mammals-hypothesis on mechanism and outcome. *Free Radical Biology and Medicine*; 14: 695-703; 1993.
302. Toribio R.E., Kohn C.W., Chew D.J., Sams R.A., Rosol T.J.: Comparison of serum parathyroid hormone and ionized calcium and magnesium concentrations and fractional urinary clearance of calcium and phosphorus in healthy horses and horses with enterocolitis. *Am J Vet Res.*; Jun; 62(6):938-47; 2001.
303. Toribio R.E., Duckett W.M.: Thyroid Gland. In: Reed S.M, Bayly W.M, Sellon D.C. Eds. *Equine Internal Medicine*. 2nd ed. USA: Elsevier; 1340-1353; 2004.

304. Toribio R.E., Kohn C.W., Hardy J., et al.: Alterations in serum parathyroid hormone and electrolyte concentrations and urinary excretion of electrolytes in horses with induced endotoxemia. *J Vet Intern Med*; 19(2):223–31; 2005.
305. Toribio R.E., Kohn C.W., Rourke K.M., et al.: Effects of hypercalcemia on serum concentrations of magnesium, potassium, and phosphate and urinary excretion of electrolytes in horses. *Am J Vet Res*; 27(68):543–54; 2007.
306. Toribio R.E.: Magnesium and disease. In: Reed SM, Bayley WM, Sellon DC, editors. *Equine internal medicine*. 3rd edition. St Louis (MO): Saunders; 1291–5; 2010.
307. Toribio R.E. : Endocrine Dysregulation in Critically Ill Foals and Horses, *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*; 27(1): 35-47; 2011.
308. Tsang R.C., Chen I., Hayes W., Atkinson W., Atherton H., Edwards N.: Neonatal hypocalcemia in infants with birth asphyxia. *J Pediatr*. Mar; 84(3):428-33; 1974.
309. Tsang R.C., Steichen J.J., Chan G.M.: Neonatal hypocalcemia mechanism of occurrence and management *Crit Care Med*. Jan-Feb; 5(1):56-61; 1977.
310. Tsangaris G.T., Kolialexi A., Karamessinis P.M., Anagnostopoulos A.K., Antsaklis A., Fountoulakis M., et al.: The normal human amniotic fluid supernatant proteome. *In Vivo*; 20:479–90; 2006.
311. Tsuchida S., Sato K.: Glutathione transferases and cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol*; 27:337-384; 1992.

312. Tsukahara, H.: Biomarkers of oxidative stress:clinical applicationin pediatric medicine. *Current Medical Chemistry*, 14, 339-351; 2007.
313. Underwood, M. A.; Gilbert, W. M.; Sherman, M. P.: Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J. Perinatol*; 25 (5), 341-8; 2005.
314. Vaala W.: Perinatal asphyxia syndrome in foals. *Compendium equine: continuing education for veterinarians*; april: 135-140; 2009.
315. Vaala W.E.: Peripartum asphyxia syndrome in foals. *Dati personali*; 2002.
316. Vaala W.E., House J.K., Madigan J.E.: Initial management and physical examination of the neonate. In: Smith BP (Ed.), *Large animal internal medicine*, Mosby, 277–93; 2002.
317. Vaala W.E., House J.K.: Perinatal adaptation, asphyxia, and resuscitation. In: Smith BP,editor. *Large animal internal medicine*. St Louis: Mosby;. 266–76; 2002.
318. Vaala W.E., Sertich P.L.: Management strategies for mares at risk for periparturient complications, *Vet Clin North Am Equine Pract*; 10(1): 237-65; 1994.
319. Vaala W.E.: Peripartum asphyxia syndrome in foals, *Proceedings of the 45th AAEP Convention*; December: 247-253, 1999.
320. Vaala W.E.: Peripartum asphyxia, *Vet Clin North Am Equine Pract*; 10(1): 187-218; 1994.
321. Vaala W.: How to Stabilize a Critical Foal Prior to. *AAEP PROCEEDINGS*; 46, 182-187; 2000.
322. Vaala W.: Peripartum Asphyxia Syndrome in Foals *AAEP PROCEEDING*; 45, 247-2531999.

323. Van der Poll T., Romijn J.A., Wiersinga W.M., Sauerwein H.P.: Tumor necrosis factor: a putative mediator of the sick euthyroid syndrome in man. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 71:1567-1572; 1990.
324. Van Wassenaer A.G., Kok J.H., Endert E., Vulsma T., De Vijlder J.J.: Thyroxine administration to infants of less than 30 weeks' gestational age does not increase plasma triiodothyronine concentrations. *Acta Endocrinology*; 129:139-146; 1993.
325. Vatassery, G. T.: Vitamin E: Neurochemistry and implication for Parkinson' disease. *Annals of the New York academy of Sciences*; 669, 92-110; 1992.
326. Veggetti A.: Corso di embriologia per gli studenti di medicina veterinaria, Esculapio, Bologna, seconda edizione; 1987.
327. Venkataraman P.S., Blick K.E., Fry H.D., Rao R.K.: Postnatal changes in calcium-regulating hormones in very-low-birth-weight infants. Effect of early neonatal hypocalcemia and intravenous calcium infusion on serum parathyroid hormone and calcitonin homeostasis. *Am J Dis Child*; 139: 913-6; 1985.
328. Venkataraman P.S., Tsang R.C., Chen I.W., Sperling M.A.: Pathogenesis of early neonatal hypocalcemia: studies of serum calcitonin, gastrin, and plasma glucagon. *J Pediatr*; 110: 599-603; 1987.
329. Vento M., Asensi M., Sastre J., Lloret A., Garcia-Sala F., Minana J.B., Vina J.: Hyperoxemia Caused by Resuscitation With Pure Oxygen May Alter Intracellular Redox Status by Increasing Oxidized Glutathione in Asphyxiated Newly Born Infants *Seminars in Perinatology*; Vol 26, No 6 (December): pp 406-410; 2002

330. Volpe J.: Neonatal seizures. In: Volpe J. ed. Neurology of the Newborn. W.B. Saunders Co., Philadelphia;129; 1987.
331. Volpe J.J. : Hypoxic–ischemic encephalopathy. In: Volpe JJ, editor. Neurology of the newborn. Philadelphia(PA)7 WB Saunders; 2001.
332. Volpe J.J.: Hypoxic-ischemic encephalopathy:biochemical and physiology aspects. In: Volpe J.J. ed. Neurology of the newborn. 4th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 217-276; 2001a
333. Volpe J.J.: Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Review; 7(1):56-64; 2001b.
334. Vuadens F., Benay C., Crettaz D., Gallott D.: Identification of biological markersof the premature ropture of fetal membranes: proteomic approach. Proteomics; 3:1521-5, 2003.
335. Wacker W.E., Parisi A.F.: Magnesium metabolism. N Engl J Med; 278:658–63 712–7, 772–6; 1968.
336. Walther F.J., Siassi B., Ramadan N.A., Wo Py.: Cardiac output in newborn infants with transient myocardial dysfunction. Journal of Pediatrics; 107:781-785; 1985.
337. Wang S., McDonnell E.H., Sedor F.A., Toffaletti J.G.: pH effects on measurements of ionized calcium and ionized magnesium in blood. Arch Pathol Lab Med; 126: 947-950; 2002
338. Wehmann R.E., Gregerman R.I., Burns W.H., Saral R., Santos G.W.: Suppression of thyrotropin in the low thyroxine state of severe nonthyroidal illness. New England Journal of Medicine; 312:546-552; 1985.

339. Weichselbaum T. E.: An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Am. J. Clin. Pathol, Tech. Sect.*; 16:40–49; 1946
340. White R., Hartzell H.: Magnesium ions in cardiac function. *Biochem Pharmacol*; 38:859–67, 1989.
341. Whitsett J.A., Pryhuber G.S., Rice W.R., Warner B.B., Wert S.E.: Acute respiratory disorders. In: *Neonatology. Physiology and management of the newborn*, ed. Avery GB, Fletcher MA, MacDonald MG, 5th Edition, Philadelphia: Lippincot Williams, Wilkins; p.500; 1999.
342. Whitwell K.E., Jeffcott L.B.: Morphological studies on the fetal membranes of the normal singleton foal at term, *Research in Vet Science*, 19, 44-55; 1975.
343. Wier F.A., Farley C.L.: Clinical controversies in screening women for thyroid disorders during pregnancy. *Journal of Midwifery and Women' s Health*; 51:152-158; 2006.
344. Wilkins P. :Perinatal Asphyxia Syndrome in: *Equine Reproduction*, 2nd Edition Angus O. McKinnon (Editor), Edward L. Squires (Editor), Wendy E. Vaala (Editor), Dickson D. Varner Editor Wiley-Blackwell; January p. 147-153; 2011.
345. Wilkins P.A.: Disorders of foals. In: Reed SM, Bayly WM, Sellon DC, editors. *Equine internal medicine*. St Louis: WB Saunders; p. 1381–431; 2004.
346. Wilkins P.A.: Hypoxic Ischemic Encephalopathy: Neonatal Encephalopathy. *International Veterinary Information Service* ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)); 2003.

347. Wilkins P.A.: Magnesium infusion in hypoxic ischemic encephalopathy. Paper presented at American College of Veterinary Internal Medicine. Denver (CO), June; 2001.
348. Wong D.M., Wilkins P.A., Bain F.T., Brockus C.W.: Neonatal encephalopathy in foals. *Compendium Continuing Education for Veterinarians*; E1-E10, 2011.
349. Wooley J.A.: Characteristics of thiamine and its relevance to the management of heart failure. *Nutr Clin Pract*; 23:487–493; 2008.
350. Wotman K., Wilkins P.A., Palmer J.E., Boston R.C.: Association of blood lactate concentration and outcome in foals, *J Vet Intern Med*; 23: 598-605, 2009.
351. Wu G., Fang Y-Z., Sheng Y., Lupton J. R., Nancy D.: Turner Glutathione Metabolism and Its Implications for Health<sup>1</sup> *Recent Advances in Nutritional Sciences J. Nutr.* March 1, vol. 134 no. 3 489-492; 2004
352. Xiong, Y., Shie, F. S., Zhang, J.: The protective role of cellular glutathione peroxidase against trauma induced mitochondrial dysfunction in the mouse brain. *J stroke Cerebrovasc Dis*; 13(3), 129-37; 2004.
353. Xiong, Y., Shie, F. S., Zhang, J.: The protective role of cellular glutathione peroxidase against trauma induced mitochondrial dysfunction in the mouse brain. *J stroke Cerebrovasc Dis*; 13(3), 129-37; 2004.
354. Yildizdas, D., Onenli-Mungan N., Yapicioglu H., Topaloglu A.K., Sertdemir Y., Yüksel B.: Thyroid hormone levels and their relationship to survival in children with bacterial sepsis and septic shock. *J Pediatr Endocrinol Metab*; 17:1435–42; 2004.

355. Zanella L.F., Takahira R.K., Melo C.M., Magalhães O., Prestes N.C: Biochemical Profile of Amniotic and Allantoic Fluid During Different Gestational Phases in Mares *Journal of Equine Veterinary Science* Volume 34, Issue 3, Pages 403-406, March; 2014
356. Zhang L., Rzigalinski B.A., Ellis E.F., et al.: Reduction of voltage-dependant Mg<sup>2+</sup> blockade of NMDA current in mechanically injured neurons. *Science*; 274: 1291–923; 1996