

Concentrazioni di cortisolo nelle feci e nel pelo di cani da utilità e difesa durante l'allenamento



Lo scopo di questo studio è stato quello di determinare i livelli di cortisolo nei cani da utilità e difesa durante l'allenamento, al fine di evidenziare una relazione tra diversi programmi di lavoro e l'attività adrenocorticale. Sono stati utilizzati 15 cani (12 maschi e 3 femmine): sei cani con il titolo di addestramento più alto (titolo IPO-3, gruppo IPO-3) e nove animali senza titolo IPO (gruppo IPO-0). Gli animali dei due gruppi hanno seguito due diversi programmi di allenamento: il programma dei cani IPO-3 consisteva in un periodo di lavoro intenso per ciascuna sezione (sezione A, B e C; periodo 1) e un periodo di riduzione dell'intensità del lavoro (periodo 2). I cani IPO-0 hanno invece lavorato ad un'intensità costante. Il cortisolo fecale e pilifero è stato misurato mediante RIA. In tutti i cani l'esercizio ha indotto un significativo aumento delle concentrazioni di cortisolo fecale rispetto ai livelli a riposo; i livelli fecali di questo ormone sono risultati più alti nei cani del gruppo IPO-3 rispetto ai cani IPO-0, sia nei giorni in cui gli animali non hanno svolto attività fisica che nei giorni di lavoro, indicando una maggiore stimolazione adrenocorticale legata all'esercizio fisico. È stata inoltre rilevata una correlazione positiva tra il cortisolo pilifero e quello fecale.

Pier Attilio Accorsi^{1*},
Carmen Petrulli¹,
Roberta Viggiani¹,
Matteo Gamberoni¹,
Cristian Linguerrì²,
Diego Bucci¹,
Valentina Beghelli¹,
Michela Mattioli¹

INTRODUZIONE

Nel cane i parametri ematologici e ormonali sono importanti sia per la valutazione dello stato di salute che per quello dello stato di benessere. Questi parametri possono essere utili anche nella medicina dello sport in quanto consentono la valutazione dello stress indotto da diverse tipologie di allenamento. La valutazione dello stato di allenamento richiede l'utilizzo di marker e nel cane un marcatore dello stress ben noto è il cortisolo.¹⁻³ Nel corso dell'allenamento, così come nella pratica sportiva, si possono avere diverse reazioni biologiche che vanno a modificare l'omeostasi dell'organismo: nell'animale la risposta correlata viene definita risposta allo stress e implica una serie di alterazioni fisiologiche, endocrine e comportamentali. L'adattamento degli animali alle condizioni

ambientali dipende dal sistema neuroendocrino, dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) e dall'asse simpatico-midollare del surrene, attraverso il rilascio di una serie di ormoni.⁴ L'interazione tra catecolamine e glucocorticoidi aiuta l'animale a tollerare il lavoro muscolare e a interagire con l'ambiente e consente allo stesso di focalizzare l'attenzione sugli eventi e di orientare le risorse disponibili sul processo decisionale e l'azione; i glucocorticoidi hanno infatti un ruolo importante per le funzioni cognitive. La loro interazione con la noradrenalina influenza l'attenzione e la memoria emotiva mentre il processo decisionale coinvolge i glucocorticoidi e la dopamina.⁵ Secondo quanto appena descritto è possibile comprendere l'impatto positivo che un livello di stress moderato (eustress) può avere durante l'allenamento;⁵⁻⁶ livelli cronici elevati di glucocorticoidi hanno invece un impatto negativo sul processo cognitivo/emotivo e possono indurre disturbi comportamentali e fisici.⁷⁻⁸⁻⁹ Diversi studi di fisiologia e comportamentali hanno va-

¹ Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna - Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano Emilia (BO), Italia

² Clinica Veterinaria San Francesco, Via M. Villa 24/B, 40026 Imola (BO), Italia

*Corresponding Author (pierattilio.accorsi@unibo.it)

Ricevuto: 26/07/2017 - Accettato: 18/07/2018

lutato l'impatto dello stress cronico sia nei cani da laboratorio^{1,10-14} che in cani provenienti da colonie;^{15,16,16} sono invece pochi gli studi effettuati nei cani da lavoro che abbiano valutato questo impatto sullo stato di benessere cronico.^{17,18} Tra quest'ultimi molti ricercatori hanno studiato le alterazioni endocrine ed ematologiche nei cani da utilità e difesa (Schutzhund), durante e dopo le prove;¹⁹⁻²¹ non abbiamo invece dati relativi a queste alterazioni durante il periodo di allenamento per tali prove.

Il cortisolo è un *marker* utile nella valutazione dello stress dato dall'allenamento.

La valutazione di questi parametri nel corso dell'allenamento potrebbe essere estremamente importante. Il lavoro fisico o un allenamento eccessivo condotto con metodi coercitivi che costringano fisicamente i cani a fare gli esercizi potrebbero infatti essere causa di affaticamento acuto, con possibile successivo affaticamento cronico e conseguente recupero funzionale incompleto, stanchezza precoce e calo delle prestazioni.²² Tutto ciò potrebbe essere correlato a fattori diversi, tra cui lo stress, con un rilascio eccessivo di glucocorticoidi.

Una risposta allo stress potrebbe essere indicativa di un sovraccarico di lavoro e quindi di un allenamento inefficace; inoltre nel corso dell'allenamento altri parametri potrebbero essere al di fuori degli intervalli di riferimento, a seconda delle diverse caratteristiche del lavoro svolto.

Lo Schutzhund è uno sport in cui l'accoppiata uomo-cane esegue delle prove che hanno lo scopo di valutare le attitudini e le caratteristiche fisiche del cane. Le prove di utilità e difesa si articolano in tre fasi, pista (A), obbedienza (B) e difesa (C) e si svolgono sulla base di tre livelli di difficoltà crescente, IPO-1, IPO-2 e IPO-3 (IPO = International Prüfungsordnung). La prova di pista consiste nel seguire una traccia olfattiva generata da una persona che calpesta il terreno e nello scoprire oggetti abbandonati lungo la pista stessa. La prova di obbedienza include una serie di esercizi che l'accoppiata uomo-cane esegue in una sequenza specifica, come condotta senza guinzaglio, seduto in marcia, terra con richiamo, fermo in piedi durante la prova, recupero (su una superficie piana, saltando oltre un ostacolo e un cavalletto), invio in avanti e sdraiato a comando e sdraiato con distrazione.

La prova di difesa valuta il coraggio del cane nel proteggere se stesso e il suo conduttore e la sua capacità di essere controllato mentre lo fa. Esistono vari esercizi, come trovare il figurante nascosto e impedirgli di muoversi solo abbaiando contro di lui, fermare l'attacco o la fuga del figurante mordendo la manica imbottita sul braccio del figurante. Quando l'attacco o la fuga del

figurante si interrompe al cane viene comandato di fermarsi o di rilasciare la manica. Il cane deve fermarsi, altrimenti viene congedato. In ogni momento il cane deve mostrare il coraggio di attaccare il figurante e il temperamento di obbedire al conduttore mentre si trova in questo forte stato di pulsione.

Durante l'addestramento e l'attività fisica questi cani sono sottoposti a "stress psicologico", generato principalmente da forti impulsi istintivi e motivazionali, e a "stress fisico", generato dall'intenso lavoro muscolare.

Ad oggi non abbiamo studi specifici che abbiano valutato l'attività dell'asse HPA nei cani sottoposti ad allenamento per le prove di utilità e difesa a livello agonistico. Alla luce di queste considerazioni, lo scopo del presente studio è stato quello di valutare alcuni parametri endocrini (cortisolo) correlati al livello di stress che caratterizza i cani da utilità e difesa durante l'allenamento. Abbiamo inoltre studiato la correlazione tra i diversi programmi di lavoro e l'attività della corteccia surrenalica. A differenza di altri autori, per la valutazione dei livelli di cortisolo abbiamo utilizzato tecniche non invasive, come la rilevazione dei valori di questo ormone nelle feci e nel pelo.

Questo studio ha lo scopo di valutare l'attività dell'asse HPA nei cani coinvolti nello Schutzhund, uno sport che prevede che una diade uomo-cane affronti prove di utilità e difesa.

MATERIALI E METODI

Animali

Per lo studio sono stati utilizzati quindici cani interi (12 maschi e 3 femmine), di tre diverse razze pure (Pastore Tedesco n=12, Rottweiler n=2 e Dobermann n=1), di età compresa tra 2 e 7 anni. Tutti i soggetti appartenevano a proprietari privati ed erano sotto allenamento per le prove di utilità e difesa: al momento dello studio sei cani erano in allenamento per le prove del massimo grado di difficoltà (gruppo IPO-3) e nove erano all'inizio dell'addestramento per le prove di utilità e difesa (gruppo IPO-0) (Tabella 1).

Attrezzature

Lo studio è stato condotto in un campo di addestramento ufficialmente riconosciuto dal club del Pastore Tedesco (Verein für Deutsche Schäferhunde) e sotto il controllo dell'ENCI (Ente Nazionale della Cinofilia Italiana). Il campo di allenamento, 80 m x 60 m, coperto da un manto erboso, era dotato delle attrezzature tipiche per lo Schutzhund: palizzate e nascondigli per il figurante/aggressore (Figura 1).

Tabella 1 - Caratteristiche dei cani utilizzati nella sperimentazione (media \pm E.S.)

	TOTALE	Pastore Tedesco	Rottweiler	Dobermann
Cani totale (n°)	15	12	2	1
Maschi non sterilizzati	12	10	1	1
Femmine non sterilizzate	3	2	1	0
Età (anni)	4,30 \pm 0,43	4,56 \pm 1,54	3,37 \pm 0,48	3,02 \pm 0,00
Gruppo IPO				
IPO 3 (n°)	6	4	1	1
Maschi non sterilizzati	3	2	0	1
Femmine non sterilizzate	3	2	1	0
Età (anni)	2,67 \pm 0,67	3,00 \pm 0,91	1,00 \pm 0,00	3,00 \pm 0,00
IPO 0 (n°)	9	8	1	0
Maschi non sterilizzati	9	8	1	0
Femmine non sterilizzate	0	0	0	0
Età (anni)	5,11 \pm 0,20	5,13 \pm 0,23	5,00 \pm 0,00	0

**Figura 1** - Campo di allenamento con l'attrezzatura tipica per lo Schutzhund. Il campo misura 80 m x 60 m ed è ricoperto da un tappeto erboso.

Allenamento

Lo studio è stato effettuato tra i mesi di settembre e dicembre dello stesso anno, quando gli animali dei due gruppi, IPO-3 e IPO-0, hanno seguito due diversi programmi di allenamento a seconda del loro livello di preparazione.

L'allenamento dei cani del gruppo IPO-3 è consistito in un periodo di 2 mesi di lavoro intenso in preparazione per il Campionato Italiano di Schutzhund (periodo 1 - periodo preagonistico), seguito da un periodo di 2 mesi caratterizzato da una riduzione nell'intensità dell'allenamento (periodo 2 - periodo post-agonistico). Nel periodo pre-agonistico i cani venivano allenati tre o più volte alla settimana mentre nel periodo post-agonistico una volta alla settimana.

L'allenamento dei cani IPO-0 è stato costante per tutto il periodo sperimentale di 4 mesi, durante il quale i cani sono stati allenati tre o più volte alla settimana.

Rispetto ai cani del gruppo IPO-0 le sessioni di allenamento dei cani IPO-3 sono state più intense in termini di velocità richiesta, sforzo fisico e stress psicologico, anche a causa della ripetizione dei vari esercizi. Ai cani IPO-3 veniva richiesta una performance agonistica

Lo studio, svolto in campo di addestramento ufficiale, ha coinvolto 15 cani divisi in due gruppi, distinti per grado di difficoltà delle prove e intensità dell'allenamento (IPO-3 e IPO-0).

mentre nel gruppo IPO-0 vi erano cani giovani in fase di preparazione/addestramento per tale attività per i quali sessioni troppo lunghe o fisiche e stressanti dal punto di vista psicologico avrebbero potuto essere fonte di demotivazione nei confronti di tale attività.

Ogni sessione di allenamento ha avuto una durata di circa 15 minuti e ha incluso esercizi di pista, obbedienza e difesa, sia per i cani IPO-3 che IPO-0.

L'intensità del lavoro è stata valutata costantemente da un operatore (allenatore esperto). Per la valutazione del grado di intensità del lavoro ("leggero" o "intenso") e dell'affaticamento psicofisico si è inoltre rilevata e valutata la frequenza respiratoria e cardiaca dei cani a fine sessione: il lavoro veniva definito "intenso" in presenza di un aumento superiore al 50% rispetto alla frequenza basale di entrambi i parametri.

Raccolta dei campioni

Le feci sono state raccolte ogni giorno per tutto il periodo sperimentale, prelevando campioni sia nei giorni di riposo che in quelli di allenamento. Le feci sono state raccolte immediatamente dopo l'evacuazione, ripulite da lettiera o detriti, inserite in sacchetti di plastica e congelate entro pochi minuti.

Nei cani IPO-3 i campioni di pelo sono stati raccolti all'inizio e alla fine di ogni periodo sperimentale (1 e 2) mentre nei cani IPO-0 all'inizio e alla fine della ricerca (periodo di campionamento). Il pelo è stato reciso dalla regione toracica sternale o laterale ed è stato prelevato da una zona di circa 10 cm di diametro. Il pelo è stato tagliato utilizzando delle forbicine, essendo questa la tecnica meno invasiva. In ogni cane il ricampionamento è

stato effettuato dalla stessa regione anatomica. Durante ogni prelievo l'osservatore ha raccolto da 10 a 90 mg di peli da ciascun animale; i peli sono stati messi in sacchetti di plastica con chiusura ermetica.

Tutti i campioni (feci e pelo) sono stati etichettati (nome dell'animale, giorno, orario dell'evacuazione o regione anatomica del prelievo) e conservati a -20°C fino all'analisi.

Raccolte le feci quotidianamente e il pelo quattro volte per il gruppo IPO-3 e due volte per IPO-0, è stata eseguita l'analisi del cortisolo tramite RIA e, infine, l'analisi statistica.

Analisi del cortisolo

L'estrazione del cortisolo dalle feci è stata effettuata come descritto da Schatz e Palme (2001).²³ In breve, una soluzione di metanolo e acqua (v/v 4:1) è stata aggiunta alle feci in fiale di vetro tappate. Le fiale sono state poi agitate per 30 minuti con un agitatore multiprovetta vortex in modalità pulsata. Dopo centrifugazione (1500g per 15 minuti), etere etilico e NaHCO₃ (5%) sono stati aggiunti a 1 ml di surnatante. Il preparato è stato poi agitato per 1 min con un agitatore multiprovetta vortex in modalità pulsata e centrifugato per 5 min (1500g). La porzione di etere è stata poi separata e fatta evaporare fino ad essiccazione sotto cappa aspirante a 37°C; il residuo secco è stato infine disciolto in soluzione fisiologica tamponata con fosfati (PBS) 0,05M, pH 7,5.

L'estrazione del cortisolo dal pelo è stata eseguita come descritto da Accorsi et al. (2008).²⁴ Il pelo è stato prima tritato in frammenti di 1-3 mm di lunghezza e poi messo in un flacone di vetro. Dopo aggiunta di metanolo i flaconi sono stati incubati a +50°C con agitazione lieve per 18 ore. Il contenuto dei flaconi è stato quindi filtrato in modo da separare la fase liquida. Quest'ultima è stata fatta evaporare fino a essiccazione sotto una cappa aspirante a 37°C e il residuo secco è stato poi disciolto in PBS 0,05M, pH 7,5.

Il dosaggio sia delle feci che del pelo è stato eseguito secondo Tamanini et al. (1983).²⁵ L'analisi è stata eseguita in duplicato. I parametri per la validazione dell'analisi sono stati: sensibilità 0,26 pg/mg, variabilità del dosaggio 6,8%, variabilità tra i dosaggi 9,3%.

Analisi statistica

Tutte le concentrazioni sono espresse in picogrammi di cortisolo rispetto ai milligrammi di materiale fecale o del fusto pilifero (pg/mg). I dati sono espressi come media \pm errore standard ($\bar{X} \pm ES$) dopo aver verificato la normale distribuzione dei residui.

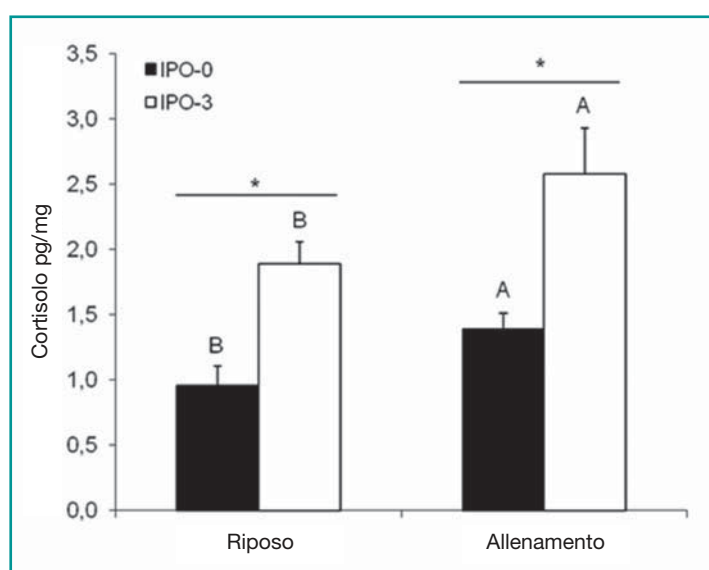


Figura 2 - Concentrazione di cortisolo fecale nei cani dei due gruppi (riposo e allenamento) correlato al programma di allenamento (IPO-0 e IPO-3) (media \pm E.S.). A, B: $P < 0,01$ giorno di riposo vs allenamento. *: $P < 0,01$ IPO-0 vs IPO-3.

Per consentire l'identificazione di qualsiasi variazione nelle concentrazioni di cortisolo fecale e pilifero nei campioni dei cani IPO-3 e IPO-0 tra i periodi 1 e 2 è stata effettuata l'analisi della varianza delle rilevazioni ripetute. È stato infine eseguito il test post-hoc di Duncan.

La correlazione tra il contenuto individuale di cortisolo pilifero e il livello individuale di cortisolo fecale medio nel periodo di crescita del pelo è stata testata utilizzando il Pearson Rank Correlation Test.

Per tutte le analisi i valori α sono stati fissati = 0,05.

RISULTATI

La Figura 2 mostra i livelli di cortisolo fecale nei cani dei due gruppi (IPO-0 e IPO-3) durante sia i giorni di allenamento che quelli di riposo. In entrambi i gruppi l'esercizio psicofisico ha causato un aumento significativo delle concentrazioni di cortisolo fecale (IPO-0: $0,96 \pm 0,15$ vs $1,39 \pm 0,12$ e IPO-3: $1,89 \pm 0,17$ vs $2,58 \pm 0,35$; $P < 0,01$). Durante le giornate di riposo e di allenamento i livelli di cortisolo sono risultati diversi a seconda del livello di allenamento: i cani più titolati nella disciplina e che hanno seguito il programma IPO-3 hanno evidenziato concentrazioni di cortisolo significativamente più elevate ($P < 0,01$), sia nei giorni di riposo che in quelli di lavoro, rispetto a quelli che hanno seguito il programma IPO-0.

La Figura 3 mostra i livelli di cortisolo fecale nei due gruppi di cani (IPO-0 e IPO-3) per il periodo 1 e 2 durante l'allenamento e i giorni di riposo. I cani IPO-3 hanno presentato una riduzione significativa ($P < 0,01$) delle concentrazioni di cortisolo fecale nel periodo 2, sia nei periodi di riposo che di allenamento. Nei cani IPO-0 non è stata osservata alcuna differenza significativa nelle concentrazioni di cortisolo fecale tra i due periodi, sia nei giorni di riposo che in quelli di allenamento.

L'impatto dell'intensità del lavoro psicofisico sulla concentrazione di cortisolo fecale è rappresentata nella Figura 4. Nei soggetti IPO-3 durante il lavoro definito "intenso" si è verificato un aumento significativo dei livelli di cortisolo fecale ($1,97 \pm 0,39$ vs $3,03 \pm 0,52$; $P < 0,01$), ma non nei cani IPO-0, sottoposti ad una intensità di lavoro costante in tutte le sessioni di allenamento ($1,37 \pm 0,14$ vs $1,44 \pm 0,22$). Il tipo di lavoro svolto durante le sedute di allenamento non ha tuttavia influito sulle concentrazioni di cortisolo fecale: non sono infatti state riscontrate differenze significative in relazione agli esercizi di pista, obbedienza e difesa (Figura 5).

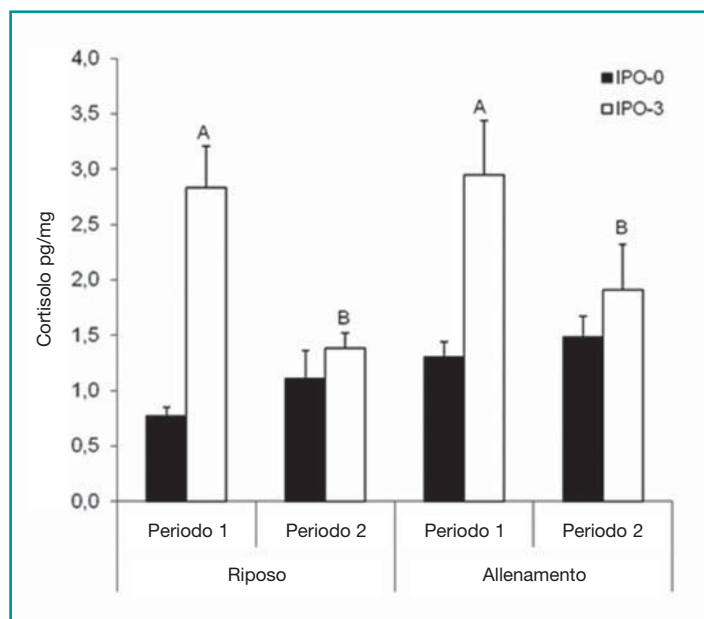


Figura 3 - Concentrazione di cortisolo nelle feci raccolte nei cani dei due gruppi dopo giorni in assenza di attività fisica e dopo giorni di attività fisica nei periodi 1 e 2, correlato al programma di allenamento (IPO-0 e IPO-3) (media \pm E.S.). A, B: $P < 0,01$ periodo 1 vs periodo 2.

Nei due gruppi il cortisolo pilifero ha andamento differente, così come quello fecale nei momenti di allenamento e riposo. Tuttavia, quest'ultimo subisce in entrambi i gruppi un incremento con l'esercizio.

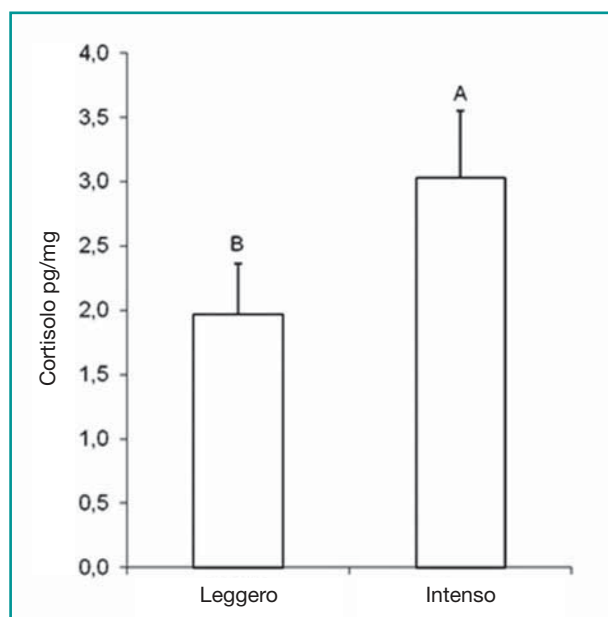


Figura 4 - Concentrazione di cortisolo fecale dopo un allenamento leggero e uno intenso, correlato al programma di allenamento (IPO-0 e IPO-3) seguito dagli animali (media \pm E.S.). A, B: $P < 0,01$ leggero vs intenso.

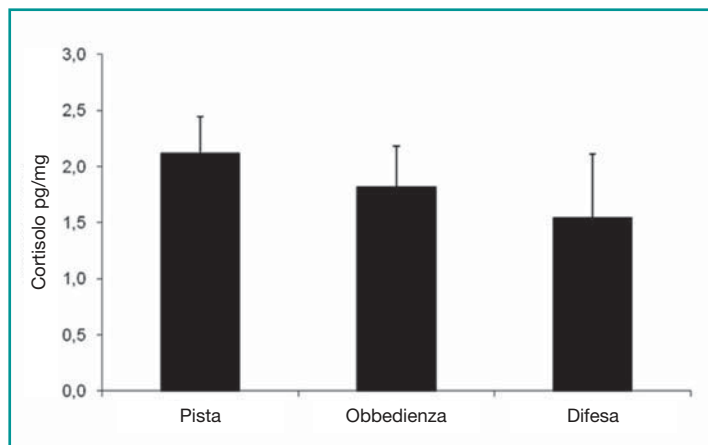


Figura 5 - Concentrazione di cortisolo fecale dopo il lavoro correlato al tipo di attività svolta (pista, obbedienza e difesa) (media \pm E.S.).

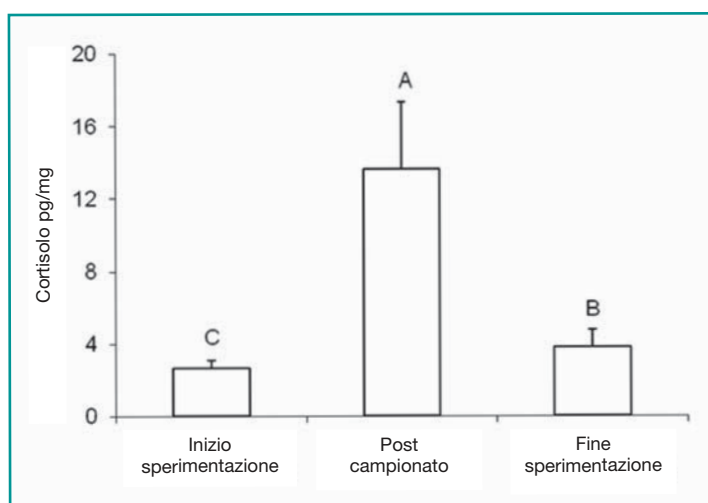


Figura 6 - Concentrazione di cortisolo pilifero nei cani IPO-3 all'inizio, dopo il campionato nazionale di Schutzhund e alla fine del periodo sperimentale (media \pm E.S.). A, B, C: $P < 0,01$.

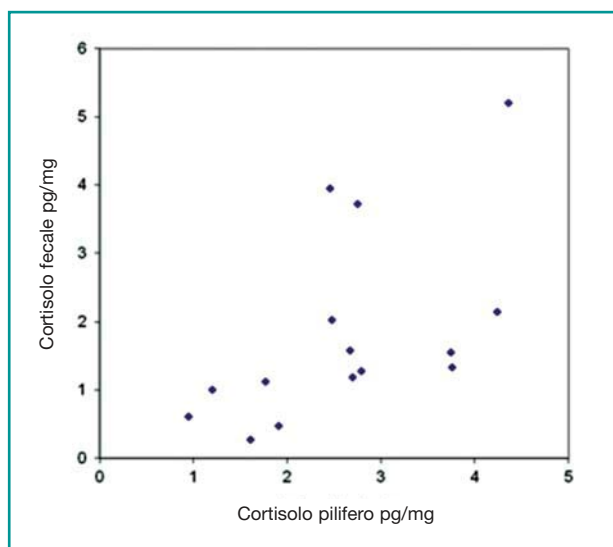


Figura 7 - Indice di correlazione di Pearson. Valori medi dei singoli valori di cortisolo fecale rispetto al contenuto di cortisolo pilifero dei singoli campioni ($N = 15$).

le. Inoltre alla fine dello studio la concentrazione di cortisolo è risultata significativamente più alta ($P < 0,01$) rispetto a quella iniziale. Gli animali IPO-0, che non hanno partecipato al campionato nazionale di Schutzhund, hanno evidenziato valori analoghi nei campioni prelevati dalla stessa zona di ricrescita del pelo, sia all'inizio che alla fine dello studio ($2,48 \pm 0,55$ vs $2,85 \pm 0,63$).

Il test di correlazione di Pearson ha evidenziato una correlazione positiva significativa tra i livelli di cortisolo pilifero e fecale in ciascun cane ($r_s = 0,68$, $P < 0,001$; Fig. 7).

DISCUSSIONE

Scopo del presente studio era di determinare, per la prima volta, le variazioni nelle concentrazioni di cortisolo fecale e pilifero nei cani sottoposti ad allenamento per le prove di utilità e difesa.

I risultati indicano che in tutti i cani l'esercizio psicofisico ha determinato un aumento significativo delle concentrazioni di cortisolo fecale rispetto a quelli a riposo. Il cortisolo fecale è risultato più alto nei cani sottoposti a un carico di lavoro più elevato e che hanno seguito il programma IPO-3 rispetto a quelli senza titoli precedenti e che hanno seguito il programma IPO-0, sia nei giorni con attività fisica che in quelli senza; ciò è indicativo di una maggiore stimolazione adrenocorticale correlata all'esercizio fisico.

La maggior concentrazione di cortisolo fecale nei cani IPO-3 e il suo incremento in concomitanza dell'esercizio indicano come esso influenzi l'attività adrenocorticale.

I valori fecali rilevati sia a riposo che durante l'allenamento sono risultati inferiori rispetto a quanto riportato da altri studi;^{23,26} queste differenze potrebbero essere dovute alle diverse condizioni di vita dei soggetti valutati (ricovero e giardino a casa del conduttore vs laboratorio e ricovero) o forse alle diverse tecniche utilizzate per la determinazione del cortisolo (RIA vs EIA).

Va in realtà anche considerato che gli studi che hanno valutato le concentrazioni fecali di cortisolo nel cane sono, secondo le nostre attuali conoscenze, scarsi.

L'aumentata concentrazione di cortisolo fecale riscontrata durante l'attività fisica è in linea con quanto presente in letteratura.^{27,28} Haverbeke et al. (2008)²⁷ hanno analizzato la risposta fisiologica (cortisolo) e comportamentale nei cani da lavoro militari. I soggetti dello studio furono sottoposti due volte a un *challenge* ambientale composto da esercizi di lavoro sociale e di difesa, con stimoli visivi e uditivi. Analogamente al nostro studio, dopo il primo *challenge* la concentrazione di cortisolo plasmatico è risultata significativamente più alta rispetto ai valori precedenti; la

cosa non si è tuttavia verificata dopo il secondo *challenge*. Inoltre, Preziuso e Preziuso (2001)²⁸ hanno rilevato le concentrazioni ematiche di cortisolo, nonché di lattato, in cani sottoposti ad attività fisica tra cui prove di attacco (un test simile a quello di difesa nello Schutzhund), corsa in pista e caccia. Come nei soggetti del nostro studio, dopo lo sforzo fisico i cani hanno evidenziato un'aumentata concentrazione di cortisolo.

Un'aumentata concentrazione di cortisolo post esercizio fisico

prolungato è stata osservata anche nel cavallo²⁹ e negli atleti umani,³⁰ mentre nel cane i risultati riportati in letteratura sono contraddittori. In questa specie, infatti, Wakschlag et al. (2004)³¹ e Durocher et al. (2007)³² hanno effettivamente riscontrato un'aumentata concentrazione di cortisolo in risposta all'esercizio fisico, mentre Arokoski et al. (1993)³³ e Rovira et al. (2007)³⁴ non hanno riscontrato variazioni significative.

La ragione di questi risultati contrastanti può essere forse dovuta alle diverse condizioni sperimentali. In primo luogo a causa delle attività fisiche estremamente diverse a cui i cani sono stati sottoposti: sport diversi impiegano infatti sistemi d'organo diversi che sono a loro volta causa di alterazione dei parametri ematologici e biochimici. L'allenamento aerobico (nei cani da slitta) causa ad esempio emodiluizione, così da garantire una maggiore quantità di acqua corporea totale necessaria per mantenere la stabilità cardiovascolare e termica durante l'esercizio acuto,³⁵ mentre l'allenamento con carichi massimali (ad esempio nei levrieri che gareggiano in pista su distanze di 235-800 m, con velocità massima di 18 m/s) causa un aumento del volume ematico, così da garantire un maggiore assorbimento di ossigeno.³⁶

Un'altra possibile causa di discrepanza nei risultati dell'attività dell'asse HPA potrebbe essere la razza²⁸ dei cani utilizzati e la relazione uomo-cane,³⁷ che può influenzare il livello di cortisolo. L'uso di giocattoli o di bocconcini come ricompensa da parte dei proprietari e un'interazione giocosa da parte dei proprietari con i loro cani hanno una correlazione negativa con i valori di questo ormone. Un rapporto amichevole e di incoraggiamento causa una riduzione dei livelli di cortisolo e di stress.³⁷

Nello studio i valori del cortisolo non sembrano essere stati influenzati dall'età o dal sesso dei soggetti. Tutti i cani considerati erano adulti e diversi studi hanno dimostrato che dopo lo svezzamento e durante la vita adulta non esistono differenze nei livelli di cortisolo;³⁸⁻³⁹ si può pertanto supporre che questo parametro non abbia influito sui risultati. La divisione per sesso era diversa nei cani IPO-3 (tutti i maschi) rispetto ai cani IPO-0 (3 maschi e 3 femmine). La letteratura attuale riporta risultati

contrastanti circa l'influenza del genere sui livelli di cortisolo. Mongillo et al. (2014)³⁹ hanno osservato una maggiore concentrazione di cortisolo plasmatico nei soggetti maschi, ma altri autori non hanno riportato differenze legate al sesso dei soggetti esaminati.⁴⁰⁻⁴¹ Nel nostro studio il livello di cortisolo nei cani maschi e femmine non

si è discostato di molto e la differenza è apparsa irrilevante; il numero ridotto di femmine presenti nello studio non consente comunque di poter trarre

delle conclusioni significative sull'eventuale influenza del sesso sui valori di cortisolo.

I risultati dello studio hanno evidenziato una significativa riduzione delle concentrazioni di cortisolo fecale nei cani IPO-3 nel periodo 2, sia durante il riposo che durante le sessioni di allenamento. Il periodo 1 corrispondeva alla fase di lavoro particolarmente intensa dal punto di vista psicofisico, legata alla partecipazione dei cani al campionato nazionale di Schutzhund. Il periodo 2 era invece finalizzato a mantenere il tono psicofisico raggiunto ed era considerato "leggero" dai professionisti. Le sessioni di allenamento si sono svolte nelle stesse condizioni ambientali di quelle delle competizioni e si può pertanto supporre che i maggiori livelli di cortisolo nel periodo 1 siano dipesi principalmente dall'intensità dell'allenamento e non da cambiamenti nelle abitudini di lavoro.

I cani IPO-0, che hanno seguito un programma di lavoro costante in due periodi diversi, non hanno evidenziato differenze significative nelle concentrazioni di cortisolo. Questi soggetti sono stati pertanto considerati come un "controllo" dell'andamento del cortisolo, così da escludere qualsiasi effetto "stagionale" sulle variazioni di concentrazione; questo ormone ha infatti un ritmo sia circadiano che annuale. Abbiamo ipotizzato che nei soggetti IPO-3 il lavoro psicofisico abbia avuto un impatto sulle concentrazioni di cortisolo fecale. Livelli ormonali significativamente più elevati sono stati osservati nelle sessioni di lavoro intenso, cosa che non si è invece verificata nei cani IPO-0, che hanno svolto un lavoro costante durante le sessioni giornaliere di allenamento. Risultati analoghi sono stati raggiunti da Radosevich et al. (1989).⁴² Durante l'esercizio a bassa intensità i livelli di cortisolo plasmatico sono aumentati con la durata dell'esercizio; con l'esercizio ad alta intensità il cortisolo è aumentato più velocemente e la risposta plasmatica integrata di questi ormoni è risultata maggiore. Il rilascio periferico di cortisolo durante l'esercizio fisico è risultato pertanto dose correlato, sia alla durata che all'intensità dello sforzo. Si è quindi potuto concludere che l'esercizio fisico è un regolatore fisiologico sia del sistema neuroendocrino periferico che di quello centrale.

L'attività dell'asse HPA è influenzata dall'esercizio in sé ma anche da altri fattori: la tipologia di esercizio, il rapporto tra cane e conduttore, razza, sesso ed età dei soggetti.

La maggior concentrazione di cortisolo riscontrata durante il periodo di allenamento più intenso nei cani IPO-3, fa supporre l'influenza o dell'intensità del lavoro o di uno stress cronico ripetuto.

Valori elevati di cortisolo possono tuttavia verificarsi anche in condizioni di stress cronico.⁴³ Ulteriori indagini sono pertanto necessarie per capire se l'aumento dei valori di cortisolo fecale sia correlato all'intensità allenamento o invece a uno stress cronico e ripetuto, causato da sessioni di allenamento più ravvicinate nel tempo. Nonostante il diverso livello di impegno richiesto, la tipologia di lavoro (A, B e C) svolto dai cani durante gli allenamenti non ha influito sulle concentrazioni di cortisolo fecale. Questo studio ha per la prima volta permesso di valutare la concentrazione di cortisolo pilifero nei cani che praticano lo Schutzhund; questi valori sono risultati in accordo con quelli fecali. In particolare, dopo il campionato italiano e dopo il periodo sperimentale la concentrazione di cortisolo pilifero è risultata significativamente superiore rispetto a quella registrata all'inizio dello studio negli animali IPO-3, ma non in quelli IPO-0, che hanno presentato valori di cortisolo pilifero mol-

to simili all'inizio e alla fine della sperimentazione. In un lavoro precedente²⁴ avevamo già evidenziato una significativa correlazione positiva tra le concentrazioni di cortisolo fecale e di quello pilifero. Questa correlazione sembra supportare l'ipotesi che sia il cortisolo fecale che quello pilifero riflettano la stessa attività surrenalica. I nostri risultati sono inoltre in accordo con quelli di Davenport et al. (2006)⁴⁴ sui macachi Rhesus ottenuti in condizioni di laboratorio controllate.

In tale specie il contenuto di cortisolo pilifero ha evidenziato una correlazione positiva con il cortisolo salivare ed è aumentato in seguito ad uno stato di stress prolungato. L'esistenza di una correlazione tra contenuto di cortisolo pilifero e quello fecale o salivare in una varietà di soggetti diversi e in condizioni di vita diverse incoraggia l'utilizzo di questa tecnica non invasiva per il monitoraggio della risposta allo stress indotto per periodi prolungati.

RINGRAZIAMENTI

Ringraziamo Danilo Matteuzzi per il supporto nella raccolta e nell'analisi dei campioni.

Ringraziamo Eleonora Petrulli e Jak Marshall per il loro prezioso aiuto con la lingua inglese.

PUNTI CHIAVE

- Il cortisolo è un importante marker biologico nella valutazione dello stress dei cani, compreso quello legato all'allenamento.
- Un moderato stress (eustress) provoca un rialzo dei glucocorticoidi, utili nell'interazione con l'ambiente, in quanto, assieme ad altri ormoni e neurotrasmettitori, influenzano positivamente i processi cognitivi, decisionali ed emozionali e supportano il lavoro muscolare.
- Uno stress cronico e ripetuto, ad esempio un allenamento troppo intenso, causa un prolungato rilascio di glucocorticoidi, che, in quantità eccessive, hanno effetti negativi sia sulla componente cognitiva ed emotiva sia sul fisico. Un allenamento eccessivo risulta, perciò, controproducente.
- L'esercizio in sé e la sua intensità provocano un rialzo del cortisolo. Tuttavia, l'attività adrenocorticale è influenzata da una serie di fattori come razza, età e periodo dell'anno.

Hair and faecal cortisol level's variations during the training in Schutzhund dogs

Summary

The aim of this study was to determine the cortisol levels in Schutzhund dogs during training, in order to highlight a relationship between different work programmes and adrenocortical activity. Fifteen Schutzhund dogs (12 males and 3 females) were used: six dogs with the highest level of training (title IPO-3, group IPO-3), and nine animals without title IPO (group IPO-0). Animals of the two groups followed two different training programmes. The programme followed by IPO-3 dogs consisted of a period of intense work for each section (section A - tracking phase, section B - obedience phase and section C - protection phase; period 1) and a period of reduction in the intensity of the training (period 2). On the other hand, IPO-0 dogs underwent a constant work intensity throughout the experiment. The faeces and hair cortisol content was measured by RLA. In all dogs the exercise induced a significant increase of faecal cortisol concentrations as compared with the levels at rest; the faecal levels of this hormone were higher in IPO-3 than in IPO-0 dogs both on days when animals were not doing physical activity and on days of work, indicating a greater exercise-related adrenocortical stimulation. Training intensity induced a modification in faecal cortisol concentrations while these were not affected by the type of work (Sections A, B and C). Correlation between hair and faecal cortisol levels was also checked; hair cortisol levels correlated positively with those observed in faeces.

BIGLIOGRAFIA

1. Beerda B, Schilder MBH, Bernadina W, et al. Chronic stress in dog subjected to social and spatial restriction II. Hormonal and immunological responses. *Physiology & Behavior* 66:243-254, 1999b.
2. Russell E, Koren G, Rieder M et al. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology* 37:589-601, 2011.
3. Stefanon B, Sandri M, Bastiani E. Misura del cortisolo salivare nel cane: Sviluppo, Validazione e Applicazioni di un sistema Point of Care. *Veterinaria* (3):163-171, 2016.
4. Matteri RL, Carroll JA and Dyer CJ. Neuroendocrine responses to stress. In: Moberg GP, Mench JA (Ed), *The biology of animal stress*, CABI Publishing, pp. 43-76, 2000.
5. McEwen BS and Sapolsky RM. Stress and cognitive function. *Current Opinion in Neurobiology* 5:205-216, 1995.
6. Erickson K, Drevetsa W, Schulkinb J. Review: Glucocorticoid regulation of diverse cognitive functions in normal and pathological emotional states. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27, 233-246, 2003.
7. Pageat P. *Pathologie du comportement du chien*, 2nd edn. Point vétérinaire, Paris, 1999.
8. Liptrap RM. Stress and reproduction in domestic animals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 697:275-284, 1993.
9. Sundin O, Ohman A, Palm T, et al. Cardiovascular reactivity, Type A behavior, and coronary heart disease: comparisons between myocardial infarction patients and controls during laboratory-induced stress. *Psychophysiology* 32:28-35, 1995.
10. Beerda B, Schilder MBH, van Hooff JARAM, et al. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 58:365-381, 1998.
11. Beerda B, Schilder MBH, van Hoof JARAM, et al. Chronic stress in dog subjected to social and spatial restriction I. Behavioural responses. *Physiology & Behavior* 66:233-242, 1999a.
12. Hettis S, Clark JD, Calpin JP, et al. Influence of housing conditions on beagle behaviour. *Applied Animal Behaviour Science* 34:137-155, 1992.
13. Clark D, Rager DR, Crowell-Davis S, et al. Housing and exercise of dogs: effects on behavior, immune function, and cortisol concentration. *Comparative Medicine* 47:500-510, 1997.
14. Spangenberg EMF, Björklund L and Dahlborn K. Outdoor housing of laboratory dogs: effects on activity, behaviour and physiology. *Applied Animal Behaviour Science* 98:260-276, 2006.
15. Tuber DS, Hennessy MB, Sanders S, et al. Behavioral and glucocorticoid responses of adult domestic dogs (*Canis familiaris*) to companionship and social separation. *Journal of Comparative Psychology* 110:103-108, 1996.
16. Sandri M, Colussi A, Perrotta MG. Salivary cortisol concentration in healthy dogs is affected by size, sex, and housing context. *Journal Veterinary Behaviour* 10:302-306, 2015.
17. Burghardt WF. Behavioral considerations in the management of working dogs. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice* 33:417-446, 2003.
18. Lefebvre D, Diederich C and Giffroy JM. Cortisol and behavioural responses to enrichment in military working dogs. *Journal of Ethology* 27:255-265, 2009.
19. Piccione G, Casella S, Panzera M, et al. Effect of moderate treadmill exercise on some physiological parameters in untrained Beagle dogs. *Experimental Animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* 61:511-515, 2012.
20. Huntingford JL, Levine CB, Mustacich DJ, et al. The Effects of Low Intensity Endurance Activity on Various Physiological Parameters and Exercise Induced Oxidative Stress in Dogs. *Open Journal of Veterinary Medicine* 04:134, 2014.
21. Slotta-Bachmayr L and Schwarzenberger F. Faecal cortisol metabolites as indicators of stress during training and search missions in avalanche dogs. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift - Veterinary Medicine Austria*. 94:110-117, 2007.
22. Mariani AP, Prezioso F, Mariani A, et al. Il cane atleta: alcuni parametri enzimatici e non enzimatici nell'impegno muscolare. *Annali Facoltà Medicina Veterinaria Pisa Vol. L*: 251-274, 1997.
23. Schatz S and Palme R. Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a non-invasive method for evaluating adrenocortical function. *Veterinary Research Communications* 25:271-287, 2001.
24. Accorsi PA, Carloni E, Valsecchi P, et al. Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *General and Comparative Endocrinology* 155:398-402, 2008.
25. Tamanini C, Giordano N, Chiesa F, et al. Plasma cortisol variations induced in the stallion by mating. *Acta Endocrinologica* 102:447-450, 1983.
26. De Palma C, Viggiano E, Barillari E, et al. Evaluating the temperament in shelter dogs. *Behaviour* 142:1307-1328, 2005.
27. Haverbeke A, Diederich C, Depiereux E, et al. Cortisol and behavioural responses of working dogs to environmental challenges. *Physiology & Behavior* 93:59-67, 2008.
28. Prezioso F and Prezioso S. Lattato e cortisolo nell'esercizio muscolare e nell'allenamento sportivo. Valutazione specifica e rapporti nel segugio, nel setter inglese, nello spinone, nel pastore tedesco e nel levriero. *Annali Facoltà Medicina Veterinaria Pisa LIV/2001*:349-360, 2001.
29. Robson RJ, Alston TD and Myburgh KH. Prolonged suppression of the innate immune system in the horse following an 80 km endurance race. *Equine Veterinary Journal* 35:133-137, 2003.
30. Daly W, Seegers CA, Rubin DA, et al. Relationship between stress hormones and testosterone with prolonged endurance exercise. *European Journal of Applied Physiology* 93:375-380, 2005.
31. Wakshlag JJ, Snedden K and Reynolds AJ. Biochemical and metabolic changes due to exercise in sprint-racing sled dogs: implications for post exercise carbohydrate supplements and hydration management. *Veterinary therapeutics: research in applied veterinary medicine* 5:52-59, 2004.
32. Durocher LL, Hinchcliff KW, Williamson KK, et al. Effect of strenuous exercise on urine concentrations of homovanillic acid, cortisol, and vanillylmandelic acid in sled dogs. *American Journal of Veterinary Research* 68:107-111, 2007.
33. Arokoski J, Miettinen PVA, Säämänen A, et al. Effects of aerobic long distance running training (up to 40 km day⁻¹) of 1-year duration on blood and endocrine parameters of female beagle dogs. *European Journal of Applied Physiology* 67:321-329, 1993.
34. Rovira S, Muñoz A and Benito M. Hematologic and biochemical changes during canine agility competitions. *Veterinary Clinical Pathology* 36:30-35, 2007.
35. McKeever KH, Scali R, Geiser S, et al. Plasma aldosterone concentration and renal sodium excretion are altered during the first days of training. *Equine Veterinary Journal* 34:524-531, 2002.
36. Ilkiw JE, Davis PE and Church DB. Hematologic, biochemical, blood-gas, and acid-base values in Greyhounds before and after exercise. *American Journal of Veterinary Research* 50:583-586, 1989.