

VALUTAZIONE DELLO STRESS NEL CANE E NEI FELINI.

Oggi il benessere animale è considerato come una scienza che si occupa dello stato di salute globale dell'animale, che è intesa come l'insieme delle condizioni psichiche e fisiche necessarie agli animali per vivere in completa armonia con il proprio ambiente. Da questa definizione si intuisce che la valutazione del benessere coinvolge una serie di discipline come l'etologia, la fisiologia, la genetica e la psiconeuroendocrinologia (disciplina che sintetizza le relazioni esistenti tra sistema nervoso, sistema neuroendocrino e sistema immunitario) le quali, integrandosi fra loro, consentono di descrivere i diversi aspetti che riguardano l'interazione degli animali con il proprio ambiente.

La capacità da parte dell'uomo di misurare il benessere, rappresenta sicuramente un campo di studio molto importante ed attuale in quanto gli indicatori da considerare sono molti. Le misurazioni da esaminare possono essere di difficile interpretazione e possono avere una scarsa reperibilità. C'è inoltre la possibilità che subiscano variazioni in maniera significativa da soggetto a soggetto in quanto, a parità di condizioni ambientali e di management, alcuni animali sembrano adattarsi meglio e più rapidamente a situazioni stressanti rispetto ad altri evidenziando così differenze individuali di sensibilità allo stress.

Gli studi fatti sino ad oggi hanno evidenziato come l'organismo risponda alle varie situazioni ambientali non solo tramite cambiamenti comportamentali, primi e precoci segni di adattamento, ma anche con cambiamenti organici che possono indurre variazioni nell'attività cardiaca, nelle concentrazioni ormonali ematiche, o nel sistema immunitario. Queste possono avere ripercussioni sullo stato di salute, sull'accrescimento e sulle capacità riproduttive del soggetto. Ogni variazione ambientale, quindi, va a costituire per l'animale uno stress al quale egli reagisce con meccanismi comportamentali e organici per ripristinare la propria omeostasi; quando ciò non si realizza si possono manifestare i sintomi tipici dello stress acuto e, se il disagio persiste, quelli dello stress cronico.

Possiamo definire come "stressor" un qualsiasi fattore che determina una modificazione della normale omeostasi di un soggetto e al quale esso reagisce mettendo in atto una serie di risposte comportamentali e/o organiche che hanno come obiettivo quello di ristabilirla; qualora questo non si verificasse viene meno il benessere del soggetto e un conseguente stato patologico che può essere più o meno grave. Viene definito "stressor" lo stimolo che conduce l'organismo e la psiche allo stress, indipendentemente dal fatto che questo sia di natura fisico (elettrico, chimico, termico), ambientale (ad esempio, ambiente sconosciuto, costrizione, pericolo imminente) o sociale (ad esempio: comportamento di conspecifici, sovraffollamento, isolamento). A questo proposito risulta essere particolarmente interessante un recente studio che ha messo in evidenza come a seconda del tipo di stressor vari a livello encefalico il meccanismo di attivazione del sistema di controllo dello stress, in particolar modo della regolazione della secrezione di cortisolo in risposta allo stress (). Ad esempio uno stressor reattivo, che può essere rappresentato da uno stimolo sensoriale reale (come ad esempio un dolore, un danno fisico, problemi immunitari del soggetto) tende ad attivare il midollo allungato, e più in particolare, specifici

nuclei ipotalamici e il nucleo della stria terminale (BNST) che hanno connessioni dirette con il nucleo paraventricolare ipotalamico (PVN) (). Mentre gli stressor anticipatori, che sono quelli scatenati da reazioni innate o legate alla memoria (come ad esempio conflitti sociali o situazioni sconosciute), attivano principalmente regioni del sistema limbico, quali l'ippocampo, l'amigdala e l'area mediale della corteccia pre-frontale (²⁶).

Hans Selye fu uno dei primi studiosi che concentrò le sue attenzioni sulla scoperta dei meccanismi che l'organismo mette in atto se sottoposto ad un evento stressante (). Secondo il medico ungherese, l'organismo mette in atto una " sindrome generale di adattamento" nella quale possiamo riconoscere tre fasi: una fase di allarme, che è la prima reazione che l'organismo aziona appena percepisce l'evento stressante; una fase di resistenza, in cui cerca di adattarsi alle nuove condizioni e di ristabilire una situazione di equilibrio; una fase di esaurimento o di collasso, che nasce con il persistere dell'evento stressante che rende l'individuo incapace di reagire e che può portarlo ad un grado di indebolimento tale da favorire anche la comparsa di malattie infettive e/o organiche talmente gravi da poter avere, addirittura, un esito infausto (). Seppur tutt'altro che recente, questa teoria, ideata nel 1936, è valida ancora oggi. Ognuna delle fasi di cui essa è composta, è caratterizzata da modificazioni nervose, ormonali ed umorali che ne spiegano le conseguenze comportamentali e cliniche che noi osserviamo. Recentemente è stato introdotto anche il concetto di allostasi. Lo stato allostatico è uno stato di attività fisiologica alterata, sostenuta dai cosiddetti "mediatori dell'allostasi" che integrano la fisiologia e i comportamenti associati, in risposta ai cambiamenti dell'ambiente. In parole semplici, questa alterata attività ha lo scopo di mantenere la "normalità" dei sistemi fisiologici in risposta al cambiamento della situazione ambientale. Una volta che tale attivazione raggiunge un nuovo livello di adattamento, l'organismo esce dallo stato allostatico. Lo stato allostatico può essere mantenuto per brevi periodi con risultati adattivi (carico allostatico) oppure diventare cronico e portare a malattie (sovraccarico allostatico) (). Si può dire che lo stato allostatico corrisponda alla fase di allarme della sindrome generale di adattamento di Selye.

Durante la fase di allarme si ha un acutizzarsi dello stato di vigilanza, un aumento della frequenza cardiaca e respiratoria, fenomeni di vasodilatazione e vasocostrizione localizzati, che fanno in modo che il sangue venga ridiretto dove è maggiormente richiesto , ovvero verso il cervello, i muscoli scheletrici, il cuore (). In questa fase si assiste ad un aumento generale dei processi metabolici, lipolisi e glicolisi, in modo tale da fornire all'organismo energia a sufficienza per affrontare la situazione. L'organismo si prepara cioè a quella situazione che viene spesso definita del "lotta o fuggi". Questi meccanismi adattativi vengono determinati da una parte dall'attivazione del sistema nervoso vegetativo simpatico (con la liberazione di adrenalina e noradrenalina) , delle terminazioni nervose post gangliari e dalla midollare del surrene, dall'altra dall'attivazione dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene che determina il rilascio di glucocorticoidi da parte della corticale del surrene. Queste due vie tuttavia non sono completamente distinte fra loro: la produzione di ormone corticotropo (CRH) da parte dell'ipotalamo, infatti, oltre a stimolare l'adenoipofisi a

produrre l'ormone adrenocorticotropo (ACTH), che a sua volta andrà a determinare il rilascio di glucocorticoidi da parte della corticale del surrene, determina anche un aumento della concentrazione ematica di catecolamine, che agiranno poi da neurotrasmettitori a livello dell'amigdala e dell'ipotalamo, che sono delle importanti zone cerebrali coinvolte nei processi di elaborazione della potenziale pericolosità dello stimolo stressogeno (). In particolar modo esistono delle strettissime correlazioni tra il centro nervoso dello stress e l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. La stazione centrale di controllo del sistema dello stress è localizzata nell'ipotalamo e nel tronco encefalico ed include neuroni parvocellulari, produttori di CRH, neuroni produttori dell'ormone arginina vasopressina (AVP), che si trovano nei nuclei paraventricolari dell'ipotalamo, ed il sistema locus ceruleus/noradrenalina (LC/NE); mentre gli effettori di questo sistema sono rappresentati dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e dal sistema simpatico/adrenomidollare e vengono attivati in seguito ad uno stimolo stressogeno ().

Il locus ceruleus, insieme ad altri gruppi di cellule noradrenergiche del midollo allungato e del ponte, sono collettivamente conosciute come il già citato sistema locus ceruleus/noradrenalina (LC/NE). La noradrenalina encefalica serve globalmente come sistema d'allarme che va a determinare una diminuzione delle funzioni neurovegetative, quali mangiare e dormire, contribuendo ad aumentare le risposte del sistema nervoso autonomo e neuroendocrine allo stress, compresa l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (). La noradrenalina inoltre attiva l'amigdala e accentua l'immagazzinamento, a lungo termine, dei ricordi legati ad esperienze negative in siti specifici quali l'ippocampo e lo striato (³²). Allo stesso tempo questo neurotrasmettitore esercita un *feedback* negativo sul giro cingolato anteriore (ACG). Se i meccanismi di *feedback* sono troppo intensi e prolungati, l'encefalo entra in uno stato di disfunzionalità; infatti mentre l'attività dell'amigdala aumenta a causa del *feedback* positivo svolto dalla noradrenalina, lo stesso neurotrasmettitore va a svolgere un'azione *feedback* negativa sulla funzione del ACG, che normalmente inibisce e riduce le emozioni dell'amigdala, la quale di conseguenza non è più controllata ().

Per quanto riguarda l'importanza del ruolo dell'ippocampo nella risposta allo stress, è in gran parte dovuta alla secrezione, da parte di questo, del fattore di rilascio della corticotropina (CRH). Quest'ormone svolge un ruolo fondamentale nella risposta fisiologica, organica e comportamentale, allo stress; infatti da inizio ad una serie di eventi che hanno come risultato finale quello di attivare l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (). Una ricerca ha messo in evidenza che se il CRH viene infuso a livello cerebrale, in dei ratti, gli determina dei comportamenti tipici dello stress (). La scoperta di questo studio fu in seguito confermata da studi farmacologici (,) e genetici (). Il CRH una volta secreto, in pochissimo tempo giunge a livello dell'adenoipofisi, determinando così la secrezione dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH). L'ACTH, a sua volta, una volta immesso nella circolazione ematica sistemica giunge a livello della corticale del surrene, dove nel giro di pochi minuti, stimola il rilascio nel sangue di glucocorticoidi, tra cui il cortisolo. Quest'ultimo va ad agire sull'ipofisi, inibendone la secrezione di ACTH (*feedback* corto),

sull'ipotalamo andando a contrastare il rilascio di CRH (*feedback* lungo) () e su se stesso (*feed back* extracorto). Oltre a questi meccanismi inibitori ve ne sono altri come quello esercitato dall'ACTH sui neuroni peptinergici ipotalamici, i quali secernono CRH (*feedback* ultra corto) e quello che l' ACTH esercita su se stesso (*auto feedback*) (). Questi meccanismi inibitori hanno il ruolo molto importante di limitare l'esposizione dell'organismo a concentrazioni eccessive e prolungate di glucocorticoidi, infatti questi ormoni potrebbero provocare conseguenze dannose per l'organismo, legate soprattutto a effetti catabolici e immunosoppressivi. L'attività secretoria di CRH ipotalamica è regolata anche da impulsi nervosi provenienti dall'ippocampo e dall'amigdala che in seguito ad un evento stressogeno inviano impulsi all'ipotalamo tramite fibre nervose adrenergiche e, in parte, dopaminergiche (³¹).

Anche l'amigdala risulta avere un ruolo chiave nei meccanismi di risposta, organici e comportamentali, a eventi stressanti. L'amigdala non è distinguibile a livello macroscopico nell'encefalo ma è generalmente considerata come un'insieme di distinte sub-aree e nuclei. E' possibile distinguere una regione cortico mediale che include il nucleo corticale, mediale e centrale ed una regione baso-laterale costituita dal nucleo basale laterale. Queste ricevono informazioni sia dalla neocorteccia di tutti i lobi cerebrali sia dal talamo che conduce *input* sensoriali (uditivi, visivi, gustativi e tattili). In particolar modo il nucleo laterale rappresenta l'ingresso sensoriale nell'amigdala; il nucleo centrale è invece considerato un'importante regione afferente, almeno per quanto riguarda l'espressione delle risposte alle emozioni innate e delle risposte ad esse associate. Numerosi sono stati gli studi riguardanti il ruolo di questa struttura nervosa con stati emozionali quali la paura e i comportamenti ad essa associati. Altri stati emotivi nei quali è coinvolta l'amigdala sono, per citarne alcuni, l'aggressività, i comportamenti materno, sessuale ed ingestivo (mangiare e bere). Inoltre questa è coinvolta in funzioni cognitive quali l'attenzione, la partecipazione e la memoria esplicita, ovvero la memoria coinvolta nel pensiero conscio (). L'amigdala agisce quindi sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrenale, attivandolo, dopo che l'informazione sensoriale è stata da essa analizzata e inviata al nucleo centrale (³¹). Quindi, riassumendo, mentre il nucleo laterale è l'ingresso sensoriale dell'amigdala, al nucleo centrale spetta il ruolo di *output*. Il nucleo centrale presiede al controllo delle espressioni di reazione alla paura, da un punto di vista comportamentale, autonomo ed endocrino, attraverso le proiezioni che possiede a valle, incluso l'ippocampo, nella sostanza grigia e nel nucleo motore dorsale del vago (⁴³ ,,,,,,). La plasticità neuronale si verifica nel nucleo centrale, ma è verosimilmente basata sulla plasticità del nucleo laterale (⁵⁰). Il nucleo laterale comunica con il nucleo centrale in modo diretto, ma essendo le loro connessioni piuttosto modeste, questa viene integrata dagli altri nuclei dell'amigdala ().

L'amigdala, insieme all'ippocampo e ad altri centri nervosi superiori, svolge anche un ruolo molto importante nel controllo della secrezione di catecolammine da parte della midollare del surrene. Infatti non appena questa struttura nervosa percepisce una minaccia, le sue strutture efferenti vanno ad attivare una serie di aree *target* che controllano le risposte che devono contrastare la minaccia, sia comportamentali che

organiche (^{45, 47}). Oltre all'espressione di comportamenti difensivi, come ad esempio il *freezing* (), l'attivazione dell'amigdala conduce all'attivazione di meccanismi encefalici e dell'organismo legati alle risposte allo stress (⁵³). Nell'encefalo, il sistema monoaminergico risulta attivato, conseguentemente il rilascio di neurotrasmettitori quali la noradrenalina, acetilcolina, serotonina e dopamina avviene in tutto l'encefalo (⁵³). Questi neurotrasmettitori conducono, in tal modo, ad un'aumento dell'*arousal*, dello stato di vigilanza e più in generale, della reattività del soggetto a stimoli esterni (^{43, 44}). Dal punto di vista endocrinologico, invece, l'attivazione dell'amigdala, come già citato, determina la secrezione di CRH dal nucleo paraventricolare dell'ipotalamo. Il CRH, insieme ad altre sostanze ipotalamiche, causa il rilascio di ormone adrenocorticotropo dall'ipofisi, le quali poi determinano il rilascio di glucocorticoidi dalla corticale del surrene (⁵³). Per quanto riguarda le conseguenze organiche, l'amigdala non appena percepisce la minaccia, tramite le sue connessioni con il midollo allungato determina l'attivazione del sistema nervoso simpatico andando così a determinare il rilascio di adrenalina e noradrenalina dalla midollare del surrene e di noradrenalina dalle terminazioni nervose simpatiche distribuite nell'organismo (⁵³).

Altra importante struttura nervosa capace di agire sull'amigdala è la corteccia prefrontale mediale, la quale per mezzo della sua subregione infralimbica riesce ad inibire gli *output* dell'amigdala (), rendendosi in tal modo capace di determinare l'estinzione di determinate paure (, ,). Mentre l'amigdala svolge un ruolo prevalentemente eccitatorio nei confronti dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene, la corteccia prefrontale può avere sia una funzione eccitatoria che inibitoria. Ciò dipende sia dalle specifiche strutture nervose che dai neurotrasmettitori coinvolti ().

La midollare del surrene, come si intuisce dal nome stesso, occupa la parte più interna della ghiandola surrenale e svolge un ruolo chiave durante la fase di allarme dello stress. Le midollari del surrene, come già ricordato, producono due ormoni di tipo catecolaminico, l'adrenalina e la noradrenalina, che si accumulano nel citoplasma sotto forma di microscopici granuli e vengono scaricati nel circolo sanguigno dietro stimolazione nervosa. La midollare del surrene è infatti un organo di derivazione nervosa e le sue cellule endocrine (cellule cromaffini) vengono considerate come neuroni modificati di tipo post-gangliare (simpatici). Essendo controllate direttamente da fibre simpatiche pre-gangliari, a differenza di altre cellule endocrine, non necessitano che la concentrazione ematica dell'ormone stimolante aumenti, ma si attivano dopo la stimolazione nervosa con grande rapidità. Le catecolamine una volta immesse nel circolo svolgono la loro azione organica a livello sistemico e spesso in sinergia con l'azione del sistema nervoso vegetativo simpatico. L'azione delle catecolamine surrenaliche risulta essere più intensa e duratura rispetto alla stimolazione nervosa simpatica. Infatti la loro azione sugli organi bersaglio persiste sino a quando questi non vengono rimossi dal circolo ematico (cosa che avviene piuttosto lentamente), mentre le catecolamine rilasciate a livello sinaptico, vengono rapidamente eliminate mediante un meccanismo di ricaptazione e di catabolismo. Le due vie di stimolazione, nervosa ed ormonale, si integrano fra loro ma la produzione di adrenalina di derivazione surrenalica risulta avere un'importanza

maggiore in quanto va a raggiungere anche cellule bersaglio sprovviste di innervazione simpatica e garantiscono così anche una risposta comportamentale efficiente (³¹). A livello organico quindi, andranno a stabilirsi tutte quelle condizioni metaboliche che risultano essere indispensabili affinché il soggetto superi l'evento stressante combattendo o fuggendo. Probabilmente l'apparato che risente maggiormente degli effetti delle catecolammine è quello cardiocircolatorio. In particolar modo si assiste ad un aumento della pressione sanguigna, con vasocostrizione dell'apparato gastroenterico, della cute e dei reni mentre si avrà vasodilatazione a carico dei muscoli scheletrici, del cuore e del cervello. Ciò è facilmente spiegabile con il fatto che l'organismo deve prepararsi ad una possibile reazione di lotta o fuga e per tale motivo gli organi che devono essere maggiormente preparati ad una rapida ed intensa attivazione, necessitano di un maggior apporto di sangue a discapito dei distretti organici non direttamente coinvolti da questa risposta. Sempre per lo stesso motivo, l'animale sottoposto a stress presenta molteplici modificazioni organiche, a partire dalla broncodilatazione, dovuta al rilasciamento della muscolatura liscia bronchiale, tachipnea ed aumento dell'ematocrito, necessari per ottimizzare l'ossigenazione del sangue ed assicurare una funzionalità massima alla muscolatura cardiaca e scheletrica; la pupilla oculare sarà midriatica affinché vi sia una più intensa stimolazione della retina da parte della luce e per una migliore visibilità soprattutto se la luce è scarsa. Anche la glicemia si troverà obbligatoriamente a dover aumentare, visto che il glucosio è il principale metabolita per una rapida produzione di energia cellulare e muscolare. A questo scopo si assisterà anche ad un aumento della glicolisi muscolare ed epatica associata ad un'azione insulino-resistente operata dai glucocorticoidi, e oltre a ciò il rilascio insulinico da parte del pancreas sarà inibito. La glicemia elevata, oltre a favorire un buon lavoro muscolare, rappresenta anche la principale fonte di energia per il tessuto encefalico che si dovrà trovare in uno stato di particolare attenzione e vigilanza, oltre a consentire la sopravvivenza in caso di digiuno prolungato. Oltre a questo si constaterà piloerezione ed una aumentata coagulabilità del sangue, (quest'ultima risulta essere un meccanismo difensivo particolarmente importante nel caso di ferite causate da un'eventuale reazione di lotta da parte dell'animale). Le modificazioni che si riscontrano a livello del sistema emocoagulativo, con un'ipercoagulabilità del sangue e spiccata trombofilia, sono dovute all'aumento dei livelli plasmatici dei fattori II, V, IX e soprattutto VIII della coagulazione, ad un aumento della sintesi e rilascio di plasminogeno, di α_2 -antiplasmina e dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) e da una diminuzione del rilascio dell'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA). Tutti questi elementi portano in tal modo ad un'alterazione del sistema fibrinolitico () e risultano marcatamente evidenti durante lo stress cronico in quanto causati anche dalle alte concentrazioni ematiche di glucocorticoidi.

Successivamente alla fase di allarme vi è uno stato di resistenza. In questa fase il soggetto, percepito lo stressor, cerca di reagire ed a tornare allo stato di equilibrio. L'azione che caratterizza maggiormente questa condizione è quella dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene ed in particolar modo dei glucocorticoidi che sono i maggiori responsabili delle reazioni organiche e comportamentali che avvengono in

essa. Tra questi ormoni, svolge sicuramente un ruolo predominante il cortisolo, che nel cane è considerato il glucocorticoide primario ().

Il cortisolo viene prodotto a livello corticale del surrene dalle cellule della zona fascicolata, e come più volte ricordato, lo stimolo più grande per la sua produzione è data dal CRH e dall'ACTH. Il cortisolo una volta liberato nel circolo ematico è responsabile di diversi importanti conseguenze organiche. Una di queste è, come già citato, l'aumento della glicemia : ottenuta, da una parte, inducendo un aumento della gluconeogenesi epatica, che in questo caso viene sostenuta dagli amminoacidi derivanti da un accentuato catabolismo proteico soprattutto a livello dei muscoli scheletrici, dall'altra, dall'azione anti-insulinica. L'azione anti-insulinica è post-recettoriale, ossia il cortisolo interferisce significativamente, diminuendo a più livelli l'efficienza funzionale sulla traslocazione indotta dall'insulina di proteine trasportatrici (*carrier*), preposte al trasporto transmembrana del glucosio dal compartimento microsomiale alla membrana plasmatica cellulare.

Per quanto riguarda il metabolismo lipidico i glucocorticoidi hanno notevoli importanti ripercussioni organiche: infatti essi pur non avendo azione lipolitica diretta, potenziano quella di altri fattori ormonali (come ACTH, β -lipotropina, GH, catecolamine, prolattina) che vengono liberati in concomitanza. In tal modo si assiste ad un aumento complessivo della lipemia che interessa tutti i suoi componenti (trigliceridi, acidi grassi liberi, glicerolo e colesterolo) che si rendono così disponibili per una loro utilizzazione periferica. Complessivamente però tutto ciò, anche se avviene per lunghi periodi (come avviene ad esempio in caso di alcuni stress cronici), non porta ad un dimagrimento dell'animale, ma ad una riorganizzazione del tessuto adiposo che si accumula soprattutto a livello viscerale e che può condurre l'animale ad obesità.

Anche il metabolismo proteico viene modificato da alte concentrazioni di cortisolo; infatti quest'ormone determina un aumento del catabolismo proteico rendendo negativo il bilancio azotato. Questa azione si svolge soprattutto a livello extra-epatico (tessuto connettivo, scheletrico ed osseo) e porta ad un aumento di amminoacidi nel torrente ematico, che in parte vengono ricaptati a livello epatico, in parte vengono eliminati per via renale. Ciò se si prolunga nel tempo può portare a grave ipotrofia muscolare. L'azione catabolica su proteine strutturali è evidente anche a livello cutaneo, ove i glucocorticoidi inibiscono i fibroblasti e la sintesi di collagene (⁴²).

Oltre a ciò, merita di essere ricordato anche il fatto che i glucocorticoidi hanno un'azione sinergica con le catecolamine, a dimostrazione di ciò si è visto che in soggetti con insufficienza surrenalica la muscolatura liscia vasale non risponde agli stimoli noradrenergici di vasocostrizione e gravi stress possono causare dei collassi circolatori (). In conclusione un'alta concentrazione di cortisolo ematico avrà come conseguenza un'ipertensione sistemica. A livello cardiaco determina invece tre effetti: inotropo, cronotropo e dromotropo positivo. In particolar modo risulta facilitata la conduzione atrio-ventricolare con conseguente accorciamento del tratto P-Q del tracciato elettrocardiografico (⁴²).

Anche l'apparato respiratorio risente dell'effetto del cortisolo, infatti a livello bronchiale esercita un'effetto di "sblocco" sulle cellule in possesso di recettori beta-

adrenergici determinando così una broncodilatazione indotta per l'appunto da questi recettori (⁴²).

Ad alte e prolungate concentrazioni ematiche di cortisolo inoltre è particolarmente sensibile anche il tessuto osseo: in tale situazione vi è una diminuzione dell'assorbimento di calcio a causa di una minore idrossilazione della 25-OH-vitamina D₃ in 1- α -25-diidrossi-vitamina D₃, una maggiore escrezione renale di calcio e fosforo, un'aumentata secrezione di paratormone (PTH), una più rilevante attività degli osteoclasti ma soprattutto una riduzione del numero e dell'attività degli osteoblasti per probabile blocco maturativo e differenziativo ().

Oltre a questo, uno dei principali ruoli che il cortisolo svolge sull'organismo è la sua azione sul sistema immunitario che diviene particolarmente evidente durante la fase di collasso di Selye e durante gli stress cronici; il legame tra sistema immunitario e stress è talmente stretto che nel 1981, Adrer R. coniò la parola "Psiconeuroimmunologia" per indicare un ambito disciplinare che studia i rapporti fra gli stati mentali e la fisiologia umana con particolare riferimento alla risposta immunitaria (). Detto ciò appare ancora più ovvio che non si può parlare esclusivamente di un'azione inibente sul sistema immunitario operata dal cortisolo, ma è più corretto riferirsi a strette correlazioni tra sistema neuroendocrino ed immunitario i cui meccanismi non sono tutt'oggi, del tutto chiari. L'Interleukina-1 (IL-1) è stata una delle prime sostanze ad essere scoperte che svolgono un'azione su entrambi i sistemi. L'IL-1 viene prodotta dai fagociti mononucleati, ma anche dalle cellule gliali (,) come pure da alcuni gruppi di neuroni dell'ippocampo e della corteccia (). Nel tempo sono aumentate le conoscenze sugli effetti dell'IL-1 e di altre sostanze, quali ad esempio l'interleukina-6 e il Tumor-necrosis factor α , sul funzionamento e sull'azione di determinati comportamenti. Si è visto che questi mediatori sono capaci di inibire l'attività motoria volontaria, oltre che l'assunzione degli alimenti, e sono capaci di modificare i meccanismi del sonno (). Alcuni studi hanno mostrato anche come le citokine possono essere liberate in seguito a stati emozionali e determinare in tal modo un aumento dell'attività dei macrofagi (). Molti autori hanno segnalato un aumento dell'IL-1 negli stati ansiosi (), dando così una possibile spiegazione ai disturbi del sonno che spesso accompagnano questo stato emozionale. La natura dello stress, come ad esempio il fatto che questi siano evitabili o meno, sembra poter influenzare la risposta immunitaria sia nel carattere che nella dimensione. In un soggetto sano un'aggressione evitabile, non altera le competenze immunitarie, anzi sembrerebbe che ne possa determinare un aumento: l'attivazione delle fibre noradrenergiche ne sarebbero alla base (). Al contrario, un'aggressione inevitabile causa una diminuzione delle difese immunitarie ed in questo caso sembra essere maggiore il ruolo degli ormoni surrenalici di alcune endorfine ed encefaline (⁷³). In particolar modo è stato evidenziato che la β -endorfina e la metenkefalina, in esperimenti in vitro, modulano la proliferazione linfocitaria ed aumentano l'attività delle cellule *natural killer* (N.K.) (,). Questi due oppioidi hanno anche la capacità di stimolare l'attività chemiotattica dei monociti, mentre la β -endorfina inibisce l'attività dell'interferone e diminuisce quella di anticorpi da parte dei linfociti B (⁷³). Nonostante ciò esperimenti in vivo mostrano un'attività immunosoppressiva degli

oppioidi; infatti l'iniezione di morfina, capace di simulare sul piano comportamentale uno stato di stress, causa anche una immunosoppressione (⁷³). Le endorfine sono liberate in piccola parte dall'ipofisi e, per la maggior parte, dal surrene che le libera contemporaneamente alle catecolammine. Anche i linfociti sono in grado di liberare γ -endorfine e sostanze correlate quando reagiscono alla presenza di antigeni; inoltre l'effetto modulatore sulle funzioni cellulari collegate al sistema immunitario implica l'esistenza di recettori periferici oppiacei e non oppiacei sulla superficie dei linfociti (). Per quanto riguarda l'effetto generale che i mediatori dello stress hanno sul sistema immunitario è opinione comune che determinino una complessiva immunosoppressione; anche se non è sempre vero, appare comunque paradossale il fatto che mentre l'organismo è sotto "attacco" metta in atto dei meccanismi che ne determinino un maggior indebolimento. Diversi studi infatti hanno mostrato come situazioni di stress aumentino la suscettibilità dell'organismo a malattie o forme tumorali (, ,). Per quanto riguarda le influenze che eventi stressanti possono avere sulle cellule ematiche immuno-competenti appaiono molto interessanti gli studi di Dhabar F.S. . L'autore con i suoi studi ha dimostrato che in seguito a stress acuti si assiste ad un rapido, significativo e prontamente reversibile diminuzione nella conta assoluta dei linfociti B, T, *natural killer* e dei monociti ematici (,). Questa diminuzione del numero dei leucociti nel sangue rappresenta una loro redistribuzione dal sangue ad organi quali il midollo osseo, i linfonodi e la cute (, ,). L'autore ipotizza che un tale meccanismo potrebbe avere la funzione di migliorare la competenza immunitaria nei compartimenti in cui vengono richiamati i leucociti durante lo stress, andando così ad osservare, in talune condizioni di stress, un miglioramento dell'immunità cellulo-mediata, mentre in altre una soppressione della stessa (). A conferma di questa ipotesi anche altri studi hanno evidenziato un miglioramento stress-indotto nella proliferazione dei linfociti mitogena-indotta (,), nella funzione fagocitaria dei macrofagi (), nell'attività dei linfociti *natural killer* () e nella produzione di IL-1, IL-2 e IFN- γ (,). In contrasto con il miglioramento della risposta immunitaria nello stress acuto, l'immunosoppressione causata da uno stress cronico può essere mediata da meccanismi che conducono alle seguenti conseguenze: effetto inibitorio sull'attivazione dei linfociti T, sulla presentazione dell'antigene, sulle azioni dei mediatori dell'infiammazione, sull'attivazione della lipocortina; sull'induzione dell'apoptosi dei linfociti, o sulla soppressione delle funzioni delle cellule effettrici (); da una diminuzione degli eosinofili ematici; da una inibizione nel rilascio di determinate citochine (essenziale per la maturazione dei linfociti B e T) ed una diminuzione della dimensione dei linfonodi (,). A questo proposito c'è da aggiungere che, altri studi hanno evidenziato che uno stress acuto, contrariamente a quanto precedentemente scritto, può inibire la risposta immunitaria ed uno cronico migliorarla. Per esempio, si è notato che uno stress acuto può avere azione soppressiva a livello splenico e sulle capacità mitogene dei linfociti T (,) e sulla produzione splenica di IgM (); mentre, invece, in seguito ad uno stress cronico, si può assistere ad un miglioramento nelle capacità proliferatrici degli splenociti (¹⁰⁰) e sulla produzione splenica di IgM (¹⁰²). Sembra che la durata dell'evento stressante sia un fattore determinante nel cambio di questa reattività immunitaria (⁹⁰).

Dopo aver descritto le modificazioni che il cortisolo può svolgere sul sistema immunitario, bisogna spiegare quali siano le sue possibili influenze sul sistema endocrino, visto l'importante ruolo che questo possiede sull'organismo, come quello di modificare il metabolismo in modo significativo, inibire o aumentare alcune funzioni e addirittura condizionare la vita stessa. Per comprendere più facilmente l'entità di queste influenze, basta ad esempio pensare ai gravi problemi endocrini presenti nei soggetti, sia uomo che animale, affetti da morbo di *Cushing*. Alti livelli di cortisolo ematico determinano ad esempio una riduzione dei livelli circolanti degli ormoni tiroidei T₃ e T₄ e una ridotta sintesi epatica di *thyroxine binding globulin* (TBC); in tal modo rallenta la conversione periferica nel T₄ nella sua forma metabolicamente attiva (T₃) ma favorisce la via alternativa a *reverse T₃* (rT₃). Ad ogni modo la concentrazione ematica rimane solitamente nel *range* di normalità e difficilmente si notano segni clinici di ipotiroidismo (⁴²).

Anche le capacità riproduttive in presenza di alte concentrazioni di glucocorticoidi risultano compromesse in entrambi i sessi. Questi ormoni infatti inibiscono la sintesi della subunità degli ormoni glicoproteici ipofisari tra i quali il Gonadotropin Releasing Hormone (GnRh) che è fondamentale per il rilascio delle gonadotropine ipofisarie LH (ormone luteinizzante) e FSH (ormone follicolo-stimolante). Appare in tal modo chiaro come questo possa determinare la sospensione delle capacità riproduttiva in soggetti sottoposti per lunghi periodi ad eventi stressanti.

Stress molto prolungati possono essere molto dannosi in soggetti giovani in fase di accrescimento: anche l'ormone dell'accrescimento (GH) infatti è influenzato negativamente sia nella secrezione che nell'azione dalle alte concentrazioni ematiche di glucocorticoidi, sino a determinare un rallentamento o addirittura un arresto del normale sviluppo corporeo.

Si può quindi affermare che anche in presenza di uno stress cronico l'organismo mette in atto una serie di cambiamenti metabolici che hanno come obiettivo quello di aumentare le capacità energetiche per affrontare la situazione a discapito di altre che non sono immediatamente indispensabili, come per esempio le capacità riproduttive, immunitarie o di accrescimento. Tutto questo però col passare del tempo può provocare nell'organismo degli scompensi e modificazioni che, come già riportato, possono condurre l'organismo ad una maggiore fragilità nei confronti di patologie, metaboliche o infettive, che possono prendere il sopravvento e peggiorare il benessere del soggetto.

Tra le importanti modificazioni che possono scaturire da tutte le alterazioni organiche causate dalle alte concentrazioni di glucocorticoidi stress-indotte, hanno grande rilevanza quelle subite dal SNC: a livello dell'amigdala uno stress cronico può causare un aumento delle arborizzazioni e spine dendritiche e un incremento delle connessioni sinaptiche nei neuroni principali del nucleo laterale e basale (,) ma non nel nucleo centrale (). Inoltre uno stress cronico da immobilizzazione, induce un rimodellamento dendritico nel nucleo laterale e in quello basale (). Oltre a ciò, in base alla durata dell'evento stressante si ha un differente orientamento spazio-temporale delle spine dendritiche. Nel caso di stress sia acuto che cronico, aumentano le spine dendritiche nei neuroni del nucleo basale e laterale, ma solo nel caso di uno stress

cronico c'è una azione sulle arborizzazioni dendritiche (). Anche una singola ed acuta dose di glucocorticoidi è capace di determinare un'ipertrofia dei neuroni dei nuclei laterale e basale dell'amigdala ().

L'ippocampo possiede un gran numero di recettori sia per i mineralcorticoidi che per i glucocorticoidi, e diversi studi hanno dimostrato che una prolungata esposizione ai glucocorticoidi altera la morfologia e l'integrità funzionale dei neuroni ippocampali (,), determinando una diminuzione di volume, associabile con un'atrofia della struttura intera. Un interessante studio ha evidenziato che in pazienti umani, che hanno subito un'intervento di trapianto d'organo, trattati quindi con alti dosi di corticosteroidi, si assiste ad una riduzione di volume che coinvolge esclusivamente l'ippocampo e non l'amigdala, indicando così una specifica neurotossicità di questi steroidi (). Si è ipotizzato che questa diminuzione di volume possa essere poi alla base di un aumento dell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene () perché, come già citato precedentemente, quest'organo svolge un feed-back negativo sulla secrezione di glucocorticoidi surrenalici. Riduzioni del volume dell'ippocampo sono state descritte anche in persone affette dalla sindrome di Cushing (), da disturbo post-traumatico da stress (DPTS) (,) e in persone anziane (). Anche nei pazienti con malattie depressive si può notare una diminuzione di volume che può coinvolgere o la parte sinistra dell'ippocampo(¹¹⁴, ,), o la destra() o coinvolgere l'intera struttura (,). Lo stato di stress, in particolar modo, indurrebbe una diminuzione delle ramificazioni e delle spine dendritiche dei neuroni ippocampali ().

Recenti studi hanno evidenziato un importante ruolo, nelle malattie depressive, anche dell'amigdala () la quale può andare incontro ad un aumento di volume (,) o una diminuzione (¹²², ,), nella maggior parte di pazienti depressi. Anche in questo caso sembrerebbe che la causa delle alterazioni osservate sarebbe imputabile allo stress persistente presente in questi individui, considerando il fatto che l'amigdala e l'ippocampo sono i siti anatomici del SNC nei quali maggiormente agiscono i glucocorticoidi (). Così come nell'uomo, anche negli animali soggetti a stress si osservano delle caratteristiche paragonabili a quelle osservate nelle persone affette da malattie depressive, quali ad esempio, variazioni del peso corporeo, disturbi del sonno, indebolimento delle funzioni dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene; è ipotizzabile che si possano riscontrare anche le alterazioni morfologiche a carico dell'amigdala e dell'ippocampo (). Secondo Reagan et al. (¹³⁰) le modificazioni neurochimiche ed i *deficit* cellulari nella plasticità sinaptica ippocampale, che si verificano in seguito a stress cronici, sarebbero dovute ad un'effetto a lungo termine dello stato iperglicemico indotto dai glucocorticoidi.

E' stato visto anche in altri studi, inoltre, che queste sostanze presentano livelli elevati in roditori anziani con patologie a carico dell'ippocampo (). Il livello basale di corticosterone plasmatico nei ratti anziani è significativamente correlato con degenerazione ippocampale e deficit nell'apprendimento spaziale (,). Elevati livelli basali di corticosteroidi plasmatici sono stati trovati solo in ratti anziani con deficit della memoria spaziale, ma non in ratti anziani privi di questi deficit mnemonici (). Una complessiva esposizione ad alti livelli di glucocorticoidi durante la vita conducono i neuroni ippocampali a disturbi della funzione elettrofisiologica, ad

glicolisi. Producono ATP, sfruttando in particolare la fosforilazione ossidativa, assicurando in tal modo una resa energetica spiccata ed una elevata resistenza. Le fibre muscolari a contrazione rapida, dette fibre di tipo II (fibre bianche), sono maggiormente rappresentate nei muscoli scheletrici destinati alla locomozione e ai movimenti fini. Queste ultime hanno la più alta velocità contrattile, la maggiore area di sezione trasversa, il più alto contenuto in glicogeno, la più alta capacità glicolitica e la più bassa capacità ossidativa. Solitamente vengono reclutate per i consumi di energia rapidi e potenti. Le fibre di tipo II vengono poi ulteriormente divise in IIA e IIB. Nel cane i primi studi sull'eterogeneità del tipo di fibre espresse nei muscoli portarono a conclusioni controverse, dove non era sempre possibile distinguere ed identificare in modo univoco le fibre di tipo 1, 2A e 2B (, , , ,); infatti se era possibile distinguere i tipi 1 e 2A lo stesso non si poteva dire per la 2B ma si evidenziò una fibra veloce differente che fu chiamata "2dog fibers" (). Alcuni studi recenti hanno mostrato che la "2dog fibers" esprime una miosina a catena pesante (MCH) 2X (,). Ad una conclusione simile sono giunti anche Acevedo e Rivero che hanno messo in evidenza come nei muscoli del cane sono distinguibili ben otto tipi distinti di fibre, tra cui dei tipi di fibra ibride, e tutte caratterizzate da un alto metabolismo ossidativo (). Diversi studi hanno messo in evidenza l'abbondanza di fibre ibride nei muscoli dei cani (¹⁵⁸,) (Tabella1).

Tabella 1:
Distribuzione
percentuale
e delle
singole
fibre
muscolari
sulla base
della loro
composizione
dell'Isoforma MHC
determinata
a tramite
elettroforesi. Dati
ottenuti da
Toniolo et
al.⁽¹⁶⁰⁾.

| | Ld | D | Sm | Tc | Tvm | Tve |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | 25% | 33% | 15% | 27% | 5% | 0 |
| 1-2A | 4% | 5% | 5% | 5% | 0 | 9% |

| | | | | | | |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|
| 2A | 50% | 62% | 64% | 32% | 14% | 6% |
| 2A-2X | 17% | 0 | 3% | 2% | 30% | 57% |
| 2X | 4% | 0 | 13% | 34% | 33% | 28% |
| 2X-2B | 0 | 0 | 0 | 0 | 10% | 0 |
| 2B | 0 | 0 | 0 | 0 | 8% | 0 |
| | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| Numero delle fibre | 24 | 23 | 81 | 40 | 58 | 21 |

L'Autore ha ottenuto le singole fibre muscolari da sei distinti muscoli e le ha poi classificate in base alla loro composizione dell'isoforma di MHC. Ld, lunghissimo del dorso; D, diaframma; Sm, semimembranos0; Tc, tibiale craniale; Tvm e Tve, vocale parte mediale e parte ventricolare del

tiroariteno
ideo

Molti muscoli nel cane contengono un misto dei vari tipi di fibre, ma la loro percentuale può variare in base al gruppo muscolare, alla razza e a variazioni individuali. Queste percentuali non sono costanti, ma possono variare nel tempo con l'allenamento.

E' interessante notare che la fibra di tipo IIB, è l'isoforma che presenta la più rapida velocità di contrazione e nel cane è localizzata esclusivamente nei muscoli laringei mentre sembrerebbe del tutto assente nei muscoli del tronco e degli arti (¹⁵⁸, ¹⁵⁹).

L'assenza dell'isoforma funzionale MyHC-IIB è stata riportata anche nei muscoli locomotori in altre specie di mammiferi tra cui uomo (), gatto (), vacca (), capra () e cavallo ()).

La fonte di energia necessaria per la contrazione muscolare è rappresentata dal legame fosfato contenuto nella molecola di ATP (adenosintrifosfato). Quando questo legame viene scisso, vengono prodotti ADP, fosfato inorganico ed energia necessaria per le funzioni cellulari.



Durante la contrazione muscolare, l'ATP viene utilizzato sia per attivare il sistema actina-miosina, sia per attivare le pompe di trasporto ionico presenti nella membrana cellulare e nel reticolo sarcoplasmatico. La produzione di ATP nel muscolo può avvenire attraverso diverse vie metaboliche come la glicogenolisi, la glicolisi, il ciclo di Krebs, la fosforilazione ossidativa, l'ossidazione degli acidi grassi liberi (FFA), la catena di trasporto degli elettroni e il ciclo dei nucleosidi purinici. Un gran numero di fattori interdipendenti sembrano influenzare la via metabolica utilizzata nel cane durante l'esercizio. Questi includono la velocità e la durata dell'esercizio, la vascolarizzazione capillare, nonché la capacità ossidativa e glicolitica delle fibre muscolari, la disponibilità di ossigeno e dei differenti substrati energetici.

Il cane possiede una riserva molto piccola di ATP all'interno dei suoi muscoli. Questa riserva, insieme con la riserva di creatina fosfato (Pcr) viene consumata velocemente entro pochi secondi dall'inizio di un esercizio. La reazione che coinvolge la Pcr è la seguente:



Questi processi, detti dei fosfageni, sono conosciuti come metabolismo anaerobico alattacido, poiché non necessitano di apporto di ossigeno per svolgersi e non danno luogo alla produzione di acido lattico. Dato che i substrati necessari sono già nel muscolo e la reazione a cui sono sottoposti è molto veloce, questo metabolismo ha per punti di forza la velocità di avvio e l'energia erogata nell'unità di tempo, ma decisamente pecca per la sua esigua autonomia. Contestualmente ad esso, al fine comune di risintetizzare nuovo ATP, operano altri metabolismi: quello aerobico, con ossidazione del glucosio, quello anaerobico lattacido, con consumo di glicogeno muscolare e formazione di acido lattico e l'ossidazione degli acidi grassi (). Gli acidi

grassi ossidati dal muscolo sono in particolare acidi grassi non esterificati (NEFA). Con l'aumentare della loro concentrazione raggiungono l'interno della cellula per diffusione, e solo successivamente, per intervento del carrier carnitina (azione indispensabile per gli acidi grassi a lunga catena). All'interno della cellula subiscono un processo di ossidazione con produzione di energia. Gli acidi grassi possono essere prelevati anche a livello epatico, per mezzo di lipoproteine, trasformati in corpi chetonici e quindi ossidati a livello endocellulare.

Gli aminoacidi ramificati (leucina, isoleucina, valina) possono costituire fino al 10% dell'apporto ossidativo energetico muscolare, con capacità di trasformazione in acido piruvico, con formazione di alanina (azione glucogeneogenetica), acido glutammico, glutammina. Alanina e glutammina, prelevati dal fegato, possono essere utilizzati per formare glucosio (gluconeogenesi). A fronte dei processi descritti, parallelamente l'attività enzimatica (alanina-transferasi, aspartato-aminotransferasi, glutammico-deidrogenasi) è al centro dell'attività catalitica.

Più nello specifico, possiamo affermare che una caratteristica metabolica di tutti i tipi di fibre muscolari a contrazione veloce del cane è quella di presentare un metabolismo ossidativo che va dal moderato all'elevato (, ,). L'assenza di fibre puramente glicolitiche nella muscolatura scheletrica del cane fa sì che questa specie animale abbia delle spiccate capacità di svolgere lavori muscolari di estrema ed alta resistenza (*endurance*) e può essere considerato un modello per lo studio del livello di correlazione tra espressione fenotipica della caratteristica contrattile e non-contrattile dei tipi di miofibre muscolari negli animali atleti con una superiore capacità alla resistenza (¹⁵⁹).

In seguito all'attività fisica nel cane si manifestano una serie di reazioni fisiologiche adattative, tra cui un aumento della gittata cardiaca, un miglioramento della ventilazione alveolare ed un conseguente aumento del trasporto di O₂ e ossigenazione cellulare.

Appare del resto necessario che le possibilità atletiche siano correlate ad un corretto sviluppo morfologico e ad una corretta alimentazione.

In caso di un esercizio muscolare eccessivo o affrontato in condizioni fisiologiche non ottimali (come nel caso di malnutrizione e in corso di una qualsiasi patologia), possono insorgere degli aspetti negativi, come una situazione di affaticamento muscolare o generalizzato. Potremo definire quindi "fatica" come uno stato di esaurimento delle prestazioni funzionali conseguente ad un esercizio fisico protratto eccessivamente, o non adatto alle caratteristiche morfo-funzionali del soggetto. In relazione all'insorgenza della fatica ed al grado di depauperamento fisiologico possiamo distinguere una fatica fisiologica, una fatica patologica ed affaticamento cronico. La fatica fisiologica è caratterizzata da una sintomatologia di breve durata e da una capacità di recupero organico completo in breve tempo. La fatica patologica è caratterizzata invece da grave prostrazione e debilitazione, ed approssimarsi dello stato di shock.

L'affaticamento cronico è contraddistinto a sua volta da incapacità di completo recupero funzionale, per cui tende a determinarsi ed evidenziarsi, nella caduta di performance, uno stato di precoce affaticamento.

A quest'effetto possono essere ricondotti anche i fenomeni da "superallenamento". Dal punto di vista fisiopatologico le principali cause che determinano questo stato sono: l'accumulo di cataboliti (ammoniaca, anidride carbonica, acido lattico, AMP, prodotti di degradazione) ed ipertermia, esaurimento delle scorte energetiche (carboidrati, grassi, proteine, enzimi, ormoni, vitamine, elementi minerali), sforzo muscolare eseguito senza un'adeguato allenamento, o allenamento programmato svolto in modo errato, alimentazione inadeguata alle richieste dell'organismo per svolgere un determinato lavoro muscolare (¹⁶⁶).

Quando si vuole valutare e controllare l'attività muscolare di un soggetto i parametri ematici che hanno un maggiore significato sono l'acido lattico, gli enzimi muscolari creatinichinasi (CK) e l'aspartato aminotransferasi (AST).

L'acido lattico è un sottoprodotto dell'attività anaerobica dei muscoli e la sua produzione, nel muscolo scheletrico, avviene in contemporanea con la sua rimozione (). Questo catabolita, in caso di esercizio fisico intenso, si accumula al livello del tessuto muscolare che lo produce e una parte significativa di esso si riversa nel sistema vascolare ematico (), attraverso il torrente ematico raggiunge il cuore, il fegato e i muscoli inattivi, dove viene riconvertito in glucosio. Tuttavia, durante un esercizio fisico intenso e prolungato, può accadere che i muscoli producano nel tempo più acido lattico di quanto gli organi sopra citati ed i restanti muscoli inattivi riescano a metabolizzare. In questo caso, la concentrazione di acido lattico nel sangue aumenta fino al punto in cui non è più possibile che venga smaltito a livello dei muscoli attivi. Ecco che si presentano i noti effetti di affaticamento e successiva incapacità locale allo sforzo. L'acido lattico di fatti è un forte acido organico (pK 3.8) ed al pH fisiologico si dissocia in un protone (H^+) ed un anione ($CH_3H_5O_3^-$) (). L'idrogenione così prodotto viene neutralizzato principalmente dal bicarbonato, quindi man mano che l'acido lattico viene prodotto si assisterà ad una riduzione di bicarbonato che col perdurare del lavoro muscolare potrà dar luogo ad un'acidosi metabolica (). Ad ogni modo, per via del suo ciclo metabolico, una volta che i muscoli hanno ripreso la loro normale attività aerobica e quando il livello in circolo nel sangue scende sotto la soglia critica di concentrazione, l'acido lattico viene immediatamente eliminato dal circolo sanguigno (nel giro di qualche decina di secondi o di pochi minuti), e la gran parte di quello che si era accumulato nei muscoli attivi viene rapidamente smaltito, all'incirca in un'ora dall'attività fisica; riguardo a ciò tuttavia vi potrebbero essere differenze interindividuali e soprattutto razziali (¹⁷³,)

La creatinfosfochinasi (CK) è un enzima citoplasmatico che catalizza sia la formazione di adenosina trifosfato (ATP) che la fosforilazione reversibile della creatinina, utilizzando l'ATP come donatore di fosfato. La sintesi di creatina fosfato è particolarmente importante nei tessuti muscolari, dove funziona da molecola di riserva energetica(). Questa è ben distribuita nell'organismo essendo presente nel muscolo scheletrico, nel miocardio, nel cervello, negli eritrociti, nel fegato, nel pancreas e in molti altri distretti organici, e si differenzia in varie frazioni enzimatiche (BB, MB, MM). In particolar modo la frazione MM costituisce circa il 98% della CK muscolare e circa l'80% della CK miocardica; la frazione CK-BB è

presente a livello del tessuto cerebrale; la frazione MB è relativamente bassa nel miocardio e circa dieci volte più alta nell'intestino, nel rene, polmone (,). Il CK è un indicatore estremamente sensibile del danno muscolare e quindi fornisce spesso valori elevati anche in seguito a danni muscolari secondari a problemi che interessano il muscolo secondariamente (ad esempio per danno pressorio in animale in decubito, convulsioni) (). Incrementi specifici di CK si possono rilevare in numerose condizioni patologiche, quali miopatie ereditarie, ipertermia maligna, ipotiroidismo, avitaminosi E, deficienza di selenio, interventi chirurgici, iniezioni intramuscolari e, in particolare, nell'infarto miocardico, con rapporto diretto fra entità del danno miocardico e il livello degli indici di CK (). La valutazione del CK plasmatico è stata usata per molto tempo per la diagnosi ed il monitoraggio degli infarti miocardici nell'uomo; mentre negli animali è maggiormente usato quale *marker* di danni a livello di muscolatura scheletrica, miopatie nutrizionali o danni muscolari indotti dall'esercizio (¹⁷⁷). Dopo il rilascio, il CK raggiunge il comparto plasmatico, prevalentemente per via linfatica () viene quindi metabolizzato a livello epatico (). Il CK, unitamente al lattato ed al cortisolo ematico, appare indice specifico dell'affaticamento muscolare, tendendo ad aumentare nello sforzo fisico con notevoli caratteri di diversità e variabilità, anche individuale, nelle varie specie animali. Incrementi specifici nel cane sono stati rilevati in varie razze quali ad esempio il *Greyhound* ed il *Labrador Retrievers* (¹⁷³,). L'incremento del CK, diversamente dall'andamento degli indici di lattato, ha manifestato nel cane notevoli caratteristiche di persistenza, rimanendo più elevato rispetto ai valori basali anche 3 ore dopo la conclusione della prova (). Riguardo ai tempi di recupero di valori basali del CK, è stato messo in evidenza anche in altre specie animali, come ad esempio nel cavallo, o nel cammello, nel quale tendono a tornare ai livelli basali solo fra 12 e 36 ore dalla fine della prova (). Si deve comunque tenere in massimo conto anche il carattere di una spiccata individualità diffusa fra le varie specie animali (). La determinazione del CK sembra assumere rilievi funzionali specifici come causa, o almeno concausa, di riduzione della "performance" atletica nel cane da slitta, unitamente alla valutazione di lattato, cortisolo, AST ed altri parametri ematici ().

L'Aspartato transferasi (AST) un tempo noto anche come glutammico ossalacetico transaminasi sierica (SGOT) catalizza il trasferimento dell'aminogruppo dall'L-glutammato all'ossalacetato o dall'L-aspartato all'-chetoglutarato e, portando alla formazione di aspartato, fornisce una fonte di azoto per il ciclo dell'urea. Anche quest'enzima si trova in quantità significative nel tessuto muscolare oltre che negli epatociti, negli eritrociti ed in altri tessuti. Ne esistono di due isoforme: una a localizzazione citoplasmatica (CAST) ed una mitocondriale (MAST). Anche quest'enzima aumenta in seguito ad esercizio muscolare, iniezione intramuscolare, infiammazione o necrosi muscolare. La maggior parte degli enzimi che aumentano nel sangue in corso di patologie muscolari sono a localizzazione citoplasmatica, benché si possa trovare anche la forma mitocondriale dell'AST soprattutto se l'insulto è stato particolarmente severo. Appare evidente che la valutazione complessiva di acido Lattico, CK e AST possono fornire un valido e sicuro indice di

un possibile danno muscolare causato da esercizio eccessivo o mal svolto.

Comportamento del cane in caso di stress.

A questo punto è importante discutere dei comportamenti che sono riscontrabili nel cane quando è sottoposto a stress acuto e cronico.

Questo argomento risulta essere oggetto di numerosi studi sia per quanto riguarda il cane che altre specie animali. L'importanza del comportamento come strumento per valutare il benessere degli animali è stato valorizzato per la prima volta dal Comitato *Brambell*, nella sua relazione sulle pratiche agricole intensive (). Lo studio del comportamento contribuisce a rivelarci ed a farci comprendere come reagiscono gli animali a determinati stimoli, quali ad esempio dolore o situazioni disagiati, ma anche a interpretare il loro comportamento sociale, sia con i conspecifici che con gli eterospecifici. Queste informazioni consentono di determinare l'etogramma della specie animale oggetto di studio. L'etogramma infatti è un catalogo del repertorio comportamentale (o modulo comportamentale) della specie animale studiata. In questo contesto ci occuperemo di descrivere e discutere principalmente i moduli comportamentali che il cane mostra in seguito ad emozioni negative. A tal proposito è molto interessante lo studio di Beerda e collaboratori (), i quali hanno analizzato il comportamento del cane in seguito a vari eventi stressanti, cercando di focalizzare l'attenzione sui cambiamenti comportamentali, fisiologici e immunologici che sono associati ai vari stressor. Ad esempio stressor sperimentali, quale uno *shock* elettrico violento, possono indurre il cane ad urinare, defecare, tentare la fuga, emettere vocalizzazioni di diversa intensità e timbro, può comparire scialorrea, agitazione, tendenza a mostrare stereotipie ed eseguire rapidi movimenti oculari con midriasi (). I soggetti possono inoltre mostrare piloerezione, tremori muscolari, respiro corto ed ansimante, coda fra le gambe, posizione bassa del corpo, movimenti veloci della lingua (¹⁸⁸,). Iperpnea e scialorrea possono presentarsi anche come reazione anticipatoria ad un inevitabile shock elettrico seppur di bassa intensità () e anche in caso di forti rumori (). Questi modelli comportamentali rappresentano, in tale contesto, delle azioni compensatorie per un ottimale termoregolazione (): l'anti-diuresi infatti osservata nei cani che anticipano uno *shock* elettrico inevitabile, aiuta l'organismo a conservare l'acqua necessaria per questa risposta termoregolatoria (¹⁹¹, ¹⁹³). È interessante notare che questa risposta non si manifesta in tutte le razze canine: Corson, in uno studio fatto nel 1971, osservò questa risposta in cani di razza *Fox Terrier* ma non in quelli di razza *Beagle* (¹⁹¹). Questa differenza nella risposta termoregolatoria tra le diverse razze, sembrerebbe attribuibile ad una risposta allo stress prevalentemente del tipo "combatti o fuggi" nei *Terrier* () e "difesa-remissione"() nei cani *Beagle* (¹⁹³). C'è da aggiungere che gli shock elettrici non sono stati usati solo in condizioni sperimentali come *stressor*, ma tutt'oggi sono anche usati come discutibili metodi di apprendimento del cane (). Leccarsi le labbra,

sollevare la zampa anteriore, avere una postura bassa o seduta, sono stati segnalati quali indicatori comportamentali di stress in cani soggetti ad un duro metodo di allenamento (). Anche una postura bassa, di sottomissione, viene considerata un indicatore di stress (^{188, 197}). Nel comportamento sociale del cane quello della sottomissione è un concetto strettamente correlato con la paura e gli schemi comportamentali che la caratterizzano. Questi ultimi sono: orecchie portate indietro (talvolta anche completamente appiattite sulla testa), labbra tirate indietro (senza mostrare i denti), occhi socchiusi (stretti, che ammiccano), flessione degli arti (il corpo si acquatta), coda abbassata (a volte tenuta completamente tra le zampe) (). Cani sottoposti a stress ambientali, come ad esempio, costretti all'isolamento e a stare in spazi ristretti (inferiori ai 3 m²), manifestano una riduzione di attività () o inattività completa (¹⁸⁸), dovuti probabilmente alla mancanza di stimoli e di spazio adeguato per il manifestarsi di qualsiasi modulo comportamentale e non necessariamente legati alla causa stressante (¹⁸⁸). Il confinamento del cane in spazi ristretti solitamente induce l'animale a compiere movimenti e azioni ripetitive quali il camminare senza una finalità, inseguirsi la coda, rimbalzare sui muri di recinzione, succhiarsi il fianco (¹⁹⁹), così pure attività di *grooming* eccessivo e morsicare o leccare le barriere del recinto (). Comportamenti stereotipati anche nel cane, così come negli animali da allevamento (), sono indicativi di una prolungata situazione di stress (^{188, 189}).

Beerda in un suo lavoro () afferma che un aumento di alcuni moduli comportamentali quali, scuotimento del corpo, accovacciarsi, uso della bocca, sbadiglio, agitazione e postura bassa sono indicatori comportamentali di uno stress acuto. L'intensità ed il tipo di risposta comportamentale ovviamente dipendono in modo molto stretto dallo stressor che lo ha causato. Stimoli causanti stress prevedibili dal cane (come ad esempio l'aprirsi di un ombrello) o che per verificarsi necessitano della presenza dell'uomo, inducono agitazione, posture moderatamente basse, frequenti scuotimenti del corpo e "comportamento orale" (²⁰²). Il cane risulta particolarmente sensibile ad alcuni stressor (quali shock elettrici, scoppi improvvisi, borsa che cade) che ne causano posture molto basse, associati ad elevati livelli ematici di cortisolo (^{192, , , ,}). Non sorprende il fatto che non si manifestino, in questi casi, "comportamenti orali" (anche questi moduli comportamentali associati con forti stress), in quanto questi ultimi sono comportamenti tipici del contesto della vita sociale del cane (²⁰²). Ad esempio, leccarsi il muso (che è uno dei tanti "comportamenti orali") può esprimere sottomissione in un ambiente sociale stressante (¹⁹⁷). Sotto quest'ottica non stupisce che in condizioni stressanti sperimentali, i "comportamenti orali" siano notevolmente aumentati quando lo stressor (ad esempio apertura di un ombrello o il contenimento fisico) richieda la presenza dello sperimentatore (²⁰²). Proprio a questo riguardo va quindi sottolineato che molti moduli comportamentali del cane hanno specifici significati comunicativi associabili a dei "segnali calmanti". Questi sono circa una trentina (quelli conosciuti) e vengono spesso utilizzati dai cani per prevenire o interrompere qualcosa, ma anche per calmare se stessi quando si sentono stressati o a disagio, sia per trasmettere al destinatario del messaggio il proprio stato emozionale pacifico. Alcuni dei segnali calmanti sono: girare la testa, guardare altrove evitando

uno sguardo diretto, socchiudere gli occhi, leccarsi il muso, sbadigliare, annusare (). In conclusione, uno stato di stress acuto può essere individuato con la valutazione comportamentale ma dovrebbe essere analizzato considerando il tipo di stressor e le caratteristiche individuali del cane; la contemporanea valutazione dei parametri fisiologici può sicuramente essere di aiuto per evitare fraintendimenti (²⁰²).

Per quanto riguarda invece i moduli comportamentali espressi dai cani in seguito a stress cronico, gli studi risultano essere più problematici dal punto di vista applicativo, soprattutto per motivi etici. Infatti non è accettabile sottoporre gli animali a regimi stressanti tali da danneggiare drasticamente la loro salute (). La maggior parte degli studi su questo argomento sottopongono i cani a restrizioni spaziali e sociali (²⁰⁸, ,). Il cane è un animale altamente sociale; la risposta comportamentale di un cucciolo separato dal suo ambiente e dal suo gruppo familiare è ben documentato (,). Malgrado tutto, la risposta fisiologica e comportamentale del cane adulto alla separazione è oggetto di numerosi studi (²⁰⁹). Rapporti clinici ed altre osservazioni descrivono gli effetti della separazione sul cane allevato in famiglia e suggeriscono come esso rimanga vulnerabile alla separazione per tutta la durata della sua vita (, , ,). Si è osservato che alcuni cani, giovani e adulti, similmente alla reazione di giovani primati, si mettono in mostra con vocalizzazioni e comportamenti distruttivi, apparentemente come “reazione di protesta”, immediatamente dopo l’allontanamento da parte del proprietario, una calorosa accoglienza al suo rientro ed una persistente vicinanza durante il resto del tempo (²¹⁵, ²¹⁶). I comportamenti distruttivi mostrati durante periodi di isolamento rappresentano un altro motivo per investigare sugli effetti della separazione in questi animali infatti rappresenta uno dei più frequenti problemi comportamentali in cani allevati in famiglia (²¹³).

Lo stress cronico indotto dall’isolamento sociale può determinare nel cane sia un’inattività (¹⁹⁹), che un aumento dell’attività motoria (²⁰⁰).

Alcuni studi hanno evidenziato come cani tenuti in ambienti disagiati mostrano per lo più un incremento dell’immobilità, del *grooming*, delle manipolazioni dell’ambiente, di movimenti ripetitivi (¹⁹⁹, ²⁰⁰), *circling*, leccarsi le zampe, sospirare (²⁰⁸), ma non quei tipi di comportamenti che sono associati alla paura. Lo studio di Beerda (²⁰⁸) ha inoltre evidenziato come le cattive condizioni climatiche le restrizioni spaziali e sociali aumentino la frequenza del *autogrooming*, *circling*, coprofagia, sollevamento della zampa anteriore, sospiri e vocalizzazioni a dimostrazione dello stato di stress. In conclusione i comportamenti più frequenti che si possono osservare in caso di stress cronico e che possono essere utilizzati per il suo riconoscimento sono considerati essere: *autogrooming*, vocalizzazioni, frequente sollevamento della zampa anteriore, stereotipie (²⁰⁸).