

Cortisolo salivare: un marcatore della risposta adattativa dell'organismo agli stimoli ambientali



L'attenzione crescente per il benessere animale ha stimolato lo studio dei marcatori della risposta adattativa dell'organismo all'ambiente e il cortisolo è considerato una delle molecole più interessanti. La saliva è un liquido biologico semplice da campionare rispetto ad altri, che ha il vantaggio di riportare le variazioni di concentrazione del cortisolo nel sangue con un ritardo di 20-30 minuti, "fotografando" la risposta adattativa allo stimolo passato, senza risentire delle manualità del prelievo. Risultati di recenti studi hanno indicato che il cortisolo salivare può essere utilizzato come biomarcatore per alcune patologie, alterazioni comportamentali e come supporto nelle attività cinotecniche e sportive del cane. La disponibilità di sistemi di misura del cortisolo salivare di tipo Point Of Care offre oggi al veterinario un valido ausilio per valutare il grado di attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene del cane in risposta agli stimoli a livello centrale o periferico.

Alice Colussi,
Animal Scientist

Misa Sandri,
Animal Scientist,
PhD

Bruno Stefanon*,
Full professor
Animal Genetic

Il cortisolo è uno dei glucocorticoidi (GC) che viene utilizzato comunemente per valutare l'attività dell'asse HPA (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal axis) e la risposta adattativa dell'organismo sia a livello centrale, legato alla stimolazione ambientale sul sistema nervoso, sia a livello periferico, connessa a modificazioni metaboliche, traumi

Il cortisolo è un glucocorticoide prodotto principalmente per effetto della risposta adattativa dell'asse ipotalamo-ipofisi surrene a diversi stimoli interni ed esterni all'organismo.

o risposte immunitarie dei diversi tessuti e organi. In alcuni casi, oltre che dall'asse HPA, la secrezione dei GC può essere stimolata dai centri encefalici superiori sia in condizioni normali (ritmo sonno-veglia nell'uomo) sia in situazioni sfavorevoli (paura, ansia, dolore, freddo ecc), favorendo il ripristino dell'omeostasi.^{1,2}

RUOLO PLEIOTROPICO DEL CORTISOLO

La molteplicità di effetti del cortisolo a livello metabolico e sulla risposta adattativa richiede un complesso meccanismo di regolazione che in alcuni aspetti non è ancora del tutto noto. Stimolato dall'ormone adrenocorticotropo (ACTH), una volta in circolo, il cortisolo nell'uomo ha un'emivita che varia dai 70 ai 120 minuti.^{3,4}

Gli effetti metabolici legati alla presenza del cortisolo riguardano principalmente la gluconeogenesi a livello epatico, la deposizione di grasso e la regolazione a livello cerebrale dei neuropeptidi ipotalamici coinvolti nella regolazione dell'appetito. Inoltre, in questi tessuti, il cortisolo tramite l'azione degli enzimi 11 β -HSD (11 β -hydroxysteroid dehydrogenase) isoforma 1 e 2 può essere localmente inattivato a cortisone o rigenerato a partire dallo stesso ormone, permettendo quindi di bypassare la secrezione dell'ormone da parte del surrene.⁵ In situazioni di stress acuto (fight or flight), concentrazioni elevate di cortisolo aumentano il rilascio di glu-

cosio nel sangue e la sensazione della fame facilitando così la risposta allo stress stesso. Nel tessuto adiposo invece il cortisolo ha un effetto anabolico che può potenzialmente favorire la deposizione di nuovo tessuto in aree metabolicamente svantaggiose. Questo aspetto rende il cortisolo oggetto di nuova attenzione per comprendere meglio meccanismi endocrini legati anche all'obesità.⁵

L'effetto pleiotropico del cortisolo è fondamentale per la risposta adattativa dell'organismo, e una stretta regolazione a feedback negativo sull'asse HPA evita la sovraesposizione dei tessuti target, prevenendone gli effetti negativi tipici quali intolleranza al glucosio, immuno-soppressione, aumento della pressione sanguigna, osteoporosi, antagonismo per l'insulina, alterazioni della crescita e della riparazione tissutale fino alla sindrome di Cushing.⁵

L'effetto pleiotropico del cortisolo provoca conseguenze sia a livello metabolico sia sulla risposta adattativa dell'organismo e la sua attività a livello cellulare è mediata dall'attivazione dei recettori per i glucocorticoidi.

A livello cellulare gli effetti del cortisolo sono mediati dall'attivazione di recettori per i GC (GR), i quali sono presenti in 5 differenti isoforme e caratterizzati da funzioni specifiche non del tutto conosciute e probabilmente responsabili dell'attività pleiotropica.⁶

La complessità di questo modello deriva anche dalla capacità del cortisolo di regolare la trasduzione dei segnali

nei diversi tessuti o sistemi attraverso il legame con i recettori sia a livello citosolico (controllo non genomico) sia a livello nucleare (controllo genomico) (Figura 1).

Nel controllo non genomico, i GC svolgono un'azione di attivazione/disattivazione nel citosol interagendo con le membrane sia in maniera GR-indipendente, agendo direttamente sulle chinasi proteiche (MAPKs) sia attraverso il legame con i GR di membrana che può determinare una rapida attivazione di segnali anti-infiammatori.^{7,8} A livello centrale i GR inoltre, insieme ai recettori per i mineral-corticoidi (MR), svolgono un'azione determinante nel coordinare una rapida risposta adattativa allo stress, con la partecipazione di pre-recettori ancora oggetto di studio.^{9,10}

Nel controllo genomico, i recettori GR agiscono invece direttamente a livello nucleare. I GR sono inizialmente presenti nel citosol associati a grandi complessi multi proteici con funzione di *chaperone*. In seguito al legame con il ligando, il complesso si rompe esponendo così le sequenze di localizzazione nucleare (NLS) permettendone quindi la traslocazione nel nucleo, dove i GR possono determinare cambiamenti trascrizionali positivi (transattivazione) e negativi (trans repressione).⁶

IL DOSAGGIO DEL CORTISOLO NELLE MATRICI BIOLOGICHE

Il cortisolo è coinvolto in diversi processi biologici a livello metabolico, immunitario e nervoso e le sue variazioni riflettono quindi la risposta adattativa all'ambiente nell'accezione più ampia del termine, richiedendo così di prendere in considerazione tutte le azioni in cui questo ormone viene coinvolto. Il dosaggio del cortisolo rappresenta un metodo che, associato ad altri elementi diagnostici, offre il vantaggio di valutare in modo più oggettivo e completo la risposta biologica dell'organismo, permettendo di confrontare i dati raccolti in contesti differenti con valori di riferimento.

Il cortisolo può essere rilevato in diverse matrici biologiche, tra cui le meno invasive sono pelo, urina e saliva.

Campionamento

Il cortisolo può essere determinato in diverse matrici biologiche tra cui sangue, saliva, urina e pelo. Le potenzialità applicative del cortisolo hanno stimolato la ricerca di modalità di campionamento non invasive che non interferiscano sulla secrezione dell'ormone ma che riflettano accuratamente l'attivazione dell'asse HPA.¹¹

Il sangue è stato una delle prime matrici di riferimento per valutare le concentrazioni di cortisolo per la diagnosi di patologie o problematiche comportamentali, e quindi per valutare l'efficacia delle terapie.

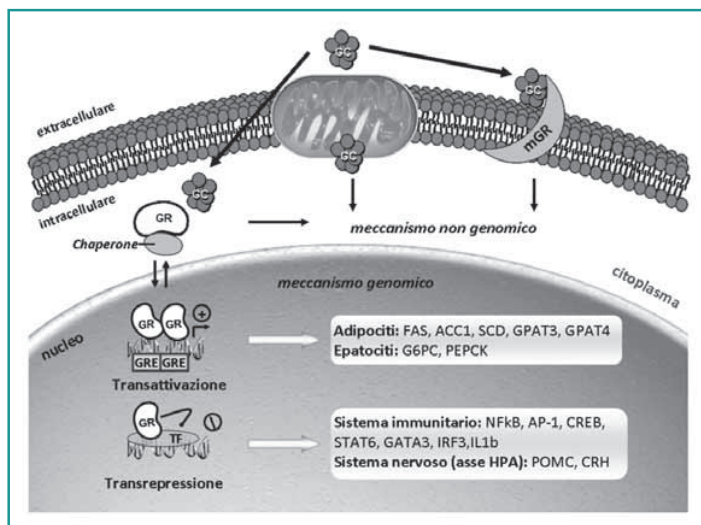


Figura 1 - Meccanismo genomico e non genomico di trasduzione del segnale dei GC (modificato da Ratman et al.⁹).

Note: mGR: membrane Glucocorticoid Receptor; GR: Glucocorticoid Receptor; GC: GlucoCorticoid; GRE: Glucocorticoid Response Element; TF: Transcription Factor.

Il campione ematico fornisce una visione istantanea dei livelli di cortisolo, la cui secrezione è molto sensibile in risposta a cambiamenti ambientali sia interni che esterni, tra i quali rientrano anche le manualità per il prelievo. Manipolazioni superiori a due minuti infatti provocano variazioni significative nella concentrazione di cortisolo ematico^{12,13,14,15} con il rischio di artefatti nella valutazione dell'attivazione dell'asse HPA.

Alternativa al sangue è il pelo, che non fornisce indicazioni sugli stress acuti, compresi quelli di gestione durante il campionamento. Il meccanismo studiato fino ad ora di accumulo degli steroidi nel pelo in crescita, indica che questo avviene tramite i vasi sanguigni che alimentano il follicolo e sembrerebbe che in misura minore avvenga anche attraverso le ghiandole sudoripare sebacee e le ghiandole eccrine circostanti, le quali, una volta che il pelo emerge dal cuoio capelluto, lo rivestono rispettivamente con sebo e con sudore. Sembra però che il follicolo produca il cortisolo anche localmente in risposta ad uno stress sistemico più ampio, ad una irritazione cutanea localizzata o come parte del suo normale funzionamento. All'interno del follicolo il legame cortisolo-fibra capillare è complesso e probabilmente coinvolge sia la melanina che la cheratina.^{16,17} Il

La concentrazione del cortisolo nel pelo riflette variazioni dell'ormone a lungo termine (risposta cronica), mentre a livello salivare riflette variazioni puntuali (risposta acuta).

cortisolo nel pelo riflette quindi la secrezione endocrina di un periodo di mesi, utile come marcatore sensibile di stress cronico, senza alterazioni sensibili legate a eventi di breve durata.

L'accumulo di cortisolo nel pelo varia però in relazione al colore del mantello, in quanto nei mammiferi esistono delle somiglianze fisiologiche e biochimiche tra la produzione di glucocorticoidi e quella dei pigmenti del pelo. La produzione del pigmento infatti è regolata dall'ormone melanotropo (MSH, Melanocyte-Stimulating Hormone), derivante dal POMC, precursore anche dell'ACTH, l'ormone adrenocorticotropo che stimola la secrezione del cortisolo. Inoltre, la presenza e l'espressione del gene Agouti, uno dei maggiori geni implicati nella colorazione del mantello, ha un effetto antagonista competitivo nei confronti dei recettori melanocortinici dell'MSH. Anche le caratteristiche genetiche legate al mantello possono quindi influenzare l'accumulo di cortisolo nel pelo. I peli di colore nero presentano infatti una concentrazione di cortisolo inferiore rispetto ai peli non neri, in

quanto i primi contengono più pigmento che occupa lo 'spazio' disponibile per i glucocorticoidi, mentre le concentrazioni sono maggiori nei peli dei mantelli di colore più chiaro.¹⁵

Il cortisolo salivare riflette invece in modo preciso le variazioni ematiche,¹⁸ con un ritardo di 20-30 minuti,^{19,20} e per questo viene usato come misura della risposta acuta allo stress, utile per valutare la risposta adattativa anche nel cane, come reazioni immediate a minacce e interazioni uomo-animale. Il ritardo nel trasferimento alla saliva permette inoltre di evitare artefatti legati alle manualità durante il campionamento. Il campione di saliva riflette simultaneamente l'attività del sistema nervoso simpatico (stress acuto) e dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene.²⁰

Il campionamento della saliva è inoltre un metodo non invasivo^{21,22} e la ripetizione dell'analisi nel tempo permette di valutare la risposta adattativa anche nel medio o lungo periodo.

Essendo la concentrazione del cortisolo salivare circa il 7-12% di quella plasmatica^{21,23}, l'analisi deve essere più sensibile rispetto a quella utilizzata per il plasma.

Contaminazioni di sangue, emolisi, pH ed eccessivi residui di cibo nella saliva possono interferire con l'analisi del cortisolo, come anche l'utilizzo di materiali che interagiscono con l'analita in fase di raccolta e conservazione del campione. Le proteine plasmatiche invece, presenti solo in tracce nella saliva, non rappresentano un problema²¹.

Non va però dimenticato che la secrezione salivare è sotto il controllo neuronale, quindi la stimolazione da parte delle innervazioni del simpatico può causare vasocostrizione e una diminuzione del flusso salivare, riducendo così la possibilità di raccogliere un campione sufficiente per l'analisi. Per questo motivo è sempre utile stimolare la salivazione del cane, ad esempio facendogli annusare del cibo per qualche secondo, inducendo così la secrezione di saliva senza causare stress.¹⁵

Fattori che influenzano la concentrazione di cortisolo nella saliva del cane

In una ricerca effettuata con cani adulti clinicamente sani^{24,25} si è rilevato un effetto significativo dello status sessuale sul cortisolo salivare (Grafico 1): i soggetti sterilizzati presentavano concentrazioni inferiori rispetto a quelli interi mentre i maschi e le femmine intere non hanno mostrato differenze significative. È emersa inoltre una relazione tra il cortisolo salivare e il peso, la taglia e la razza dei soggetti^{24,25,26,27} (Grafico 2)²⁵.

Queste osservazioni sono coerenti con un ulteriore studio²⁸ che evidenzia un aumento significativo di attività e di impulsività dei cani di taglia piccola rispetto ai cani di taglia grande.

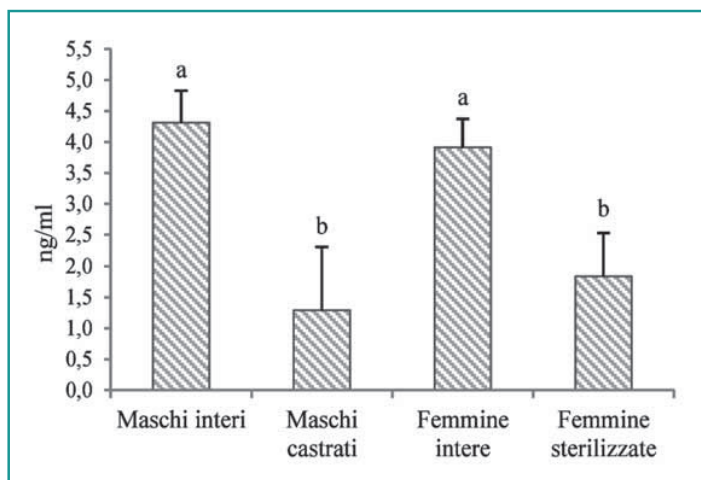


Grafico 1 - Variazioni del cortisolo salivare (ng/ml) in relazione al sesso.

Note: a, b, c: lettere diverse indicano differenze significative fra le medie per $P < 0,05$.

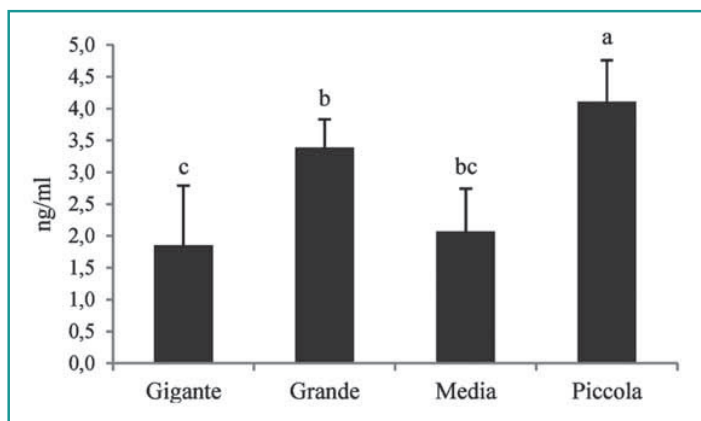


Grafico 2 - Variazioni del cortisolo salivare (ng/ml) in relazione alla taglia.

Note: a, b, c: lettere diverse indicano differenze significative fra le medie per $P < 0,05$.

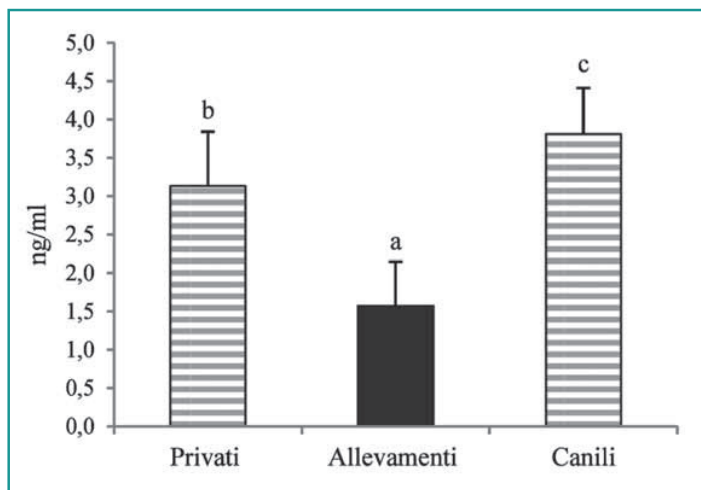


Grafico 3 - Variazioni del cortisolo salivare (ng/ml) in relazione all'ambiente.

Note: a, b, c: lettere diverse indicano differenze significative fra le medie per $P < 0,05$.

Anche l'ambiente di vita influenza le concentrazioni di cortisolo, che risultano maggiori nei soggetti ospitati in rifugio rispetto a quelli in allevamento o in ambito domestico (Grafico 3).²⁴ A tal proposito alcuni studiosi²⁹ hanno evidenziato come il ricovero dei cani nel rifugio causi un'attivazione prolungata dell'asse HPA che, pur rappresentando una condizione di stress cronico, comporta un progressivo adattamento della risposta alle condizioni ambientali anche in termini di concentrazioni di cortisolo.

Anche variazioni nel corso della giornata sono state osservate nei cani ospitati nei rifugi, da cui è emersa una riduzione dei livelli di cortisolo in seguito all'interazione con l'uomo (Grafico 4).²⁵ I prelievi di saliva effettuati nel presente studio, pre e post interazione con l'uomo, sono avvenuti entrambi in mattinata, ad una distanza di circa 30 minuti, evitando eventuali interferenze con un ritmo circadiano.^{30,25} I risultati ottenuti, sembrano far emergere come un'interazione positiva con l'uomo determini miglioramenti nel comportamento sociale e nel benessere fisiologico dei cani nei rifugi, con maggiori possibilità di adozione.³¹ Altri studiosi hanno osservato variazioni delle concentrazioni di cortisolo dei cani anche in relazione al sesso della persona con cui interagivano, con riduzione della concentrazione di cortisolo salivare in seguito all'interazione con persone di sesso femminile.²⁹

Le variazioni delle concentrazioni di cortisolo salivare nel cane sono influenzate dal genere, dalla taglia e dagli ambienti di vita.

In un'ulteriore ricerca è stato riscontrato un significativo aumento di cortisolo salivare nei cani in seguito ad ospedalizzazione, con una correlazione significativa tra concentrazioni elevate e comportamenti 'anomali' come l'ansimare e il leccarsi le labbra.³²

In una ricerca precedente,²⁰ le concentrazioni di cortisolo salivare sono aumentate, da un valore di base compreso fra 2,16 e 4,68 ng/ml a un valore medio di 6,01 ng/ml in seguito all'esposizione dei cani ad una serie di differenti stimoli.

Risultati simili sono stati ottenuti confrontando cani della stessa razza sottoposti per sei settimane ad ambienti individuali e con spazi più ristretti rispetto a quelli a cui erano abituati.

Le concentrazioni di cortisolo nella saliva hanno trovato corrispondenza con il palesarsi di comportamenti anomali, con successivo sviluppo di iporesponsività dell'asse HPA agli stimoli acuti.^{33,11}

In definitiva, la semplicità e la non invasività del campionamento della saliva offrono la possibilità di far rac-

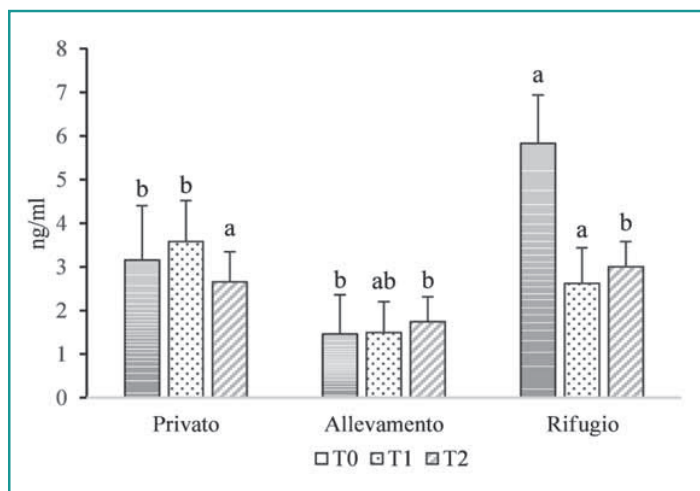


Grafico 4 - Variazioni del cortisolo salivare ng/ml in relazione all'ambiente e al momento della giornata.

Note: T0: campionamento effettuato al mattino durante la prima interazione con l'uomo, poco prima del pasto (6:00-8:00 AM).

T1: campionamento effettuato 30 minuti dopo la prima interazione del mattino.

T2: campionamento effettuato la sera, 30 minuti dopo l'ultima interazione con l'uomo.

a, b, c: lettere diverse indicano differenze significative fra le medie per $P < 0,05$.

mento successivo all'evento di interesse senza rischiare interferenze dovute al contenimento del soggetto. Ad esempio, nel caso di un sospetto problema comportamentale legato ad una situazione ambientale particolare, è possibile raccogliere il campione di saliva 20 minuti dopo la manifestazione del comportamento anomalo del cane, confrontando la concentrazione di cortisolo con il valore rilevato in un momento di tranquillità.

Potenzialità applicative della misura del cortisolo nella saliva

Gli studi riportati evidenziano l'utilità del cortisolo salivare nel rilevare lo stato di attivazione dell'asse HPA nel cane in relazione a condizioni fisiologiche e a stimoli ambientali di diversa natura.

L'interesse per questo ausilio conoscitivo e la sua utilità diagnostica sono dimostrati dal numero crescente di pubblicazioni

cogliere il campione anche al proprietario, in un momento particolare e in luoghi diversi da quelli canonici come l'ambulatorio veterinario (Figure 2, 3, 4, 5). Inoltre, il ritardo nel trasferimento del cortisolo nella saliva rispetto alla secrezione nel sangue, pari a circa 20-30 minuti, consente di raccogliere il campione in un mo-



Figura 2 - Stimolazione della salivazione del cane con un alimento, senza però consentirne l'ingestione prima di aver effettuato il campionamento.



Figura 3 - Campionamento della saliva del cane. Esempio di posizionamento del tampone nella bocca del cane; il tempo necessario per ottenere una buona imbibizione è di almeno 15-20 secondi per 2-3 volte consecutive.



Figura 4 - Inserimento del tampone imbibito nella provetta.



Figura 5 - Chiusura della provetta con il tappo.

scientifiche sul cortisolo salivare nel cane degli ultimi 3-5 anni. In prima istanza l'utilità della misura del cortisolo riguarda il supporto alla diagnosi delle patologie comportamentali, ma il ruolo pleiotropico dei GC e del cortisolo in particolare apre l'orizzonte a numerosi altri impieghi, analogamente a quanto già avviene nell'ambito biomedico umano e delle scienze animali per le specie da reddito.

Esercizio e attività cinotecniche

Il cortisolo salivare nell'uomo in relazione all'esercizio fisico ha riscosso recentemente un considerevole interesse sia per verificare la risposta all'intensità del gesto atletico sia per valutare la capacità di recupero dell'organismo,^{34,35,36} ed anche nella verifica durante l'attività fisica dell'efficacia di alcuni composti funzionali.³⁷

Analogamente, nelle attività cinofile, in contesti in cui il soggetto è sottoposto a diversi stimoli sia fisici che psicologici, le variazioni di cortisolo consentono confronti fra i diversi soggetti del livello di fitness, sia nel corso di una sessione di lavoro sia entro soggetto nel corso di un programma di allenamento e di addestramento. In letteratura sono presenti ancora esigui studi in merito alle variazioni di cortisolo in cani sottoposti ad attività fisica. Alcune ricerche³⁸ hanno valutato l'entità dello stress causato da gare di agility in cani di razza Border Collie, cane da Pastore Australiano Kelpie, Boxer, cane da Pastore Belga, Pastore Tedesco, Pit Bull, Pinscher, Barbone e in meticcì. I risultati hanno evidenziato un incremento delle concentrazioni di cortisolo in seguito alla gara, oltre alla

Il cortisolo salivare può rappresentare un buon marcatore anche per la valutazione degli effetti di attività fisiche e/o psichiche come l'allenamento, attività cinotecniche e attività assistite con gli animali.

manifestazione di alcuni comportamenti riconducibili ad una condizione di stress.

Relativamente agli effetti di diversi carichi di lavoro sulle concentrazioni di cortisolo, alcuni ricercatori hanno svolto un'indagine su cani sottoposti a sforzi fisici di bassa ed elevata intensità. In particolare, i cani sono stati fatti esercitare su *tapis roulant* a velocità diverse per una durata di 90 minuti circa.³⁹ Le concentrazioni di cortisolo ematico sono aumentate durante l'esercizio, ad una velocità che rifletteva l'intensità dell'esercizio stesso. Il suo rilascio appare quindi correlato alla durata e all'intensità dello sforzo.

In un altro studio preliminare²⁵ sono state valutate le variazioni di cortisolo salivare in cani durante attività di caccia da ferma (Setter Inglesi), su traccia di sangue (Segugi da montagna Bavaresi e Segugi di Hannover), in caccia ad ungulati (Segugi Istriani, Griffon Nivernais e Segugi Italiani). I soggetti reclutati, in base al tipo di caccia hanno sostenuto sforzi sia mentali che fisici diversi per durata ed intensità. I risultati emersi da questo studio hanno indicato un significativo innalzamento delle concentrazioni di cortisolo, particolarmente evidente per i cani da caccia da ferma, sottoposti allo sforzo fisico più intenso ($P < 0.05$).²⁵ Le variazioni di cortisolo salivare sono invece risultate modeste per i cani da traccia e da se-

guita, confermando precedenti osservazioni in Pastori Tedeschi impegnati in un contesto di pista durante gare di Utilità e Difesa, e cioè una ridotta attivazione dell'asse HPA nelle attività per le quali è richiesta una maggiore concentrazione mentale.⁴⁰

Attività assistite con gli animali

L'impegno psichico nel cane adeguatamente allenato non sembra quindi comportare fenomeni di stress tali da alterare in modo consistente l'omeostasi. Sembrano confermarlo i risultati ottenuti in cani impiegati in attività assistite con animali (AAA), nei quali il cortisolo salivare non subisce variazioni significative in seguito all'interazione con i pazienti.⁴¹ Risultati simili si sono ottenuti in uno studio preliminare²⁵ dove si è evidenziato, come, in cani impiegati nell'AAA, si sia verificata una diminuzione significativa ($P < 0,05$) della concentrazione di cortisolo salivare a 20 minuti dalla fine della seduta ($1,47 \pm 0,15$ ng/ml) rispetto a quella misurata immediatamente prima dell'inizio ($2,07 \pm 0,16$ ng/ml). Va inoltre considerato che l'AAA si è svolta dalle 10:00 alle 11:45, in un momento della giornata in cui si dovrebbe osservare un aumento della concentrazione salivare di cortisolo per effetto dell'andamento circadiano.^{25,30} La misurazione dell'ormone nella saliva permetterebbe quindi di identificare i soggetti meno adatti alle AAA, attraverso il rilevamento di livelli elevati di cortisolo e di verificare nel tempo e precocemente, condizioni di alterata omeostasi del cane connessa alle attività stesse.

Genetica e selezione

I dati disponibili sulle variazioni del cortisolo salivare in relazione alle AAA, all'addestramento, ai programmi educativi e di riabilitazione psico-motoria e alle attività fisiche condizionali o coordinative più in generale sono ancora limitati, ma offrono lo spunto per importanti riflessioni non solo dal punto di vista fisiologico, ma anche da quello etologico e dei programmi di selezione. Nell'uomo, il consorzio CORNET (CORTisol NET-

Il cortisolo salivare, oltre al supporto diagnostico può offrire applicazioni interessanti per la selezione di razza, ad esempio per la valutazione di un fenotipo di capacità di risposta adattativa.

work) ha recentemente pubblicato uno studio di GWAs (Genome Wide Association study) che ha evidenziato una significativa componente genetica nelle concentrazioni del cortisolo plasmatico legate a mutazioni di geni coinvolti nel legame del cortisolo con la Corticosteroid Binding Globulin e alpha1-Antitrypsin.⁴² Mutazioni del DNA associate alle concentrazioni plasmatiche di cortisolo sono state identificate anche nel suino.⁴³ Secondo CORNET, inoltre, l'ereditabilità del cortisolo plasmatico nell'uomo varierebbe dal 30 al 60%.

Per la specie *Canis lupus familiaris* non sono ancora disponibili studi di associazione o di stime di ereditabilità, ma le analogie con i mammiferi^{43,44} indicano la presenza

Tabella 1 - Applicazioni del cortisolo salivare nell'allenamento e addestramento, nell'educazione e risposta relazionale, nella fisiopatologia e nella psicopatologia

Allenamento e addestramento <ul style="list-style-type: none"> • Predisposizione individuale per le attività cinotecniche • Livello di fitness in corso di allenamento e addestramento • Controllo stress durante periodi di intensa attività cinotecnica e cinoagonistica • Valutazione composti funzionali ed ergogenici • Controllo stress in cani per il servizio civile, militare e di polizia 	Fisiopatologia <ul style="list-style-type: none"> • Sindrome di Cushing, ipercortisolismo • Morbo di Addison, ipocortisolismo • Diabete mellito • Sindrome metabolica e obesità • Malattie cardio vascolari • Infarto cardiaco • Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali e IBD
Educazione e Risposta relazionale <ul style="list-style-type: none"> • Controllo fasi di socializzazione cucciolo • Attività e terapie assistite con animali (AAA, AAT) • Qualità della vita in allevamenti, canili, rifugi • Risposta emozionale ai programmi educativi e rieducativi • Adattamento in fase di adozione • Adattamento ai nuovi ambienti 	Psicopatologia <ul style="list-style-type: none"> • Ansia • Disturbi ossessivo-compulsivi/fobie • Depressione • Iperattività/aumento dell'eccitazione e dello stato di ipersensibilità-iperattività (HS-HA) • Stress posttraumatico • Anoressia nervosa • Atteggiamenti compulsivi con il cibo

di una forte base genetica nella risposta adattativa all'ambiente che potrebbe essere utilizzata per finalità selettive, giustificando differenze caratteriali ed attitudinali fra le razze e permettendo l'identificazione di linee di sangue più predisposte per le attività tipiche di razza. La determinazione del cortisolo in questo caso, da marcatore puntuale di una condizione fisiologica di un soggetto, potrebbe rappresentare, una volta standardizzato il protocollo di dosaggio, un fenotipo oggetto di selezione.

Patologie

L'analisi del cortisolo nella saliva del cane è anche utile in tutte le situazioni di sospetto ipercortisolismo o di alterata funzionalità, anche secondaria, delle ghiandole surrenali.²³ In clinica medica umana, la misura del cortisolo salivare rappresenta un ausilio diagnostico che viene sempre più considerato per alcune patologie, quali la NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease), la sindrome metabolica, l'obesità e le patologie cardiovascolari,^{45,46} nonché nella malattia e nella sindrome infiammatoria dell'intestino (IBD, IBS).⁴⁷ In Tabella 1 sono riportate alcune delle applicazioni che

la misura del cortisolo salivare del cane può offrire sia in base alle conoscenze attuali sia in termini prospettici, mutuando quanto già avviene per l'uomo.^{48,49}

CONCLUSIONI

La valutazione delle concentrazioni di cortisolo in una matrice come la saliva può essere considerata una risorsa data la non invasività del campionamento e il buon parallelismo con le variazioni ematiche. Inoltre, la possibilità di effettuare una lettura immediata delle concentrazioni di cortisolo tramite dei kit rapidi attualmente disponibili rappresenta uno strumento utile sia per il veterinario, che ha la possibilità di avere un quadro più completo dello stato di salute dell'animale, sia per altre figure professionali come addestratori ed educatori cinofili, permettendo una valutazione più completa della qualità del programma psicopedagogico e di allenamento e della risposta all'attività del cane. In relazione alla componente genetica, la rilevazione delle concentrazioni di cortisolo salivare, qualora misurata in condizioni prestabilite e secondo un protocollo standard, può diventare uno strumento utile agli allevatori per valutazioni caratteriali ed attitudinali della razza utili anche a fini selettivi.

PUNTI CHIAVE

- L'effetto pleiotropico del cortisolo è fondamentale nella risposta adattativa dell'organismo, e si esplica a livello cellulare mediante la capacità di regolare la trasduzione dei segnali attraverso il legame con i recettori sia a livello citosolico, sia a livello nucleare.
- L'interesse crescente degli ultimi anni nei confronti del cortisolo salivare nel cane offre la possibilità di numerosi utilizzi sul piano pratico analogamente a quanto già avviene nell'ambito biomedico per l'uomo e delle scienze animali per le specie da reddito.
- Nonostante non ci siano ancora studi di associazione genica o stime di ereditabilità nel cane, le analogie con altre specie indicano la possibilità di utilizzare il cortisolo salivare come un fenotipo oggetto di selezione.
- La misura del cortisolo salivare con un kit rapido può essere un valido strumento non invasivo utile a diverse figure professionali come il medico veterinario, l'addestratore, l'educatore e l'allevatore.

Salivary cortisol: a marker of the adaptive response of the organism to environmental stimuli

The increasing attention on animal well-being and the study of relative biomarkers identify cortisol as one of the most interesting. Saliva is a biological fluid and represents a matrix easy to be collected and advantageous, resembling the hematic variation of cortisol during adaptive response with a 20-30 minutes delay and without interferences due to animal handling. Recent studies showed as saliva cortisol can be used as biomarker for disease diagnosis, as such as for behavioral modifications or in support of dogs activities and sports. The new Point of Care devices for saliva cortisol concentration in dogs represent for the practitioners an useful tool to evaluate the Hypothalamic Pituitary Adrenal (HPA) axis activation state in response to central or peripheral stimuli.

BIBLIOGRAFIA

1. Poli A. Fisiologia degli animali. Regolazione-diversità-adattamento. Edizione Zanichelli, 2006.
2. Swenson MJ, Reece WO. Duke's Fisiologia degli animali domestici. Edizione Idelson Gnocchi, 2002.
3. Wiebke A, Stewart PM. Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism, and action. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 34:293-313, 2005.
4. Sjaastad ØV, Hove K, Sand O. Physiology of Domestic Animals. Scandinavian Veterinary Press, 2003.
5. Harno E, White A. Will treating diabetes with 11 β -HSD1 inhibitors affect the HPA axis? *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2:619-627, 2010.
6. Ratman D, Berghe WV, Dejager L, *et al.* How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: A scope beyond tethering. *Molecular and Cellular Endocrinology* 380:41-54, 2013.
7. Song IH, Buttgeriet F. Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. *Molecular and Cellular Endocrinology* 246:142-146, 2006.
8. Lowenberg M, Verhaar AP, van den Brink GR, *et al.* Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends in Molecular Medicine* 13:158-163, 2007.
9. Strehl C, Gaber T, Lowenberg M, *et al.* Origin and functional activity of the membrane-bound glucocorticoid receptor. *Arthritis Rheum* 63:3779-3788, 2011.
10. Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, *et al.* Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology* 350:299-309, 2012.
11. Beerda B, Schilder MB, Van Hoff JA, *et al.* Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restrictions. II. Hormonal and immunological responses. *Physiology & Behavior* 66(2):243-254, 1999b.
12. Kobelt AJ, Hemsworth PH, Barnett JL, *et al.* Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *Research in Veterinary Science* 75(2):157-161, 2003.
13. Hiby EF, Rooney NJ, Bradshaw JW. Behavioural and physiological responses of dogs entering re-homing kennels. *Physiology & Behavior* 89(3):385-391, 2006.
14. Accorsi PA, Carloni E, Valsecchi P, *et al.* Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *General And Comparative Endocrinology* 155(2):398-402, 2007.
15. Bennett A, Hayssen V. Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domestic Animal Endocrinology* 39:171-180, 2010.
16. Meyer JS, Novak MA. Minireview: hair cortisol: a novel biomarker of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *Endocrinology* 153(9): 4120-4127, 2012.
17. Bryan HM, Adams AG, Invik RM, *et al.* Hair as a meaningful measure of baseline cortisol levels over time in dogs. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 52(2):189-196, 2013.
18. Oyama D, Hyodo M, Doi H, Kurachi T, *et al.* Saliva collection by using filter paper for measuring cortisol levels in dogs. *Domestic Animal Endocrinology* 46:20-25, 2013.
19. Vincent IC, Michell AR. Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Research in Veterinary Science* 53(3):342-345, 1992.
20. Beerda B, Schilder MB, van Hooff JA, *et al.* Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 58:365-381, 1998.
21. Beerda B, Schilder MB, Janssen NS, *et al.* The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. *Hormones and Behavior* 30(3):272-279, 1996.
22. Dreschel NA, Granger DA. Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. *Hormones and Behavior* 55(1):163-168, 2009.
23. Wenger-Riggenbach B, Boretti FS, Quante S, *et al.* Salivary cortisol concentrations in healthy dogs and dogs with hypercortisolism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24(3):551-556, 2010.
24. Sandri M, Colussi A, Perrotta MG, *et al.* Salivary cortisol concentration in healthy dogs is affected by size, sex, and housing context. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* 10:302-306, 2015.
25. Stefanon B, Sandri M, Bastiani E, *et al.* Misura del cortisolo salivare nel cane: Sviluppo, Validazione e Applicazioni di un sistema Point of Care. Congresso Internazionale Scivac, Rimini, 2015.
26. Houpt KA. Genetics of canine behavior. *Acta Veterinaria Brno* 76:431-444, 2007.
27. Spady TC, Ostrander EA. Canine behavioral genetics: pointing out the phenotypes and herding up the genes. *American Journal of Human Biology* 82:10-18, 2008.
28. Vas J, Topa J, Pech E, Miklosi A. Measuring attention deficit and activity in dogs: a new application and validation of a human ADHD questionnaire. *Applied Animal Behaviour Science* 103:105-117, 2007.
29. Hennessy MB, Davis HN, Williams MT, *et al.* Plasma cortisol levels of dogs at a county animal shelter. *Physiology & Behavior* 62(3):485-490, 1997.
30. Giannetto C, Fazio F, Assenza A, *et al.* Parallelism of circadian rhythmicity of salivary and serum cortisol concentration in normal dogs. *Journal of applied biomedicine* 12:229-233, 2014.
31. Luescher AU, Medlock RT. The effects of training and environmental alterations on adoption success of shelter dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 117:63-69, 2009.
32. Hekman JP, Karas AZ, Dreschel NA. Salivary cortisol concentrations and behavior in a population of healthy dogs hospitalized for elective procedures. *Applied Animal Behaviour Science* 141:3-4, 2012.
33. Beerda B, Schilder MB, Van Hoff JA, *et al.* Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restrictions. I. Behavioral responses. *Physiology & Behavior* 66(2):233-242, 1999.
34. McGuigan MR, Egan AD, Foster C. Salivary cortisol responses and perceived exertion during high intensity and low intensity bouts of resistance exercise. *Journal of Sports Science and Medicine* 3:8-15, 2003.
35. Gatti R, De Palo EF. An update: salivary hormones and physical exercise. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 21:157-169, 2011.
36. Powell J, DiLeo T, Roberge R, *et al.* Salivary and serum cortisol levels during recovery from intense exercise and prolonged, moderate exercise. *Biology of Sport* 32:91-95, 2015.
37. McNaughton L, Bentley DJ, Koeppel P. The effects of a nucleotide supplement on salivary IgA and cortisol after moderate endurance exercise. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* 46:84-89, 2006.
38. Pastore C, Pirrone F, Balzarotti F, *et al.* Evaluation of physiological and behavioral stress-dependent parameters in agility dogs. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* 6:188-194, 2011.
39. Radosevich PM, Nash JA, Lacy DB, *et al.* Effects of low- and high-intensity exercise on plasma and cerebrospinal fluid levels of α -melanocyte stimulating hormone, ACTH, cortisol, norepinephrine and glucose in the conscious dog. *Brain Research* 498(1):89-98, 1989.
40. Colussi A. Influenza delle componenti genetiche, fisiologiche ed ambientali sul cortisolo salivare del cane. Università degli studi di Udine. AA 2012/2013.
41. Glenk LM, Kothgassner OD, Stetina BU, *et al.* Salivary cortisol and behavior in therapy dogs during animal-assisted interventions: A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior* 9:98-106, 2014.
42. Bolton JL, Hayward C, Direk N, *et al.* Genome wide association identifies common variants at the *serpina6/serpina1* locus influencing plasma cortisol and corticosteroid binding globulin. *PLoS Genetics* 10(7): e1004474, 2014.
43. Muráni E, Ponsuksili S, D'Eath RB, Turner SP, *et al.* Association of HPA axis-related genetic variation with stress reactivity and aggressive behaviour in pigs. *BMC Genetics* 11:74, 2010.
44. Mormede P, Terenina E. Molecular genetics of the adrenocortical axis and breeding for robustness. *Domestic Animal Endocrinology* 43:116-131, 2012.
45. Woods CP, Hazlehurst JM, Tomlinson JW. Glucocorticoids and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 154:94-103, 2015.
46. Baudrand R, Vaidya A. Cortisol dysregulation in obesity-related metabolic disorders. Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity 22(3):143-149, 2015.
47. Vanuytsel T, van Wanrooy S, Vanheel H. Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism. *Gut* 63:1293-1299, 2014.
48. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioural homeostasis. *Journal of American Medical Association* 267(9):1244-1252, 1992.
49. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology*, 67:259-284, 2005.