



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO: SCIENZE BIOMEDICHE VETERINARIE E COMPARATE

CICLO XXIII

## **ASPETTI ENDOCRINI NEL PROCESSO D'INVECCHIAMENTO DEL CANE**

**Direttore della Scuola:** Ch. mo Prof. Massimo Morgante

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Lieta Marinelli

**Dottoranda:** Elisa Prana



<b>SOMMARIO</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>3</b>
<b>PRIMA PARTE</b>	
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
1.1 DEIDROEPIANDROSTERONE E DEIDROEPIANDROSTERONE SOLFATO (DHEA E DHEAS)	6
1.1.1 CARATTERISTICHE BIOCHIMICHE E SINTESI DI DHEA(S)	8
1.1.2 MECCANISMI D'AZIONE	10
1.1.3 VARIAZIONE DEI LIVELLI PLASMATICI DI DHEA(S) CON L'ETÀ	11
1.1.3.1 VITA PRENATALE E INFANZIA	11
1.1.3.2 ADRENARCA	11
1.1.3.3 ETA' ADULTA, ADRENOPAUSA E INVECCHIAMENTO	13
1.1.4 DHEA(S) : NEUROSTEROIDI E SISTEMA NERVOSO	14
1.2 IL CORTISOLO	17
1.2.1 SINTESI, BIODISPONIBILITA' EMATICA E FUNZIONI	17
1.2.2 MECCANISMI D'AZIONE DEL CORTISOLO	21
1.2.3 ALTERAZIONI DELL'ASSE IIS E DELLA SECREZIONE DEL CORTISOLO DURANTE L'INVECCHIAMENTO	22
1.3 POTENZIALE RUOLO DI DHEA(S) E DEL CORTISOLO NELL'INVECCHIAMENTO E IN PATOLOGIE CORRELATE ALL'ETA' ANZIANA	24
1.4 DHEA(S) NEL CANE	27
1.5 IL CORTISOLO NEL CANE	28
1.5.1 VARIAZIONI DELLA CORTISOLEMIA	28
1.5.1.1 VARIAZIONI DIURNE	28
1.5.1.2 VARIAZIONI RELATIVE ALL'ETÀ	29
1.5.1.3 VARIAZIONI RELATIVE AL GENERE	30
<b>2. SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>32</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>35</b>
3.1 RACCOLTA CAMPIONI	35
3.2 CRITERI DI INCLUSIONE E CLASSIFICAZIONE DEI SOGGETTI	36
3.3 ESAME COLPOCITOLGICO	39
3.3.1 PRELIEVO	39
3.3.2 COLORAZIONE	39
3.3.3 COLPOCITOLOGIA E VALUTAZIONE MICROSCOPICA	40

3.4 VALUTAZIONE DELLA PROGESTERONEMIA PLASMATICA	41
3.5 ANALISI RADIOIMMUNOLOGICA	43
3.5.1 RIA SU MICROPIASTRA	43
3.5.2 ESTRAZIONE DEGLI STEROIDI	46
3.5.3 ALLESTIMENTO CURVA DI TARATURA E DEI CONTROLLI	46
3.5.4 VALIDAZIONE DEL METODO DI QUANTIFICAZIONE DI DHEA, CORTISOLO E TESTOSTERONE	47
3.5.4.1 TEST DI DILUIZIONE O DI PARALLELISMO	48
3.5.4.2 TEST DI RECUPERO	49
3.5.4.3 TEST DI RIPETIBILITÀ	49
3.6 ANALISI STATISTICA	50
<b>4. RISULTATI</b>	<b>51</b>
4.1 VALIDAZIONE DELLE METODICHE DI QUANTIFICAZIONE DEGLI STEROIDI PLASMATICI	51
4.2 DHEA E CORTISOLO NEL PLASMA CANINO	52
4.2.1 DHEA	52
4.2.1.1 GENERE ED ETA'	53
4.2.1.2 CONDIZIONE RIPRODUTTIVA	55
4.2.2 CORTISOLO	56
4.2.2.1 GENERE ED ETA'	54
4.2.2.2 CONDIZIONE RIPRODUTTIVA	58
4.3 RAPPORTO CORTISOLO/DHEA	58
4.3.1 GENERE ED ETA'	59
4.3.2 CONDIZIONE RIPRODUTTIVA	61
4.4 TESTOSTERONE PLASMATICO	62
<b>5. DISCUSSIONE</b>	<b>63</b>
5.1 DHEA	63
5.1.1 EFFETTO DEL GENERE	64
5.1.2 EFFETTO DELL'ETA'	65
5.1.3 EFFETTO DELLA CONDIZIONE RIPRODUTTIVA	67
5.2 CORTISOLO	68
5.2.1 EFFETTO DEL GENERE	68
5.2.2 EFFETTO DELL'ETA'	68
5.2.3 EFFETTO DELLA CONDIZIONE RIPRODUTTIVA	69
5.3 RAPPORTO CORTISOLO/DHEA	70

**PRIMA PARTE**

<b>6. INTRODUZIONE</b>	<b>73</b>
6.1 TEST COMPORTAMENTALI DI BLANDO STRESS PSICOSOCIALE	74
6.1.1 STRANGE SITUATION TEST	74
6.1.2 TEST DI ATTENZIONE SOCIALE	75
6.1.3 TEST COGNITIVO	75
6.2 QUANTIFICAZIONE DEL CORTISOLO IN DIFFERENTI MATRICI BIOLOGICHE NEL CANE	76
6.2.1 CORTISOLO PLASMATICO NEL CANE	77
6.2.2 CORTISOLO SALIVARE	77
<b>7. SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>79</b>
<b>8. MATERIALI E METODI</b>	<b>81</b>
8.1 PROCEDURA SPERIMENTALE SEGUITA	81
8.2 RACCOLTA DEI CAMPIONI SALIVARI	82
8.3 PRIMO PROTOCOLLO: SST	83
8.3.1 SOGGETTI ANALIZZATI	83
8.3.2 PROCEDURA DELLO SST	83
8.4 SECONDO PROTOCOLLO: AS + TC	85
8.4.1 SOGGETTI ANALIZZATI	85
8.4.2 PROCEDURA DEL TEST AS	85
8.4.3 PROCEDURA DEL TEST TC	86
8.5 TERZO PROTOCOLLO: AS-II + TC-II	87
8.5.1 SOGGETTI ANALIZZATI	87
8.5.2 PROCEDURA DEL TEST AS-II	87
8.5.3 PROCEDURA DEL TC-II	88
8.6 ANALISI RADIOIMMUNOLOGICA	88
8.6.1 VALIDAZIONE DEL METODO PER LA QUANTIFICAZIONE DEL CORTISOLO SALIVARE	88
8.6.2 QUANTIFICAZIONE DEL CORTISOLO SALIVARE E PLASMATICO	89
8.7 ANALISI STATISTICA	89
<b>9. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>91</b>
9.1 VALIDAZIONE DEL METODO DI QUANTIFICAZIONE RIA DEL CORTISOLO SALIVARE	91
9.2 CORTISOLEMIA SALIVARE E PLASMATICA NEI CANI PARTECIPANTI AI TRE PROTOCOLLI SPERIMENTALI	92

9.3 VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA CORTISOLEMICA AI TRE PROTOCOLLI SPERIMENTALI	93
<b>10. CONCLUSIONI</b>	<b>103</b>
<b>11. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>107</b>
<b>ALLEGATO</b>	<b>139</b>

## SOMMARIO

Parecchi studi condotti nell'uomo hanno dimostrato che il processo d'invecchiamento è associato ad alterazioni del sistema endocrino ed in particolare dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Deidroepiandrosterone e cortisolo sono ormoni steroidei, secreti dalle ghiandole surrenali, che presentano attività biologica pleiotropica.

La dissociazione biosintetica di questi steroidi che si verifica con il progredire dell'età nella specie umana, diventa evidente soprattutto nel momento in cui molte patologie legate all'invecchiamento iniziano a diventare marcatamente prevalenti.

Recenti lavori supportano il cane come modello animale per lo studio dell'invecchiamento umano, soprattutto per la notevole analogia esistente tra le due specie per quanto riguarda il declino neurologico e cognitivo. Tuttavia, se la letteratura umana presenta numerosi lavori inerenti questi steroidi, quella riguardante la specie canina e gli ormoni in questione è decisamente meno esaustiva.

La prima parte di questa tesi ha avuto come principale obiettivo quello di indagare, attraverso l'utilizzo dell'analisi radioimmunologica, se ed in che modo le concentrazioni plasmatiche di DHEA e di cortisolo, ed il loro rapporto nella specie canina, siano influenzate da età e genere. Inoltre, una valutazione di questi ormoni è stata effettuata nelle diverse fasi del ciclo estrale ed in cagne ovariectomizzate al fine di individuare la presenza di variazioni associate alla condizione riproduttiva.

I risultati ottenuti hanno evidenziato come l'andamento di entrambi questi ormoni non subisca modificazioni durante l'invecchiamento nel cane, mentre è emerso come le concentrazioni plasmatiche di DHEA sia influenzate da genere, condizione riproduttiva e presenza di gonadectomia.

La seconda parte di questa tesi ha invece cercato di verificare se test comportamentali che creano situazioni di stress sociale e psicologico, siano in grado di determinare una differente attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene in cani di proprietà adulti ed anziani. Attraverso l'analisi radioimmunologica è stata effettuata una valutazione del cortisolo salivare, confrontando le concentrazioni dei campioni raccolti dai cani reclutati prima e dopo ciascuno di tre differenti protocolli sperimentali.

Circostanze antecedenti ai test devono tuttavia aver contribuito a determinare un'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, che ha generato un aumento della cortisolemia nei prelievi effettuati prima dei tre test comportamentali. Questo non ha consentito di verificare l'effetto dei test nell'intera popolazione reclutata e soprattutto di evidenziare una differenza tra cani adulti ed anziani nella risposta allo stress. Tuttavia è

stato possibile in una sottopopolazione di cani evidenziare come stress di tipo emozionale sociale sia in grado di indurre un aumento della cortisolemia nel cane.

Per concludere, questa tesi ha consentito di ottenere nuove conoscenze sui livelli fisiologici basali che gli ormoni DHEA e cortisolo ed il loro rapporto assumono in relazione ad età, genere, condizione riproduttiva e gonadectomia nella specie canina. Essa ha inoltre consentito di evidenziare come per il cane un evento di natura emozionale sia maggiormente stressante rispetto ad uno di natura psicologica. La sperimentazione futura attuata con i dovuti accorgimenti dovrà in cani adulti ed anziani verificare se una diversa risposta è presente.

***Parole chiave:*** *DHEA, cortisolo, invecchiamento, cane, test comportamentali, stress emozionale.*



## **SUMMARY**

Several studies in humans have shown that the aging process is associated with endocrine disruption, in particular of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and cortisol are steroid hormones secreted by the adrenal glands. They have pleiotropic biological effects, influencing a wide range of physiological functions. In humans, the biosynthetic dissociation of these steroids occurs during the aging process and this event becomes evident when age-related pathologies are clearly manifested. Recent works support the dog as a useful animal model for the study of human aging processes. The dog shows a remarkable similarity with the human cognitive decline. However, even if DHEA and cortisol have been extensively investigated in humans, little is known about these hormones in dogs.

The main purpose of the first part of this thesis was to investigate whether and how the plasmatic concentrations of DHEA and cortisol (and their ratio) are affected by age and gender in the canine species. The evaluation of DHEA and cortisol concentrations has been determined by using radioimmunoassay analysis. In addition, these hormones have been also analyzed in different stages of estrous cycle and in ovariectomized bitches in order to detect changes associated with reproductive status.

The results showed that the trend of both hormones did not change during aging in the dog, but the plasmatic concentration of DHEA is influenced by gender, reproductive status and presence of gonadectomy.

The second part of this thesis aimed at assessing whether some behavioral tests, that are known to socially and psychologically stress the dog, finally induce a different activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in adult and elderly owned dogs. Salivary cortisol was chosen as marker of stress and was evaluated by radioimmunoassay analysis. The salivary cortisol concentrations of the recruited dogs were compared before and after each experimental protocols.

However, circumstances prior to the test must have contributed to activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, producing an increase of cortisol in samples taken before the behavioral tests. As a consequence, it has not been possible to evaluate the stressor effect of the experimental protocol in all the subjects of the recruited population, and to highlight a difference between adult and elderly dogs. However, in a subpopulation of dogs it was possible to show that the social emotional stress is able to induce an increase in cortisol concentrations.

In conclusion, this thesis has allowed to obtain new insights into the physiological levels of the DHEA and cortisol hormones and their ratio in relation to age, gender, reproductive status and gonadectomy in dogs. It showed that for dogs an emotional event is more stressful than a psychological event. Future studies are needed to determine whether a different response exists between adult and elderly dogs.

***Keywords:*** DHEA, cortisol, aging, dog, behavioral test, emotional stress.

## 1. INTRODUZIONE

Negli ultimi 50 anni, la vita media del cane ha subito un notevole allungamento, con incrementi fino al 25%, e con conseguente comparsa, nei paesi industrializzati, di una consistente popolazione di animali anziani (Watson, 1996; Miolo, 2005; Bonnett e Egenvall, 2010). Tale fenomeno si deve non solo al miglioramento delle condizioni ambientali e gestionali, agli avanzamenti nella diagnostica e nella terapia farmacologica, ma anche al maggiore coinvolgimento emotivo e disponibilità economica dei proprietari. Il fatto che nella società moderna ci sia un aumento della sensibilità nei confronti del benessere degli animali da compagnia, che vengono sempre più considerati come "membri della famiglia", fa sì che il medico veterinario sia sempre più spesso coinvolto nel trattamento delle conseguenze non soltanto fisiche ma anche psicologiche dell'età avanzata della popolazione canina. L'invecchiamento, infatti, che è caratterizzato da una graduale diminuzione della capacità omeostatica dell'organismo, favorisce l'insorgenza di malattie cardiovascolari, infiammatorie e neoplastiche (Bonnett e Egenvall, 2010) o il manifestarsi di patologie prima silenti (Fortney, 2004) e facilita la comparsa di alterazioni cognitive ed emozionali.

Uno dei problemi che si accompagna alla maggiore aspettativa di vita del cane è quindi l'aumento dell'incidenza di patologie di diversa natura, tra cui quelle neurodegenerative e comportamentali (Landsberg, 2005).

A questo proposito, numerose evidenze scientifiche supportano il cane come modello animale per lo studio dell'invecchiamento umano, sia per la notevole analogia con il declino neurologico osservato, sia per la sua evoluzione filogenetica, avvenuta in stretta vicinanza con l'uomo, condividendone le condizioni ambientali (Ruehl *et al.*, 1995; Cummings *et al.*, 1996; Adams *et al.*, 2000; Overall, 2000; Cotman *et al.*, 2002; Studzinski *et al.*, 2005).

La necessità di ampliare le conoscenze nel campo della geriatria umana e veterinaria con la prospettiva futura di identificare nuove cure specifiche per malattie di pertinenza geriatrica ha costituito il punto di partenza che ha promosso il lavoro di ricerca condotto durante questi tre anni di dottorato.

Dato l'importante ruolo svolto dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (IIS) nel mantenimento dell'omeostasi corporea, alla luce delle modificazioni che esso subisce durante l'invecchiamento umano e delle ripercussioni che ciò sembra comportare per la salute dell'anziano, questa tesi si propone di indagare ed ampliare nel cane, alcuni degli aspetti endocrini già ampiamente discussi nell'uomo, ma non ancora caratterizzati

nel cane, nonostante esso sia considerato un animale modello per gli studi sull'invecchiamento umano.

La prima parte di questa tesi ha avuto come principale obiettivo quello di indagare, attraverso l'utilizzo dell'analisi radioimmunologica, se ed in che modo le concentrazioni plasmatiche di DHEA e di cortisolo, ed il loro rapporto nella specie canina, siano influenzate da età e genere. Inoltre, una valutazione di questi ormoni è stata effettuata nelle diverse fasi del ciclo estrale ed in cagne ovariectomizzate al fine di individuare la presenza di variazioni associate alla condizione riproduttiva.

Una breve considerazione al fine di precisare che in questa introduzione si è dato più ampio spazio al ruolo e all'importanza che questi ormoni assumono nell'uomo. Se da un lato infatti la letteratura umana presenta numerosi lavori scientifici inerenti questi steroidi, quella riguardante il cane e gli ormoni in questione è decisamente meno esaustiva. Una seconda parte dell'introduzione cercherà comunque di illustrare quanto si conosce di questi ormoni nel cane.

## **1.1 DEIDROEPIANDROSTERONE E DEIDROEPIANDROSTERONE SOLFATO (DHEA E DHEAS)**

Il DHEA ed il suo estere solfato rappresentano i più abbondanti ormoni steroidei circolanti nel corpo umano (Labrie *et al.*, 1997b; Conley *et al.*, 2004). Nonostante ciò, il loro significato fisiologico, i meccanismi d'azione ed il loro possibile ruolo in molte patologie umane non sono ancora del tutto chiari.

Nell'uomo adulto, le concentrazioni plasmatiche di questi steroidi diminuiscono in modo progressivo con l'avanzare dell'età, raggiungendo i livelli più bassi nel momento in cui molte patologie legate all'invecchiamento cominciano a diventare marcatamente prevalenti (Felman *et al.*, 1998; Ferrari *et al.*, 2001b; Tchernof e Labrie, 2004; Haren *et al.*, 2007). Osservazioni come queste, affiancate a dimostrazioni pre-cliniche degli effetti biologici del DHEA, hanno supportato l'ipotesi di poter incrementare il benessere, proteggere le funzioni cerebrali e ritardare gli effetti dell'invecchiamento semplicemente ripristinando i suoi livelli di concentrazione ai valori giovanili.

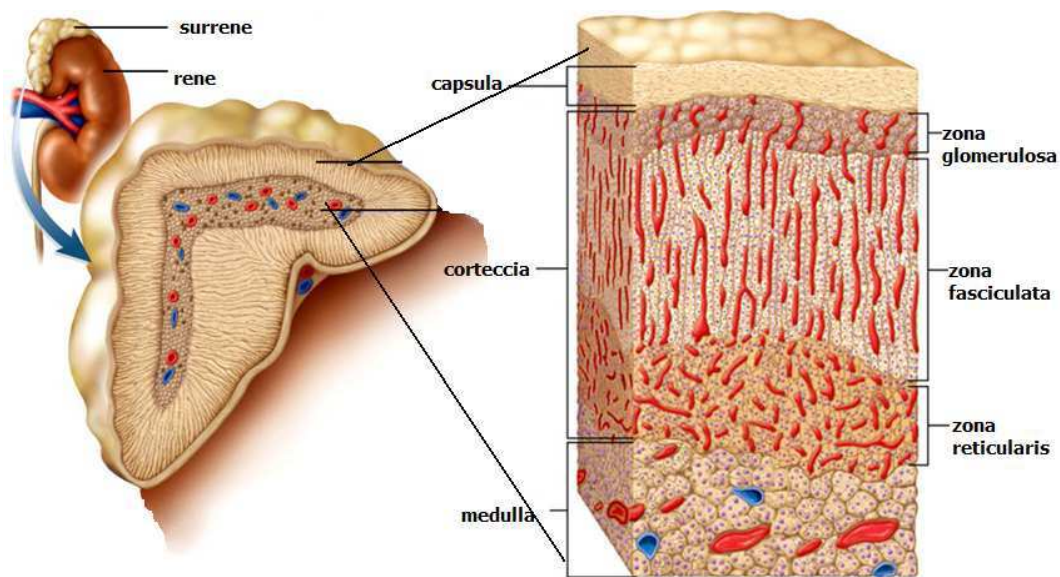
Alcuni autori hanno inoltre ipotizzato l'utilizzo di DHEA e DHEAS (DHEA(S)) come possibili marcatori d'invecchiamento fisiologico e come bioindicatori per differenziare

quest'ultimo da quello patologico (Rudman *et al.*, 1990; Lane *et al.*, 1997; Ferrari *et al.*, 2001b; Muehlenbein *et al.*, 2003).

Dalla loro iniziale scoperta, DHEA(S) sono stati inoltre presi in considerazione come possibili trattamenti di patologie neuropsichiatriche e pertanto le loro azioni neurobiologiche sono state e sono tuttora oggetto di numerosi studi (Pérez-Neri *et al.*, 2008; Maninger *et al.*, 2009).

### 1.1.1 CARATTERISTICHE BIOCHIMICHE E SINTESI DI DHEA(S)

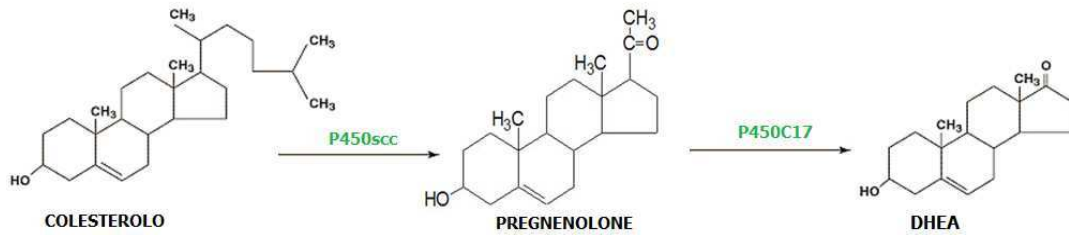
Gli uomini e gli altri Primati sono le uniche specie animali a possedere ghiandole surrenali in grado di secernere cospicue quantità dello steroide DHEA e del suo sulfonconiugato DHEAS, con il quale esso è in equilibrio (Labrie *et al.*, 1997b; Conley *et al.*, 2004). La zona reticolare del surrene in queste specie costituisce infatti la sorgente primaria di DHEA(S) circolanti nel plasma (Endoh *et al.*, 1996) (figura 1).



**Fig. 1** – Rappresentazione schematica della microanatomia della corteccia surrenale umana.

Il DHEA è uno steroide a 19 atomi di carbonio che viene sintetizzato a partire dal colesterolo attraverso l'azione successiva degli enzimi P450 *side-chain cleavage* (P450scc) e P450c17: il primo regola la conversione del colesterolo a pregnenolone, il secondo converte il pregnenolone a DHEA (figura 2).

Propriamente, il DHEA è secreto dalle surrenali principalmente come DHEAS, la cui formazione avviene in presenza del cofattore 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfonato e attraverso l'azione della DHEA sulfotransferasi citosolica (DST o SULT2A1) (Parker, 1999). DHEA(S) sono presenti nella circolazione ematica sia in forma biologicamente inattiva, legati all'albumina, sia in forma non legata come frazione attiva.



**Fig. 2** – Le reazioni catalizzate dagli enzimi P450scc e P450c17 convertono il colesterolo in DHEA.

Nell'uomo, le loro concentrazioni plasmatiche sono molto differenti, nell'ordine dei ng/ml per il DHEA e dei µg/ml per il DHEAS (Labrie *et al.*, 2005). Queste differenze nelle concentrazioni possono essere parzialmente spiegate dalla differente *clearance* metabolica: il DHEA viene eliminato dal circolo sanguigno più rapidamente rispetto al DHEAS (Longcope, 1996) e la sua emivita (circa 30 min) è più breve rispetto a quella del suo sulfo-coniugato (da 10 a 20 ore) (Rosenfeld *et al.*, 1975; Bélisle *et al.*, 1980; Longcope, 1996). Anche il legame con l'albumina influenza la velocità della *clearance*: il DHEA si lega a questa proteina più debolmente rispetto al DHEAS. La concentrazione plasmatica di DHEAS non varia di conseguenza in modo consistente durante il giorno, mentre la secrezione di DHEA segue un ritmo circadiano parallelo a quello del cortisolo con un picco mattutino indotto principalmente dal picco dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) (Rosenfeld *et al.*, 1975). In genere è quindi il DHEAS plasmatico ad essere quantificato di *routine*, sia per l'assenza di ritmi circadiani che per la concentrazione più elevata (Young *et al.*, 1997).

Il metabolismo di DHEA(S) comporta o la degradazione, con la conseguente inattivazione, o la conversione periferica a steroidi sessuali. Sia DHEA che DHEAS sono infatti prodotti intermedi nella produzione di androgeni e di estrogeni (testosterone, diidrotestosterone ed estradiolo), anche se soltanto la forma de-solfatata può essere convertita negli steroidi sessuali. Fino a circa il 50% degli androgeni nell'uomo adulto, il 75% degli estrogeni attivi nella donna in premenopausa e quasi il 100% degli estrogeni attivi dopo la menopausa sono sintetizzati nei tessuti periferici utilizzando DHEA(S) come precursori di sintesi (Labrie *et al.*, 1991).

### 1.1.2 MECCANISMI D'AZIONE

In generale, gli ormoni steroidei influenzano la trascrizione genica legandosi a specifici recettori citoplasmatici e traslocando nel nucleo o legandosi direttamente a recettori nucleari. Una volta all'interno del nucleo il complesso steroide-recettore si lega a specifiche sequenze di DNA, note come *Steroid Responsive Elements*.

Un unico recettore steroideo nucleare con alta affinità per il DHEA o il DHEAS non è ancora stato individuato (Widstrom e Dillon, 2004) e i meccanismi attraverso i quali DHEA(S) operano non sono del tutto chiari (Webb *et al.*, 2006). In generale però, sono stati descritti più meccanismi d'azione per questi due steroidi (Webb *et al.*, 2006).

Come accennato nel paragrafo precedente, DHEA(S) possono mediare alcune delle loro azioni attraverso la conversione a steroidi sessuali più attivi, che successivamente si legano ai rispettivi recettori nei vari tessuti bersaglio (Labrie, 2004). Secondo quella che è nota come *intracrine action*, nell'uomo la conversione del DHEA a steroidi sessuali avviene a livello intracellulare nei tessuti periferici. La trasformazione del DHEA in estrogeni ed androgeni attivi dipende pertanto dal livello di espressione di vari enzimi steroidogenici in ciascun tipo cellulare così che i tessuti sensibili possano controllare la produzione di steroidi sessuali in accordo con la loro reale necessità (Labrie, 1991). Androgeni ed estrogeni attivi così sintetizzati esercitano le loro funzioni nelle cellule di origine con minor rischio d'esposizione di altri tessuti ad azioni o effetti non desiderati (Labrie *et al.*, 2005).

DHEA(S) possono tuttavia agire anche attraverso l'azione svolta dai loro metaboliti più immediati, come nel caso del 7 $\alpha$ -idrossi-DHEA (Chalbot e Morfin, 2006) o attivare alcuni recettori verso i quali mostrano affinità (Webb *et al.*, 2006). Siti di legame per questi due steroidi sono stati descritti nei linfociti T murini e umani (Meikle *et al.*, 1992; Okabe *et al.*, 1995). DHEA(S) sembrano attivare l'ossido nitrico sintasi (eNOS) nelle cellule endoteliali (Liu e Dillon, 2002; Simoncini *et al.*, 2003) ed influenzare con azione diretta la fosforilazione della chinasi I (ERK-1) nelle cellule muscolari lisce vascolari (Williams *et al.*, 2002). Il DHEA è inoltre in grado di interagire direttamente con alcune componenti del citoscheletro (Laurine *et al.*, 2003) ed agire su altri recettori, come il *peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$* , il *pregnane X receptor* ed il recettore  $\beta$  degli estrogeni (Chen *et al.*, 2005; Webb *et al.*, 2006; Kóhalmy *et al.*, 2007; Tamasi *et al.*, 2008). A livello di sistema nervoso centrale, DHEA(S) sono in grado di modulare l'attività di alcuni recettori di membrana neuronali (Sousa e Ticku, 1997; Maurice *et al.*, 2006).



### **1.1.3 VARIAZIONE DEI LIVELLI PLASMATICI DI DHEA(S) CON L'ETÀ'**

Nell'uomo le concentrazioni plasmatiche di DHEA(S) variano in base ad età e genere (Orentreich *et al.*, 1984).

#### **1.1.3.1 VITA PRENATALE E INFANZIA**

Durante la gestazione, alte concentrazioni di DHEA(S) sono secrete dalla zona fetale delle ghiandole surrenali del feto allo scopo di fornire i precursori steroidei utilizzati dalla placenta per produrre estrogeni (Siiteri e MacDonald, 1966). In questo periodo le surrenali fetali, che sono strutturalmente diverse da quelle adulte (Mesiano e Jaffe, 1993; Coulter *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 2000), formano un unico sistema endocrino assieme a placenta e surrenali materne (Rainey *et al.*, 2004). Nel corso della vita prenatale le surrenali fetali subiscono profondi cambiamenti e la produzione surrenalica fetale di DHEAS sembra aumentare in modo progressivo parallelamente al peso di queste ghiandole (Parker *et al.*, 1982).

Subito dopo la nascita, la corteccia surrenale subisce una massiva riorganizzazione durante la quale l'ampia zona fetale regredisce ed il peso delle surrenali diminuisce drasticamente (Bech *et al.*, 1969; Rainey *et al.*, 2004). Nei primi sei mesi dopo la nascita, le concentrazioni sieriche di DHEA(S) subiscono un evidente declino e rimangono basse fino al raggiungimento della fase di adrenarca (de Peretti e Forest, 1976; Grumbach, 1980; Sulcová *et al.*, 1997). Studi istologici nel surrene del bambino hanno confermato l'assenza di cellule della zona fetale ed una zona reticolare scarsamente sviluppata che non esprime gli enzimi necessari per mantenere elevati i livelli di produzione di DHEA(S) (Dhom, 1973; Suzuki *et al.*, 2000).

#### **1.1.3.2 ADRENARCA**

Durante la fase di adrenarca, DHEA(S) sono sintetizzati e secreti dalla zona reticolare del surrene e le concentrazioni plasmatiche di questi steroidi cominciano ad aumentare (de Peretti e Forest, 1976; Grumbach, 1980; Sulcová *et al.*, 1997). Tale incremento, che precede l'aumento di estrogeni ed androgeni della pubertà (Ducharme *et al.*, 1976), è associato ad un progressivo ampliamento dell'area corticale interna ed alla generazione della zona reticolare nel periodo peripubere (Dhom, 1973; Reiter *et al.*, 1977). Generalmente nell'uomo, l'adrenarca inizia intorno ai 6-8 anni (Dhom, 1973), anche se alcuni studi dimostrano che la zona reticolare diviene

morfologicamente evidente nel surrene già a partire dai 4 anni, supportando l'ipotesi che la comparsa di una reticolare funzionale sia un processo lento e graduale (Remer *et al.*, 1994; Marx *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 2000; Remer *et al.*, 2005; Hui *et al.*, 2009). Si ritiene infatti che l'adrenarca sia una diretta conseguenza della differenziazione della zona reticolare del surrene dove, in questo periodo, si verificano specifici cambiamenti nell'espressione dei geni che regolano la steroidogenesi (Belgorosky *et al.*, 2008). L'incremento dell'attività lissica 17,20, secondariamente a quello dell'espressione del citocromo b5, la diminuzione dell'espressione della 3 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi di tipo II (3 $\beta$ -HSD2) e l'incremento di SULT2A1, costituiscono un fenotipo enzimatico che massimizza la produzione di DHEA(S) nella zona reticolare del surrene e che potrebbe favorire l'insorgere dell'adrenarca (Miller, 1998; Dardis *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2000; Belgorosky *et al.*, 2008). Anche se la biochimica enzimatica che definisce l'adrenarca è stata ben caratterizzata (Auchus e Rainey, 2004; Miller, 2009; Nakamura *et al.*, 2009), i meccanismi alla base della genesi e del successivo mantenimento della zona reticolare nel giovane rimangono ancora poco chiari. I risultati di un recente studio sembrano comunque confermare la classica teoria della migrazione cellulare proposta da Sasano nel 1995 (Hui *et al.*, 2009). Lo sviluppo della zona reticolare durante l'adrenarca deriverebbe dalla proliferazione e dal rimodellamento di un *pool* di cellule progenitrici localizzate nelle zone periferiche della corteccia (glomerulosa e fascicolata) che migrando e differenziandosi andrebbero a popolare la più interna reticolare, considerata zona di cellule senescenti e apoptotiche (Sugihara, 1977; Hui *et al.*, 2009).

Parecchi esperimenti ed osservazioni cliniche hanno dimostrato che l'aumentata secrezione di androgeni surrenali durante l'adrenarca non è associata all'aumento dei livelli di ACTH (la cui presenza è necessaria ma non sufficiente) o delle gonadotropine e non richiede gonadi funzionali (Apter *et al.*, 1979; Ilondo *et al.*, 1982; Genezzani *et al.*, 1983; Weber *et al.*, 1997) suggerendo che altri fattori potrebbero essere coinvolti nella regolazione della sintesi di DHEA(S) nel surrene. Tra questi, il sistema GH/IGF, l'insulina e gli estrogeni prodotti a livello della medulla surrenale potrebbero essere alcuni dei possibili candidati (Hindmarsh *et al.*, 1988; Amiel *et al.*, 1991; Travers *et al.*, 1998; Belgorosky *et al.*, 2008).

### **1.1.3.3 ETA' ADULTA, ADRENOPAUSA E INVECCHIAMENTO**

Sebbene nell'adulto una frazione del *pool* circolante di DHEA derivi dall'ovaio e dal testicolo, la maggior parte del DHEA (90-95%) e virtualmente tutto il DHEAS plasmatico derivano dal surrene (Labrie *et al.*, 1995).

Nell'uomo e nella donna, le concentrazioni plasmatiche di DHEA(S) raggiungono un picco intorno ai 20-30 anni per poi diminuire in modo graduale con l'avanzare dell'età e raggiungendo i livelli più bassi (approssimativamente il 20% del picco giovanile) intorno ai 65-70 anni, età nella quale l'incidenza di molte patologie correlate all'età aumenta in modo evidente (Orentreich *et al.*, 1984; Pavlov *et al.*, 1986; Orentreich *et al.*, 1992).

La secrezione di DHEA(S) mostra però un dimorfismo legato al sesso e già a partire dagli 11-15 anni diventa evidente la differenza nelle concentrazioni plasmatiche di questi steroidi: i livelli di questi ormoni nella donna sono approssimativamente il 50-70% dei valori osservati nell'uomo (Orentreich *et al.*, 1984; Carlström *et al.*, 1988; Sulcovà *et al.*, 1997). Il meccanismo responsabile di una più accentuata produzione di DHEA(S) nell'uomo rispetto alla donna rimane ancora poco chiaro.

La diminuzione nella produzione di questi steroidi, comunemente definita "adrenopausa", è un evento indipendente dalla menopausa femminile e si verifica tanto nell'uomo quanto nella donna come un processo graduale e all'interno di un analogo intervallo di età (Smith *et al.*, 1975; Orentreich *et al.*, 1984; Parker *et al.*, 1997). Tale declino, che mostra una elevata variabilità individuale, sembra essere associato ad una riduzione sia delle dimensioni delle zona reticolare delle surrenali (non accompagnata però ad atrofia globale del surrene) sia al potenziale steroidogenico di questa zona (Parker *et al.*, 1997; Parker, 1999). La zona reticolare risulta infatti particolarmente suscettibile al gradiente intra-surrenale di fattori autocrini e paracrini creati dal flusso sanguigno, a danni vascolari, come eventi microemorragici, con conseguente danno dovuto a necrosi. Alcune alterazioni a livello della zona reticolare possono aiutare a spiegare il meccanismo di dissociazione nella produzione di cortisolo e DHEA(S) che si verifica con l'invecchiamento (Hornsby, 1995). Alcuni autori hanno ipotizzato una riduzione dell'attività liasica 17,20 non associata a variazioni dell'attività 17-idrossilasica di CYP17 (Liu *et al.*, 1990; Parker *et al.*, 1999), mentre altri suggeriscono un possibile aumento nei livelli o nell'attività dell'enzima 3 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi (3 $\beta$ -HSD) (Parker *et al.*, 1999). Alterazioni età-correlate della *clearance* metabolica di questi steroidi non sembrano invece essere responsabili della loro riduzione plasmatica con

l'invecchiamento (Haning *et al.*, 1989; Longcope *et al.*, 1993).

#### **1.1.4 DHEA(S): NEUROSTEROIDI E SISTEMA NERVOSO**

Gli steroidi endogeni sono stati recentemente classificati da Melcangi e collaboratori (2008) come steroidi ormonali, cioè prodotti da ghiandole endocrine, e neurosteroidi, sintetizzati a livello del tessuto nervoso.

Per lungo tempo si è creduto che ghiandole steroidogeniche come la corteccia surrenale, le gonadi e la placenta fossero le uniche fonti di steroidi e che quest'ultimi fossero in grado di agire anche a livello cerebrale. Baulieu (1981) ha confermato l'infondatezza di queste affermazioni, dimostrando che nel ratto le concentrazioni di parecchi steroidi, come DHEA(S), sono molto più elevate a livello cerebrale che a livello plasmatico e che i livelli di questi steroidi nel tessuto cerebrale rimangono elevati a lungo dopo adrenalectomia e castrazione (Corpéchet *et al.*, 1981; Cheney *et al.*, 1995; Baulieu e Robel, 1998).

Nell'uomo è stato dimostrato che le concentrazioni di DHEA presenti a livello cerebrale superano di un fattore pari a circa 6,5 quelle plasmatiche (Lacroix *et al.*, 1987), mentre quelle del liquido cerebrospinale (liquor) sembrano essere il 5% di quelle trovate nel plasma (Guazzo *et al.*, 1996).

Robel e collaboratori (1986) hanno inoltre dimostrato che le variazioni circadiane delle concentrazioni di questi steroidi nel tessuto nervoso non sono sincronizzate con quelle degli steroidi circolanti. L'insieme di queste osservazioni ha portato alla conclusione che il cervello può effettivamente sintetizzare steroidi biologicamente attivi ed è stato coniato il termine "neurosteroidi" per designarli (Baulieu, 1998; Baulieu e Robel, 1998).

Il concetto di neurosteroidogenesi è stato quindi avvalorato da studi di neuroimmunoistochimica o ibridazione *in situ* che hanno evidenziato la presenza di enzimi steroidogenici e dei loro mRNA sia a livello neuronale che delle cellule gliali, a seconda delle specie e degli enzimi considerati (Mensah-Nyagan *et al.*, 1999; Matsunaga *et al.*, 2001; Mellon e Vaudry, 2001; Mellon e Griffin, 2002; Mukai *et al.*, 2006). La presenza, la distribuzione anatomica e l'attività dei vari enzimi che catalizzano la sintesi di DHEA(S) a livello cerebrale è stata quindi ampiamente dimostrata in mammiferi ed anfibi (Beaujean *et al.*, 1999; Hojo *et al.*, 2004; Do Rego *et al.*, 2007; Do Rego *et al.*, 2009).

Parallelamente è divenuto evidente che i neurosteroidi sono in grado di esercitare

un'ampia gamma di attività biologiche a livello cerebrale, sia attraverso la convenzionale azione genomica che attraverso l'interazione con recettori di membrana (Majewska, 1992; Paul e Purdy, 1992; Lapchak e Araujo, 2001; Belelli *et al.*, 2006;).

DHEA(S) sono in grado di modulare le azioni di tre recettori neuronali agendo come antagonisti non competitivi del recettore dell'acido  $\gamma$ -aminobutirrico di tipo A (GABA<sub>A</sub>) (Majewska, 1992; Melchior e Ritzmann, 1994; Sousa e Ticku, 1997), come modulatori allosterici positivi del recettore dell'acido N-metil-D-aspartico (NMDA) (Baulieu, 1998; Compagnone e Mellon, 2000) e come agonisti del recettore sigma<sub>1</sub> ( $\sigma_1$ ) (Majewska, 1992; Bergeron *et al.*, 1996; Baulieu, 1997; Compagnone e Mellon, 2000; Maurice *et al.*, 2006).

Parecchi lavori in letteratura hanno dimostrato che il DHEA è un neurosteroido in grado di modulare i diversi sistemi di neurotrasmettitori (Catalina *et al.*, 2002; Monnet, 2002; Lhullier *et al.*, 2004; Suárez *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2007; Pérez-Neri, 2008). Gli effetti di DHEA(S) sul sistema nervoso centrale sono in parte mediati dalla modulazione di neurotrasmettitori come glutammato e GABA, ma alcuni studi hanno riportato anche un effetto su dopamina, serotonina, come pure sulla biosintesi di ossido nitrico ed il funzionamento di canali ionici (Catalina *et al.*, 2002; Monnet, 2002; Lhullier *et al.*, 2004; Suárez *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2007; Pérez-Neri, 2008).

Anche a livello cerebrale DHEA(S) possono agire sia direttamente sia indirettamente dopo la loro conversione a steroidi sessuali. Le principali azioni neurobiologiche in cui DHEA(S) sono direttamente coinvolti comprendono: neuroprotezione, crescita neuritica, neurogenesi e sopravvivenza neuronale, apoptosi, sintesi e secrezione di catecolamine (Maninger *et al.*, 2009). Numerosi studi hanno infatti dimostrato che DHEA(S) svolgono un'azione neuroprotettiva sia *in vitro* che *in vivo*, agendo attraverso meccanismi molecolari distinti (Cardounel *et al.*, 1999; Lapchak *et al.*, 2000; Marx *et al.*, 2000; Kaasik *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Maurice *et al.*, 2006), altri ancora hanno sottolineato come a dosi elevate questi steroidi possano risultare neurotossici (Gil-ad *et al.*, 2001; Safiulina *et al.*, 2006).

E' stato dimostrato che DHEA(S) promuovono la neurogenesi e la sopravvivenza neuronale (Suzuki *et al.*, 2004; Naert *et al.*, 2007). Il DHEA, ma non il DHEAS che agisce in maniera opposta, favorisce la sopravvivenza neuronale attivando la serin-treonin chinasi Akt ed inibendo in questo modo l'apoptosi neuronale (Zhang *et al.*, 2002). Questa osservazione ha suggerito che probabilmente anche l'equilibrio tra i due neurosteroidi svolge un ruolo critico nello sviluppo e nel mantenimento del sistema nervoso.

Studi *in vitro* hanno dimostrato l'importanza di DHEA(S) come antiossidanti, sottolineando l'effetto protettivo che questi steroidi possono avere per le cellule nervose in patologie quali l'Alzheimer o in particolari condizioni quali l'iperglicemia (Bastianetto *et al.*, 1999; Aragno *et al.*, 2002).

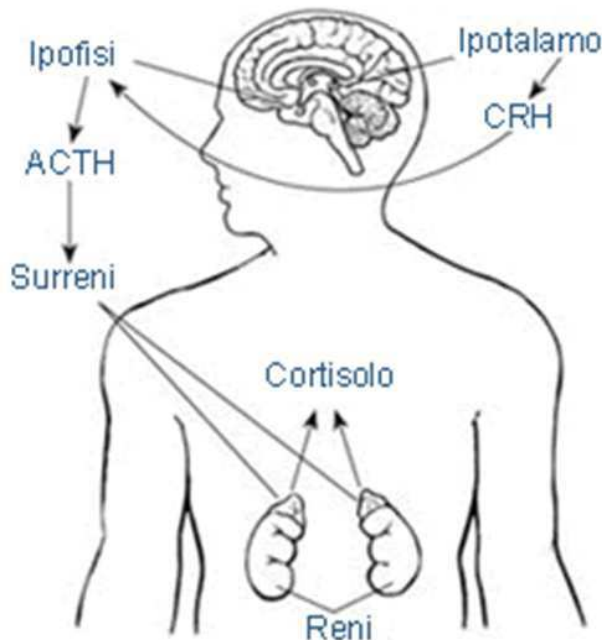
Ben noto è il ruolo protettivo svolto *in vitro* ed *in vivo* dal DHEA nei confronti degli effetti neurotossici dei glucocorticoidi (Kimonides *et al.*, 1999; Karishma e Herbert, 2002). Il DHEA sembra infatti attenuare la traslocazione nucleare indotta dal corticosterone della *stress-activated protein kinase 3* (SAPK3), proteina che potrebbe svolgere un ruolo importante nella sequenza di eventi che sfociano nella morte o nella sopravvivenza delle cellule neuronali (Kimonides *et al.*, 1999).

## 1.2 IL CORTISOLO

Il cortisolo è uno dei principali glucocorticoidi sintetizzati nella zona fasciolata del surrene assieme al corticosterone, al cortisone ed al desossicorticosterone. Funzione fondamentale del cortisolo è il controllo delle attività cataboliche ed anaboliche durante le 24 ore, adattandole alle condizioni ambientali ed alle attività dell'individuo. In accordo sia con le fluttuazioni ritmiche spontanee sia con le risposte alle condizioni di stress, i livelli di cortisolo circolanti sono altamente variabili. In situazioni di stress infatti e durante le alterazioni dell'equilibrio omeostatico questo steroide interviene nella mobilitazione delle risorse dell'organismo per consentire la sopravvivenza dell'individuo, sacrificando le funzioni non immediatamente necessarie a favore della funzionalità circolatoria e nervosa.

### 1.2.1 SINTESI, BIODISPONIBILITA' EMATICA E FUNZIONI

Il cortisolo viene rilasciato dalla corteccia surrenale in risposta all'azione dell'ACTH liberato dall'ipofisi, che a sua volta risponde all'ormone rilasciante la corticotropina (CRH), secreto dall'ipotalamo (figura 3).



**Fig. 3** – Struttura dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene.

Dopo il legame dell'ACTH ai recettori di membrana delle cellule della corteccia

surrenale, il cortisolo è sintetizzato e rilasciato nella circolazione sanguigna (Follenius *et al.*, 1987), dove ha un'emivita che varia tra i 70 e i 120 minuti (Arlt e Stewart, 2005). Oltre il 90% del cortisolo secreto nella circolazione sanguigna è legato alla proteina transcortina o CBG (*Corticosteroid Binding Globulin*) e all'albumina, mentre solo un 10% costituisce la frazione libera e quindi attiva (Hammond, 1990). Il cortisolo legato alle proteine rappresenta la forma di riserva dell'ormone circolante che può essere ceduto ai tessuti in forma libera in base alle richieste dell'organismo (Kley *et al.*, 1977). Il cortisolo non legato, grazie al basso peso molecolare e alla sua natura lipofila, entra nelle cellule per diffusione passiva, dove si lega a recettori citoplasmatici, che lo traslocano verso il nucleo. A questo livello, i complessi ormone-recettore si legano a siti specifici, aumentando o inibendo la trascrizione di specifici geni *target* (Swenson e Reece, 2002). Il cortisolo è responsabile di numerosi effetti biologici ed interviene nella regolazione di molte funzioni legate all'omeostasi corporea. Esso è infatti coinvolto in funzioni essenziali per l'organismo come il metabolismo delle proteine, dei carboidrati e dei grassi, nella risposta dell'organismo allo stress fisico o psichico, nel controllo di livelli adeguati di zucchero nel sangue e nel mantenimento di una pressione sanguigna appropriata (Arlt e Stewart, 2005). Ha inoltre azione immunosoppressiva e anti-infiammatoria e contribuisce ad una normale attività nervosa e cerebrale. La tabella 1 riassume i principali effetti metabolici del cortisolo (Arlt e Stewart, 2005).



<b>EFFETTI DEI GLUCOCORTICOIDI</b>	
METABOLISMO DI CARBOIDRATI	Incrementano la concentrazione di zuccheri nel sangue; stimolano la deposizione di glicogeno nel fegato; inibiscono l'assorbimento e l'utilizzo del glucosio nei tessuti periferici (essenzialmente muscolo e adipe).
METABOLISMO LIPIDICO	Attivano la lipolisi nel tessuto adiposo, favorendo l'ipercolesterolemia e il rilascio di acidi grassi liberi nella circolazione. Determinano una redistribuzione dei grassi di deposito.
METABOLISMO PROTEICO	Inibiscono la sintesi di proteine e ne aumentano la degradazione allo scopo di fornire substrati gluconeogenici dai tessuti a cui non servono (muscoli, cute, tessuto adiposo, linfoidi, connettivo) a quelli per cui la presenza di glucosio è fondamentale.
METABOLISMO DELL'OSSO E DEL CALCIO	Inibiscono le funzioni degli osteoblasti: osteopenia ed osteoporosi sono caratteristiche dovute all'eccesso di tali steroidi. Inducono un bilancio negativo del calcio, inibendone l'assorbimento intestinale ed incrementandone l'escrezione renale.
OMEOSTASI DI SALI E ACQUA E CONTROLLO DELLA PRESSIONE SANGUIGNA	Aumentano la pressione sanguigna attraverso meccanismi che coinvolgono reni e il sistema vascolare. Aumentano la velocità di filtrazione glomerulare (e quindi la diuresi) e la produzione di ormone natriuretico atriale da parte del cuore.
SECREZIONE GASTRICA	Determinano un aumento della secrezione gastrica, con effetto soprattutto sulla produzione di acido cloridrico e pepsina, per cui la somministrazione cronica ha effetto ulcerogeno.

<b>EFFETTI DEI GLUCOCORTICOIDI</b>	
PELLE, MUSCOLO E TESSUTO CONNETTIVO	Inducono insulino-resistenza nel muscolo. Nella pelle e nel connettivo inibiscono la divisione cellulare epidermica, la sintesi del DNA e la produzione di collagene.
AZIONE ANTI- INFIAMMATORIA E SISTEMA IMMUNE	Sopprimono le risposte immunologiche ed esercitano spiccati effetti anti-infiammatori. Nel sangue periferico riducono il numero di linfociti, ridistribuendoli dai compartimenti intravascolari alla milza, ai linfonodi e al midollo osseo. Al contrario, il numero di neutrofili aumenta dopo somministrazione di glucocorticoidi, mentre il numero di eosinofili diminuisce rapidamente. Le azioni immunologiche dei glucocorticoidi implicano azioni dirette sia sui linfociti T che B, che includono l'inibizione della sintesi delle immunoglobuline e la stimolazione dell'apoptosi linfocitaria. Inibiscono la produzione di citochine agendo sul fattore nucleare NF-kB.
SISTEMA NERVOSO	Il cervello è un importante organo bersaglio dei glucocorticoidi: pazienti con eccesso o deficienza di glucocorticoidi presentano sintomi di depressione, euforia, psicosi, apatia e letargia. Anomalie psichiatriche si presentano in circa il 50% dei pazienti affetti da Sindrome di Cushing.
SISTEMA RIPRODUTTIVO ED EFFETTI ENDOCRINI	Determinano una diminuzione della produzione di estrogeni/testosterone a livello delle gonadi, esercitano un <i>feedback</i> negativo sull'ipotalamo per diminuire la produzione di GnRH e sull'ipofisi per bloccare la produzione di FSH e LH. Facilitano la sintesi di GH, ma ne inibiscono la secrezione spontanea. Sopprimono l'asse tiroideo, probabilmente attraverso un'azione diretta sulla secrezione di tireotropina. Esercitano un'azione permissiva sugli effetti metabolici promossi da glucagone e adrenalina.

**Tab. 1** - Principali effetti dei glucocorticoidi.

### 1.2.2 MECCANISMI D'AZIONE DEL CORTISOLO

La secrezione dei glucocorticoidi può essere di due tipi: 1) ciclica, cioè che avviene secondo un ritmo circadiano e 2) situazionale, in risposta ad eventi stressanti ed emozionali (Nagalski e Kiersztan, 2010).

I livelli di glucocorticoidi circolanti sono regolati dall'asse IIS. Il CRH ipotalamico stimola il rilascio da parte dell'ipofisi anteriore di ACTH, che a sua volta innesca la secrezione di glucocorticoidi (cortisolo o corticosterone a seconda delle specie) e di androgeni, da parte della corticale surrenale. I glucocorticoidi sono in grado di regolare il loro rilascio e l'attività dell'asse con un meccanismo di autoregolazione a feedback negativo (Reul e de Kloet, 1985): livelli progressivamente maggiori di glucocorticoidi sopprimono la secrezione ipotalamica di CRH. L'attività del sistema di feedback, fondamentale per modulare l'ampiezza e la durata dell'attivazione dell'asse IIS in risposta allo stress, è possibile grazie alla presenza nel sistema nervoso centrale di recettori specifici per il cortisolo, distinti in recettori per i mineralcorticoidi (MR o recettori di Tipo I), ad alta affinità per il cortisolo ed espressi soprattutto nell'ippocampo, ed i recettori per i glucocorticoidi (GR o recettori di Tipo II), con affinità per lo steroide 6-10 volte inferiore rispetto ai precedenti e particolarmente abbondanti nell'ipotalamo, nell'ipofisi e nella corteccia frontale (Lupien *et al.*, 2007; Nagalski e Kiersztan, 2010). Il cortisolo viene riconosciuto e può attivare anche il recettore dei mineralcorticoidi (MR): il MR ed il GR presentano infatti considerevole omologia ed uno studio ha dimostrato che *in vitro*, il MR ha la stessa affinità per l'aldosterone, il corticosterone ed il cortisolo (Krozowski, 1983). La soppressione di CRH e ACTH da parte del cortisolo previene la sovrapproduzione di cortisolo stesso. Durante il ciclo diurno il cortisolo occupa più del 90% dei recettori MR e soltanto un 10% di quelli GR. In condizioni di stress o in corrispondenza del picco circadiano di secrezione, i recettori MR vengono saturati ed il 67-74% dei recettori GR risulta occupato (Lupien *et al.*, 2007).

Il cortisolo attraverso la circolazione sanguigna raggiunge inoltre i vari organi bersaglio dove esercita i suoi effetti dopo essersi legato a questi recettori (Weinberger, 1985). Il GR è presente in quasi tutti i tessuti corporei (Zanchi *et al.*, 2010): la sua ampia distribuzione e la molteplicità di isoforme prodotte contribuiscono a spiegare la molteplicità degli effetti promossi dal cortisolo stesso, che opera attraverso azioni genomiche e non-genomiche (Zanchi *et al.*, 2010). La presenza tessuto-specifica di numerosi fattori, quali coattivatori e corepressori della trascrizione, conferisce inoltre la

specificità di risposta nei vari tessuti bersaglio (McKenna, 1999).

### **1.2.3 ALTERAZIONI DELL'ASSE IIS E DELLA SECREZIONE DEL CORTISOLO DURANTE L'INVECCHIAMENTO**

L'asse IIS costituisce uno dei primi effettori della risposta allo stress nei mammiferi, consentendo all'organismo di adattarsi a modificazioni dell'ambiente interno ed esterno. La sua attività dipende dall'integrazione di numerosi fattori nervosi, neuroendocrini ed immunologici e dall'integrità del sistema di feedback. Numerosi studi in letteratura dimostrano che l'attività di questo asse si modifica nel corso della vita ed una chiara dissociazione del pattern secretorio adrenocorticale si accompagna all'invecchiamento fisiologico (Ferrari *et al.*, 2001b). Se la produzione di DHEA(S) mostra un chiaro declino correlato all'età, la secrezione di cortisolo sembra rimanere relativamente costante con il passare degli anni o mostrare un trend verso un incremento (Jensen e Blichert-Toft, 1971; Van Cauter *et al.*, 1996; Laughlin e Barrett-Connor, 2000). Mentre alcuni autori riferiscono infatti che la secrezione di cortisolo non viene influenzata dall'età (Parker *et al.*, 1999; Giordano *et al.*, 2001; Sher *et al.*, 2004), altri sostengono che l'invecchiamento è associato ad un incremento della cortisolemia basale (Van Cauter *et al.*, 1996; Deuschle *et al.*, 1997; Yen e Laughlin, 1998; Laughlin e Barrett-Connor, 2000). La relazione tra i sistemi che regolano la risposta allo stress e l'invecchiamento risulta complessa e non sorprende quindi l'esistenza di certa variabilità individuale, risultato di una combinazione di fattori genetici ed ambientali (Lupien *et al.*, 1998; Pardon, 2007).

Ciò che comunque emerge da più studi è che i livelli ematici di cortisolo nelle persone anziane tendono ad aumentare durante le ore serali e notturne (Van Cauter *et al.*, 1996; Ferrari *et al.*, 2001a; Ferrari *et al.*, 2001b), con conseguente appiattimento del profilo circadiano di questo ormone. Numerosi lavori inoltre evidenziano che con l'invecchiamento, almeno in alcuni individui, la sensibilità dell'asse IIS al feedback steroideo viene considerevolmente ridotta (Sapolsky *et al.*, 1986; Rothuizen *et al.*, 1993; Goncharova *et al.*, 2002). Una prolungata esposizione ai glucocorticoidi, quale può verificarsi nel corso della vita, può generare delle alterazioni a livello delle strutture cerebrali che regolano il meccanismo di feedback (Pedersen *et al.*, 2001), risultando in una iperattivazione dell'asse stesso. Tali alterazioni possono in altre parole determinare una risposta prolungata alle condizioni di stress come conseguenza dell'incapacità di spegnere la risposta stessa una volta che la situazione di stress è terminata (McEwen,

1992; Seeman e Robins, 1994; Wilkinson *et al.*, 1997; Otte *et al.*, 2005).

Studi condotti sulle scimmie confermano quanto trovato nell'uomo e riferiscono che gli individui anziani risultano più resistenti alla soppressione del cortisolo sierico, indotta attraverso desametasone, rispetto ai soggetti più giovani (Gust *et al.*, 2000; Goncharova *et al.*, 2002), in particolare quando esposte a stress sociali (Gust *et al.*, 2000), indicando una compromissione della regolazione del meccanismo di feedback dell'asse IIS (Pedersen *et al.*, 2001).

Alterazioni correlate all'età nella risposta neuroendocrina allo stress sono state descritte anche nei roditori (De Kloet *et al.*, 1991; Hauger *et al.*, 1994; Pisarska *et al.*, 2000; Revskoy e Radei, 2000; Mizoguchi *et al.*, 2009) e nei cani anziani, dove gli autori riferiscono che la compromissione del meccanismo di feedback sembra verificarsi a livello dei recettori dei glucocorticoidi situati nell'ippocampo ed in altre regioni cerebrali (Rothuizen *et al.*, 1993).

### **1.3 POTENZIALE RUOLO DI DHEA(S) E DEL CORTISOLO NELL'INVECCHIAMENTO E IN PATOLOGIE CORRELATE ALL'ETA' ANZIANA**

L'invecchiamento è un processo accompagnato da alterazioni ormonali caratterizzate da uno squilibrio tra ormoni catabolici (come il cortisolo), che rimangono relativamente stabili, ed ormoni anabolici (come DHEA(S)), che diminuiscono con l'età (Maggio *et al.*, 2010). Come evidenziato dal crescente numero di pubblicazioni sull'argomento, si ritiene che la maggiore reattività dell'asse IIS, l'affievolimento delle fluttuazioni circadiane di cortisolo e la progressiva diminuzione dei livelli plasmatici di DHEA(S) e del rapporto DHEA/cortisolo possano contribuire all'invecchiamento umano (Yen e Laughlin, 1998; Ferrari *et al.*, 2001b; Valenti *et al.*, 2004). Variazioni ormonali di questo tipo possono infatti avere importanti ripercussioni sul funzionamento del sistema immunitario e nervoso, sull'integrità muscolo-scheletrica e sul sistema cardiovascolare.

Il sistema endocrino ed in particolare l'asse IIS svolgono un ruolo importante nella modulazione del sistema immunitario (Buford e Willoughby, 2008). Lo squilibrio nella produzione di cortisolo e DHEA(S), che si verifica durante l'invecchiamento, potrebbe favorire il fenomeno dell'immunosenescenza, intesa come l'indebolimento delle difese immunitarie che compare nell'anziano e che contribuisce ad incrementare la suscettibilità ad infezioni, patologie autoimmuni e cancro (Pawelec e Solana, 1997).

Che il DHEA sia un potenziale immunomodulatore, in grado di stimolare una risposta immunitaria e neutralizzare in parte gli effetti immunosoppressivi dei glucocorticoidi, è supportato da numerosi studi condotti *in vitro* ed *in vivo* sui roditori (Loria *et al.*, 1988; Danenberg *et al.*, 1992). Molti dei lavori in letteratura che attribuiscono un ruolo immunomodulatorio al DHEA derivano da studi che indagano il suo effetto sulla secrezione delle citochine (Suzuki *et al.*, 1991; Daneberg *et al.*, 1992; Di Santo *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1998). Da questi emerge che il DHEA stimola la produzione di interleuchina 2 (Suzuki *et al.*, 1991) ed è in grado di inibire la secrezione di citochine proinfiammatorie come il *tumor necrosis factor* (TNF) (Daneberg *et al.*, 1992; Di Santo *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1998; Padgett e Loria, 1998). Basse concentrazioni di DHEA sono inoltre correlate a particolari stati patologici in cui la risposta immunitaria risulta compromessa, supportando l'esistenza di associazione tra questo steroide e il sistema immunitario (Derksen *et al.*, 1998). Queste ed altre evidenze suggeriscono che il declino nei livelli di DHEA durante l'adrenopausa possa in parte spiegare il

deterioramento della funzione immunitaria e lo squilibrio nella produzione di citochine (ridotta produzione di citochine  $T_H-1$  ed incrementata produzione di citochine  $T_H-2$ ) che accompagna l'invecchiamento umano e numerose patologie correlate all'età (Daynes *et al.*, 1993; Spencer *et al.*, 1996; Straub *et al.*, 1998; Hazeldine *et al.*, 2010).

Ben noti sono gli effetti immunosoppressivi e anti-infiammatori esercitati dal cortisolo (Budford e Willoughby, 2008). Secondo alcuni autori l'immunosenescenza negli anziani potrebbe essere imputabile o comunque strettamente associata alla prolungata secrezione di glucocorticoidi che si verifica in risposta a stress o all'alterazione del *feedback* dell'asse IIS che accompagna l'invecchiamento e che spesso risulta in una sovrapproduzione di glucocorticoidi (Otte *et al.*, 2005; Bauer, 2008; Bauer *et al.*, 2009). A supporto di questa ipotesi l'evidenza che molte delle alterazioni del sistema immunitario che si verificano in seguito ad esposizione prolungata a stress sono analoghe a quelle riscontrate con l'invecchiamento (Piazza *et al.*, 2010) e che lo stress d'altra parte è in grado di esacerbare le alterazioni del sistema immunitario che accompagnano l'invecchiamento stesso (Piazza *et al.*, 2010).

Oltre al deterioramento della competenza immunitaria, alterazioni correlate all'età nell'asse IIS sono spesso associate a compromissione delle *performances* cognitive ed affettive, patologie glico- e lipometaboliche e neurodegenerative (Sapolsky, 1996, 2000; Valenti, 2004).

Ferrari e collaboratori (2001a, 2001b), studiando il legame tra secrezione di corticosteroidi ed alterazioni età-correlate nel sistema limbico-ippocampale, riportano che rispetto ai giovani di controllo e agli anziani sani, i pazienti anziani affetti da demenza presentano valori di cortisolo significativamente più alti durante le ore serali e notturne e che la secrezione di DHEAS risulta maggiormente compromessa in presenza di demenza senile. La sensibilità dell'asse IIS al *feedback* steroideo si riduce negli anziani e ancor più nei soggetti con demenza. La risposta incretorica del cortisolo alla stimolazione con ACTH ha durata e ampiezza significativamente aumentata in patologie età-correlate quali appunto la demenza (Ferrari *et al.*, 2001b). Gli stessi autori descrivono un rapporto cortisolo/DHEAS significativamente correlato sia all'età sia al deterioramento senile delle *performances* cognitive. In considerazione del potenziale neurotossico del cortisolo, che favorisce la degenerazione e la morte neuronale, in particolare a livello ippocampale, e del ruolo protettivo del DHEA(S) sulla sopravvivenza neuronale e gliale (Sapolsky *et al.*, 1985, 1986), sembra che il progressivo incremento del rapporto cortisolo/DHEAS possa svolgere un ruolo importante nella patogenesi di patologie neurodegenerative nell'anziano (Ferrari *et al.*, 2004). Concentrazioni anche

solo relativamente aumentate di cortisolo, non controbilanciate da adeguati livelli di DHEA(S) avrebbero quindi un effetto neurotossico nel sistema nervoso centrale, in particolare sull'ippocampo (Ferrari, 2001a). Una riduzione del volume ippocampale, regione cerebrale che svolge un importante ruolo nei processi di apprendimento e memorizzazione, è stata ritrovata in alcuni anziani con elevati valori di cortisolemia (Lupien *et al.*, 1998).

Proprio per le molteplici azioni svolte da DHEA(S) a livello di sistema nervoso centrale e data la loro capacità di modulare il rilascio di diversi neurotrasmettitori in quanto neurosteroidi, numerosi studi hanno indagato le concentrazioni (circolanti e a livello cerebrale) di questi ormoni non solo nel declino cognitivo e in patologie legate all'invecchiamento come demenze e morbo di Alzheimer (Vallée *et al.*, 2001; Weill-Engerer *et al.* 2002; Ferrari e Magri, 2008; Naylor *et al.*, 2008) ma anche in patologie neuropsichiatriche, quali depressione, disordini da stress post-trauma (PTSD) e schizofrenia (Barrett-Connor *et al.*, 1999; Ritsner *et al.*, 2004; Rasmusson *et al.*, 2006; Gallagher *et al.*, 2007).

Nonostante il loro ruolo neuroprotettivo, e sebbene molti studi condotti sui roditori abbiano dimostrato un aumento delle capacità mnemoniche in questi animali modello dopo somministrazione di DHEA(S), diversi studi condotti nell'uomo non hanno dimostrato un miglioramento delle *performances* cognitive a seguito del trattamento con tali steroidi (Wolf *et al.*, 1997; Wolf e Kirschbaum 1999; Grimley *et al.*, 2006; Kritz-Silverstein *et al.*, 2008). L'opinione generale che emerge dai lavori presenti in letteratura è quella di essere ancora lontani dal poter attribuire in maniera definitiva un ruolo terapeutico a questi androgeni.

Visti gli effetti pleiotropici di questi ormoni, il ruolo di cortisolo e DHEA(S) risulta inoltre ampiamente discusso anche in altre patologie correlate all'età quali quelle cardiovascolari e l'osteoporosi (Gordon *et al.*, 1999; Tchernof e Labrie, 2004). Mentre la frequente e prolungata secrezione di cortisolo può portare a diminuzione della densità ossea e della consistenza del tessuto muscolare ed un coinvolgimento del cortisolo nell'aterosclerosi è tuttora discusso (Fantidis, 2010), un possibile ruolo protettivo in patologie cardiovascolari è stato ipotizzato per il DHEA (Barret-Connor, 1986; Herrington, 1995), anche se gli studi che hanno esaminato la relazione sussistente tra livelli di DHEAS e le patologie cardiovascolari hanno spesso prodotto risultati contraddittori (Khaw, 1996).



## 1.4 DHEA(S) NEL CANE

La maggior parte degli studi effettuati nel cane e che valutano le concentrazioni di DHEA(S) riguardano patologie endocrine, tumori mammari e la fisiologia della riproduzione nel maschio (Boari *et al.*, 2003; Queiroga *et al.*, 2005; Queiroga *et al.*, 2009). Infatti, nonostante il cane rappresenti il modello animale d'elezione per lo studio di alcuni aspetti legati all'invecchiamento, pochi lavori hanno indagato le concentrazioni plasmatiche fisiologiche di DHEA(S) in questa specie e nessun lavoro in maniera esaustiva (Feher *et al.*, 1977; Schiebinger *et al.*, 1981a; Tremblay e Belanger, 1984; Frank *et al.*, 2003).

Feher e collaboratori (1977) sono stati tra i primi a valutare i livelli di androgeni surrenalici sia liberi che coniugati presenti nel sangue periferico di alcuni mammiferi. La loro analisi, per quanto concerne il cane, ha però preso in esame un numero esiguo di soggetti (3 soltanto) e tutti di genere maschile. Schiebinger e collaboratori (1981) hanno osservato che la comparsa della pubertà nel cane e nel coniglio è associata ad incrementi nelle concentrazioni plasmatiche di DHEA ed androstenedione.

In uno studio successivo, Tremblay e Belanger (1984) hanno analizzato i livelli plasmatici di alcuni steroidi, tra cui il DHEA, in cani adulti interi ed orchiettomizzati (6 per ciascuno gruppo), prima e dopo stimolazione con ACTH. Essi hanno dimostrato che in seguito a somministrazione di ACTH esogeno, l'incremento delle concentrazioni plasmatiche di DHEA si verifica nei cani interi, ma non in quelli orchiettomizzati. Per determinare la sorgente di DHEA plasmatico, hanno inoltre esaminato l'effetto della somministrazione di 17-idrossipregnenolone esogeno in cani adrenalectomizzati, trovando che questo composto causa un incremento dei livelli plasmatici di steroidi a 19 atomi di carbonio e proponendo il testicolo come probabile sito di conversione.

In un lavoro più recente, Frank e collaboratori (2003) hanno analizzato le concentrazioni sieriche di diversi steroidi, tra cui il DHEAS, in cani appartenenti ad entrambi i generi, sia interi che orchiettomizzati/ovariectomizzate, prima e dopo stimolazione con cosintropina, un derivato sintetico dell'ACTH. Gli autori hanno trovato nei maschi interi valori di DHEAS significativamente maggiori rispetto alle femmine (intere e sterilizzate) e ai maschi orchiettomizzati. Secondo questo studio inoltre, nei maschi interi né DHEAS né testosterone incrementavano significativamente dopo stimolazione.

Nonostante le informazioni fornite da tali studi, essi nel complesso non analizzano l'andamento del DHEA nelle varie fasi d'età e perciò non consentono di ottenere una

visione globale del suo assetto fisiologico nel cane. Notevole diversità esiste poi nei metodi utilizzati per la quantificazione ormonale e ciò rende problematico il confronto dei valori ottenuti dai diversi studi.

## **1.5 IL CORTISOLO NEL CANE**

Molti dei dati riguardanti i livelli di cortisolo nella specie canina sono stati ottenuti da studi atti a valutare e monitorare lo stato di benessere nel cane (Smiley e Peterson, 1993; Coppola *et al.*, 2006). Infatti molte condizioni o particolari situazioni possono risultare stressanti per questo animale, andando ad influire sulla sua salute. Gli esempi più indicativi sono costituiti dai cani ospitati in canile e da quelli che assumono ruoli di rilievo (e pertanto potenzialmente stressanti) nella nostra società, come i cani in servizio pubblico (protezione civile e polizia) o da assistenza (cani guida o impegnati in interventi assistiti). In questi casi, in situazioni nuove o potenzialmente pericolose per l'animale, in patologie endocrine come la sindrome di Cushing è utile effettuare una valutazione della risposta endocrina, che viene attuata attraverso la determinazione della cortisolemia plasmatica o salivare.

### **1.5.1 VARIAZIONI DELLA CORTISOLEMIA**

#### **1.5.1.1 VARIAZIONI DIURNE**

Nelle varie specie animali a ciclo diurno tra le quali figura anche l'uomo, la secrezione del cortisolo, in condizioni basali, segue un ritmo circadiano della durata di 24 ore, durante il quale questo steroide viene rilasciato in maniera pulsatile con una periodicità di circa 90 min (Follenius *et al.*, 1987; Young *et al.*, 2004). In queste specie, i livelli più elevati di cortisolo vengono registrati al risveglio mentre quelli più bassi vengono raggiunti nelle prime ore del sonno (Weitzman *et al.*, 1971). Questo ritmo, sincronizzato dalle ore di luce, si verifica nonostante gli effetti del *feedback* negativo del cortisolo sull'ipotalamo e sull'ipofisi e riflette le caratteristiche del sonno di ciascuna specie (Dallman *et al.*, 1978; Czeisler *et al.*, 1991).

Nel cane, dove il cortisolo è il principale glucocorticoide secreto dalla corteccia surrenale (Farrell e Lamus, 1953), l'esistenza di un ritmo circadiano nella secrezione di questo steroide rimane ancora controversa (Kemppainen e Sartin, 1984; Castillo *et al.*, 2009; Pessina *et al.*, 2009).

I primi studi sulla secrezione diurna di cortisolo nel cane sono stati effettuati da

Rijnberk (1968) e da Johnston e Mather (1978). Il primo autore ha individuato, in sei degli otto cani inclusi nello studio, un ritmo diurno nella secrezione di  $11\beta$ -idrossicorticosteroidi simile a quello presente nell'uomo, anche se con differenze meno distinte, mentre i secondi non hanno confermato una secrezione circadiana del cortisolo in questa specie. Alla stessa conclusione di Johnston e Mather sono giunti Takahashi e collaboratori (1981) ed il gruppo di Kemppainen e Sartin (1984), non trovando variazioni ritmiche nella specie canina. Successivamente, Palazzolo e Quadri (1987) hanno dimostrato la presenza di un ritmo circadiano solo negli animali adulti, ma non in cuccioli e negli animali anziani. Più recentemente, Kolevská (2003) ha misurato il cortisolo sierico nell'arco delle 24 ore in 23 cani, suddivisi in tre gruppi sottoposti a differente grado di attività fisica. L'autore ha trovato che complessivamente le concentrazioni misurate tra le 10.00 e le 13.00 erano significativamente più alte rispetto a quelle determinate tra le 19.00 e le 22.00, ma ha anche riportato che non tutti i gruppi presentavano ritmi diurni, suggerendo l'esistenza di un *pattern* diurno di secrezione del cortisolo anche se con differenze non così nette come nell'uomo. Castillo (2009), in uno studio sull'effetto del trattamento con acido retinoico di cani affetti da sindrome di Cushing, ha confermato la presenza di variazioni diurne della cortisolemia nel gruppo di controllo anche se non marcate e probabilmente connesse soprattutto al grado di attività dei cani durante la giornata.

#### **1.5.1.2 VARIAZIONI RELATIVE ALL'ETÀ**

Uno dei primi studi ad indagare l'effetto dell'età sulla concentrazione basale di cortisolo nel cane è quello di Reimers (1990), in cui i livelli sierici dello steroide sono stati analizzati in un cospicuo numero di cani suddivisi in sei gruppi sulla base delle differenti età dei soggetti. Una cortisolemia significativamente inferiore è stata trovata nel gruppo costituito dai cuccioli in allattamento e nessuna differenza nei rimanenti cinque gruppi analizzati.

Rothuizen e collaboratori (1993), che hanno effettuato uno studio approfondito sull'argomento, hanno evidenziato una progressiva modificazione dell'asse IIS nei cani anziani. In questo studio i soggetti anziani dimostravano alcuni parametri significativamente diversi rispetto ai più giovani, in particolare, i cani anziani evidenziavano concentrazioni basali di ACTH e cortisolo più elevate, associate a perdita di ritmicità nella loro secrezione, aumentata escrezione urinaria di cortisolo, aumentata secrezione di ACTH e cortisolo in risposta a stress o a somministrazione di CRH

esogeno, maggior peso dei surreni come manifestazione di un'ipertrofia da stimolazione cronica e diminuita *clearance* plasmatica del cortisolo. A livello di sistema nervoso centrale, gli autori hanno evidenziato una diminuzione del numero dei recettori per i mineralcorticoidi, (soprattutto a livello di ippocampo, setto, ipotalamo e adenoipofisi), mentre il numero di recettori per i glucocorticoidi rimaneva invariato in diverse zone cerebrali e risultava aumentato nell'adenoipofisi dei soggetti più vecchi.

Incrementi nella cortisolemia plasmatica basale di cani anziani sono stati evidenziati anche da Strasser (1993) e più recentemente da Goy-Thollot (2007), che ha fallito nel tentativo di dimostrare un maggiore incremento nella secrezione di cortisolo in risposta ad ACTH esogeno negli animali più anziani. Stephen e Ledger (2006) d'altra parte hanno riferito come non sia stato possibile per loro rilevare una correlazione certa tra età e livelli di cortisolo urinario dell'animale.

### **1.5.1.3 VARIAZIONI RELATIVE AL GENERE**

Il genere del soggetto è una variabile presa in considerazione negli studi di Garnier e coautori (1990), Rothuizen e collaboratori (1993), Reimers e collaboratori (1990), Hennessy e coautori (1997), Beerda e collaboratori (1999), Stephen e Ledger (2006). Negli ultimi quattro non sono state riportate differenze nei livelli di cortisolo tra maschi e femmine, mentre negli altri due è stata riscontrata una differenza di genere. Lo studio di Garnier (1990) ha confrontato i livelli di cortisolo basale e quelli dopo stimolazione con ACTH in 58 cani di razza Beagle di 1 anno (29 maschi e 29 femmine) a 2 giorni, 5 settimane e 12 settimane dall'ingresso in un ospedale veterinario. Al giorno 2, i livelli basali di cortisolo differivano significativamente tra maschi e femmine, mentre non differivano dopo stimolazione con ACTH. A 5 e a 12 settimane non sono state invece riscontrate variazioni significative tra i due generi né per quanto riguarda i valori di cortisolemia basale, né per quelli dopo stimolazione. Gli autori sono giunti quindi alla conclusione che non c'erano differenze nei livelli di cortisolo basale tra maschi e femmine, dopo che gli animali si erano acclimatati al nuovo ambiente. Beerda e collaboratori (1999) hanno riscontrato una variabilità legata al genere quando hanno misurato i livelli di cortisolo salivare in cani sottoposti a restrizioni spaziali e sociali. Questi autori hanno trovato che le cagne erano più suscettibili a stress sia acuti che cronici rispetto ai maschi. Stephen e Ledger (2006) non trovando differenze nei livelli di cortisolo urinario nei due generi, hanno formulato l'ipotesi che le differenze tra maschi e femmine possano essere maggiormente evidenti in quegli studi che usano cani

geneticamente correlati rispetto agli studi che analizzano meticci o cani di diverse razze e in condizioni più controllate rispetto a quelle che si possono avere in un canile.



## **2. SCOPO DEL LAVORO**

Nell'uomo DHEA(S) e cortisolo sono coinvolti nei meccanismi che regolano l'omeostasi dell'organismo ed intervengono nella modulazione del sistema nervoso centrale e del sistema immunitario. La dissociazione nella produzione e secrezione di questi steroidi che si verifica con l'invecchiamento risulta associata a differenti patologie che caratterizzano l'età anziana ed in particolare a quelle neurodegenerative come il morbo di Alzheimer.

Pur essendo il cane il modello animale d'elezione per lo studio dei disordini cognitivi legati all'invecchiamento dell'uomo (Cummings *et al.*, 1996), pochi sono i lavori che prendono in considerazione ed analizzano l'andamento fisiologico di DHEA e di cortisolo nel cane.

Il lavoro esposto in questa prima parte della tesi si prefigge quindi di verificare se in una popolazione numerosa di cani esista una modificazione età-dipendente nella concentrazione plasmatica di DHEA e di cortisolo. Questo studio si propone inoltre di verificare se alcuni aspetti, come genere e condizione riproduttiva, possano significativamente incidere sulle concentrazioni plasmatiche di DHEA e cortisolo, come già osservato in altre specie.





### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 RACCOLTA DEI CAMPIONI**

Per questo studio sono stati utilizzati campioni di plasma appartenenti ad una popolazione di 423 cani (*Canis familiaris*). Parte dei campioni derivano da aliquote utilizzate per precedenti ricerche attuate presso i laboratori di Fisiologia e Parassitologia Veterinaria del Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie dell'Università degli Studi di Padova. Al fine di ampliare il database esistente, altri prelievi ematici sono stati effettuati in modo mirato nel corso del triennio 2008-2010 da soggetti:

- pervenuti presso il centro CORAF (Centro di Consulenza Comportamentale e Relazionale per gli Animali d’Affezione), struttura facente parte del medesimo Dipartimento sopra citato,
- ospitati presso il canile di Selvazzano (Padova),
- residenti in allevamenti delle Province di Padova, Venezia, Vicenza e Treviso.

Da ciascun soggetto sono stati prelevati dalla vena cefalica circa 5 ml di sangue periferico che è stato posto in provette con anticoagulante (EDTA) e successivamente centrifugato (2700 g per 15 min) al fine di separare il plasma dalla frazione corpuscolata. Il plasma è stato poi lasciato a -20°C fino al momento delle analisi. Per ciascun cane sono state raccolte informazioni riguardo a genere, età, razza, altezza al garrese, peso, presenza/assenza di gonadectomia in una scheda di raccolta dati (allegato 1). Quando possibile per le cagne la raccolta dei campioni ematici è stata effettuata stabilendo con metodiche opportune la fase del ciclo estrale in cui esse si trovavano al momento del prelievo o l’eventuale stato di gravidanza. Tuttavia, non sempre è stato possibile compilare la scheda nella sua interezza soprattutto per quegli animali i cui campioni di plasma erano già presenti in laboratorio.

### **3.2 CRITERI DI INCLUSIONE E CLASSIFICAZIONE DEI SOGGETTI**

Le numerose razze canine esistenti presentano grande varietà quanto a dimensioni: la variabilità presente in questa specie è maggiore rispetto a quella osservata in qualsiasi altro vertebrato terrestre (Sarasa e Pesini, 2009). Specialmente nel cane, uno dei fattori che maggiormente influisce sul grado d'invecchiamento e sull'aspettativa di vita dell'animale è rappresentato dalla taglia. I dati riguardanti la durata media della vita nelle diverse razze sono piuttosto scarsi e sebbene proprietari, allevatori e veterinari abbiano spesso proprie opinioni in merito, queste rimangono per ora considerazioni ancora basate sull'esperienza piuttosto che su studi scientifici. La scarsità d'informazione, sommata alla mancanza di tabelle di riferimento riconosciute a livello scientifico per una classificazione univoca dei cani in base ad età biologica, rendono difficile dare una precisa definizione di cane anziano e di conseguenza assegnare soggetti diversi a classi di età omogenee per grado di invecchiamento.

L'esistenza di una relazione negativa tra dimensioni corporee e grado di longevità è comunque supportata da alcuni studi (Patronek *et al.*, 1997; Galis *et al.*, 2006), in base ai quali si può affermare che i cani di piccola taglia raggiungono il periodo geriatrico ad un'età più avanzata rispetto ai cani di taglia grande e che i primi vivono più a lungo rispetto ai secondi (Hoskins e McCurnin, 1997). Per cercare di ovviare al problema della considerevole variabilità nell'aspettativa di vita associata all'ampio intervallo di dimensioni nelle differenti razze, in questo studio sono stati inclusi solo cani di taglia media e grande (tabella 2).

La selezione sulla base della taglia è stata effettuata tenendo conto sia del peso che dell'altezza al garrese mentre nei casi in cui i dati non erano disponibili la selezione si è basata sui valori standard di riferimento delle varie razze (Jones *et al.*, 2008; <http://users.pullman.com/lostriver/longhome.htm>).

Sono stati inclusi quindi nel presente lavoro soltanto i soggetti con peso superiore o uguale a 10 kg e con altezza al garrese maggiore o uguale a 40 cm.

<b>Razza</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>Razza</b>	<b>F</b>	<b>M</b>
Alano	2		Labrador Retriever	27	5
Alaskan Malamute	2	1	Meticcio	19	30
Argentine Dogo	1		Pastore Australiano	1	
Border Collie	2	2	Pastore Maremmano	3	7
Bovaro del Bernese	2		Pastore Tedesco	104	22
Boxer	28	4	Pastore Tibetano		1
Bracco	1		Pitt-Bull	1	2
Bulldog		1	Pointer	1	
Breton	2	7	Rottweiler	2	3
Cane Corso	1		San Bernardo	1	
Cane d'acqua portoghese		1	Segugio	21	23
Collie	2		Setter	9	8
Dalmata		1	Setter Inglese	6	8
Doberman	5	5	Setter Irlandese	1	1
Drahthaar	2	1	Shar Pei		1
Espagneul Breton	1	1	Siberian Husky	1	2
Flat Coat Retriever	1	1	Spinone	1	5
Golden Retriever	4	3	Springer Spaniel	2	
Griffon Bleu		1	Standard Schnauzer	1	
Grifone	2	11	Terranova	2	1
Kurzhaar		1	Vizsla	2	

**Tab. 2** – Razze e genere presenti nella popolazione analizzata. F = femmine ; M = maschi.

Inoltre i soggetti che, sulla base della scheda raccolta dati, presentavano patologie in atto e/o erano sottoposti a trattamento farmacologico con cortisonici, steroidi o progestinici sono stati esclusi.

I campioni di plasma utilizzati ed analizzati in questo lavoro di tesi provengono da 423 cani, di cui 263 femmine (31 delle quali ovariectomizzate) e 160 maschi interi, 49 meticci e 374 soggetti appartenenti a razze varie (tabella 2).

La popolazione inclusa è stata quindi suddivisa in gruppi sulla base dell'età anagrafica degli animali.

Gli animali della presente popolazione, di età compresa tra 2 mesi e 13 anni, sono stati suddivisi in 5 gruppi d'età: cuccioli (1-5 mesi), peripuberi/puberi (6-20 mesi), adulti (21 mesi-6 anni), senior (6,1-10 anni) e geriatrici (> 10 anni).

Per ciascun soggetto è stato effettuato un unico prelievo di sangue e nel plasma corrispondente sono stati analizzati cortisolo e DHEA.

Poiché da uno studio preliminare (di un lavoro non ancora pubblicato) era emerso che il DHEA risulta essere maggiormente concentrato rispetto al DHEAS nel plasma canino, così come accade in altre specie animali (quali bovini, ovini e conigli) (Feher *et al.*, 1977; Marinelli *et al.*, 2007a) uomo escluso, nel presente studio è stata quantificata la forma desolfatata dello steroide.

L'analisi del progesterone è stata eseguita nelle femmine per determinare la fase del ciclo estrale e quella del testosterone in 69 maschi interi.

La discrepanza nel numero di determinazioni degli steroidi esaminati rispetto al numero di animali è dovuta alla quantità di plasma disponibile, non sempre sufficiente per eseguire tutte le analisi ormonali.

Per una maggior chiarezza a tal proposito la tabella 3 mostra la distribuzione della numerosità dei campioni analizzati per ciascun ormone, come essi sono stati ripartiti nei gruppi d'età anche sulla base della presenza/assenza di gonadectomia.

<b>ORMONE</b>									
<i>Gruppi d'età</i>	<b>DHEA</b>			<b>C</b>			<b>C/DHEA</b>		
	<b><i>F<sub>int</sub></i></b>	<b><i>F<sub>ov</sub></i></b>	<b><i>M</i></b>	<b><i>F<sub>int</sub></i></b>	<b><i>F<sub>ov</sub></i></b>	<b><i>M</i></b>	<b><i>F<sub>int</sub></i></b>	<b><i>F<sub>ov</sub></i></b>	<b><i>M</i></b>
Cuccioli	15	-	9	22	-	11	14	-	5
Peripuberi	23	-	13	24	1	9	22	-	12
Adulti	89	8	55	122	11	69	87	8	54
Senior	30	10	27	41	12	45	29	9	26
Geriatrici	8	7	10	9	7	14	7	7	10
Totale	165	25	114	218	31	148	159	24	107

**Tab. 3** – Distribuzione della numerosità dei campioni analizzati nei vari gruppi d'età relativamente a ciascun ormone considerato. DHEA = deidroepiandrosterone; C = cortisolo; C/DHEA = rapporto cortisolo/DHEA; ***F<sub>int</sub>*** = femmine intere; ***F<sub>ov</sub>*** = femmine ovariectomizzate; M = maschi.

### **3.3 ESAME COLPOCITOLOGICO**

La fase del ciclo estrale è stata individuata sulla base dei dati anamnestici e dell'esame colposcitologico, il cui esito è stato successivamente confermato mediante valutazione della progesteronemia plasmatica.

#### **3.3.1 PRELIEVO**

L'esame delle cellule esfoliate dell'epitelio vaginale è una tecnica utile per monitorare la progressione del proestro e dell'estro nelle cagne e ottenere utili informazioni sullo stadio del ciclo estrale al momento del prelievo. Quest'ultimo viene eseguito utilizzando un tampone di cotone (provette con tampone a secco, Kima laboratori analisi, Piove di Sacco, Italia) introdotto, dopo divaricazione delle labbra vulvari, a livello della commessura dorsale della vulva. Inizialmente il tampone viene mantenuto addossato alla superficie caudo-dorsale del canale vaginale, per evitare la fossa clitoridea, procedendo quindi in direzione cranio-dorsale verso la colonna vertebrale sino a superare l'arcata ischiatica ed infine spinto fino al settore intrapelvico per essere poi retratto, previa rotazione di 360° sul proprio asse longitudinale in senso orario e antiorario. L'estremità del tampone viene quindi fatta delicatamente rotolare (per evitare la distruzione delle cellule) su un vetrino portaoggetti, dove le cellule raccolte vengono trasferite effettuando due o tre rotazioni parallele (strisci).

#### **3.3.2 COLORAZIONE**

Dopo esser stati lasciati asciugare all'aria i vetrini sono stati fissati e colorati mediante Diff-Quick, metodo di colorazione di uso comune per ematologia, citologia e batteriologia.

La procedura prevede che i vetrini siano dapprima immersi per 10 volte consecutive in una soluzione di fissaggio (Fast green 2,5 µM in metanolo) e quindi asciugati all'aria. Essi vengono successivamente immersi (10 volte) in una soluzione di colorazione acida (Eosina G 1,76 mM in tampone fosfato 0,1 M, pH 6,6), sciacquati delicatamente con acqua distillata, immersi in una seconda soluzione di colorazione basica (Blu di metilene 2,94 mM in tampone fosfato 0,1 M, pH 6,6) e nuovamente sciacquati con acqua distillata. Dopo asciugatura all'aria, i preparati vengono chiarificati in xilolo e coperti con un vetrino coprioggetti previo trattamento con un montante sintetico (balsamo) per conservarli più a lungo.

### **3.3.3 COLPOCITOLOGIA E VALUTAZIONE MICROSCOPICA**

Nella specie canina l'analisi delle cellule epiteliali dello striscio vaginale viene utilizzata soprattutto per determinare e monitorare il momento ottimale per l'accoppiamento. Le modificazioni delle cellule esfoliate riflettono gli effetti degli estrogeni sull'epitelio vaginale, il quale sotto l'influenza ormonale subisce delle modificazioni di spessore. Di conseguenza, la citologia vaginale può venire utilizzata come test biologico per la determinazione degli estrogeni allo scopo di monitorare la fase follicolare del ciclo ovarico. A seconda dello stadio del ciclo ovarico, i preparati mostrano tipi diversi di cellule dell'epitelio vaginale:

- cellule parabasali: elementi cellulari di piccole dimensioni che originano dall'esfoliazione degli strati più prossimi a quello basale; uniformi quanto a forma e dimensioni, sono cellule dotate di grandi nuclei tondeggianti e vescicolosi e citoplasma relativamente scarso, così che il rapporto nucleo:citoplasma risulta elevato.
  
- cellule intermedie: derivano dalle precedenti e si differenziano da queste quanto a dimensioni, variabili a seconda della quantità di citoplasma presente. Sono più ampie o addirittura doppie rispetto alle parabasali.
  
- cellule superficiali: sono le cellule epiteliali di maggiori dimensioni in questo tipo di preparati istologici. Si tratta di cellule morte caratterizzate da ampi margini irregolari, angolosi e spesso ripiegati, abbondante citoplasma ed i cui nuclei vanno incontro a picnosi prima di progredire verso la formazione di elementi anucleati. Poiché le cellule degenerano il citoplasma può contenere piccoli vacuoli.
  
- cellule squamose: le cellule epiteliali superficiali vanno incontro ad un processo degenerativo che porta alla formazione di ampie e appiattite cellule morte, dette anche squame o cellule corneificate. Cellule superficiali con piccoli nuclei picnotici e cellule epiteliali superficiali anucleari a livello citologico assumono lo stesso significato.

La vagina contiene flora batterica, per cui alcuni batteri possono essere osservati nei preparati istologici. Tale condizione rientra nella normalità se non è associata alla presenza di un'alta percentuale di neutrofili.

I diversi tipi di cellule sopra elencati possono essere osservati al microscopio ottico (OLYMPUS, Vanox photomicroscope, Japan), analizzando i preparati ottenuti dagli strisci.

Sulla base dell'analisi dei preparati, le cagne sono state classificate come soggetti in:

- anestro: quando prevalevano le cellule parabasali e le intermedie; neutrofilii e batteri, qualora presenti, erano in basso numero.
- proestro: quando gli elementi cellulari presenti (nel proestro precoce ed intermedio) erano soprattutto cellule epiteliali miste (parabasali, intermedie piccole e grandi e cellule superficiali), assieme a neutrofilii ed eritrociti, in percentuale variabile. Il fondo del vetrino poteva apparire opaco per la presenza di materiale mucoso basofilico. Dopo il picco degli estrogeni, nel tardo proestro, più dell'80% delle cellule epiteliali erano superficiali/squamose e i neutrofilii assenti (situazione simile all'estro citologico). Batteri erano spesso presenti sia liberi che sulla superficie delle cellule epiteliali.
- estro: quando veniva raggiunto il massimo grado di corneificazione ed erano presenti cellule superficiali con piccoli nuclei picnotici e squamose anucleate in quantità superiore all'80%. Lo sfondo del vetrino si presentava chiaro e privo di muco mentre gli eritrociti potevano essere indifferentemente presenti o assenti. I batteri potevano essere presenti mentre i neutrofilii erano generalmente assenti.
- diestro: quando le cellule parabasali ed intermedie erano di nuovo presenti in quantità preponderante e le cellule superficiali rappresentavano circa il 20% della popolazione cellulare presente. Neutrofilii potevano essere presenti in numero variabile. Eritrociti e batteri potevano essere indifferentemente presenti o assenti (Cowell *et al.*, 2008; <http://intl.elsevierhealth.com.vet>).

### **3.4 VALUTAZIONE DELLA PROGESTERONEMIA PLASMATICA**

La misurazione dei livelli plasmatici di progesterone viene generalmente utilizzata per identificare la presenza di corpi lutei funzionalmente attivi, per confermare l'avvenuta ovulazione, per monitorare il diestro e per stabilire approssimativamente il momento dell'ovulazione imminente. Nella cagna durante il proestro le concentrazioni plasmatiche di progesterone restano a livelli basali, inferiori a 0,5 ng/ml, fino al picco

preovulatorio dell'LH. In coincidenza con l'innalzamento dei livelli di questo ormone si ha un incremento della progesteronemia al di sopra dei livelli basali. I valori ematici di progesterone mostrano una tendenza ad aumentare arrivando a 1-2 ng/ml qualche giorno (circa 2) prima del picco preovulatorio dell'LH (Nelson e Couto, 1998). La produzione di LH al suo picco provoca l'ovulazione e ha inizio così la fase di estro in cui la concentrazione ematica del progesterone aumenta rapidamente, passando da valori di 1-2 ng/ml, osservabili in corrispondenza del picco di LH, a valori di 4-6 ng/ml nel periodo delle ovulazioni, ovvero 1-2 giorni dopo il picco di LH, fino ad arrivare a livelli di 12 ng/ml e 15 ng/ml rispettivamente a 4 e 8 giorni dal picco (Nelson e Couto, 1998). Valori di *plateau* nella progesteronemia vengono raggiunti 2-4 settimane dopo. Alla fase estrale fa seguito infatti il diestro: dal punto di vista ormonale si assiste in questa fase alla massima produzione di progesterone sia nella cagna gravida, da parte dei corpi lutei gravidici, sia in assenza di gravidanza in questo caso da parte dei corpi lutei ciclici. Durante il diestro il progesterone raggiunge i livelli più elevati arrivando a valori anche di 80 ng/ml a 15-30 giorni dall'ovulazione. Esso rimane a tali livelli per circa un'altra settimana dopo la quale inizia a subire un graduale declino raggiungendo i livelli basali di meno di 1 ng/ml nelle cagne non gravide 60-90 giorni dopo il picco dell'LH (Nelson e Couto, 1998). Nelle cagne gravide invece si verifica un rapido calo del progesterone prima del parto, approssimativamente 64 giorni dopo il picco di LH. Al diestro fa seguito l'anestro, fase del ciclo in cui il progesterone si mantiene a livelli molto bassi (inferiori a 0,5 ng/ml).

Nel presente studio le cagne in cui la condizione riproduttiva è stata analizzata e determinata, sono state classificate e raggruppate in tre differenti gruppi corrispondenti a:

- una fase follicolare, che include cagne nelle fasi di proestro ed estro;
- una fase luteinica, che include la cagne in diestro e gravidanza;
- una fase anestratale, comprendente cagne in anestro e lattazione.

Per maggior chiarezza la tabella 4 mostra la numerosità e la distribuzione dei campioni analizzati per ciascun ormone e per il loro rapporto, nelle tre differenti fasi riproduttive del genere femminile.



<i>Fase riproduttiva</i>	<b>ORMONE</b>		
	<b>DHEA</b>	<b>C</b>	<b>C/DHEA</b>
<i>Anestrale</i>	43	54	43
<i>Follicolare</i>	26	43	26
<i>Luteinica</i>	9	21	9

**Tab. 4** – Distribuzione della numerosità dei campioni appartenenti a femmine intere nelle tre differenti fasi riproduttive relativamente a ciascun ormone considerato. DHEA = deidroepiandrosterone; C = cortisolo; C/DHEA = rapporto cortisolo/DHEA.

### **3.5 ANALISI RADIOIMMUNOLOGICA**

La quantificazione degli ormoni sui campioni di plasma è stata effettuata mediante analisi radioimmunologica (*Radioimmunoassay* - RIA), sistema analitico ad elevata specificità e sensibilità. La specificità è raggiunta mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico, capace di riconoscere e legare selettivamente la sostanza da dosare. La sensibilità è garantita dall'affinità dell'anticorpo per l'antigene.

La quantificazione radioimmunologica si basa sulla reazione di competizione tra un antigene marcato con un tracciante radioattivo e l'analita che si vuole quantificare per un anticorpo specifico comune. La competizione fra antigene marcato e analita si determina perché l'anticorpo è presente in difetto: ciò significa che maggiore è la concentrazione dell'analita presente, minore sarà la quantità del tracciante radioattivo che si legherà all'anticorpo.

#### **3.5.1 RIA SU MICROPIASTRA**

Il RIA su micropiastro è una variante solida del tradizionale RIA e prevede l'utilizzo di micropiastre in poliestere da 96 pozzetti (Packard, optiplat 96 well PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA), a cui viene fatto adsorbire l'anticorpo secondario.

Inizialmente un anticorpo anti- $\gamma$ globuline di coniglio prodotto nella capra è stato utilizzato come anticorpo secondario, diluito 1:1000 con tampone sodio acetato 0,15 mM, pH 9,0. L'antisiero è stato distribuito nei 96 pozzetti della micropiastra (200  $\mu$ l/pozzetto). Dopo un'incubazione a 4 °C per una notte la piastra è stata svuotata e sono stati aggiunti, ad ogni pozzetto, 200  $\mu$ l di tampone RIA ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 61 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ , 40 mM; NaCl, 154 mM, pH 7,2) contenente albumina bovina serica (BSA) allo 0,1%. Dopo un'ulteriore incubazione di 1 ora a 4 °C la piastra è stata nuovamente svuotata e conservata a -20 °C fino al momento dell'utilizzo. La piastra così ottenuta è stata mantenuta a -20 °C per un tempo massimo di 4 settimane.

Ad ogni piastra è stato quindi aggiunto l'anticorpo primario specifico, opportunamente diluito a seconda dell'analita da ricercare: anticorpo anti-DHEA-17-CMO (Centro Medico Diagnostico Emilia s.r.l., Bologna, Italia), diluito 1:30000; anticorpo anti-cortisolo-3-CMO (Centro Medico Diagnostico Emilia s.r.l., Bologna, Italia), diluito 1:20000; anticorpo anti-progesterone-7-CMO (Battocchio *et al.*, 1999), diluito 1:8000; anticorpo anti-testosterone-3-CMO (Centro Medico Diagnostico Emilia s.r.l., Bologna, Italia), diluito 1:32000.

Le caratteristiche di specificità degli anticorpi sono riportate di seguito:

- Anticorpo anti-DHEA-17-CMO: DHEA 100%, 5-androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol 9,2%, epiandrosterone 2,8%, 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol 0,6%, testosterone 0,1%, androstenedione 0,1%, DHEAS 0,04%, cortisolo < 0,001%.
- Anticorpo anti-cortisolo-3-CMO: cortisolo 100%, prednisolone 44,3%, 11-deossicortisolo 13,9%, cortisone 4,9%, corticosterone 3,5%, prednisone 2,7%, 17-idrossiprogesterone 1,0%, 11-deossicorticosterone 0,3%, desametasone 0,1%, progesterone < 0,01%, 17-idrossipregnenolone < 0,01%, danazolo < 0,01%, DHEAS < 0,01%, androsterone solfato < 0,01%, pregnenolone < 0,01%.
- Anticorpo anti-progesterone-7-CMO: progesterone 100%, 11 $\alpha$ -idrossiprogesterone 77%, 11 $\beta$ -idrossiprogesterone 65%, 17 $\alpha$ -idrossiprogesterone 2,9%, 20 $\alpha$ -idrossiprogesterone 0,01%, 20 $\beta$ -idrossiprogesterone < 0,001%.
- Anticorpo anti-testosterone-3-CMO: testosterone 100%, 5 $\alpha$ -diidrotestosterone 38%, 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol 13,7%, 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol 13,6%, androstenedione 1,7%, 5 $\alpha$ -androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol 1,2%, deidroepiandrosterone 0,01%, cortisolo < 0,001%, colesterolo < 0,001%.

In ogni pozzetto, tranne in quelli destinati alla determinazione di alcuni parametri di controllo, quali Attività Totale (AT) e legame aspecifico (NSB), sono stati dispensati 200

µl di antisiero e la piastra è stata lasciata incubare a 4 °C per una notte. Successivamente la piastra è stata svuotata, asciugata e quindi un opportuno volume di campione estratto e diluito con tampone RIA è stato aggiunto nel pozzetto in modo da raggiungere un volume complessivo di 200 µl/pozzetto, come riportato in tabella 5. Ogni campione è stato analizzato in duplicato.

In tutti i pozzetti, sono stati infine aggiunti 10 µl di tracciante radioattivo, diluito precedentemente con etanolo assoluto, ulteriormente diluito con tampone RIA ad ottenere una soluzione da 5000 cpm/10 µl: [1,2,6,7-<sup>3</sup>H]DHEA; [1,2,6,7-<sup>3</sup>H]cortisolo; [1,2,6,7-<sup>3</sup>H]progesterone; [1,2,6,7-<sup>3</sup>H]testosterone (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA).

	AT	NSB	Co	Curva	Campioni DHEA	Campioni C	Campioni P4	Campioni TST
Tampone RIA (µl)	-	200	200	150	100	100	150/100	150
Standard (µl)	-	-	-	50	-	-	-	-
Campione (µl)	-	-	-	-	100	100	50/100	50
Tracciante (µl)	10	10	10	10	10	10	10	10

**Tab. 5** – Volumi dispensati nella piastra. AT = attività totale; NSB = legame aspecifico; Co = massima radioattività misurabile dal sistema; DHEA = deidroepiandrosterone; C = cortisolo; P4 = progesterone; TST = testosterone.

La piastra è stata fatta agitare su agitatore orizzontale a bassa velocità per 3 minuti, coperta con pellicola trasparente e lasciata incubare per una notte a 4 °C al fine di consentire alla reazione immunologica di raggiungere l'equilibrio.

Dopo incubazione, la piastra è stata lavata, tranne i pozzetti di controllo (AT e NSB), per 4 volte con tampone RIA (200 µl/pozzetto) per rimuovere l'antigene marcato rimasto libero e lasciare solo l'antigene marcato rimasto legato all'anticorpo.

Ad ogni pozzetto sono stati infine aggiunti 200 µl di liquido scintillante (Microscint, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) per il conteggio della frazione di radioattività legata. La piastra è stata sigillata con pellicola termosaldabile (TOPSEAL S, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) e messa ad agitare per 3 minuti a bassa velocità.

La frazione di radioattività legata è stata determinata mediante lettura al β-counter (Top-Count, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) che,

attraverso un apposito programma (Riasmart, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA), elabora una curva di taratura e fornisce direttamente le concentrazioni ormonali dei campioni espresse in pg/pozzetto.

### **3.5.2 ESTRAZIONE DEGLI STEROIDI**

L'analisi radioimmunologica è stata condotta utilizzando come matrice il plasma canino. Rispettivamente 500, 50 e 150 µl prelevati da ciascun campione, sono stati sottoposti ad estrazione mediante etere dietilico per il dosaggio di DHEA, cortisolo e TST, mentre ad un'aliquota di 100 µl di plasma è stato aggiunto etere di petrolio per il dosaggio del P4. Gli steroidi sono stati estratti trasferendo l'opportuno volume di plasma in provette da estrazione e aggiungendo 8 ml di etere a ciascun campione. Successivamente, le provette sono state poste ad agitare su agitatore orizzontale per 10 minuti e centrifugate a 2700g a 5 °C per 5 minuti, al termine dei quali sono state trasferite a -20°C e ivi lasciate sino a congelamento della fase acquosa.

Il surnatante è stato quindi trasferito in provette coniche e portato a secco sotto corrente d'azoto su piastra termostata a 40°C. Il residuo secco è stato quindi risospeso con un adeguato volume di tampone RIA e la provetta è stata messa ad agitare vigorosamente su agitatore orizzontale per 10 minuti. Per la quantificazione del cortisolo plasmatico, data l'alta concentrazione di questo steroide nel plasma canino, è stata effettuata un'ulteriore diluizione (1/4) dell'estratto. Al termine del procedimento ciascun campione è stato dispensato in doppio nei pozzetti della piastra (tabella 5).

### **3.5.3 ALLESTIMENTO DELLA CURVA DI TARATURA E DEI CONTROLLI**

La curva di taratura è stata ottenuta dosando quantità note di ormone standard (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) a concentrazioni crescenti. I punti di concentrazione della curva sono stati preparati partendo da una concentrazione 100 ng/ml di steroide in etanolo, soluzione che è stata diluita 1:2 in modo seriale con tampone RIA fino ad ottenere gli intervalli riportati in tabella 6.

ORMONE	INTERVALLI DI CONCENTRAZIONE
DHEA	200 - 1,5 pg/50 µl
C	200 - 3 pg/50 µl
P4	320 - 2,5 pg/50 µl
TST	200 - 3 pg/50 µl

**Tab. 6** – Intervalli di concentrazione delle curve di taratura.

In ciascuna piastra sono stati allestiti dei pozzetti di controllo della qualità del sistema, nei quali sono stati valutati parametri quali: l'Attività Totale (AT), il legame non specifico con l'anticorpo secondario (NSB), il controllo dell'avvenuto adsorbimento (*coating*) dell'anticorpo secondario ai pozzetti (C0) ed il dosaggio di una quantità nota di analita (CTRL).

Di seguito vengono riportate le tipologie dei reagenti dispensate nei pozzetti di controllo:

- AT: è stato aggiunto solamente il tracciante radioattivo per stimarne la radioattività totale.
- NBS: non è stato addizionato l'anticorpo specifico, ma solo il tampone RIA ed il tracciante radioattivo per stimare la componente di legame aspecifico.
- C0: sono stati aggiunti l'anticorpo primario, il secondario, il tampone RIA ed il tracciante radioattivo. Essendo l'unico antigene presente, l'antigene marcato occuperà tutti i siti di legame dell'anticorpo esprimendo la radioattività massima misurabile dal sistema.
- CTRL: sono stati aggiunti l'anticorpo primario, il secondario, il tampone RIA ed il tracciante. E' presente un estratto di plasma bovino con concentrazione nota dell'analita per verificare l'affidabilità dell'elaborazione.

#### **3.5.4 VALIDAZIONE DEL METODO DI QUANTIFICAZIONE DI DHEA, CORTISOLO E TESTOSTERONE**

Nonostante i metodi RIA per la quantificazione di DHEA, cortisolo e testosterone siano già stati validati in campo bovino ed in altre specie animali (Gabai *et al.*, 2004), una validazione specifica si è resa necessaria per questi ormoni nella specie canina.

Per valutare l'attendibilità del metodo di quantificazione usato nel presente lavoro, sono state fatte diverse prove (test di diluizione, di recupero e di ripetibilità) stabilendone così la precisione, la sensibilità e l'accuratezza.

La validazione delle metodiche radioimmunologiche per la quantificazione di progesterone nel plasma di cane era invece già stata effettuata presso il laboratorio di Fisiologia Veterinaria del Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie dell'Università degli Studi di Padova (Rota *et al.*, 2003), fornendo risultati soddisfacenti in tutte e tre le sue componenti: test di diluizione, di recupero e di ripetibilità.

#### **3.5.4.1 TEST DI DILUIZIONE O DI PARALLELISMO**

L'obiettivo di tale test è verificare che a diluizioni seriali del campione corrisponda una proporzionale riduzione della concentrazione dell'ormone da dosare. I campioni diluiti devono quindi fornire risultati proporzionalmente correlati alle loro concentrazioni iniziali; in caso contrario, il sistema di misura deve essere definito "non accurato".

Le cause possono essere sostanzialmente dovute a:

- a. un'erronea taratura del sistema (reazione immunologica, separazione libero-legato);
- b. la presenza di interferenti nel sistema che agiscono in maniera non proporzionale alla loro concentrazione, provocando una sovrastima o sottostima ad ogni diluizione.

Per misurare l'effetto di eventuali interferenti al diminuire della concentrazione dell'ormone, sono state effettuate delle diluizioni seriali degli estratti, aventi fattori di diluizione compresi tra 1/2 e 1/64 per il DHEA e tra 1/2 e 1/32 per il cortisolo ed il testosterone.

I risultati di questa prova dimostrano la funzionalità del sistema quando la linea ottenuta interpolando i reciproci del fattore di diluizione con le concentrazioni tende ad una retta ( $y=ax+b$ ) che mostra un coefficiente di correlazione  $R^2$  che tende a 1 (deve essere superiore a 0,98, indicativo di una ridotta dispersione dei valori), un'intercetta all'origine "b" che è significativamente uguale a 0 ed il coefficiente angolare "a" che rappresenta la concentrazione iniziale del campione non diluito.

### **3.5.4.2 TEST DI RECUPERO**

Questo test consiste nell'aggiungere quantità note dell'ormone in un plasma che ne è privo (detto anche plasma "*steroid free*") e nel determinarne l'incremento che ne deriva rispetto al valore iniziale. Il plasma "*steroid free*" viene ottenuto aggiungendo a 100 ml di plasma 20 gr di *charcoal* (carbone attivo, Sigma-C5260). Dopo incubazione di una notte in agitazione su piastra magnetica, la miscela viene centrifugata (a 3500 g per 20 minuti) e il surnatante, prelevato e ricentrifugato, è plasma privo di steroidi.

Il sistema di analisi risulta attendibile se esiste una buona corrispondenza fra le concentrazioni osservate e le concentrazioni aggiunte. Per un corretto esito delle prove di recupero, l'aggiunta non deve mai provocare una diluizione del campione maggiore del 10% in termini di volume, per non modificarne in modo sostanziale la natura biologica (ad esempio il contenuto proteico). La condizione ideale è rappresentata da una percentuale di recupero (valore osservato/valore aggiunto X 100) tendente al 100%. Se le percentuali di recupero sono maggiori del 100% significa che il metodo sovrastima la concentrazione dell'ormone, in caso di percentuali inferiori al 100% il sistema di analisi sottostima. La valutazione del sistema di analisi può essere effettuata non solo come percentuale di recupero, ma anche attraverso l'analisi della regressione lineare. L'analisi statistica in questo caso deve mostrare, ai fini dell'accettabilità del test, dei valori di coefficiente di correlazione  $R^2$  e di coefficiente angolare "a" tendenti a 1. L'intercetta all'origine "b" della retta  $y = ax+b$  deve essere inoltre pari alla concentrazione iniziale del campione perché se la dose aggiunta è uguale a zero, "y" deve essere uguale a "b". Il recupero nei casi specifici è stato eseguito in campioni di plasma addizionati di quantità note di cortisolo (intervallo: 0,31-10 ng/ml) o di DHEA (intervallo: 39-1000 pg/ml) o di testosterone (intervallo: 0,16 - 5 ng/ml).

### **3.5.4.3 TEST DI RIPETIBILITÀ**

La precisione è l'indice di riproducibilità del sistema di analisi e si verifica inserendo fra i campioni incogniti dei campioni di controllo a concentrazioni note.

Questo test permette di valutare la riproducibilità all'interno dello stesso saggio (intra-saggio) e tra saggi diversi (inter-saggio) calcolando il coefficiente di variazione ( $CV\% = \text{Deviazione Standard} \times 100/\text{valore medio dei risultati}$ ).

Nello specifico, per valutare la riproducibilità inter-saggio nelle analisi di DHEA e cortisolo sono stati utilizzati campioni di plasma aventi rispettivamente concentrazioni pari a 100 pg/ml e 5 ng/ml. Per l'analisi del testosterone sono stati invece utilizzati tre

differenti controlli, per basse (450 pg/ml), intermedie (600 pg/ml) ed alte (2370 pg/ml) concentrazioni dell'ormone, mentre per l'analisi del progesterone sono stati utilizzati due controlli, rispettivamente per concentrazioni basse (4 ng/ml) ed intermedie (10 ng/ml) dell'ormone.

Un sistema di analisi immunologica presenta una buona riproducibilità se il CV% intra-saggio è minore del 10% e se il CV% inter-saggio è inferiore del 20%.

### **3.6 ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica è stata condotta mediante software STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

I valori di concentrazione degli steroidi sono stati sottoposti a test di Shapiro-Wilk per testarne la normalità. Se i dati non erano distribuiti normalmente venivano trasformati in valori logaritmici. L'omogeneità della varianza tra gruppi è stata valutata mediante test di Levene.

Le differenze tra maschi e femmine nelle concentrazioni ormonali sono state valutate mediante test t per campioni indipendenti. Per ciascun genere, le differenze nelle concentrazioni ormonali tra gruppi d'età sono state valutate mediante ANOVA univariata seguita da test *post-hoc* "Honestly Significant Difference" (HSD) per campioni diseguali, al fine di evidenziare eventuali differenze tra gruppi. I risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard (ES) e sono stati considerati significativi quando il valore di P era inferiore allo 0,05. Dalle analisi sono stati esclusi quei campioni i cui valori si discostavano oltre le 3 deviazioni standard dalla media.



## 4. RISULTATI

### 4.1 VALIDAZIONE DELLE METODICHE DI QUANTIFICAZIONE DEGLI STEROIDI PLASMATICI

I risultati dei test di recupero, di diluizione e ripetibilità per gli steroidi plasmatici DHEA, cortisolo e testosterone sono riportati in tabella 7: il coefficiente di correlazione ( $R^2$ ) evidenzia una ridotta dispersione dei punti ed i valori dei CV% intra- ed inter-saggio confermano la buona riproducibilità del sistema di quantificazione.

Per l'analisi del testosterone i tre differenti controlli per basse, intermedie ed alte concentrazioni dell'ormone, hanno fornito i valori relativi ai tre CV% inter-saggio riportati in tabella 7.

Per l'analisi del progesterone i risultati dei test di ripetibilità inter-saggio ottenuti inserendo all'interno delle analisi effettuate in giorni diversi dei campioni di controllo con concentrazioni ormonali note hanno fornito i seguenti coefficienti di variazione:

- 19,80% nel controllo per basse concentrazioni e
- 10% nel controllo per concentrazioni intermedie,

che essendo inferiori al 20%, hanno confermato la buona riproducibilità del sistema di quantificazione.

TEST DI VALIDAZIONE						
ORMONE	RECUPERO	$R^2$	DILUIZIONE	$R^2$	CV% INTRA	CV% INTER
<b>DHEA</b>	$y = 1,14x + 16,40$	0,98	$y = 1,41x + 0,01$	0,99	3,81	15,42
<b>C</b>	$y = 0,99x + 0,23$	0,99	$y = 10,17 + 0,32$	0,99	4,15	17,70
						9,46
<b>TST</b>	$y = 1,18 x - 0,00$	0,99	$y = 6,00x - 0,01$	0,99	3,71	11,56
						12,68

**Tab. 7** – Risultati dei test di validazione nel plasma canino per gli steroidi DHEA, cortisolo (C) e testosterone (TST). Nel caso del TST sono stati utilizzati tre differenti controlli, rispettivamente per basse, intermedie ed alte concentrazioni dell'ormone: in tabella sono riportati i valori dei relativi coefficienti di variazione.

## 4.2 DHEA E CORTISOLO NEL PLASMA CANINO

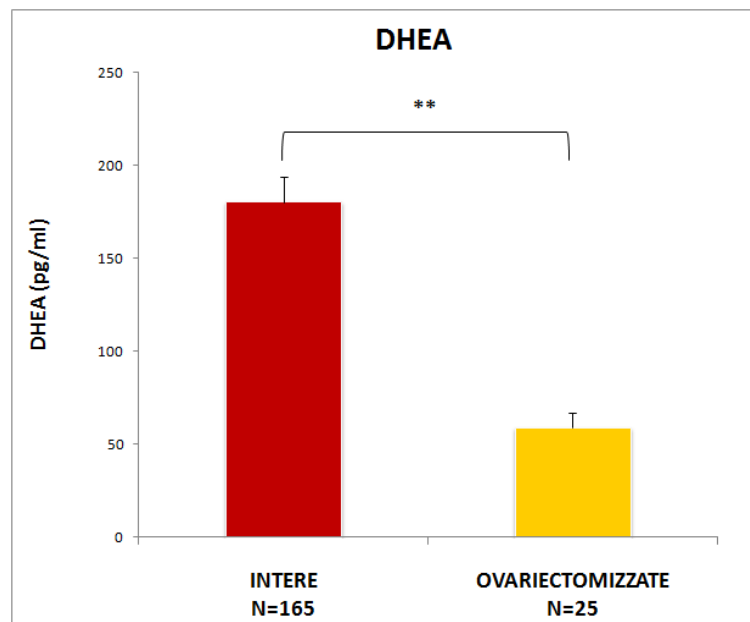
La quantificazione RIA ha consentito di determinare la concentrazione degli steroidi DHEA, cortisolo, progesterone e testosterone nel plasma canino.

La valutazione della progesteronemia plasmatica è stata utilizzata al fine di confermare l'esito dell'esame colpocitologico, consentendo di identificare la fase del ciclo estrale in cui si trovavano le cagne al momento del prelievo ematico.

I risultati ottenuti dalla quantificazione di DHEA, cortisolo e testosterone sono stati invece sottoposti ad analisi statistica al fine di evidenziare l'influenza delle variabili genere, età e condizione riproduttiva sui livelli ormonali.

### 4.2.1 DHEA

Durante l'elaborazione statistica si è appurato che la variabile DHEA non presentava una distribuzione normale, per cui i dati sono stati sottoposti ad opportuna trasformazione. L'analisi è stata condotta considerando separatamente i soggetti interi e quelli sottoposti a gonadectomia dal momento che il test t per campioni indipendenti ha evidenziato una differenza significativa ( $t = 6,10$ ;  $P < 0,01$ ) nei livelli plasmatici di DHEA tra femmine intere ed ovariectomizzate (figura 4).

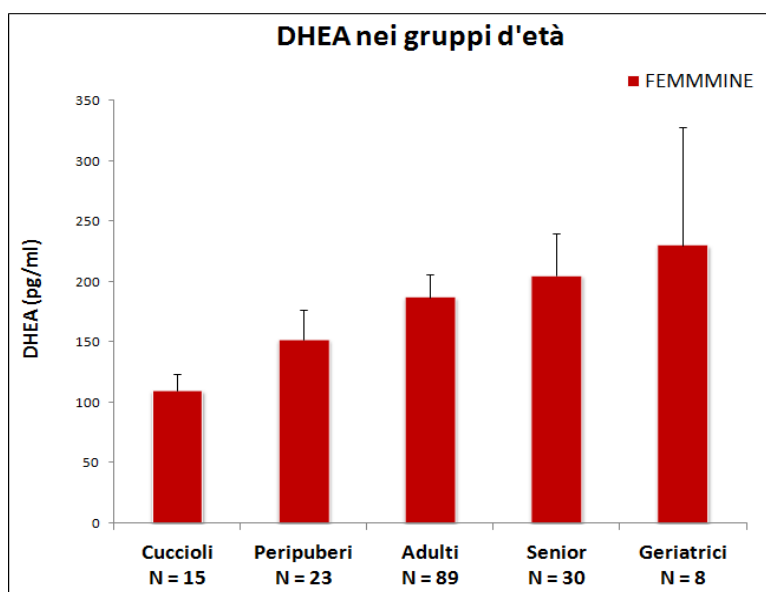


**Fig. 4** – La concentrazione plasmatica media di DHEA (pg/ml) nelle cagne intere è risultata significativamente maggiore rispetto a quella riscontrata nelle cagne ovariectomizzate. Le barre verticali indicano +/- l'errore standard. \*\* =  $P < 0,01$ .

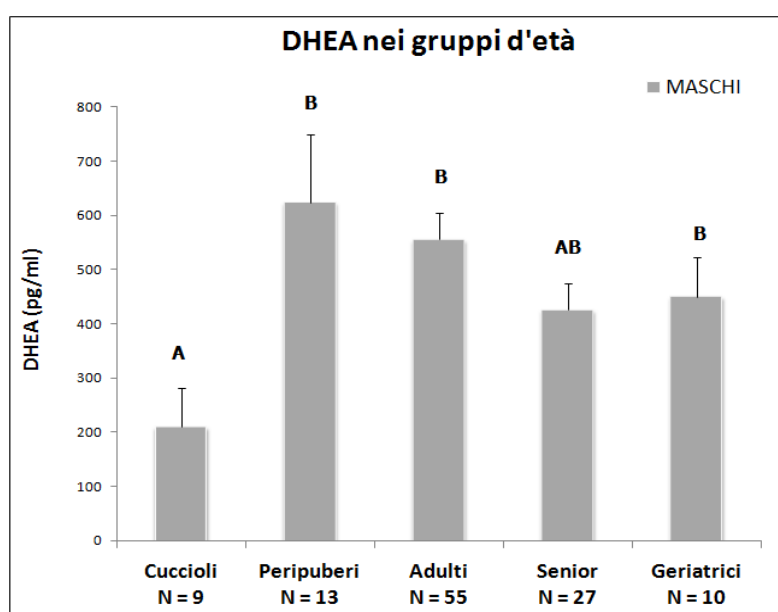
#### 4.2.1.1 GENERE ED ETÀ

Le concentrazioni di DHEA sono state analizzate valutando separatamente l'effetto dell'età e del genere.

Il test ANOVA a un criterio di classificazione condotto sulle femmine (figura 5) non ha rivelato differenze significative tra gruppi d'età ( $F = 1,09$ ;  $P = 0,36$ ), mentre una differenza altamente significativa è emersa nel genere maschile ( $F = 5,73$ ;  $P < 0,01$ ). I risultati del test *post-hoc* HSD per campioni diseguali sono presentati in figura 6.



**Fig. 5** – Concentrazioni plasmatiche medie di DHEA (pg/ml) delle femmine nei 5 gruppi d'età. Le barre verticali indicano +/- l'errore standard.



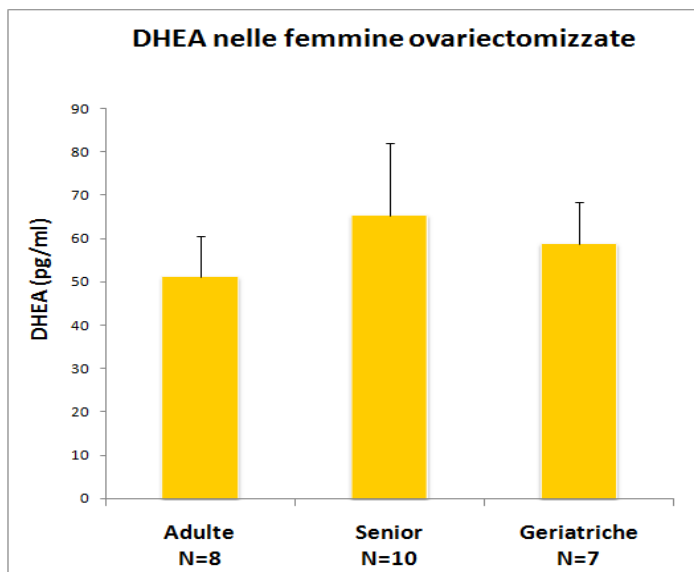
**Fig. 6** – Concentrazioni plasmatiche medie di DHEA (pg/ml) dei maschi nei 5 gruppi d'età. Le barre verticali indicano +/- l'errore standard. Lettere maiuscole diverse indicano livelli significativamente differenti di DHEA all'interno del genere (*post-hoc* HSD per campioni diseguali,  $P < 0,01$ ).

Le differenze nella concentrazione ormonale di DHEA tra maschi e femmine valutate all'interno di ciascun gruppo d'età mediante test t per campioni indipendenti hanno inoltre dimostrato che, ad eccezione dei cuccioli, tutti gli altri gruppi del genere maschile mostrano livelli di DHEA plasmatico significativamente maggiori rispetto alle femmine (tabella 8).

DHEA (pg/ml) in soggetti interi						
Gruppi d'età	Genere	N	Media	ES	Test t	
					t	p
Cuccioli	F	15	109,27	13,59	1,57	NS
	M	9	209,46	72,25		
Peripuberi	F	23	151,64	25,10	4,97	**
	M	13	624,09	124,10		
Adulti	F	89	186,77	19,03	9,96	**
	M	55	555,01	48,86		
Senior	F	30	204,89	34,69	4,33	**
	M	27	425,30	49,73		
Geriatrici	F	8	229,90	98,42	2,99	*
	M	10	449,89	73,18		
Totale	F	165	180,21	13,48	11,20	*
	M	114	495,67	32,23		

**Tab. 8** – Valori medi di concentrazione plasmatica di DHEA (pg/ml) relativi a soggetti interi (*N* = numero di soggetti; *ES* = errore standard; *NS* = non significativo; \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ).

Dal momento che i livelli plasmatici di DHEA delle femmine ovariectomizzate sono risultati significativamente inferiori rispetto a quelli delle femmine intere, l'effetto dell'età sulla concentrazione plasmatica di DHEA è stato analizzato separatamente in femmine ovariectomizzate (figura 7) mediante test ANOVA. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata evidenziata tra i gruppi "adulte", "senior" e "geriatriche" ( $F = 0,29$ ;  $P = 0,75$ ).

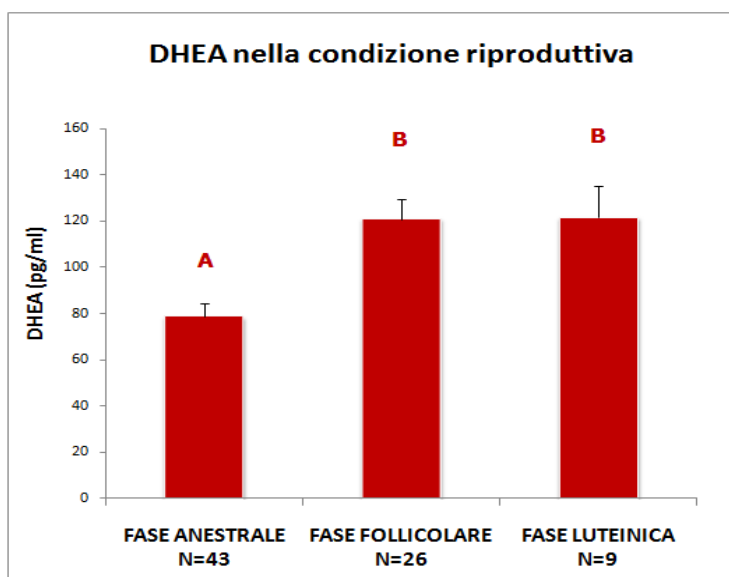


**Fig. 7** – Concentrazioni plasmatiche medie di DHEA (pg/ml) nelle cagne ovariectomizzate suddivise nei gruppi d'età adulte, senior e geriatriche. Nel grafico le barre verticali indicano +/- l'errore standard.

#### 4.2.1.2 CONDIZIONE RIPRODUTTIVA

Dal momento che nessuna differenza significativa è emersa tra i differenti gruppi d'età per le femmine intere, tutti i soggetti sono stati considerati come appartenenti ad un unico gruppo e nelle cagne in cui la condizione riproduttiva era nota (N = 78), l'effetto di quest'ultima è stato analizzato sui livelli plasmatici di DHEA.

Come evidenziato dal test ANOVA ( $F = 11,01$ ;  $P < 0,01$ ) la concentrazione plasmatica di DHEA è risultata significativamente differente nelle varie condizioni riproduttive considerate. Il risultato del test HSD per campioni diseguali è mostrato in figura 8: la fase anestrale differisce in modo significativo dalle fasi follicolare e luteinica, rispetto alle quali presenta concentrazioni plasmatiche di DHEA significativamente inferiori.



**Fig. 8** - Concentrazioni plasmatiche medie di DHEA (pg/ml) nelle differenti fasi riproduttive. Nel grafico le barre verticali indicano +/- l'errore standard. Lettere diverse indicano livelli significativamente differenti di DHEA tra le tre fasi (*post-hoc* HSD per campioni diseguali,  $P < 0,01$ ).

## 4.2.2 CORTISOLO

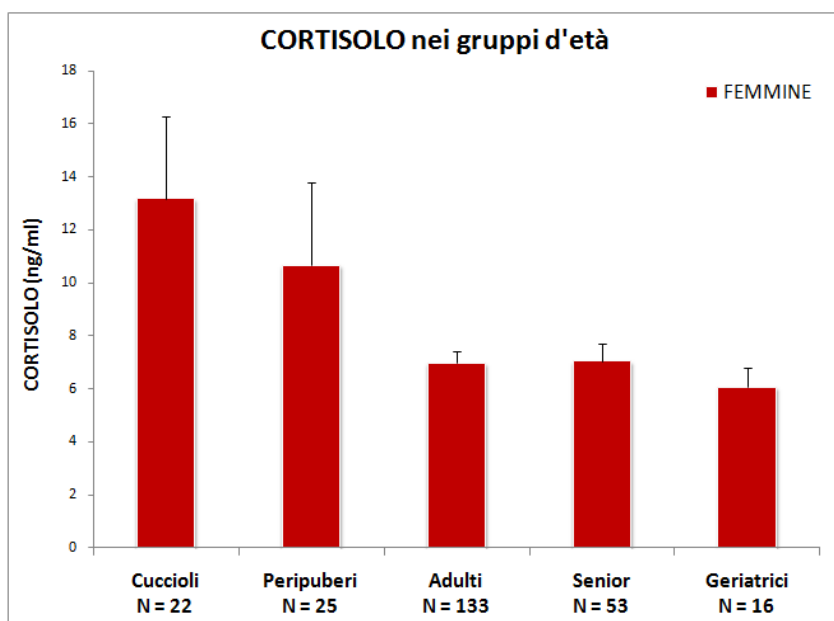
Anche per questo steroide, dopo trasformazione logaritmica, i dati sono risultati distribuiti normalmente e la varianza è risultata omogenea. Di conseguenza, per le analisi statistiche sono stati utilizzati dei test parametrici.

Nel caso del cortisolo è stato possibile analizzare un maggior numero di soggetti: questo ormone risulta infatti più concentrato rispetto al DHEA nel plasma canino. La quantificazione ha quindi richiesto un volume inferiore di matrice consentendo l'analisi anche dei campioni di scarsa quantità.

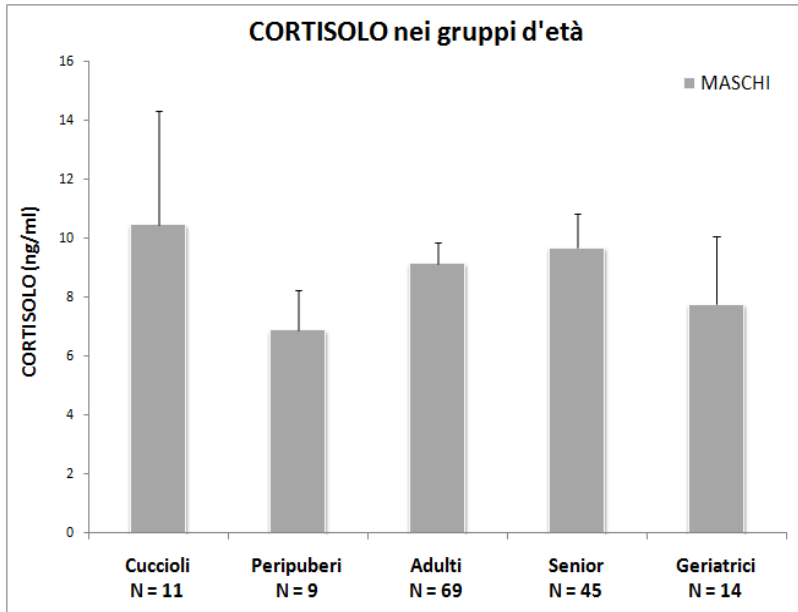
### 4.2.2.1 GENERE ED ETA'

Il test t per campioni indipendenti non ha rivelato differenze statisticamente significative nelle concentrazioni plasmatiche di cortisolo di femmine intere ed ovariectomizzate ( $t = 0,90$ ;  $P = 0,37$ ), pertanto tutti i soggetti di genere femminile sono stati considerati come appartenenti ad un unico gruppo.

Il test ANOVA a un criterio di classificazione, condotto separatamente per le femmine (figura 9) e per i maschi (figura 10), ha evidenziato che in entrambi i generi i cinque gruppi d'età considerati non presentano concentrazioni plasmatiche di cortisolo significativamente differenti tra loro (ANOVA per le femmine:  $F = 0,65$ ;  $P = 0,63$ ; ANOVA per i maschi:  $F = 0,70$ ;  $P = 0,59$ ).



**Fig. 9** – Concentrazioni plasmatiche medie di cortisolo (ng/ml) delle femmine nei cinque gruppi d'età. Le barre verticali indicano +/- l'errore standard.



**Fig. 10** – Concentrazioni plasmatiche medie di cortisolo (ng/ml) dei maschi nei cinque gruppi d'età. Le barre verticali indicano +/- l'errore standard.

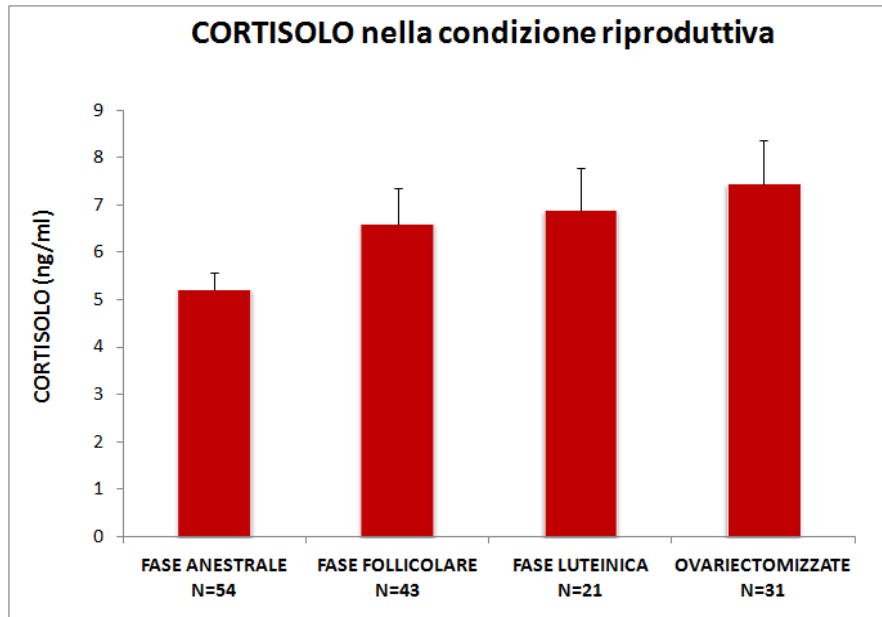
Le differenze nella concentrazione ormonale di cortisolo tra maschi e femmine valutate all'interno di ciascun gruppo d'età mediante test t per campioni indipendenti sono mostrate nella tabella 9: nei soggetti adulti la cortisolemia plasmatica dei maschi è risultata significativamente maggiore rispetto a quella delle femmine, mentre in tutti gli altri gruppi d'età non sono state evidenziate differenze significative tra i generi.

CORTISOLO (ng/ml)						
Gruppi d'età'	Genere	N	Media	ES	Test t	
					t	p
Cuccioli	F	22	13,17	3,11	0,32	NS
	M	11	10,48	3,85		
Peripuberi	F	25	10,66	3,15	0,09	NS
	M	9	6,89	1,34		
Adulti	F	133	6,97	0,43	2,77	**
	M	69	9,16	0,69		
Senior	F	53	7,04	0,65	1,66	NS
	M	45	9,69	1,17		
Geriatrici	F	16	6,07	0,70	0,07	NS
	M	14	7,77	2,29		
Totale	F	249	7,84	0,51	2,48	*
	M	148	9,15	0,60		

**Tab. 9** – Valori medi di concentrazione plasmatica di cortisolo (ng/ml) (NS = non significativo; \* = P < 0,05; \*\* = P < 0,01).

#### 4.2.2.2 CONDIZIONE RIPRODUTTIVA

L'effetto della condizione riproduttiva sulle concentrazioni plasmatiche di cortisolo è stato indagato in 149 femmine, di cui 31 ovariectomizzate. L'analisi statistica ha evidenziato che i valori plasmatici di cortisolo non sono influenzati dalla condizione riproduttiva ( $F = 2,18$ ;  $P = 0,09$ ), (figura 11).



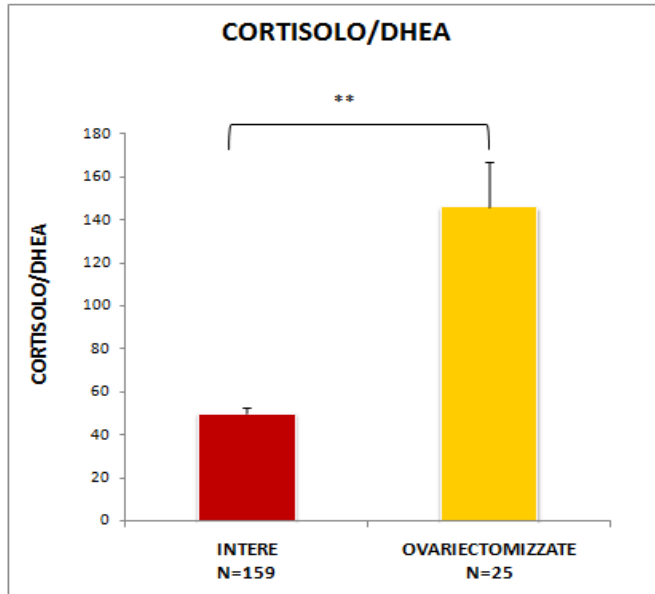
**Fig. 11** - Concentrazioni plasmatiche medie di cortisolo (ng/ml) nelle differenti condizioni riproduttive. Le barre verticali indicano +/- l'errore standard.

#### 4.3 RAPPORTO CORTISOLO/DHEA

I valori relativi al rapporto cortisolo/DHEA sono stati ottenuti dividendo i valori delle concentrazioni dei due ormoni, dopo trasformazione di quelli relativi al cortisolo da ng/ml a pg/ml.

Anche in questo caso l'analisi statistica è stata eseguita trattando separatamente soggetti interi e sottoposti a gonadectomia dal momento che una differenza significativa ( $t = 5,72$ ;  $P < 0,01$ ) nei valori di tale rapporto è stata riscontrata tra femmine intere ed ovariectomizzate (figura 12).

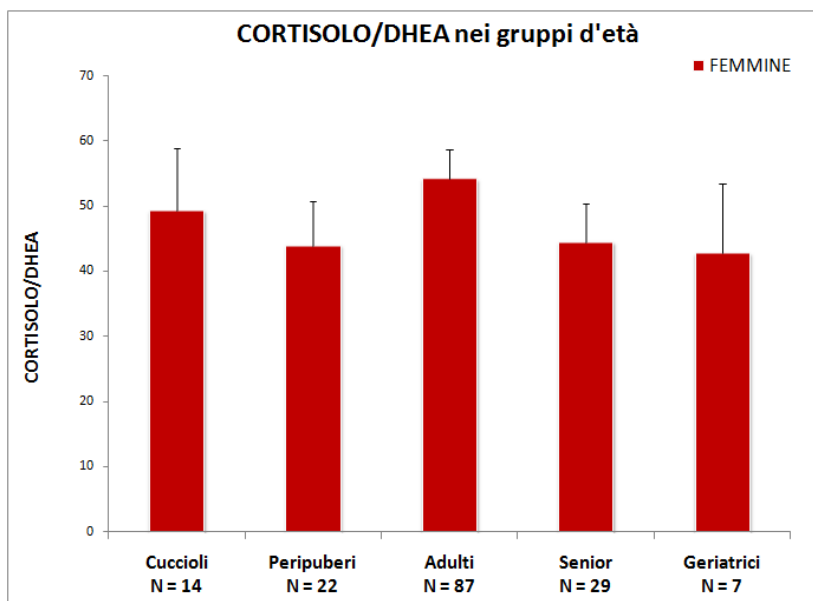




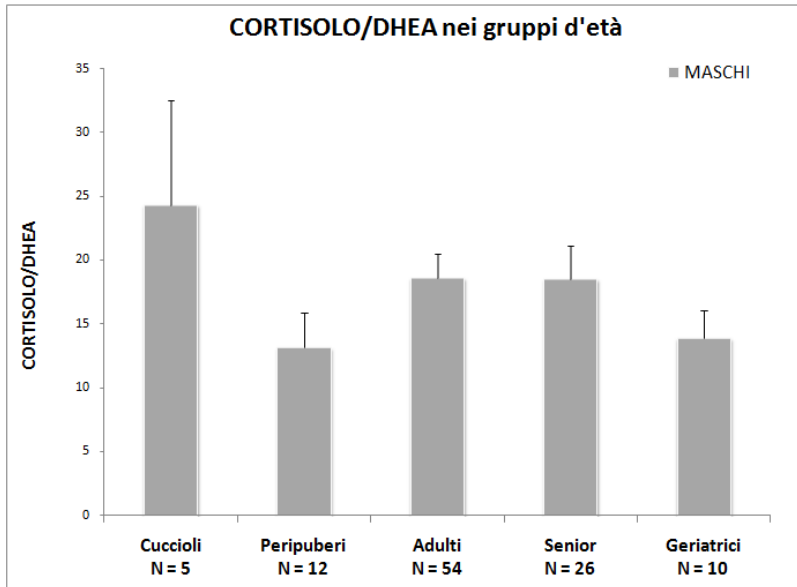
**Fig. 12** – I valori medi relativi al rapporto cortisolo/DHEA nelle cagne intere sono risultati significativamente inferiori rispetto a quelli riscontrati nelle cagne ovariectomizzate. Le barre verticali indicano +/- l'errore standard. \*\* =  $P < 0,01$ .

#### 4.3.1 GENERE ED ETA'

L'ANOVA a un criterio di classificazione, condotto separatamente per le femmine (figura 13) e per i maschi (figura 14), ha evidenziato che né nelle femmine intere ( $F = 0,57$ ;  $P = 0,69$ ) né nei maschi ( $F = 0,69$ ;  $P = 0,60$ ) il rapporto cortisolo/DHEA differisce in modo significativo tra i cinque gruppi d'età considerati.



**Fig. 13** – Valori medi relativi al rapporto cortisolo/DHEA delle femmine nei vari gruppi d'età. Le barre verticali indicano +/- l'errore standard.



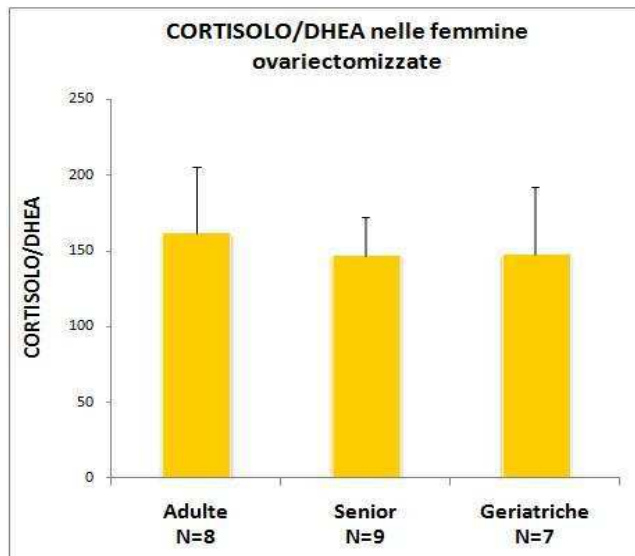
**Fig. 14** – Valori medi relativi al rapporto cortisolo/DHEA dei maschi nei vari gruppi d’età. Le barre verticali indicano +/- l’errore standard.

Le differenze nel rapporto cortisolo/DHEA tra maschi e femmine valutate all’interno di ciascun gruppo d’età mediante test t per campioni indipendenti sono presentate nella tabella 10. Il rapporto cortisolo/DHEA è risultato significativamente maggiore nelle femmine in tutti i gruppi considerati ad eccezione del gruppo “cuccioli”, dove non è stata evidenziata alcuna differenza significativa tra genere femminile e maschile.

RAPPORTO CORTISOLO/DHEA in soggetti interi						
Gruppi d'età'	Genere	N	Media	ES	Test t	
					t	p
Cuccioli	F	14	49,29	9,65	1,77	NS
	M	5	24,31	8,22		
Peripuberi	F	22	43,96	6,71	4,55	**
	M	12	13,13	2,77		
Adulti	F	87	54,13	4,53	7,69	**
	M	54	18,35	1,90		
Senior	F	29	44,46	5,99	3,66	**
	M	26	18,51	2,65		
Geriatrici	F	7	42,77	10,62	2,77	*
	M	10	13,87	2,19		
Totale	F	159	50,03	3,02	10,2	**
	M	107	17,78	1,28		

**Tab. 10** – Rapporto cortisolo/DHEA in soggetti interi (NS = non significativo; \* = P < 0,05; \*\* = P < 0,01).

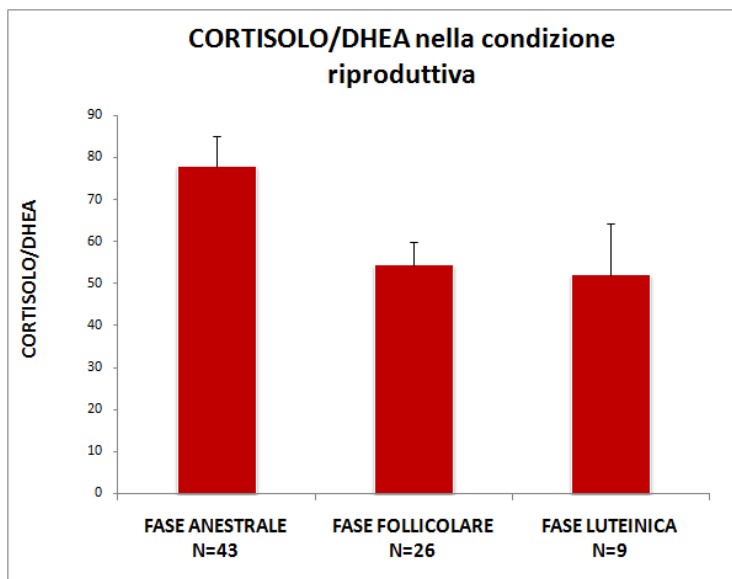
Nessuna differenza significativa (F = 0,05; P = 0,95) è emersa confrontando i valori medi relativi al rapporto cortisolo/DHEA dei gruppi d’età “adulti”, “senior” e “geriatrici” in 24 femmine ovariectomizzate (figura 15).



**Fig. 15** – Valori medi di cortisolo/DHEA nelle cagne ovariectomizzate suddivise nei tre gruppi d'età. Nel grafico le barre verticali indicano +/- l'errore standard.

#### 4.3.2 CONDIZIONE RIPRODUTTIVA

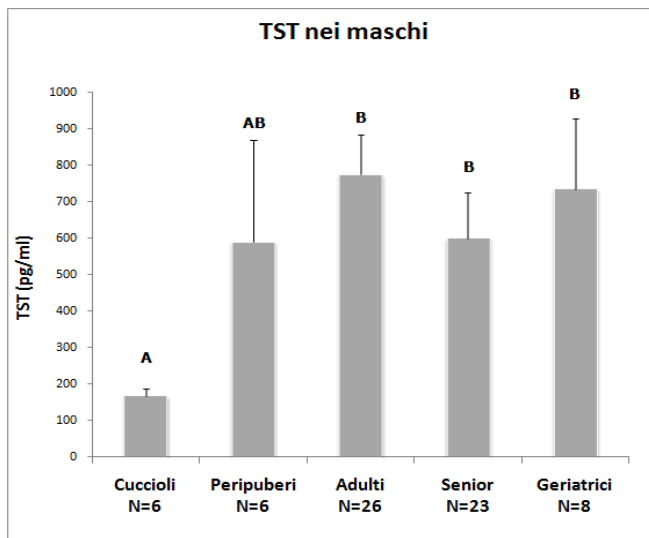
I valori del rapporto cortisolo/DHEA, analizzati in 78 femmine, sono risultati significativamente differenti nelle differenti condizioni riproduttive considerate (ANOVA:  $F = 3,33$ ;  $P = 0,041$ ), anche se il test HSD per campioni diseguali non ha poi evidenziato differenze significative tra i tre differenti gruppi (figura 16).



**Fig. 16** – Valori medi del rapporto cortisolo/DHEA nelle differenti fasi riproduttive della cagna. Nel grafico le barre verticali indicano +/- l'errore standard. *Post-hoc* HSD per campioni diseguali.

#### 4.4 TESTOSTERONE PLASMATICO

In 69 maschi della popolazione (figura 17), per i quali il volume di matrice a disposizione lo ha consentito, è stato effettuato il dosaggio del testosterone plasmatico e l'analisi statistica ha permesso di evidenziare differenze significative tra i gruppi d'età considerati ( $F = 2,74$ ;  $P = 0,04$ ).



**Fig. 17** – Concentrazioni plasmatiche medie di testosterone (pg/ml) in maschi di gruppi d'età differenti. Le barre verticali indicano +/- l'errore standard. Lettere maiuscole diverse indicano livelli significativamente differenti di testosterone all'interno del genere maschile (*post-hoc* HSD per campioni diseguali,  $P < 0,05$ ).

## 5. DISCUSSIONE

Essendo il cane un animale modello utilizzato in studi riguardanti l'invecchiamento ed in particolare quelli inerenti il declino neurologico associato a demenza, è sembrato interessante valutare se quanto emerso nell'uomo trovasse riscontro nella specie canina.

Numerosi sono i lavori che indagano il ruolo di cortisolo e DHEA nell'uomo, facendo riferimento in particolare al processo d'invecchiamento e ad alcune patologie correlate all'età (Ferrari *et al.*, 2001b; Tchernof e Labrie, 2004; Haren *et al.*, 2007).

Il principale interrogativo al quale si è cercato di dare una risposta con il presente lavoro di tesi è se l'invecchiamento, anche nel cane, sia associato ad alterazioni dei livelli plasmatici dei suddetti steroidi. Infatti, anche se numerosi sono gli studi riguardanti il cortisolo e non mancano dati inerenti il DHEA nel cane, non vi sono tuttavia in letteratura, lavori che descrivano l'andamento di questi ormoni al variare dell'età del cane.

Mancano inoltre studi che chiariscano se e come le loro concentrazioni plasmatiche varino durante il ciclo riproduttivo della cagna o in seguito a gonadectomia.

Poiché il presente studio ha cercato di colmare questa lacuna, esso rappresenta un elemento di novità nella ricerca scientifica.

### 5.1 DHEA

Con questo lavoro di tesi si è dimostrato che nella specie canina, genere, condizione riproduttiva e gonadectomia influenzano le concentrazioni plasmatiche di DHEA. I livelli di questo steroide, contrariamente a quanto si osserva nella specie umana, non sembrano invece essere influenzati dal progredire dell'età.

Prima di discutere i risultati della presente ricerca, appare doveroso dare una spiegazione in merito alla scelta, effettuata in questo studio, di valutare i livelli ematici di DHEA e non di DHEAS nel cane.

Da un lavoro precedente a questo studio e non ancora pubblicato è emerso che nel cane lo steroide maggiormente concentrato è il DHEA e non il DHEAS. La forma solfatata dello steroide risulta essere circa il 72% della forma non solfatata, percentuale compatibile con quella riferita dal lavoro di Feher e collaboratori (1977).

Nonostante nella specie umana sia il DHEAS e non il DHEA, lo steroide con la maggiore concentrazione ematica, esistono in natura altre specie animali oltre al cane,

che evidenziano una maggiore concentrazione periferica di DHEA rispetto a quella di DHEAS. Tra queste ultime quella bovina, come riferito nel lavoro di Marinelli e collaboratori (2007a) e quella ovina come riportato da Feher e collaboratori (1977).

Essendosi dimostrata la forma prevalente nella specie canina, nel presente lavoro si è stabilito di valutare solamente la forma desolfatata dello steroide (DHEA).

Una breve considerazione va effettuata anche relativamente alle concentrazioni plasmatiche dello steroide DHEA, determinate in questo studio.

I valori plasmatici di DHEA misurati in questo lavoro di tesi si discostano infatti da quelli presentati in alcuni lavori scientifici, i quali riferiscono concentrazioni superiori per lo steroide in questione nella specie canina (Frank *et al.*, 2003; Queiroga *et al.*, 2005; Rosado *et al.*, 2010).

E' bene sottolineare però che negli studi citati la concentrazione dello steroide è stata valutata in alcuni casi attraverso RIA ed in altri mediante metodi immunoenzimatici autoprodotti, quale l'EIA, in cui l'anticorpo utilizzato per la quantificazione dello steroide risulta covalentemente legato ad un enzima. In quest'ultimo caso il complesso anticorpo-steroidi che viene a formarsi è quantificato misurando l'attività enzimatica.

Le differenti quantità osservate potrebbero conseguentemente essere imputabili non soltanto alle diverse metodiche impiegate, ma anche al tipo di anticorpo utilizzato e alle sue caratteristiche di cross-reattività, non sempre riportate nei suddetti studi.

E' pur vero che in altri studi, i valori plasmatici descritti per lo steroide DHEA risultano molto simili a quelli riportati in questa tesi, variando da  $553 \pm 105$  a  $2338 \pm 647$  pg/ml (media  $\pm$  errore standard) nel lavoro di Tremblay e Belanger (1984) e da 450 a 2500 pg/ml in quello di Mialot e collaboratori (1988).

### **5.1.1 EFFETTO DEL GENERE**

I risultati di questa tesi di dottorato evidenziano che le concentrazioni plasmatiche di DHEA presentano dimorfismo sessuale nella specie canina.

Fatta eccezione per i cuccioli, dove i due generi non divergono, negli altri gruppi d'età analizzati, maschi e femmine presentano significative differenze nei valori ormonali di DHEA. Nella cagna, i livelli di questo ormone risultano essere approssimativamente il 25 - 50% di quelli osservati nel maschio.

Questo risultato trova riscontro nel lavoro di Frank (2003) che, nonostante abbia analizzato la forma solfatata dello steroide e non quella desolfata, riferisce comunque concentrazioni ormonali più elevate nei maschi rispetto alle femmine. Una conferma

più recente giunge dal lavoro di Rosado e collaboratori (2010) che, con lo scopo di approfondire le basi biologiche del fenomeno dell'aggressione nella specie canina, valuta nei due generi alcuni parametri ematici, trovando nei maschi concentrazioni plasmatiche di DHEA superiori alle femmine.

La specie canina non costituisce da questo punto di vista un'eccezione nel regno animale, in quanto differenze analoghe legate al genere nelle concentrazioni plasmatiche di DHEA sono descritte anche nella specie umana (Orentreich *et al.*, 1984; Carlström *et al.*, 1988; Sulcovà *et al.*, 1997) e nel criceto (*Mesocricetus auratus*) (Pieper e Labocki, 2008), supportando quanto emerge da questo lavoro di ricerca. Pattison e collaboratori (2007) riferiscono invece che, nelle scimmie del Nuovo Mondo (*Callithrix jacchus*), sono le femmine adulte a possedere concentrazioni di DHEA maggiori rispetto ai maschi adulti.

Se il meccanismo responsabile di una più accentuata produzione di DHEA nell'uomo rispetto alla donna rimane ancora poco chiaro, nel cane è possibile ipotizzare che la differenza tra i due generi possa essere imputata ad un importante contributo testicolare.

Quest'ipotesi è supportata da alcuni studi che riferiscono una notevole diminuzione dei valori plasmatici di DHEA(S) nel cane in seguito ad orchietomia (Tremblay e Belanger, 1984; Lacoste *et al.*, 1989; Frank *et al.*, 2003).

### **5.1.2 EFFETTO DELL'ETA'**

Dal presente studio si deduce che nei cani appartenenti al genere maschile si verifica un significativo incremento della concentrazione plasmatica di DHEA durante la transizione dalla vita prepubere a quella adulta. Negli animali del gruppo peripubere la concentrazione plasmatica media di DHEA risulta infatti incrementata del 66% rispetto a quella osservata nei cuccioli.

Anche questo incremento sembra supportare la precedente ipotesi di un importante contributo testicolare alla concentrazione periferica di DHEA, essendo tale aumento evidente nel maschio, ma assente nella femmina ( $109,27 \pm 13,59$  pg/ml nei cuccioli verso  $151,64 \pm 25,10$  nelle cagne in età peripubere).

Dai risultati ottenuti si può desumere che le concentrazioni plasmatiche di DHEA si diversifichino nei due generi in corrispondenza della comparsa della pubertà, e che la differenza tra i due generi venga poi mantenuta nel corso dell'età adulta.

Un incremento nei livelli di DHEA durante il periodo puberale ed il raggiungimento di un *plateau* in età post-pubere è stato descritto anche da Mialot e collaboratori (1988)

che hanno effettuato uno studio longitudinale in cani maschi d'età però non superiore all'anno.

L'aumento della concentrazione di DHEA associato a maturazione sessuale nella specie canina è stato descritto anche da Cutler e colleghi (1978) e da Schiebinger e collaboratori (1981a). Questo secondo autore ha evidenziato oltre ad un aumento di DHEA plasmatico in cani maschi in età postpubere (rispetto a quelli in fase prepubere), anche la presenza nel cane di cambiamenti nella zona reticolare surrenale simili a quelli descritti nel surrene umano durante l'adrenarca.

Dal presente studio è inoltre emerso che in maschi e femmine adulti della specie canina il DHEA non diminuisce al progredire dell'età, come avviene invece per l'uomo e gli altri Primati (Conley *et al.*, 2004). Nell'uomo questa diminuzione è ipotizzata dipendere da una riduzione nel numero delle cellule funzionali nella zona reticolare, una riduzione della sensibilità all'ACTH di queste cellule, una diminuzione dell'attività della 17,20 - liasi oppure una diminuzione dello spessore della zona reticolare stessa (Conley *et al.*, 2004). E' pur vero però che gli uomini e gli altri Primati sono indicati in letteratura come le uniche specie animali a possedere ghiandole surrenali in grado di secernere cospicue quantità di DHEA(S) (Labrie *et al.*, 1997b; Conley *et al.*, 2004), mentre studi *in vitro* condotti su cellule surrenali di cavie (Hyatt *et al.*, 1983), bovini (Kramer *et al.*, 1983) e ratti (van Weerden *et al.*, 1992) hanno dimostrato che la conversione di precursori progestinici triziati in steroidi a 19 carboni appare particolarmente bassa. Parker e collaboratori (1983) hanno dimostrato che le cellule surrenali ottenute dalla specie canina sono sì in grado di secernere DHEA in risposta ad ACTH, ma in quantità esigue.

Nel cane maschio pertanto, il contributo da parte del surrene alle concentrazioni plasmatiche di DHEA, pur essendo presente (dal momento che l'ormone è quantificabile a livello ematico anche nei cuccioli), sembra di fatto essere inferiore all'apporto derivante dalle gonadi.

Il maggior contributo gonadico alla concentrazione plasmatica di DHEA contribuisce probabilmente a non evidenziare nel cane quel decremento dei livelli di questo steroide che risulta invece decisamente evidente nell'uomo e nei Primati con l'invecchiamento. L'analisi del testosterone, condotta in questo studio in 69 maschi interi, supporta quanto appena affermato mostrando un andamento analogo a quello del DHEA nella popolazione maschile.

L'ipotesi di poter evidenziare un decremento dei valori dello steroide con l'invecchiamento nelle femmine sottoposte a gonadectomia non ha trovato conferma in questo studio. Da questo lavoro di tesi si evince infatti che l'età non influenza le



concentrazioni plasmatiche di DHEA neppure nelle femmine ovariectomizzate, dove le concentrazioni plasmatiche dello steroide sono presumibilmente di derivazione prevalentemente surrenale, anche se fonti ectopiche di DHEA non possono essere escluse.

E' bene però sottolineare che tale risultato non può essere considerato una prova definitiva in quanto il campione di femmine ovariectomizzate (N=25) utilizzate in questa indagine è esiguo, in particolare se si considera la variabilità cui le concentrazioni plasmatiche di DHEA sono soggette (Rosenfeld *et al.*, 1975; Lejeune-Lenain *et al.*, 1987; Marinelli *et al.*, 2007a).

### **5.1.3 EFFETTO DELLA CONDIZIONE RIPRODUTTIVA**

La concentrazione plasmatica di DHEA è risultata essere influenzata dalla condizione riproduttiva della cagna.

Dal confronto dei valori medi di DHEA nelle tre diverse condizioni riproduttive considerate, la fase anestrale è risultata essere caratterizzata da concentrazioni plasmatiche di DHEA significativamente inferiori rispetto a quelle riscontrate nelle fasi follicolare e luteinica (rispettivamente:  $78,57 \pm 5,98$ ;  $120,99 \pm 8,69$  e  $121,58 \pm 13,64$  pg/ml).

I risultati di questo lavoro sono confermati nel cane dal lavoro di Marinelli e collaboratori (2007b), che riferisce un significativo effetto della condizione riproduttiva sui livelli plasmatici di DHEA.

La maggiore concentrazione periferica di DHEA osservata nelle fasi follicolare e luteinica rispetto alla fase anestrale può essere spiegata dal fatto che in queste fasi oltre al contributo di origine surrenale è presente anche un contributo di derivazione ovarica. Durante la fase anestrale invece, caratterizzata dall'assenza di evidente attività ovarica, il DHEA presente a livello periferico origina prevalentemente dal surrene. A supporto di quanto appena evidenziato nelle femmine ovariectomizzate, i livelli plasmatici di DHEA sono risultati significativamente inferiori rispetto a quelli rilevati nelle femmine intere.

La maggiore concentrazione di DHEA osservata nella fase follicolare potrebbe essere finalizzata a supportare la produzione ovarica di estrogeni caratteristica di questa fase.

## **5.2 CORTISOLO**

In questo lavoro di tesi è emerso che nella specie canina, età, condizione riproduttiva e gonadectomia non influenzano i livelli basali di cortisolo plasmatico.

### **5.2.1 EFFETTO DEL GENERE**

Una significativa differenza tra maschi e femmine è emersa nel gruppo degli adulti, dove i maschi presentano concentrazioni di cortisolo superiori alle femmine.

Dare una spiegazione a questo risultato risulta difficile soprattutto alla luce dei lavori presenti in letteratura. Come riferito nella parte introduttiva di questa tesi, la maggior parte dei lavori non evidenzia differenze nella cortisolemia basale tra i due generi, non solo quando questa viene determinata a livello plasmatico, ma anche quando misurata nella saliva, nelle urine o in una matrice alternativa quale il pelo (Reimers *et al.*, 1990; Hennessy *et al.*, 1997; Beerda *et al.*, 1999; Frank *et al.*, 2003; Stephen e Ledger, 2006; Bennett e Hayssen, 2010).

Un risultato inatteso non è dunque l'assenza di differenza tra maschi e femmine negli altri gruppi d'età, quanto piuttosto la differenza emersa nel gruppo degli adulti ed il fatto che siano i maschi a presentare i valori maggiori. Solitamente infatti in condizioni basali non vengono riscontrate differenze tra i due generi (Garnier *et al.*, 1990; Beerda *et al.*, 1999; Frank *et al.*, 2003).

A questo proposito è bene sottolineare che la popolazione di cani esaminata in questo studio include cani ospitati in canile o residenti in allevamenti. Da alcuni studi è emerso che i cani che vivono con altri conspecifici hanno concentrazioni basali di cortisolemia più elevate rispetto a quelli che vivono in assenza di altri cani (Dreschel e Granger, 2005; Bennet ed Hayssen, 2010). E' quindi possibile avanzare l'ipotesi che condizioni di vita differenti, quali per esempio la permanenza in canile o la convivenza con altri conspecifici possano aver inciso sulle concentrazioni plasmatiche di cortisolo contribuendo a generare un risultato differente da quello più frequentemente evidenziato nella letteratura scientifica.

### **5.2.2 EFFETTO DELL'ETA'**

In entrambi i generi, i cinque gruppi d'età considerati non hanno rivelato concentrazioni plasmatiche di cortisolo significativamente differenti tra loro.

Sulla base di quanto ribadito nell'introduzione, ci si sarebbe aspettato di poter evidenziare un incremento della cortisolemia basale nei cani più anziani in accordo con lo studio di Rothuizen (1993), uno dei più approfonditi sull'argomento. E' bene comunque sottolineare che in letteratura esiste parecchio disaccordo.

Alcuni studi effettuati nel cane non riferiscono variazioni in relazione all'età nella cortisolemia plasmatica basale (Chen *et al.*, 1978; Reimers *et al.*, 1990), mentre altri evidenziano come l'età influenzi tale parametro (Rothuizen *et al.*, 1993; Goy-Thollot *et al.*, 2007).

A supporto dei risultati di questo lavoro di tesi, nessuna relazione tra età e concentrazioni di cortisolo urinario è stata identificata nel lavoro di Stephen e Ledger (2006) ed in quello più recente di Bennet ed Hayssen (2010), che analizzano l'effetto dell'età sui livelli di cortisolo valutati nella saliva e nel pelo della specie canina.

Nonostante le concentrazioni di cortisolo riscontrate in questo lavoro siano paragonabili a quelle riferite in letteratura (Frank *et al.*, 2003; Rosado *et al.*, 2010), il risultato del presente lavoro non consente tuttavia di giungere ad una conclusione definitiva, escludendo a priori l'esistenza di un incremento della cortisolemia associato all'invecchiamento. La notevole variabilità che caratterizza i livelli periferici di cortisolo (Kemppainen e Sartin, 1984; Castillo *et al.*, 2009) e la presenza di condizioni di vita differenti costituiscono sicuramente un limite del presente lavoro. Uno studio di tipo longitudinale potrebbe costituire a tal proposito una valida alternativa.

### **5.2.3 EFFETTO DELLA CONDIZIONE RIPRODUTTIVA**

Da questo lavoro è emerso che le concentrazioni basali di cortisolo plasmatico non differiscono nelle varie condizioni riproduttive considerate.

Questo risultato è in accordo con lo studio di Reimers (1990) che ha indagato l'effetto della condizione riproduttiva sui livelli plasmatici basali di cortisolo nella cagna. Dai dati presenti in letteratura, variazioni significative dei livelli di cortisolo ematico riguardano infatti soprattutto il periodo immediatamente precedente il parto, il quale è caratterizzato nella cagna, così come in altre specie animali, da valori significativamente superiori di cortisolemia (Concannon *et al.*, 1978; Veronesi *et al.*, 2002).

Dal presente studio si evince inoltre che cagne intere ed ovariectomizzate presentano livelli plasmatici di cortisolo simili, risultato questo che trova riscontro positivo nel lavoro di Frank (2003).

### 5.3 RAPPORTO CORTISOLO/DHEA

Il rapporto cortisolo/DHEA, pur non fornendo ulteriori informazioni rispetto a quelle già evidenziate con l'analisi delle concentrazioni plasmatiche di DHEA, ha contribuito a confermarne l'andamento.

Una delle ipotesi previste dal presente lavoro era quella di determinare il rapporto cortisolo/DHEA nella specie canina per valutare se l'andamento di questo rapporto consentisse di stabilire degli intervalli o *range* di valori sulla base dei quali poter classificare i cani in base all'età biologica, stabilendo in questo modo un criterio oggettivo per determinare il reale grado d'invecchiamento del cane. Purtroppo questo lavoro di tesi non è riuscito a raggiungere questo obiettivo in quanto l'età sembra non influenzare il valore di tale rapporto nella specie canina, né in soggetti interi né in quelli sottoposti a gonadectomia.

Genere e gonadectomia influenzano i valori relativi a questo rapporto. Per quanto riguarda l'effetto della condizione riproduttiva sul rapporto cortisolo/DHEA, l'analisi eseguita non consente di arrivare a stabilire con certezza se tale rapporto sia influenzato o meno dalla particolare condizione riproduttiva, questo perché purtroppo il risultato fornito dal test ANOVA è al limite della significatività tanto da non essere successivamente confermato dal test *post hoc*. La scarsa numerosità delle fasi anestrane, follicolare e luteinica costituisce sicuramente il limite maggiore.

Il risultato che appare di maggior interesse è la differenza emersa tra femmine intere e ovariectomizzate. E' possibile a tal proposito effettuare qualche speculazione inerente il processo di declino cognitivo correlato all'età, che può essere osservato anche nel cane, oltre che nell'uomo. In un loro studio Ferrari e collaboratori (2001) riferiscono infatti che il valore assunto dal rapporto cortisolo/DHEAS risulta incrementato nella popolazione anziana rispetto ai giovani e, ancor più, se gli anziani sono affetti da demenza. Sulla base dell'opposto ruolo che i due ormoni esercitano a livello cerebrale, gli autori sostengono che lo squilibrio tra glucocorticoidi ed androgeni (come il DHEA) potrebbe avere effetti negativi sulla funzionalità della regione ippocampale, che svolge un ruolo importante in processi quali l'apprendimento e la memoria (Ferrari *et al.*, 2001a). A questo proposito lo studio di Azkona e colleghi (2009) riferisce come genere ed età siano variabili in grado di predire la comparsa di segni di compromissione cognitiva nella popolazione canina anziana. Non solo, gli autori riferiscono le femmine e i soggetti sottoposti a gonadectomia come significativamente più affetti da compromissione cognitiva rispetto a maschi e soggetti

interi. Alla conclusione che cani maschi interi sono meno propensi a sviluppare declino cognitivo rispetto ai cani orchiettomizzati giunge anche Hart, in un suo lavoro del 2001.

Sebbene attraverso lo studio svolto in questa tesi non si possa giungere ad alcuna conclusione definitiva, si deve prendere in considerazione il fatto che il più elevato valore assunto dal rapporto cortisolo/DHEA nei soggetti di genere femminile ed in quelli sottoposti a gonadectomia potrebbe essere in qualche modo implicato nello sviluppo del declino cognitivo della popolazione canina.

L'ovariectomizzazione, pratica ampiamente diffusa per il controllo della popolazione canina e per motivi medici, potrebbe di conseguenza avere importanti ripercussioni sulla qualità dell'invecchiamento nella specie canina.



## 6. INTRODUZIONE

Come più ampiamente trattato nella prima parte di questa tesi di dottorato, esistono numerose evidenze che supportano come l'invecchiamento fisiologico alteri i sistemi coinvolti nella risposta neuroendocrina allo stress, giustificando la diminuita capacità di far fronte a tale situazione nel soggetto anziano (Reul *et al.*, 1991; Rothuizen *et al.*, 1993; Aguilera *et al.*, 2010).

In questa seconda parte del lavoro, campioni di saliva sono stati raccolti da cani di proprietà sani, adulti ed anziani, prima e dopo essere stati sottoposti a condizioni di blando stress psicosociale, rappresentate da test comportamentali quali lo *strange situation test* (SST), un test di attenzione sociale (AS) ed un test cognitivo di apprendimento spaziale (TC).

Gli *stressors* sociali e psicologici sono gli stimoli naturali noti per essere tra i più efficaci nel generare l'attivazione del sistema IIS (Mason, 1968). Alcuni *stressors* in grado di attivare la risposta di quest'asse includono l'esposizione a condizioni ambientali nuove o percepite come pericolose (Ader e Friedman, 1967; Beerda *et al.*, 1998), la separazione da oggetti fonte di attaccamento (Hennessy, 1997) e la mancanza o perdita di controllo sull'ambiente circostante.

Nel cane, nuove condizioni ambientali e/o la separazione dalla figura sociale di attaccamento sono senza dubbio eventi stressanti (Hennessy, 1997; Coppola *et al.*, 2006). Per il cane familiare inoltre, l'uomo è divenuto sicuramente la figura sociale più importante (Coppola *et al.*, 2006).

Con l'obiettivo di individuare se l'invecchiamento influenzi la risposta a blandi stress di natura psicologica e sociale nel cane, in questo lavoro di tesi, cani adulti ed anziani sono stati sottoposti a tre differenti test comportamentali, che possono rappresentare per l'animale situazioni di stress psicologico.

La risposta allo stress applicato è stata quindi valutata attraverso l'analisi della cortisolemia salivare, metodo poco invasivo e sempre più frequentemente utilizzato per la determinazione dei livelli di cortisolo in questa specie (Coppola *et al.*, 2006).

## **6.1 TEST COMPORTAMENTALI DI BLANDO STRESS PSICOSOCIALE**

### **6.1.1 *STRANGE SITUATION TEST***

Lo SST elaborato da Ainsworth (1969) è uno dei più importanti approcci metodologici utilizzati per valutare l'attaccamento di un infante alla figura materna. Il termine "attaccamento" fa riferimento ad una speciale relazione affettiva che si instaura tra due individui e che in generale è destinata a perdurare nel tempo (Cohen, 1974). Il legame esistente è basato sulla dipendenza degli individui coinvolti e si esprime attraverso comportamenti di reciproca preferenza (Wickler, 1976).

L'utilizzo di questa procedura è stato esteso ad alcune specie animali e viene attualmente impiegato nella ricerca etologica.

Topál e collaboratori (1998) sono stati i primi ad utilizzare una versione modificata dello SST proposto da Ainsworth per valutare l'esistenza dell'attaccamento del cane al proprietario, partendo dal presupposto che tale comportamento diventa maggiormente manifesto in condizioni percepite dall'animale come stressanti, quali per esempio un ambiente sconosciuto. Le "*strange situations*" elaborate da Topál e collaboratori (1998) altro non sono infatti che degli episodi di separazione dalla figura di attaccamento (il proprietario) cui fanno seguito episodi di riunione alla stessa.

Nel suo studio, Topál dimostra che effettivamente il cane utilizza il proprietario come una "base sicura", mostrando nei suoi confronti le manifestazioni comportamentali tipiche dell'attaccamento.

E' sembrato pertanto utile ai fini di questo lavoro di tesi utilizzare una versione modificata dello SST di Topál per verificare se cani adulti ed anziani rispondano in diversa maniera allo stress psicosociale rappresentato dalla separazione dalla figura di riferimento (il proprietario). Ciò soprattutto alla luce della incrementata suscettibilità alla separazione dal proprietario osservata nel cane anziano da Marinelli e collaboratori (2007c).

Stando agli studi presenti nella letteratura scientifica e riguardanti la specie canina (Reul *et al.*, 1991; Rothuizen *et al.*, 1993), l'ipotesi lavorativa che il presente studio intende valutare è se cani anziani ed adulti presentino una diversa risposta cortesolemica allo stress applicato. La situazione creata, pur essendo di blando stress, presenta quelle caratteristiche di "imprevedibilità" ed "incontrollabilità" in generale sufficienti a generare l'attivazione dell'asse IIS, anche se tale condizione non è mai stata rilevata direttamente sinora.



### **6.1.2 TEST DI ATTENZIONE SOCIALE**

I cani familiari vivono in gruppi interspecifici dove gli uomini sono numericamente preponderanti. L'integrazione nella società umana richiede conseguentemente che i cani presentino attitudini sociali che implicano un elevato livello di attenzione nei confronti dell'uomo (Mongillo *et al.*, 2010): ciò consente loro non soltanto di garantirsi le cure e le risorse di cui necessitano, ma anche di acquisire nuove informazioni sull'ambiente circostante utilizzandole a proprio vantaggio (Pongracz *et al.*, 2005).

Recentemente a questo proposito Mongillo e collaboratori (2010) hanno sviluppato e validato un nuovo test comportamentale volto a caratterizzare il livello e le caratteristiche di attenzione spontanea espresse dal cane in un contesto sociale interspecifico. Attraverso questo test, che valuta l'attenzione del cane nei confronti di stimoli sociali in competizione tra loro, gli autori hanno dimostrato che l'età del cane è un fattore che influisce sulla capacità di attenzione dell'animale. Essi hanno quindi proposto che il cane anziano abbia una inferiore capacità di discriminare elementi socialmente rilevanti rispetto al cane adulto ed una delle conclusioni cui sono giunti è che le scarse prestazioni degli animali anziani potrebbero riflettere una compromissione età-correlata nei meccanismi neurofisiologici che sono coinvolti nell'attenzione (Mongillo *et al.*, 2010).

Uno degli obiettivi del presente lavoro di tesi è stato quindi quello di verificare se in cani adulti ed anziani sottoposti al test validato da Mongillo e colleghi (2010) sia presente una differente risposta cortisolemica al test.

Partendo infatti dal presupposto che l'animale anziano presenta maggiore difficoltà nell'esecuzione del test rispetto all'animale adulto, questo studio si prefigge di valutare se il compito determini conseguentemente anche una differente attivazione dell'asse IIS nel cane anziano.

### **6.1.3 TEST COGNITIVO**

L'introduzione dell'uso del labirinto in psicologia risale agli inizi del secolo (1901), quando Willard Small realizzò una riproduzione in miniatura del famoso labirinto di siepi di Hampton Court, vicino a Londra.

Questo strumento consente non soltanto di riprodurre in laboratorio situazioni che gli animali incontrano spesso in natura (Vallortigara, 2000), ma fornisce un utile mezzo

di investigazione delle funzioni cognitive, quali per esempio la memoria spaziale, e di eventuali deficit presenti in tali funzioni.

L'effetto del test è stato indagato anche in questo caso in cani adulti ed anziani per valutare se tra i due gruppi sussista una differente risposta cortisolemica. Come per il test precedente, anche in quest'ultimo si presuppone una maggiore difficoltà da parte del cane anziano nell'eseguire il compito previsto dal test cognitivo che, conseguentemente potrebbe risultare maggiormente stressante.

## **6.2 QUANTIFICAZIONE DEL CORTISOLO IN DIFFERENTI MATRICI BIOLOGICHE NEL CANE**

L'analisi degli steroidi avviene attraverso l'utilizzo di differenti metodologie, quali il *radioimmunoassay* (RIA), l'*enzime-linked immunoabsorbent assay* (ELISA) e le tecniche cromatografiche (Hansen *et al.*, 2008; Gatti *et al.*, 2009), che consentono di quantificare quest'ultimi in diverse matrici biologiche.

Sebbene le concentrazioni di cortisolo ematico siano quelle maggiormente utilizzate per lo studio dell'attività dell'asse IIS, altre matrici biologiche quali saliva, urine, latte, feci e pelo (Mormède *et al.*, 2007) costituiscono interessanti approcci alternativi che oltre a fornire utili informazioni, consentono di evitare il disagio conseguente alla cattura, alla manipolazione e, in matrici quali latte, feci, urina e pelo, le oscillazioni ematiche dovute alla secrezione episodica dello steroide.

Le matrici che di seguito verranno trattate nello specifico sono quelle plasmatica e salivare, utilizzate per la valutazione della cortisolemia in questo studio.

### **6.2.1 CORTISOLO PLASMATICO NEL CANE**

Un ovvio vantaggio del prelievo ematico, quando effettuato con le dovute precauzioni, è che esso consente di misurare non solo i livelli di steroidi come il cortisolo, ma di ottenere informazioni relative alle concentrazioni di ACTH ed allo stato di altri parametri ematici sensibili all'effetto dello stress.

Tuttavia, anche se il plasma rimane una delle matrici più utilizzate per valutare la cortisolemia, uno dei principali problemi cui si deve far fronte quando si valutano i livelli plasmatici di cortisolo è la loro elevata variabilità. Come menzionato in precedenza nel cane sono stati descritti, ritmi ultradiani e diurni (Introduzione – I, Paragrafo 1.5.1.1).

Inoltre, i livelli di cortisolo possono risultare significativamente incrementati dalla cattura dell'animale o trattenendolo durante il prelievo nel caso di prelievi ripetuti a breve distanza.

### **6.2.2 CORTISOLO SALIVARE**

Oltre alla specie umana e a quella canina (Kobelt *et al.*, 2003; Gatti *et al.*, 2009), i glucocorticoidi sono stati misurati nella saliva in una ampia varietà di specie animali d'allevamento (Mormède *et al.*, 2007).

La saliva rappresenta infatti una matrice in grado di offrire numerosi vantaggi nella quantificazione di cortisolo.

Questa matrice offre la possibilità di una raccolta non-invasiva e relativamente priva di stress rispetto ad un prelievo ematico (Mormède *et al.*, 2007). Gli animali possono essere addestrati a tale procedura proponendola con un certo anticipo rispetto all'inizio del protocollo sperimentale vero e proprio.

La concentrazione di cortisolo salivare riflette la concentrazione circolante di cortisolo libero anziché quella circolante totale (Riad-Fahmy *et al.*, 1982) e i dati presenti nella letteratura scientifica riferiscono che le concentrazioni sieriche totali e libere di cortisolo sono strettamente correlate a quelle di cortisolo salivare (Vining *et al.*, 1983; Wood, 2009).

In campo diagnostico, le variazioni di cortisolo salivare si sono mostrate comparabili a quelle plasmatiche dopo stimolazione con ACTH e CRH, e in seguito a stress indotto da esercizio fisico (Vining *et al.*, 1983; Gozansky, 2005).

Gli ormoni possono raggiungere la saliva attraverso una varietà di meccanismi, ma per gli steroidi neutri non coniugati come il cortisolo, la via più comune è la diffusione passiva attraverso la membrana delle cellule acinari. La velocità con cui si realizza la diffusione passiva degli ormoni liberi nella saliva è circa 10 volte più elevata della velocità del flusso salivare, per cui la loro concentrazione in questa matrice risulta indipendente dal flusso salivare e le concentrazioni plasmatiche e salivari risultano per questo ben correlate (Vining *et al.*, 1983).

Esistono comunque degli svantaggi nell'utilizzo della saliva come mezzo per il dosaggio del cortisolo.

La secrezione di cortisolo nella saliva presenta le variazioni e fluttuazioni diurne che si riscontrano per questo steroide nel sangue (Hansen *et al.*, 2008).

Il dosaggio degli steroidi nella saliva può presentare problemi di tipo analitico, sia perché talvolta è difficile ricavarne dall'animale volumi sufficienti alla quantificazione dello steroide, sia perché il cortisolo nella saliva è presente in concentrazioni inferiori a quelle riscontrate nella circolazione sanguigna (Wood, 2009). Le ghiandole salivari esprimono infatti l'enzima 11 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi di tipo 2 e di conseguenza, la saliva, a differenza del plasma, possiede fino a tre volte il livello di cortisone rispetto al cortisolo (Wood, 2009).

Un ulteriore svantaggio derivante della quantificazione del cortisolo salivare è dovuto alla possibilità di contaminazione ematica, derivante da microtraumi gengivali.

## **7. SCOPO DEL LAVORO**

Alcuni studi effettuati sull'invecchiamento della specie canina descrivono un aumento non soltanto della cortisolemia basale, ma anche di quella riscontrata in risposta a stress acuti nei cani anziani rispetto a cani adulti (Reul *et al.*, 1991; Rothuizen *et al.*, 1993).

Tuttavia gli stress acuti cui vengono sottoposti i cani, adulti ed anziani, nella maggior parte dei lavori esistenti consistono nell'immobilizzazione, nella restrizione spaziale o nel sottoporre i cani a improvviso frastuono (Reul *et al.*, 1991; Beerda *et al.*, 1998). Altri ancora valutano la risposta cortisolemica in seguito a stimolazione con farmaci (Reul *et al.*, 1991).

In questo lavoro di tesi si è invece cercato di verificare se anche test comportamentali che creano situazioni di stress sociale e psicologico, siano in grado in cani di proprietà di determinare un'attivazione dell'asse IIS significativamente diversa tra anziani e adulti.

Il principale obiettivo previsto da questo studio era quello di determinare se in cani adulti ed anziani fosse evidenziabile una differente attivazione dell'asse IIS in risposta a test comportamentali, che rappresentano per il cane familiare situazioni di stress psicosociale. Altro scopo previsto da questo studio era quello di valutare se la saliva, utilizzata per l'analisi della cortisolemia, ed il prelievo salivare potessero rappresentare rispettivamente un'utile matrice biologica ed un valido metodo da utilizzare come alternativa al prelievo ematico in studi di questo tipo.



## **8. MATERIALI E METODI**

### **8.1 PROCEDURA SPERIMENTALE SEGUITA**

Per valutare l'effetto dell'età del cane in risposta a stress psicosociali, delle coppie cane-proprietario sono state invitate a svolgere dei test comportamentali di blando stress presso il laboratorio di etologia applicata, struttura facente parte del Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie dell'Università degli Studi di Padova.

Prima di sottoporre ciascuna coppia cane-proprietario ai test, ai proprietari dei cani è stato chiesto di rispondere a dei quesiti per ottenere informazioni riguardanti il segnalamento del cane e al fine di escludere patologie neurologiche e deficit sensoriali che avrebbero compromesso il risultato degli stessi test. Le informazioni riguardanti l'età sono state successivamente codificate ed utilizzate per effettuare l'analisi statistica dei dati.

I partecipanti allo studio sono stati reclutati tra studenti e personale dell'Università degli Studi di Padova ed i rispettivi cani sono stati suddivisi in 3 gruppi d'età: adulti (18 mesi - 6 anni), senior (6,1 - 10 anni) e geriatrici (> 10 anni).

I test sono stati svolti in tre diverse giornate. In un prima giornata è stato eseguito lo SST, in un secondo giorno sono stati svolti i test AS e TC ed infine in un terzo giorno ai partecipanti è stata proposta una versione modificata di entrambi i test AS e TC.

Non tutte le coppie cane-proprietario hanno partecipato a tutte e tre le giornate e a ciò è dovuta la discrepanza nel numero di cani che hanno svolto i tre diversi protocolli (primo protocollo: test SST; secondo protocollo: test AS + TC; terzo protocollo: AS-II + TC-II). Per la precisione, 35 cani hanno partecipato a tutti e tre i protocolli, 3 cani hanno partecipato solamente al secondo e al terzo protocollo sperimentale, 5 hanno preso parte soltanto allo SST e al secondo protocollo. Un cane infine ha partecipato soltanto al terzo protocollo, per un totale di 44 cani che hanno preso parte allo studio.

I campioni di saliva dei cani che hanno partecipato ai test sono stati raccolti secondo la modalità di seguito illustrata:

- per i cani che hanno partecipato al primo protocollo (test SST) sono stati eseguiti due prelievi, uno immediatamente prima del test (a 5/10 min dall'arrivo del cane al laboratorio di etologia applicata) ed uno al termine del test, a circa 30 minuti dal primo;

- per i cani che hanno partecipato al secondo protocollo (test AS e TC) sono stati eseguiti sempre due prelievi, uno immediatamente prima dell'inizio del primo test ed

uno alla fine del secondo test. AS e TC sono stati eseguiti l'uno di seguito all'altro ed il tempo intercorso tra primo e secondo prelievo è stato di circa 60 minuti;

- per i cani che hanno partecipato al terzo protocollo (test AS-II + TC-II) i due prelievi sono stati eseguiti come nel secondo protocollo, con l'unica differenza che tra primo e secondo prelievo il tempo intercorso variava dai 60 ai 90 minuti. Infatti, essendo la procedura dei due test leggermente più complessa, essa ha richiesto un tempo maggiore.

Due ulteriori prelievi di saliva (basali) a 30 minuti l'uno dall'altro ed un prelievo ematico successivo sono stati effettuati in ambiente noto ai cani, presso la dimora dei rispettivi proprietari, all'incirca agli stessi orari in cui erano stati eseguiti i test comportamentali.

Tutti i test sono stati eseguiti all'interno di una stanza di dimensioni pari a circa 5x5 m, ubicata presso il laboratorio di etologia applicata e diversamente allestita a seconda del test sottoposto all'animale.

## **8.2 RACCOLTA DEI CAMPIONI SALIVARI**

Tutti i prelievi sono stati effettuati nel periodo di tempo compreso tra gennaio ed agosto 2008.

Per ogni cane che ha partecipato a tutti e tre i protocolli sperimentali sono stati raccolti 8 campioni di saliva, per ciascun cane che ha preso parte a due dei tre protocolli ne sono stati raccolti 6, mentre dall'unico soggetto che ha partecipato solamente al terzo protocollo sono stati ottenuti 4 campioni di saliva.

I campioni di saliva, utilizzati per valutare la concentrazione di cortisolo sono stati ottenuti attraverso l'utilizzo di Salivette® (Sarstedt, UK), un dispositivo dotato di un tampone di cotone ed utilizzato per la raccolta di tale matrice anche nell'uomo.

I proprietari dei cani erano stati precedentemente istruiti a mantenere a digiuno il cane da almeno mezz'ora per evitare contaminazioni nel prelievo.

Il prelievo salivare è stato quindi effettuato consentendo al cane di masticare il tampone di cotone e/o strofinandolo sotto la lingua e all'interno della cavità orale del soggetto nello spazio tra guance e denti. La procedura è stata protratta fino ad ottenere un tampone ben inumidito, ma in generale essa non ha richiesto un tempo superiore ai 60 secondi.

Le salivette sono state quindi conservate in ghiaccio e centrifugate (2700 g per 10 min) entro 4 ore dalla raccolta ed i campioni di saliva sono stati conservati a -20 °C fino al momento delle successive analisi.



### **8.3 PRIMO PROTOCOLLO: SST**

#### **8.3.1 SOGGETTI ANALIZZATI**

Allo SST hanno partecipato 40 coppie cane-proprietario. I cani erano 24 femmine e 16 maschi, di età compresa tra 1,5 e 12 anni (media  $\pm$  DS =  $7 \pm 3,2$  anni). Il campione in studio comprendeva 12 meticci e 28 cani di razza. Le razze presenti erano le seguenti: Labrador retriever (N = 7), Pastore tedesco (N = 7), Maremmano Abruzzese (N = 2), Setter inglese (N = 2), Alaskan malamute (N = 1), border collie (N = 1), Bracco ungherese (N = 1), cane Corso (N = 1), cocker spaniel (N = 1), Golden retriever (N = 1), maltese (N = 1), Pastore australiano (N = 1), Segugio (N = 1), West Highland terrier (N = 1).

#### **8.3.2 PROCEDURA DELLO SST**

Una versione modificata dello SST di Topál e collaboratori (1998) è stata utilizzata in questo lavoro per valutare lo risposta cortisolemica indotta nel cane dal test.

La stanza presso la quale è stato effettuato il test conteneva al suo interno due sedie (una per il proprietario ed una per l'estraneo) e dei giochi per cani con i quali l'animale poteva liberamente interagire durante lo svolgimento del test.

Brevemente, lo SST consisteva di una sequenza di sette episodi durante i quali il cane poteva trovarsi all'interno di tale stanza (sconosciuta al cane) da solo, con il proprietario e/o con una persona estranea al cane (tabella 11). Il test si svolgeva complessivamente in 14 minuti e 30 secondi, essendo la durata di ciascun episodio della sequenza di 2 minuti.

<b>Episodio (durata)</b>	<b>Descrizione degli eventi</b>
Introduzione (30 sec)	Proprietario e cane entrano nella stanza.
1. Proprietario e cane (2 min)	Il proprietario si siede sulla sedia ed assume un atteggiamento passivo. Dopo 1 min e 30 sec il proprietario stimola il cane invitandolo al gioco.
2. Proprietario, estraneo e cane (2 min)	L'estraneo entra nella stanza, si siede e dopo circa 30 sec inizia a conversare con il proprietario. Dopo 1 min dal suo ingresso l'estraneo stimola il cane invitandolo al gioco. Il proprietario alla fine dell'episodio lascia la stanza cercando di non farsi notare dal cane.
3. Estraneo e cane (2 min)	Si tratta del <b>primo episodio di separazione</b> dalla figura di riferimento sociale. L'estraneo continua a giocare con il cane o lo coccola se il l'animale lo desidera. Trascorso il minuto l'estraneo interrompe il gioco, ma coccola il cane se questo lo richiede.
4. Proprietario e cane (2 min)	Si tratta del <b>primo episodio di riunione</b> . Il proprietario entra, si siede ed attende che il cane termini il rito del saluto prima di interagire con lui. L'estraneo esce cercando di non farsi notare dal cane. Alla fine di quest'episodio il proprietario si alza dalla sedia, dice al cane "rimani qui" e lascia nuovamente la stanza.
5. Cane da solo (2 min)	Si tratta del <b>secondo episodio di separazione</b> . Il cane viene lasciato solo nella stanza per l'intero episodio.
6. Estraneo e cane (2 min)	L'estraneo entra, si siede ed attende che il cane abbia terminato il rito del saluto prima di interagire con lui, giocando o coccolandolo se il cane lo richiede.
7. Proprietario e cane (2 min)	E' il <b>secondo episodio di riunione</b> . Il proprietario entra nella stanza, mentre l'estraneo la lascia. Il proprietario si siede e terminato il rito del saluto interagisce con il cane.

**Tab. 11** - Sequenza e descrizione degli episodi dello SST.

## **8.4 SECONDO PROTOCOLLO: AS + TC**

### **8.4.1 SOGGETTI ANALIZZATI**

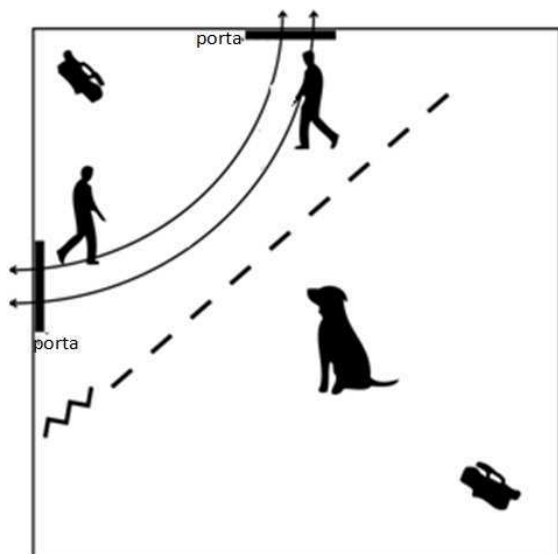
Al secondo protocollo sperimentale (AS + TC) hanno partecipato 43 coppie cane-proprietario. I cani erano 25 femmine e 18 maschi, di età compresa tra 1,5 e 12 anni (media  $\pm$  DS =  $7 \pm 3,2$  anni). Il campione in studio comprendeva 14 meticci e 29 cani di razza. Le razze presenti erano le seguenti: Labrador retriever (N = 7), Pastore tedesco (N = 7), border collie (N = 2), Maremmano Abruzzese (N = 2), Setter inglese (N = 2), Alaskan malamute (N = 1), Bracco ungherese (N = 1), cane Corso (N = 1), cocker spaniel (N = 1), Golden retriever (N = 1), maltese (N = 1), Pastore australiano (N = 1), Segugio (N = 1), West Highland terrier (N = 1).

### **8.4.2 PROCEDURA DEL TEST AS**

Il test AS utilizzato per questo studio è un test comportamentale sviluppato e validato da Mongillo e collaboratori (2010), presso il laboratorio di etologia applicata.

Nel caso del test di AS, la stanza sperimentale era stata allestita con una sedia posta al centro della stanza all'incirca alla stessa distanza da due porte situate in pareti adiacenti.

In breve, durante il test una persona sconosciuta al cane rimaneva seduta al centro della stanza tenendo il cane al suo fianco con un corto guinzaglio. Nel frattempo il proprietario del cane ed una seconda persona sconosciuta all'animale (estraneo) entravano ed uscivano dalla stanza attraverso le due porte adiacenti, muovendosi in direzioni opposte secondo una determinata sequenza (Mongillo *et al.*, 2010). Al termine della sequenza una tenda veniva fatta scorrere in modo simile ad un sipario non consentendo al cane di vedere le due porte. Durante tale fase, proprietario ed estraneo erano istruiti a rientrare nella stanza senza far rumore e ad uscire dalla porta opposta rispetto a quella d'ingresso. Una volta riaperto il "sipario" il cane era lasciato libero di dirigersi verso una delle due porte alla ricerca del proprietario. Il cane avrebbe potuto avvalersi dell'informazione visiva, nel qual caso si sarebbe diretto verso la porta da cui il proprietario era uscito prima della chiusura del sipario o di quella olfattiva e si sarebbe diretto all'altra porta per ritrovare il proprietario (figura 18).

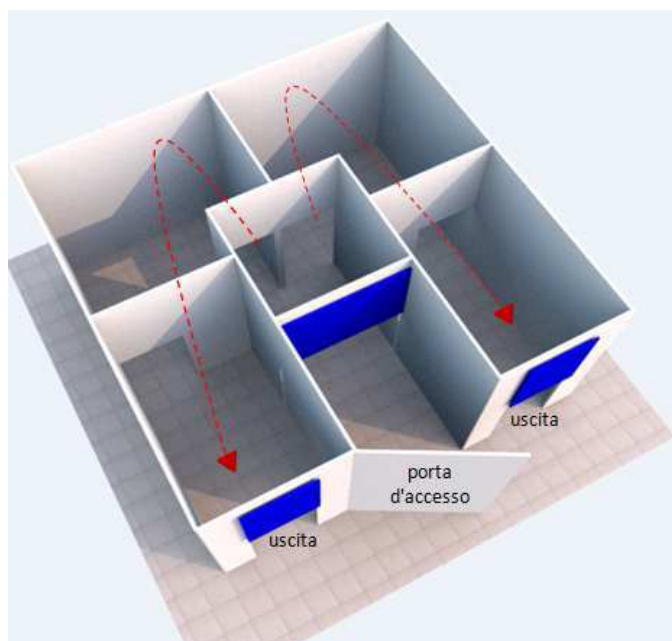


**Fig. 18** – La figura presenta in modo schematico la procedura prevista dal test di AS svolto dai cani. Le due frecce indicano il percorso effettuato dal proprietario e dalla persona sconosciuta al cane. La linea tratteggiata rappresenta la tenda, che veniva fatta scorrere in maniera simile ad un sipario alla fine del test, impedendo al cane di vedere le due porte.

### 8.4.3 PROCEDURA DEL TEST TC

Il test cognitivo di apprendimento spaziale veniva condotto all'interno della stanza sperimentale, allestita in questo caso con un apparato costituito da pannelli in plastica che creavano un percorso con struttura di un labirinto a T (figura 19).

In questo caso, il cane era impegnato in un compito di apprendimento spaziale (*spatial learning*) e, attraverso una serie di tentativi, gli veniva richiesto di imparare ad uscire dalla struttura a T scegliendo una delle due possibili vie di uscita alternative. Il compito era considerato appreso quando il cane sceglieva per tre volte consecutive sempre la stessa via d'uscita.



**Fig. 19** – La figura presenta l'apparato utilizzato per lo svolgimento del test cognitivo. Le frecce indicano le due possibili vie di uscita. Il cane poteva avvalersi di una delle due vie per uscire dal labirinto. Il compito era considerato appreso quando per tre volte consecutive veniva intrapreso sempre lo stesso percorso.

## 8.5 TERZO PROTOCOLLO: AS-II + TC-II

### 8.5.1 SOGGETTI ANALIZZATI

Al terzo protocollo (AS-II + TC-II) hanno partecipato 39 coppie cane-proprietario.

I cani erano 22 femmine e 17 maschi, di età compresa tra 1,5 e 12 anni (media  $\pm$  DS =  $7 \pm 3,2$  anni). Il campione in studio comprendeva 13 meticci e 26 cani di razza. Le razze presenti erano le seguenti: Pastore tedesco (N = 8), Labrador retriever (N = 6), border collie (N = 2), Maremmano Abruzzese (N = 2), Setter inglese (N = 2), Alaskan malamute (N = 1), cane Corso (N = 1), cocker spaniel (N = 1), Golden retriever (N = 1), maltese (N = 1), Segugio (N = 1).

### 8.5.2 PROCEDURA DEL TEST AS-II

La procedura seguita era sostanzialmente la stessa del test AS, ma a differenza di quest'ultimo, proprietario ed estraneo indossavano un cappuccio che impediva al cane di vedere la testa delle due persone (figura 20). Un'apertura velata del cappuccio consentiva a proprietario ed estraneo di vedere, mentre i loro occhi non erano visibili dall'esterno (Mongillo *et al.*, 2010).

Questa versione del test di attenzione sociale presenta un grado di difficoltà maggiore rispetto alla precedente, perché la visibilità delle caratteristiche facciali è ritenuta influenzare in modo significativo il comportamento del cane e la sua interazione con l'uomo (Mongillo *et al.*, 2010).



**Fig. 20** – Nel test AS-II proprietario ed estraneo indossavano un cappuccio che impediva al cane di vedere la testa delle due persone.

### **8.5.3 PROCEDURA DEL TC-II**

Questa prova assieme al test AS-II è stata eseguita da ciascun cane a circa due settimane di tempo dal secondo protocollo (AS + TC). Lo scopo di questo test (TC-II) era quello di stabilire se ad un intervallo di tempo sufficientemente lungo (due settimane) il cane ricordasse ciò che aveva appreso durante il test precedente (TC). Solo in caso di risposta affermativa, il soggetto ripeteva un protocollo analogo al test TC, con l'unica variante che in questo caso doveva imparare ad uscire dalla struttura a T utilizzando la via d'uscita opposta a quella appresa nel TC (*reversal learning*).

## **8.6 ANALISI RADIOIMMUNOLOGICA**

### **8.6.1 VALIDAZIONE DEL METODO PER LA QUANTIFICAZIONE DEL CORTISOLO SALIVARE**

Anche in questo caso prima di procedere alla quantificazione del cortisolo dai campioni di saliva, si è reso necessario valutare l'attendibilità del metodo di analisi RIA in questa matrice, attraverso i test di diluizione, di recupero e di ripetibilità, descritti precedentemente (Sezione Materiali e Metodi - I, Paragrafo 3.5).

Brevemente, per il test di diluizione, ad 1 ml di saliva *steroid free* sono stati aggiunti 5 ng di cortisolo standard. L'estratto contenente l'ormone standard è stato sottoposto a diluizioni seriali, aventi fattore di diluizione compreso tra 1/2 e 1/32. Le varie diluizioni sono state dispensate in doppio nella micropiastra RIA e dopo la quantificazione dello steroide si è proceduto alla determinazione dell'equazione della retta di regressione corrispondente.

Per il test di recupero ad aliquote da 1 ml ciascuna di saliva *steroid free* sono state addizionate quantità note di cortisolo standard, rispettivamente: 5; 2,5; 1,25; 0,63 e 0,16 ng/ml. Le soluzioni sono state sottoposte ad estrazione, e dopo quantificazione è stata determinata l'equazione della corrispondente retta di regressione.

Nel caso del cortisolo salivare è stata analizzata anche l'efficienza del protocollo di estrazione calcolando la resa estrattiva della procedura. Per allestire l'esperimento sono state preparate tre aliquote da 1 ml di saliva di cane contenenti 1,2,6,7-<sup>3</sup>H cortisolo a concentrazioni note e ritenute: alta (3 ng/ml), media (1,5 ng/ml) e bassa (0,75 ng/ml). Cinquanta µl di ciascuna soluzione contenente 1,2,6,7-<sup>3</sup>H cortisolo sono stati sottoposti alla procedura estrattiva con 8 ml di etere etilico, ripresi con 250 µl di tampone RIA, dispensati in doppio nella micropiastra (10 µl/pozzetto) e sottoposti al conteggio della radioattività residua dopo estrazione.

In questo caso, maggiore è la resa estrattiva, minore è la quota di ormone persa durante la procedura e maggiore la precisione della quantificazione. Per ogni concentrazione (3 e 1,5 e 0,75 ng/ml) è stata quindi valutata la percentuale media di radioattività residua sulla radioattività totale aggiunta.

### **8.6.2 QUANTIFICAZIONE DEL CORTISOLO SALIVARE E PLASMATICO**

Dopo essere stata scongelata e riportata a temperatura ambiente, un'aliquota di ciascun campione di saliva e plasma (100 e 50 µl rispettivamente) è stata sottoposta ad estrazione con etere etilico, come precedentemente descritto (Sezione Materiali e Metodi - I, Paragrafo 3.5.2).

Dopo estrazione il residuo secco di ciascun campione è stato risospeso con 0,25 o 1,6 ml di tampone RIA a seconda che la matrice fosse rispettivamente saliva o plasma. Ciascuna soluzione così ottenuta è stata dispensata in doppio (100 µl/pozzetto) nei pozzetti delle micropiastre ed il cortisolo è stato quantificato mediante analisi RIA (Sezione Materiali e Metodi - I, Paragrafo 3.5).

### **8.7 ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica è stata condotta mediante software STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Poiché i dati non risultavano distribuiti normalmente neppure dopo trasformazione, per l'analisi statistica sono stati utilizzati test non parametrici.

Le differenze tra le concentrazioni ormonali dei campioni salivari raccolti prima e dopo ciascun test, così come quelle tra i prelievi ottenuti presso la dimora del proprietario del cane (basali) e le concentrazioni dei campioni salivari raccolti prima di ciascun test comportamentale sono state analizzate mediante test di Wilcoxon per campioni dipendenti.

La correlazione tra cortisolo plasmatico e salivare è stata valutata attraverso il test non parametrico di Spearman.

I risultati dei test statistici sono stati considerati significativi quando il valore di P era inferiore allo 0,05.

Dall'analisi statistica sono stati esclusi due cani. Uno dei cani che aveva partecipato al terzo protocollo sperimentale è stato escluso in quanto nel prelievo effettuato dopo il test comportamentale (post\_test), l'esiguo volume di saliva ottenuto non ha consentito la quantificazione dello steroide, mentre un cane che aveva preso parte al secondo protocollo sperimentale è stato escluso perché presentava un valore di cortisolemia molto più elevato rispetto agli altri cani (34,50 ng/ml) nel tampone effettuato prima del protocollo sperimentale corrispondente.

Anche se i test parametrici si basano su differenze nelle mediane, anziché nei valori medi, nelle figure della successiva sezione (Risultati e Discussione - II) i risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard (ES) per maggiore chiarezza grafica.



## 9. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 9.1 VALIDAZIONE DEL METODO DI QUANTIFICAZIONE RIA DEL CORTISOLO SALIVARE

La validazione del metodo RIA per la quantificazione del cortisolo salivare è risultata soddisfacente in tutte e tre le sue componenti: test di diluizione, di recupero e di ripetibilità.

I risultati di questi test sono riportati in tabella 12: il coefficiente di correlazione ( $R^2$ ) evidenzia una ridotta dispersione dei punti ed i valori dei CV% intra- ed inter-saggio confermano la buona riproducibilità del sistema di quantificazione.

In tabella 12 sono riportati anche i risultati dei test condotti per la validazione del cortisolo plasmatico (precedentemente esposti nella sezione Risultati - I, Paragrafo 4.1).

MATRICE	TEST DI VALIDAZIONE					
	RECUPERO	$R^2$	PARALLELLISMO	$R^2$	CV% INTRA	CV% INTER
SALIVA	$y = 0,99x + 0,19$	0,99	$y = 5,22x + 0,24$	0,99	8,30	11,73
PLASMA	$y = 0,99x + 0,23$	0,99	$y = 10,17 + 0,32$	0,99	4,15	17,70

**Tab. 12** – Risultati dei test di validazione condotti per la quantificazione dello steroide cortisolo dalle matrici biologiche saliva e plasma di cane.

Per verificare l'efficienza del protocollo di estrazione del cortisolo salivare è stata inoltre effettuata una valutazione della procedura di resa estrattiva dello steroide.

Per ciascuna delle tre soluzioni di  $1,2,6,7\text{-}^3\text{H}$  cortisolo (di concentrazione rispettivamente pari a 3 ng/ml, 1,5 ng/ml e 0,75 ng/ml) sono state calcolate le percentuali medie di radioattività residua sulla radioattività totale aggiunta. La percentuale media di ogni soluzione è risultata rispettivamente pari a 92%, 85% e 77%. Poiché tale procedura presenta una resa estrattiva media dell'85%, essa indica soltanto una lieve perdita ormonale durante la fase estrattiva e di

conseguenza la sua precisione nella determinazione ormonale è stata ritenuta soddisfacente.

## 9.2 CORTISOLEMIA SALIVARE E PLASMATICA NEI CANI PARTECIPANTI AI TRE PROTOCOLLI SPERIMENTALI

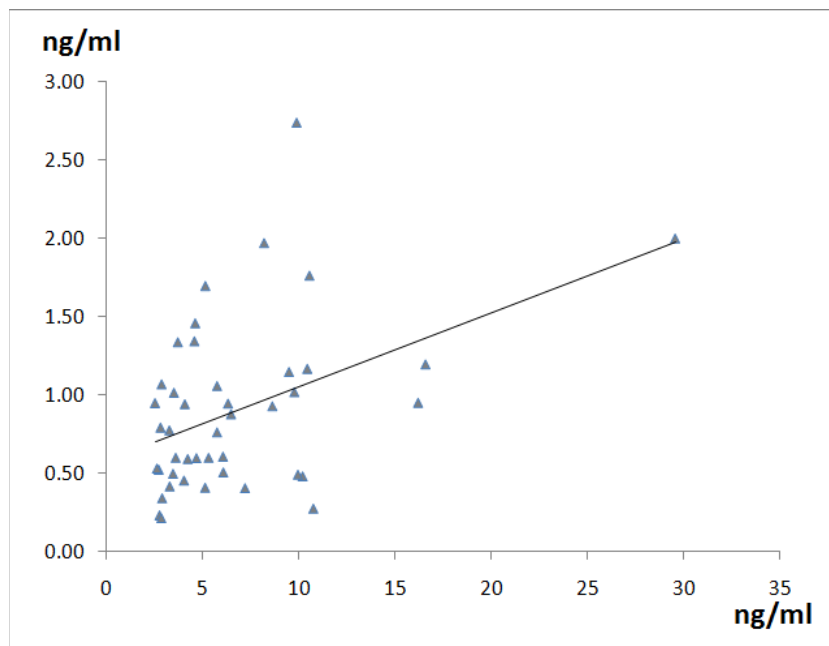
La quantificazione RIA ha consentito di determinare la concentrazione di cortisolo nei campioni di saliva e plasma canino raccolti.

Durante l'elaborazione statistica si è appurato che anche dopo opportuna trasformazione, i dati relativi alla cortisolemia salivare non presentavano una distribuzione normale. Tutte le analisi sono state pertanto condotte attraverso l'utilizzo di test non parametrici.

Innanzitutto si è proceduto a valutare se le concentrazioni di cortisolo plasmatico e quelle di cortisolo salivare fossero tra loro correlate.

Per valutare l'esistenza di tale correlazione sono stati utilizzati i valori di cortisolo ematico ed i valori medi ottenuti dai due prelievi salivari (basali) effettuati in ambiente noto ai cani.

La correlazione tra cortisolo plasmatico e salivare, valutata attraverso il test di Spearman, è risultata altamente significativa ( $R = 0,48$ ;  $P < 0,01$ ) (figura 21).



**Fig. 21** – Correlazione tra le concentrazioni di cortisolo plasmatico in ascissa (ng/ml) e quelle relative al cortisolo salivare, in ordinata.

Dai risultati ottenuti nel presente lavoro è emerso che la concentrazione di cortisolo salivare corrisponde in media al 16% di quella presente a livello plasmatico. Questo valore, anche se lievemente superiore, può comunque definirsi in accordo con i valori riferiti nella letteratura scientifica. Vincent e Michell (1992) riferiscono infatti valori di cortisolemia salivare che rappresentano il 5 – 10% dei valori stimati a livello plasmatico, mentre Beerda e collaboratori (1996) e Wenger-Riggenbach e colleghi (2010) riportano che la concentrazione di cortisolo salivare nel cane è approssimativamente un 12% di quella plasmatica.

Nel presente lavoro, l'analisi della cortisolemia è stata effettuata su di un totale di 332 campioni di saliva, dai quali è stato ottenuto un valore medio di concentrazione dello steroide pari a  $1,65 \text{ ng/ml} \pm 1,68$  (media  $\pm$  deviazione standard), con un minimo di  $0,18 \text{ ng/ml}$  ed un massimo di  $8,56 \text{ ng/ml}$ . Nello studio di Bennett e Hayssen (2010), condotto in 45 cani da compagnia, la concentrazione salivare media di cortisolo riferita è  $1,56 \text{ ng/ml} \pm 0,61$ , con un valore minimo di  $0,70 \text{ ng/ml}$  ed un valore massimo di  $3,18 \text{ ng/ml}$ . Questi valori vengono riportati a conferma della bontà della procedura utilizzata dal presente lavoro di tesi per la raccolta, per l'estrazione e la quantificazione della cortisolemia salivare.

Per quanto riguarda l'analisi statistica della cortisolemia plasmatica, il valore medio di concentrazione è risultato pari a  $6,72 \text{ ng/ml} \pm 5,03$  (media  $\pm$  deviazione standard), con un valore minimo di  $2,57 \text{ ng/ml}$  ed un valore massimo di  $29,60 \text{ ng/ml}$ . Anche in questo caso i valori ottenuti trovano riscontro con quelli riferiti nella letteratura scientifica per la specie canina (Frank et al., 2003; Goy-Thollot et al., 2006; Rosado et al., 2010).

### **9.3 VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA CORTISOLEMICA AI TRE PROTOCOLLI SPERIMENTALI**

Il test di Wilcoxon per campioni dipendenti è stato eseguito per confrontare i valori di cortisolemia salivare relativi ai campioni raccolti prima di ciascun test comportamentale (prelievo pre\_test) con i corrispondenti valori relativi ai campioni raccolti al termine di ogni test (prelievo post\_test). Ciò è stato effettuato per valutare se ciascuno dei tre diversi protocolli seguiti fosse in grado di generare una risposta cortisolemica nei cani che vi avevano partecipato.

Lo stesso test statistico è stato inoltre utilizzato per effettuare un confronto tra i valori di cortisolemia salivare relativi ai campioni raccolti in ambiente noto ai

cani (prelievo basale) con i corrispondenti valori relativi ai campioni pre\_test, raccolti presso il laboratorio di etologia applicata prima di sottoporre i cani a ciascun protocollo sperimentale.

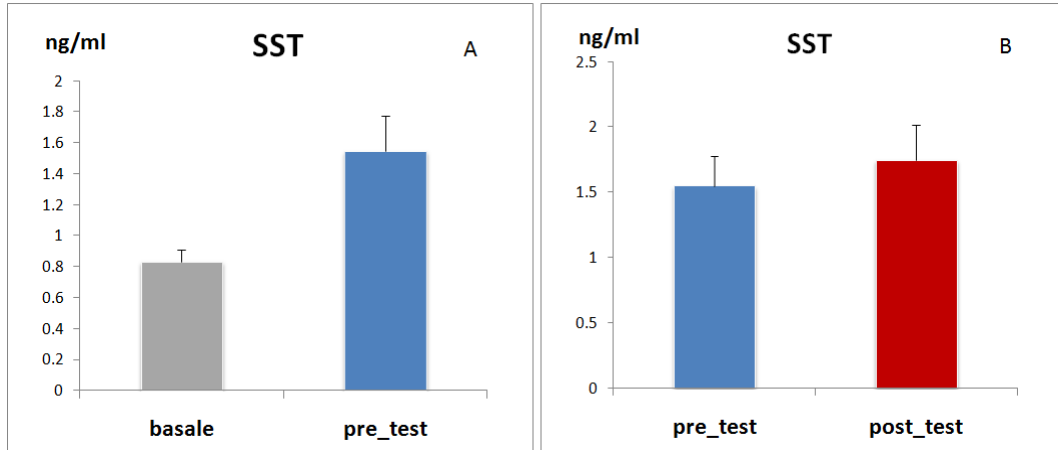
La tabella 13 riporta i risultati dei test di Wilcoxon per campioni dipendenti eseguiti per i diversi confronti analizzati.

<b>Test comportamentale</b>	N	Prelievi a confronto	Z	P
SST	40	pre_test vs post_test	0,59	0,56
		basale vs pre_test	3,28	0,001
AS + TC	42	pre_test vs post_test	1,11	0,27
		basale vs pre_test	3,01	0,003
AS - II + TC - II	38	pre_test vs post_test	1,04	0,30
		basale vs pre_test	3,42	0,001

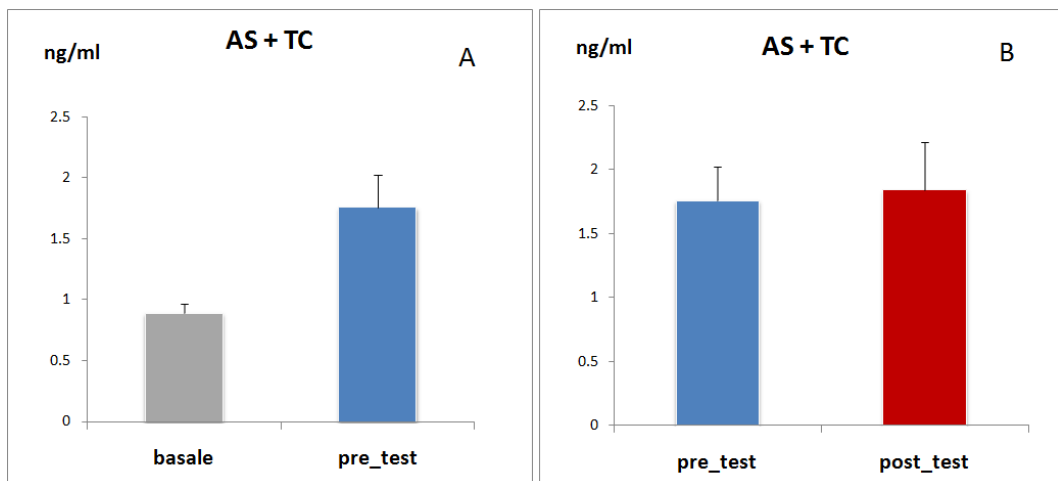
**Tab. 13** – Risultati dei test di Wilcoxon per campioni dipendenti.

Come evidenziato dalla tabella 13 e dalle figure 22, 23 e 24, le analisi statistiche eseguite evidenziano che in tutte e tre le giornate in cui i tre differenti protocolli sono stati effettuati, i cani presentavano, ancor prima di effettuare il test comportamentale, una concentrazione cortisolemica significativamente maggiore (pur rimanendo all'interno dei *range* di cortisolemia considerati fisiologici in questo animale) rispetto a quella rilevata nei prelievi basali effettuati presso la dimora dei rispettivi proprietari.

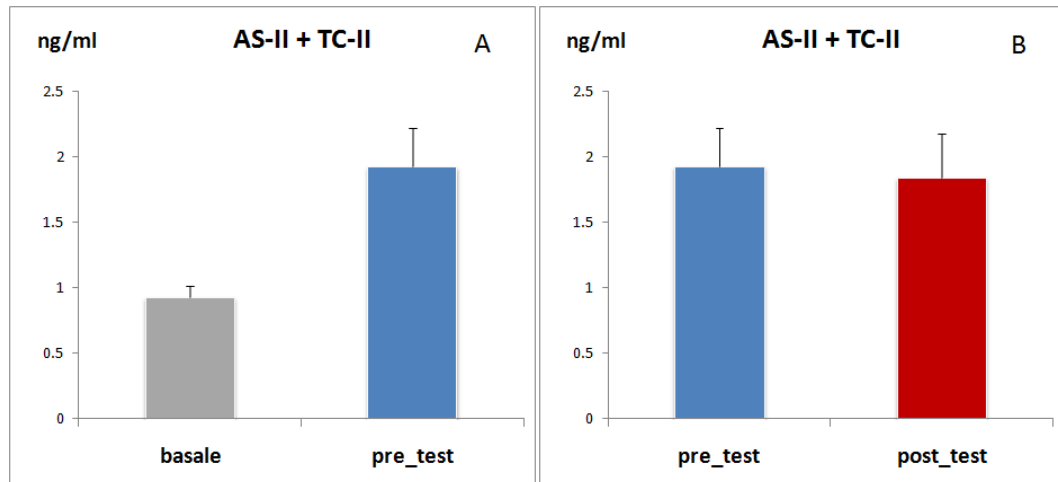
Il test di Wilcoxon per campioni dipendenti ha inoltre rivelato che i valori di cortisolo salivare relativi ai prelievi effettuati prima di ciascun test comportamentale non differivano in modo significativo da quelli relativi ai prelievi effettuati al termine del test.



**Fig. 22** – Concentrazione cortisolemica media evidenziata nei prelievi basali e nei prelievi pre\_test dello SST (A). Concentrazione cortisolemica media evidenziata nei prelievi pre\_test e post\_test dello SST (B). I valori sono espressi come media  $\pm$  errore standard.



**Fig. 23** - Concentrazione cortisolemica media evidenziata nei prelievi basali e nei prelievi pre\_test del protocollo sperimentale AS+TC (A). Concentrazione cortisolemica media evidenziata nei prelievi pre\_test e post\_test del protocollo AS+TC (B). I valori sono espressi come media  $\pm$  errore standard.



**Fig. 24** – Concentrazione cortisolemica media evidenziata nei prelievi basali e nei prelievi pre\_test del protocollo sperimentale AS-II+TC-II (A). Concentrazione cortisolemica media evidenziata nei prelievi pre\_test e post\_test del protocollo AS-II+TC-II (B). I valori sono espressi come media  $\pm$  errore standard.

Per cercare di spiegare l'aumento della cortisolemia osservata nei cani all'arrivo al laboratorio di etologia applicata, l'ipotesi che è stata avanzata è che una serie di concause e circostanze abbiano contribuito a generare la risposta osservata.

Il trasporto in auto di animali domestici e l'esposizione degli stessi ad un ambiente e a persone sconosciute sono fattori spesso riconosciuti come stressogeni. E' attendibile pensare che anche in questo caso entrambi i fattori abbiano contribuito a generare l'aumento della cortisolemia osservato nei prelievi effettuati prima dei test comportamentali.

La letteratura scientifica evidenzia infatti come il trasporto su strada o l'esposizione ad un ambiente non noto possano costituire fonte di stress per un animale (Grandin, 1997; Bergeron *et al.*, 2002; Buckham Sporer *et al.*, 2008).

Nel loro lavoro Bergeron e collaboratori (2002) affermano che il trasporto su strada (oltre che a quello aereo) è fonte di stress per i cani ed in particolar modo per quelli non abituati a viaggiare. Gli autori hanno effettuato lo studio in cani che avevano viaggiato in auto per un tragitto di 300 km. Anche se la maggior parte dei cani che hanno preso parte a questo studio non hanno percorso in auto lunghe distanze, è bene evidenziare che due cani provenivano dalle provincie di Bologna e di Belluno.

Il trasporto in auto può comunque risultare una procedura stressante per l'animale non solo per la distanza percorsa ma anche per altri fattori. Le operazioni di ingresso ed uscita dal veicolo per esempio sono state descritte

come procedure in grado di generare un aumento della frequenza cardiaca (Bergeron *et al.*, 2002). La modalità di trasporto può inoltre prevedere il confinamento dell'animale in un vano stretto con scarsa possibilità di movimento, o sottoporlo a variazioni di temperatura, inadeguata ventilazione e deprivazione di acqua (Fazio e Ferlazzo, 2003).

Naturalmente anche l'esposizione ad un ambiente non noto e a persone sconosciute possono aver contribuito alla maggiore cortisolemia osservata prima dell'inizio dei protocolli sperimentali. Anche se lo studio condotto da Wenger-Riggenbach e collaboratori (2010) riferisce che le concentrazioni di cortisolo salivare non vengono influenzate dal luogo nel quale vengono eseguiti i prelievi (casa o clinica veterinaria), la maggior parte degli studi sostiene che l'esposizione ad un ambiente sconosciuto e la presenza di estranei o persone non familiari al cane determinano un aumento dei livelli di cortisolo nel cane stesso (Grandin, 1997; Haubenhofer e Kirchengast, 2006).

L'insieme di questi fattori può aver contribuito a generare l'aumento cortisolemico osservato nel presente studio nei prelievi effettuati prima dei tre test comportamentali.

Studi futuri che prevedano la quantificazione della cortisolemia nel cane dovranno pertanto prendere in considerazione l'influenza che la concomitanza di questi eventi può avere sulla concentrazione salivare dello steroide e trovare valide strategie che consentano di superare i limiti che ne conseguono.

Una possibile soluzione per quanto riguarda lo stress eventualmente determinato dal trasporto potrebbe essere quella di effettuare un'indagine preliminare andando a valutare la cortisolemia dei cani prima e dopo un viaggio in auto e limitando l'accesso ai test comportamentali solamente ai quei soggetti che non siano risultati sensibili al trasporto. Si presume infatti che alcuni cani familiari siano abituati ad essere trasportati in auto mentre altri non lo siano affatto.

Una possibile soluzione alla stimolazione derivante da un ambiente sconosciuto potrebbe essere quella di effettuare i test di AS e TC soltanto successivamente ad una maggiore permanenza presso il laboratorio stesso. Questo tipo di strategia non potrà però essere attuata nel caso dello SST, dal momento che per lo valutare la risposta alla separazione dalla figura di riferimento sociale è fondamentale che il cane si trovi in un ambiente ad esso sconosciuto. Molto dipenderà comunque dalla disponibilità dei proprietari.

Nel presente studio, tutti e tre i test comportamentali sembrano non aver generato una risposta nei cani, dal momento che non si è verificato alcun incremento statisticamente significativo della cortisolemia nei prelievi raccolti al termine di ciascun test sperimentale.

Per ovviare a questa situazione si è deciso di verificare se tra i soggetti esaminati vi fossero alcuni cani non stimolati dagli eventi antecedenti il test comportamentale.

In ciascun protocollo sperimentale si potevano distinguere due sottogruppi di cani: uno che presentava soggetti che all'arrivo al centro non presentavano già un'attivazione dell'asse IIS, valutata rispetto alla cortisolemia del prelievo basale, ed uno in cui invece i soggetti evidenziavano una stimolazione prima ancora di essere sottoposti al protocollo sperimentale.

Il fatto che i cani presentassero un'attivazione dell'asse IIS prima di effettuare il protocollo sperimentale non ha permesso di verificare l'effetto dei test sull'intero campione di cani. Il verificarsi di questa situazione ha costituito un limite rispetto a quello che era l'obiettivo primario di questo lavoro e cioè determinare se cani adulti ed anziani reagissero in maniera differente alle condizioni di blando stress indotte dai test comportamentali.

Per identificare soggetti stimolati e non stimolati è stata determinata la percentuale di variazione di ciascun prelievo pre\_test rispetto al corrispondente prelievo basale. Tutti i cani che presentavano nel prelievo pre\_test un valore di cortisolemia non superiore del 10% rispetto al basale sono stati classificati come "non stimolati", mentre tutti gli altri sono stati classificati come "stimolati".

La tabella 14 mostra la distribuzione dei cani nei due sottogruppi e le relative percentuali delle diverse classi di età e genere presenti. Poiché i differenti gruppi d'età nelle diverse sottopopolazioni ("stimolati" e "non stimolati") non presentavano una numerosità sufficiente, non si è potuto stabilire se all'arrivo in laboratorio fossero maggiormente stimolati i cani anziani o gli adulti.



Test	NS/S	genere		gruppi d'età		
		femmine	maschi	adulti	senior	geriatrici
SST	NS (N = 14)	9 (22,5%)	5 (12,5%)	3 (7,5%)	9 (22,5%)	2 (5%)
	S (N = 26)	15 (37,5%)	11 (27,5%)	10 (25%)	11 (27,5%)	5 (12,5%)
AS + TC	NS (N = 17)	12 (28,6%)	5 (11,9%)	6 (14,3%)	8 (19,1%)	3 (7%)
	S (N = 25)	13 (30,9%)	12 (28,6%)	8 (19,1%)	13 (31%)	4 (9,5%)
AS-II+TC-II	NS (N = 14)	7 (18,4%)	7 (18,4%)	3 (7,9%)	8 (21%)	3 (7,9%)
	S (N = 24)	15 (39,5%)	9 (23,7%)	9 (23,7%)	10 (26,3%)	5 (13,2%)

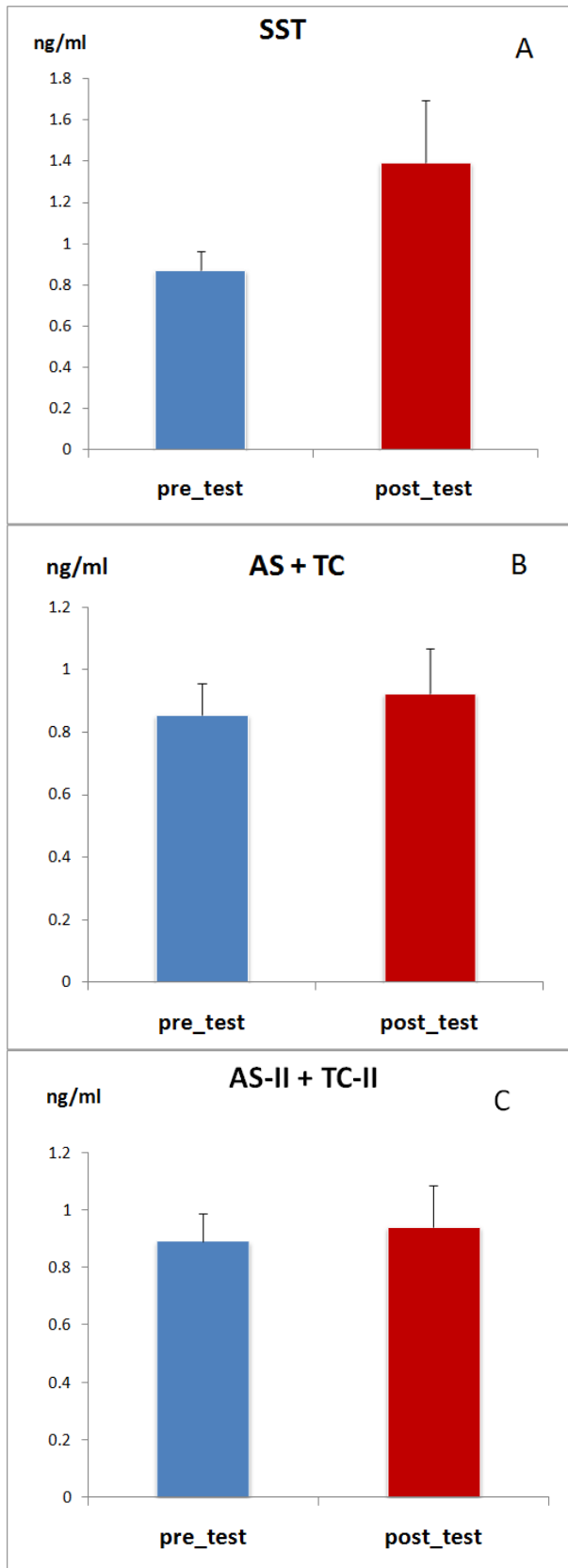
**Tab. 14** – Suddivisione dei cani che hanno partecipato a ciascun test, sulla base del fatto che essi fossero stimolati o meno prima di effettuare il test comportamentale e loro suddivisione in base a genere e gruppi d'età. NS = non stimolati prima del test comportamentale; S = stimolati.

L'analisi statistica precedentemente descritta è stata ripetuta per confrontare la cortisolemia salivare dei prelievi pre\_test con quella dei prelievi post\_test nei cani stimolati. Come atteso, nessuna differenza significativa è emersa tra i due prelievi in tutti e tre i protocolli.

Infine, si è verificato se nei cani non stimolati fosse presente una reazione al blando stress imposto dai test comportamentali. La tabella 15 e la figura 25 presentano quanto emerso.

Test comportamentale	N	Confronto	Z	P
SST	14	pre_test vs post_test	2,04	0,04
AS + TC	17	pre_test vs post_test	0,02	0,98
AS - II + TC - II	14	pre_test vs post_test	0,22	0,83

**Tab. 15** – Valutazione dell'efficacia di ciascun test comportamentale nel generare una risposta allo stress nei cani inizialmente non stimolati.



**Fig. 25** – Livelli di concentrazione di cortisolo salivare determinati nei prelievi durante i tre differenti protocolli sperimentali in cani inizialmente non stimolati. In A, la concentrazione determinata il giorno dello SST, in B e C rispettivamente quelle rilevate nei giorni dei protocolli AS + TC e AS-II + TC-II.

L'analisi eseguita ha permesso di evidenziare che lo SST è l'unico dei tre protocolli sperimentali in grado di generare una risposta nei soggetti che vi hanno preso parte. La separazione dalla figura di riferimento sociale sembra essere in grado di stimolare una risposta da parte dell'asse IIS.

Il verbo al condizionale appare in questo caso doveroso perché la probabilità emersa dal test di Wilcoxon nel confronto tra cortisolemia pre e post test è al limite della significatività.

Gli altri due protocolli invece, non hanno generato alcun tipo di risposta, dal momento che non sono emerse differenze statisticamente significative tra valori di cortisolemia misurati prima e dopo il relativo test comportamentale.

Ciò si deve molto probabilmente alla diversa natura dei due test. Lo SST è infatti in grado di indurre uno stress di tipo emozionale sociale, a differenza dei test di attenzione sociale (AS) e di apprendimento spaziale (TC) in cui lo stress eventualmente generato deriva da una condizione di tipo psicologico, ovvero dalla difficoltà richiesta per la risoluzione di un determinato compito.

Un lavoro di Denot-Ledunois e collaboratori (1998) supporta i risultati ottenuti in questo studio. Gli autori valutano gli effetti generati da una sessione di gioco ai *video games* in bambini di 9-10 anni, valutando l'effetto sulla frequenza respiratoria, quella cardiaca e sulla concentrazione salivare del cortisolo. Lo studio rivela che, come nel presente lavoro di tesi, la cortisolemia valutata immediatamente prima dell'inizio della sessione era leggermente più elevata rispetto a quella determinata al termine della stessa. A questo proposito anch'essi riferiscono come la cortisolemia misurata prima della prova sia imputabile a comuni situazioni di vita, quali trasporto o incontro con altre persone. Poiché i bambini conoscevano sia l'ambiente in cui la sessione si svolgeva sia le persone che vigilavano e monitoravano la prova l'impatto emozionale della prova è stato considerato basso. Ciò viene ulteriormente evidenziato dalla minor concentrazione di cortisolo salivare dei campioni raccolti al termine della prova rispetto a quella dei campioni pre-test. In conclusione, un compito che richiede di focalizzare l'attenzione per lo svolgimento di una prova non è necessariamente stressante se viene eliminata quella che costituisce la componente emotiva della prova.

D'altra parte lo svolgimento di un compito che presenti difficoltà crescenti può definirsi stressante soprattutto quando l'esito della prova è soggetto a valutazione e/o ad eventuale giudizio o conseguenza negativa. Nel presente studio ovviamente i cani non potevano presagire effetti negativi dei test

comportamentali cui erano sottoposti, perché nessuna conseguenza negativa era mai stata contemplata nel protocollo.

Resta da stabilire a questo proposito se la difficoltà che un cane incontra nell'effettuare un compito e/o il mancato superamento della prova possa risultare come per l'uomo un fattore stressante (Dickerson e Kemeny, 2004). Al riguardo non sembrano essere presenti studi in letteratura e la questione rimane per ora non risolta. Accorgimenti che consentano di effettuare il test in soggetti non inizialmente stimolati potrebbero permettere di rispondere a questo interrogativo.

Infine poiché nel presente studio la raccolta del prelievo salivare è stata effettuata a circa 15 min dalla fine dello SST e a 60 minuti dai prelievi dei campioni pre\_test nei protocolli AS+TC e AS-II+TC-II, si ritiene che nel presente studio non siano stati commessi errori nei tempi di raccolta della saliva (Vincent e Michell, 1992; Beerda *et al.*, 1998; Dreshel e Granger, 2005; Jones e Josephs, 2006; Horváth *et al.*, 2007).

Resta il fatto che uno degli accorgimenti da attuare in futuro sarà sicuramente quello di effettuare più prelievi a tempi diversi così da stabilire con maggiore chiarezza l'andamento delle concentrazioni di cortisolo non soltanto durante l'esecuzione del test ma anche al termine dello stesso.

## 10. CONCLUSIONI

Alla luce di quanto emerso nella letteratura scientifica, la prima parte del presente lavoro di tesi ha avuto come principale obiettivo quello di verificare se nel cane (*Canis familiaris*) il processo d'invecchiamento sia associato a modificazioni delle concentrazioni plasmatiche basali di DHEA e di cortisolo. Esso si è inoltre proposto di indagare se aspetti come genere, condizione riproduttiva e gonadectomia possano significativamente incidere sui livelli plasmatici di questi steroidi.

Lo studio ha evidenziato come nella specie canina le concentrazioni plasmatiche di DHEA siano soprattutto influenzate dal genere, dalla condizione riproduttiva e dalla presenza di gonadectomia, piuttosto che dall'invecchiamento.

In età post-pubere i livelli plasmatici di questo ormone sono risultati significativamente più elevati nei maschi rispetto alle femmine. Nelle fase follicolare e luteinica è stata evidenziata una maggiore concentrazione di DHEA a livello plasmatico, rispetto a quella rilevata nella fase anestrata, supportando la presenza di un contributo di derivazione ovarica oltre che surrenale alle concentrazioni plasmatiche di questo steroide. A supporto di quanto appena affermato è stato dimostrato che i livelli di DHEA nelle femmine ovariectomizzate sono risultati significativamente inferiori a quelli riscontrati nelle cagne intere.

Mentre nelle femmine non sono state evidenziate significative differenze tra i diversi gruppi d'età, nei maschi è stato evidenziato un significativo aumento delle concentrazioni plasmatiche di DHEA in corrispondenza della maturazione sessuale, sottolineando anche in questo caso l'importanza del contributo testicolare ai livelli plasmatici dello steroide in questione.

A differenza di quanto osservato nell'uomo nessuna diminuzione dei livelli di DHEA è stata osservata in età adulta, ed in particolare con l'invecchiamento, in soggetti interi e nelle femmine ovariectomizzate.

Quanto al cortisolo, le concentrazioni plasmatiche di questo steroide non sono risultate variare con l'invecchiamento né nei maschi, né nelle femmine e da quanto emerso il suo andamento non è risultato esser influenzato dalla presenza di gonadectomia né tantomeno variare nelle diverse condizioni riproduttive della cagna.

Il rapporto cortisolo/DHEA pur non fornendo ulteriori informazioni rispetto a quelle già evidenziate con l'analisi delle concentrazioni plasmatiche di DHEA, ha contribuito a confermarne l'andamento. Il rapporto dei due ormoni ha infatti permesso non soltanto

di ridurre la variabilità intra-soggetto dei dati, ma anche fornito un indice che descrive in maniera integrata la steroidogenesi della corteccia surrenale nel cane.

In risposta alle numerose evidenze che supportano come l'invecchiamento fisiologico alteri i sistemi coinvolti nella risposta neuroendocrina allo stress, nella seconda parte di questo lavoro di tesi si è cercato di verificare se test comportamentali che creano situazioni di stress sociale e psicologico, siano in grado di determinare una diversa attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene in cani di proprietà adulti ed anziani.

Purtroppo, nei cani reclutati è insorta un'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene antecedente allo svolgimento dei test impedendo di verificare l'ipotesi iniziale di lavoro. Il trasporto in auto e/o l'esposizione ad un nuovo ambiente e a persone sconosciute possono aver contribuito a generare l'innalzamento dei valori di cortisolemia plasmatica rispetto a quelli valutati presso la dimora dei proprietari in condizioni familiari ai cani.

Tuttavia, anche se non è stato possibile confrontare cani adulti ed anziani, questa seconda parte dello studio ha comunque permesso di evidenziare come uno stress di tipo emozionale sociale sia in grado di generare un aumento della cortisolemia, contrariamente a test di tipo psicologico.

Anche se i due ormoni DHEA e cortisolo non possono essere ritenuti informativi per quanto riguarda il grado d'invecchiamento nella specie canina, si ritiene che i risultati di questo lavoro abbiano contribuito a chiarire quale sia il loro andamento in particolari condizioni di vita del cane. Risposte definitive a questo proposito possono essere ottenute soltanto attraverso uno studio di tipo longitudinale, che valuti l'insorgere e la progressione dell'invecchiamento fisiologico nella specie canina.

Marcatori fisiologici e molecolari, quali i marcatori di stress ossidativo, attualmente indagati nel processo d'invecchiamento, potrebbero essere oggetto di ricerche future in questa specie.

Strategie alternative e provvedimenti adeguati dovrebbero essere inoltre adottati al fine di superare i limiti del presente studio, effettuando una nuova valutazione dell'effetto dei test comportamentali in soggetti anziani ed adulti, per comprendere se sia possibile rilevare una diversa attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene nelle due classi d'età.

In tutto questo naturalmente non potrà non essere presa in considerazione la grande difficoltà che si incontra nella ricerca quando si lavora con il cane.

Innanzitutto, se da un lato la notevole differenza nell'aspettativa di vita tra cani di taglia diversa rende questa specie estremamente interessante per chi intenda studiare i meccanismi biologici alla base del processo d'invecchiamento, dall'altro la notevole variabilità esistente contribuisce a rendere estremamente complessa l'interpretazione dei risultati.

In secondo luogo, nonostante lavorare a contatto di animali d'affezione come i cani sia fonte di grandi soddisfazioni, reperire campioni numericamente rilevanti, raggiungendo accordi con proprietari, medici veterinari e gestori di canili risulta spesso un'ardua impresa.

Questo tipo di ostacolo non deve tuttavia essere dissuasivo ma piuttosto costituire una valida motivazione per rafforzare le collaborazioni del mondo della ricerca con associazioni cinofile, medici veterinari, gestori di canili e privati cittadini, con vantaggi non soltanto per nostri "amici a quattro zampe" ma anche per le persone coinvolte nella loro gestione.





## 11. BIBLIOGRAFIA

**Adams B., Chan A., Callahan H., Milgram N.W.,** 2000. *The canine as a model of human cognitive aging: recent developments.* Progr Neuro-Psychoph 24, 675-692.

**Aguilera G.,** 2010. *HPA axis responsiveness to stress: Implications for healthy aging.* Exp Gerontol, 46 (2-3), 90-95.

**Ainsworth M.S.D.,** 1969. *Object relations, dependency and attachment: A theoretical review of the infant-mother relationship.* Child Dev 40, 969-1025.

**Amiel S.A., Caprio S., Sherwin R.S., Plewe G., Haymond M.W., Tamborlane W.V.,** 1991. *Insulin resistance of puberty: a defect restricted to peripheral glucose metabolism.* J Clin Endocrinol Metab 72, 277–282.

**Apter D., Pakarinen A., Hammond G.L., Vihko R.,** 1979. *Adrenocortical function in puberty. Serum ACTH, cortisol and dehydroepiandrosterone in girls and boys.* Acta Paediatr Scand 68 (4), 599-604.

**Aragno M., Mastrocola R., Brignardello E., Catalano M., Robino G., Manti R., Parola M., Danni O., Boccuzzi G.,** 2002. *Dehydroepiandrosterone modulates nuclear factor-kappaB activation in hippocampus of diabetic rats.* Endocrinology 143 (9), 3250-3258.

**Ader R., Friedman S.B., Grotta L.J.,** 1967. *'Emotionality' and adrenal cortical function: effects of strain, test, and the 24-hour corticosterone rhythm.* Anim Behav 15 (1), 37-44.

**Arlt W., Stewart P.M.,** 2005. *Adrenal Corticosteroid Biosynthesis, Metabolism, and Action.* Endocrinol Metab Clin N Am 34, 293–313.

**Auchus R.J., Rainey W.E.,** 2004. *Adrenarche – physiology, biochemistry and human disease.* Clin Endocrinol 60, 288–296.

**Azkona G., García-Belenguer S., Chacón G., Rosado B., León M., Palacio J.,** 2009. *Prevalence and risk factors of behavioural changes associated with age-related cognitive impairment in geriatric dogs.* J Small Anim Pract 50 (2), 87–91.

**Barrett-Connor E., Khaw K.T., Yen S.S.,** 1986. *A prospective study of dehydroepiandrosterone sulfate, mortality, and cardiovascular disease.* N Engl J Med 315 (24), 1519-1524.

**Barrett-Connor E., von Mühlen D., Laughlin G.A., Kripke A.,** 1999. *Endogenous levels of dehydroepiandrosterone sulfate, but not other sex hormones, are associated with depressed mood in older women: the Rancho Bernardo Study.* J Am Geriatr Soc 47 (6), 685-691.

**Bastianetto S., Ramassamy C., Poirier J., Quirion R.,** 1999. *Dehydroepiandrosterone (DHEA) protects hippocampal cells from oxidative stress-induced damage.* Brain Res Mol Brain Res 66 (1-2), 35-41.

**Battocchio M., Gabai G., Mollo A., Veronesi M.C., Soldano F., Bono G., Cairoli F.,** 1999. *Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows.* Theriogenology 51 (6), 1059-1069.

**Battocchio M., Gabai G., Mollo A., Veronesi M.C., Soldano F., Bono G., Cairoli F.,** 1999. *Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows.* Theriogenology 51 (6), 1059-1069.

**Bauer H.C., Bauer H.,** 1989. *Micromethod for the determination of 3 $\beta$ -HSD activity in cultured cells.* J Steroid Biochem 33, 643-646.

**Bauer M.E.,** 2008. *Chronic Stress and Immunosenescence: A Review.* Neuroimmunomodulat 15, 241-250.

**Bauer M.E., Moriguchi Jeckel C.M., Bonorino C., Ribeiro F., Luz C.,** 2009. *Glucocorticoids and DHEA: Do They Have a Role in Immunosenescence?* Handbook on Immunosenescence, Part III, Part 10, 833-862.

**Bauer M.E., Moriguchi Jeckel C.M., Luz C.,** 2009. *The role of stress factors during aging of the immune system.* Neuroimmunomodulat: Ann NY Acad Sci 1153, 139-152.

**Baulieu E.E.,** 1981. *Steroid hormones in the brain: several mechanisms?* In: K. Fuxe, J.A. Gutafsson, L. Wetterberg (Eds.), Steroid Hormone Regulation of the Brain, Pergamon Press, Oxford, 3-14.

**Baulieu E.E.,** 1996. *Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate as neuroactive neurosteroids.* J Endocrinol 150 (Suppl), 221-239.

**Baulieu E.E.**, 1997. *Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system*. Recent Prog Horm Res 52, 1-32.

**Baulieu E.E.**, 1998. *Neurosteroids: a novel function of the brain*. Psychoneuroendocrino 23 (8), 963–987.

**Baulieu E.E. e Robel P.**, 1998. *Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids*. Proc Natl Acad Sci USA 95, 4089–4091.

**Beaujean D., Mensah-Nyagan A.G., Do Rego J.L., Luu-The V., Pelletier G., Vaudry H.**, 1999. *Immunocytochemical localization and biological activity of hydroxysteroid sulfotransferase in the frog brain*. J Neurochem 72, 848–857.

**Bech K., Tygstrup I., Nerup J.**, 1969. *The involution of the foetal adrenal cortex. A light microscopic study*. Acta Pathol Microbiol Scand 76 (3), 391-400.

**Beerda B., Schilder M.B.H., van Hooff J.A.**, 1998. *Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs*. Applied Animal

**Beerda B., Schilder M.B.H., Van Hoff J.A.R.A.M., De Vries H.W., Mol J.A.**, 1999. *Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restrictions. II. Hormonal and immunological responses*. Physiol & Behav 66 (2), 243-254.

**Bélanger B., Bélanger A., Labrie F., Dupont A., Cusan L., Monfette G.**, 1989. *Comparison of residual C-19 steroids in plasma and prostatic tissue of human, rat and guinea pig after castration: unique importance of extratesticular androgens in men*. J Steroid Biochem 32 (5), 695-698.

**Belgorosky A., Baquedano M.S., Guercio G., Rivarola M.A.**, 2008. *Adrenarche: Postnatal Adrenal Zonation and Hormonal and Metabolic Regulation*. Horm Res 70, 257–267.

**Bélisle S., Schiff I., Tulchinsky D.**, 1980. *The use of constant infusion of unlabeled dehydroepiandrosterone for the assessment of its metabolic clearance rate, its half-life, and its conversion into estrogens*. J Clin Endocrinol Metab 50 (1), 117-121.

**Bennett A., Hayssen V.**, 2010. *Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences*. Domest Anim Endocrin 39 (3), 171-180.

**Bergeron R., de Montigny C., Debonnel G.,** 1996. *Potentiation of Neuronal NMDA Response Induced by Dehydroepiandrosterone and its Suppression by Progesterone: Effects Mediated via Sigma Receptors.* J Neurosci 76 (3), 1193-1202.

**Bergeron R., Scott S.L., Emond J.P., Mercier F., Cook N.J., Schaefer A.L.,** 2002. *Physiology and behavior of dogs during air transport.* J Vet Res 66 (3), 211-216.

**Boari A., Aste G.,** 2003. *Diagnosis and management of geriatric canine endocrine disorders.* Vet Res Commun 27 (Suppl 1), 543-554.

**Bonnett B.N., Egenvall A.,** 2010. *Age Patterns of Disease and Death in Insured Swedish Dogs, Cats and Horses.* J Comp Path 142, 33-38.

**Buford T.W., Willoughby D.S.,** 2008. *Impact of DHEA(S) and cortisol on immune function in aging: a brief review.* Appl Physiol Nutr Metab 33, 429-433.

**Buckham Sporer K. R., Weber P. S. D., Burton J. L., Earley B., Crowe M. A.,** 2008. *Transportation of young beef bulls alters circulating physiological parameters that may be effective biomarkers of stress.* J Anim Sci 86, 1325-1334.

**Butcher S.K., Lord J.M.,** 2004. *Stress responses and innate immunity: aging as a contributory factor.* Aging Cell, 151-160.

**Cardounel A., Regelson W., Kalimi M.,** 1999. *Dehydroepiandrosterone protects hippocampal neurons against neurotoxin-induced cell death: mechanism of action.* Proc Soc Exp Biol Med 222 (2), 145-149.

**Carlström K., Brody S., Lunell N.O., Lagrelius A., Möllerström G., Pousette A., Rannevik G., Stege R., von Schoultz B.,** 1988. *Dehydroepiandrosterone sulphate and dehydroepiandrosterone in serum: differences related to age and sex.* Maturitas 10 (4), 297-306.

**Catalina F., Milewich L., Frawley W., Kumar V., Bennett M.,** 2002. *Decrease of core body temperature in mice by dehydroepiandrosterone.* Exp Biol Med 227 (6), 382-388.

**Castillo V.A., Cabrera Blatter M.F., Gómez N.V., Sinatra V., Gallelli M.F., Ghersevich M.C.,** 2009. *Diurnal ACTH and plasma cortisol variations in healthy dogs and in those with pituitary-dependent Cushing's syndrome before and after treatment with retinoic acid.* Res Vet Sci 86 (2), 223-229.

**Chalbot S., Morfin R.,** 2006. *Dehydroepiandrosterone metabolites and their interactions in humans.* Drug Metabol Drug Interact 22 (1), 1-23.

**Chen C.L., Kumar M.S., Williard M.D., Liao T.F.,** 1978. *Serum hydrocortisone (cortisol) values in normal and adrenopathic dogs as determined by radioimmunoassay.* Am J Vet Res 39 (1), 179-181.

**Chen F., Knecht K., Birzin E., Fisher J., Wilkinson H., Mojena M., Moreno C.T., Schmidt A., Harada S., Freedman L.P., Reszka A.A.,** 2005. *Direct Agonist/Antagonist Functions of Dehydroepiandrosterone.* Endocrinology 146 (11), 4568-4576.

**Cheney D.L., Uzunov D., Costa E., Guidotti A.,** 1995. *Gas chromatographic–mass fragmentographic quantitation of 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one (allopregnanolone) and its precursors in blood and brain of adrenalectomized and castrated rats.* J Neurosci 15, 4641-4650.

**Cohen L.J.,** 1974. *The operational definition of human attachment.* Psychological Bulletin 81, 207-217.

**Compagnone N.A., Mellon S.H.,** 2000. *Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators.* Front neuroendocrin 21, 1–56.

**Concannon P.W., Butler W.R., Hansel W., Knight P.J., Hamilton J.M.,** 1978. *Parturition and lactation in the bitch: serum progesterone, cortisol and prolactin.* Biol Reprod, 19 (5), 1113-1118.

**Conley A.J., Pattison J.C., Bird I.M.,** 2004. *Variations in adrenal androgen production among (nonhuman) primates.* Semin Reprod Med 22 (4), 311-326.

**Coppola C.L., Gradin T., Enns R.M.,** 2006. *Human interaction and cortisol: can human contact reduce stress for shelter dogs?* Physiol Behav 87 (3), 537-541.

**Corpéchet C., Robel P., Axelsont M., Sjovalit J., Baulieu E.E.,** 1981. *Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain.* Proc Natl Acad Sci Biochemistry 78 (8), 4704-4707.

**Cotman C.W., Head E., Muggenburg B.A., Zicker S., Milgram N.W.,** 2002. *Brain aging in the canine: a diet enriched in antioxidants reduces cognitive dysfunction.* Neurobiol Aging 23, 809–818.

**Coulter C.L., Goldsmith P.C., Mesiano S., Voytek C.C., Martin M.C., Han V.K., Jaffe R.B.,** 1996. *Functional maturation of the primate fetal adrenal in vivo: role of insulin-like growth factors (IGFs), IGF-I receptor, and IGF binding proteins in growth regulation.* Endocrinology 137 (10), 4487-4498.

**Cowell R.L., Tyler R.D., Meinkoth J.H., DeNicola D.B.,** 2008. *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat.* Vet Clin Path, 37 (2), 256, 3rd edition.

**Cummings B.J., Head E., Ruehl W., Milgram N.W., Cotman C.W.,** 1996. *The canine as an animal model of human aging and dementia.* Neurobiol Aging 17 (2), 259-268.

**Cutler G.B. Jr, Glenn M., Bush M., Hodgen G.D., Graham C.E., Loriaux D.L.,** 1978. *Adrenarche: a survey of rodents, domestic animals, and primates.* Endocrinology 103 (6), 2112-2118.

**Czeisler C.A., Chiasera A.J., Duffy J.F.,** 1991. Research on sleep, circadian rhythms and aging: applications to manned spaceflight. Exp Gerontol, 26 (2-3), 217-232

**Dallman M.F., Engeland W.C., Rose J.C., Wilkinson C.W., Shinsako J., Siedenburg F.,** 1978. *Nycthemeral rhythm in adrenal responsiveness to ACTH.* Am J Physiol 235 (5), 210-218.

**Danenberg H.D., Alpert G., Lustig S., Ben-Nathan D.,** 1992. *Dehydroepiandrosterone protects mice from endotoxin toxicity and reduces tumor necrosis factor production.* Antimicrob agents ch 36 (10), 2275-2279.

**Dardis A., Saraco N., Rivarola M.A., Belgorosky A.,** 1999. *Decrease in the expression of the 3  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase gene in human adrenal tissue during prepuberty and early puberty. Implications to the mechanism of adrenarche.* Pediatr Res 45, 384-388.

**Daynes R.A., Araneo B.A., Ershler W.B., Maloney C., Li G.Z., Ryu S.Y.,** 1993. *Altered regulation of IL-6 production with normal aging. Possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative.* J Immunol 150 (12), 5219-5230.

**Denot-Ledunois S., Vardon G., Perruchet P., Gallego J.,** 1998. *The effect of attentional load on the breathing pattern in children.* Int J Psychophysiol 29 (1), 13-21.

**De Kloet E.R., Sutanto W., Rots N., van Haarst A., van den Berg D., Oitzl M., van Eekelen A., Voorhuis D.,** 1991. *Plasticity and function of brain corticosteroid receptors during aging.* Acta Endocrinol 125 (Suppl 1), 65-72.

**de Peretti E., Forest MG.,** 1976. *Unconjugated dehydroepiandrosterone plasma levels in normal subjects from birth to adolescence in human: the use of a sensitive radioimmunoassay.* J Clin Endocrinol Metab 43 (5), 982-991.

**Derksen R.H.,** 1998. *Dehydroepiandrosterone (DHEA) and systemic lupus erythematosus.* Semin Arthritis Rheum 27 (6), 335-347.

**Deuschle M., Gotthardt U., Schweiger U., Weber B., Körner A., Schmider J., Standhardt H., Lammers C.H., Heuser I.,** 1997. *With aging in humans the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal system increases and its diurnal amplitude flattens.* Life Sci 61 (22), 2239-2246.

**Dhom G.,** 1973. *The prepuberal and puberal growth of the adrenal (adrenarche).* Beitr Pathol 150 (4), 357-377.

**Dickerson S.S., Kemeny M.E.,** 2004. *Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research.* Psychol Bull 130 (3), 355-391.

**Di Santo E., Foddi M.C., Ricciardi-Castagnoli P., Mennini T., Ghezzi P.,** 1996. *DHEAS inhibits TNF production in monocytes, astrocytes and microglial cells.* Neuroimmunomodulat 3 (5), 285-288.

**Do Rego J.L., Tremblay Y., Luu-The V., Repetto E., Castel H., Vallarino M., Bélanger A., Pelletier G., Vaudry H.,** 2007. *Immunohistochemical localization and biological activity of the steroidogenic enzyme cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/C17, 20-lyase (P450C17) in the frog brain and pituitary.* J Neurochem 100 (1), 251-268.

**Do Rego J.L., Seong J.Y., Burel D., Leprince J., Luu-The V., Tsutsui K., Tonon M.C., Pelletier G., Vaudry H.,** 2009. *Neurosteroid biosynthesis: Enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides.* Front Neuroendocrin 30, 259–301.

**Dong L.Y., Cheng Z.X., Fu Y.M., Wang Z.M., Zhu Y.H., Sun J.L., Dong Y., Zheng P.,** 2007. *Neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate enhances spontaneous glutamate release in rat prelimbic cortex through activation of dopamine D1 and sigma-1 receptor.* *Neuropharmacology* 52 (3), 966-974.

**Dreschel N.A., Granger D.A.,** 2005. *Physiological and behavioral reactivity to stress in thunderstorm-phobic dogs and their caregivers.* *Appl Anim Behav Sci* 95, 153–168.

**Ducharme J.R., Forest M.G., De Peretti E., Sempé M., Collu R., Bertrand J.,** 1976. *Plasma adrenal and gonadal sex steroids in human pubertal development.* *J Clin Endocrinol Metab* 42 (3), 468-476.

**Endoh A., Kristiansen S.B., Casson P.R., Buster J.E., Hornsby P.J.,** 1996. *The zona reticularis is the site of biosynthesis of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in the adult human adrenal cortex resulting from its low expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase.* *J Clin Endocr Metab* 81, 3558-3565.

**Fantidis P.,** 2010. *The role of the stress-related anti-inflammatory hormones ACTH and cortisol in atherosclerosis.* *Curr Vasc Pharmacol* 8 (4), 517-525.

**Farrell G.I., Lamus B.,** 1953. *Steroids in adrenal venous blood of the dog.* *Proc Soc Exp Biol Med* 84 (1), 89-93.

**Fazio E., Ferlazzo A.,** 2003. *Evaluation of stress during transport.* *Vet Res Com* 27 (Suppl 1), 519-524.

**Ferrari E., Cravello L., Muzzoni B., Casarotti D., Paltro M., Solerte S.B., Fioravanti M., Cuzzoni G., Pontiggia B., Magri F.,** 2001a. *Age-related changes of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: pathophysiological correlates.* *Eur J Endocrinol* 144 (4), 319-329.

**Ferrari E., Casarotti D., Muzzoni B., Albertelli N., Cravello L., Fioravanti M., Solerte S.B., Magri F.,** 2001b. *Age-related changes of the adrenal secretory pattern: possible role in pathological brain aging.* *Brain Res Rev* 37 (1-3), 294-300.

**Feher T., Bodrogi L., Feher K. G., Poteczin E. and Kolcsey I. S.,** 1977. *Free and solvable dehydroepiandrosterone and androsterone in blood of mammals under*



*physiological conditions and following administration of dehydroepiandrosterone. Acta endocrinol-Cop* 85, 126-133.

**Feldman H.A., Johannes C.B., Mckinlay J.B., Longcope C.,** 1998. *Low dehydroepiandrosterone sulfate and heart disease in middle-aged men: cross-sectional results from the Massachusetts Male Aging Study. AEP* 8 (4), 217–228.

**Ferrari E., Casarotti D., Muzzoni B., Albertelli N., Cravello L., Fioravanti M., Solerte S. B., Magri F.,** 2001a. *Age-related changes of the adrenal secretory pattern: possible role in pathological brain aging. Brain Res Rev* 37, 294–300.

**Ferrari E., Cravello L., Muzzoni B., Casarotti D., Paltro M., Solerte S.B., Fioravanti M., Cuzzoni G., Pontiggia B., Magri F.,** 2001b. *Age-related changes of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: pathophysiological correlates. Eur J Endocrinol* 144, 319-329.

**Ferrari E., Magri F.,** 2008. *Role of neuroendocrine pathways in cognitive decline during aging. Ageing Res Rev* 7, 225–233.

**Ferrari E., Mirani M., Barili L., Falvo F., Solerte S.B., Cravello L., Pini L., Magri F.,** 2004. *Cognitive and affective disorders in the elderly: a neuroendocrine study. Arch Gerontol Geriatr (Suppl 9),* 171-182.

**Follenius M., Simon C., Brandenberger G., Lenzi P.,** 1987. *Ultradian plasma corticotropin and cortisol rhythms: time-series analyses. J Endocrinol Invest* 10 (3), 261-266.

**Fortney W.D.,** 2004. Geriatrics and aging in J.D. Hoskins, *Geriatrics and Gerontology of the dog and cat*, 1-4, Ed. Elsevier Saunders, St.Louis.

**Frank L. A., Rohrbach B.W., Bailey E.M., West J.R., Oliver J.W.,** 2003. *Steroid hormone concentration profiles in healthy intact and neutered dogs before and after cosyntropin administration. Domest anim endocrin* 24, 43-57.

**Gabai G., Marinelli L., Simontacchi C., Bono G.,** 2004. *The increase in plasma C<sub>19</sub>Δ<sup>5</sup> steroids in subcutaneous abdominal and jugular veins of dairy cattle during pregnancy is unrelated to estrogenic activity. Steroids* 69, 121–127.

**Galis F., Van der Sluijs I., Van Dooren T.J., Metz J.A., Nussbaumer M.,** 2007. *Do large dogs die young ? J Exp Zool B Mol Dev Evol* 308 (2), 119-126.

**Gallagher P., Watson S., Smith M.S., Young A.H., Ferrier I.N., 2007.** *Plasma cortisol-dehydroepiandrosterone (DHEA) ratios in schizophrenia and bipolar disorder.* Schizophr Res 90, 258–265.

**Garnier F., Benoit E., Virat M., Ochoa R., Delatour P., 1990.** *Adrenal cortical response in clinically normal dogs before and after adaptation to a housing environment.* Lab Anim 24, 40-43.

**Genazzani A.R., Facchinetti F., Petraglia F., Pintor C., Bagnoli F., Puggioni R., Corda R., 1983.** *Correlations between plasma levels of opioid peptides and adrenal androgens in prepuberty and puberty.* J Steroid Biochem 19, 891-895.

**Gatti R., Antonelli G., Prearo M., Spinella P., Cappellin E., De Palo E.F., 2009.** *Cortisol assay and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids.* Clin Biochem (42), 1205-1217.

**Gil-ad I., Shtauf B., Eshet R., Maayan R., Rehavi M., Weizman A., 2001.** *Effect of dehydroepiandrosterone and its sulfate metabolite on neuronal cell viability in culture.* Isr Med Assoc J 3 (9), 639-43.

**Giordano R., Di Vito L., Lanfranco F., Broglio F., Benso A., Gianotti L., Grottoli S., Ghigo E., Arvat E., 2001.** *Elderly subjects show severe impairment of dehydroepiandrosterone sulphate and reduced sensitivity of cortisol and aldosterone response to the stimulatory effect of ACTH1-24.* Clin Endocrinol 55, 259-265.

**Goncharova N.D., Lapin B.A., 2002.** *Effects of aging on hypothalamic–pituitary–adrenal system function in non-human primates.* Mech Ageing Dev 123, 1191–1201.

**Gozansky W.S., Lynn J.S., Laudenslager M.L., Kohrt W.M., 2005.** *Salivary cortisol determined by enzyme immunoassay is preferable to serum total cortisol for assessment of dynamic hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity.* Clin Endocrinol (Oxf). 63 (3), 336-341.

**Gordon C.M., Glowacki J., LeBoff M.S., 1999.** *DHEA and the skeleton (through the ages).* Endocrine 11 (1), 1-11.

**Goy-Thollot I., Decosne-Junot C., Bonnet J.M., 2007.** *Influence of aging on adrenal responsiveness in a population of eleven healthy beagles.* Res Vet Sci 82 (2), 195-201.

**Gradin T.**, 1997. *Assessment of stress during handling and transport.* J Anim Sci (75), 249-257.

**Greenspan S.L., Rowe J.W., Maitland L.A., McAloon-Dyke M., Elahi D.**, 1993. *The Pituitary-adrenal glucocorticoid response is altered by gender and disease.* J Gerontol 48 (3), 72-77.

**Grimley E.J., Malouf R., Huppert F., van Niekerk J.K.**, 2006. *Dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation for cognitive function in healthy elderly people.* Cochrane Database Syst Rev 18 (4), CD006221.

**Grumbach M.M.**, 1980. *The neuroendocrinology of puberty.* Hosp Pract 15 (3), 51-60.

**Guazzo E.P., Kirkpatrick P.J., Goodyer I.M., Shiers H.M., Herbert J.**, 1996. *Cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA), and DHEA sulfate in the cerebrospinal fluid of man: relation to blood levels and the effects of age.* J Clin Endocrinol Metab 81 (11), 3951-3960.

**Gupta S., Agrawal A., Agrawal S., Su H., Gollapudi S.**, 2006. *A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis.* Immunity & Ageing, 3-5.

**Gust D.A., Wilson M.E., Stocker T., Conrad S., Plotsky P. M. Gordon T. P.**, 2000. *Activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is altered by aging and exposure to social stress in female rhesus monkeys.* J Clin Endocr Metab 85 (7), 2556-2563.

**Hammond G.L., Smith C.L., Paterson N.A., Sibbald W.J.**, 1990. *A role for corticosteroid-binding globulin in delivery of cortisol to activated neutrophils.* J Clin Endocrinol Metab 71 (1), 34-39.

**Haning R.V. Jr, Chabot M., Flood C.A., Hackett R., Longcope C.**, 1989. *Metabolic clearance rate (MCR) of dehydroepiandrosterone sulfate (DS), its metabolism to dehydroepiandrosterone, androstenedione, testosterone, and dihydrotestosterone, and the effect of increased plasma DS concentration on DS MCR in normal women.* J Clin Endocrinol Metab 69 (5), 1047-1052.

**Hansen A.M., Garde A.H., Persson R.,** 2008. Sources of biological and methodological variation in salivary cortisol and their impact on measurement among healthy adults: A review. *Scand J Clin Lab Inv* (68), 448-458.

**Haren M.T., Malmstrom T.K., Banks W.A., Patrick P., Miller D.K., Morley J.E.,** 2007. *Lower serum DHEAS levels are associated with a higher degree of physical disability and depressive symptoms in middle-aged to older African American women.* *Maturitas* 57, 347–360.

**Hart B. L.,** 2001. *Effect of gonadectomy on subsequent development of age-related cognitive impairment in dogs.* *J Am Vet Med Ass* 219 (1), 51-56.

**Haubehofer D.K., Kirchengast S.,** 2006. *Physiological arousal for companion dogs working with their owners in animal-assisted activities and animal-assisted therapy.* *J Appl Anim Welf Sci* 9 (2), 165-172.

**Hauger R.L., Thivikraman K.V., Plotsky P.M.,** 1994. *Age-related alterations of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in male Fischer 344 rats.* *Endocrinology* 134 (3), 1528-1536.

**Hazeldine J., Arlt W., Lord J.M.,** 2010. *Dehydroepiandrosterone as a regulator of immune cell function.* *J Steroid Biochem* 120, 127–136.

**Hennesy M.B., Davis H.N., Williams M.T., Mellott C., Douglas C.W.,** 1997. *Plasma cortisol levels of dogs at a County Animal Shelter.* *Physiol Behav* 62 (3), 485-490.

**Herrington D.M.,** 1995. *Dehydroepiandrosterone and coronary atherosclerosis.* *Ann N Y Acad Sci* 774, 271-280.

**Hillen T., Lun A., Reischies F.M., Borchelt M., Steinhagen-Thiessen E., Schaub R.T.,** *DHEA-S Plasma Levels and Incidence of Alzheimer's Disease.* *Biol Psychiatry* 47, 161–163.

**Hindmarsh P., Di Silvio L., Pringle P.J., Kurtz A.B., Brook C.G.,** 1988. *Changes in serum insulin concentration during puberty and their relationship to growth hormone.* *Clin Endocrinol (Oxf)* 28 (4), 381-388.

**Hornsby P. J.,** 1995. *Biosynthesis of DHEAS by the human adrenal cortex and its age-related decline.* *Ann N Y Acad Sci*, 29-46.

**Horváth Z., Igyártó B.Z., Magyar A., Miklósi A.,** 2007. *Three different coping styles in police dogs exposed to a short-term challenge.* Horm Behav 52 (5), 621-630.

**Hojo Y., Hattori T.A., Enami T., Furukawa A., Suzuki K., Ishii H.T., Mukai H., Morrison J.H., Janssen W.G.M., Kominami S., Harada N., Kimoto T.,** 2004. *Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 $\alpha$  and P450 aromatase localized in neurons.* Proc Natl Acad Sci USA 101, 865–870.

**Hoskins J.D., McCurnin D.M.,** 1997. *Geriatrics care in the late 1990s.* Vet Clin North Am Small Anim Pract 27 (6), 1273-1284.

**Hyatt P.J., Bhatt K., Tait J.F.,** 1983. *Steroid biosynthesis by zona fasciculata and zona reticularis cells purified from the mammalian adrenal cortex.* J Steroid Biochem 19 (1C), 953-959.

**Hui X.G., Akahira J., Suzuki T., Nio M., Nakamura Y., Suzuki H., Rainey W.E., Sasano H.,** 2009. *Development of the human adrenal zona reticularis: morphometric and immunohistochemical studies from birth to adolescence.* J Endocrinol 203, 241–252.

**Ilondo M.M., Vanderschueren-Lodeweyckx M., Vlietinck R., Pizarro M., Malvaux P., Eggermont E., Eeckels R.,** 1982. *Plasma androgens in children and adolescents. Part II. A longitudinal study in patients with hypopituitarism.* Horm Res 16 (2), 78-95.

**Jensen H.K., Blichert-Toft M.,** 1971. *Serum corticotrophin, plasma cortisol and urinary excretion of 17-ketogenic steroids in the elderly (age group: 66-94 years).* Acta Endocrinol (Copenh) 66 (1), 25-34.

**Johnston S.D., Mather E.C.,** 1978. *Canine plasma cortisol (hydrocortisone) measured by radioimmunoassay: clinical absence of diurnal variation and results of ACTH stimulation and dexamethasone suppression tests.* Am J Vet Res 39 (11), 1766-1770.

**Jones P., Chase K., Martin A., Davern P., Ostrander E.A., Lark K.G.,** 2008. *Single-nucleotide-polimorphism-based association mapping of dog stereotypes.* Genetics 179 (2), 1033-1044.

- Jones A.C., Josephs R.A.,** 2006. *Interspecies hormonal interactions between man and the domestic dog (Canis familiaris)*. Horm Behav 50 (3), 393-400.
- Kaasik A., Kalda A., Jaako K., Zharkovsky A.,** 2001. *Dehydroepiandrosterone sulphate prevents oxygen-glucose deprivation-induced injury in cerebellar granule cell culture*. Neuroscience 102 (2), 427-432.
- Karishma K.K., Herbert J.,** 2002. *Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression*. Eur J Neurosci 16 (3), 445-453.
- Kemnitz J.W., Roecker E.B., Haffa A.L., Pinheiro J., Kurzman I., Ramsey J.J., MacEwen E.G.,** 2000. *Serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations across the life span of laboratory-housed rhesus monkeys*. J Med Primatol 29 (5), 330-337.
- Kempainen R.J., Sartin J.L.,** 1984. *Evidence for episodic but not circadian activity in plasma concentrations of adrenocorticotrophin, cortisol and thyroxine in dogs*. J Endocrinol 103 (2), 219-226.
- Khaw K.T.,** 1996. *Dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulphate and cardiovascular disease*. J Endocrinol 150, 149-153.
- Kimonides V.G., Spillantini M.G., Sofroniew M.V., Fawcett J.W., Herbert J.,** 1999. *Dehydroepiandrosterone antagonizes the neurotoxic effects of corticosterone and translocation of stress-activated protein kinase 3 in hippocampal primary cultures*. Neuroscience 89 (2), 429-436.
- Kimura M., Tanaka S., Yamada Y., Kiuchi Y., Yamakawa T., Sekihara H.,** 1998. *Dehydroepiandrosterone decreases serum tumor necrosis factor-alpha and restores insulin sensitivity: independent effect from secondary weight reduction in genetically obese Zucker fatty rats*. Endocrinology 139 (7), 3249-3253.
- Kley H.K., Bartmann E., Kruskemper H.L.,** 1977. *A simple and rapid method to measure non-protein-bound fractions of cortisol, testosterone and oestradiol by equilibrium dialysis: comparison with centrifugal filtration*. Acta Endocrinol (Copenh) 85 (1), 209-219.

**Kobelt A.J., Hemsworth P.H., Barnett J.L., Butler K.L.,** 2003. Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *es Vet Sci* 75 (2), 157-161.

**Kóhalmy K., Tamási V., Kobori L., Sárváry E., Pascussi J.M., Porrogi P., Rozman D., Prough R.A., Meyer U.A., Monostory K.,** 2007. *Dehydroepiandrosterone Induces Human CYP2B6 through the Constitutive Androstane Receptor.* *Drug metab disp* 35 (9), 1495–1501.

**Kolevská J., Brunclík V., Svoboda M.,** 2003. *Circadian rhythm of cortisol secretion in dogs of different daily activities.* *Acta Vet Brno* 72, 599-605.

**Kramer R.E., McCarthy J.L., Simpson E.R., Waterman M.R.,** 1983. *Effects of ACTH on steroidogenesis in bovine adrenocortical cells in primary culture—increased secretion of 17 $\alpha$ -hydroxylated steroids associated with a refractoriness in total steroid output.* *J Steroid Biochem* 18 (6), 715-723.

**Kritz-Silverstein D., von Mühlen D., Laughlin G.A., Bettencourt R.,** 2008. *Effects of dehydroepiandrosterone supplementation on cognitive function and quality of life: the DHEA and Well-Ness (DAWN) Trial* *J Am Geriatr Soc* 56 (7), 1292-1298.

**Krozowski Z.S., Funder J.W.,** 1983. *Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone-binding species have identical intrinsic steroid specificity.* *Proc Natl Acad Sci USA* 80 (19), 6056-6060.

**Labrie F.,** 1991. *Intracrinology.* *Mol Cell Endocrinol* 78 (3), 113-118.

**Labrie F., Bélanger A., Simard J., Luu-The V., Labrie C.,** 1995. *DHEA and Peripheral Androgen and Estrogen Formation: Intracrinology.* *An N Y Acad Sci*, 16-28.

**Labrie F., Bélanger A., Cusan L., Gomez J.L., Candas B.,** 1997. *Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging.* *J Clin Endocrinol Metab* 82, 2396-2402.

**Labrie F., Luu-The V., Labrie C., Simard J.,** 2001. *DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology.* *Front Neuroendocrin* 22, 185–212.

**Labrie F.,** 2004. *Adrenal androgens and intracrinology.* *Semin Reprod Med* 22 (4), 299-309.

**Labrie F., Luu-The V., Bélanger A., Lin S.L., Simard J., Pelletier G., Labrie C.,** 2005. *Is dehydroepiandrosterone a hormone?* J Endocrinol 187, 169–196.

**Labrie F.,** 2010. *DHEA, important source of sex steroids in men and even more in women.* Prog Brain Res 182, 97-148.

**Lacoste D., Dubé D., Trudel C., Bélanger A., Labrie F.,** 1989. *Normal gonadal functions and fertility after 23 months of treatment of prepuberal male and female dogs with the GnRh agonist (D-Trp<sup>6</sup>, des-Gly-NH<sub>2</sub><sup>10</sup>)GnRh ethylamide.* J Androl 10 (6) 456-465.

**Lacroix C., Fiet J., Benais J.P., Gueux B., Bonete R., Villette J.M., Gourmel B., Dreux C.,** 1987. *Simultaneous radioimmunoassay of progesterone, androst-4-enedione, pregnenolone, dehydroepiandrosterone and. 17-hydroxyprogesterone in specific regions of human brain.* J Steroid Biochem 28 (3), 317-325.

**Landsberg G.,** 2005. *Therapeutic agents for the treatment of cognitive dysfunction syndrome in senior dogs.* Progr Neuro-Psychoph 29, 471– 479.

**Lane M.A., Ingram D.K., Ball S.S., Roth G.S.,** 1997. *Dehydroepiandrosterone Sulfate: a biomarker of primate aging slowed by calorie restriction.* J Clin Endocrinol Metab 82, 2093-2096.

**Lapchak P.A., Chapman D.F., Nunez S.Y., Zivin J.A.,** 2000. *Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective in a reversible spinal cord ischemia model: possible involvement of GABA(A) receptors.* Stroke 31 (8), 1953-1956.

**Lapchak P.A., Araujo D.M.,** 2001. *Preclinical development of neurosteroids as neuroprotective agents for the treatment of neurodegenerative diseases.* Int Rev Neurobiol 46, 379–397.

**Laughlin G.A., Barrett-Connor E.,** 2000. *Sexual Dimorphism in the Influence of Advanced Aging on Adrenal Hormone Levels: The Rancho Bernardo Study.* J Clin Endocrinol Metab 85, 3561-3568.

**Laurine E., Lafitte D., Grégoire C., Sérée E., Loret E., Douillard S., Michel B., Briand C., Verdier J.M.,** 2003. *Specific binding of dehydroepiandrosterone to the N Terminus of the Microtubule-associated Protein MAP2.* J Biol Chem 278 (32), 29979–29986.



- Lejeune-Lenain C., Van Cauter E., Désir D., Beyloos M., Franckson J.R.,** 1987. *Control of circadian and episodic variations of adrenal androgens secretion in man.* *Endocrinol Invest* 10 (3), 267-76.
- Lhullier F.L.R., Nicolaidis R., Riera N.G., Cipriani F., Junqueira D., Dahm K.C.S., Brusque A.M., Souza D.O.,** 2004. *Dehydroepiandrosterone increases synaptosomal glutamate release and improves the performance in inhibitory avoidance task.* *Pharmacol Biochem Be* 77, 601–606.
- Li H., Klein G., Sun P., Buchan A.M.,** 2001. *Dehydroepiandrosterone (DHEA) reduces neuronal injury in a rat model of global cerebral ischemia.* *Brain Res* 888 (2), 263-266.
- Liu C.H., Laughlin G.A., Fischer U.G., Yen S.S.,** 1990. *Marked attenuation of ultradian and circadian rhythms of dehydroepiandrosterone in postmenopausal women: evidence for a reduced 17,20-desmolase enzymatic activity.* *J Clin Endocrinol Metab* 71 (4), 900-906.
- Liu D., Dillon J.S.,** 2002. *Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to  $G\alpha_{i2,3}$ .* *J Biol Chem* 277 (24), 21379–21388.
- Longcope C., Baker S.,** 1993. *Androgen and estrogen dynamics: relationships with age, weight, and menopausal status.* *J Clin Endocrinol Metab* 76 (3), 601-604.
- Longcope C.,** 1996. *Dehydroepiandrosterone metabolism.* *J Endocrinol* 150, 125-127.
- Loria R.M., Padgett D.A.,** 1998. *Control of the immune response by DHEA and its metabolites.* *Rinsho Byori* 46 (6), 505-517.
- Lupien S. J., de Leon M., de Santi S., Convit A., Tarshish C., Nair N.P.V., Thakur M., McEwen B.S., Hauger R.L., Meaney M. J.,** 1998. *Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits.* *Nat Neurosci* 1, 69-73.
- Lupien S.J., Maheu F., Tu M., Fiocco A., Schramek T.E.,** 2007. *The effects of stress and stress hormones on human cognition: implications for the field of brain and cognition.* *Brain Cognition* 65, 209–237.

**Luu-The V.**, 2001. *Analysis and characteristics of multiple types of human 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase*. J Steroid Biochem 76, 143–151.

**Maggio M., Cattabiani C., Lauretani F., Ferrucci L., Luci M., Valenti G., Ceda G.**, 2010. *The concept of multiple hormonal dysregulation*. Acta Biomed 81 (Suppl 1), 19-29.

**Majewska M.D.**, 1992. *Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA<sub>A</sub> receptor. Mechanism of action and physiological significance*. Prog Neurobiol 38 (4), 379-395.

**Maninger N., Wolkowitz O.M., Reus V.I., Epel E.S., Mellon S.H.**, 2009. *Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS)*. Front Neuroendocrin 30, 65–91.

**Marinelli L., Trevisi E., Da Dalt L., Merlo M., Bertoni G., Gabai G.**, 2007a. *Dehydroepiandrosterone secretion in dairy cattle is episodic and unaffected by ACTH stimulation*. J Endocrinol 194 (3), 627-635.

**Marinelli L., Gabai G., Simontacchi C., Bono G.**, 2007b. *Effect of aging and reproductive condition on dehydroepiandrosterone plasma levels in the bitch*. Vet Res Commun 31 (Suppl 1), 169-172.

**Marinelli L., Adamelli S., Normando S., Bono G.**, 2007c. *Quality of life of the pet dog: Influences of owner and dog's characteristics*. Appl Anim Beh Sci 108, 143-156.

**Martel C., Melner M.H., Gagné D., Simard J., Labrie F.**, 1994. *Widespread tissue distribution of steroid sulfatase, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 beta-HSD), 17 beta-HSD 5 alpha-reductase and aromatase activities in the rhesus monkey*. Mol Cell Endocrinol 104 (1), 103-111.

**Marx C., Borustein S.R., Wokiersdorfer G.W., Peter M., Sippell W.G. Scherbaum W.A.**, 1997. *Relevance of major histocompatibility complex class a expression as a hallmark for the cellular differentiation in the human adrenal cortex*. J Clin Endocr Metab 82, 3136-3140.

**Marx C.E., Jarskog L.F., Lauder J.M., Gilmore J.H., Lieberman J.A., Morrow A.L.**, 2000. *Neurosteroid modulation of embryonic neuronal survival in vitro following anoxia*. Brain Res 871 (1), 104-112.

**Matsunaga M., Ukena K., Tsutsui K.,** 2001. *Expression and localization of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase/c17,20-lyase in the avian brain.* Brain Res 899 (1-2), 112-122.

**Maurice T., Grégoire C., Espallergues J.,** 2006. *Neuro(active)steroids actions at the neuromodulatory sigma1 ( $\sigma_1$ ) receptor: biochemical and physiological evidences, consequences in neuroprotection.* Pharmacol Biochem Be 84, 581–597.

**McEwen B.S.,** 1992. *Re-examination of the glucocorticoid hypothesis of stress and aging.* Prog Brain Res 93, 365-381.

**Meikle A.W., Dorchuck R.W., Araneo B.A., Stringham J.D., Evans T.G., Spruance S.L., Daynes R.A.,** 1992. *The presence of a dehydroepiandrosterone-specific receptor binding complex in murine T cells.* J Steroid Biochem Mol Biol 42 (3-4), 293-304.

**Melcangi R.C., Garcia-Segura L.M., Mensah-Nyagan A.G.,** 2008. *Neuroactive steroids: state of the art and new perspectives.* Cell Mol Life Sci 65, 777–797.

**Melchior C.L., Ritzmann R.F.,** 1994. *Dehydroepiandrosterone is an anxiolytic in mice on the plus maze.* Pharmacol Biochem Behav 47 (3), 437-441.

**Mellon S.H., Vaudry H.,** 2001. *Biosynthesis of neurosteroids and regulation of their synthesis.* Int Rev Neurobiol 46, 33-78.

**Mellon S.H., Griffin L.D.,** 2002. *Synthesis, regulation, and function of neurosteroids.* Endocr Res 28 (4), 463.

**Mensah-Nyagan A.G., Do-Rego J.L., Beaujean D., Luu-The V., Pelletier G., Vaudry H.,** 1999. *Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system.* Pharmacol Rev 51 (1), 63-81.

**Mesiano S., Jaffe R.B.,** 1993. *Interaction of insulin-like growth factor-II and estradiol directs steroidogenesis in the human fetal adrenal toward dehydroepiandrosterone sulfate production.* J Clin Endocrinol Metab 77 (3), 754-758.

**Mialot J.P., Thibier M., Toublanc J.E., Castanier M., Scholler R.,** 1988. *Plasma concentration of luteinizing hormone, testosterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione between birth and one year in the male dog: longitudinal study and hCG stimulation.* Andrologia 20 (2), 145-154.

**Miller W.L.**, 1998. *Molecular biology of steroid hormone synthesis*. *Endocr Rev* 9, 295–318.

**Miller W.L.**, 2009. *Androgen synthesis in adrenarche*. *Rev Endocr Metab Disord* 10, 3–17.

**Miolo A.**, 2005. *Risultati di un'indagine conoscitiva sulla geriatria veterinaria in Italia*, Atti 50° Congresso Nazionale SCIVAC, 357.

**Mizoguchi K., Ikeda R., Shoji H., Tanaka Y., Maruyama W., Tabira T.**, 2009. *Aging attenuates glucocorticoid negative feedback in rat brain*. *Neuroscience* 159, 259–270.

**Mongillo P., Bono G., Regolin L., Marinelli L.**, 2010. Selective attention to humans in companion dogs, *Canis familiaris*. *Animal Behaviour* 80 (6), 1057-1063.

**Monnet F.P.**, 2002. *Functional cooperation between neurosteroids and D2 dopamine antagonists on KCl-evoked [3H]noradrenaline release: modulation by calcium channel blockers*. *J Neuroendocrinol* 14 (12), 955-962.

**Mormède P., Andanson S., Aupérin B., Beerda B., Guémené D., Malmkvist J., Manteca X., Manteuffel G., Prunet P., van Reenen C.G., Richard S., Veissier I.**, 2007. *Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare*. *Physiol Behav* 92 (3), 317-339.

**Moynihan J.A., Callahan T.A., Kelley S.P., Campbell L.M.**, 1998. *Adrenal hormone modulation of type 1 and type 2 cytokine production by spleen cells: dexamethasone and dehydroepiandrosterone suppress interleukin-2, interleukin-4, and interferon- $\gamma$  production in vitro*. *Cell Immunol* 184, 58–64.

**Muehlenbein M.P., Campbell B.C., Richards R. J., Svec F., Phillippi-Falkenstein K.M., Murchison M.A., Myers L.**, 2003. *Dehydroepiandrosterone-sulfate as a biomarker of senescence in male non-human primates*. *Exp Gerontol* 38, 1077–1085.

**Mukai H., Tsurugizawa T., Ogiue-Ikeda M., Murakami G., Hojo Y., Ishii H., Kimoto T., Kawato S.**, 2006. *Local neurosteroid production in the hippocampus: influence on synaptic plasticity of memory*. *Neuroendocrinology* 84 (4), 255-263.

**Muller M., den Tonkelaar I., Thijssen J.H.H., Grobbee D.E., van der Schouw Y.T.,** 2003. *Endogenous sex hormones in men aged 40–80 years.* *Eu J Endocrinol* 149, 583–589.

**Naert G., Maurice T., Tapia-Arancibia L., Givalois L.,** 2007. *Neuroactive steroids modulate HPA axis activity and cerebral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in adult male rats.* *Psychoneuroendocrino* 32 (8-10), 1062-1078.

**Nagalski A., Kiersztan A.,** 2010. *Physiology and molecular mechanism of glucocorticoid action.* *Postepy Hig Med Dosw* 64, 133-145.

**Nakamura Y., Gang H.X., Suzuki T., Sasano H., Rainey W.E.,** 2009. *Adrenal changes associated with adrenarche.* *Rev Endocr Metab Disord* 10, 19–26.

**Naylor J.C., Hulette C.M., Steffens D.C., Shampine L.J., Ervin J.F., Payne V.M., Massing M.W., Kilts J.D., Strauss J.L., Calhoun P.S., Calnaido R.P., Blazer D.G., Lieberman J. A., Madison R.D., Marx C.E.,** 2008. *Cerebrospinal fluid dehydroepiandrosterone levels are correlated with brain dehydroepiandrosterone levels, elevated in Alzheimer's disease, and related to neuropathological disease stage.* *J Clin Endocrinol Metab* 93 (8), 3173–3178.

**Nelson R.W., Couto C.G.,** 1998. *Small animal internal medicine.* Lavoisier.fr.

**Okabe T., Haji M., Takayanagi R., Adachi M., Imasaki K., Kurimoto F., Watanabe T., Nawata H.,** 1995. *Up-regulation of high-affinity dehydroepiandrosterone binding activity by dehydroepiandrosterone in activated human T lymphocytes.* *J Clin Endocrinol Metab* 80 (10), 2993-2996.

**Orentreich N., Brind J.L., Rizer R.L., Vogelmann J.H.,** 1984. *Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood.* *J Clin Endocrinol Metab* 59 (3), 551-555.

**Orentreich N., Brind J.L., Vogelmann J.H., Andres R., Baldwin H.,** 1992. *Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulfate in normal men.* *J Clin Endocrinol Metab* 75 (4), 1002-1004.

**Otte C., Hart S., Neylan T.C., Marmar C.R., Yaffe K., Mohr D.C.,** 2005. *A meta-analysis of cortisol response to challenge in human aging: importance of gender.* *Psychoneuroendocrino* 30, 80–91.

**Overall K.L.**, 2000. *Natural animal models of human psychiatric conditions: assessment of mechanism and validity*. Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat 24, 727-776.

**Padgett D.A., Loria R.M.**, 1998. *Endocrine regulation of murine macrophage function: effects of dehydroepiandrosterone, androstenediol, and androstenediol*. J Neuroimmunol 84 (1), 61-68.

**Palazzolo D.L., Quadri S.K.**, 1987. *The effects of aging on the circadian rhythm of serum cortisol in the dog*. Exp Gerontol 22 (6), 379-387.

**Pardon M.C.**, 2007. *Stress and ageing interactions: A paradox in the context of shared etiological and physiopathological processes*. Brain Res Rev 54, 271-273.

**Parker C.R. Jr, Leveno K., Carr B.R., Hauth J., MacDonald P.C.**, 1982. *Umbilical cord plasma levels of dehydroepiandrosterone sulfate during human gestation*. J Clin Endocrinol Metab 54 (6), 1216-1220.

**Parker L.N., Lifrak E.T., Kawahara C.K., Geduld S.I., Kozbur X.M.**, 1983. *Angiotensin II potentiates ACTH-stimulated adrenal androgen secretion*. J Steroid Biochem 18 (2), 205-208.

**Parker C.R. Jr, Mixon R.L., Brissie R.M., Grizzle W.E.**, 1997. *Aging alters zonation in the adrenal cortex of men*. J Clin Endocrinol Metab 82, 3898-3901.

**Parker C.R. Jr**, 1999. *Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate production in the human adrenal during development and aging*. Steroids 64, 640-647.

**Pattison J.C., Saltzman W., Abbott D.H., Hogan B.K., Nguyen A.D., Husen B., Einspanier A., Conley A.J., Bird I.M.**, 2007. *Gender and gonadal status differences in zona reticularis expression in marmoset monkey adrenals: Cytochrome b5 localization with respect to cytochrome P450 17,20-lyase activity*. Mol Cell Endocrinol 265,266,93-101.

**Patronek G.J., Waters D.J., Glickman L.T.**, 1997. *Comparative longevity of pet dog and humans: implications for gerontology research*. J Gerontol A Biol Med Sci 52 (3), 171-178.

**Pawelec G., Solana R.,** 1997. *Immunosenescence*. Immunol Today 18 (11), 514-516.

**Pavlov E.P., Harman S.M., Chrousos G.P., Loriaux D.L., Blackman M.R.,** 1986. *Responses of plasma adrenocorticotropin, cortisol, and dehydroepiandrosterone to ovine corticotropin-releasing hormone in healthy aging men*. J Clin Endocrinol Metab 62 (4), 767-772.

**Pedersen W.A., Wan R., Mattson M.P.,** 2001. *Impact of aging on stress-responsive neuroendocrine systems*. Mech Ageing Dev 122 , 963–983.

**Pérez-Neri I., Montes S., Ojeda-López C., Ramírez-Bermúdez J., Ríos C.,** 2008. *Modulation of neurotransmitter systems by dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate: Mechanism of action and relevance to psychiatric disorders*. Progr Neuro-Psychoph 32, 1118–1130.

**Pessina P., Fernández-Foren A., Cueto E., Delucchi L., Castillo V., Meikle A.,** 2009. *Cortisol secretion after adrenocorticotrophin (ACTH) and dexamethasone tests in healthy female and male dogs*. Acta Vet Scand, 51:33.

**Piazza J.R., Almeida D.M., Dmitrieva N.O., Klein L.C.,** 2010. *Frontiers in the Use of Biomarkers of Health in Research on Stress and Aging*. J Gerontol Psychological Sci, 65B (5), 513–525.

**Pieper D.R., Lobocki C.A.,** 2000. *Characterization of serum dehydroepiandrosterone secretion in golden hamsters*. Proc Soc Exp Biol Med 224 (4), 278-84.

**Pisarska M., Mulchahey J.J., Welge J.A., Geraciotti T.D. Jr., Kasckow J.W.,** 2000. *Age-related alterations in emotional behaviors and amygdalar corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF-binding protein expression in aged Fischer 344 rats*. Brain Res 877, 184–190.

**Pongracz M., Miklòsi A., Vida V., Csányi V.,** 2005. *The pet dogs' ability for learning from a human demonstrator in a detour task is independent from the breed and age*. Appl Anim Beh Sci 90, 309-323.

**Queiroga F.L., Pérez-Alenza M.D., Silvan G., Peña L., Lopes C., Illera J.C.,** 2005. *Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer*. J Steroid Biochem 94, 181–187.

**Queiroga F.L., Pérez-Alenza D., Silvan G., Peña L., Illera J.C.,** 2009. *Positive correlation of steroid hormones and EGF in canine mammary cancer.* J Steroid Biochem 115, 9–13.

**Rainey W.E., Rehman K.S., Carr B.R.,** 2004. *The human fetal adrenal: making adrenal androgens for placental estrogens.* Semin Reprod Med 22 (4), 327-336.

**Rasmusson A.M., Pinna G., Paliwal P., Weisman D., Gottschalk C., Charney D., Krystal J., Guidotti A.,** 2006. *Decreased cerebrospinal fluid allopregnanolone levels in women with posttraumatic stress disorder.* Biol Psychiatry 60, 704–713.

**Reiter E.O., Fuldauer V.G., Root A.W.,** 1977. *Secretion of the adrenal androgen, dehydroepiandrosterone sulfate, during normal infancy, childhood, and adolescence, in sick infants, and in children with endocrinologic abnormalities.* J Pediatr 90 (5), 766-770.

**Reimers T.J., Lawler D.F., Sutaria P.M., Correa M.T., Erb H.N.,** 1990. *Effects of age, sex, and body size on serum concentrations of thyroid and adrenocortical hormones in dogs.* Am J Vet Res 51 (3), 454-457.

**Remer T., Hintelmann A., Manz F.,** 1994. *Measurement of urinary androgen sulfates without previous hydrolysis: a tool to investigate adrenarche. Determination of total 17-ketosteroid sulfates.* Steroids 59 (1), 16-21.

**Remer T., Boye K.R., Hartmann M.F., Wudy S.A.,** 2005. *Urinary markers of adrenarche: reference values in healthy subjects, aged 3-18 years.* J Clin Endocrinol Metab 90 (4), 2015-2021.

**Reul J.M., de Kloet E.R.,** 1985. *Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation.* Endocrinology 117 (6), 2505-2511.

**Reul J.M.H.M., Rothuizen J., de Kloet E.R.,** 1991. *Age-related changes in the dog hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: Neuroendocrine activity and corticosteroid receptors.* J Steroid Biochem 40 (1-3), 63-69.

**Revskey S., Redei E.,** 2000. *Decreased in vitro sensitivity to dexamethasone in corticotropes from middle-age rats.* Exp Gerontol 35, 237–242.

**Riad-Fahmy D., Read G.F., Walker R.F., Griffiths K.,** 1982. *Steroids in saliva for assessing endocrine function.* Endocr Rev (3), 367-395.



**Rijnberk A., der Kinderen P.J., Thijssen J.H.,** 1968. *Endocrine diseases in dogs and cats: similarities and differences with endocrine diseases in humans.* Growth Horm IGF Res 13, 158-164.

**Ritsner M., Maayan R., Gibel A., Strous R.D., Modai I., Weizman A.,** 2004. *Elevation of the cortisol/dehydroepiandrosterone ratio in schizophrenia patients.* Eur Neuropsychopharm 14, 267– 227.

**Ritsner M., Maayan R., Gibel A., Weizman A.,** 2007. *Differences in blood pregnenolone and dehydroepiandrosterone levels between schizophrenia patients and healthy subjects.* Eur Neuropsychopharm 17, 358—365.

**Robel P., Synguelakis M., Halberg F., Baulieu E.E.,** 1986. *Persistence of the circadian rhythm of dehydroepiandrosterone in the brain, but not in the plasma, of castrated and adrenalectomized rats.* C R Acad Sci III 303 (6), 235-238.

**Rosenfeld R.S., Rosenberg B.J., Fukushima D.K., Hellman L.,** 1975. *24-Hour secretory pattern of dehydroisoandrosterone and dehydroisoandrosterone sulfate.* J Clin Endocrinol Metab 40 (5), 850-855.

**Rota A, Mollo A, Marinelli L, Gabai G, Vincenti L.,** 2003. *Evaluation of cabergoline and buserelin efficacy for oestrous induction in the bitch.* Reprod Domest Anim 38 (6), 440-443.

**Rothuizen J., Reul J.M., van Sluijs F.J., Mol J.A., Rijnberk A., de Kloet E.R.,** 1993. *Increased neuroendocrine reactivity and decreased brain mineralocorticoid receptor-binding capacity in aged dogs.* Endocrinology 132 (1), 161-168.

**Rosado B., García-Belenguer S., León M., Chacón G., Villegas A., Palacio J.,** 2010. *Blood concentrations of serotonin, cortisol and dehydroepiandrosterone in aggressive dogs.* Appl Anim Beh Sci 123, 124-130.

**Rudman D., Shetty K.R., Mattson D.E.,** 1990. *Plasma dehydroepiandrosterone sulfate in nursing home men.* J Am Geriatr Soc 38, 421–427.

**Ruehl W.W., Bruyette D.S., DePaoli A., Cotman C.W., Head E., Milgram N.W., Cummings B.J.,** 1995. *Canine cognitive dysfunction as a model for human age-related cognitive decline, dementia and Alzheimer's disease: clinical presentation,*

*cognitive testing, pathology and response to 1-deprenyl therapy.* Prog Brain Res 106, 217-225.

**Safiulina D., Peet N., Seppet E., Zharkovsky A., Kaasik A.,** 2006. *Dehydroepiandrosterone inhibits complex I of the mitochondrial respiratory chain and is neurotoxic in vitro and in vivo at high concentrations.* Toxicol Sci 93 (2), 348-356.

**Sapolsky R.M., Krey L.C., McEwen B.S.,** 1985. *Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging.* J Neurosci 5 (5), 1222-1227.

**Sapolsky R.M., Krey L.C., McEwen B.S.,** 1986. *The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis.* Endocr Rev 7 (3), 284-301.

**Sapolsky R.M.,** 1996. *Stress, glucocorticoids, and damage to the nervous system: the current state of confusion.* Stress. 1 (1), 1-19.

**Sarasa M., Pesini P.,** 2009. *Natural non-transgenic animal models for research in Alzheimer's disease.* Curr Alzheimer Res 6 (2), 171-178.

**Sasano H., Imatani A., Shizawa S., Suzuki T., Nagura H.,** 1995. *Cell proliferation and apoptosis in normal and pathologic human adrenal.* Modern Pathol 8, 11-17.

**Schiebinger R.J., Albertson B.D., Barnes K.M., Cutler G.B. Jr., Loriaux D.L.,** 1981a. *Developmental changes in rabbit and dog adrenal function: a possible homologue of adrenarche in the dog.* Am J Physiol 240 (6), 694-699.

**Schiebinger R.J., Albertson B.D., Cassorla F.G., Bowyer D.W., Geelhoed G.W., Cutler G.B. Jr., Loriaux D.L.,** 1981b. *The developmental changes in plasma adrenal androgens during infancy and adrenarche are associated with changing activities of adrenal microsomal 17-hydroxylase and 17,20-desmolase.* The American Society for Clinical Investigation 67, 1177-1182.

**Seeman T.E., Robbins R.J.,** 1994. *Aging and hypothalamic-pituitary-adrenal response to challenge in humans.* Endocr Rev 15 (2), 233-260.

**Sher L., Oquendo M.A., Galfalvy H.C., Cooper T.B., Mann J.J.,** 2004. *Age effects on cortisol levels in depressed patients with and without comorbid post-traumatic stress disorder, and healthy volunteers.* J Affect Disorders 82, 53-59.

**Siiteri P.K., MacDonald P.C.,** 1966. *Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy.* J Clin Endocrinol Metab 26 (7), 751-761.

**Simoncini T., Mannella P., Fornari L., Varone G., Caruso A., Genazzani A.R.,** 2003. *Dehydroepiandrosterone Modulates Endothelial Nitric Oxide Synthesis Via Direct Genomic and Nongenomic Mechanisms.* Endocrinology 144, 3449-3455.

**Smiley L.E., Peterson M.E.,** 1993. *Evaluation of a urine cortisol:creatinine ratio as a screening test for hyperadrenocorticism in dogs.* J Vet Intern Med 7 (3),163-168.

**Smith M.R., Rudd B.T., Shirley A., Rayner P.H., Williams J.W., Duignan N.M., Bertrand P.V.,** 1975. *A radioimmunoassay for the estimation of serum dehydroepiandrosterone sulphate in normal and pathological sera.* Clin Chim Acta 65 (1), 5-13.

**Sorwell K.G., Urbanski H.F.,** 2010. *Dehydroepiandrosterone and age-related cognitive decline.* Age (Dordr) 32 (1), 61-67.

**Sousa A., Ticku M.K.,** 1997. *Interactions of the neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate with the GABA(A) receptor complex reveals that it may act via the picrotoxin site.* J Pharmacol Exp Ther 282 (2), 827-833.

**Spencer N.F.L., Norton S.D., Harrison L.L., Li G.Z., Daynes R.A.,** 1996. *Dysregulation of il-10 production with aging: possible linkage to the age-associated decline in DHEA and its sulfated derivative.* Exp Gerontol 31 (3), 393-408.

**Stephen J.M., Ledger R.A.,** 2006. *A longitudinal evaluation of urinary cortisol in kenneled dogs, Canis familiaris.* Physiol Behav 87, 911-916.

**Strasser A., Niedermüller H., Hofecker G., Laber G.,** 1993. *The effect of aging on laboratory values in dogs.* J Am Vet Med Assoc 40, 720-730.

**Straub R. H., Vogl D., Gross V., Lang B., Schölmerich J., Andus T.,** 1998. *Association of humoral markers of inflammation and dehydroepiandrosterone sulfate or cortisol serum levels in patients with chronic inflammatory bowel disease.* Am J Gastroenterol 93 (11), 2197-2202.

**Studzinski C.M., Araujo J.A., Milgram N.W.,** 2005. *The canine model of human cognitive aging and dementia: Pharmacological validity of the model for assessment of human cognitive-enhancing drugs.* Progr Neuro-Psychoph 29, 489-498.

**Suárez C., Vela J., García-Tornadú I., Becu-Villalobos D.,** 2005. *Dehydroepiandrosterone (DHEA) modulates GHRH, somatostatin and angiotensin II action at the pituitary level.* J Endocrinol 185(1), 165-172.

**Sugihara H.,** 1977. *Differentiation of the fetal adrenal cortex of rats-its experimental observation in vivo.* Acta Pathol Jpn 27 (6), 759-773.

**Sulcová J., Hill M., Hampl R., Stárka L.,** 1997. *Age and sex related differences in serum levels of unconjugated dehydroepiandrosterone and its sulphate in normal subjects.* J Endocrinol 154 (1), 57-62.

**Suzuki T., Suzuki N., Daynes R.A., Engleman E.G.,** 1991. *Dehydroepiandrosterone enhances IL2 production and cytotoxic effector function of human T cells.* Clin Immunol Immunopathol 61(2 Pt 1) 202-211.

**Suzuki T., Sasano H., Takeyama J., Kaneko C., Freije W.A., Carr B.R., Rainey W.E.,** 2000. *Developmental changes in steroidogenic enzymes in human postnatal adrenal cortex: immunohistochemical studies.* Clin Endocrinol (Oxf) 53 (6), 739-747.

**Suzuki M., Wright L.S., Marwah P., Lardy H.A., Svendsen C.N.,** 2004. *Mitotic and neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on human neural stem cell cultures derived from the fetal cortex.* Proc Natl Acad Sci USA 101 (9), 3202-3207.

**Svec F.,** 1997. *Ageing and adrenal cortical function.* Baillieres Clin Endocrinol Metab 11 (2), 271-287.

**Swenson M.J., Reece W.O.,** 2002. *Duke's Fisiologia degli animali domestici.* Edizioni Idelson-Gnocchi, 736-769.

**Takahashi Y., Ebihara S., Nakamura Y., Takahashi K.,** 1981. *A model of human sleep-related growth hormone secretion in dogs: effects of 3, 6, and 12 hours of forced wakefulness on plasma growth hormone, cortisol, and sleep stages.* Endocrinology 109, 262-272.

**Tamasi V., Miller K.K.M., Ripp S.L., Vila E., Geoghagen T.E., Prough R.A.,** 2008. *Modulation of receptor phosphorylation contributes to activation of peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  by dehydroepiandrosterone and other peroxisome proliferators.* Mol Pharmacol 73 (3), 968-976.

- Tannenbaum C., Barrett-Connor E., Laughlin G.A., Platt R.W.,** 2004. *A longitudinal study of dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) change in older men and women: the Rancho Bernardo Study.* Eur J Endocrinol 151, 717–725.
- Tchernof A., Labrie F.,** 2004. *Dehydroepiandrosterone, obesity and cardiovascular disease risk: a review of human studies.* Eur J Endocrinol 151, 1–14.
- Topál J., Miklósi Á., Csányi V., Doka, A.,** 1998. *Attachment behaviour in dogs (Canis familiaris): A new application of Ainsworth's (1969) Strange Situation Test.* J Comp Psych 112, 219-229.
- Travers S.H., Labarta J.I., Gargosky S.E., Rosenfeld R.G., Jeffers B.W., Eckel R.H.,** 1998. *Insulin-like growth factor binding protein-I levels are strongly associated with insulin sensitivity and obesity in early pubertal children.* J Clin Endocrinol Metab 83, 1935–1939.
- Tremblay Y., Belanger A.,** 1984. *Effect of acute administration on plasma steroid levels in the dog.* Steroids 44 (1), 57-66.
- Valenti G.,** 2002. *Adrenopause: an imbalance between dehydroepiandrosterone (DHEA) and cortisol secretion.* J Endocrinol Invest 25 (10 Suppl), 29-35.
- Valenti G.,** 2004. *Neuroendocrine hypothesis of aging: the role of corticoadrenal steroids.* J Endocrinol Invest 27 (Suppl 6), 62-63.
- Vallée M., Mayo W., Le Moal M.,** 2001. *Role of pregnenolone, dehydroepiandrosterone and their sulfate esters on learning and memory in cognitive aging.* Brain Res Rev 37, 301–312.
- Vallortigara G.,** 2000. *Altre menti. Lo studio comparato della cognizione animale.* Il Mulino, 324-325.
- Van Cauter E., Leproult R., Kupfer D.J.,** 1996. *Effects of gender and age on the levels and circadian rhythmicity of plasma cortisol.* J Clin Endocrinol Metab 81(7), 2468-2473.
- van Weerden W.M., Bierings H.G., van Steenbrugge G.J., de Jong F.H., Schröder F.H.,** 1992. *Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens.* Life Sci 50 (12), 857-861.

**Veronesi M.C., Battocchio M., Marinelli L., Faustini M., Kindahl H., Cairoli F.,** 2002. *Correlations among body temperature, plasma progesterone, cortisol and prostaglandin F<sub>2a</sub> of parturient bitch.* J Vet Med 49, 264-268.

**Vincent I.C., Michell A.R.,** 1992. *Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs.* Res Vet Sci 53 (3), 342-345.

**Vining R.F., McGinley R., Rice B.V.,** 1983. *Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortisol function than serum cortisol.* Ann Clin Biochem (20), 329-336.

**Watson D.,** 1996. *Longevity and diet.* Vet Rec, 3-71.

**Webb S.J., Geoghegan T.E., Prough R.A., Miller K.K.M.,** 2006. *The biological actions of dehydroepiandrosterone involves multiple receptors.* Drug Metab Rev 38 (1-2), 89-116.

**Weber A., Clark A.J., Perry L.A., Honour J.W., Savage M.O.,** 1997. *Diminished adrenal androgen secretion in familial glucocorticoid deficiency implicates a significant role for ACTH in the induction of adrenarche.* Clin Endocrinol (Oxf) 46 (4), 431-437.

**Weill-Engerer S., David J.P., Sazdovitch V., Liere P., Eychenne B., Pianos A., Schumacher M., Delacourte A., Baulieu E.E., Akwa Y.,** 2002. *Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients.* J Clin Endocrinol Metab 87, 5138-5143.

**Weinberger C., Hollenberg S.M., Rosenfeld M.G., Evans R.M.,** 1985. *Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the v-erb-A oncogene product.* Nature 318 (6047), 670-672.

**Weitzman E.D., Fukushima D., Nogeire C., Roffwarg H., Gallagher T.F., Hellman L.,** 1971. *Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects.* J Clin Endocrinol Metab 33 (1), 14-22.

**Wenger-Riggenbach B., Boretti F.S., Quante S., Schellenberg S., Reusch C.E., Sieber-Ruckstuhl N.S.,** 2010. *Salivary cortisol concentrations in healthy dogs and dogs with hypercortisolism.* Vet Intern Med 24 (3), 551-556.

**Wichmann U., Wichmann G., Krause W.,** 1984. *Serum levels of testosterone precursors, testosterone and estradiol in 10 animal species.* Exp Clin Endocrinol 83 (3), 283-290.

**Widstrom R.L., Dillon J.S.,** 2004. *Is there a receptor for dehydroepiandrosterone or dehydroepiandrosterone sulfate?* Semin Reprod Med 22 (4), 289-298.

**Wickler W.,** 1976. *The ethological analysis of Attachment: sociometric motivational and sociophysiological aspects.* Zeitschrift fur tierpsychologie 42, 133-150.

**Wilkinson C.W., Peskind E.R., Raskind M.A.,** 1997. *Decreased hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitivity to cortisol feedback inhibition in human aging.*

**Williams M.R.I., Ling S., Dawood T., Hashimura K., Dai A., Li H., Liu J.P., Funder J.W., Sudhir K., Komesaroff P.A.,** 2002. *Dehydroepiandrosterone Inhibits Human Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Independent of ARs and ERs.* J Clin Endocrinol Metab 87, 176-181.

**Wolf O.T., Köster B., Kirschbaum C., Pietrowsky R., Kern W., Hellhammer D.H., Born J., Fehm H.L.,** 1997. *A Single administration of dehydroepiandrosterone does not enhance memory performance in young healthy adults, but immediately reduces cortisol levels.* Biol Psychiatry 42, 845–848.

**Wolf O.T., Kirschbaum C.,** 1999. *Actions of dehydroepiandrosterone and its sulfate in the central nervous system: effects on cognition and emotion in animals and humans.* Brain Res Rev 30, 264–288.

**Wood P.,** 2009. *Salivary steroid assay – research or routine ?* Ann Clin Biochem (46), 183-196.

**Yen S.S., Laughlin G.A.,** 1998. *Aging and the adrenal cortex.* Exp Gerontol 33 (7-8), 897-910.

**Young J., Couzinet B., Nahoul K., Brailly S., Chanson P., Baulieu E.E., Schaison G.,** 1997. *Panhypopituitarism as a Model to Study the Metabolism of Dehydroepiandrosterone.* J Clin Endocrinol Metab 82, 2578-2585.

**Young E.A., Abelson J., Lightman S.L.,** 2004. *Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health.* Front Neuroendocrin 25, 69–76.

**Zhang L., Li B., Ma W., Barker J.L., Chang Y.H., Zhao W., Rubinow D.R.,** 2002. *Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated derivative (DHEAS) regulate apoptosis during neurogenesis by triggering the Akt signaling pathway in opposing ways.* Mol Brain Res 98, 58–66.

**Zanchi N.E., De Siqueira Filho M.A., Felitti V., Nicastro H., Lorenzetti F.M., Lancha A.H.Jr.,** 2010. *Glucocorticoids: Extensive physiological actions modulated through multiple mechanisms of gene regulation.* J Cell Physiol 224, 311–315.

**Siti web consultati:**

<http://users.pullman.com/lostriver/longhome.htm>

<http://intl.elsevierhealth.com.vet>



---

**DATA DEL PRELIEVO**

...../...../.....

Temperatura ambientale (°C) .....

Ora del prelievo .....

---

**DATI DEL PROPRIETARIO**

Nome .....

Cognome .....

Indirizzo .....

Città .....

Recapito telefonico/Fax .....

E-mail .....

---

**DATI DEL CANE**

ID .....

Nome .....

Sesso .....

Razza .....

Peso (kg) .....

Altezza al garrese (cm) .....

Data di nascita .....

Gonadectomia  si  no      Data .....

Condizione riproduttiva      Femmina:  anestro  proestro  estro  
 diestro  gravidanza  lattazione

Data relativa all'ultimo calore ...../...../.....

Giorno d'inizio delle perdite ematiche ...../...../.....

Patologie note  no  si

Tipo di patologia .....

Terapia .....

Posologia .....

---

**NOTE/COMMENTI**

---

**Allegato 1.** Scheda di raccolta dati.

