

NUOVO APPROCCIO NON INVASIVO PER LA VALUTAZIONE DEL BENESSERE ANIMALE

Prandi A., Comin A., Peric T., Montillo M., Omodeo S.G.

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEGLI ALIMENTI, Sezione di Fisiologia Animale e Nutrizione -
Università degli Studi di Udine

Riassunto

Lo studio degli andamenti dei principali steroidi coinvolti nei processi fisiologici quali accrescimento, riproduzione, controllo del metabolismo e adattamento dell'organismo all'ambiente si basano su campioni biologici quali sangue, urine, saliva, feci e latte. Da tempo nel nostro laboratorio sono stati messi a punto dosaggi in grado di determinare questi steroidi in tutti i tipi di campioni biologici sopra descritti. Queste metodiche sono risultate particolarmente utili per studiare l'attività riproduttiva. In particolare quelli messi a punto sul latte hanno permesso di studiare, su vasta scala, aspetti legati alla funzionalità ovarica in diverse specie quali capre, pecore e bovino. Negli ultimi anni il nostro laboratorio si è dedicato allo studio del cortisolo, principale ormone attivo dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. La misura dell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) è l'approccio standard allo studio dello stress e del benessere animale negli animali domestici. Il cortisolo è fortemente condizionato dalle variazioni ambientali. Le operazioni di contenimento, necessarie per un prelievo di sangue, possono alterare in modo significativo i livelli ormonali e invalidare così i risultati. Per questa ragione abbiamo deciso di studiare questo steroido nei capelli e nei peli. Questo campione biologico risulta particolarmente interessante in quanto il cortisolo ematico viene incorporato all'interno del pelo o del cappello in accrescimento. Il cortisolo ematico si lega alla cheratina e i peli che, una volta fuorusciti dalla cute subiscono un essiccamento che stabilizza il legame. Lo studio degli steroidi in tricologia è già praticato in medicina umana. La scelta di questo campione biologico offre diversi vantaggi. I livelli di cortisolo presenti nel pelo non sono infatti influenzati dalle variazioni giornaliere. Questo permette quindi di non essere legati ad uno specifico orario di prelievo nel caso si vogliano studiare le variazioni su più giorni per ottenere un profilo. Il prelievo risulta non invasivo ed è facile da conservare e inviare al laboratorio. Non necessita, infatti, di essere refrigerato e l'unica accortezza è quella di mantenerlo asciutto. È molto importante, però, tenere presente le modalità con cui crescono capelli e peli. La raccolta di un campione di capelli o peli comporta la presenza di una popolazione mista di capelli o peli: quelli che hanno cessato di crescere e quelli che sono ancora in fase di crescita. I livelli ormonali trovati in questo campione daranno informazioni su un arco temporale ampio (mesi, settimane). Non possiamo infatti sapere quanto dei livelli degli ormoni esaminati derivi dai capelli o peli che hanno cessato la crescita e sono in una fase di latenza, e quanto invece derivi da capelli o peli che stanno ancora crescendo. Avremo però la possibilità di valutare se vi sia stata, in passato, una eccessiva o insufficiente attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e ciò potrebbe risultare molto utile durante l'indagine anamnestica. Per avere, invece, una maggiore correlazione tra i livelli di cortisolo in tricologia e le variazioni ambientali è necessario che il campione sia ottenuto soltanto da capelli o peli in crescita e quindi provenienti da una zona precedentemente rasata. Si potranno così ottenere indicazioni sui livelli riferibili a periodi definiti. Una rasatura giornaliera, invece, potrà dare indicazioni sui livelli delle ultime ventiquattr'ore. Questo approccio introduce flessibilità nelle procedure di prelievo, conservazione e invio dei campioni. Inoltre potrebbe essere molto utile in studi estensivi atti a valutare le risposte dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene a variazioni dell'ambiente. Lo studio del cortisolo in tricologia è un importante ausilio di carattere oggettivo nella valutazione dell'adattamento dell'organismo all'ambiente e, quindi, utile nelle valutazioni dello stato di benessere.

Abstract

Non-invasive assessment of animal welfare - *The study of trends in major steroids involved in physiological processes such as growth, reproduction, control of metabolism and adaption to the environment are based on biological samples such as blood, urine, saliva, feces and milk. Cortisol determination can be useful to evaluate HPA particularly when we have to evaluate the responses to stress and welfare in domestic animals. Cortisol is strongly influenced by environmental changes. Sampling for a blood test can significantly alter the hormonal levels and thus invalidate the results. For this reason we decided to study this steroid in the hair. This biological sample is particularly interesting because blood cortisol is incorporated into the growing hair. The blood cortisol binds to the keratin. This pathway comes to an end as the hair cell become keratinized and dehydrated. The study of steroids in trichology is already in use in human medicine. The choice of this biological sample offers several advantages. The levels of cortisol in the hair are not affected by the hormone daily biorhythm. This allows independence of the time of withdrawal in the study of the hormonal profile. The sampling is not invasive and is easy to store and send to the laboratory. It does not need to be refrigerated and only care is to keep it dry. It is very important, however, know grow hair. The collection of a sample of hair implies the presence of a mixed population of hair: those who are in telogen phase and those who are in anagen phase. The hormone levels found in this sample will give information on a wide time span (months, weeks). We can not in fact know what the levels of hormones derived from hairs no longer growth and are in a resting phase (telogen phase) and how much from hairs that are still growing (anagen phase). However we will have the opportunity to assess whether there has been in the past excessive or insufficient activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and this could be very useful during the anamnestic investigation. To have a greater correlation between hair cortisol levels and environmental changes is necessary that the sample is obtained only by hairs growing and then from an area previously shaved. So it can be obtained information about level at defined periods. A shave daily can give indications on the levels of the last twenty-four hours. This approach introduces flexibility in the procedures for collection, storage and shipment of samples. This assay can be very useful in extensive studies to evaluate the responses of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to environmental changes. The hair cortisol study is an important objective help in the assessment of the organism adaptation to the environment, so helpful in assessing the state of welfare.*

Introduzione

Possiamo definire il benessere come uno stato psicologico soggettivo dell'individuo in relazione al suo ambiente interno ed esterno (Fraser, 1999; Rushen, 2003). C'è una notevole differenza tra percezione sensoriale negli animali e nell'uomo; la nostra definizione di benessere, infatti, è spesso antropomorfa. Non potendo ancora leggere le emozioni degli animali cerchiamo di dedurle attraverso studi fisiologici e fisiopatologici che riguardano le emozioni, lo stress, l'adattamento (Dantzer and Mormède, 1983). La misura dell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) è l'approccio standard allo studio dello stress e del benessere animale. Il principale ormone attivo dell'asse nei bovini, pecore, maiali è il cortisolo. E' un glucocorticoide che modula un ampio range di effetti fisiologici. E' prodotto principalmente dalla corteccia surrenale in risposta all'ACTH, un ormone ipofisario che a sua volta è regolato dal CRH, un release hormone ipotalamico (Guyton and Hall 2006). Tutti questi processi insieme formano l'asse HPA. L'attività di tale asse è molto variabile. Infatti la secrezione di cortisolo risulta essere pulsatile con una periodicità di circa 90 min (Follenius et al., 1987), presenta dei ritmi circadiani con un picco di produzione al mattino e una riduzione nel pomeriggio e alla sera (Lefcourt et al., 1993) ed è anche influenzata da fattori ambientali quali temperatura, umidità, fotoperiodo (Marple et al, 1972; Al-Busaidi

et al., 2008). Tutti questi fattori ambientali assieme a quelli genetici e di stato fisiologico tipici dell'animale, concorrono a modificare l'attività dell'asse HPA (Guyton and Hall, 2006). Vari stressori fisici o psicologici possono aumentare i livelli basali di cortisolo (Dickerson and Kemeny, 2004). Il cortisolo è un ormone chiave nella risposta fisiologica allo stress ed è normalmente determinato in campioni di sangue, urina e feci (Hay and Mormède, 1998; Mostl et al., 2002a; Negro et al., 2004). Il dosaggio nel sangue, nella saliva e nell'urina comporta problemi in quanto la necessità di contenere l'animale durante il prelievo può causare stress ed alterare i livelli di cortisolo (Creel et al. 92). Le concentrazioni di cortisolo nel sangue e nella saliva possono essere alterate anche dalle variazioni circadiane, dall'ingestione e da qualsiasi disturbo ambientale prima del prelievo. I campioni di feci offrono il vantaggio di una raccolta non invasiva ma il dosaggio del cortisolo e dei suoi metaboliti non è senza problemi a causa di importanti differenze fra specie (proporzione di metaboliti del cortisolo escreti con le feci; intervallo tra rilascio di cortisolo e sua escrezione nelle feci; principali metaboliti escreti nelle feci) (Palme R., 2005, Mostl E and Palme R., 2002b). Queste matrici biologiche, una volta raccolte, devono essere trasportate refrigerate o congelate, condizioni che sono spesso difficili da ottenere in campo (Yang et al., 1998). Inoltre, per uno studio a lungo termine dell'attività dell'asse HPA, tutti questi approcci richiedono ripetuti campionamenti dello stesso soggetto.

Una sorgente alternativa di cortisolo è il pelo, matrice biologica che può essere raccolta non invasivamente e che può essere utilizzata per campionare un ampio numero di animali. Da oltre due decenni questa matrice è stata utilizzata in tossicologia forense, tossicologia clinica, medicina del lavoro, controllo del doping per dosare droghe e altre sostanze illegali (Kintz, 2003). Il pelo come sorgente di analiti ha suscitato molto interesse anche in campo psicologico, comportamentale e sociale per il suo utilizzo nel dosaggio di corticosteroidi e ormoni sessuali. L'interesse è focalizzato soprattutto sul fatto che a differenza di altre matrici biologiche, il pelo fornisce informazioni a lungo termine che permettono di ricostruire quella che è stata la storia dell'individuo alcuni mesi antecedenti il prelievo. Rasature e ricampionamenti di peli nella stessa area consentono di monitorare i livelli di cortisolo per settimane o mesi fornendo una "finestra sul passato". Altri vantaggi di questa matrice riguardano la facilità di stoccaggio (a temperatura ambiente) e trasporto (via posta). L'analisi del cortisolo nel pelo non è influenzata dallo stress di cattura o contenimento dell'animale e il bioritmo circadiano dell'ormone viene annullato in quanto il valore trovato nel pelo rappresenta il valore temporale medio. Per quanto riguarda l'influenza della temperatura e fotoperiodo attualmente non è noto se i livelli di cortisolo nel pelo variano durante le varie stagioni (Sauvè et al., 2007), eventuali differenze dovrebbero essere meglio studiate confrontando situazioni opposte di fotoperiodo e temperatura.

Incorporazione delle sostanze nel pelo

Il preciso meccanismo coinvolto nell'incorporazione degli steroidi nel pelo non è ancora chiaro e richiede ulteriori indagini. Sono stati proposti alcuni model-

li. Il modello tipico di incorporazione prevede una incorporazione per diffusione passiva dai capillari ematici che circondano le cellule del pelo in crescita (fase anagen). L'incorporazione ha fine con la cheratinizzazione e deidratazione delle cellule del pelo (Cone, 1996). Altri modelli prevedono una incorporazione da compartimenti profondi della pelle durante la formazione del fusto del pelo o dalla ghiandola sebacea attaccata ad ogni follicolo pilifero o da vicine ghiandole sudoripare che bagnano il fusto del pelo in crescita per diversi giorni prima che esso emerga dalla pelle. Inoltre sostanze potrebbero depositarsi dall'ambiente esterno. Questo modello che interessa più compartimenti è stato specificatamente dimostrato da Henderson (1993) e generalmente accettato nella pratica (Pragst et al, 1998; Kintz, 2004). La diffusione è amplificata da una elevata solubilità dei lipidi e da un basso legame proteico che suggerisce un preferenziale deposito di molecole in forma libera rispetto a quelle legate a proteine. Per questo motivo i livelli degli steroidi dosati nel pelo riflettono la parte libera dello steroide presente in circolo. Ormoni, droghe e altri composti verrebbero incorporati e bloccati nel pelo in crescita. Questo ha fatto ipotizzare che misurazioni dell'ormone in distinti segmenti di pelo potrebbero fornire un calendario retrospettivo della produzione di ormone. La conservazione e la stabilità di una sostanza nel pelo dipende però da alcuni fattori come la natura chimica del composto, dal suo metabolismo nel pelo e dalle condizioni fisiche del pelo. Le concentrazioni rilevabili all'interno della sua struttura non subiscono variazioni nel tempo una volta che il capello è emerso dalla cute. Non è quindi possibile che avvenga una diluizione dell'ormone nell'intera lunghezza del pelo, come testimoniano Kirschbaum et al. (2009) nel loro studio. Essi prelevano dei capelli in donne che hanno partorito da 9 mesi e, tramite sezioni di 1 cm l'una, riescono a ricostruire una sorta di calendario restrospettivo della produzione di cortisolo, identificando perfettamente il periodo di inizio della secrezione di cortisolo (il capello umano cresce infatti di 1 cm al mese). Sauvé et al (2007) hanno trovato che capelli trattati con coloranti avevano livelli più bassi di cortisolo rispetto a quelli non trattati e questo potrebbe alterare il dato.

Data la natura preliminare di questi studi non sorprende la presenza di risultati a volte contrastanti dovuti forse all'utilizzo di metodologie diverse soprattutto per quanto riguarda la preparazione del campione e il metodo di dosaggio. Davenport et al. (2006) ha messo a punto una precisa metodica che riguarda le procedure di raccolta, lavaggio ed estrazione del campione seguita poi anche da altri autori. Anche il nostro gruppo di lavoro che da qualche anno studia i livelli di cortisolo e di alcuni ormoni sessuali in questa matrice ha utilizzato tali procedure modificandole e adattandole al dosaggio utilizzato.

Cortisolo nel pelo e attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene

Diversi ricercatori hanno cercato di determinare se l'attività dell'asse HPA, sia basale che in risposta a uno stress cronico, poteva attendibilmente essere valutata mediante il livello di cortisolo nel capello o pelo.

Davenport et al. (2006), oltre a riportare aumentati livelli di cortisolo nel pelo in risposta a stress ambientali (rilocazione) in 20 *rhesus macaque monkeys*, han-

no sottolineato un'alta correlazione tra livelli di cortisolo nel pelo e nella saliva. Sauv  et al. (2007) hanno trovato che i livelli di cortisolo nel capello umano erano significativamente correlati con il cortisolo libero di urine di 24 ore, ma non con il cortisolo plasmatico e salivare di un solo prelievo. Accorsi et al. (2008) sottolineano una positiva correlazione tra concentrazioni di cortisolo nelle feci e nel pelo di cani e gatti. Anche se ulteriori studi sono necessari, questi studi rinforzano l'idea che il cortisolo dosato nel pelo derivi dallo stesso meccanismo di controllo che interessa anche i livelli di ormone in altre matrici biologiche e che possa essere interessato dai cambiamenti nell'asse HPA indotti dallo stress. Infatti, una positiva associazione dello stress con i livelli di cortisolo   stata trovata in diversi studi. Yamada et al. (2007) hanno osservato, in neonati ospedalizzati, livelli di cortisolo nel pelo pi  elevati rispetto a neonati sani a termine. Tali livelli erano anche sensibili all'esposizione ad un potenziale stressore. Anche Kalra et al. (2007) in uno studio condotto su donne gravide sane hanno registrato una positiva correlazione tra stress cronico e livelli di cortisolo nel pelo. Kirschbaum et al. (2009) hanno osservato pi  elevati livelli di cortisolo durante il terzo trimestre di gravidanza, un risultato che   coerente con il noto aumento dell'ormone in tale periodo.

L'analisi del cortisolo nel pelo appare sempre pi  come l'unico mezzo per una misurazione non invasiva dell'attivit  dell'asse HPA in risposta allo stress. L'affidabilit  di tali misurazioni dovr  comunque in futuro tenere conto anche di una produzione locale di cortisolo in quanto   stato trovato nella pelle e nel follicolo del pelo un organizzato asse HPA equivalente con produzione di CRF, POMC e cortisolo (Slominski and Wortsman, 2000). A tutt'ora non   conosciuto il grado di interessamento di questo sistema locale nella regolazione generale dell'asse HPA.

Applicazioni e utilit  in campo veterinario: alcuni esempi

La maggior parte degli studi sui livelli di cortisolo nel pelo o nel capello sono stati eseguiti su primati e sull'uomo. Questo dosaggio rappresenta un utile nuovo indice biologico per valutare l'attivazione dell'asse HPA. In campo umano tale indice ha trovato applicazione nella ricerca di stress cronico, in studi di psicoendocrinologia e in medicina del lavoro.

Pochi sono, invece, gli studi su animali domestici e piccoli animali. L'utilizzo di questa matrice in campo veterinario potrebbe essere utile per misurare facilmente ed in modo non invasivo l'attivit  dell'asse HPA in relazione a situazioni stressanti e al benessere dell'animale.

Il nostro gruppo di lavoro si occupa da alcuni anni di studiare il cortisolo nel pelo in diverse specie animali (Maiero et al., 2005; Comin et al., 2008; Montillo et al., 2009; Canavese et al., 2010). Dato che il cortisolo nel pelo fornisce una memoria storica che documenta l'attivit  dell'asse HPA, abbiamo indagato se era possibile utilizzarlo come potenziale marker biologico per valutare lo stress in conigli New Zealand White sottoposti ad artrodesi spinale rispetto a un gruppo di controllo *sham*. Tutti i conigli hanno avuto un

lieve incremento nelle concentrazioni di cortisolo dopo 10 giorni dall'arrivo in stabulario evidenziando come le procedure di trasporto e acclimatazione abbiano indotto una attivazione dell'asse HPA. I conigli operati hanno mostrato dei livelli di cortisolo più elevati rispetto ai controlli. Questi livelli sono rimasti elevati per 60 giorni. Dopo questo periodo sono progressivamente diminuiti fino a normalizzarsi. Esiste quindi una correlazione tra livelli elevati di cortisolo nel pelo e intensità dello stress chirurgico. Dai risultati ottenuti si è potuto, inoltre, osservare che il materiale impiantato non è risultato un fattore di stress in quanto i livelli di cortisolo due mesi dopo l'operazione erano simili nei due gruppi di conigli (Canavese et al., 2010). L'applicazione di tale metodica non invasiva in campo veterinario potrebbe essere un valido aiuto per migliorare le procedure di adattamento e manipolazione degli animali in stabulario e, quindi, il benessere.

L'attendibilità dell'utilizzo di questa matrice nella specie bovina e equina è stata confermata da due studi sui livelli di cortisolo nel pelo di vitelli e puledri durante il periodo neonatale e postnatale (Comin et al., 2008; Montillo et al., 2009). In accordo con i livelli trovati da altri autori nel plasma (Mastorakos and Ilias, 2003; Burdick et al., 2009; Silver and Fowden, 1994), le concentrazioni di cortisolo nel pelo di vitelli e puledri alla nascita sono risultate significativamente superiori a quelle trovate rispettivamente a sei mesi e a un mese di età testimoniando che il parto rappresenta uno dei momenti di maggiore attivazione dell'asse HPA. Questa tecnica non invasiva che non mette a rischio la sopravvivenza del feto ci consente di studiare il periodo prenatale e di valutare eventuali ripercussioni sulla salute e sulle prestazioni del neonato.

Uno studio da noi condotto su più di 500 bovine da latte ha evidenziato un ampio range di variazione nei livelli di cortisolo nel pelo che sottolineano una diversa attivazione dell'asse HPA. E' stato individuato un range nel quale le vacche clinicamente sane hanno la maggior probabilità di essere incluse (dati in pubblicazione). Il dosaggio del cortisolo nel pelo non deve essere considerato un mezzo per individuare animali malati ma potrebbe essere un utile e interessante metodo per un controllo estensivo di vacche da latte clinicamente sane al fine di individuare animali potenzialmente stressati che potrebbero sviluppare malattie. Tale metodica è risultata valida anche nello studio dei livelli di cortisolo in vacche da latte durante il passaggio dall'allevamento in stalla al pascolo di montagna (Comin et al., 2011) evidenziando, tramite la variazione dei livelli di cortisolo, un coinvolgimento dell'asse HPA. Uno studio approfondito e su grandi numeri potrebbe chiarire la risposta adattativa degli animali alle condizioni di montagna, correggere un management non idoneo per un appropriato rispetto del benessere animale.

Conclusioni

Questo dosaggio è molto interessante in quanto ci permette di avere indicazioni sui livelli di cortisolo e sullo stato di attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene riferibili a periodi antecedenti al prelievo (mesi, settimane o giorni). Ci

permette, quindi, di valutare se in passato ci sia stata un'eccessiva o insufficiente attivazione dell'asse HPA. Questo dato potrebbe risultare molto utile durante l'indagine anamnestica. Questo approccio permette una maggiore flessibilità per le procedure legate al prelievo e alla conservazione del campione. Il prelievo di pelo, infatti, non è invasivo ed il campione è facile da conservare e inviare al laboratorio. L'unica accortezza è di mantenerlo asciutto. Permette un utilizzo estensivo nella valutazione delle risposte dell'asse HPA a variazioni dell'ambiente. Lo studio del cortisolo in tricologia è un importante ausilio di carattere oggettivo nella valutazione dell'adattamento dell'organismo all'ambiente e, quindi, utile nelle valutazioni dello stato di benessere.

Bibliografia

- Accorsi P., Carloni E., Valsecchi P., Viggiani R., Gamberon M., Tamanini C., Seren E., 2008. *Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs*, Gen. Comp. Endocrinol., 155: 398-402.
- Al-busaidi, R., Johnson, E.H., Osman Mahgoub, S., 2008. *Seasonal variations of phagocytic response, immunoglobulin G (IgG) and plasma cortisol levels in Dhofari goat*. Small Rum. Res., 79: 118-123.
- Burdick N.C., Banta J.P., Neuendorff D.A., White J.C., Vann R.C., Laurenz J.C., Welsh T.H. Jr, Randel R.D., 2009. *Interrelationships among growth, endocrine, immune, and temperament variables in neonatal Brahman calves*. J Anim Sci., 87: 3202-10.
- Canavese F., Dimeglio A., Comin A., Granier M., Stebel M., Canavese B., Prandi A., 2010. *Le taux de cortisol dans les poils comme possible marqueur bio-clinique du stress : étude expérimental chez des lapines New Zealand White pré-pubertaire*. 12ème congrès de l'Association des Orthopédistes de Langue Française 22 au 26 juin 2010, Genève, Suisse
- Comin A., Tidu L., Cornacchia G., Cappa A., Renaville B., Prandi A., 2008. *Neonatal period and hair cortisol in cattle as a marker of stress*. Proceedings of the 16th Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants. Zadar, Croatia, pp 221-225.
- Comin A., Prandi A., Peric T., Corazzin M., Dovier S., Bovolenta S., 2011. *Hair cortisol levels in dairy cows from winter housing to summer prazing*, Liv. Sci., 138: 69-73.
- Cone E.J., 1996. *Mechanisms of drug incorporation into hair*. Ther. Drug Monit., 18: 438-443.
- Creel, S., Creel, N. M., Wildt, D. E. Monfort, S. L., 1992. *Behavioural and endocrine mechanisms of reproductive suppression in Serengeti dwarf mongooses*. Animal Behaviour, 43: 231-245.
- Dantzer R., Mormède P., 1983. *Stress in farm animals: a need for reevaluation*. J Anim Sci 57: 6-18.
- Davenport M.D., Tiefenbacher S., Lutz C.K., Novak M.A., Meyer J.S., 2006. *Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques*. General and Comparative Endocrinology., 147: 255-61.

- Dickerson, S.S., Kemeny, M. E., 2004. *Acute stressors and cortisol responses: A theoretical integration and synthesis of laboratory research*. Psychol. Bull., 130: 355-391.
- Follenius M., Simon C., Brandenberger G., Lenzi P., 1987. *Ultradian plasma corticotropin and cortisol rhythms: time-series analyses*. J Endocrinol Investig., 10: 261-6.
- Fraser D., 1999. *Animal ethics and animal welfare science: bridging the two cultures*. Appl Anim Behav Sci, 65: 171-89.
- Guyton AC, Hall JE: *Textbook of Medical Physiology*, Elsevier, Philadelphia, 2006.
- Hay, M., Mormède, P., 1998. *Urinary excretion of catecholamines, cortisol and their metabolites in Meishan and large white sows: validation as a non-invasive and integrative assessment of adrenocortical and sympathoadrenal axis activity*. Vet. Res., 29: 119-128.
- Henderson GL., 1993. *Mechanism of drug incorporation into hair*. Forensic Sci Int 1993;63: 19-29.
- Kalra S., Einarson A., Karaskov T., Van Uum S., Koren G., 2007 *The relationship between stress and hair cortisol in healthy pregnant women*. Clin. Invest. Med., 30: E100-104.
- Kintz P., 2003. *Testing for anabolic steroids in hair: a review*. Legal Medicine 5 (2003) S29-S33
- Kintz P., 2004. *Value of hair analysis in postmortem toxicology*. Forensic Sci Int., 142: 127-34.
- Kirschbaum, C., Tietze, A., Skoluda, N., Dettenborn, L., 2009. *Hair as a retrospective calendar of cortisol production—Increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy*. Psychoneuroendocrinology, 34: 32-37.
- Lefcourt A.M., Bitman J., Kahl S., Wood D.L., 1993. *Circadian and ultradian rhythms of peripheral cortisol concentrations in lactating dairy cows*. J Dairy Sci., 76: 2607-12.
- Marple D.N., Aberle E.D., Forrest J.C., Blake W.H., Judge M.D., 1972. *Effects of humidity and temperature on porcine plasma adrenal corticoids, ACTH and growth hormone levels*. J Anim Sci., 34: 809-12.
- Maiero S., Marchini E., Comin A., Renaville B., Prandi A., 2005. *Determination of cortisol in hair as indicator of long-term stress in Simmenthal dairy cows*. Reprod. Dom. Anim., 40: 396.
- Mastorakos, G., I. Ilias. 2003. *Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and parturition*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 997: 136-149.
- Montillo M., Amodeo S., Comin A., Valentini S., Renaville B., Cornacchia G. e Prandi A., 2009. *Livelli di cortisolo nel pelo durante il periodo neonatale nel puledro*. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, LXIII: 53-55.
- Mostl, E., Maggs, J.L., Schrotter, G., Besenfelder, U., Palme, R., 2002a. *Measurement of Cortisol Metabolites in Faeces of Ruminants*. Vet. Res. Commun., 26: 127-139.
- Mostl E., Palme R., 2002b. *Hormones as indicators of stress*. Domest. Anim. Endocrinol., 23: 67-74.

- Negrao, J.A., Porcionato, M.A., de Passille, A.M., Rushen, J., 2004. *Cortisol in Saliva and Plasma of Cattle After ACTH Administration and Milking*. J. Dairy Sci., 87: 1713-1718.
- Palme R., 2005. *Measuring fecal steroids: guidelines for practical application*. Ann NY Acad Sci., 1046: 75-80.
- Pragst F, Rothe M, Spiegel K, Sporkert F., 1998. *Illegal and therapeutic drug concentrations in hair segments—a timetable of drug exposure*. Forensic Sci Rev., 10/2: 81-111.
- Rushen J., 2003. *Changing concepts of farm animal welfare: bridging the gap between applied and basic research*. Appl Anim Behav Sci, 81: 199-214.
- Sauvé B, Koren G, Walsh G, Tokmakejian S, Van Uum SH., 2007. *Measurement of cortisol in human hair as a biomarker of systemic exposure*. Clin Invest Med., 30: E183-91.
- Silver M, Fowden AL., 1994. *Prepartum adrenocortical maturation in the fetal foal: responses to ACTH*. J Endocrinol., 142: 417-425.
- Slominski A , Wortsman J., 2000. *Neuroendocrinology of the skin* . Endocr Rev., 21: 457-487
- Yamada Y, Stevens B, de Silva N, Gibbins S, Beyene J, Taddio A, Newman C, Koren G., 2007. *Hair cortisol and a potential biologic marker of chronic stress in hospitalized neonates*. Neonatology, 92: 42-49.
- Yang, H. Z., Lan, J., Meng, Y. J., Wan, X. J. Han, D. W. 1998. *A preliminary study of steroid reproductive hormones in human hair*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 67: 447-450.