



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN MEDICINA
VETERINARIA

ASSE INTESTINO-CERVELLO
IMPLICAZIONI NELLE MALATTIE COMPORTAMENTALI NEL CANE

GUT-BRAIN AXIS
IMPLICATION IN BEHAVIORAL DISEASES IN THE DOG

RELATORE: Chiar.mo Prof. Fausto Quintavalla

CORRELATORE: Dott.ssa Letizia Mandorli

LAUREANDA: Silla Saiani

ANNO ACCADEMICO: 2021 – 2022

ABSTRACT	2
INTRODUZIONE	3
1. SISTEMA NERVOSO CENTRALE	3
1.1 Sistema limbico	5
1.2 Fisiologia del comportamento	7
2. SISTEMA NERVOSO AUTONOMO	9
2.1 Nervo Vago	10
3. SISTEMA NERVOSO ENTERICO	14
4. NEUROTRASMETTITORI	18
4.1 Serotonina	20
4.2 Norepinefrina e epinefrina	20
4.3 Dopamina	21
4.4 Acido γ -aminobutirrico	22
4.5 Istamina	22
5. MALATTIE COMPORTAMENTALI NEL CANE	24
5.1 STATI PATOLOGICI ELEMENTARI	24
La Fobia	24
L'ansia	26
Lo stato depressivo	27
5.2 PATOLOGIE DEL COMPORTAMENTO	28
Il disturbo dell'attaccamento	29
Le patologie dell'omeostasi sensoriale	29
Il disturbo competitivo di relazione.	30
La sindrome da disfunzione cognitiva nell'anziano	31
6. MICROBIOTA INTESTINALE	34
6.1 I Procarioti	37
6.2 I Funghi	43
6.3 I Virus	43
6.4 Gli Archeobatteri	44
6.5 Attività Metaboliche	44
7. ASSE INTESTINO-CERVELLO E COMPORTAMENTO.	45
8. ATTIVITA' PSICOBIOTICA DEGLI INTEGRATORI ALIMENTARI	59
CONCLUSIONI	70
BIBLIOGRAFIA	72

ABSTRACT

In the last years, a new protagonist of the regulation of the gut-brain axis has stood out: the microbiota. While previously gut-brain communication meant the sense of hunger or satiety and digestive function, recent research are increasingly focusing on cognitive and psychological effects. The microbiota-gut-brain axis describes a bidirectional interaction between the inside of the enteric environment (the gut epithelium, the microbiota, the enteric nervous system), and the outside (the central nervous system). The intestinal epithelium is one of the body's major sources of hormones and neurotransmitters, which have critical effects on neuronal function. The influence of the gut microbiota on these processes appears to be profound. Intestinal dysbiosis is linked not only to intestinal diseases but also to brain symptoms, including neurodegenerative and behavioral disorders. Changes in the microenvironment in the gut are transmitted from gut epithelial and immune cells, via hormones and neuroactive molecules, to cells of the enteric nervous system, where they are translated into neural impulses that carry signal locally throughout the tissue and systematically throughout the gut to central nervous system. With the arrival of brain-imaging in the 1980s, bidirectionality of the axis was observed. The brain is affected by the absence of gut microbiota in germ-free animals, in its development and functionality. Furthermore, animals to which specific bacterial strains had been administered showed behavioral alterations. Being able to define the composition of the microbiome, and what role each component plays is fundamental to understanding the dynamics not only within the microbiome itself but also between it and other systems such as the brain. Subclinical intestinal infections lead to behavioral changes even in the absence of immune activation. The immensely diverse microbiota dynamic and responsive to external stimuli enhances its potential as a target for therapeutic intervention. Numerous researches in the last decade have demonstrated how

probiotics can influence various processes of central neurons such as neurotransmission, neurogenesis, neuropeptide expression, neuroinformation and behavior. All these results have led to the concept of psychobiotics for the treatment of various neurological and psychiatric disorders: intervening on the microbiota with the administration of probiotics or prebiotics, which influence bacteria-brain relationships.

INTRODUZIONE

1. SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Il sistema nervoso centrale (SNC) è formato da encefalo, o cervello, e midollo spinale, l'uno in continuità diretta con l'altro. L'encefalo è un sistema complesso di parti interconnesse, racchiuso nel cranio che raccoglie ed integra le informazioni provenienti dagli altri organi e dall'ambiente, pianificando opportune risposte che trasmette al resto dell'organismo. L'encefalo, insieme al sistema endocrino, si occupa di parte della regolazione delle funzioni vitali. E' sede delle regolazioni omeostatiche e delle funzioni cerebrali superiori: memoria, linguaggio, capacità di risolvere un problema, percezione e azione (riconoscere uno stimolo e realizzare un piano motorio atto a raggiungere lo scopo). E' solitamente distinto in emisferi cerebrali, diencefalo, tronco encefalico e cervelletto.

Gli emisferi sono uniti dal *corpus callosum*, ed esternamente sono composti dalla corteccia: la struttura che più differenzia il cervello dei mammiferi da quello degli altri vertebrati. La corteccia è la sede delle percezioni sensoriali e del controllo della motilità volontaria, inviando ai muscoli segnali in eccesso che vengono poi modulati dai nuclei basali.

Il diencefalo è formato dal talamo, struttura che funziona da porta d'entrata per le informazioni sensoriali e che possiede estesi collegamenti con altre aree del cervello, incluse quelle neocorticali sovrastanti, e dall'ipotalamo che partecipa, di concerto con l'ipofisi, in maniera importante al mantenimento

dell'omeostasi fisiologica attraverso meccanismi neuroendocrini, che comportano sia la generazione di segnali nervosi sia la secrezione di ormoni (Fig. 1).

Neuroni e glia sono organizzati in livelli crescenti di complessità, dai piccoli gruppi definiti nuclei agli insiemi più ampi che formano circuiti, regioni o emisferi cerebrali. I circuiti del tronco encefalico, alla base del cranio, controllano processi fisiologici fondamentali come la respirazione, la regolazione della temperatura corporea e della frequenza cardiaca o gli stati di arousal e vigilanza. Secondo la teoria polivagale, l'interazione con gli altri ha un impatto diretto su come tali nuclei cerebrali rispondono dando origine a un senso di sicurezza e ricettività o un senso di pericolo e minaccia.⁽¹⁾ Il tronco encefalico produce comportamenti autorizzati necessari per la sopravvivenza, è la via di passaggio per tutti i tratti di fibre tra cervello e midollo spinale, ed è costituito da mesencefalo, ponte e midollo allungato.

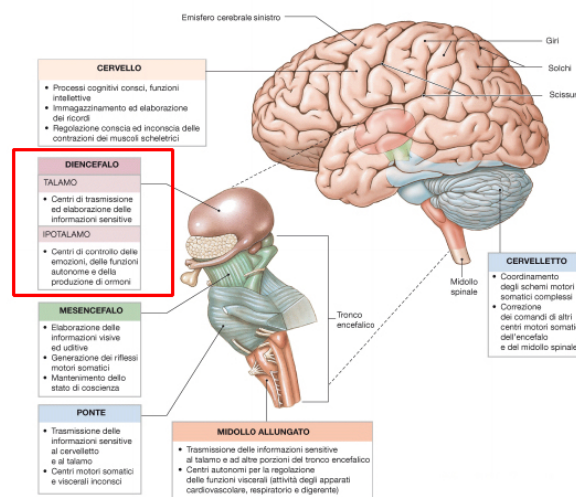


Fig. 1 Regioni dell'encefalo. (SlidePlayer.it)

Il cervelletto costituisce il 10% del cervello, ma contiene più della metà dei neuroni cerebrali. È diviso in varie regioni che ricevono informazioni da aree diverse del cervello e del midollo spinale e le proiettano ai sistemi motori. Tutte le regioni svolgono le stesse funzioni su segnali afferenti diversi. Il

ruolo delle cellule stellate a canestro è quella di portare le informazioni nella giusta area di competenza del cervelletto: il cervelletto impara dall'esperienza. L'archicerebellum raccoglie informazioni in arrivo dagli organi, riguardo l'equilibrio. Il paleocerebellum lavora sul tono muscolare e quindi su quante fibre muscolari devono essere reclutate nel movimento. Il neocerebellum pianifica il movimento: lo modula per la direzione e l'intensità. Gli input che arrivano dalla corteccia, vengono poi integrati con informazioni somatosensitive dalle cellule muscolari, e con informazioni visive dalle fibre rampicanti.

Le connessioni sinaptiche costituiscono le fondamenta dell'intricata architettura dell'encefalo, tale per cui, l'eccitazione di un singolo neurone può influenzarne mediamente l'attività di altri 10.000. L'insieme funzionale dei neuroni che risultano eccitati contemporaneamente creando un pattern di attivazione, è chiamato "profilo di eccitazione neurale". Inoltre i collegamenti tra neuroni non sono statici, ma cambiano continuamente in risposta alle esperienze. All'interno dei diversi componenti sono presenti connessioni che permettono pattern di eccitazione neurale limitati alla singola area specifica; gli output di un'area differenziata vengono poi comunicati alle altre attraverso le fibre nervose che le mettono in comunicazione.

1.1 Sistema limbico

Al centro del cervello si trovano le regioni limbiche, che comprendono amigdala, lobo temporale mediale e ippocampo e che svolgono un ruolo cruciale nel coordinare le attività di varie aree cerebrali. Queste regioni sono coinvolte in maniera importante sia nei meccanismi che mediano le emozioni, le motivazioni e i comportamenti diretti a scopi specifici, sia nell'integrazione della memoria e nel sistema dell'attaccamento che porta i piccoli dei mammiferi a dipendere dai genitori per la loro sicurezza e sopravvivenza.⁽¹⁾ Per emozione s'intende la reazione ad uno stimolo, caratterizzato da aspetti fisiologici (cambiamenti della frequenza cardiaca, sudorazione, etc.) e da

aspetti cognitivi, ossia dalla valutazione cognitiva delle modificazioni fisiologiche e della natura dello stimolo. In particolare si ritiene che l'ippocampo abbia un ruolo primario nelle forme flessibili di memoria e nell'identificazione del contesto delle esperienze.⁽¹⁾ Le regioni più profonde inviano segnali, che si riferiscono ai dati fisiologici provenienti dall'intero organismo, alle strutture limbiche centrali, dove queste informazioni vengono registrate ed integrate con elementi più complessi che derivano dalle attività di processing delle stesse strutture limbiche e delle aree paralimbiche adiacenti. Il sistema limbico è il filtro esperienziale, è il responsabile del fatto che le emozioni regolano la risposta della corteccia.

L'amigdala riceve informazioni da tutte le vie sensoriali, comprese le fibre nervose provenienti direttamente dal bulbo olfattivo, dalle aree corticali visive, uditive e somatosensoriali. L'amigdala trasmette poi segnali ad aree corticali, dove sono processate le informazioni visive, che indirizzano il sistema percettivo a interpretare lo stimolo come pericoloso. Se ciò avviene, si possono innescare processi di valutazione cognitiva che portano l'instaurarsi di uno stato di paura. L'amigdala svolge un ruolo cruciale nella risposta allo stress acuto: "freeze - fight - flight - fright".

Un'amigdala eccessivamente sensibile, spesso a causa di un'ipostimolazione sensoriale nel periodo neonatale e in quello di transizione, trasmette eccessivi segnali di pericolo, ed è in grado di alterare automaticamente i processi percettivi dell'individuo, che tenderà a interpretare come minacciosi numerosi stimoli che provengono dal mondo esterno. L'amigdala è sempre in funzione ma, grazie alla sua intima connessione con le regioni corticali, l'organismo è in grado di modularne l'attività. Le informazioni sensoriali raggiungono l'amigdala attraverso due vie parallele: una diretta ed una indiretta. La prima è una via più rapida, in cui le informazioni provengono direttamente dal talamo, ma fornisce informazioni approssimative sulle caratteristiche dello stimolo. La seconda è una via più lenta perché l'informazione talamica viene prima

processata dalla corteccia, e per questo indiretta, ma descrive lo stimolo con maggiore precisione. L'esistenza di un circuito sottocorticale permette all'amigdala di individuare rapidamente gli eventi ambientali potenzialmente minacciosi, mentre il percorso corticale le permette di valutare le informazioni con maggiore attenzione, così da perfezionare la risposta comportamentale. L'informazione sensoriale raggiunge anche i centri nervosi del tronco encefalico, che presiedono a vari aspetti della reattività emotiva.

La neurogenesi adulta è un processo complesso che include proliferazione dei precursori neurali, sopravvivenza delle cellule figlie, loro differenziamento morfologico biochimico e funzionale in neuroni, e inserimento in circuiti preesistenti. L'intero processo si compie in circa quattro settimane. La nicchia neurogenica del bulbo olfattivo ha come scopo la conservazione del patrimonio cellulare necessario all'espletamento della funzione, attraverso la sostituzione delle cellule perdute. La nicchia nell'ippocampo, invece, dà origine a nuove cellule che si aggiungono a quelle già presenti, e sembrano avere un preciso ruolo nella formazione di nuove memorie. Lo stimolo cognitivo è di fondamentale importanza nel mantenere in vita le cellule nervose neoprodotte. Come attori chiave nell'orchestra immunitaria del cervello, le cellule della microglia modellano il cablaggio e l'attività neuronale, la plasticità sintetica e la fagocitosi e supportano la sopravvivenza dei neuroni e dei loro progenitori attraverso la secrezione di fattori di crescita. Lo stress ha un effetto deleterio sulla proliferazione cellulare: sia lo stress acuto che cronico provocano riduzione della proliferazione e della sopravvivenza delle neonate cellule ippocampali.

1.2 Fisiologia del comportamento

Le principali vie noradrenergica, serotoninergica, dopaminergica, colinergica e istaminergica sono composte da gruppi di neuroni i cui corpi cellulari sono raggruppati in specifiche zone del sistema nervoso centrale, mentre gli assoni terminano in più aree cerebrali.

Il sistema serotonergico comprende tutte le vie neuronali che utilizzano come mediatore chimico la serotonina (5-HT). Il quartier generale dei corpi cellulari dei neuroni serotonergici è posto nei nuclei del rafe del tronco cerebrale, divisi in una porzione rostrale e una porzione caudale. La porzione rostrale è posta nel ponte e nel mesencefalo e proietta in tutto il sistema nervoso; questa parte è coinvolta nell'umore, nella percezione sensoriale, nel ciclo sonno-veglia e in altri comportamenti come aggressività, comportamento alimentare e sessuale. La porzione caudale, posta nel bulbo, è coinvolta nella percezione degli stimoli sensoriali e nella nocicezione.

Il sistema noradrenergico comprende tutte le vie neuronali che utilizzano come mediatore sinaptico noradrenalina e adrenalina. Il sistema noradrenergico è coinvolto soprattutto nella regolazione dei comportamenti di emergenza e nella risposta allo stress, come la reazione “freeze - fight - flight - fright”, attivando il sistema simpatico e il rilascio di adrenalina per aumentare la frequenza del battito cardiaco e il numero di atti respiratori, la pressione arteriosa, la mobilitazione degli zuccheri, la dilatazione dei bronchi, etc. I corpi cellulari dei neuroni noradrenergici si trovano nel *corpus coeruleus*: un centro nervoso profondo, situato nel tronco cerebrale, che integra le informazioni sensoriali in arrivo dalla periferia per distribuirle ai centri superiori del cervello e alla neocorteccia.

Il sistema dopaminergico comprende tutte le vie neuronali che utilizzano come mediatore sinaptico la dopamina. La via dopaminergica nigrostriatale è parte fondamentale del sistema extrapiramidale, si estende dalla *substantia nigra* del tronco cerebrale verso i gangli basali e lo striato. Il sistema extrapiramidale è deputato al controllo del movimento, della postura e dell'equilibrio. Il sistema dei gangli della base ha il ruolo di facilitare le aree corticali in cui è conservata la memoria del gesto volontario, ed di inibire le altre aree corticali che potrebbero mettere in atto gesti opposti o interferenti con quello volontario. Per memoria del gesto volontario si intende l'insieme di

informazioni sulle attività motorie che quando richiamate innescano una serie di attività muscolari complesse in maniera automatica.⁽²⁾ Dalla *substantia nigra* originano anche fibre dirette coinvolte nei processi emotivi ed intellettivi, e che influenzano la veglia e l'attenzione. La via dopaminergica mesocorticale si estende dai corpi cellulari posti nel tegumento ventrale del tronco cerebrale, al sistema limbico ed è strettamente collegata alla via mesolimbica che parte anch'essa dal tegumento ventrale e si estende al *nucleus accumbens* sito nell'area sottocorticale limbica. Le vie dopaminergica mesolimbica e mesocorticale sono implicate nei processi cerebrali di filtrazione degli stimoli sensoriali, influenzano l'umore e le funzioni limbiche come emozioni e motivazioni. La via dopaminergica tuberoinfundibolare si estende dall'ipotalamo all'ipofisi anteriore e inibisce principalmente la liberazione di prolattina, oltre a regolare fame, sete, pressione arteriosa e secrezione dell'ormone della crescita. Nell'ipofisi anteriore le cellule lattotrope che secernono prolattina possiedono recettori dopaminergici inibitori.

Le sinapsi GABAergiche regolano numerose funzioni comportamentali e della sfera emozionale.

2. SISTEMA NERVOSO AUTONOMO

Il sistema nervoso autonomo (SNA) è una rete di connessioni neurali localizzate sia nel sistema nervoso centrale che nel sistema nervoso periferico, che controllano le funzioni corporee non coscienti come la respirazione, il battito cardiaco e la digestione. Comprende il ramo ortosimpatico (o simpatico) e quello parasimpatico. In combinazione con l'attività del sistema nervoso enterico (SNE) e la modulazione del sistema nervoso centrale (SNC), il sistema nervoso autonomo è responsabile dell'omeostasi fisiologica, oltre a rispondere alle aree endocrine, a quelle periferiche motorie autonome e a quelle comportamentali. In combinazione con l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), il SNA comprende una vasta e complessa rete di comunicazione

integrata tra il cervello e l'intestino, che stabilisce e regola in modo involontario l'omeostasi fisiologica dell'ospite. Le informazioni viscerali in arrivo dall'intestino attraverso il SNA vengono elaborate dal SNC, che quindi dirige le risposte essenziali per la sopravvivenza. L'ulteriore elaborazione di queste informazioni comporta cicli di feedback positivi e negativi che competono agli organi periferici. Le funzioni gastrointestinali chiave come la motilità e la permeabilità dell'intestino, l'osmolarità luminale, la secrezione della bile, i livelli di carboidrati, la produzione di bicarbonato e muco, nonché la risposta immunitaria della mucosa, sono tutti controllati dal SNA. L'attivazione gastroenterica autonoma può essere innescata dal feedback afferente dall'intestino così come dalla modulazione efferente cognitiva ed emotiva del sistema nervoso centrale. L'alterazione della neurofisiologia dell'innervazione simpatica è evidente nel transito gastrointestinale con motilità e secrezione alterati, principalmente attraverso la modificazione della trasmissione colinergica e delle contrazioni dello sfintere e della muscolatura liscia. Il SNA fornisce all'intestino la risposta neurologica più diretta possibile, portando a rapidi cambiamenti nella fisiologia intestinale, attraverso l'innervazione dell'organo bersaglio, sia in uno stato di salute che di malattia come nel caso della risposta al dolore e allo stress. Le vie neuronali afferenti ed efferenti che procedono attraverso i rami parasimpatico (vago) e simpatico (splancnico e spinale pelvico) del sistema nervoso autonomo, rappresentano le principali connessioni neuronali.

2.1 Nervo Vago

Il nervo vago è il X nervo cranico e la via più veloce e diretta che collega l'intestino e il cervello. Il suo nome deriva dal latino "errante", vista la sua vasta innervazione, che consente la raccolta di informazione da diversi organi. È composto per l'80% da fibre afferenti e per il 20% da fibre efferenti, trasmettendo informazioni dai sistemi gastroenterico, respiratorio e cardiovascolare al sistema nervoso centrale, e fornendo feedback ai visceri.

Le afferenze vagali, il cui soma è presente nel ganglio nodoso (NVG), trasmettono informazioni sensoriali riguardanti la presenza di cibo, l'attività motoria e il grado di distensione intestinale, al nucleo del tratto solitario (NTS) nel tronco encefalico. Gli input neuronali sono quindi diretti alle aree superiori del sistema nervoso centrale, ad esempio all'ipotalamo, o partecipano ai riflessi vago-vagali. Il riflesso antinfiammatorio vago-vagale comprende efferenze vagali che originano principalmente dal nucleo motore dorsale del vago e che possono modulare i livelli circolanti di citochine pro-infiammatorie. La stimolazione del riflesso può portare a una modifica vagale dell'attivazione dei macrofagi, che è un meccanismo importante nella fisiopatologia delle malattie infiammatorie intestinali. Segnali vagali efferenti, passando attraverso il nucleo motore dorsale del vago (DMV), controllano la motilità e la secrezione intestinale.

A seconda del loro tipo e localizzazione, le vie vagali afferenti sono ideali per trasportare segnali di stiramenti o tensioni e molecole intestinali come prodotti batterici, ormoni intestinali, o neurotrasmettitori. Le stimolazioni sensitive gastrointestinali arrivano attraverso le fibre vagali afferenti al nucleo del tratto solitario, costituito dalle fibre sensitive del ganglio genicolato, del ganglio petroso e del ganglio nodoso. I corpi cellulari delle fibre vagali sensoriali risiedono nel ganglio nodoso e nelle sinapsi di vari nuclei del tronco encefalico. Da qui le informazioni vengono trasmesse ad altri nuclei del tronco encefalico e alle strutture del prosencefalo: percorsi multisinaptici ascendenti dal nucleo del tratto solitario collegano informazioni provenienti dai visceri all'intero cervello.

Le fibre vagali afferenti, sono polimodali, in quanto rispondono a una varietà di segnali di natura meccanica, chimica, o ormonale, grazie alla grande molteplicità di recettori che esprimono. La maggior parte delle afferenze vagali sono glutaminergiche, mentre i neuroni NTS di secondo ordine esprimono recettori α -amino-3-idrossi-5-metilsossazolo-4-propionato

(AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA), e metabotropici del glutammato (mGlu). Inoltre i neuroni NTS esprimono una varietà di neuropeptidi tra cui la colecistochinina (CCK), il peptide di rilascio della prolattina, la pro-opiomelanocortina, e i loro recettori. I modelli di espressione di questi neuropeptidi e la regione bersaglio degli assoni possono essere utilizzati per identificare quali neuroni siano responsabili di specifiche risposte emotive e comportamentali. Ad esempio l'attivazione delle proiezioni che esprimono CCK nel nucleo parabrachiale determina una diminuzione dell'assunzione di cibo senza influenzare il comportamento correlato all'ansia.⁽³⁾ Al contrario, le proiezioni all'area ipotalamica laterale inducono l'attivarsi del comportamento alimentare, e le proiezioni dall'NTS al nucleo del letto della *stria terminalis* e all'amigdala centrale sono coinvolte rispettivamente nell'ansia, nella paura e nei comportamenti di evitamento.⁽⁴⁾ Le proiezioni di neuroni al *nucleus accumbens* e all'amigdala basolaterale sono in grado di modulare la facilitazione della memoria dopo l'eccitazione fisiologica.⁽⁵⁾ Attraverso proiezioni dirette e multisinaptiche, l'NTS è in grado di influenzare i principali sistemi di neurotrasmettitori come la norepinefrina (in gruppi di cellule nel nucleo del tratto solitario e nel *locus coeruleus*), e la serotonina (nel rafe dorsale). Sembra che il nucleo del tratto solitario sia adatto a coordinare l'integrazione del feedback introcettivo trasmesso attraverso il nervo vago dall'intestino al cervello e dal cervello alla periferia, fungendo così da eccellente centro di smistamento per le comunicazioni microbiota-intestino-cervello.⁽⁶⁾

Da decenni, utilizzando la vagotomia si è chiaramente dimostrato l'importanza di una segnalazione vagale bidirezionale costante per un'appropriata funzione cerebrale, compreso il comportamento. Già negli anni '50 e '60 ci furono evidenze che l'ablazione del nervo vago conseguente alla gastrectomia utilizzata per il trattamento dell'ulcera peptica, provocasse un aumento dell'incidenza di disturbi psichiatrici.⁽⁷⁾ Nei roditori la vagotomia

provoca una diminuzione dell'attività locomotoria durante la fase oscura e un aumento delle concentrazioni di epinefrina nel plasma basale dopo lo stress da immobilizzazione.⁽⁸⁾ Inoltre, la vagotomia riduce la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule neonate, provocando un numero ridotto di neuroni immaturi e l'attivazione della microglia nel giro dentato dell'ippocampo, tutti sintomi che si possono riscontrare anche in pazienti con malattia psichiatrica.⁽⁹⁾ La deafferentazione vagale sub-diaframmatica, un metodo che elimina le afferenze vagali addominali ma mantiene intatte la maggior parte delle afferenze, evidenzia il coinvolgimento di tali afferenze in condizioni ansiose e nei comportamenti legati alla paura.⁽¹⁰⁾ La stimolazione del nervo vago nei modelli murini ha dimostrato di aumentare la neurogenesi dell'ippocampo adulto e di modulare il rilascio di norepinefrina, serotonina e dopamina nelle regioni cerebrali correlate all'ansia e alla depressione, nonché di aumentare l'espressione del BDNF nell'ippocampo migliorando i comportamenti depressivi in animali con stress cronico da contenimento.⁽¹¹⁾ L'attivazione delle afferenze vagali gastrointestinali influenza il comportamento di gratificazione nei topi, rafforzando ulteriormente il concetto che la via vagale è coinvolta nel comportamento.⁽¹²⁾ È interessante notare che gli animali sottoposti a deafferentazione vagale sottodiaframmatica mostrano un'espressione genica alterata del *nucleus accumbens*.⁽¹³⁾

I neuroni spinali afferenti del ramo simpatico, il cui soma è presente nei gangli della radice dorsale (DGR), trasferiscono i segnali originati dall'intestino ai neuroni afferenti secondari del corno dorsale, che poi proiettano al sistema nervoso centrale attraverso la via spinotalamica: la principale via di segnalazione del dolore dell'asse intestino-cervello. Gli input afferenti vagali e spinali prendono sinapsi con le regioni cerebrali superiori, come il sistema limbico e alcune strutture paralimbiche.

L'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene è innescata dalla liberazione del fattore di rilascio dell'ormone corticotropo dall'ipotalamo, seguito dal

rilascio dell'ormone adrenocorticotropo dall'ipofisi, che quindi stimola le ghiandole surrenali a produrre cortisolo.

3. SISTEMA NERVOSO ENTERICO

L'apparato gastrointestinale è il solo organo a contenere un sistema nervoso intrinseco in grado di mediare i riflessi in completa assenza di input al cervello o midollo spinale: il sistema nervoso enterico (SNE).

L'intestino è un organo altamente innervato e il sistema nervoso enterico è una divisione ampia e complessa del sistema nervoso autonomo, costituito da una rete di neuroni e cellule gliali organizzate in gangli interconnessi note come plesso sottomucoso, plesso sottosieroso e plesso mioenterico, che è in gran parte responsabile della coordinazione delle funzioni intestinali come la motilità e il controllo dei fluidi. Il plesso sottomucoso regola la secrezione e il controllo vascolare, mentre il plesso mioenterico regola la mobilità intestinale. Il SNE è stato soprannominato "secondo cervello" per le sue dimensioni, complessità ed elevato grado di somiglianza dei neurotrasmettitori condivisi con il sistema nervoso centrale. All'interno del sistema nervoso enterico ci sono microcircuiti che funzionano per avviare i riflessi e consentono la coordinazione locale della motilità autonoma. Comprende più di 100 milioni di neuroni e più di 400 milioni di cellule gliali enteriche (EGC), che coordinano e regolano le funzioni gastrointestinali, compresa la motilità, il dolore, e secondo prove emergenti, hanno un ruolo nel turnover epiteliale, nella funzione della barriera epiteliale, nelle secrezioni della mucosa, e nell'immunità.⁽¹⁴⁾ Il sistema nervoso enterico è costituito da una complessa rete neuronale che controlla diverse funzioni gastrointestinali come la motilità, la secrezione, il trasporto della mucosa, il flusso sanguigno e l'assorbimento dei nutrienti, e interagisce con il sistema immunitario ed endocrino dell'intestino. Si estende dall'esofago al colon e controlla risposte gastrointestinali complesse, come il riflesso della peristalsi, in maniera

autonoma rispetto al sistema nervoso centrale e al sistema nervoso autonomo. Tuttavia, il SNE non è totalmente autonomo e la completa regolazione delle funzioni gastrointestinali origina dall'integrazione dei riflessi locali, coinvolgendo afferenze simpatiche vagali dall'intestino al sistema nervoso centrale e viceversa. I sistemi simpatico e parasimpatico possono influenzare i neurocircuiti del SNE, con conseguenti cambiamenti nella motilità che possono modificare la velocità di rilascio di pre- e probiotici nell'intestino tenue e nel colon, compresi gli amidi resistenti, le fibre alimentari e altri nutrienti microbici critici. Le interazioni dirette o indirette SNE-microbiota possono verificarsi come risultato dell'attività del SNA.

I neuroni enterici continuano ad eludere una classificazione conveniente, poiché hanno funzioni diverse a seconda della loro posizione e possono esprimere più marcatori contemporaneamente oppure non esprimerli affatto. I neuroni sono classificati in base alla loro morfologia e direzionalità: motoneuroni eccitatori o inibitori, neuroni sensitivi intrinseci, motoneuroni ascendenti o discendenti, secretomotori ed effettori simpatici (che hanno corpi cellulari situati al di fuori del sistema nervoso enterico). Nel plesso sottomucoso e mioenterico, le cellule IPAN (neuroni primari afferenti intrinseci) proiettano alla mucosa per rispondere agli stimoli chimici e meccanici che originano dai motoneuroni secretori, dai vasodilatatori e dai motori riflessi. Questi plessi del sistema nervoso hanno il potenziale di ricevere stimoli costanti da diverse direzioni, incluso localmente le cellule enteroendocrine dell'epitelio intestinale e le cellule gliali, e distalmente il sistema nervoso autonomo attraverso i segnali ormonali, e attraverso l'ambiente creato dal microbiota e dal contenuto intestinale.

Il SNE comunica con il SNC attraverso neuroni che vanno dall'intestino ai gangli simpatici portando informazioni sensoriali, che viaggiano attraverso i neuroni afferenti primari estrinseci e che seguono percorsi spinali e vagali, all'ipotalamo, gestore chiave dei segnali di input. Questi percorsi neurali

intrinseci e afferenti forniscono l'opportunità alle molecole derivate dal lume intestinale, e quindi potenzialmente dal microbiota, di influenzare non solo la funzione intestinale ma anche il sistema nervoso centrale.

Il sistema nervoso enterico è inoltre un grande deposito di sostanze chimiche, al cui interno è rappresentata ciascuna classe di neurotrasmettitori presente nel cervello. Nei mammiferi la 5-HT rilasciata dalle cellule enterocromaffini stimola gli IPAN che si proiettano sulla mucosa, promuovendo così l'attivazione dei riflessi enterici. Gli stimoli chimici e meccanici della mucosa possono essere trasdotti dalle cellule IPAN agli interneuroni ascendenti o discendenti e ai motoneuroni eccitatori o inibitori che innervano i muscoli lisci longitudinali e circolari. La serotonina è anche il neurotrasmettitore rilasciato dai neuroni mioenterici della via discendente del movimento peristaltico. È comunque importante notare che una deplezione di tutta la serotonina endogena non blocca la peristalsi intestinale, né inibisce il transito.

(14)

Cellule epiteliali sensoriali e secernenti ormoni, differenziate e altamente specializzate (cellule enteroendocrine, EEC), svolgono un ruolo primario della comunicazione dell'epitelio con il SNE. A livello locale i neuroni del plesso neuronale ricevono segnali dall'epitelio tramite messaggi chimici come neuropeptidi colecistochinina e il peptide YY rilasciati dalle EEC. Queste molecole forniscono segnali paracrini ai neuroni del plesso sottomucoso e comunicano con il SNC attraverso il nervo vago. Le EEC hanno anche un ruolo importante nella conversione del triptofano in serotonina e derivati microbici dell'indolo, che sono importanti marcatori e mediatori funzionali dell'omeostasi del microbioma ospite.⁽¹⁵⁾ Il triptofano e uno dei suoi metaboliti, la chinurenina, hanno effetti importanti nella comunicazione intestino-cervello e sistema nervoso enterico. La perdita di chinurenina è anche associata alla depressione clinica e la sua integrazione può avere effetti benefici, mentre i derivati microbici del triptofano indolico sembrano avere

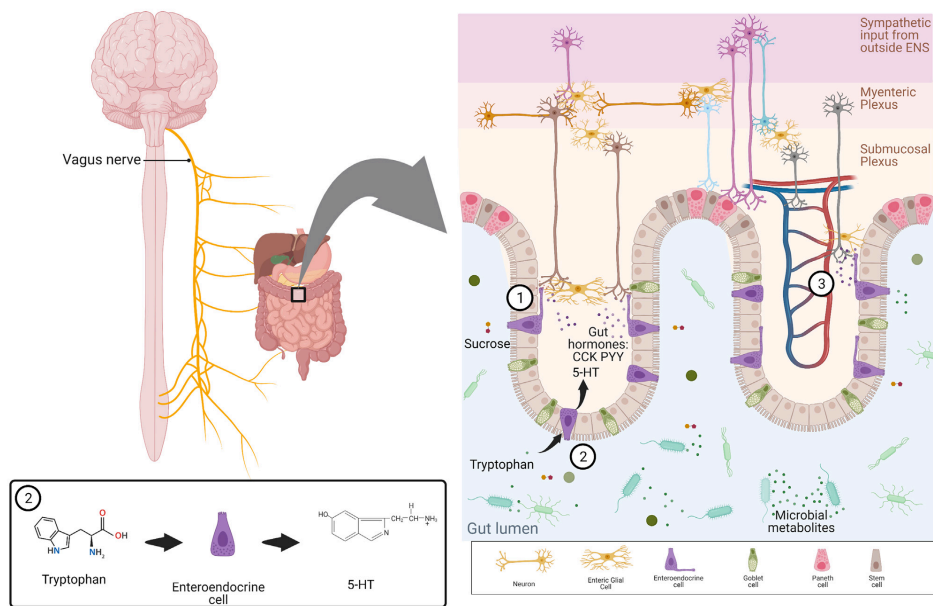


Fig. 2 Panoramica dell'asse intestino-cervello e dell'interazione tra il SNE e la mucosa intestinale. L'epitelio intestinale, le cellule immunitarie e i segnali neuroattivi solubili, trasferiscono gli stimoli dal microbiota intestinale al SNE attraverso molteplici meccanismi: 1) le cellule enteroendocrine nell'epitelio rilevano i cambiamenti chimici luminali e trasferiscono i segnali prendendo contatto direttamente con i neuroni con una sinapsi del neuropode; 2) le cellule enteroendocrine captano gli stimoli metabolici dal lume e convertono questi segnali in ormoni o molecole neuroattive come il triptofano o la serotonina, che vengono rilasciati nella mucosa e attivano la via della serotonina attraverso i neuroni il plesso sottomucoso; 3) le cellule neuroendocrine rilasciano ormoni solubili e peptidi neuroattivi che diffondono nel sistema vascolare enterico per circolare sistematicamente e agire sul SNC. (Dowling et al., 2022)⁽¹⁴⁾

effetti avversi.⁽¹⁶⁾ Nell'IBS (irritable bowel syndrome), una malattia strettamente legata all'asse intestino-cervello, si osserva una riduzione del rapporto triptofano-chinurenina. Le EEC nella barriera epiteliale prendono direttamente contatto con i neuroni enterici e le cellule gliali enteriche (EGC), attraverso un processo basale assono-simile (processo neuropode), che esprime un potenziale d'azione in presenza di glucosio e glutammato.⁽¹⁷⁾ Le cellule enterocromaffini (EC) esprimono recettori chemosensoriali specifici, sono elettricamente eccitabili e modulano i neuroni afferenti primari tramite la serotonina, suggerendo che questo sottoinsieme ha un ruolo chiave nella comunicazione intestino-cervello.⁽¹⁸⁾ Le cellule cromaffini non prendono direttamente sinapsi con i neuroni afferenti, quindi le sostanze neurochimiche secrete devono agire sulle fibre nervose afferenti vagali tramite diffusione (Fig. 2).

La struttura e la neurochimica del sistema nervoso enterico assomigliano a quelle del sistema nervoso centrale, e quindi qualsiasi meccanismo implicato

nella disfunzione del SNC può anche portare a disfunzione del SNE e viceversa. Il primo sviluppo del sistema nervoso enterico si verifica principalmente durante l'embriogenesi, ma eventi chiave come la proliferazione delle cellule progenitrici, la differenziazione dei fenotipi neurali maturi e la formazione di circuiti neurali funzionali, continuano durante il periodo post natale, in concomitanza con lo sviluppo del microbiota. Mentre la colonizzazione batterica di topi germ-free (GF) convenzionali ha provocato un aumento della serotonina neurale enterica e l'espressione dei recettori 5-HT₄, la colonizzazione di topi GF privi di triptofano-idrossilasi-1 non è riuscita a ripristinare il numero di neuroni enterici ai livelli osservati nei topi GF e TPH1 convenzionali, continuando a presentare una diminuita quantità dei precursori neurali della nestina (proteina espressa nel citoscheletro delle cellule neurali), indice di una riduzione della neurogenesi. La colonizzazione dei topi GF in presenza di un antagonista del recettore 5-HT₄ ha influenzato negativamente il SNE. Al contrario la stimolazione dei recettori 5-HT₄ negli animali GF ha avuto l'effetto opposto e ha ripristinato la normale fisiologia intestinale.⁽¹⁹⁾ Gli animali germ-free sono animali nati ed allevati in laboratorio in assoluta condizione di sterilità, mentre gli animali gnotobiotici sono nati e allevati nelle stesse condizioni dei GF, ma vengono messi a contatto con microrganismi noti. Gli studi sugli animali GF suggeriscono un ruolo specifico del microbiota, che non si limita al primo periodo dello sviluppo post natale, nella migrazione delle EGC nei gangli enterici alla mucosa, tanto che queste cellule sono diminuite negli animali trattati con antibiotici.⁽²⁰⁾

4. NEUROTRASMETTITORI

Attraverso alterazioni neurochimiche e cambiamenti di potenziale di membrana, il cervello svolge compiti complessi come pensare, ricordare, controllare i movimenti e così via. La comunicazione tra i neuroni avviene tramite il rilascio da parte del neurone presinaptico di un messaggero chimico

o neurotrasmettitore, che si lega a recettori specifici presenti sulla membrana della cellula post sinaptica. L'impulso elettrico è convertito in segnale chimico a livello delle sinapsi. Questo meccanismo non avviene solo in una direzione: il neurone postsinaptico, infatti, risponde alla cellula presinaptica con altri messaggeri chimici. Il sistema neurotrasmettitore-recettore può indurre una variazione del passaggio ionico oppure provocare la sintesi di un secondo messaggero intracellulare postsinaptico, responsabile delle azioni cellulari e degli effetti biologici successivi. La trasmissione dell'impulso può essere rapida o lenta: quando la neurotrasmissione è rapida, l'informazione chimica si trasforma in impulso elettrico, gli aminoacidi, quali GABA o glutammato, si legano ai recettori ionotropici. Il GABA provoca l'apertura del canale ionico e l'inibizione dell'impulso elettrico, mentre il glutammato svolge un'azione contraria, in quanto i recettori glutammatergici aprono il canale ionico del calcio, favorendo l'eccitazione del neurone. Per quanto riguarda la neurotrasmissione lenta, come nel caso delle catecolamine e della serotonina, i recettori sono prevalentemente metabotropici. I componenti che formeranno il neurotrasmettitore vengono prodotti nel soma, e dovranno essere portati fisicamente alla sinapsi insieme agli enzimi, a una velocità per quelli piccoli, che sono molto lenti di 5 mm al giorno.⁽²¹⁾ Perciò le cellule devono avere delle vescicole in cui stocarli, che fungono da magazzino. Alcuni neurotrasmettitori vengono assemblati nel soma poi racchiusi in vescicole che si spostano a una velocità molto diversa: circa 400 mm al giorno.⁽²¹⁾

Il neurotrasmettitore libero nella sinapsi si fissa al recettore nella sua parte esterna, in questo modo la componente intracellulare si lega a una proteina di connessione, denominata proteina G, attivandola. A sua volta la proteina G può legarsi a un enzima, che produrrà un secondo messaggero, per esempio AMPc. La cascata biochimica che ne deriva raggiunge il nucleo cellulare e provoca attivazione o inibizione di alcuni geni. Inoltre, il recettore è in grado di eccitare o inibire la membrana post sinaptica; per eccitarla può utilizzare

più strategie come aprire i canali del sodio (il sodio penetra nella cellula ed eleva il potenziale di membrana), modificare i canali del potassio e del cloro rallentandone il passaggio (i due ioni escono ed entrano rispettivamente con maggiore difficoltà, elevando il potenziale di membrana), aumentare il numero dei recettori eccitatori e diminuire quello degli inibitori. Le depolarizzazioni postsinaptiche sono composte di potenziali eccitatori, in grado di aumentare la probabilità di scarica del neurone, e di potenziali inibitori, che riducono tale probabilità. I potenziali postsinaptici sono graduati e non rispondono alla "legge del tutto o nulla": la loro ampiezza è direttamente proporzionale non solo all'intensità dello stimolo che li ha generati ma anche alla durata dello stesso.

È possibile suddividere i neurotrasmettitori in tre categorie: aminoacidi, ammine biogene, neuropeptidi.

4.1 Serotonina

La serotonina è un neurotrasmettitore monoaminico, una triptamina, sintetizzato nei neuroni serotoninergici a livello del SNC, nonché nelle cellule enterocromaffini dell'apparato gastrointestinale. E' sintetizzata da diversi enzimi, partendo da un precursore aminoacidico, il triptofano, che è trasportato nel neurone serotoninergico. La serotonina è metabolizzata dall'enzima monoaminoossidasi (MAO), oltre a essere ricatturata da una pompa di trasporto presinaptica selettiva dal neurone presinaptico per essere riutilizzata in futuro. L'enzima MAO ossida la 5-HT, che è successivamente trasformata in acido 5-idrossindoloacetico, escreto con le urine. La serotonina è un neurotrasmettitore modulatorio che esercita nella maggior parte dei casi un'azione finale inibitoria.

4.2 Norepinefrina e epinefrina

La noradrenalina o norepinefrina fa parte delle catecolamine, sostanze così denominate perché hanno nella loro molecola un gruppo catecolico, formato da due ossidrili e da un'ammina, e differisce dall'epinefrina in quanto rispetto

ad essa manca di un metile legato al gruppo amminico. È sintetizzata a partire dall'amminoacido tirosina con una prima reazione di ossidazione di L-DOPA seguita dalla decarbossilazione del neurotrasmettitore dopamina, e infine la βossidazione in norepinefrina. Questa può essere ulteriormente metilata dalla feniletanolamina N-metiltransferasi in adrenalina o epinefrina.

L'epinefrina, in quanto ormone della risposta allo stress, provoca l'attivazione del sistema nervoso centrale, potenziando la capacità cognitiva, migliorando l'umore, accentuando attenzione e vigilanza e controllando motricità e ciclo sonno-veglia. La norepinefrina agisce su alcuni recettori adrenergici, in particolare su tutti gli α , che inducono la contrazione della muscolatura liscia, e sui β , che provocano un effetto opposto. Gli α_1 hanno localizzazione post sinaptica, mentre gli α_2 sono collocati a livello del terminale presinaptico (auto recettore). La stimolazione dei recettori α_1 induce vasocostrizione, rilassamento della muscolatura liscia di alcuni organi, midriasi, aumento della secrezione sudoripara e salivare. I recettori β_1 sono distribuiti a livello cardiaco e renale: la loro stimolazione induce effetto inotropo, batmotropo, cronotropo e dromotropo positivo e aumento della secrezione di renina a livello renale. I recettori β_2 sono localizzati a livello dei vasi e della muscolatura liscia di alcuni organi: la loro stimolazione induce vasodilatazione e bronco dilatazione, rilassamento muscolare di intestino e utero e aumento del metabolismo basale.

4.3 Dopamina

La dopamina è un neurotrasmettitore che fa parte della famiglia delle catecolamine, è prodotta dall'amminoacido fenilalanina, idrossilata prima a tirosina, in seguito a L-DOPA, ed infine decarbossilata da un enzima specifico a dopamina. La dopamina è diffusa a livello cerebrale e nel tessuto retinico. Questa catecolamina agisce anche come mediatore periferico a livello dei sistemi cardiovascolare, gastroenterico e renale, e controlla la motricità soprattutto per quanto riguarda iniziativa ed armonizzazione del movimento.

La dopamina rappresenta anche un mediatore periferico a livello del sistema simpatico cardiaco, dei vasi renali e mesenterici.

4.4 Acido γ -aminobutirrico

Nel sistema nervoso centrale, l'acido γ -aminobutirrico (GABA) è il principale mediatore della neurotrasmissione inibitoria del cervello dei mammiferi. La maggior parte di GABA e glutammato deriva dalle riserve di glutammina presenti nella cellule gliali. La principale fonte di glutammina e di acido glutammico è il glucosio. Il legame tra GABA e lo specifico recettore determina un cambiamento chimico nella membrana del neurone bersaglio, che rende quest'ultimo refrattario a eventuali stimoli eccitatori. La risposta inibitoria indotta dall'attivazione del recettore GABA_A si attua attraverso meccanismi pre e post sinaptici. L'inibizione postsinaptica è tipica dei neuroni encefalici (cellule corticali, cerebellari, ippocampali, etc.), mentre l'inibizione presinaptica è presente a livello del midollo spinale. L'azione inibitoria veloce di GABA indotta dall'attivazione dei recettori GABA_A determina aumento della conduttanza allo ione cloruro. I recettori GABA_B sono localizzati sui terminali presinaptici e anche su quelli non-GABAergici (eterorecettori), così come a livello postsinaptico su dendriti e corpi cellulare non-GABAergici. L'effetto di GABA è neutralizzato dal riassorbimento dello stesso mediatore da parte della terminazione presinaptica e da parte delle cellule della glia.

4.5 Istamina

L'istamina non ha solo un ruolo nel sistema immunitario, ma agisce anche sull'ippocampo. E' implicata nello stato di attenzione dell'animale e agisce nel sistema neuroendocrino.

Il sistema neurotrasmettitore-recettore è in grado di regolare il numero dei propri recettori: quando aumenta la concentrazione del neurotrasmettitore nello spazio sinaptico, i recettori postsinaptici esauriscono la loro funzione in tempi relativamente brevi, a causa dell'elevato numero di molecole che la cellula nervosa capta grazie alla loro presenza. Il neurone, per ripristinare

l'omeostasi cellulare, può inglobare alcuni recettori postsinaptici in specifiche vescicole, staccate all'interno della membrana cellulare (internalizzazione), o distruggerli. Il legame tra neurotrasmettitore-recettore può non solo provocare a cascata l'azione del secondo messaggero, ma anche originare un incavo reversibile nella membrana. Questo meccanismo permette al neurone di ridurre temporaneamente o definitivamente, grazie all'azione distruttiva dei lisosomi, il numero dei recettori disponibili, mentre il meccanismo di internalizzazione permette di esporre nuovamente il recettore in tempo breve, in caso di bisogno. I recettori presinaptici, al contrario, aumenteranno per cercare di ricaptare il più possibile il neurotrasmettitore, ripristinando l'equilibrio. Ne conseguono riduzione del numero dei recettori postsinaptici e aumento di quelli presinaptici. Quando la concentrazione del neurotrasmettitore diminuisce si realizza il meccanismo opposto. Entrambi i processi sono solitamente reversibili: se nell'ambiente extracellulare si ristabilisce l'omeostasi, il numero di recettori e di conseguenza la sensibilità della cellula a un determinato segnale, torna a stabilizzarsi intorno a una funzionalità fisiologica.

L'effetto paradossale di alcuni antidepressivi, un temporaneo aggravamento dei sintomi prima della loro attenuazione, sembra essere legato all'interferenza con la capacità dei neuroni di rilasciare, oltre alla serotonina, anche un altro neurotrasmettitore, il glutammato. Il rapido aumento dell'attività serotoninergica monopolizza a favore della serotonina la scorta di vescicole prodotte dal neurone; così facendo il glutammato è privato del mezzo necessario al suo rilascio fino a quando il neurone non riesce ad adeguare la produzione di vescicole all'aumentato fabbisogno.

I sistemi neurotrasmettitoriali si sovrappongono tra loro nelle diverse aree cerebrali, interagiscono e influenzandosi a vicenda, integrano gli effetti legati alla loro azione all'interno del neurone.

5. MALATTIE COMPORTAMENTALI NEL CANE

L'organismo animale mette in atto delle risposte adattative ai pericoli reali o presunti che minacciano l'omeostasi, al fine di alleviare uno stato di stress in situazioni avverse. Queste risposte consistono nello sviluppare cambiamenti comportamentali per annullare o contrastare gli effetti della minaccia, e cambiamenti fisiologici atti a ripristinare e mantenere l'omeostasi interna. Quando un animale non è in grado di sfuggire al fattore di stress attraverso un'appropriata risposta comportamentale, e questa incapacità diventa cronica, ciò porta a effetti negativi sullo stato fisico ed emotivo dell'individuo. Il comportamento di un animale è visto come la capacità di adattarsi alle modificazioni di un ambiente circostante: l'organismo riceve informazioni dall'ambiente esterno e le analizza attraverso i sistemi emozionali e cognitivi, che possono variare o modificarsi degli stati neurofisiologico, metabolico e/o endocrino. Il risultato è la produzione di una risposta comportamentale adeguata a quella situazione.

La patologia è definita come una perdita di plasticità comportamentale legata all'istallarsi di stati patologici elementari: fobico, ansioso, depressivo. Si tratta di meccanismi la cui azione modifica contemporaneamente la natura delle risposte comportamentali e i loro elementi di regolazione, che si tratti di strutture cognitive o emozionali. Gli stati patologici elementari sono un raggruppamento dei segni clinici comportamentali dovuti ad una patologia comportamentale. Il passaggio da stato patologico a malattia si ha quando il cane manifesta un irrigidimento comportamentale, una cristallizzazione delle risposte, là dove l'instabilità emozionale sovrasta le capacità cognitive.

5.1 STATI PATOLOGICI ELEMENTARI

La Fobia

Fobia, dal greco *phóbos*, significa paura angosciosa e inspiegabile di qualcosa o di qualche evento in particolare. La fobia induce un comportamento, una reazione non controllabile, riconosciuta dal soggetto che la prova come

esagerata, irragionevole e sproporzionata alla situazione, inducendo l'evitamento dell'oggetto o della fonte della paura.⁽²²⁾ Nello stato fobico gli stimoli provengono solamente dall'ambiente esterno, a differenza dello stato ansioso, dove gli stimoli provengono anche dall'ambiente interno, cioè dalle rappresentazioni legate al ricordo di eventi negativi o che hanno portato al disagio. Lo stato fobico è indotto dalla sensibilizzazione ad uno stimolo esterno che genera paura. Sul piano funzionale la sensibilizzazione si accompagna essenzialmente a un aumento dell'attenzione e della reattività con una più forte tendenza alla fuga o all'attacco, un aumento della frequenza cardiaca e talvolta tremore. L'alterazione comportamentale che caratterizza il soggetto fobico, suggerisce il principale coinvolgimento del sistema noradrenergico. L'evoluzione spontanea delle fobie attraversa tre tappe, che corrispondono alla degradazione progressiva dell'omeostasi sensoriale. Il primo stadio, o stadio dinamico, è la fobia semplice: lo stimolo scatenante è unico e facilmente identificabile. La risposta del cane consiste in attivazione del sistema nervoso autonomo e modificazioni del comportamento esploratorio. Il secondo stadio è la fobia complessa. Gli stimoli scatenanti sono numerosi ma sempre associati allo stimolo sensibilizzante iniziale. Compare l'anticipazione emozionale e la risposta comportamentale consiste nell'attivazione del sistema nervoso autonomo, modificazione del comportamento esploratorio e comparsa del comportamento di aggressione per irritazione da paura. Si assiste all'aumento dell'attività delle strutture noradrenergiche e dopaminergiche. Il terzo stadio è lo stato preansioso. Gli stimoli scatenanti sono numerosi, identificabili con difficoltà e senza relazione tra di loro. Il comportamento esploratorio scompare del tutto. Nel soggetto fobico si riconoscono tachicardia, tachipnea, midriasi, tremori, ipervigilanza, vocalizzi, svuotamento dei sacchi anali, minzioni e/o defecazioni emozionali, evitamento associato a fuga e irrequietezza generale

con ipercinesia. L'evoluzione spontanea dello stato fobico al terzo stadio è il passaggio allo stato ansioso.

L'ansia

Lo stato ansioso secondo Pageat è caratterizzato dall'aumento delle probabilità di comparsa di risposte comportamentali ed emozionali analoghe a quelle della paura, in occasione di qualsiasi variazione dell'ambiente interno ed esterno, con conseguente disorganizzazione degli autocontrolli e perdita di adattabilità dell'organismo. ⁽⁸⁵⁾ E' distinta in un'ansia funzionale e in un'ansia patologica.

L'ansia funzionale è una manifestazione interna che rende l'individuo più reattivo e pronto a rispondere agli stimoli che lo circondano, più performante; un insieme di comportamenti di allarme che non provocano disagio funzionale o perdita dell'adattabilità,

L'ansia patologica invalida considerevolmente il soggetto modificando profondamente le relazioni che il cane ha con l'ambiente, i suoi conspecifici e l'uomo. Tra le ansie patologiche si annovera l'ansia parossistica, l'ansia intermittente e l'ansia permanente.

L'ansia parossistica si manifesta all'improvviso, per crisi, caratterizzata da intense manifestazioni comportamentali riferibili alla paura. La risposta comportamentale è legata all'attivazione del sistema nervoso autonomo con aumento dell'attività delle strutture noradrenergiche e manifestazioni a carico dell'apparato digerente, come scialorrea dispepsia e colon irritabile.

L'ansia intermittente è descritta come prolungati periodi di disordini comportamentali seguiti da remissione spontanea. In questo caso la risposta comportamentale è data dall'attivazione del sistema nervoso autonomo con aumento di attività delle strutture noradrenergiche e dopaminergiche, e quando la sintomatologia è presente da lungo tempo si assiste anche alla modificazione delle strutture serotoninergiche. Tra i sintomi, le manifestazioni dell'apparato digerente appaiono con importante frequenza, e sono presenti

insonnia a cicli rispettati legati all'ipervigilanza, modificazione e comportamento esploratorio con evitamento e comportamento di aggressione per irritazione da paura.

Nell'ansia permanente l'espressione di periodi di disordine comportamentale è continua. L'attivazione del SNA porta un aumento dell'attività delle strutture noradrenergiche, dopaminergiche e serotoninergiche. I sintomi gastroenterici diventano poco frequenti, l'insonnia è a cicli rispettati, ma compaiono attività di sostituzione, esacerbazione del comportamento somestesico, potomania, e modificazione del comportamento esploratorio con evitamento ed inibizione tali che arrivano a diminuire considerevolmente tutte le attività motorie. Da notare che diminuiscono o scompaiono le aggressioni da paura. Le attività di sostituzione, uno dei sintomi principali dello stato ansioso, sono attività motorie volontarie che si scatenano in un contesto conflittuale tale per cui il soggetto non riesce ad avere risposte di adattamento. Nei pazienti ansiosi è presente ipertono del sistema nervoso autonomo simpatico, e c'è un maggiore rilascio di catecolamine rispetto ai soggetti normali; inoltre c'è riduzione della fase R.E.M. Anche i livelli di GABA sono ridotti e ci sono evidenze di aumento dell'attività della corteccia temporale e del locus coeruleus, sede dei neuroni noradrenergici.⁽²²⁾

I tre neurotrasmettitori per cui è riconosciuto un coinvolgimento nell'insorgenza dell'ansia sono noradrenalina (*locus coeruleus*), GABA e serotonina (soprattutto nel rafe pontino).⁽²²⁾ L'aumento di serotonina e di dopamina è in grado di scatenare ansia.⁽²²⁾

Lo stato depressivo

Lo stato depressivo è caratterizzato dalla diminuzione della recettività agli stimoli e da un'inibizione non reversibile spontaneamente. Si divide in stato depressivo acuto o stato depressivo cronico. Nello stato depressivo acuto l'individuo è incapace di provare piacere in seguito alla realizzazione di un qualsiasi comportamento: anedonia. La risposta comportamentale è di totale

inibizione. Le alterazioni delle risposte comportamentali riguardano: il comportamento alimentare caratterizzato da iporessia o anoressia, il comportamento dipsico caratterizzato da adipisia, alterazione del sonno caratterizzata da ipersonnia, indifferenza agli stimoli esterni (apatia). Lo stato depressivo acuto è legato all'ipoattività delle strutture serotonergiche.⁽²²⁾

Lo stato depressivo cronico può instaurarsi sia per fattori esogeni che endogeni come disendocrinie, neoplasie o dolore cronico. La sintomatologia comportamentale si arricchisce di gravi alterazioni del sonno: si ha insonnia con inversione del ciclo, ansia ipnagogica, aumento del sonno paradossale e risvegli improvvisi durante la prima ora di riposo con emissione di feci e urine. Nell'ansia ipnagogica il soggetto presenta uno stato di irrequietezza e gemiti durante il periodo che precede l'addormentamento. Si aggiunge la modificazione degli apprendimenti con alterazione dei processi cognitivi e perdita di parte delle informazioni apprese. Lo stato depressivo cronico è caratterizzato da ipoattività delle strutture noradrenergiche, dopaminergiche e serotonergiche.⁽²²⁾ La dopamina gioca un ruolo primario nella fisiopatologia della depressione, nel meccanismo d'azione degli antidepressivi e nella risposta allo stress, situazione che determina l'incremento dei livelli di dopamina in diverse aree cerebrali (corteccia prefrontale).⁽²³⁾

5.2 PATOLOGIE DEL COMPORTAMENTO

Secondo l'American Psychiatric Association⁽²⁴⁾, un disturbo mentale è una sindrome caratterizzata da un'alterazione clinicamente significativa della sfera cognitiva, della regolazione delle emozioni o del comportamento di un individuo, che riflette una disfunzione dei processi psicologici, biologici o evolutivi che sottendono il funzionamento mentale.

I modelli operativi interni sono rappresentazioni mentali che hanno la funzione di veicolare la percezione e l'interpretazione degli eventi da parte dell'individuo, e di fare previsioni e crearsi aspettative sugli eventi della propria vita relazionale⁽²⁾.

Il disturbo dell'attaccamento

I disturbi dell'attaccamento sono spesso alla base di molte patologie del comportamento: ne consegue che raramente si presentano da soli, più spesso invece sono compresenti altre patologie comportamentali. Sono distinti in diverse espressioni, a seconda del modello di attaccamento primario e di conseguenza del modello relazionale che il cane ha sviluppato durante la crescita. Una costante di questa patologia è lo stato ansioso, a livelli diversi a seconda della gravità della patologia stessa. La paura del momento del distacco peggiora progressivamente, portando a un'anticipazione emozionale, per cui il cane inizia a preoccuparsi molto prima che ciò avvenga. Non sempre il paziente presenta comportamenti produttivi quando rimane da solo, perché non sempre l'ansia raggiunge la soglia oltre la quale si mostrano i sintomi attivi, soprattutto quando il cane impara a gestire i distacchi routinari⁽²⁾. Il progressivo aggravamento da uno stato di ansia intermittente ad uno di ansia permanente, dove il livello ansioso è sempre molto alto, è dovuto all'interiorizzazione del disagio con assenza dei comportamenti produttivi, ma comparsa di comportamenti compulsivi legati al corpo come leccamento e suzione, girare su se stessi e così via⁽²⁾.

Le patologie dell'omeostasi sensoriale

Sindrome da privazione sensoriale esperienziale e Sindrome da ipersensibilità iperattività

La sindrome da privazione sensoriale esperienziale (SPS) e la sindrome da ipersensibilità-iperattività (HS-HA) sono patologie del comportamento legate ad alterazioni dell'omeostasi sensoriale⁽²⁵⁾. Il cane con SPS presenta una gestione difficoltosa e deficitaria delle informazioni sensoriali che arrivano dall'ambiente di vita, e si manifesta con fobie ontogenetiche semplici e complesse, ansia permanente o depressione a seconda dello stadio. Per allostasi sensoriale si intende l'equilibrio agli stimoli esterni che si struttura durante lo sviluppo comportamentale attraverso la continua interazione con

l'ambiente che circonda l'individuo, e attraverso l'acquisizione di comportamenti efficaci a superare quelle situazioni che lo perturbano⁽²⁾. Un ambiente isolato e/o ipostimolante, porta al disturbo dell'allostasi sensoriale perché il soggetto non ha raccolto sufficienti informazioni attraverso i canali sensoriali nei periodi neonatale, di transizione e di socializzazione. Una madre non competente non promuove l'esplorazione del cucciolo e la conseguente acquisizione di nuove competenze, e non aiuta lo sviluppo degli autocontrolli. I processi di regolazione sono poco efficaci e portano all'iporegolazione emotiva, caratterizzata da comportamenti eccessivi, impulsività, eccessiva reattività agli stimoli e labilità emotiva. La prole sarà incapace valutare l'intensità degli stimoli esterni, che saranno sempre sovrastimati e porteranno a risposte comportamentali non adatte al contesto, esagerate, ridondanti. I cani con alterazione dell'omeostasi sensoriale sono caratterizzati da un profilo ansioso intermittente o permanente⁽²⁵⁾. Nella quasi totalità dei casi queste due sindromi sono legate da un filo talmente stretto con i disturbi dell'attaccamento, che non si può riconoscere una consecutio temporale in una situazione di causa effetto reciproche. I soggetti SPS sono cani evitanti, con numerose fobie ontogenetiche che possono arrivare al morso reattivo per paura. I soggetti con HS-HA sono cani che non posseggono un rumore cerebrale di fondo al di sotto del quale gli stimoli non portano ad un'attivazione comportamentale. Sono cani ipercinetici, con deficit della concentrazione e della memoria, ed hanno alterazioni del sonno. Il morso può arrivare per mancanza degli autocontrolli, può essere un morso involontario.⁽²⁾

Il disturbo competitivo di relazione.

Il disturbo competitivo di relazione, definito come sociopatia dalla scuola francese, è uno stato patologico dato da una deriva nei processi di status sociale all'interno del gruppo familiare, è distinto in intraspecifico, se la disfunzione dell'organizzazione del gruppo sociale avviene tra soggetti della

stessa specie, e interspecifico quando coinvolge specie diverse. La sintomatologia, in cui spiccano minacce e aggressioni, compare al raggiungimento della pubertà⁽²⁾. Il disturbo è diviso in due stadi a seconda dello stato di alterazione della sequenza di aggressione: il primo stadio reattivo evolve nel secondo stadio di iperaggressività secondaria. Nel primo stadio la sequenza è completa: prima fase di minaccia, fase consumatoria e fase di appagamento; nel secondo stadio invece, la sequenza è destrutturata con assenza della fase di minaccia e di appagamento. Sono individui soggetti ad ansia intermittente⁽²⁾.

La sindrome da disfunzione cognitiva nell'anziano

L'invecchiamento è un processo fisiologico che interessa tutti gli esseri viventi e si manifesta con modificazioni sia delle funzioni cellulari, tissutali e organiche, sia delle risposte comportamentali. L'invecchiamento interviene disorganizzando l'insieme dei comportamenti, facilitando la comparsa di alterazioni cognitive ed emozionali ed aggravando le affezioni comportamentali già in atto. La membrana cellulare dei neuroni presenta abitualmente zone più rigide e più fluide che corrispondono ad aree di mobilità recettoriale differente: i microdomini. L'invecchiamento si accompagna alla diminuzione della fluidità di tutta la membrana a causa dell'aumento del colesterolo tra i fosfolipidi, alla modificazione del rapporto tra sfingomieline e fosfatidilcolina, e alla presenza dei radicali liberi che originano in seguito alla morte neuronale. Ciò comporta l'alterazione della mobilità dei recettori di membrana e la comparsa di iper o ipo sensibilità in alcuni microdomini, che possono essere all'origine della messa in atto di risposte emozionali inadeguate conseguenti all'impossibilità dell'organismo di adattarsi alle variazioni ambientali⁽²⁾. Anche i sistemi di neurotrasmissione subiscono un processo di disorganizzazione, dovuto sia alla diminuzione della sintesi del neurotrasmettitore sia alla variazione numerica dei recettori. Negli animali anziani il sistema colinergico svolge un ruolo fondamentale nel deficit

mnemonico, poiché il numero dei recettori colinergici muscarinici diminuisce, soprattutto a livello della corteccia, e si riducono la sintesi e la liberazione dell'acetilcolina.⁽²⁵⁾ I recettori muscarinici hanno funzione di aprire o chiudere i canali del potassio, del calcio o del cloro, con la conseguente depolarizzazione o iperpolarizzazione della membrana. Il sistema colinergico centrale ha un ruolo importante nelle modificazioni cognitive correlate all'età. L'utilizzo della PET (tomografia a emissione di positroni) e della SPECT (tomografia computerizzata a emissione di fotone singolo) hanno dimostrato che la funzione postsinaptica serotoninergica si riduce e che i recettori 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} tendono a diminuire di numero e di sensibilità con l'avanzare dell'età.⁽²¹⁾ C'è un declino dei livelli di dopamina cerebrale associato all'età. L'attivazione enzimatica delle MAO-B sembra incrementare con l'età, contribuendo alla riduzione della trasmissione dopaminergica, mentre l'attivazione delle MAO-A non sembra si modifichi con l'età. Nel cane anziano il numero di recettori dopaminergici e serotoninergici, diminuisce e studi compiuti da Pageat hanno dimostrato che queste alterazioni sono alla base delle modificazioni cognitive, motorie e dell'umore.⁽²⁵⁾ È possibile dividere l'invecchiamento in un "invecchiamento di successo" e uno "non di successo": nel primo caso si assiste alla sola modificazione delle funzioni cognitive del cane, che comporta l'attuazione di una risposta comportamentale corretta, ma realizzata più lentamente, alle variazioni ambientali; nel secondo caso, appaiono importanti modificazioni emozionali, cognitive e dell'umore, che segnalano la presenza di un'affezione comportamentale. I sintomi che caratterizzano le patologie del comportamento del cane anziano riguardano alterazioni cognitive, disturbi dell'appetito e del sonno. Quando le risposte emozionali sfuggono a ogni controllo da parte dell'animale i processi cognitivi sono disorganizzati e compare un processo patologico definito di involuzione. Dal punto di vista cognitivo compare una regressione, cioè la ricomparsa di comportamenti infantili come l'esplorazione orale e

l'eliminazione inappropriata (sindrome confusionale). Quando a questo processo patologico si associa una disfunzione dei meccanismi inibitori, con alterazione dell'omeostasi sensoriale e perdita degli autocontrolli, nel cane si parla di quadro clinico della depressione da involuzione⁽²⁾. Nella depressione da involuzione i principali sintomi sono alterazioni del comportamento alimentare, alterazione del comportamento eliminatorio e alterazione del sonno-veglia. Il cane alterna momenti di anoressia a momenti di bulimia, compare ansia ipnagogica che si manifesta con gemiti, deambulazione continua con percorsi ripetitivi, stereotipati, trascinando mani e piedi. Il cane non reagisce agli stimoli di intensità normale, restando indifferente “in cuccia” o in un posto isolato. In concomitanza a forti rumori improvvisi, può manifestare vere e proprie crisi di panico, accompagnate da tachicardia e tachipnea, scialorrea, agitazione con vocalizzi, minzione e defecazione inappropriate. Ricompare l'esplorazione orale con distruzione di oggetti. I deficit emozionali possono portare all'instaurarsi di un iper-attaccamento secondario⁽²⁾.

Nella sindrome confusionale il cane presenta alterazioni del comportamento eliminatorio e alterazioni del comportamento del sonno in cui il ciclo è rispettato e senza ansia ipnagogica, ma l'animale dorme durante il giorno e la notte è in piena attività. Il cane presenta disorientamento spazio-temporale: non trova la cuccia o la ciotola del cibo, non trova più la porta di entrata e di uscita di casa, si perde in giardino o si allontana da casa vagando senza meta, fissa inebetito il muro. C'è perdita degli apprendimenti.

La sindrome da disfunzione cognitiva riguarda le modificazioni comportamentali che compaiono in alcuni cani anziani come conseguenza di un processo degenerativo del sistema nervoso centrale. È caratterizzata da disorientamento spazio temporale, alterazione o diminuzione delle interazioni sociali con i proprietari e con gli altri animali, disturbi del sonno, eliminazioni inappropriate, riduzione di tutte le attività, perdite cognitive. Il cane a volte

fissa il vuoto, non ricerca le interazioni con i proprietari, non ricorda nemmeno gli apprendimenti più semplici e di notte vaga per l'abitazione piangendo e abbaiano.

6. MICROBIOTA INTESTINALE

Nell'organismo sono presenti due involucri a contatto con l'esterno: la cute e l'apparato gastroenterico, che con la sua mucosa specializzata aggiunge alle proprietà di una barriera anche quella di un potente sistema immunitario per catalogare la flora microbica normalmente presente e combattere la popolazione patogena.

L'intestino ospita il microbiota: una popolazione diversificata di microrganismi tra cui lieviti, archeobatteri, parassiti, virus e protozoi, che si sono adattati a vivere sulla superficie della mucosa dell'intestino o nel suo lume, sviluppandosi da immediatamente dopo la nascita dell'ospite (Fig. 3).

(26)

Il concetto di microbiota intestinale è stato suggerito all'inizio da Joshua Lederberg, che coniò il termine "microbiota" per indicare "l'ecosistema di microrganismi commensali, simbiotici e patogeni che letteralmente condividono il nostro corpo".⁽²⁷⁾

Le classiche tecniche culturali non sono adatte alla coltivazione e all'isolamento del microbiota intestinale. Il primo punto critico è che attualmente non sono sufficienti le informazioni sulle necessità per la crescita ottimale della maggior parte dei microrganismi che lo compongono, e ciò spiega perché solo una piccola parte di questa popolazione riesca a crescere nei mezzi di coltura. In secondo luogo il tratto gastroenterico ospita principalmente i batteri anaerobi, che possono essere danneggiati durante il prelievo del campione. Da terzo alcuni microrganismi vivono in interazione mutualistica con altri o con l'ospite, e questo rende impossibile la crescita isolata in coltura. Da ultimo i sistemi di identificazione biochimici e fenotipici non riescono a classificare con precisione molti microrganismi che risiedono

nell'intestino: alcune colture selettive mancano di specificità sufficiente e spesso ne vengono contati anche altri oltre a quelli ricercati. È stato stimato che meno del 10% dei batteri intestinali può essere coltivato con le tecniche di routine e solo una piccola frazione può essere correttamente classificata utilizzando i classici criteri morfologici e biochimici.⁽⁶⁾

Siccome le colture batteriche sottostimano la diversità del microbiota intestinale, gli strumenti molecolari sono diventati l'approccio standard nella determinazione della popolazione microbica, rivelando la sostanziale diversità batterica e studiando gruppi di microrganismi difficilmente coltivabili. I campioni per le analisi molecolari di DNA o RNA provengono da feci, biopsia intestinale o contenuto luminale. La maggior parte degli studi molecolari è stata condotta analizzando la sequenza del gene che codifica per la subunità 16S dell'RNA ribosomiale (rRNA). I tre approcci comunemente più utilizzati per studiare la diversità del microbioma intestinale sono il targeting genico mediante polymerase chain reaction (PCR), le tecniche di ibridazione basate su sonde oligonucleotidiche fluorescenti, come l'ibridazione fluorescente in situ (FISH), e le tecniche di fingerprinting molecolare, come la denaturazione elettroforetica su gel a gradiente (DGGE). Le tecniche di targeting genico utilizzano primer genespecifici per amplificare i geni bersaglio come le regioni conservate del 16S rRNA. Inoltre la PCR associata all'uso della trascrittasi inversa (RT-PCR) viene utilizzata specificamente per amplificare i geni batterici a partire da campioni di feci. Uno dei metodi sopra citati è l'ibridazione fluorescente in situ dell'rRNA: basandosi sulle sequenze dell'rRNA 16S, le sonde possono essere sintetizzate in modo tale da legarsi specificamente ai geni degli organismi di interesse, ed utilizzando diversi marcatori fluorescenti si possono visualizzare simultaneamente vari tipi di microrganismo all'interno di comunità complesse. Le tecniche di fingerprinting molecolare di solito vengono utilizzate per analizzare la diversità microbica. La DGGE (elettroforesi su gel

in gradiente denaturante) e la TGGE (elettroforesi su gel a gradiente di temperatura) sono forse le tecniche più comunemente utilizzate e sono utili nel fornire una panoramica della diversità del microbiota intestinale. L'impronta molecolare ha dimostrato che ogni individuo cane o gatto ha un unico e stabile ecosistema microbico. Gli animali ospitano gruppi batterici simili quando si analizzano ad alto livello filogenetico (per esempio a livello di famiglia o di genere), ma il microbioma di ogni animale differisce sostanzialmente a livello di specie o ceppo, con tipicamente una coincidenza che va da solo il 5% al 20% di specie batteriche in comune.⁽²⁸⁾

La tecnologia microarray è un potente strumento per la rapida individuazione di migliaia di sequenze genetiche dell'rRNA 16 S, fornendo un profilo delle comunità microbiche presenti nell'intestino.

Queste tecniche hanno rivelato una significativa diversità microbica nei campioni di feci, ma forniscono informazioni piuttosto limitate. È importante tenere presente che le metodiche molecolari hanno delle limitazioni: l'uso di diversi metodi di estrazione del DNA e l'uso di diversi primer PCR possono dare risultati leggermente diversi di uno stesso campione.

La metagenomica esplora la composizione globale delle comunità microbiche, combinando la biologia molecolare e le tecniche genetiche per identificare e caratterizzare il materiale genetico di ambienti microbici complessi. L'analisi dei geni più frequentemente isolati riguarda in primo luogo l'espressione dei mezzi di adesione alle proteine dell'ospite (collagene, fibrinogeno, fibronectina), requisito fondamentale per la possibilità di persistenza nel tratto gastrointestinale, e in secondo luogo la fermentazione degli zuccheri.

Il microbiota è formato da circa 10^4 microbi, il cui numero è 10 volte superiore al numero delle cellule eucariotiche del corpo. L'insieme dei geni dei batteri viene definito microbioma intestinale, e consiste di circa 10 milioni

di geni, superando più di 400 volte la dimensione del genoma umano che consta di 23.000 geni circa.⁽²⁹⁾

Tra gli animali domestici il cane ha un apparato gastroenterico relativamente semplice e non si affida al microbiota per il bilancio energetico. Ciò nonostante il suo microbiota intestinale è composto da diverse decine di phyla. Il microbioma intestinale dei cani è più simile a quello umano rispetto a quello di topi e maiali,⁽³⁰⁾ ed è stato dimostrato che i proprietari condividono più microbioma con il loro cane che con i cani altrui, e che c'è un maggiore effetto della coabitazione sul microbioma della pelle rispetto a quello orale o fecale.⁽³¹⁾ Il gatto, evoluto come carnivoro stretto, si affida all'alta concentrazione di proteine dei tessuti animali come unica fonte di energia, e si è metabolicamente adattato a un basso utilizzo di glucosio e ad un alto metabolismo delle proteine. Sebbene condivida caratteristiche anatomiche e di metabolismo con il gatto, il cane ha una dieta più onnivora e può digerire, assorbire e metabolizzare una considerevole quantità di carboidrati. Nonostante la fonte di energia per cani e gatti non dipenda strettamente dalle fermentazioni microbiche, un equilibrato e stabile microbiota intestinale è fondamentale per un intestino in salute.

6.1 I Procarioti

Da uno studio di Mondo et al. del 2020, i phyla più abbondanti nei cani, differenziati utilizzando la piattaforma Illumina MiSeq, sono *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*, mentre *Fusobacteria* e *Proteobacteria* sono i meno rilevanti.⁽³²⁾

Ci sono significative somiglianze tra i phyla batterici predominanti presenti nel tratto gastroenterico di carnivori ed onnivori, e tra le differenze di composizione lungo il tratto gastroenterico.⁽³³⁾ In generale il numero di batteri e la loro diversità aumentano gradualmente lungo il tratto gastroenterico. Suchodolski et al. già nel 2011 evidenziano che gli studi basati su tecniche di coltivazione hanno rivelato che nello stomaco sono presenti da 10^1 a 10^6 cfu/g

o ml di microrganismi. Le specie predominanti sono *Helicobacter* spp e *Lactobacilli* spp. Nello stomaco *Helicobacter* spp rappresenta il 99% delle sequenze identificate, mentre il rimanente 1% è costituito da batteri acidolattici produttori e da *Clostridium* spp.⁽²⁸⁾ Nel piccolo intestino prossimale dei cani sono stati identificati 10 diversi phyla batterici. La conta batterica del duodeno e del digiuno dei cani mostra una pronunciata variabilità individuale: è bassa nella maggior parte dei casi (<10³ cfu/g o ml di aspirato duodenale), ma possono aumentare fino a 10⁹ cfu/g o ml in alcuni soggetti. L'ileo ospita approssimativamente 10⁷ cfu/g o ml, mentre il colon conta dai 10⁹ ai 10¹¹ cfu/g o ml. I principali generi batterici sono *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* spp e la famiglia *Enterobacteriaceae*. La concentrazione batterica aumenta cranio-caudalmente lungo il tratto gastrointestinale.

Dalle tecniche molecolari risulta che nello stomaco dei cani sani, la carica batterica totale è piuttosto bassa (10⁵ log 10 16 S rRNA copy numbers), ed appartiene soprattutto a *Proteobacteria* (99.6% delle sostanze genetiche ottenute) e solo in piccola misura a *Firmicutes* (0.3%).

Firmicutes, che è il più abbondante phylum batterico in tutte le parti dell'intestino del cane, è rappresentato principalmente dall'ordine *Clostridiales*, a sua volta organizzato in distinti gruppi filogenetici *Clostridium*.⁽²⁸⁾

Secondo Suchodolski et al. (2018), a livelli filogenetici inferiori, il piccolo intestino dei cani ospita principalmente *Clostridiales*, *Lactobacillales* e varie classi di *Proteobacteria*, mentre il grosso intestino ospita quasi esclusivamente specie anaerobiche degli ordini *Clostridiales* e *Bacteroides*, le famiglie *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae*, e i generi *Prevotella* e *Fusobacteria*. I membri dell'ordine *Clostridiales* sono in particolare molto abbondanti, e si pensa che le specie batteriche di quest'ordine svolgano importanti funzioni del grosso intestino, come produzione di SCFA,

Phylum	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum
Actinobacteria	1.9	2.7	0.0	11.7
Bacteroidetes	33.3	14.7	5.4	55.1
Epsilonbacteraeota	0.7	1.5	0.0	6.4
Firmicutes	33.0	16.5	6.8	73.9
Fusobacteria	24.4	10.1	0.0	41.9
Proteobacteria	6.5	7.5	0.1	25.4
Other bacteria	0.2	0.2	0.0	0.7
Genus	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum
<i>Allobaculum</i>	0.5	1.1	0.0	5.4
<i>Alloprevotella</i>	5.2	5.3	0.0	16.9
<i>Anaerobiospirillum</i>	1.3	3.4	0.0	17.5
<i>Bacteroides</i>	21.1	14.1	4.1	51.6
<i>Blautia</i>	2.5	2.8	0.0	11.2
<i>Catenibacterium</i>	0.6	1.5	0.0	7.1
<i>Clostridium</i>	1.0	1.8	0.0	7.6
<i>Collinsella</i>	1.6	2.5	0.0	11.3
<i>Dialister</i>	0.5	2.6	0.0	13.8
Erysipelotrichaceae bacterium	0.1	0.3	0.0	1.2
<i>Escherichia-Shigella</i>	3.1	6.1	0.0	24.5
<i>Fusobacterium</i>	24.2	10.0	0.0	41.6
<i>Helicobacter</i>	0.6	1.6	0.0	6.4
<i>Holdemanella</i>	0.8	2.7	0.0	14.5
<i>Lachnospira</i>	0.5	1.5	0.0	8.0
Lachnospiraceae bacterium	5	4.4	0.8	18.5
<i>Lactobacillus</i>	1.3	6.6	0.0	35.5
<i>Megamonas</i>	4.6	6.3	0.0	29.6
<i>Peptoclostridium</i>	5.8	7.5	0.0	34.0
Peptostreptococcaceae bacterium	0.7	1.6	0.0	8.2
<i>Phascolarctobacterium</i>	1.8	3.3	0.0	16.3
<i>Prevotella</i>	6.2	9.4	0.0	35.1
<i>Sarcina</i>	0.8	3.8	0.0	20.5
<i>Streptococcus</i>	0.6	1.1	0.0	3.9
<i>Sutterella</i>	1.4	1.8	0.0	9.0
<i>Turcibacter</i>	1.1	2.4	0.0	9.5
Other bacteria	7.0	4.0	0.2	15.9

Fig. 3 Composizione del microbioma intestinale in cani a livello di phylum e genere in percentuale. (Kubinyi et al. 2020)⁽³⁵⁾

metabolismo dell'indolo, sintesi di vitamine e sintesi di aminoacidi.⁽³³⁾ *Clostridiales*, così come *Ruminococcus* spp, *Faecalibacterium* spp, *Dorea* spp, e *Turcibacter* spp, sono importanti produttori di SCFA.

La maggior parte degli studi sul microbiota del cane utilizza i campioni ottenuti da feci o da prelievi nel colon, ricercando le frazioni S16 rRNA. In uno studio Swanson et al. (2011), analizzando i campioni ottenuti dal prelievo nel colon di sei cani da caccia con tecnica Sanger, hanno identificato quattro phyla predominanti: *Firmicutes* (47.7%), *Proteobacteria* (23.3%),

Fusobacteria (16.6%) e *Bacteroidetes* (12.4%).⁽³⁴⁾ Nello stesso studio è stata caratterizzata la differenza del microbiota lungo il tratto gastroenterico e in particolare tra duodeno e colon. *Clostridiales* predominano nel duodeno (40%) e nel digiuno (39%) e sono molto abbondanti in ileo (25%) e colon (26%), mentre *Fusobacteriales* e *Bacteroidales* sono gli ordini batterici predominanti in ileo (33%) e colon (30%). *Enterobacteriales* sono più comunemente osservati nel piccolo intestino rispetto al colon, mentre *Lactobacillales* si trovano in tutte le parti dell'intestino e la loro proporzione non varia in modo significativo.⁽³⁰⁾

I principali filati identificati nel microbioma del cane anziano erano *Bacteroidetes*, *Firmicute* (33% entrambe), e *Fusobacteria* (24%), seguiti da *Proteobacteria* (7%) e *Actinobacteria* (2%).⁽³⁵⁾ I generi principali erano *Fusobacterium*, *Bacteroidetes*, *Prevotella*, *Peptoclostridium* e *Alloprevotella* (>5% in media).⁽³⁵⁾

Nel 2019 è stato studiato un gruppo di cani composto da 31 Pitbull impiegati illegalmente nei combattimenti e sequestrati. Un campione di feci da tutti i 31 cani è stato raccolto nel canile in cui erano in custodia. È stato prelevato il centro delle feci per minimizzare la potenziale contaminazione batterica dovuta al pavimento del canile. I 31 cani divisi in 17 femmine e 14 maschi, sono stati sottoposti a valutazione comportamentale da parte dell'agenzia del benessere animale che li ha sequestrati, e che li ha divisi in due categorie 21 soggetti con aggressività intraspecifica e 10 soggetti non aggressivi. Le aggressioni si sono verificate in una di queste 3 modalità: introduzione di un peluche a grandezza naturale, incontro a rete con un cane dello stesso sesso, e incontro senza barriere con un cane dello stesso sesso. Le manifestazioni aggressive verso il peluche a grandezza naturale includevano ringhio, morso, morso e presa, morso e scuotimento e rigidità fisica (indice di tensione emotiva) incoerente con la presenza di un gioco. Le manifestazioni aggressive verso un soggetto dello stesso sesso includevano ringhio, ringhio più balzi in

avanti, comportamento di monta ringhiando, minacce di morso e morso. I cani non aggressivi non hanno manifestato nessun comportamento di aggressione né verso il peluche né verso altri cani. *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*, sono i phyla dominanti nei campioni di feci. Ci sono differenze tra i phyla predominanti nei campioni di cani aggressivi e nei campioni di cani non aggressivi. In particolare *Proteobacteria* e *Fusobacteria* sono più abbondanti nei cani non aggressivi, mentre *Firmicutes* è più abbondante nei cani aggressivi. La famiglia *Lactobacillaceae* è più rappresentata nei cani aggressivi, mentre la famiglia *Fusobacteriaceae* abbonda nei non aggressivi. Così come il genere *Lactobacillus* è più abbondante nei cani aggressivi, mentre il genere *Fusobacteria* è più abbondante nei cani non aggressivi. Un'ulteriore divisione tra cani aggressivi e non aggressivi è stata osservata a livello di OTUs., in particolare sette OTU sono differenti: quattro appartenenti al genere *Dorea*, due al genere *Lactobacillus* e uno al genere *Turicibacter*.⁽³⁶⁾

Secondo Mondo et al. (2020) i cani aggressivi mostrano una proporzione simile riguardo ai phyla dominanti comparati al gruppo con un comportamento normale, ad eccezione di una relativa ridotta abbondanza di *Bacteroidetes*. A livello familiare, *Lachnospiraceae*, *Erysipelotrichaceae* e *Clostridiaceae* costituiscono i componenti principali del gruppo di comportamento normale (abbondanza relativa >10%). Un impoverimento dell'abbondanza relativa di *Bacteriodaceae*, *Alcaligenaceae* e *Paraprevotellaceae*, nonché un aumento di *Erysipelotrichaceae* (valore $P < 0.05$) è stato osservato nel gruppo aggressivo rispetto al gruppo con comportamento normale. Il gruppo fobico era invece caratterizzato da un aumento dell'abbondanza relativa della famiglia *Rikenellaceae* rispetto al gruppo con comportamento normale. I gruppi aggressivi e fobici sono risultati distinguibili a causa delle diverse proporzioni dell'abbondanza relativa delle famiglie batteriche *Mogibacteriaceae* e *Veillonellaceae*, rispettivamente

impoverite una e arricchite le altre nel gruppo aggressivo. A livello tassonomico di genere, *Clostridium*, *Megamonas* e *Eubacterium* hanno mostrato tendenza opposta. A livello di genere, non sono state rilevate differenze significative tra il gruppo fobico e quello con comportamento normale. Le differenze riscontrate tra gruppi fobici e aggressivi erano dovute a una maggiore abbondanza relativa di *Catenibacterium* e *Megamonas* in quest'ultimo gruppo, oltre a un leggero impoverimento del genere *Epulopiscium*. La diversità intra individuale del microbioma intestinale canino è stata valutata mediante la metrica Observed OTUs e l'indice di biodiversità di Shannon a livello di genere. Mentre secondo l'indice di Shannon la diversità del microbiota intestinale tra gli individui era esigua nei gruppi di comportamento aggressivo, fobico e normale, la metrica Observed OTUs ha evidenziato una differenza statistica tra il gruppo aggressivo e il gruppo fobico. In particolare, il gruppo aggressivo era caratterizzato da un aumento del numero dei differenti taxa osservati, il gruppo fobico aveva il valore più basso e il gruppo di comportamento normale mostrava valori intermedi.

Inoltre secondo l'indice di somiglianza di Jaccard, c'è una separazione significativa tra la composizione strutturale del microbiota intestinale tra i gruppi di studio. I principali generi rappresentati nei soggetti con comportamento normale erano *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Phascolarctobacterium*, *Fusobacterium*, *Prevotella*. Il gruppo fobico era caratterizzato da un arricchimento in *Lactobacillus*, mentre *Dorea blautia*, *Colinsella*, *Ruminococcus*, *Slackia*, *Catenibacterium* e *Megamonas* erano più rappresentati all'interno del gruppo aggressivo. I generi batterici discriminatori del comportamento sono stati identificati con cambiamenti distintivi nelle loro abbondanze relative. Nello specifico, sono due i generi batterici "aggressivi-discriminatori": *Catenibacterium* e *Megamonas*. Lo studio suggerisce che le configurazioni del microbiota intestinale disbiotiche

in uno scenario di livelli di stress a lungo termine potrebbero influenzare l'ambiente intestinale locale attraverso il rilascio di sottoprodotti microbici potenzialmente neuroattivi, probabilmente influenzando il comportamento dell'ospite principalmente come effetto collaterale. In particolare, i cani che presentano disturbi comportamentali aggressivi sono caratterizzati da una peculiare struttura del microbiota intestinale, un'elevata biodiversità e un arricchimento di generi batterici generalmente sottodominanti.⁽³²⁾

6.2 I Funghi

I funghi hanno un ruolo importante per le complesse interazioni funghi-batteri, funghi-funghi e funghi-ospite, che influenzano la salute e in alcuni casi le malattie dell'ospite. I funghi che costituiscono il microbioma nell'uomo comprendono *Candida*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* e *Penicillium*.⁽³⁷⁾ La caratterizzazione del microbioma fungino nelle feci di cane è datata 2013. I phyla predominanti erano *Ascomycomata* (97.9%) e *Basidiomycomata* (1%). Non c'erano differenze nella presenza fungina in cani sani o cani con diarrea.⁽³⁸⁾ Studi di coltivazione hanno dimostrato la presenza di lieviti e muffe nell'intestino di quasi il 25% di Beagle sani, e con conta fungina rispettivamente di 10^1 cfu/g di contenuto digiunale e 10^5 cfu/g di feci. Il *Saccharomycetes* è la classe più rappresentata. I funghi sono osservati più frequentemente aderenti alla mucosa intestinale piuttosto che all'interno del contenuto luminale.⁽²⁸⁾

6.3 I Virus

I virus costituiscono il viroma. Nelle feci umane si ritiene siano presenti anche 10^9 particelle virus-simili per grammo.⁽³⁹⁾ I batteriofagi sono i virus enterici prevalenti. Vista l'eterogeneità dei virus non è possibile l'approccio con i primer universali è perciò impegnativo caratterizzare le comunità virali presenti nell'intestino di cani e gatti.⁽²⁸⁾

Le cellule dell'intestino sono equipaggiate con i Pattern Recognition Receptors (PRR), recettori transmembrana, o intracitoplasmatici, capaci di

riconoscere specificamente e legare i microbial-associated molecular patterns (MAMP) come lipopolisaccaridi, flagellina, peptidoglicani, peptidi formilati e altri. I PRR includono i toll-like receptors (TLR) transmembrana, che controllano lo spazio extracellulare, mentre i non-like receptors (NLR) si occupano del compartimento intracellulare citoplasmatico. I RIG-like helicases e i C-type lectin receptors sono PRR coinvolti rispettivamente nell'individuazione di componenti virali e fungine.

6.4 Gli Archeobatteri

Gli Archeobatteri sono distinti da un punto di vista evolutivo dai procarioti e dagli eucarioti, sono anaerobi obbligati. Gli Archeobatteri metanogenici rappresentano un'altra componente del microbiota intestinale, importante per la fermentazione batterica.⁽⁴⁰⁾ L'idrogeno è il prodotto finale di molte fermentazioni a livello di microbioma, è metabolizzato dai metanogeni e dai batteri solfato-riduttori (SRB) trasformandolo in metano e solfito di idrogeno. Il consumo di idrogeno è importante perché un enorme accumulo di idrogeno andrebbe ad inibire ulteriori fermentazioni microbiche, causando una diminuzione della produzione degli SCFA.

Le differenze interindividuali nella composizione totale del microbiota possono essere notevoli, il che rende difficile definire un microbiota sano standard.

6.5 Attività Metaboliche

Il microbiota intestinale è un organo con grande capacità metabolica che si esplica attraverso la produzione di un grande numero di metaboliti, la maggior parte dei quali prodotti dalla fermentazione batterica.⁽³³⁾

Ad esempio il microbiota fornisce gli acidi grassi a catena corta come nutrienti per i colonociti. Il microbiota intestinale, tramite il controllo diretto e indiretto del metabolismo del triptofano, contribuisce alla sintesi di un'abbondanza di molecole neuroattive come serotonina, chinurenina, triptamina e composti indolici, con importanti ruoli fisiologici nel controllo

della comunicazione dell'asse intestino-cervello. Il triptofano è essenziale per gli animali, che lo ricavano prevalentemente da fonti esogene, come l'apporto alimentare dei nutrienti e solo in parte, dalla degradazione proteica endogena. È contenuto anche in forma libera nel latte materno, e svolge un ruolo importante per lo sviluppo post natale del bambino. Nonostante le differenze filogenetiche, i prodotti metabolici del microbiota gastrointestinale sono simili tra gli individui. I vari membri della comunità microbica svolgono funzioni simili, e se un gruppo è carente a causa di fattori esterni (come l'antibiotico terapia), gli altri membri del microbiota sono capaci di mantenere la funzionalità dell'ecosistema.

Interventi nella dieta possono condizionare la composizione dei microbiota intestinale con effetti importanti sulla salute dell'ospite. Tipicamente il cibo industriale è diviso in secco e umido, ma le più importanti differenze riguardano composizione, proteine, grassi e carboidrati.

7. ASSE INTESTINO-CERVELLO E COMPORTAMENTO.

I componenti del microbiota comunicano tra di loro attraverso metaboliti, simili a quelli riconosciuti dalle cellule dell'ospite e possono quindi interagire con le sinapsi del SNA intestinale. I nervi autonomi dell'intestino trasportano informazioni sensoriali e possono segnalare direttamente al cervello la stimolazione del metabolita microbico gastrointestinale locale. I singoli componenti dell'asse microbiota-intestino-cervello, comunicano tra loro bidirezionalmente, sia in modo antagonistico che sinergico, all'interno del sistema nervoso autonomo. La densità e la proporzione della sostanza P contenuta nei neuroni, un neurotrasmettitore coinvolto nella neurotrasmissione motoria e sensoriale dell'intestino, sono aumentate in risposta all'alterazione del microbiota intestinale indotta dagli antibiotici, così come la densità del TLR2, che quando attivato recupera parzialmente la funzione intestinale.⁽¹⁹⁾ Il microbiota e il cervello comunicano attraverso diverse vie incluso il sistema immunitario, il metabolismo del triptofano, il

nervo vago e il sistema nervoso enterico, coinvolgendo metaboliti microbici come acidi grassi a catena corta, aminoacidi a catena ramificata e peptidoglicani.

I percorsi neurali anatomici per il controllo delle funzioni intestinali formano un'organizzazione gerarchica "a quattro livelli".⁽⁴¹⁾ Il primo livello è l'SNE compresi i gangli mioenterici, il ganglio sottomucoso e le cellule gliali dell'intestino. Il secondo livello è costituito dai gangli paravertebrali che regolano le risposte riflesse viscerali. Il terzo livello è il sistema nervoso autonomo nel midollo spinale, il nucleo del tratto solitario nel tronco encefalico e il nucleo motorio dorsale del nervo vago, rispettivamente. Il quarto livello è composto dai centri cerebrali superiori. Le informazioni provenienti dai centri corticali e sottocorticali convogliano verso i nuclei peculiari del tronco encefalico, che controllano molte funzioni intestinali. La comunicazione neurale diretta tra il microbiota intestinale e il cervello si realizza principalmente attraverso il nervo vago, cioè i batteri stimolano i neuroni afferenti del sistema nervoso enterico, e il segnale vagale dall'intestino può stimolare la risposta infiammatoria, prevenendo la setticemia causata dai microrganismi.⁽⁴¹⁾ L'attivazione dei neuroni sensoriali vagali attraverso l'inoculazione intestinale di *Campylobacter jejuni* nei topi, ha portato all'attivazione diretta del marcatore c-Fos nei gangli sensoriali vagali e nel nucleo sensoriale primario per il nervo vago, il nucleo del tratto solitario nel midollo allungato.⁽⁴²⁾ Un numero crescente di evidenze suggerisce che le interazioni microbiota-ospite a livello dell'intestino portino al rilascio di citochine, chemochine, neurotrasmettitori, neuropeptidi, messaggeri endocrini e sottoprodotti microbici che possono infiltrarsi nel sistema sanguigno o linfatico, o influenzare i messaggi neuronali trasportati costantemente al cervello per aggiornare lo stato di salute dai neuroni afferenti vagali e spinali, e in questo modo regolare il cervello stesso e il comportamento. Metaboliti neuromodulatori derivati dal microbiota

includono precursori e metaboliti del triptofano, della serotonina, del GABA e delle catecolamine.

L'indolo è il principale metabolita prodotto dai batteri intestinali a partire dal triptofano, attraverso l'azione dell'enzima triptofanasi. Dopo l'assorbimento, l'indolo viene ulteriormente metabolizzato da enzimi epiteliali intestinali ed epatici in una famiglia di derivati ossidati e coniugati. Tra questi, l'ossindolo e l'isatina sono molecole neurodepressive, come indicato dai loro effetti sui ratti, inducendo una diminuzione dell'attività locomotoria in seguito a iniezione sistemica.⁽⁴³⁾ Inoltre, a seconda della dose, l'ossindolo induce perdita del riflesso di raddrizzamento, ipotensione e persino coma reversibile, mentre l'isatina promuove comportamenti ansiosi, inattività e compromette le funzioni cognitive.⁽⁴³⁾

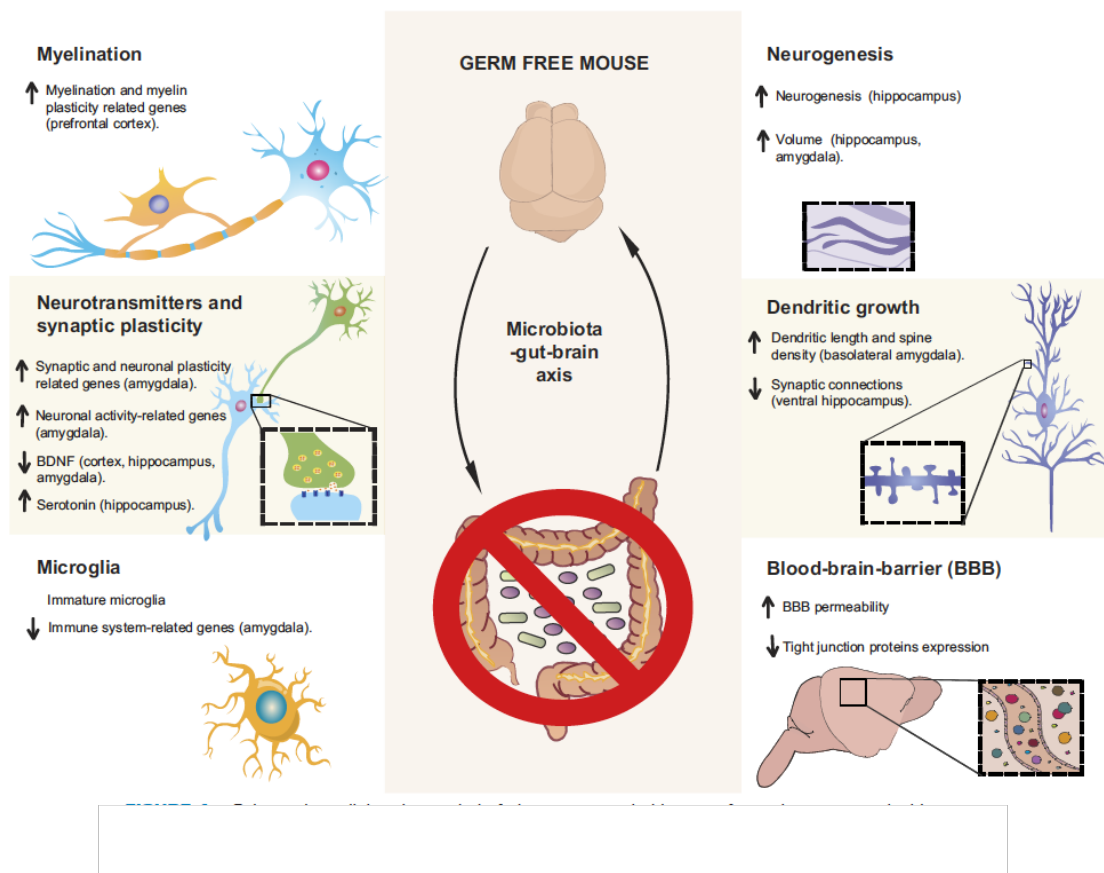


Fig. 4 Schematizzazione delle numerose alterazioni neuronali nei topi germ-free rispetto ai tipo convenzionali. (Cryan et al., 2019) ⁽⁶⁾

Molte delle conoscenze dell'asse intestino-cervello, del complesso multicellulare, e del canale di comunicazione bidirezionale, derivano dai topi GF e dai modelli murini gnotobiotici. (Fig. 4) Questi modelli sono stati usati per esaminare come un cambio netto di microbiota può influenzare il sistema nervoso enterico e il sistema nervoso centrale, anche in seguito al trapianto fecale con campioni da pazienti malati o non malati.⁽¹⁴⁾ Questi modelli murini GF hanno portato alla scoperta di correlazione tra il cambio del microbiota intestinale e le patologie neurologiche funzionalmente separate. L'utilizzo nelle ricerche di topi GF trapiantati con campioni fecali di donatori umani, hanno mostrato un collegamento funzionale tra alcuni taxa del microbiota intestinale e l'insorgenza di sintomi neurologici. In uno studio del 2019 Sharon et al. hanno osservato dei cambiamenti nel comportamento e nella neurochimica dei topi GF che avevano ricevuto trapianto di microbiota da individui colpiti da sindrome dello spettro autistico (ASD), in particolare mostravano sintomi di ASD, a differenza del gruppo di controllo trapiantato con microbiota di individui neurotipici, e differenti taxa batterici. I livelli di *Akkermansia*, *Sutterella* e *Lachnospiraceae* erano tutti aumentati, *Bacteroidetes*, *Bacteroides* e *Parabacteroides* diminuiti.⁽⁴⁴⁾ Sempre nello stesso studio, l'analisi dei metaboliti microbici nel contenuto del colon ha mostrato differenze significative nei topi seminati ASD, incluso un minor livello di acido 5-aminovalerico e taurina, che sono entrambi agonisti per i recettori GABA_A, e sono conosciuti per essere ridotti negli individui con ASD. Questo suggerisce che il microbiota intestinale, attraverso le secrezioni di questi metaboliti, può influenzare i segnali neuronali inibitori del GABA, portando a manifestazioni comportamentali simil-ASD.⁽⁴⁴⁾ Inoltre, la somministrazione orale di acido 5-aminovalerico o taurina in topi ASD dal concepimento all'età adulta, ha ridotto i comportamenti tipici, diminuendo l'eccitabilità neuronale nella corteccia prefrontale.⁽⁴⁴⁾ Anche altri metaboliti batterici, come il p-Cresolo, hanno mostrato effetti sui sintomi ASD

promuovendo questi comportamenti.⁽⁴⁵⁾ In un modello murino di autismo, non solo è stata osservata una anormale funzione intestinale, caratterizzata da stitichezza, ma anche cambiamenti ultrastrutturali e neurochimici del sistema nervoso enterico, e cambiamenti nel profilo degli acidi biliari fecali non dissimile da quelli osservati nei topi trattati con antibiotici, in particolare livelli elevati di acido taurocolico fecale.⁽⁴⁶⁾

Il microbiota svolge anche un ruolo di primo piano nella regolazione da parte dell'asse intestino-cervello dei comportamenti sociali, legati allo stress e alla depressione. È stato dimostrato che i topi GF hanno uno sviluppo sociale anormale e che i comuni ceppi probiotici intestinali come *Lactobacillus rhamnosus*⁽⁴⁷⁾ e *Bifidobacterium breve*⁽⁴⁸⁾ potrebbero ridurre comportamenti correlati allo stress e alla depressione nei topi attraverso la stimolazione vagale GABAergica aumentando i livelli di acidi grassi a corta catena e di serotonina, rispettivamente.

Nel topo la barriera ematoencefalica (BBB) si sviluppa tipicamente intorno alla seconda settimana di vita embrionale, con una permeabilità che diminuisce bruscamente a circa 15 giorni. Gli embrioni di topo GF, invece, mostrano una maggiore permeabilità della barriera con una ridotta espressione delle proteine occludenti delle giunzioni strette fino a 16-18 giorni di vita embrionale.⁽⁴⁹⁾ Lo stesso studio ha identificato che l'integrità della barriera ematoencefalica può essere ripristinata dalla ricolonizzazione post natale del microbiota, il che implica un ruolo causale per il microbiota nell'assicurare lo sviluppo della BBB. Oltre allo stato germ-free, altri fattori materni come dieta, obesità, attivazione immunitaria e stress, sono noti per alterare gli esiti di salute mentale e fisica della prole e influenzarne la composizione del microbiota.⁽⁴⁹⁾

Sia l'invecchiamento che lo stress indeboliscono l'integrità e la funzione della barriera gastrointestinale e influenzano negativamente la permeabilità della barriera ematoencefalica, accelerando potenzialmente l'infiammazione. Il

microbioma intestinale ha un ruolo nella regolazione della neuroimmunità dalla mezza età alla vecchiaia. Uno studio sui prebiotici ha esaminato l'effetto di diete diverse per contenuto di zuccheri, grassi e fibre sul microbiota intestinale di topi umanizzati con microbiota di persone anziane sane o fragili. Il microbiota intestinale associato alla fragilità non evolveva in un microbiota più giovane e sano come stato. Comunque l'integrazione con prebiotici negli essere umani è stata associata a un minor numero di effetti positivi rilevati rispetto a quanto avviene nei modelli animali.⁽⁵⁰⁾

Numerosi gruppi di ricerca hanno dimostrato che il metabolita 4-etilfenilsufato, modulato dal microbiota, è sufficiente per indurre comportamenti ansia-simile nel topo.⁽⁵¹⁾

I cambiamenti nella composizione del microbiota associati allo stress, e le anomalie del sistema nervoso enterico possono verificarsi indipendentemente l'uno dall'altro, come osservato nella prole di madri esposte a stress prenatale in cui i cambiamenti più significativi indotti dallo stress nel microbiota intestinale non erano correlati con l'intestino fisiologico e i parametri del sistema nervoso enterico.⁽⁵²⁾

Uno degli aspetti principali del concetto di endocrinologia microbica si basa sul linguaggio neurochimico condiviso che esiste tra ospite e microbo. È noto da tempo che i microbi sono in grado di produrre sostanze neurochimiche che tipicamente associamo agli organismi dei mammiferi. Gli studi di riferimento degli anni '90 sono stati i primi a dimostrare che i batteri rispondono alle molecole di segnalazione neuroendocrine dell'ospite, tra cui sia epinefrina che norepinefrina, e che il microbiota può influenzare il comportamento dell'ospite attraverso l'asse intestino-cervello.⁽⁵³⁾ Da quel momento si è dimostrato che il microbiota sintetizza e risponde a diverse sostanze neurochimiche chiave che sono coinvolte nell'umore, nel comportamento e nella cognizione dell'ospite. Molte di queste molecole neuroattive di origine ospite e microbica sono anche importanti molecole di segnalazione delle

interazioni ospite-microbiota a livello dell'interfaccia intestinale. Le catecolamine svolgono diversi ruoli nella fisiologia dell'ospite, che vanno dalla risposta di lotta o fuga indotta dallo stress, all'influenza sull'integrità intestinale, all'influenza sul comportamento motivazionale dell'ospite e sul processo decisionale. I nervi enterici contengono il meccanismo genetico necessario per sintetizzare la dopamina e la noradrenalina, ma mancano di feniletanolamina N-metiltransferasi, l'enzima che converte la noradrenalina in adrenalina. Questa considerazione è importante perché è stato dimostrato che il microbiota, e in particolare l'enzima batterico glucuronidasi, svolge un ruolo critico nella conversione da una forma biologicamente inattiva a una forma biologicamente attiva sia di adrenalina che di dopamina nell'ospite.⁽⁵⁴⁾ Sia l'ospite che i batteri hanno la capacità di convertire l'amminoacido glutammato in GABA, il principale neurotrasmettitore inibitorio del sistema nervoso dell'ospite. *Escherichia* spp e *Lactobacillus* spp hanno dimostrato di sintetizzare GABA.⁽⁵⁵⁾ Sebbene la quantità della produzione batterica di GABA nel lume intestinale dell'ospite non sia chiara, i topi germ-free mostrano livelli luminali di GABA significativamente più bassi rispetto i topi che hanno un microbiota.⁽⁵⁶⁾ È interessante notare che il ceppo probiotico di *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) può produrre un lipopeptide analgesico associato a GABA: C12AsnGABA OH. L'aggiunta di questo lipopeptide al GABA ne ha facilitato la diffusione attraverso la barriera epiteliale, consentendo l'attivazione dei recettori GABA sui neuroni sensoriali.⁽⁵⁷⁾ In uno studio che ha esaminato *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp, isolati dal tratto gastroenterico umano, cinque ceppi sono stati trovati in grado di convertire in GABA il glutammato monosodico.⁽⁵⁸⁾ È stato dimostrato che la somministrazione orale di *Bifidobacterium dentium*, una specie batterica produttrice di GABA isolata da feci umane, inibisce l'ipersensibilità viscerale nei ratti, suggerendo un significato funzionale delle azioni in vivo dei batteri produttori di GABA.⁽⁵⁹⁾ Allo stesso modo i batteri esprimono recettori in

grado di percepire il GABA extracellulare, è quindi probabile che la produzione ospite di GABA possa influenzare il microbiota.⁽⁵⁶⁾ I batteri *Bacteroides* modulatori del GABA sono abbondanti nel microbioma intestinale dei cani non aggressivi, mentre prevalgono i batteri *Lactobacillus* nei cani aggressivi.⁽³⁶⁾ L'integrazione della dieta di cani ansiosi con *Bifidobacterium longum* BL999 ha portato a una riduzione dei comportamenti stress correlati come saltare, ruotare su se stessi, camminare avanti indietro, e abbaiare, viceversa ha aumentato il comportamento esploratorio.⁽⁶⁰⁾ Il cortisolo salivare è diminuito nei cani che hanno ricevuto BL999.⁽⁶⁰⁾

La serotonina è un neurotrasmettitore prodotto dal triptofano tramite l'enzima TPH. La capacità di sintetizzare la 5-HT dal triptofano è ampiamente manifesta nei mammiferi e in diverse specie batteriche. Nei mammiferi la 5-HT svolge diversi compiti che vanno dalla modulazione del comportamento dell'ospite all'impatto sulla motilità gastrointestinale, oltre a influenzare il rimodellamento osseo e la salute degli eritrociti. Le cellule cromaffine producono la maggior parte di serotonina del corpo dal triptofano alimentare. Sebbene le cellule EC del tratto gastrointestinale siano responsabili di oltre il 95% della produzione di 5-HT del corpo, si ritiene che il microbiota abbia un impatto sul sistema serotoninergico gastrointestinale dell'ospite.

La specie *Clostridium perfringens*, membro del microbiota umano e dei roditori, modula la produzione intestinale di 5-HT nel colon tramite il TPH1 dell'ospite.⁽⁶¹⁾ Le concentrazioni di 5-HT nel lume del cieco e del colon sono significativamente ridotte nei topi GF. La colonizzazione di questi topi con un microbiota ha comportato un aumento delle concentrazioni di 5-HT nel lume intestinale. La forma non coniugata, biologicamente attiva di 5-HT, è stata trovata in maggiore concentrazione nei topi GF colonizzati, rispetto i topi GF dove è maggiore la forma coniugata.⁽⁶²⁾ I meccanismi di trasporto extracellulare della 5-HT sono stati evidenziati in un ceppo probiotico di *Lactobacillus*.⁽⁶³⁾ Gli animali GF mostrano un aumento dei livelli di triptofano

circolante, che vengono corretti in seguito alla colonizzazione con un microbiota, associato ad un'elevata concentrazione di 5-HT nell'ippocampo, che non viene corretta con la colonizzazione.⁽⁶⁴⁾ I ratti GF hanno livelli ridotti di 5-HT circolante, come di quella nell'ippocampo. Poiché il sistema serotonergico è coinvolto in diverse malattie comportamentali e fisiche, è diventato sempre più importante capire come il microbiota influenza la 5-HT lungo l'asse microbiota-intestino-cervello.

È improbabile che le variazioni nella produzione intestinale di serotonina abbiano un effetto diretto sul cervello perché la serotonina non può attraversare la barriera ematoencefalica. La disponibilità di triptofano per il cervello, come fonte per la sintesi di serotonina nel SNC, è anche parzialmente determinata dal suo metabolismo lungo la via fisiologicamente dominante della chinurenina. Circa il 90% del triptofano disponibile viene incanalato verso la produzione di chinurenina. La chinurenina e i suoi metaboliti, incluso l'acido chinurenico e l'acido chinolinico, sono implicati nella salute mentale. Nei topi GF, vi è un ridotto metabolismo del triptofano lungo la via della chinurenina, il che è probabilmente in parte responsabile dell'aumentata disponibilità circolante di triptofano.⁽⁶⁵⁾ (Fig. 5)

Poiché il microbiota modula i glicocorticoidi circolanti nell'ospite e la loro produzione in risposta allo stress, oltre ad “educare” il sistema immunitario il microbiota può influenzare indirettamente la produzione di chinurenina per l'azione che i glicocorticoidi hanno sul TDO (ossidoreduttasi epatica del triptofano) e sull'IDO (ossidoreduttasi intestinale del triptofano).

I metaboliti di origine microbica intestinale più esaminati sono gli acidi grassi a corta catena, di cui oltre il 95% è costituito da acetato, proprionato e butirato. Gli SCFA sono stati implicati in una varietà di processi dell'ospite tra cui la funzione gastrointestinale, la regolazione della pressione sanguigna, il ritmo circadiano e la funzione neuro-immunitaria.⁽⁶⁶⁾ Nei modelli animali la diminuzione dei livelli di SCFA gastrointestinali è stata associata alla malattia

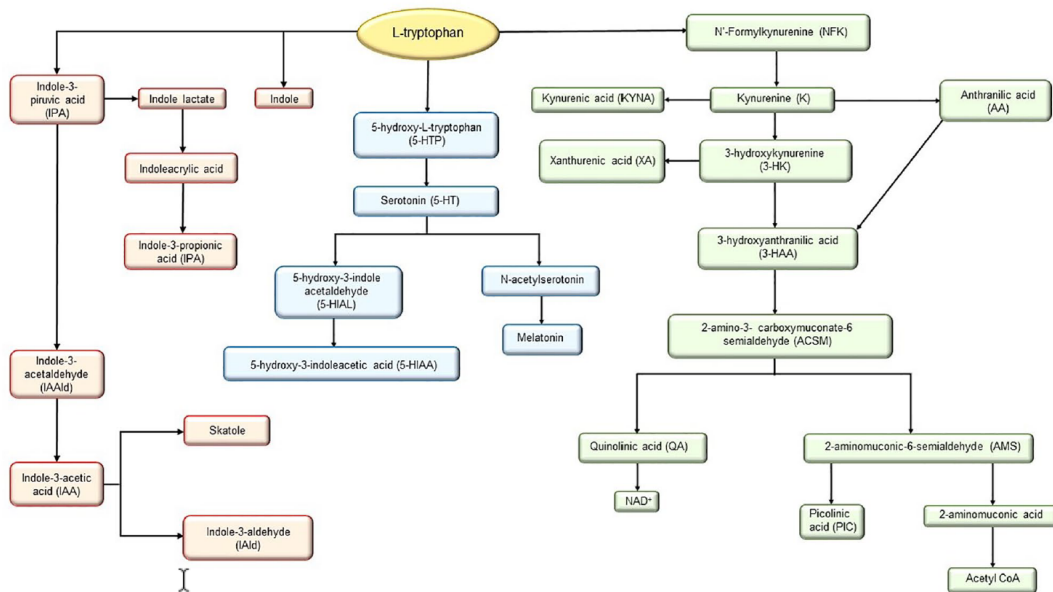


Fig. 5 Panoramica del metabolismo del triptofano. Rappresentazione schematica delle principali vie metaboliche di produzione di serotonina, chinurenina e idolo. (Bosi et al. 2020)⁽¹⁰¹⁾

di Alzheimer e in alcuni studi allo stress cronico.⁽⁶⁷⁾ La fonte primaria di SCFA è la fermentazione microbica di specifiche fibre alimentari indigeribili dall'ospite, altre fonti sono la scomposizione delle proteine da parte del microbiota, il metabolismo di acidi grassi a lunga catena e il consumo di alcol. L'asse microbiota-intestino-cervello è pronto ad influenzare ed essere influenzato da molti fattori, tra cui il comportamento sociale e cognitivo, la paura, lo stress e l'assunzione di cibo. La socialità può essere classificata come qualsiasi forma di interazione tra più di un animale. È un comportamento fondamentale per tutte le specie di mammiferi in quanto facilita molti risultati positivi come l'apprendimento, la cooperazione, la protezione e l'accoppiamento. È interessante notare che il comportamento sociale in tutto il regno animale sembra essere fortemente influenzato dal microbiota. I topi GF trascorrono meno tempo interagendo con un nuovo conspecifico rispetto ad un topo colonizzato. Mentre i topi colonizzati in modo convenzionale preferiscono trascorrere più tempo con un nuovo conspecifico rispetto ad un familiare, i topi GF non sono in grado di distinguere tra i due

animali, il che rappresenta un deficit cognitivo nell'identificazione della novità sociale.⁽⁶⁸⁾

L'amigdala sembra essere una regione del cervello centrale per l'influenza del microbiota sul comportamento sociale. L'analisi morfologica dell'amigdala murina GF rivela un'estesa ipertrofia neuronale e un'armonizzazione dendritica che porta ad un aumento complessivo del volume dei vari subnuclei. Questi cambiamenti genetici e funzionali dell'amigdala dei topi GF dimostrano che questa regione del cervello non è solo un nodo cruciale nei circuiti di neuroni alla base del comportamento sociale, ma è anche il punto focale attraverso il quale il microbiota modula questo comportamento.⁽⁶⁶⁾ La somministrazione di *L. Reuteri* ai topi ha determinato un aumento dell'espressione e dei livelli in circolo di ossitocina, ormone associato a un aumento dei comportamenti sociali.⁽⁶⁹⁾ Le alterazioni mediate dalla dieta nel microbioma possono avere anche un impatto importante su i neurocircuiti dei comportamenti sociali, specialmente durante lo sviluppo. La carenza dietetica sperimentale di acidi grassi polinsaturi omega-3 ha provocato compromissioni del comportamento sociale nei ratti adulti, ma non adolescenti.⁽⁶⁹⁾ Una dieta ricca di acidi grassi polinsaturi può esercitare i suoi effetti prosociali attraverso la modulazione dei livelli degli acidi grassi di membrana nel cervello, ed influisce positivamente sulla composizione del microbiota.⁽⁷⁰⁾

La somministrazione di antibiotici dall'età dello svezzamento in poi può indurre cambiamenti nel microbiota intestinale, insieme a successivi disturbi della memoria di riconoscimento degli oggetti e alterazioni dell'espressione del BDNF nell'ippocampo, nell'età adulta. Studi più recenti hanno trovato analoghe menomazioni nella memoria di riconoscimento degli oggetti dopo la somministrazione di antibiotici in età adulta. Un'esposizione di 11 giorni a un cocktail antibiotico ha infatti inficiato la memoria di riconoscimento degli oggetti nei topi maschi adulti.⁽⁷¹⁾ Il trattamento probiotico con ceppi selettivi di *Bifidobacterium* in topi sani può migliorare selettivamente la memoria di

riconoscimento degli oggetti, diminuire il numero di errori di un test di memoria spaziale e indurre un miglior apprendimento a lungo termine nel condizionamento alla paura.⁽⁷¹⁾ I ratti alimentati con probiotici hanno mostrato un miglioramento delle prestazioni nel test dell'attenzione, indicando così una maggiore flessibilità cognitiva, insieme ad un aumento della funzione dei recettori N-metil-D-aspartato all'interno della corteccia frontale.⁽⁷²⁾ VSL#3, una miscela probiotica disponibile in commercio costituita da ceppi *Streptococcus*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, ha risolto il deterioramento della memoria di riconoscimento degli oggetti indotto dal trattamento antibiotico cronico.⁽⁷³⁾

La paura esagerata è un sintomo fondamentale dell'ansia clinica e la risposta alla paura è strettamente legata allo stress, che a sua volta è strettamente intrecciato con le funzioni dell'asse intestino-cervello. L'espressione e l'inibizione della paura appresa è regolata dall'amigdala, dall'ippocampo e della corteccia prefrontale e queste regioni sono tutte modulate dai cambiamenti del microbiota. Utilizzando la scala per il test dello stress cronico da sconfitta sociale, topi con un punteggio più alto di evitamento sociale hanno una correlata maggior diversità dei taxa che compongono il microbiota cecale, rispetto al gruppo di controllo.⁽⁷⁴⁾ Analizzando il microbioma fecale di ratti più vulnerabili a ripetuti stress da sconfitta sociale, rispetto a quelli classificati come più resilienti, il sequenziamento del metagenoma ha identificato un aumento dell'espressione del microbiota immunomodulante, inclusi i clostridi. Il fenotipo comportamentale di tipo depressivo era trasferibile tramite FMT (trapianto fecale), da ratti vulnerabili allo stress a ratti naive. Ratti sconfitti hanno mostrato un aumento dei comportamenti depressivi correlati a una riduzione dell'abbondanza di specifici generi batterici.⁽⁷⁵⁾

In un modello murino di stress cronico, il trattamento con *Lactobacillus helveticus* NS8 ha migliorato il comportamento esplorativo in campo aperto,

migliorato i test in labirinto e ridotto i livelli di corticosteroidi e ormone adrenocorticotropo.⁽⁷⁶⁾ In uno studio del 2020 Kubinyi et al. hanno osservato che nei cani con età più elevata era associata una percentuale inferiore di *Fusobacteria*. Le prestazioni cognitive più basse (ovvero, più errori nel test della memoria a breve termine) erano collegate a una percentuale maggiore di *Actinobacteria*. Anche le capacità mnemoniche, dunque, sono associate alla composizione del microbiota intestinale: i cani con performance peggiori (per esempio più errori nei test di memoria) hanno relativamente più *Actinobacteria* nei loro campioni fecali.⁽³⁵⁾ A confermare la stretta relazione tra microbiota intestinale e ospite, i ricercatori hanno realizzato che la composizione del microbiota intestinale influenza anche sistemi organici al di fuori del tratto gastroenterico, essendo associato con cambiamenti di cognizione, comportamento, risposte allo stress, e altri disordini del sistema nervoso.⁽³³⁾

Una potenziale via di comunicazione è quella di stimolazione diretta immunologica attraverso il contatto cellula-cellula influenzando il sistema nervoso enterico o il sistema immunitario che trasporta i segnali al cervello. Un'altra via potenziale è la produzione di metaboliti endocrini da parte del microbiota intestinale. Sebbene questa stimolazione sia fisiologica e benefica, degli effetti negativi possono presentarsi quando ci sia uno sbilanciamento nel microbiota commensale a causa di eventi esterni (ad esempio uso di antibiotici), sbilanci nutrizionali, o anche infiammazione intestinale, che condiziona la composizione del microbiota. Specifici membri del microbiota hanno dimostrato di produrre direttamente neurotrasmettitori, come l'acido γ -amino-butirrico (GABA) o l'acetilcolina, in vitro.⁽⁵⁸⁾ Sostanze neuroendocrine (e.g. catecolamine, noradrenalina, e dopamina) sono state trovate in topi normali a una regolare concentrazione, invece a concentrazione molto inferiore nei topi germ-free, suggerendo che il microbiota intestinale produce significative quantità di queste sostanze neuroendocrine.⁽⁵⁴⁾ D'altra parte, le

sostanze neuroendocrine prodotte dall'ospite durante periodi di stress possono modulare la virulenza degli enteropatogeni in vivo, portando prove di come le sostanze neuroendocrine dell'ospite possono anche avere effetti sul microbiota intestinale. Topi sono stati inoculati con *Campylobacter jejuni*, provocando un'infezione subclinica che non produceva una misurabile attivazione del sistema immunitario. Ciò nonostante i topi infetti mostravano un aumento dell'ansia, che si manifestava come una diminuzione del comportamento esploratorio, suggerendo che il microbiota attiva direttamente la via neurale.⁽⁵³⁾ Nei successivi follow-up gli stessi ricercatori mostravano che la colonizzazione con *Campylobacter jejuni* portava l'attivazione del nucleo del tratto solitario e dei nuclei parabrachiali laterali del cervello, supportando la prova che l'intestino reagisce alle infezioni subcliniche inviando segnali al cervello.⁽³³⁾ I componenti batterici hanno anche dimostrato di modulare direttamente lo sviluppo cerebrale di conseguenza il comportamento. Dopo aver ricevuto un'alimentazione con amidi resistenti, i topi hanno manifestato comportamenti simili all'ansia più pronunciati.⁽⁷⁷⁾ Disordini dell'umore sono stati associati a un'ipersensibilità alla dieta che si è ipotizzato essere dovuto all'aumento della permeabilità della barriera intestinale a causa di infezione da agenti come l'influenzavirus, il coronavirus o infestazioni da *Toxoplasma Gondii*.⁽⁷⁸⁾ EcNL-DOPA è un *E. Coli* modificato con ingegneria genetica per produrre L-DOPA. Per massimizzare la diffusione al cervello di L-DOPA, è stato somministrato, in combinazione con EcNL-DOPA, Benserazide: un inibitore della DOPA decarbossilasi.⁽⁷⁹⁾

Nelle patologie neurodegenerative, i cani sono modelli importanti perché spontaneamente manifestano sintomi simili a quelli del Parkinson, come depressione, ansia e disfunzioni cognitive. Ai cani è stato somministrato EcNL-DOPA oralmente per 21 giorni, due volte al giorno. Prima di cominciare la somministrazione sono stati presi campioni di sangue, di feci e di liquido cerebrospinale. Durante il periodo di trattamento sono stati presi

quotidianamente i campioni di sangue e feci, e ai giorni 18-21 il liquido cerebrospinale. Alla sospensione del EcNL-DOPA il Benserazide è stato continuato fino al giorno 25. Durante il trattamento le CFU/g sono aumentate, e sono rimaste alte nel washout, il che significa che il trattamento è stato benefico.⁽⁷⁹⁾

L'attivazione delle citochine proinfiammatorie induce uno stato depressivo, che aiuta l'individuo a combattere la malattia che ha innescato la risposta infiammatoria. Le citochine proinfiammatorie circolanti possono raggiungere il cervello, dove hanno un'azione infiammatoria diretta e stimolano la produzione di altre citochine proinfiammatorie e di prostaglandine. Questa risposta infiammatoria non produce danni tissutali, induce un cambio negativo nel comportamento. Le cellule proinfiammatorie circolanti esercitano le loro azione sul cervello anche indirettamente attraverso vie neuronali, per esempio, attivando una risposta vagale. I microrganismi endogeni che costituiscono il microbioma intestinale possono influenzare il comportamento dell'animale ospite attraverso un'azione simile.

8. ATTIVITA' PSICBIOTICA DEGLI INTEGRATORI ALIMENTARI

L'asse intestino-cervello descrive un'interazione bidirezionale all'interno dell'ambiente enterico tra l'epitelio intestinale, il sistema immunitario della mucosa e il microbiota, con il sistema nervoso enterico. L'epitelio intestinale è una delle maggiori fonti di ormoni e neurotrasmettitori del corpo, che hanno effetti critici sulla funzione neuronale. L'influenza del microbiota intestinale su questi processi sembra essere profonda. La disbiosi intestinale è legata non solo alle malattie dell'intestino ma anche alla sintomatologia cerebrale, compresi disturbi neurodegenerativi e comportamentali. I cambiamenti del microambiente dell'intestino vengono indirettamente trasmessi dalle cellule epiteliali e immunitarie dell'intestino (tramite ormoni e molecole neuroattive) alle cellule del sistema nervoso enterico, dove vengono tradotte in impulsi neurali che portano il segnale in tutto il tessuto locale e sistematicamente

attraverso il sistema nervoso centrale. La via principale attraverso la quale si ritiene che il microbiota intestinale influenzi il comportamento sono i metaboliti prodotti dai batteri che abitano l'intestino. Alcuni di essi (come il *Lactobacillus* e il *Bifidobacterium*) possono produrre neurotrasmettitori o altre molecole, tra cui l'acido γ -aminobutirrico (GABA), i derivati degli aminoacidi (e.g. serotonina, melatonina e istamina), i derivati degli acidi grassi (e.g. acetilcolina), o cateclamine (e.g. dopamina e noradrenalina). L'importanza dell'interazione intestino cervello nella salute umana sta diventando sempre più chiara nello studio dei disturbi gastrointestinali e neurologici, esistono molte correlazioni cliniche che suggeriscono un ruolo chiave dell'asse intestino-cervello nelle malattie, tra cui ansia e depressione come principali comorbilità per i disturbi gastrointestinali cronici come la IBS e la malattia infiammatoria intestinale. Mancando l'esposizione ai microrganismi fin dalla nascita, gli animali GF forniscono informazioni su come il microbiota è parte integrante nel plasmare il comportamento, la fisiologia e la neurobiologia del suo ospite. Gli animali privi di microbiota hanno uno sviluppo e una fisiologia straordinariamente diversi rispetto agli animali che ospitano batteri commensali. I topi GF hanno peso corporeo inferiore, una funzione intestinale compromessa, concentrazioni inferiori dei principali aminoacidi gastrointestinali luminali rispetto ai topi gnotobiotici. A causa della mancanza di microbi commensali gli animali GF hanno un sistema immunitario compromesso, segnali ormonali disregolati, metabolismo alterato e differenze nella neurotrasmissione.⁽⁶⁾

I topi ASF sono colonizzati con solo otto specie batteriche consentendo uno studio più semplificato del coinvolgimento del microbiota nella relativa funzione cerebrale. È stato dimostrato che la somministrazione di antibiotici agli animali da laboratorio influenza comportamenti come la socialità e l'ansia; tali studi hanno scoperto che vari tipi di fenotipi comportamentali possono essere trasferiti dal trapianto fecale, inclusi i comportamenti simili

all'ansia e aspetti della sintomatologia depressiva, suggerendo che il microbiota intestinale è un componente chiave nella regolazione dell'ansia e della depressione.⁽⁶⁾

È ormai acclarato il beneficio dell'alimentazione con carboidrati non digeribili, pre e/o probiotici sia nel cane che nel gatto. Secondo l'International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, i prebiotici sono un substrato che viene utilizzato selettivamente dal microrganismo ospite producendo un beneficio nella salute, i probiotici sono specie di batteri vivi che, se ingeriti in quantità adeguate, conferiscono effetti benefici alla salute dell'ospite e le simbiotiche sono quelle preparazioni che contengono una combinazione di prebiotici e di probiotici. L'assunzione di prebiotici spesso porta a un miglioramento delle produzioni delle fermentazioni e alla produzione di SCFA nel colon, conferendo numerosi benefici all'ospite. I probiotici possono aumentare la salute dell'intestino sostituendosi ai patogeni intestinali, producendo sostanze antimicrobiche o aumentando la risposta immunitaria dell'ospite. Nel cane una dieta con un alto contenuto di proteine (61%) favorisce la crescita di *Fusobacteriales*, mentre una dieta con un alto contenuto di carboidrati (19% di proteine) favorisce la crescita di *Erysepeletrichales*.⁽⁸⁰⁾

L'integrazione di cibo per cani con il 7,5% di polpa di barbabietola, diminuisce l'abbondanza di *Fusobacteria*, ma aumenta quella di *Firmicutes*, rispetto a una dieta senza supplementazione di fibre.⁽⁸¹⁾ L'integrazione con prebiotici riduce la reattività allo stress, l'ansia e il comportamento di tipo depressivo, oltre a facilitare i cambiamenti nell'efficacia di sintesi dell'ippocampo, tra cui aumento dell'espressione del BDNF, aumento generale dell'attività neuronale ipotalamica e potenziamento della cognizione e dell'apprendimento.⁽⁶⁾ Secondo uno studio del 2015, la somministrazione di GOS nei ratti ha indotto una diminuzione della risposta neuroendocrina allo stress e un aumento dell'attenzione positiva rispetto alla vigilanza negativa,

portando quindi a risultati simili ad un ansiolitico.⁽⁸²⁾ La somministrazione di FOS + GOS e di GOS riduce il rilascio di corticosterone indotto dallo stress, combinato ad un aumento significativo delle concentrazioni cecali di acetato e proprionato e ad una riduzione di livelli di isobutirrato.⁽⁸³⁾ I topi alimentati con FOS+GOS hanno trascorso più tempo al centro di un test in campo aperto, con un aumento della percentuale di ingressi nell'area aperta, che indica ansia ridotta.⁽⁸²⁾ Studi preclinici hanno dimostrato che i probiotici esercitano un'ampia gamma di effetti sulla salute dell'ospite con vari ceppi che migliorano il metabolismo, l'immunità, la funzione endocrina e rallentano l'invecchiamento. ⁽⁸⁴⁾ *Faecalibacterium prausnitzii* (ATCC 27766) ha recentemente dimostrato di avere un effetto ansiolitico e antidepressivo nei ratti, probabilmente attraverso l'aumento cecale di SCFA e di IL-10 nel plasma riducendo i livelli di corticosterone e di IL-6.⁽⁸⁵⁾

I livelli di tirosina nel sistema nervoso centrale sono normalmente abbastanza elevati in confronto alla presenza dell'enzima tirosina idrossilasi, quindi non ci si deve aspettare un aumento della sintesi di dopamina in seguito all'assunzione di tirosina con la dieta.⁽²³⁾

Le nuove tecniche di neuroimaging come la risonanza magnetica, offrono ora un metodo ideale per studiare l'interazione intestino cervello in vivo. Con l'uso della Spettroscopia di Risonanza Magnetica (MRS), si è dimostrato che il ceppo batterico *L rhamnosus* JB-1 è in grado di aumentare il glutammato e il suo precursore glutammina, oltre ad aumentare l'N-acetil aspartato e l'acido γ -aminobutirrico (GABA).⁽⁸⁶⁾ Il Tensore di Diffusione (DTI) ha identificato i cambiamenti della sostanza bianca dipendenti dalla dieta, nei ratti. Utilizzando un classificatore di apprendimento automatico per la valutazione quantitativa della forza delle associazioni microbiota-cervello, si è scoperto che i cambiamenti nella struttura del cervello erano associati a cambiamenti nel microbioma intestinale dipendenti dalla dieta.⁽⁸⁷⁾

Durante l'invecchiamento la microglia evolve in uno stato altamente reattivo e squilibrato che promuove la disfunzione cognitiva, inclusa l'alterazione della plasticità cerebrale e la neuro degenerazione. I topi GF mostrano deficit nella maturazione e nella funzione della microglia, mentre la colonizzazione batterica o la somministrazione di metaboliti chiave del microbiota intestinale come gli SCFA, ripristinano la funzione della microglia.⁽⁸⁸⁾ La somministrazione di diete mirate al microbiota con bifidobatterio per prevenire il declino associato all'età, ha effetti positivi sulla composizione del microbiota intestinale e sulla salute associata dell'ospite. Un intervento dietetico di 14 settimane con prebiotici ha aumentato sia il *Bifidobacterium* che l'*Akkermansia* nei topi di mezza età.⁽⁸⁹⁾ La prova che i batteri intestinali utilizzano il nervo vago per alterare le risposte emotive e comportamentali dei loro ospiti proviene da studi che osservano i cambiamenti nell'espressione di c-Fos nei corpi cellulari delle afferenze vagali dopo somministrazione orale di *Campylobacter jejuni*.⁽⁴²⁾ Inoltre, un aumento della concentrazione di indolo nell'intestino, un metabolita microbico, è collegato all'attivazione del nervo vago, analogamente ai risultati che mostrano che la somministrazione di *Lactobacillus rhamnosus* aumenta la velocità di attivazione del fascio nervoso mesenterico, che contiene afferenze vagali e spinali.⁽⁹⁰⁾ Infine, studi del 2019 in un modello murino genetico di autismo (Shank3B/topo) mostrano che gli effetti di *Lactobacillus reuteri* sul comportamento sociale non sono presenti negli animali vagotomizzati.⁽⁹¹⁾

Poiché i prodotti microbici come gli SCFA modulano il TPH1 dell'ospite, potrebbe esserci una regolazione microbica della motilità gastrointestinale dell'ospite attraverso il sistema serotoninergico e intestinale.

Suñol A. et al.(2020) riportano che un cane maschio di sette anni presentava eccessi di comportamenti aggressivi da due anni, in continuo peggioramento. È stata somministrata una dieta proteica idrolizzata senza glutine con Purina Pro Plan HA Hypoallergenic. Una settimana dopo il periodo di transizione

alimentare, il proprietario ha riportato un miglioramento significativo del comportamento del cane. Dopo altre due settimane il cane era tornato alla normalità senza segno di aggressività. Il cane ha avuto due ricadute sempre associate al cambio di dieta, tornando poi alla normalità in quattro giorni dalla ripresa della dieta proteica idrolizzata Grain free.⁽⁹²⁾

In uno studio sono stati arruolati 45 cani, di cui 19 maschi e 26 femmine con un range di età dagli otto mesi ai 14 anni e un'età media di 4,75 anni, con problemi comportamentali tra cui 22 cani con aggressività, 15 cani con ansia da separazione, 7 con disturbo compulsivo e 1 con un comportamento inappropriato non classificabile (abbaiare eccessivo). Il probiotico *Lactobacillus plantarum* PS128 è stato somministrato a questi cani fisicamente sani con problemi comportamentali per un periodo di due settimane. I cani sono stati valutati utilizzando la scala di valutazione dei disturbi emotivi e cognitivi del cane (EDED) e il questionario Canine Behavioral Checklist (CBC). I livelli plasmatici di serotonina sono stati misurati mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni - rilevamento elettrochimico (HPLC-ECD) e i rapporti di turn-over della serotonina sono stati confrontati prima e dopo il trattamento. I risultati hanno mostrato che la stabilità comportamentale generale era migliorata per i problemi di aggressività e ansia da separazione, suggerendo un meccanismo correlato alla serotonina. Questi risultati hanno dimostrato che il PS128 era benefico per la stabilizzazione emotiva, e che potrebbe essere utile come supplemento terapeutico per l'aggressività canina e l'ansia da separazione. La 5-idrossitriptamina nota anche come serotonina è uno dei neurotrasmettitori che svolge un ruolo cruciale nella regolazione dell'umore e delle emozioni. L'attività del trasportatore della serotonina è più elevata nei cani aggressivi, il che può portare a una minore concentrazione sierica di serotonina.⁽⁹³⁾ Il tasso di turn-over della serotonina è determinato dividendo la concentrazione di 5-HIAA per la concentrazione di 5-HT. Un rapporto di turn-over più elevato è

fortemente correlato al rapido metabolismo della serotonina nei suoi metaboliti. La componente proteica della dieta e l'integrazione di triptofano riducono l'aggressività nel cane.⁽⁹³⁾ dopo il trattamento è stata osservata una significativa riduzione del rapporto di turn-over plasmatico dei cani affetti da ansia da separazione, cosa che non è stata trovata nei cani con aggressività. Il probiotico PS128 può migliorare lo stato emotivo canino per mezzo dell'asse intestino-cervello.⁽⁹³⁾

Relaxigen Pet dog è un integratore nutraceutico contenente composti antinfiammatori naturali (CLA, Krill), pre e probiotici, 5-HTP e L-teanina. L'EPA e il DHA svolgono diverse azioni neuroprotettive, in quanto precursori di molecole in grado di favorire il ripristino funzionale dei neuroni danneggiati dallo stress cronico, e di svolgere attività antidepressiva. L'acido linoleico coniugato (CLA) oltrepassa la barriera ematoencefalica e agisce attraverso i recettori nucleari, innescando la produzione di molecole con attività antinfiammatoria, proteggendo le cellule nervose dai danni cronici da stress con stabilizzazione dell'umore, ripristinando il sistema dopaminergico e consentendo una risposta fisiologica adeguata ai diversi insulti stressanti. La presenza simultanea di probiotici tinalizzati, prebiotici e postbiotici dovrebbe fornire un controllo efficace contro le condizioni di disbiosi intestinale in modo da consentire una normale risposta dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene allo stress. Il 5-HTP è un precursore specifico della serotonina e attraversa la barriera ematoencefalica, venendo convertito in serotonina nel sistema nervoso centrale. La L-teanina implementa i livelli di alcuni mediatori chimici, come la dopamina e la serotonina, che possono essere coinvolti nel controllo e nella regolazione del comportamento, dei processi cognitivi e soprattutto delle emozioni, consentendo di avere rilassamento senza sedazione. L'integrazione con Relaxigen Pet dog in cani ansiosi, ha modificato alcuni gruppi batterici, in particolare ha portato a diminuzione di

Bifidobatteri e *Enterobacteriaceae*, che aumentano in caso di malattie gastrointestinali e stress.⁽⁴¹⁾

Il microbiota è capace di modulare la risposta allo stress attraverso l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, o direttamente attraverso la stimolazione neuronale vagale, l'azione delle citochine, o la modulazione di metaboliti con azione inibitoria o eccitatoria sul cervello. Le aggressioni di cani a persone, ad altri cani o ad altri animali, sono un problema comportamentale comune, che può provocare danni seri ad animali, proprietari, vicini o amici. I comportamenti aggressivi, specialmente quelli che implicano morsi, possono lasciare danni fisici, traumi psicologici, trasmissione di malattie, o anche fatalità in caso di morsi a essere umani fragili o altri cani. Le diverse aggressioni dei cani sono spesso divise in categorie basate sul tipo di comportamento e sull'identificazione del contesto e delle motivazioni presunte o delle conseguenze associate allo specifico atto aggressivo. Il microbioma intestinale può interagire con la fisiologia dei mammiferi e influenzare il comportamento. Questo legame include aspetti che sono rilevanti nelle aggressioni dei mammiferi. Ad esempio, il trattamento con un antibiotico ad ampio spettro che distrugge il microbioma intestinale, diminuisce il comportamento aggressivo nel criceto siberiano.⁽⁹⁵⁾ La somministrazione di *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) riduce l'ansia e i comportamenti ad essa associati nel topo, mentre *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 aumenta i comportamenti simili ansiosi in un modello murino.⁽⁴⁷⁾ Numerosi studi dimostrano una relazione inversa tra il metabolita della serotonina, l'acido 5-idrossindoloacetico, e comportamenti aggressivi.⁽⁹⁶⁾

La sindrome da disfunzione cognitiva è una delle più frequenti condizioni patologiche in cui si trovano i cani anziani. Questa sindrome condivide con la malattia dell'Alzheimer negli essere umani delle alterazioni neuropatologiche come l'atrofia severa della corticale, un'angiopatia amiloide cerebrale e un allargamento dei ventricoli. Sempre negli essere umani sono stati individuati

diversi fattori di rischio. Già uno studio del 2007 dimostrava che gli integratori alimentari potevano migliorare alcuni dei sintomi del declino cognitivo patologico correlato all'età dei cani.⁽⁹⁴⁾ Non potendo dare un nutriente per ogni fattore di rischio è stata creata una miscela di nutrienti, chiamata BPB (Brain Protection Blend), con livelli migliorati di vitamina B, antiossidanti, acidi grassi omega-3 e arginina, dato che sono in grado di prevenire o ridurre i suddetti fattori di rischio. Nei cani anziani ma sani, l'assunzione di BPB è stata capace di aumentare le funzioni cognitive e ritardare l'invecchiamento che induce il declino dell'apprendimento, della memoria e dell'esecuzione di funzioni. Altra cosa che accomuna l'invecchiamento del cane e dell'uomo è la perdita dell'abilità di metabolizzare il glucosio. L'integrazione alla dieta con trigliceridi a media catena è capace di migliorare l'apprendimento, la memoria e l'esecuzione di funzioni in cani anziani. Questo indica che i corpi chetonici possono avere un ruolo importante nel supportare le funzioni cerebrali fungendo da risorsa energetica sia degli essere umani che nei cani. L'insieme delle diverse manifestazioni cliniche della sindrome da disfunzione cognitiva nel cane viene indicata con l'acronimo DISHAA, che indica i vari comportamenti alterati che possono manifestarsi: disorientamento, interazioni sociali alterate, disturbo del sonno-veglia, ansia, eliminazione inappropriate e attività notturna. Lo studio ha riguardato cani con livelli da medio a severo di CDS. Il campione di cani alimentati con la dieta con l'aggiunta di 6,5% di MCD e BPB ha avuto un miglioramento per 5 dei 6 segni clinici di CDS al giorno 30 e il miglioramento in tutti e sei i segni clinici al giorno 90 (Fig. 6 e 7).⁽⁹⁷⁾

Il microbiota non è un ecosistema statico, ma in costante cambiamento, piccole variazioni si osservano nell'arco della giornata ma queste fluttuazioni diventano più evidenti nell'arco della vita. Sia nelle prime fasi della vita che nella senescenza il microbiota è caratteristicamente diverso dall'età adulta. Si è ipotizzato che questi periodi di trasformazione del microbiota possono

essere considerati periodi sensibili, durante i quali il microbiota non è solo reattivo alle influenze esterne, e quindi suscettibile al trattamento, ma anche

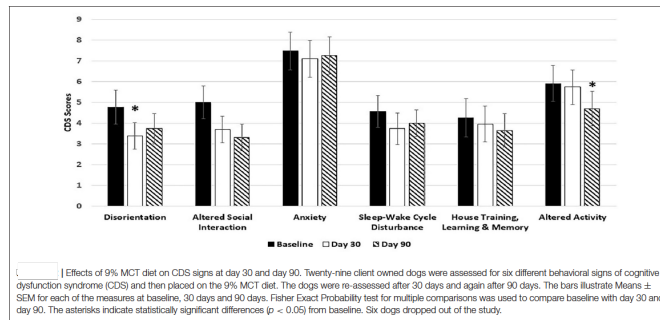
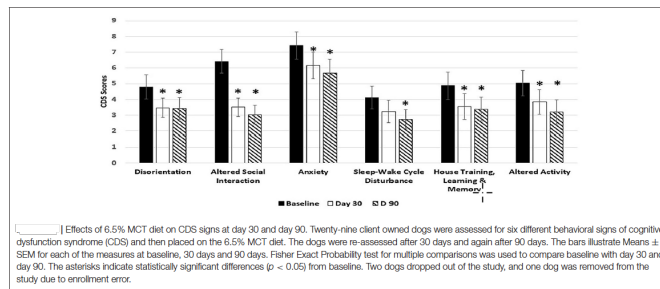


Fig. 6

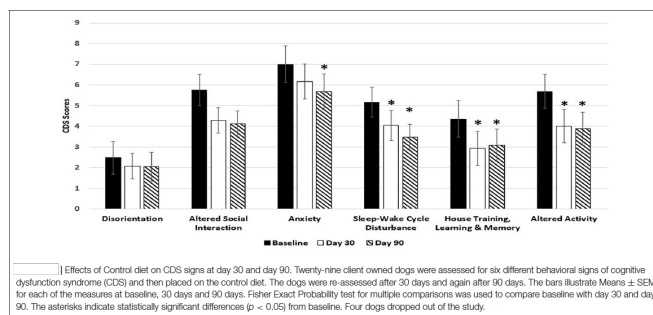
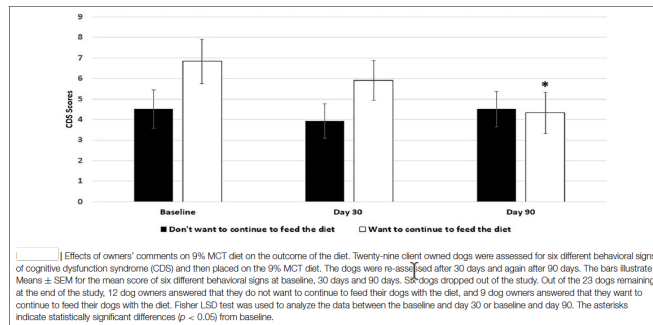


Fig. 7

altamente influente per quanto riguarda la salute generale dell'ospite. È probabile che i periodi sensibili del microbiota si allineino con i periodi sensibili dello sviluppo o del declino di altri sistemi corporei, compresi il

sistema immunitario innato, l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e lo sviluppo cerebrale in generale.⁽⁶⁾

I topi GF, che non hanno mai avuto una colonizzazione microbica, hanno permesso l'analisi del ruolo del microbiota nei segnali intestino-cervello lungo tutta la durata della vita.

Nel bambino subito dopo la nascita, il microbiota è tipicamente caratterizzato da abbondanza di *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacteriaceae* e *Clostridiaceae*, e bassi livelli di *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*.⁽⁹⁸⁾ Man mano che il bambino cresce, gli anaerobi stretti prendono gradualmente il sopravvento come taxa dominanti, raggiungendo un aumento della diversità complessiva a livelli simili all'adulto intorno a 1-3 anni di età, in coincidenza con il completo svezzamento e il passaggio all'assunzione del cibo solido (Fig 7). Questo rapido sviluppo dal momento dello svezzamento è osservato in tutte le

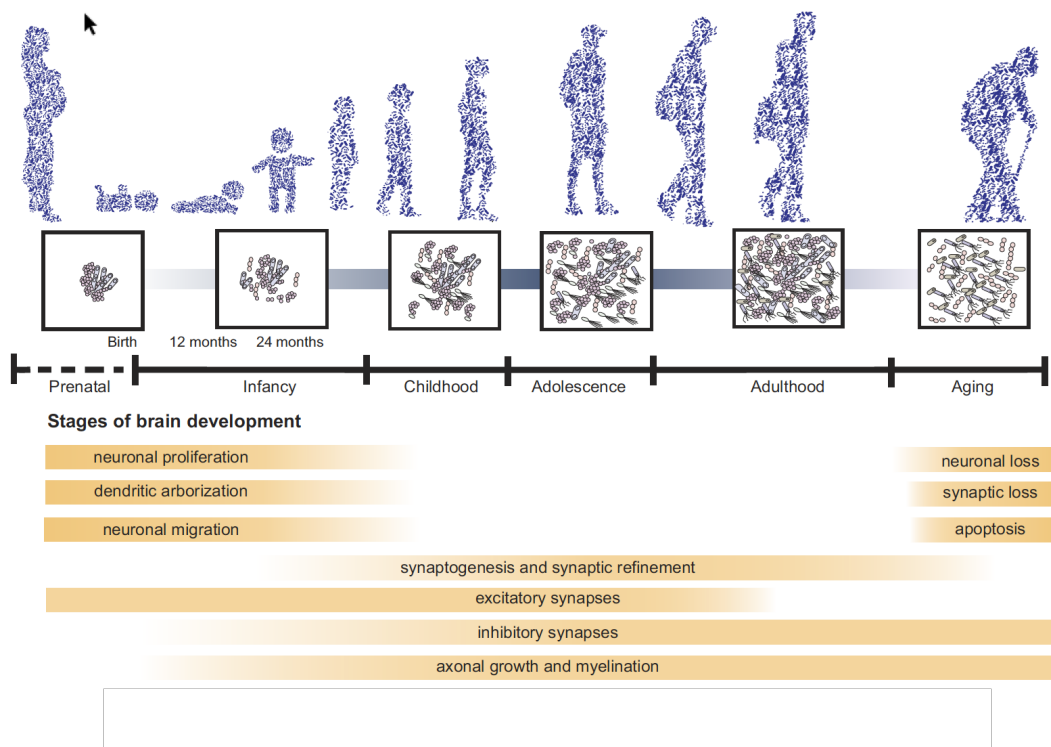


Fig. 8 Grafico cronologico che indica i cambiamenti nella diversità microbica nel corso della vita umana, accompagnata da tipici cambiamenti nello sviluppo neurale. (Cryan et al., 2019)⁽⁶⁾

specie ed è fondamentale per la protezione dall'eventuale sviluppo di immunopatologie in età adulta nei topi.⁽⁹⁹⁾

Nell'adolescenza il cervello subisce un vasto rimodellamento, tra cui potatura, mielinizzazione, cambiamenti volumetrici in varie regioni e cambiamenti nelle connettività funzionali.

L'invecchiamento è anche associato a cambiamenti nella fisiologia intestinale, tra cui ipocloridria, disturbi della motilità gastrica e cambiamenti degenerativi del SNE, con effetti drammatici sulla composizione e sulla funzione del microbiota intestinale. Topi con maggiore abbondanza relativa di *Porphyromonadaceae* sono correlati a un aumento del comportamento simile all'ansia.⁽¹⁰⁰⁾

CONCLUSIONI

I campi della microbiologia e delle neuroscienze stanno diventando sempre più intrecciati. Negli ultimi anni sono stati fatti progressi considerevoli sulla definizione e comprensione della popolazione microbica nei piccoli animali, in particolare grazie alla disponibilità delle tecniche di sequenziamento genomico a lunga catena. Più che di un asse intestino cervello bisognerebbe parlare di un asse microbiota-intestino-cervello, in cui il microbiota può esercitare una notevole influenza sul comportamento dell'ospite. Il miglioramento del targeting dell'asse-intestino cervello, ad esempio attraverso l'applicazione di psicobiotici, potrebbe aprire la strada allo sviluppo di nuove terapie per le malattie comportamentali. La sintomatologia comportamentale è di difficile gestione per i proprietari, incide profondamente sullo loro stile di vita. Un cane con disturbo dell'attaccamento e ansia intermittente o permanente ha vocalizzazioni, distrugge oggetti e abiti, porte, mobili di casa, ha disturbi gastroenterici, può arrivare a procurarsi lesioni da leccamento anche molto gravi. Un cane anziano con alterazioni cognitive dorme di giorno ed è in piena attività tutta notte, vocalizza, si blocca negli angoli delle stanze e non riesce a spostarsi da solo, ha eliminazioni

inappropriate, non riconosce i proprietari, perde gli apprendimenti anche più semplici. Tutto questo rende difficile la convivenza e incide profondamente anche sullo stato emotivo del proprietario. Si possono cambiare le disponibilità di molecole neuroattive in circolo agendo sul microbiota intestinale, e anche se questo non risolve lo stato patologico, attenua la sintomatologia modulando gli stati emotivi del cane. I metaboliti microbici possono essere un supporto nei trattamenti degli stati patologici, in particolare l'ansia, permettendo una modulazione dei comportamenti ad essa correlati. Particolarmente incisiva può essere l'integrazione con pro e prebiotici nelle prime fasi del disagio, prima che le alterazioni si cristallizzino strutturando una malattia vera e propria.. Anche nei disturbi cognitivi del cane anziano, l'integrazione probiotica può attenuare o risolvere la disbiosi da senescenza e di conseguenza ripristinare tutta la produzione microbica che sostiene l'attività neuronale e rallentare la degenerazione neurologica indirizzando un soggetto verso un invecchiamento "di successo". Inoltre soprattutto nel cane anziano occorre fare attenzione nella somministrazione di psicofarmaci perché sono presenti con molta probabilità disfunzioni organiche o patologie cliniche che possono essere aggravate dagli effetti collaterali di questi farmaci.

BIBLIOGRAFIA

1. Siegel DJ. La mente relazionale - Neurobiologia dell'esperienza interpersonale. Raffaello Cortina Editore. 2013; 1: 1-43.
2. Colangeli R, Fassola F, Giussani S, Merola I, Possenti M. Medicina comportamentale del cane, del gatto e di nuovi animali da compagnia. Poletto Editore. 2016; 3-10: 38-275.
3. Roman CW, Derkach VA, Palmiter RD. Genetically and functionally defined NTS to PBN brain circuits mediating anorexia. *Nat Commun*, 2016; 7: 11905.
4. Bienkowski MS, Rinaman L. Common and distinct neural inputs to the medial central nucleus of the amygdala and anterior ventrolateral bed nucleus of stria terminalis in rats. *Brain Struct Funct*, 2013; 218: 187-208.
5. Kerfoot EC, Chattillion EA, Williams CL. Functional interactions between the nucleus tractus solitaires (NTS) and nucleus accumbent shell in modulating memory for arousing experiences. *Neurobiol Learn Mem*, 2008; 89: 47-60.
6. Cryan LF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaanssen TSF, Boehme M, Codagnone MG, Cussotto S, Fulling C, Golubeva AV, Guzzetta KE, Jaggar M, Long-Smith CM, Lyte JM, Martin JA, Molinero-Perez A, Moloney G, Morelli E, Mobilas E, O'Connor R, Cruz-Pereira JS, Peterson VL, Rea K, Ritz NL, Sherwin E, Spichak S, Teichman EM, van de Wouw M, Ventura-Silva AP, Wallace-Fitzsimons SE, Hyland N, Clarke G, Dinan TG. The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev*, 2019; 99: 1877-2013.
7. Whitlock FA. Some psychiatric consequences of gastrectomy. *BMJ*, 1961; 1: 1560-1564.
8. Mravec B, Ondicova K, Tillinger A, Pecenak J. Subdiaphragmatic vagotomy enhances stress-induced epinephrine release in rats. *Auton Neurosci*, 2015; 190: 20-25.
9. O'Leary OF, O'Gonnays ES, Felice D, Levone BR, Conroy LC, Fitzgerald P, Bravo JA, Forsythe P, Bienstock J, Dinan TG, Cryan JF. The vagus nerve modulates BDNF expression and neurogenesis in the hippocampus. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2018; 28: 307-316.

10. Klarer M, Arnold M, Günther L, Winter C, Langhans W, Meyer U. Gut vagal afferents differentially modulate innate anxiety and learned fear. *J Neurosci*, 2014; 34: 7067-7076.
11. Shin HC, Jo BG, Lee CY, Lee KW, Naming U. Hippocampal activate of 5-HT_{1B} receptors and BDNF production by vagus nerve stimulation in rats under chronic restraint stress. *Eur J Neurosci* , 2019; 50: 1820-1830.
12. Han W, Tellez LA, Perkins MH, Perez IO, Qu T, Ferreira J, Ferreira TL, Quinn D, Liu ZW, Gao XB, Kaelberer MM, Bohórquez DV, Shammah-Lagnado SJ, de Lartigue G, de Araujo IE. A neural circuit for gut-induced reward. *Cell*, 2018; 175: 887-888.
13. Klarer M Krieger JP, Richtet J, Weber-Stadlbauer U, Günther L, Winter C, Arnold M, Langhans W, Meyer U. Abdominal vagal afferents modulate the brain transcriptome and behaviors relevant to schizophrenia. *J Neurosci*, 2018; 38: 1634-1647.
14. Dowling LR, Strazzari MR, Keeply S, Kaiko GE. Enteric nervous system and intestinal epithelial regulation of the gut-brain axis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* Vol 150, Issue, 2022; 3: 513-522.
15. Jaglin M, Rhimi M, Philippe C, Pis N, Bruneau A, Goustard B, Daugé V, Maguin E, Naudon L, Rabot S. Indole, a signaling molecule produced by the gut microbiota, negatively impacts emotional behaviors in rats. *Front Neurosci*, 2018; 12: 216.
16. Ogyu K, Kubo K, Noda Y, Iwata Y, Tsugawa S, Omura Y, et al. Kynurenine pathway in depression: a systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*, 2018; 90: 16-25.
17. Bohorquez DV, Samsa LA, Roholt A, Medicetty S, Chandra R, Liddle RA. An enteroendocrine cell - enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy. *PLoS One*, 2014; 9: e89881.
18. Kaelberer MM, Rupprecht LE, Liu WW, Eeng P, Bohórquez BV. Neuropod cells: the emerging biology of gut-brain sensory transduction. *Annul Rev Neurosci*, 2020; 43: 337-53.
19. De Vadder F, Grasset E, Mannerås Holm L, Karsenty G, Macpherson AJ, Olofsson LE, Bäckhed F. Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2018; 115: 6458-6463.

20. Kabouridis PS, Lasrado R, McCallum S, Chng SH, Snippert Sto arrivando!, Clevers H, Pettersson S, Pachnis V. Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria. *Neuron*, 2015; 85: 289-295.
21. Colangeli R, Fassola F, Giussani S, Merola I, Possenti M. *Medicina comportamentale del cane, del gatto e di nuovi animali da compagnia*. Poletto E
22. Colangeli R, Fassola F, Giussani S, Merola I, Possenti M. *Medicina comportamentale del cane, del gatto e di nuovi animali da compagnia*. Poletto Editore, 2016; 38-47.
23. Patterson PH, Ryan PM, Cryan JF, Dinan TG, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Gut microbioma, obesity and diabetes. *Postgrad Med J*, 2016; 92: 286 - 300.
24. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition: DSM-5*, American Psychiatric Publishing, Washington 2013, p. 20
25. Pageat P. La patologia comportamentale del cane. *Le point vétérinaire*, 1999. 2 : 39-102
26. Capurso L. Il microbiota intestinale. *Recenti Prog Med* 107(6): 257-266, 2016.
27. Schmitz S, Suchodolski J. Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics - what is the evidence? *Vet Med Sci*. 2016 Jan 11;2(2):71-94. doi: 10.1002/vms3.17. PMID: 29067182; PMCID: PMC5645859.
28. Suchodolski JS. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. *Vet Clin Small Anim*, 2011; 41: 261-272.
29. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 2005; 307: 1915-1920.
30. Swanson KS, Dowd SE, Suchodolski JS, et al. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME J*, 2011; 5: 639-649.
31. Song SJ, Lauber C, Costello EK, et al. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dog. *Life*, 2013; 2: e00458.
32. Mondo E, Barone M, Poverini M, D'Amico F, Cocchi M, Petrulli C, Mattioli M, Marliani G, Canal M, Accorsi PA. Gut microbiome structure and adrenocortical activity in dogs with aggressive and phobic behavioral disorders. *Heliyon*, 2020; 6: e03311.

33. Suchodolski JS. Gut brain axis and its microbiota regulation in mammals and birds. *Vet Clin Exit Anim*, 2018; 21: 159-167.
34. Suchodolski JS, Camacho J, Steiner JM. Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008; 66: 567-578.
35. Kubinyi E, Rhali SB, Sándor S, Szabó A, Felföldi T. Gut microbiome composition is associated with age and memory performance in pet dogs. *Animals*, 2020; 10: 1488.
36. Kirchoff NS, Udell MA, Sharpton TJ, The gut microbiome correlates with conspecific aggression in a small population of rescued dogs. *Peer j*. 2019 7: e6103.
37. Underhill DM, Iliev ID. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat Rev Immunol*, 2014; 14: 405-416.
38. Foster ML, Dowd SE, Stephenson C, et al. Characterization of the fungal microbiome (mycobiome) in fecal sample from dogs. *Vet Med Int* 2013: e658373.
39. Minot S, Bryson A, Chehoud C, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD. Rapid evolution of the human gut virome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013; 110: 12450-12455.
40. GaciN, Borrel G, Tottey W, O'Toole PW, Brugère JF. Archaea and the human gut: new beginning of an old story. *World J Gastroenterol*, 2014; 20: 16062-16078.
41. Cannas S, Tonini B, Belà B, Di Prinzi R, Pignataro G, Di Simone D, Gramenzi A. Effect of a novel nutraceutical supplement (Relaxingen Pet dog) on the fecal microbiome and stress-related behaviors in dogs: a pilot study. *Journal of veterinari behavior*, 2020; 42: 37-47.
42. Goehler LE, Gaykema RP, Opitz N, Reddaway R, Badr N, Lyte M. Activation in vagal afferents and central autonomic pathways: early responses to intestinal infection with *Campylobacter jejuni*. *Brain Behav Immun* 19: 334- 344, 2005.
43. Jaglin M, Rhimi M, Philippe C, Pons N, Bruneau A, Goustard B, Daugé V, Maguin E, Naudon L, Rabot S. Indole, a signaling molecule produced by the gut microbiota, negatively impacts emotional behaviors in rats. *Frontiers in neuroscience*, 2018; 12:216.
44. Sharon G, Cruz NJ, Kang DW, Gandal MJ, Wang B, Kim YM, et al. Human gut microbiota from autism spectrum disorder promote behavioral symptoms in mice. *Cell*, 2019; 177:1600-18 e 17.

45. Bermudez-Martin P, Becker JAJ, Caramello N, Fernandez SP, Costa-Campos R, Canaguier J, et al. the microbial metabolite p-Gresol induces autistic-like behaviors in mice by remodeling the gut microbiota. *Microbiome*, 2021; 9:157.
46. Golubeva AV, Joyce SA, Moloney G, Burokas A, Sherwin E, Arboleya S, Flynn I, Khochanskiy D, Moya-Pérez A, Peterson V, Rea K, Murphy K, Makarova O, Buravkov S, Hyland NP, Stanton C, Clarke G, Gahan CGM, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota-related changes in bile acid & tryptophan metabolism are associated with gastrointestinal dysfunction in a mouse model of autism. *EBioMedicine*, 2017; 24: 166-178.
47. Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savigny HM, Dinan TG, et al. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptors expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2011; 108: 16050-5.
48. Tian P, O’Riordan KJ, Wang G, Zhang H, et al. Towards a psychobiotic therapy for depression: Bifidobacterium breve CCFM1025 reverses chronic stress-induced depressive symptoms and gut microbial abnormalities in mice. *Neurobiol Stress*, 2020; 12: 100216.
49. Braniste V, Al-Asmakh M, Kpwal C, Anuar F, Abbaspour A, Tòth M, Korecka A, Bakocevic N, Ng LG, Kundu P, Gulyas B, Halldin C, Hultenby K, Nilsson H, Hebert H, Volpe BT, Diamond B, Pettersson S. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice [correction in *Sci Transl Med* 6: 266er7, 2014]. *Sci Transl Med*, 2014; 6: 263ra 158.
50. Tran TTT, Cousin FJ, Lynch DB, Menon R, Brulc J, Brown JR, O’Herlinhy E, Butto LF, Power K, Jeffery IB, O’Connor EM, O’Toole PW. Prebiotic supplementation in frail older people affects specific gut microbiota taxa but not global diversity. *Microbiome*, 2019; 7: 39.
51. Wall R, Cryan JF, Ross RP, Fitzgerald GF, Dinan TG, Stanton C. Bacterial neuroactive compounds produced by psychobiotics. *Adv Exp Med Biol*, 2014; 817: 221-239.
52. Golubeva AV, Crampton S, Desbonnet L, Edge D, O’Sullivan O, Lomasney KW, Zhdanov AV, Crispie F, Moloney RD, Borre YE, Cotter PD, Hyland NP, O’Halloran KD, Dinan TG, O’Keefe GW, Cryan JF. Prenatal stress-induced alterations in major

physiological system correlate with gut microbiota composition in adulthood.

Psychoneuroendocrinology, 2015; 60: 58-74.

53. Lyte M, Varcoe JJ, Biley MT. Anxiogenic effect of subclinical bacterial infection in mice in the absence of overt immune activation. *Physiol Behav*, 1998; 65: 63-68.
54. Asano Y, Hiramoto T, Nishino R, Yaiba Y, Kimura T, Yoshihara K, Koga Y, Sudo N. Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in the gut lumen of mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012; 303: G1288-G1295.
55. Richard HT, Foster JW. Acid resistance in *Escherichia coli*. *Adv App Microbiol*, 2003; 52: 167-186.
56. Siragusa S, De Angelis M, Di Cagno R, Rizzello CG, Coda R, Gobbetti M. Synthesis of gamma-aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Appl Environ Microbiol*, 2007; 73: 7283-7290.
57. Pérez-Berezo T, Pujo J, Martin P, Le Faouder P, Galano JM, Guy A, Knauf C, Tabet JC, Tronnet S, Barreau F, Heuillet M, Dietrich G, Bertrand-Michel J, Durand T, Oswald E, Cenac N. Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Nat Commun*, 2017; 8:1314.
58. Barrett E, Ross RP, O'Toole PW, Fitzgerald GF, Stanton C. γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *J Appl Microbiol*, 2012; 113: 411-417.
59. Pokusaeva K, Johnson C, Luk B, Uribe G, Fu Y, Oezguen N, Matsunami RK, Lugo M, Major A, Mori-Akiyama Y, Hollister EB, Dann SM, Shi XZ, Engler DA, Savidge T, Versalovic J. GABA-producing *Bifidobacterium dentium* modulates visceral sensitivity in the intestine. *Neurogastroenterol Motil*, 2017; 29: e12904.
60. Siracusa C. The gut-brain axis - using the brain and the gut to decide. World Small Animal Veterinary Association Congress Proceedings. 2019; 376: 257.
61. Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, Nagler CR, Ismagilov RF, Mazmanian SK, Hsiao EY. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. [Erratum in *Cell* 163: 258,2015.] *Cell*, 2015; 161: 264-276.

62. Hata T, Asano Y, Yoshihara K, Kimura-Todani T, Miyata N, Zhang XT, Takakura S, Yaiba Y, Koga Y, Sudo N. Regulation of gut luminal serotonin by commensal microbiota in mice. *PLoS One*, 2017; 12: e0180745.
63. Knecht LD, O'Connor G, Mittal R, Liu XZ, Daftarian P, Deo SK, Daunert S. Serotonin activates bacterial quorum sensing and enhances the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in the host. [Correction in *EBioMedicine* 23: 195,2017]. *EBioMedicine*, 2016; 9: 161-169.
64. Clarke G, Granham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry*, 2013; 18: 666-673.
65. Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G. Kynurenine pathway metabolism and the microbiota-gut-brain axis. *Neuropharmacology*, 2017; 112, Pt B: 399-412.
66. Maltz RM, Keirse J, Kim SC, Mackos AR, Gharaibeh RZ, Moore CC, Xu J, Bakthavatchalu V, Somogyi A, Bailey MT. Prolonged restraint stressor exposure in outbred CD-1 mice impacts microbiota, colonic inflammation, and short chain fatty acids. *PLoS One*, 2018;13: e0196961.
67. Zhang L, Wang Y, Xiayu X, Shi C, Chen W, Song N, Fu X, Zhou R, Xu YF, Huang L, Zhu H, Han Y, Qin C. Altered gut microbiota in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis*, 2017; 60: 1241-1257.
68. Stilling RM, Moloney GM, Ryan FJ, Hoban AE, Bastiaanssen TF, Shanahan F, Clarke G, Claesson MJ, Dinan TG, Cryan JF. Social interaction-induced activation of RNA splicing in the amygdala of microbiome-deficient mice. 2018; *eLife* 7: e33070.
69. Robertson RC, Seira Oriach C, Murphy K, Moloney GM, Cryan JF, Dinan TG, Paul Ross R, Stanton C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids critically regulate behavior and gut microbiota development in adolescence and adulthood. *Brain Behav Immun*, 2017; 59: 21-37.
70. Robertson RC, Seira Oriach C, Murphy K, Moloney GM, Cryan JF, Dinan TG, Ross RP, Stanton C. Deficiency of essential dietary n-3 PUFA disrupts the caecal microbiome and metabolome in mice. *Br J Nutr*, 2017; 118: 959-970.
71. Fröhlich EE, Farce A, Mayerhofer R, Reichmann F, Jačan A, Wagner B, Zinser E, Bordag N, Magnes C, Fröhlich E, Kashofer K, Gorkiewicz G, Holzer P. Cognitive

- impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain Behave Immun*, 2016; 56: 140-155.
72. Gronier B, Savignac HM, Di Miceli M, Idriss SM, Tzortzis G, Anthony D, Burnet PWJ. Increased cortical neuronal responses to NMDA and improved attentional set-shifting performance in rats following prebiotic (B-GOS®) ingestion. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2018; 28: 211-224.
 73. Möhle L, Mattei D, Heimesaat MM, Bereswill S, Fischer A, Alutis M, French T, Hambarzumyan D, Matzinger P, Dunay IR, Wolf SA. Ly6C(hi) monocytes provide a link between antibiotic-induced changes in gut microbiota and adult hippocampal neurogenesis. *Cell Rep*, 2016; 15: 1945-1956.
 74. Szyszkowicz JK, Wong A, Anisman h, Medali Z, Audet MC. Implications of the gut microbiota in vulnerability to the social avoidance effects of chronic social defeat in male mice. *Brain Behave Immun*, 2017; 66: 45-55.
 75. Pearson-Leary, J., Zhao, C., Bittinger, K. *et al.* The gut microbiome regulates the increases in depressive-type behaviors and in inflammatory processes in the ventral hippocampus of stress vulnerable rats. *Mol Psychiatry* **25**, 1068–1079 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0380-x>
 76. Liang S, Wang T, Hu X, Luo J, Li W, Wu X, Duan Y, Jin F. Administration of *Lactobacillus helveticus* NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberration caused by chronic restraint stress. *Neuroscience*, 2015; 310: 561-577.
 77. Lyte M, Chapel A, Lyte JM et al. Resistant starch alters the microbiota-gut-brain axis: implication for dietary modulation of behavior. *PLoS One*, 2016; 11(1): e0146406.
 78. Casella G, Pozzi R, Cigognetti M, et al. Mood disorders and non-celiac gluten sensitivity. *Minerva gastroenterol dietol* , 2017; 63(1): 32-37.
 79. Halley C. The gut-brain axis: assessment of EcNL-DOPA in mice and dogs. *Creative Components*, 2020; 505. <https://dr.lib.iastate.edu/handle/20.500.12876/17073>
 80. Hang I, Rinttila T, Zentek J, et al. Effect of high content of dietary animal-derived protein or carbohydrates on canine fecal microbiota. *BMG Vet Res*, 2012; 8: 90.
 81. Middelbos IS, Vester Boler BM, Qu A, et al. Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. *PLoS ONE*, 2010; 5: 29768.

82. Schmidt K, Cowen PJ, Harmer CJ, Tzortzis G, Errington S, Burnet PW. Prebiotic intake reduces the waking cortisol response and alters emotional bias in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)*, 2015; 232: 1793-1801.
83. Burokas A, Arboleya S, Moloney RD, Peterson VL, Murphy K, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Targeting the Microbiota - Gut - Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice. *Biol Psychiatry*, 2017; 82: 472 - 487.
84. El Aidy S, Dinan TG, Cryan JF. Immune modulation of the brain-gut-microbe axis. *Clin Ther*, 2015; 37: 954 - 967.
85. Hao Z, Wang W, Gio R, Liu H. *Faecalibacterium prausnitzii* (ATCC 27766) has preventive and therapeutic effects on chronic unpredictable mild stress-induced depression-like and anxiety-like behavior in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 2019; 104: 132 - 142.
86. Janik R, Thomason LAM, Stanisz AM, Forsythe P, Bienenstock J, Stanisz GJ. Magnetic resonance spectroscopy reveals oral *Lactobacillus* promotion of increases in brain GABA, N-acetyl aspartate and glutamate. *Neuroimage*, 2016; 125: 988 - 995.
87. Ong IM, Gonzalez JG, McIlwain SJ, Sawin EA, Schoen AJ, Adluru N, Alexander AL, Yu JJ. Gut microbiome populations are associated with structure-specific changes in white matter architecture. *Transl Psychiatry*, 2018; 8: 6.
88. Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, Keren-Shaul H, Mahlakoiv T, Jakobshagen K, Buch T, Schwierzeck V, Utermöhlen O, Chun E, Garrett WS, McCoy KD, Diefenbach A, Staeheli P, Stecher B, Amit I, Prinz M. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci*, 2015; 18: 965-977.
89. Boehme M, van de Wouw M, Bastiaanssen TFS, Olavarria-Ramirez L, Lyons K, Fouhy F, Golubeva AV, Moloney GM, Minuto C, Sandhu KV, Scott KA, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Schellekens H, Cryan JF. Mid-life microbiota crises: middle age is associated with pervasive neuroimmune alterations that are reversed by targeting the gut microbiome. *Mol Psychiatry*. 2020; 25: 2567-2583.
90. Perez-Burgos A, Wang B, Mao YK, Mistry B, McVey Neufeld KA, Bienenstock J, Kunze W. Psychoactive bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) elicits rapid

- frequency facilitation in vagal afferents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013; 304: G211-G220.
91. Sgritta M, Dooling SW, Buffington SA, Momin EN, Francis MB, Britton RA, Costa-Mattioli M. Mechanisms underlying microbial-mediated changes in social behavior in mouse models of autism spectrum disorders. *Neuron*, 2019; 101: 246-259.e6.
 92. Suñol A, Perez-Accino P, Kelley M, Rossi G, Salavati Schmitz S. Successful dietary treatment of aggression and behavioral changes in a dog. *Journal of veterinary behavior*: 2020; 37: 56-60.
 93. Yeh YM, Lye XY, Lin HY, Wong JY, Wu CC, Huang CL, Tsai YC, Wang LC. Effects of *Lactiplantibacillus plantarum* PS128 on alleviating canine aggression and separation anxiety. *Applied Animal Behavior Science*, 2022; 247:105569.
 94. Heath SE, Barabas S, Craze PG. Nutritional supplementation in case of canine cognitive dysfunction - A clinical trial. *Apple. Anim. Behav. Sci.* 2007; 105: 284-296.
 95. Sylvia KE, Jewell CP, Rendon NM, St John EA, Demas GE. Sex-specific modulation of the gut microbiome and behavior in Siberian hamster. *Brain, Behavior and Immunity*, 2017; 60:51-62.
 96. Coccaro EF, Fanning JR, Phan KL, Lee R. Serotonin and impulsive aggression. *CNS Spectrums*, 2015; 20: 295-302.
 97. Pan Y, Landsberg G, Mougeot I, Kelly S, Xu H, Bhatnagar S, Gardner CL, Milgram W. Efficacy of therapeutic diet on dogs with signs of cognitive dysfunction syndrome (CDS): a prospective double blinded placebo controlled clinical study. *Front. Nutr.* , 2018; 5:127.
 98. Chu DM, Ma J, Prince AL, Antony KM, Seferovic MD, Aagaard KM. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nat Med* 2017; 23: 314 - 326.
 99. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, *Suppl* 2011; 1: 4578 - 4585.
 100. Scott KA, Ida M, Peterson VL. Prenderville JA, Moloney GM, Izumo T, Murphy K, Murphy A, Ross RP, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Revisiting Metchnikoff: age-

related alterations in microbiota-gut-brain axis in the mouse. *Brain Behav Immun* 2017; 65: 20-32.

101. Bosi A, Banfi D, Bistoletti M, Giaroni C, Baj A. Tryptophan metabolites along microbiota-gut-brain axis: an interkingdom communication system influencing the gut in health and disease. *International Journal of Tryptophan Research* 2020; 13: 1-25.