



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Albricani

# Fisiologia del benessere e del dolore dei pesci ossei

*Carlo Corradini*

Il benessere animale nelle specie ittiche d'acquacoltura

12 aprile 2022

# I pesci possono provare dolore?

Ma secondo te,  
gli umani hanno  
un collo?



Ma cosa vai  
a pensare...



INTENSIVE  
**FISH WELFARE COURSE**  
11 - 13 November 2019  
CCMAR | Faro | Portugal



fair fish CCMAR  
CENTRO DE CIÊNCIAS DO MAR

Photo: Astronotus scellatus by Jan Høgl, Jansson under the CC BY-SA license

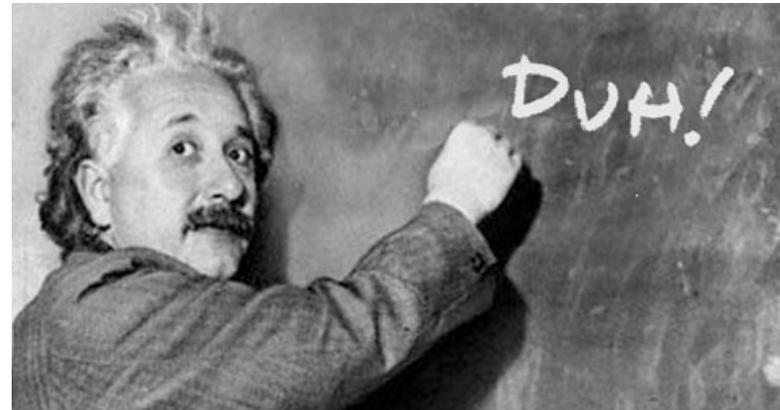


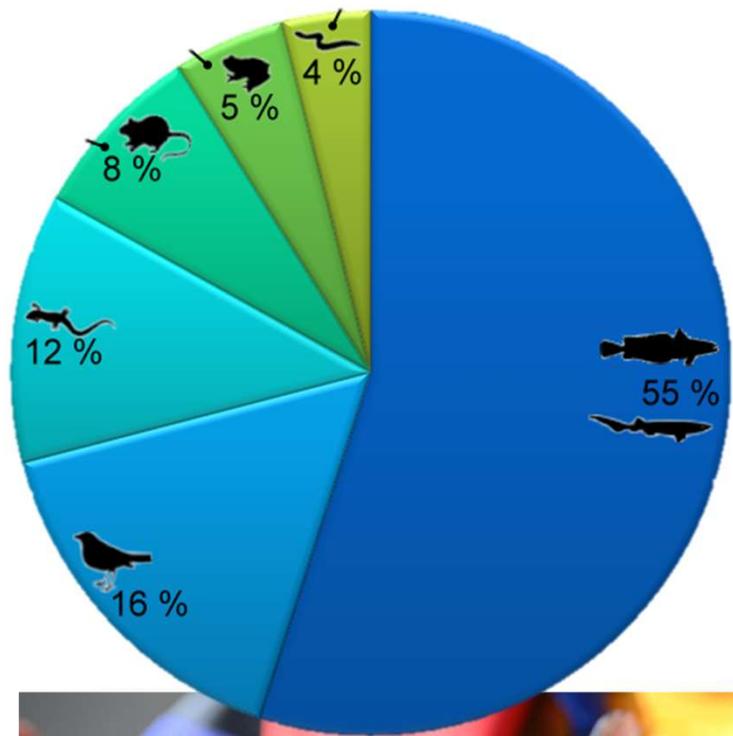
# Argomenti

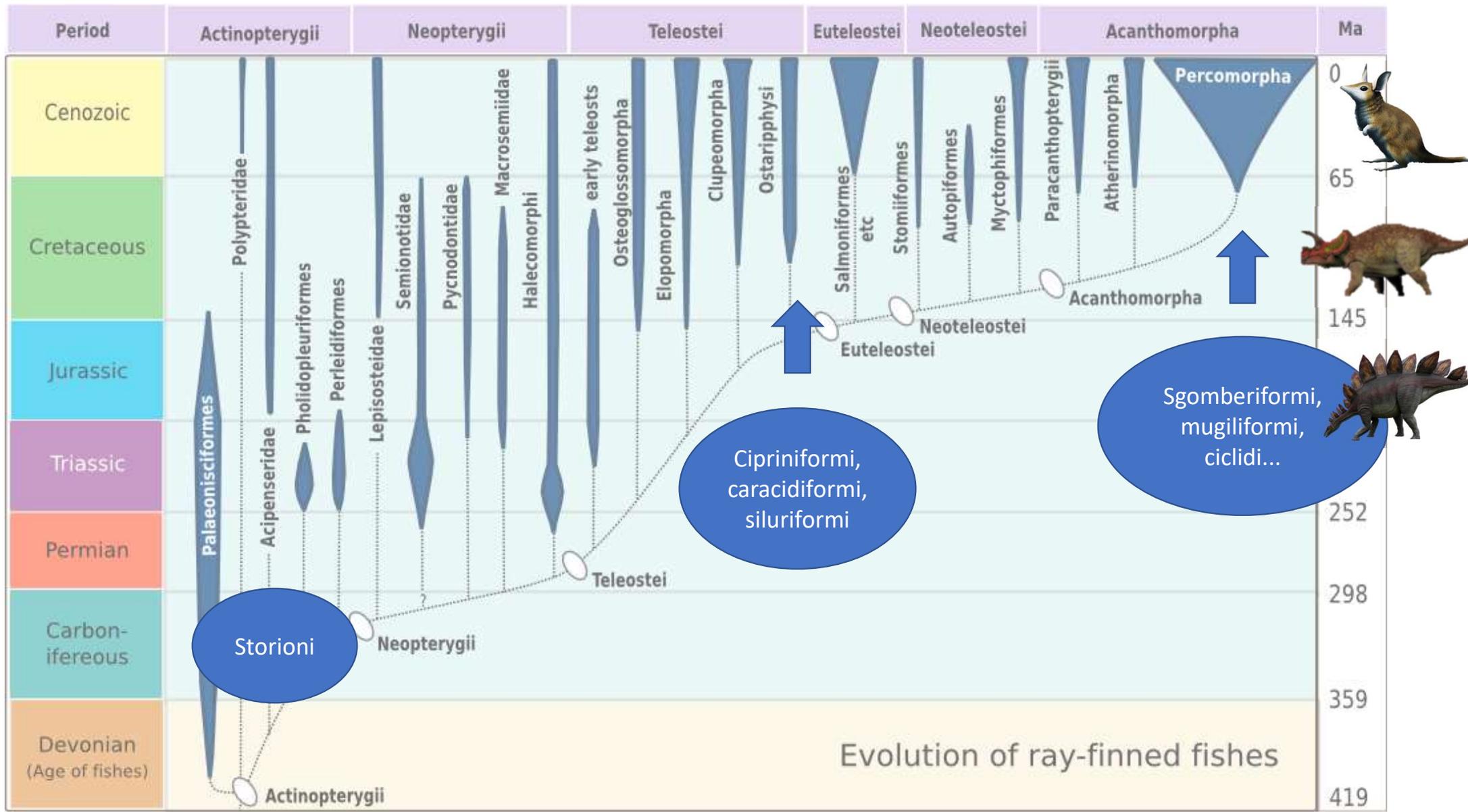
- Meccanismi sensoriali
- Definire il dolore
- I meccanismi fisiologici del dolore, del benessere e dello stress

# Meccanismi sensoriali ed elettrofisiologia

- Gli osteitti (da ora in avanti “pesci”) sono vertebrati acquatici
- Esistono tantissime specie di pesci (e sono a volte molto diverse tra di loro)







# Gli organi di senso dei pesci



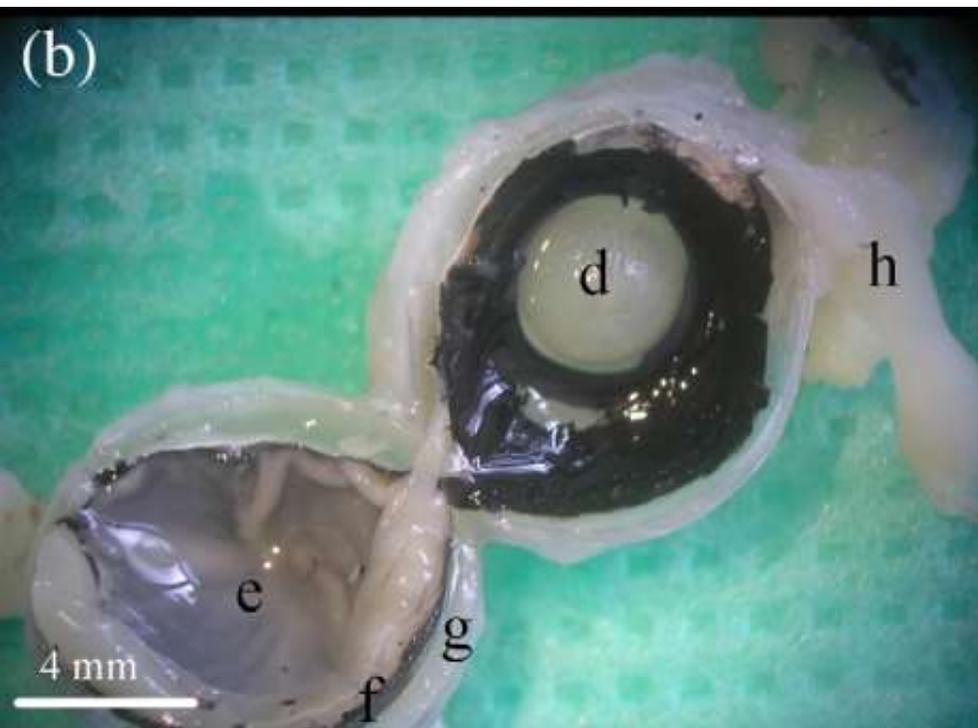


# Vista

- Gli occhi dei pesci sono simili a quelli degli altri vertebrati
- Il cristallino è più rotondeggiante
- La messa a fuoco si basa sull'avvicinamento e allontanamento del cristallino dalla retina
- Non tutti i pesci possono accomodare la dimensione della pupilla
- L'acqua (e quindi la profondità, le sue caratteristiche di salinità, torbidità, presenza di tannini...) influenza molto il passaggio delle onde elettromagnetiche che compongono la luce
- Molti pesci possono vedere l'UV (che penetra più in profondità rispetto allo spettro per noi visibile)

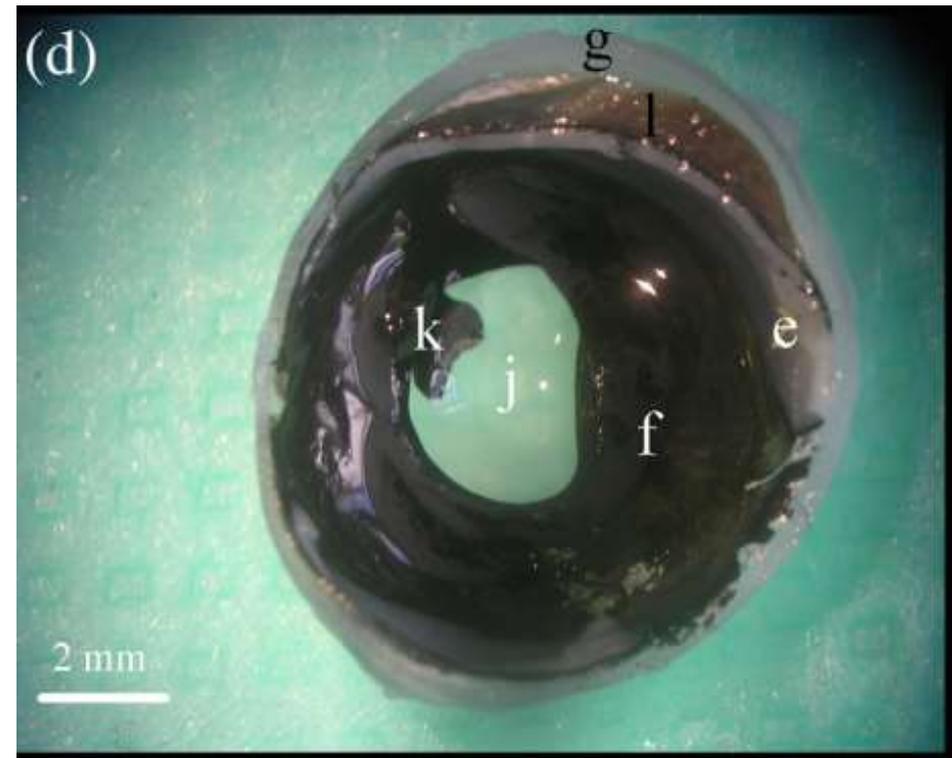


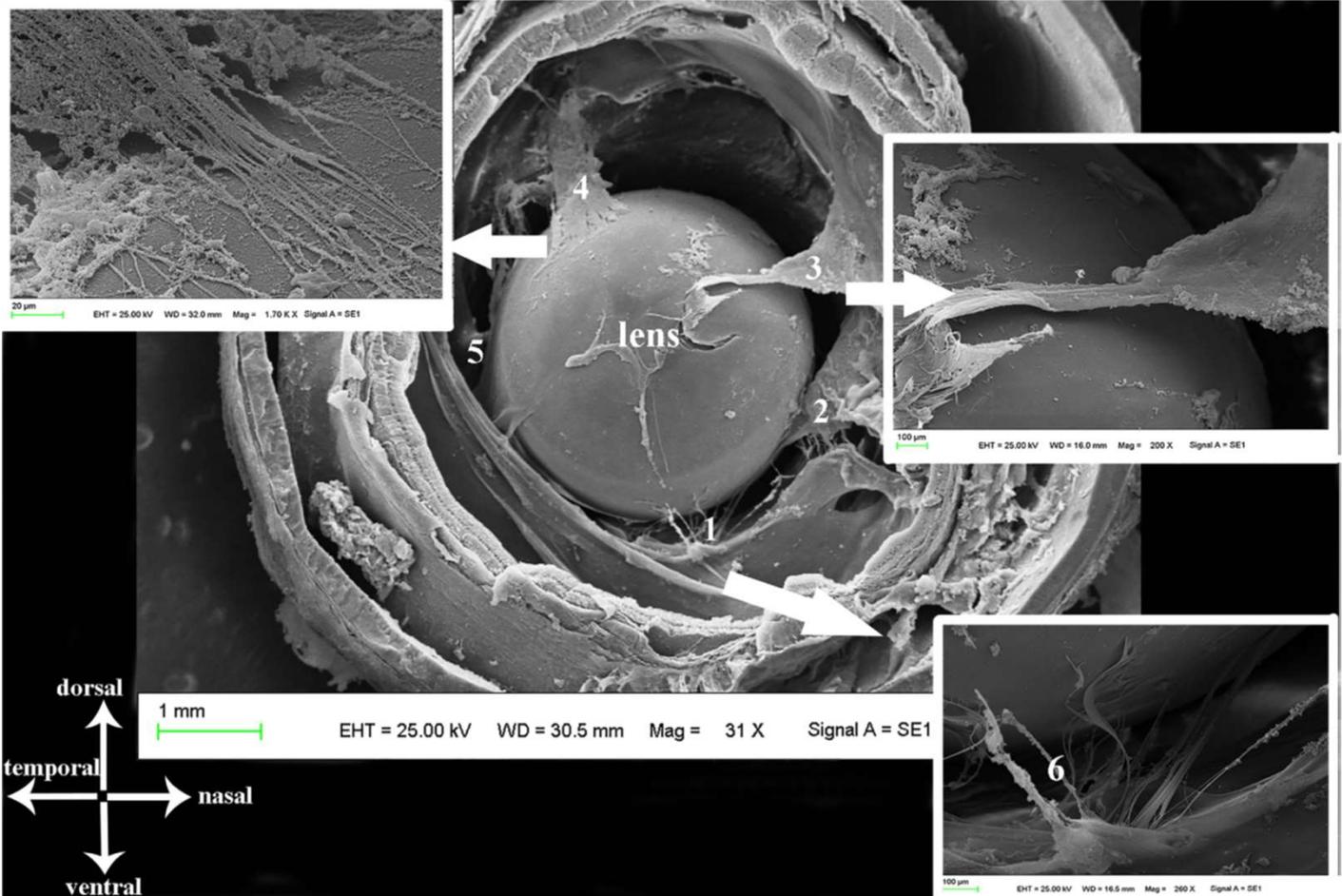
Anche la  
quantità di luce  
può modificare il  
benessere



Sinistra: Sezione trasversale del bulbo oculare:  
 d: cristallino, e: retina, f: coroide,  
 G, sclera, h muscoli bulbari

Destra, sezione dle bulbo oculare  
 anteriore: g: sclera, j: cornea, k: iride, l:  
 rete coroidale





Scansione della muscolatura del cristallino: 1: retratore, 2: legamento frontale, 3: legamento sospendore nasale, 4: legamento sospendore centrale, 5: legamento sospendore temporale, 8: legamento accessorio

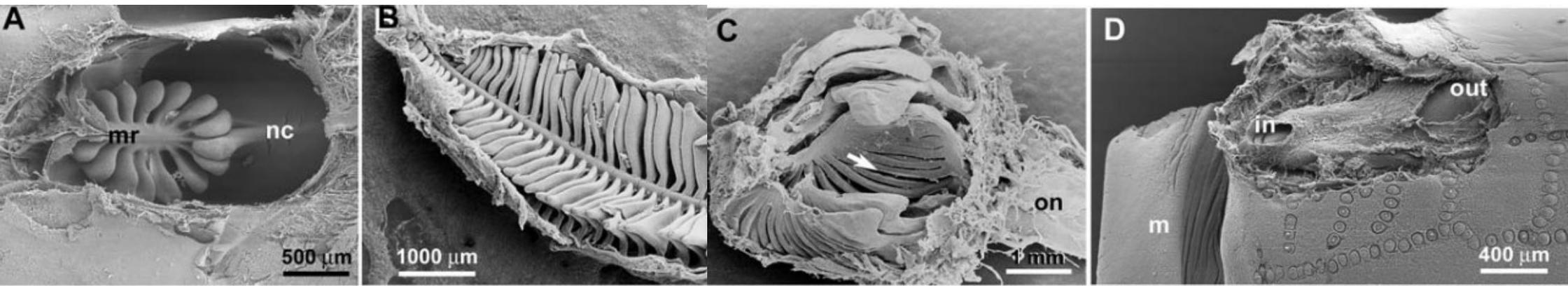


# Gusto e olfatto

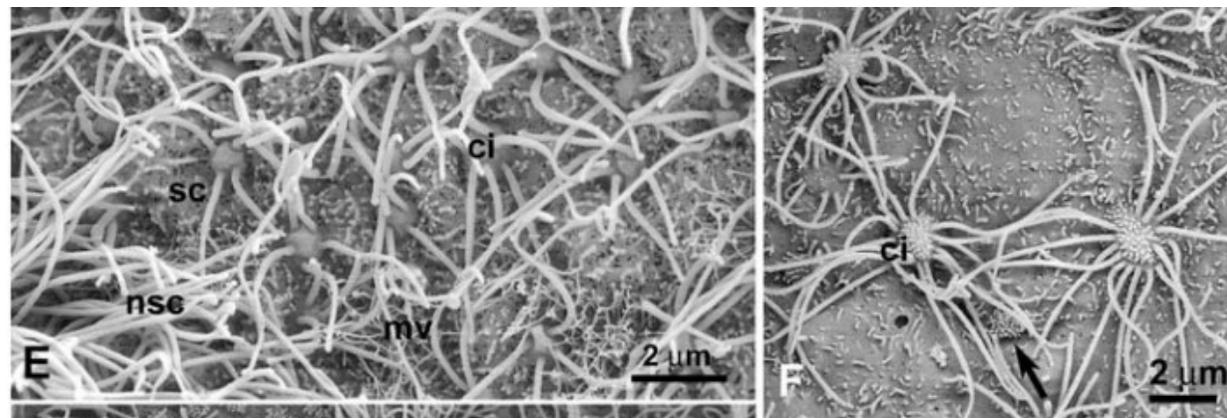
Il gusto è relativo unicamente alla nutrizione (=capire se quello che si è afferrato è commestibile o no) mentre l'olfatto a diversi comportamenti (ricercar del cibo, valutazione della chimica dell'acqua, comportamenti sociali)

L'olfatto rileva le sostanze solubili in acqua, il gusto le sostanze disciolte in acqua sulla bocca o sugli epiteli (barbigli etc), i sottoprodotti di reazioni enzimatiche (enzimi salivari), o rilasciate attraverso il morso o la manipolazione con la bocca.

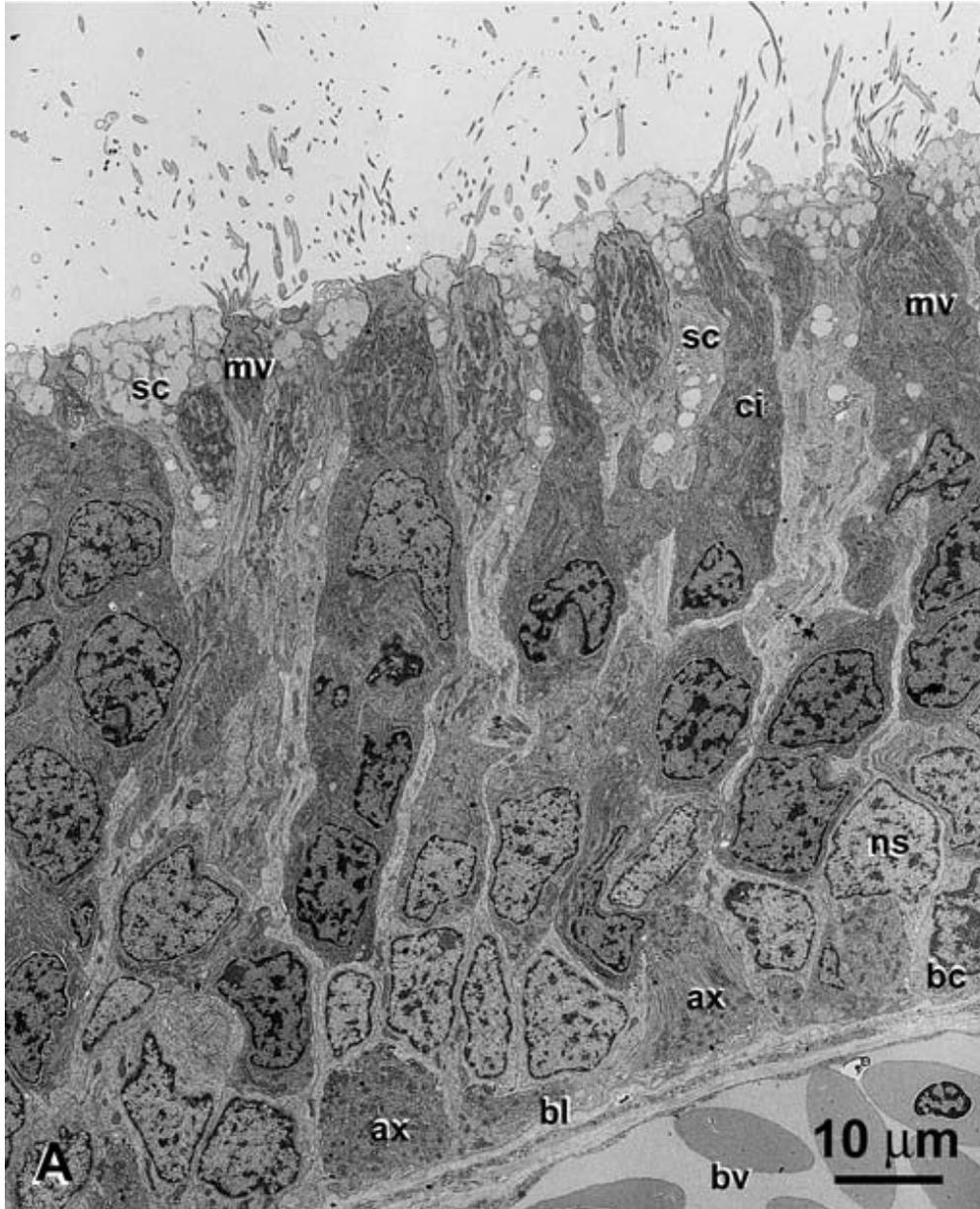




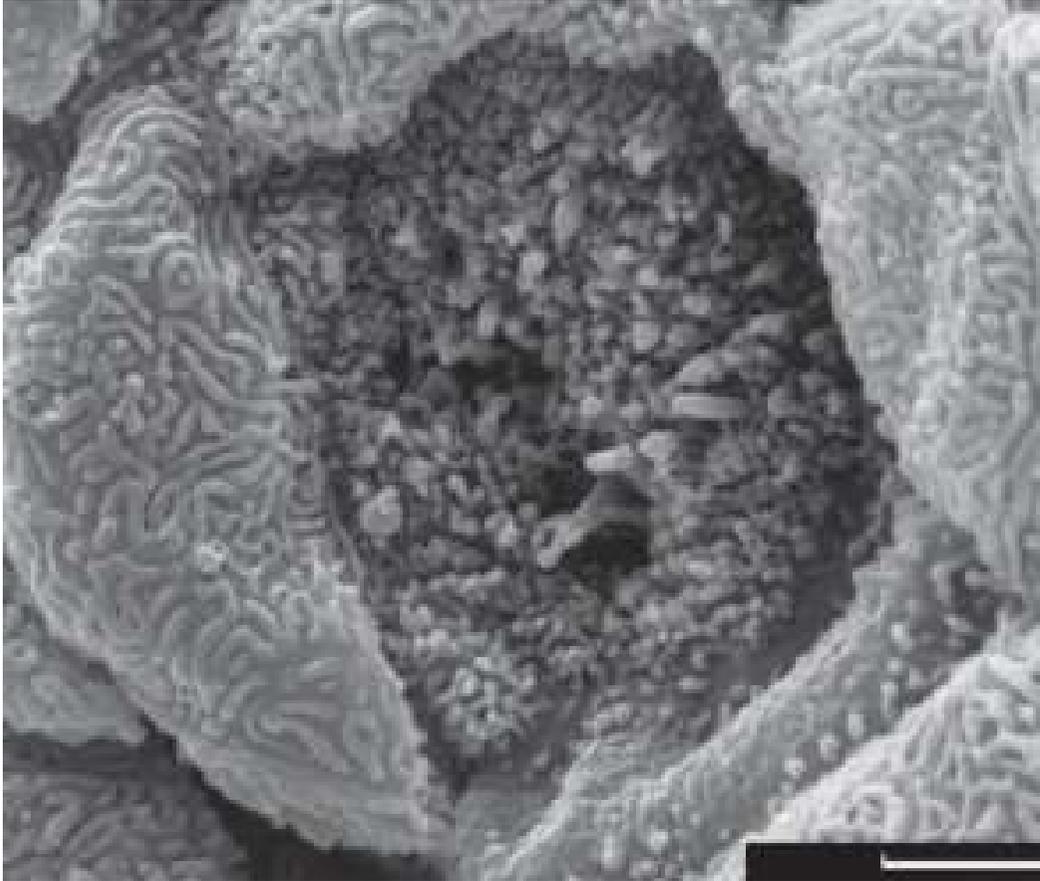
Sopra: rosette (organi olfattori) dopo rimozione epidermide di pesce bandiera reticolato, Anguilla, luccio dal naso corto, eleotride delle isole sandwich.  
 Sotto: microvilli (mv), neuroni olfattori ciliati (ci) in *Pimephales promelas*.



HANSEN ZIELINSKI 2006



In sezione (*Ictalurus punctatus*): mv (microvilli), ci (neuroni olfattivi), sc (cellule stromali), ns (nucleo delle cellule stromali), ax (assoni), bl (lamina basale).



Diversi tipi di papille gustative: I e II intorno ai denti, mascelle, lingua, e brachie, III nella zona orofaringea associate ai denti trituratori.

A destra: papilla gustative di tetra (Kasumyan, 2019)

- La presenza di inquinanti data da scarsa filtrazione e/o altra densità può aumentare il “sottofondo olfattivo”
- Alta pressione parziale di CO<sub>2</sub> e/o basso pH possono diminuire la capacità olfattiva, come anche xenobiotici
- L'importanza dei vari sensi nel comportamento alimentare può modificarsi nei pesci allevati (soprattutto dopo diverse generazioni di selezione: ad es. Maggiore importanza della vista rispetto all'olfatto nei salmoni allevati)

# Udito

I pesci sono particolarmente sensibili ai suoni. Per la loro componente, sono tutti sensibili ai movimenti dell'acqua, piuttosto che ai cambiamenti di pressione (solo i pesci con la vescica natatoria).

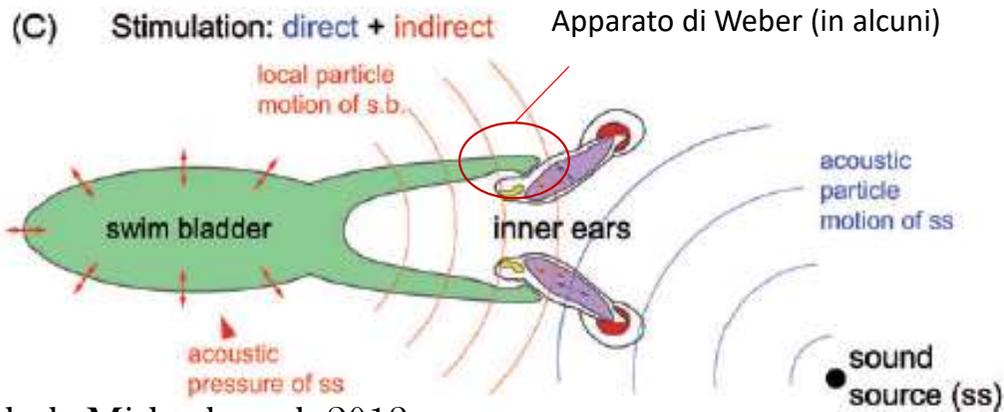
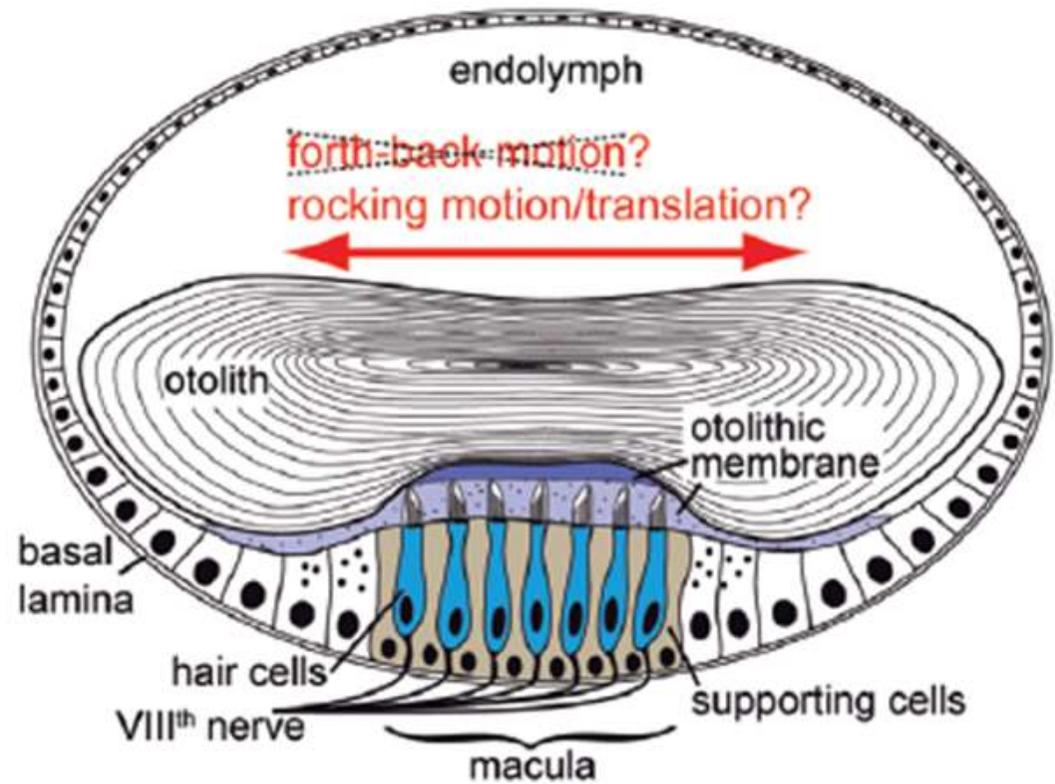
Per questo i pesci sono stati spesso divisi in "specializzati" o "generalisti" quando si parla delle loro capacità di ascoltare.

Questa divisione è stata messa in discussione da Popper et al. (2021)



Copyright © Xiaohong Deng  
[www.life.umd.edu/biology/popperlab/research/deepsea.htm](http://www.life.umd.edu/biology/popperlab/research/deepsea.htm)

- Il corpo del pesce ha una densità simile a quella dell'acqua,
- Il movimento delle particelle arriva fino agli otoliti, che però offrono resistenza a questo movimento (Maggiore inerzia).
- Il contrasto tra il movimento degli otoliti e quello delle cellule ciliari porta ad una stimolazione delle stesse e l'informazione viene passata attraverso il nervo statoacustico (vestibolococleare).

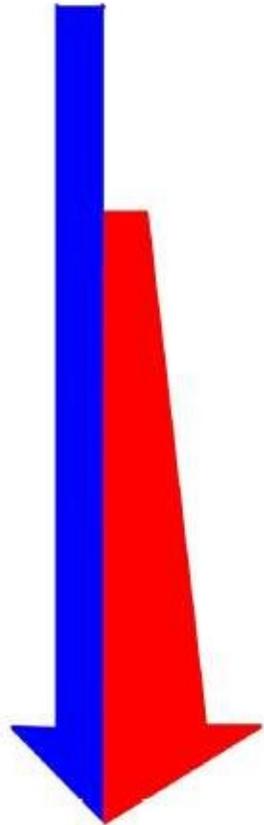


Schulz-Mirbach et al. 2018

Nei pesci con vescica natatoria il suono viene amplificato dalla stessa (aria -> comprimibile)



Only Particle Motion



Extensive use of  
Sound Pressure

Fishes without a gas bubble such as a swim bladder  
(e.g., Elasmobranchii; Pleuronectiformes)

Fishes with a swim bladder distant from the ear  
(e.g., Salmoniformes, Scombridae)

Fishes with a swim bladder that extends to close to the ear,  
but is not connected to it (e.g., Gadiformes)

Fishes with a gas bubble near, but not connected to the ear,  
as well as having a swim bladder (e.g., Anabantidae)

Fishes with gas bubbles associated with the ear  
(e.g., Mormyridae, Clupeiformes), as well as having a  
swim bladder

Fishes with a swim bladder that touches or connects to  
the ear (e.g., Holocentridae)

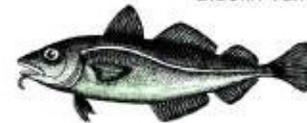
Fishes with mechanical connections between  
the swim bladder and the ear  
(e.g., Cypriniformes; Siluriformes)



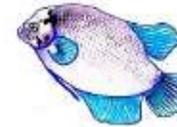
Turbot



Bluefin Tuna



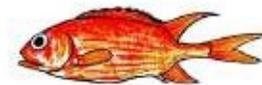
Atlantic Cod



Giant Gourami



Herring



Squirrelfish



Catfish

**Fig. 1.** Depiction of continuum of hearing for fishes first proposed by Popper and Fay (2011), starting with fishes with no gas bubble, such as elasmobranchs and flatfish, that do not detect sound pressure, to fishes, including the otophysans, that are very well adapted for detection of sound pressure. Width of the arrows depict relative involvement of particle motion (blue) and sound pressure (red) in hearing in different species. Figure derived from Popper and Fay (2011) as modified by Putland et al. (2019). (Figure © 2021 Anthony D. Hawkins, all rights reserved.)

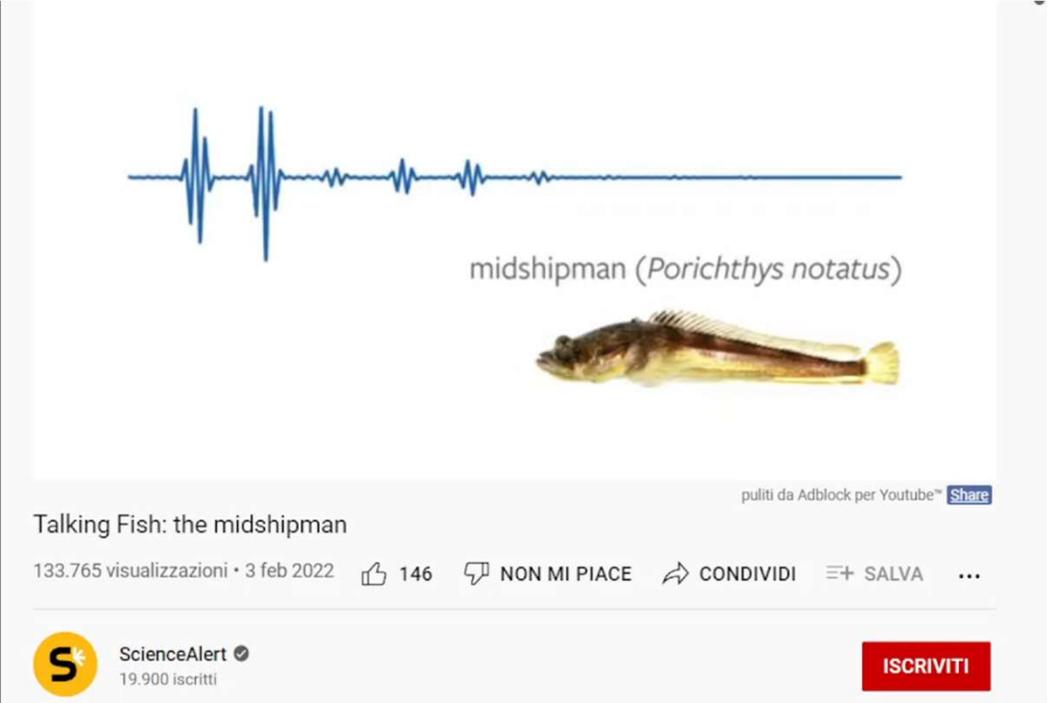
Popper et al. 2021

# Implicazioni sul welfare

- Il suono nell'aria non necessariamente si propaga nel mezzo acquoso (e viceversa)
- Alcuni suoni possono mascherare frequenze utilizzate dai pesci per la comunicazione
- I rumori prodotti da pompe ed altri apparecchi in acquacoltura, ventole, navi possono influenzare il comportamento dei pesci

# Evolutionary Patterns in Sound Production across Fishes

Rice et al.  
2022



The image shows a YouTube video player interface. At the top, there is a blue sound waveform representing the sound produced by a midshipman fish. Below the waveform, the text "midshipman (*Porichthys notatus*)" is displayed. To the right of the text is a photograph of a midshipman fish, which is a long, slender, yellowish-brown fish with a prominent dorsal fin. Below the video player, the title "Talking Fish: the midshipman" is visible, along with the view count "133.765 visualizzazioni" and the date "3 feb 2022". There are also icons for likes (146), dislikes (NON MI PIACE), share (CONDIVIDI), save (SALVA), and a menu icon (three dots). At the bottom left, there is a ScienceAlert logo with the text "ScienceAlert" and "19.900 iscritti". At the bottom right, there is a red button with the text "ISCRIVITI".

midshipman (*Porichthys notatus*)

Talking Fish: the midshipman

133.765 visualizzazioni • 3 feb 2022

146 NON MI PIACE CONDIVIDI SALVA

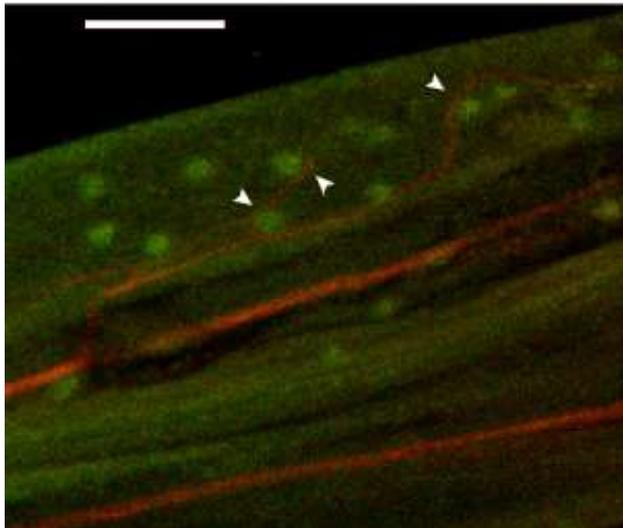
ScienceAlert  
19.900 iscritti

ISCRIVITI

# Meccanorecettori

Tatto: molto studiato soprattutto per i recettori delle pinne pettorali. Lo studio di queste nel pesce-gatto (Hardy et al 2016) ha sottolineato:

- Senso della pressione e del movimento degli oggetti
- Propriocezione e senso di sfioramento con le superfici



Rosso: nervi.  
Verde: anticorpi  
per cellule di  
Merkel  
(Cytokeratin 20)



# Linea laterale

- Struttura che corre lungo il fianco del pesce (“del canale”) o liberi sulla pelle, formata da una sequenza di neuromasti
- Il neuromasto è formato da cellule ciliate aggregate, le cui cilia sono inglobate in una cupola gelatinosa
- Sensibile ai cambiamenti di corrente: velocità negative, movimenti nell’acqua: 10-700 Hz (liberi), 100-200 (canale)

# Elettrorecezione

- Importanti per gli elasmobranchi e “pesci elettrici” di acque torbide
- In alcuni casi utilizzati per la navigazione oceanica



# Riassumendo

- Moltissime delle strutture sensoriali dei mammiferi hanno dei corrispettivi nell'anatomia dei pesci, adattate all'ambiente aereo da quello acquatico
- Per “pesci” si intende un numero di specie estremamente ampio, in cui i vari gruppi tassonomici si sono divisi in tempi anche molto lontani, per cui è importante trattare le esigenze di ogni specie individualmente



# I meccanismi fisiologici del dolore

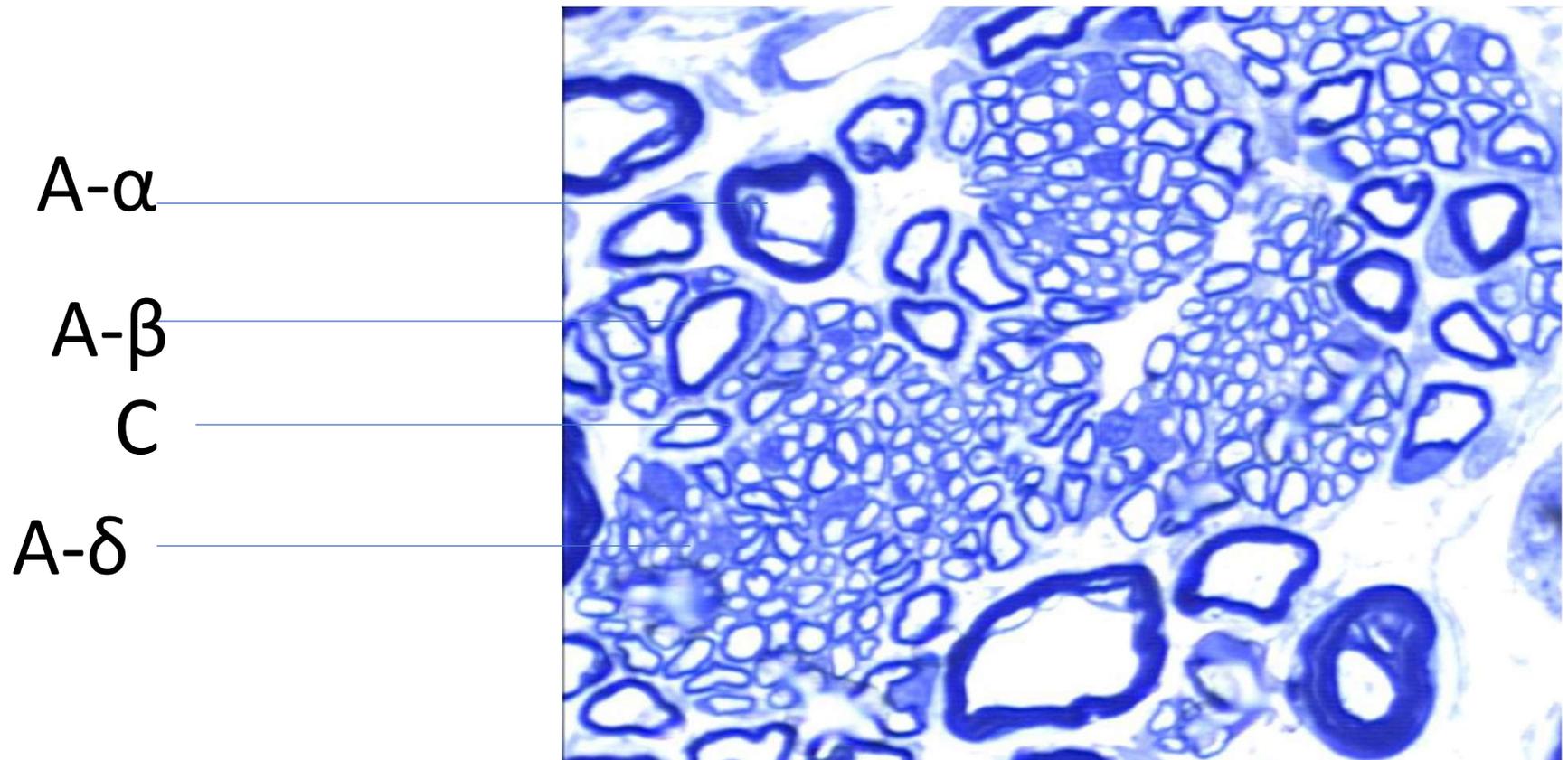
# Definizione di dolore

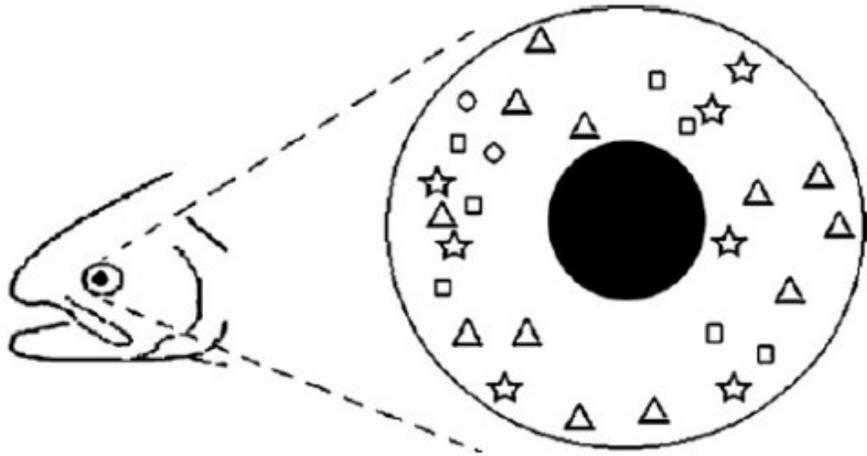
1. Il dolore è una spiacevole esperienza sensoriale ed emozionale associata a, o che assomiglia a quella associata a, un danno tissutale attuale o potenziale. (IASP, 2020)
2. Nocicezione: percezione di stimoli negativi (non necessariamente legata ad un'esperienza)
3. Legato al cambiamento di comportamenti dopo eventi potenzialmente dolorosi (importante in creature che non possono esprimere verbalmente il dolore)
4. Ad esempio: evitamento della fonte del dolore, o ricorso ad analgesici

Nota: nel dibattito UK/USA si parla di dolore e nocicezione (pain and nociception), in Italia spesso si differenzia in dolore e sofferenza

Classificazione Erlanger-Gasser	Diametro	Mielina	Velocità di conduzione	Recettori sensoriali associati
A $\alpha$	13-20 $\mu\text{m}$	si	80-120 m/s	Propriocettori Organo tendineo del Golgi
A $\beta$	6-12 $\mu\text{m}$	si	33-75 m/s	Recettori secondari del fuso muscolare Tutti i meccano-recettori cutanei
A $\delta$	1-5 $\mu\text{m}$	poca	3-30 m/s	Terminazioni nervose libere del tatto e pressione <b>Nocicettori</b> del tratto neospinotalamico <b>Termorecettori del freddo</b>
C	0,2-1,5 $\mu\text{m}$	no	0,5-2,0 m/s	<b>Nocicettori</b> del tratto <u>paleospinotalamico</u> <b>Recettori</b> del calore

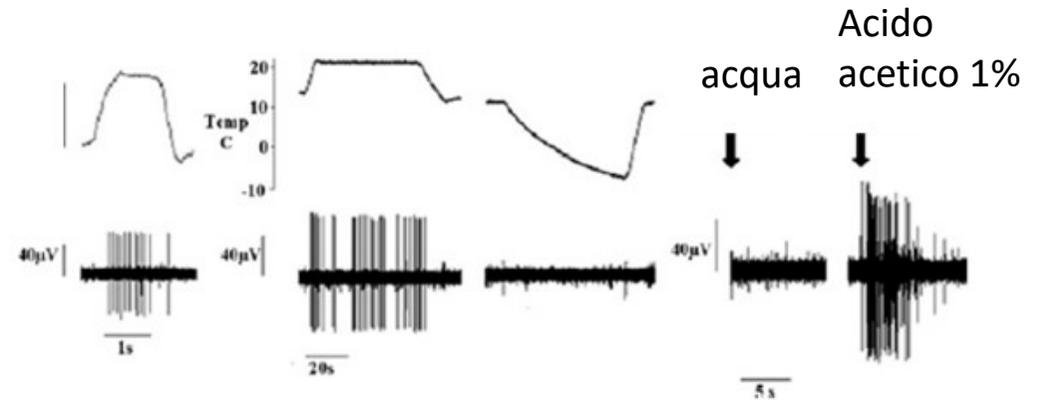
# Nervo trigemino della trota arcobaleno





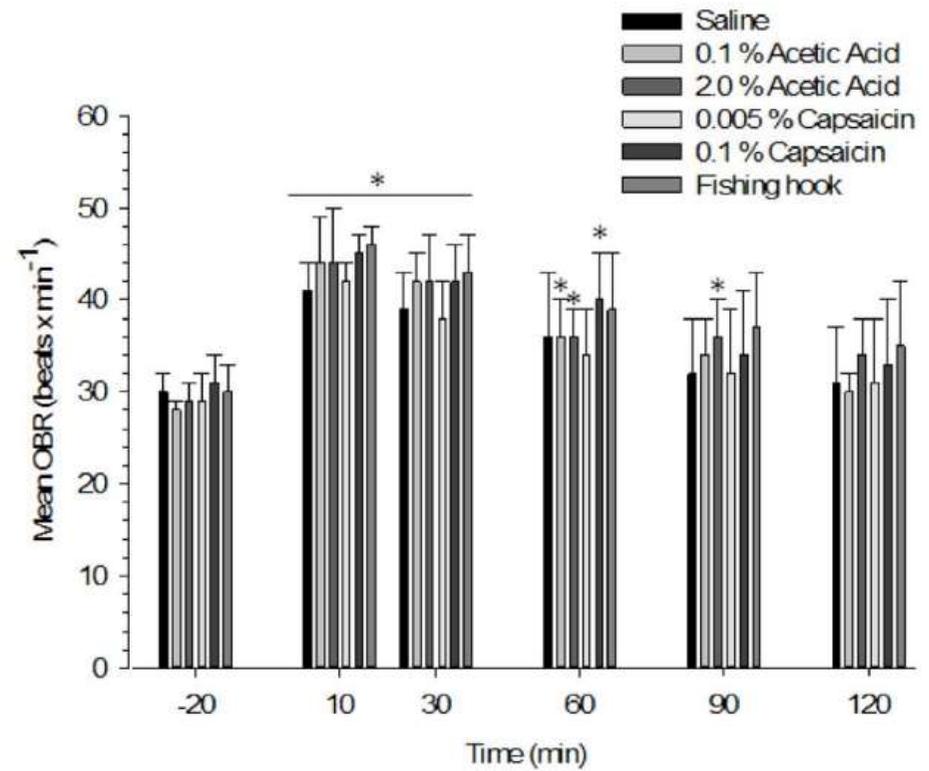
Nocirecettori su cornea di trota arcobaleno. Ashley et al. 2006  
 (n = 27, Stella= nocirecettori polimodali, □= nocicettori meccanotermici, Δ= meccanorecettori, ○= recettori mecanochimici)

Esempio di come I nocirecettori polimodali della cornea reagiscono di fronte a stimolo meccanico (lento), alla temperature (poco al calore, nullo al freddo), nulla all'acqua e con intensità all'acido acetico

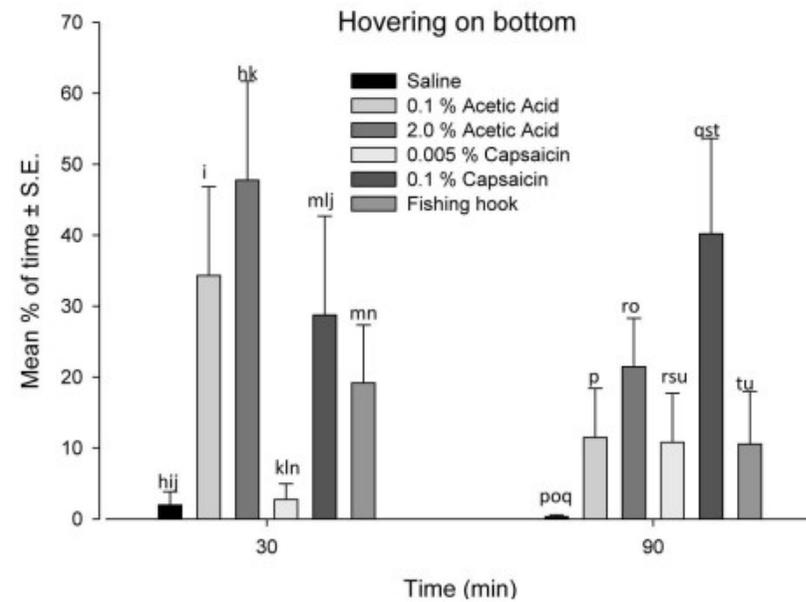
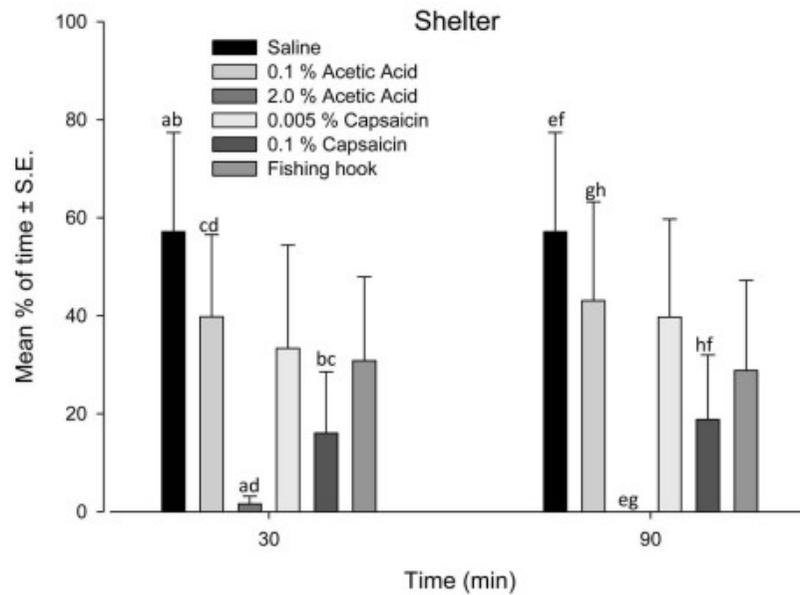




Eckroth et al. 2014



OBR: frequenza di battito opercolare  
(=frequenza respiratoria).



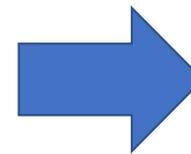
Modifiche del comportamento più accentuate di OBR

Sneddon et al. 2014, Defining and Assessing Animal Pain

Vertebrates	Mammalia	Aves	Amphibia/Reptilia	Agnatha/Osteichthyes	Cephalopoda	Decapods	Insecta
Nociceptors	√	√	√	√	√	√	√
Pathways to CNS	√	√	√	√	√	√	√
Central processing in brain	√	√	√	√	√	√	√
Receptors for analgesic drugs	√	√	√	√	√	√	? <sup>a</sup>
Physiological responses	√	√	√	√	√	√	?
Movement away from noxious stimuli	√	√	√	√	√	√	√
Behavioural changes from norm	√	√	√	√	√	√	√
Protective behaviour	√	√	√	√	√	√	No
Responses reduced by analgesic drugs	√	√	√	√	√	√	√ <sup>a</sup>
Self-administration of analgesia	√	√	?	√	?	?	?
Responses with high priority over other stimuli	√	√/? <sup>b</sup>	?	√	√	√	No
Pay cost to access analgesia	√	√	?	√	?	?	?
Altered behavioural choices/preferences	√	√	?	√	√	√	√
Relief learning	√	√	?	?	?	?	√
Rubbing, limping or guarding	√	√	?	√	√	√	?
Paying a cost to avoid stimulus	√	√	?	√	?	√	?
Trade-offs with other requirements	√	√	?	√	?	√	?

# Why fish do not feel pain - Brian Key 2016

- Poichè l'esperienza cosciente nel dolore negli umani dipende principalmente dalla corteccia e da strutture cerebrali evolutivamente recenti, è difficile sostenere che animali privi di questi organi possano provare le stesse cose che proviamo noi
- “la struttura determina la funzione”
- Il dolore ci frena dal compiere molte azioni, I pesci risentono meno di questo fenomeno



Cfr. L'errore di Cartesio (Damasio) su le operazioni di Lima, leucotomia modificata per dolore intrattabile

Altri autori rispondono che le stesse funzioni possono essere esercitate da strutture diverse

Corteccia cerebrale -> telencefalo

Strutture limbiche -> pallio laterale e medio

Sistemi di neurotrasmissione e neuroendocrine -> sistemi analoghi

Article | [Published: 11 March 2016](#)

## Contingency checking and self-directed behaviors in giant manta rays: Do elasmobranchs have self-awareness?

[Csilla Ari](#)  & [Dominic P. D'Agostino](#)

*Journal of Ethology* **34**, 167–174 (2016) | [Cite this article](#)

**4160** Accesses | **29** Citations | **186** Altmetric | [Metrics](#)

# Fisiologia del benessere

“Il welfare animale definisce come un animale affronta le condizioni in cui vive. Un animale è in buono stato di welfare (=benessere?) se (come indicato da evidenza scientifica) è in salute, a suo agio, ben nutrito, in sicurezza, nelle condizioni di esprimere il suo comportamento naturale, e non sta soffrendo per uno stato spiacevole dovuto a dolore, paura, e **stress** [...] proteggere il welfare di un animale significa provvedere ai suoi bisogni fisici e mentali”.

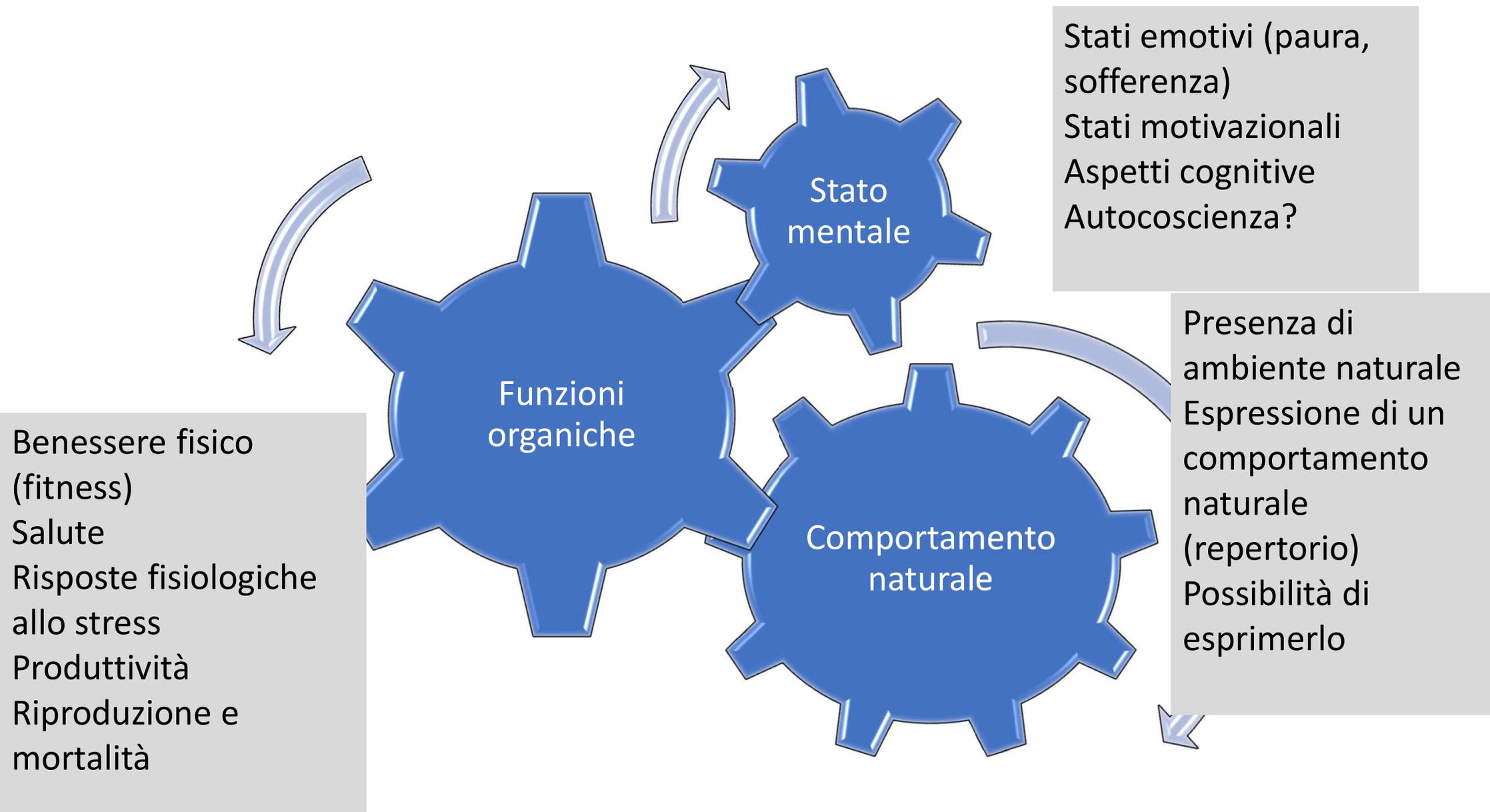


# Per una definizione “positiva” di welfare

Molto spesso si riferisce al benessere come un'assenza di malessere. In realtà, già dal 1965, si sottolineavano dei fattori “positivi” per definire il benessere, che non dipendono cioè dall'assenza di fattori di malessere. D'altra parte, è scientificamente più facile misurare un'assenza di uno stimolo negativo che uno stato psicologico positivo di un animale...

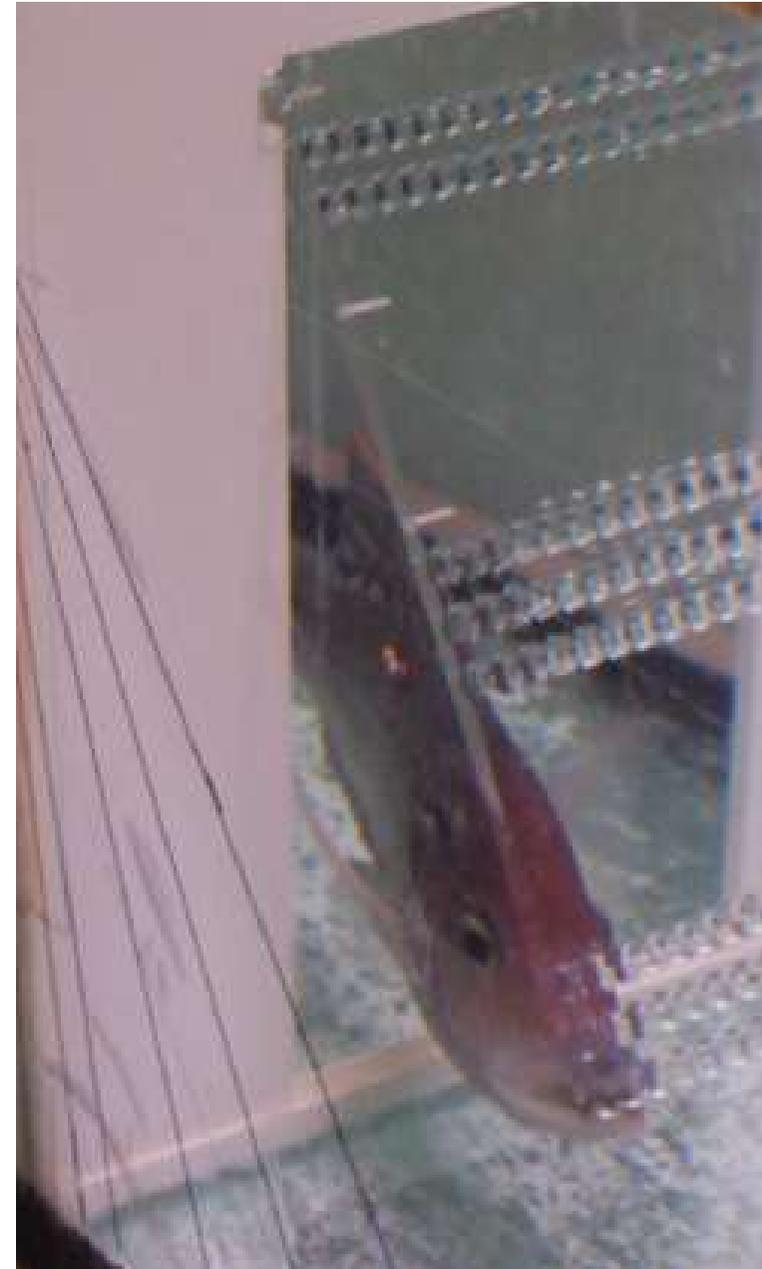
Brambell Report (1965)

1. Dalla sete, dalla fame e dalla cattiva nutrizione
2. Di avere un ambiente fisico adeguato
3. Dal dolore, dalle ferite, dalle malattie
4. Di manifestare le caratteristiche comportamentali specie-specifiche normali
5. Dalla paura e dal disagio

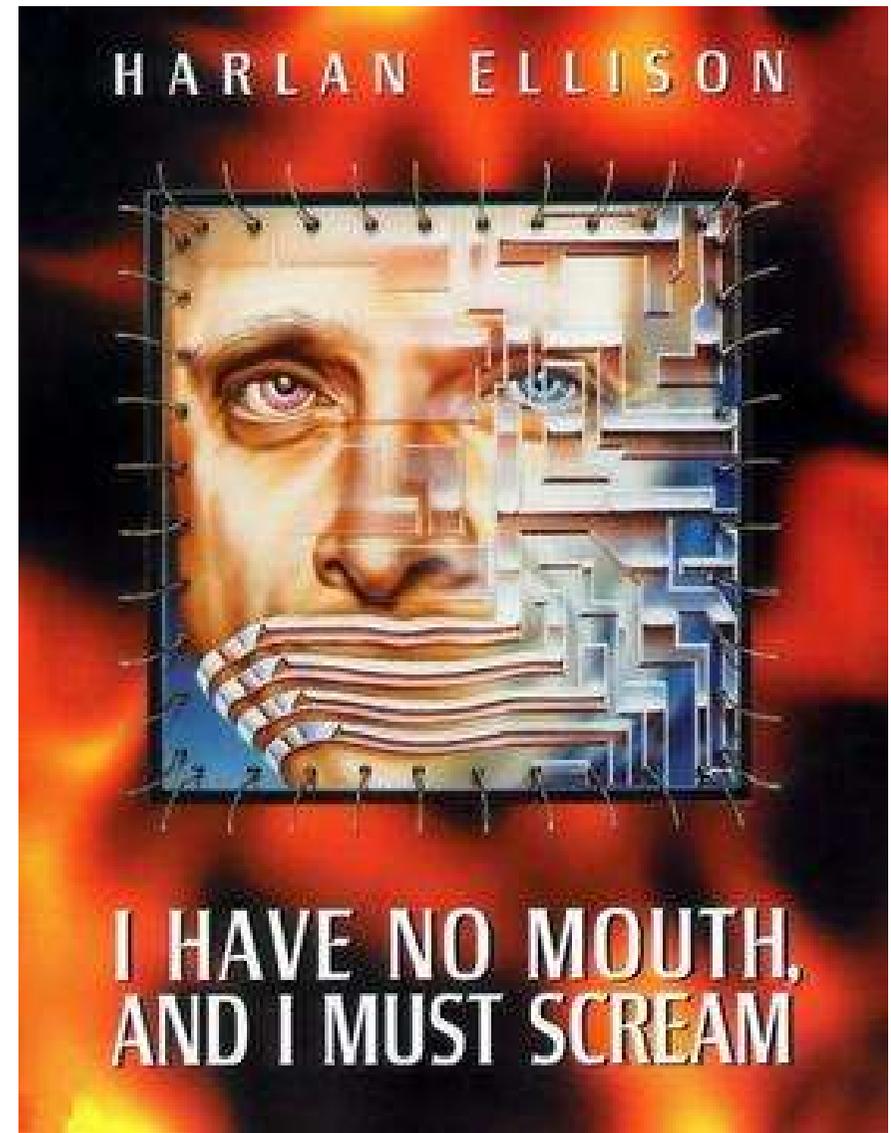


# Misurare la motivazione... di un ciclode (Galhardoa et al. 2011)

La tilapia del Mozambico dimostra di voler utilizzare tempo, attenzione ed energie per avere accesso a cibo, partner o semplicemente ad una porzione di vasca con arricchimento ambientale (substrato). Alcuni esemplari sono più pigri di altri...



Purtroppo per loro, i pesci non sono molto bravi a comunicare cosa provano  
**(O MEGLIO: noi umani non siamo molto bravi a capire lo stato psicologico dei pesci)**



# Alcune definizioni di stress

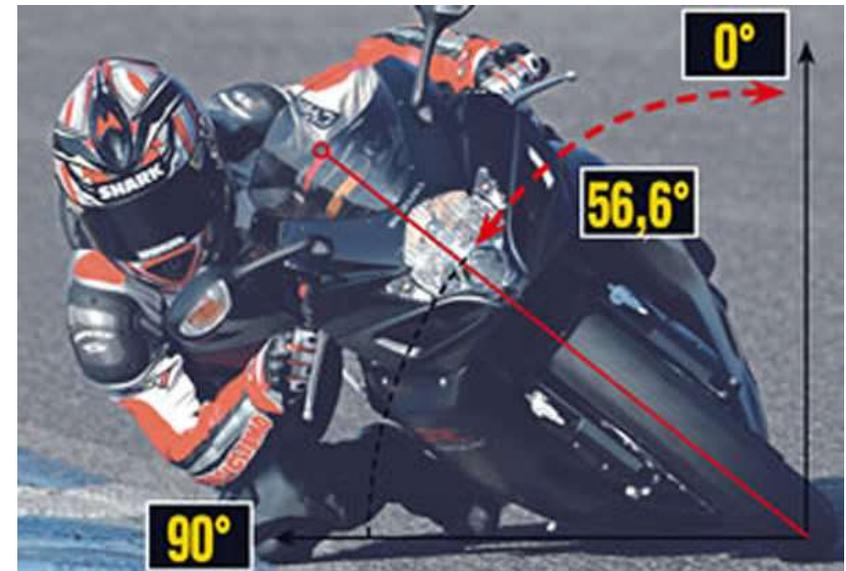
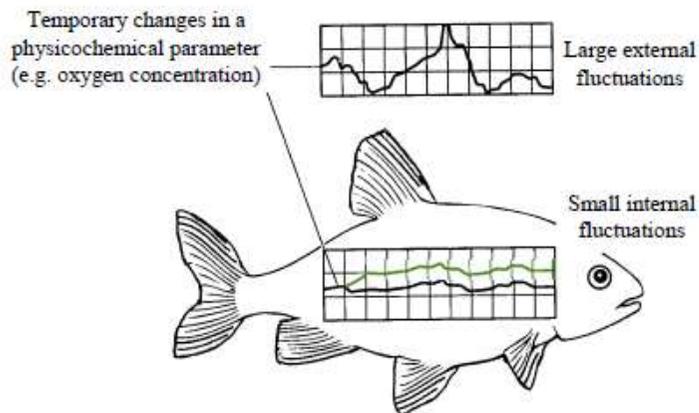
- La somma di tutte le risposte fisiologiche attraverso le quali un animale compie per provare a mantenere o ristabilire un normale metabolismo in risposta a forze chimiche o fisiche (1950)
- Uno stato di alterata omeostasi che viene ristabilita da un complesso repertorio di risposte adattative fisiologiche e comportamentali dall'organismo

-> **concetto di omeostasi**



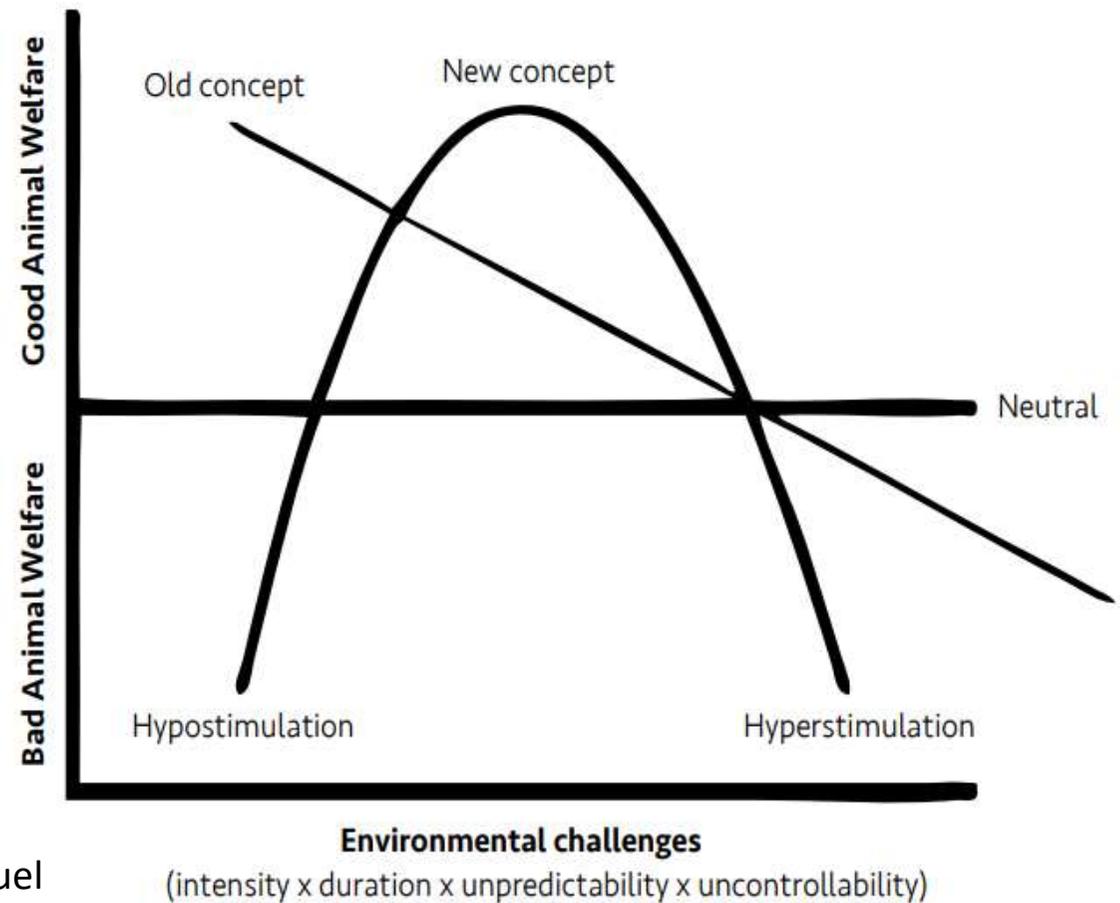
# Allostasi

L'allostasi è il processo di acquisire stabilità attraverso cambiamenti di natura fisiologica e comportamentale. È legato all'acclimatamento, l'insieme di modificazioni fisiologiche con cui un animale si adatta alle nuove condizioni ambientali



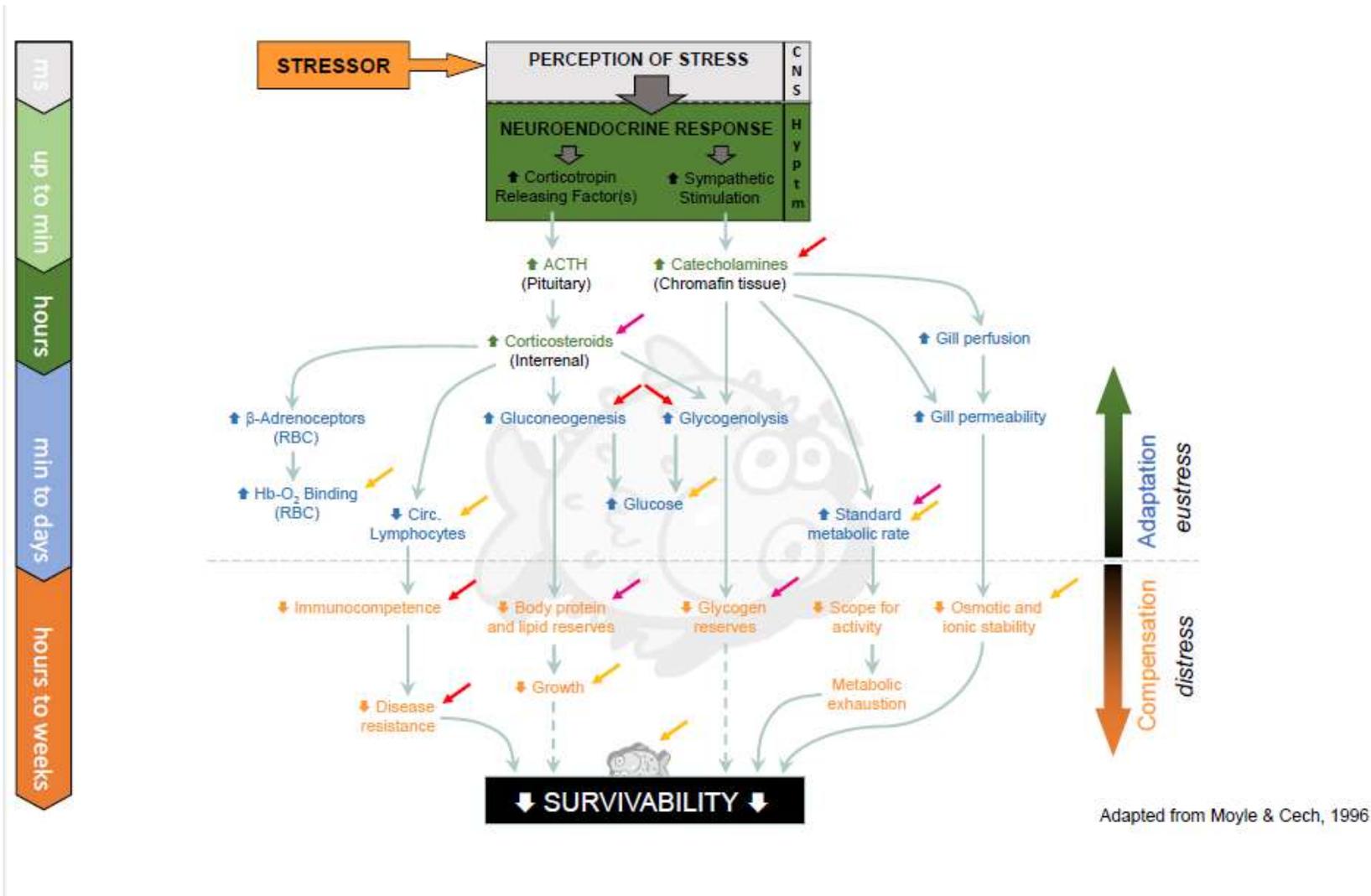
# Un nuovo paradigma di benessere

L'assenza di stimoli può ridurre il benessere di un animale quanto un eccesso di stimoli



Biology of welfare in fish, 2015, Remy Manuel

Anche nei pesci l'asse ipotalamo-ipofisario, mediato dal cortisolo come principale molecola è centrale nei fenomeni di adattamento



# Alla ricerca dei marcatori dello stress

	Biological matrix	Parameter
Lethal	Pituitary	Pituitary ACTH content
	Interrenal	Interrenal tissue volume
		Interrenal cell nuclear diameter
		Interrenal cell size
		Interrenal cell nuclear/cytoplasm ratio
		Interrenal RNA content
	Whole body	Whole body cortisol concentration
Tissue	Tissue cortisol concentration	
Lethal/non-lethal but invasive	Blood	Plasma ACTH content
		Plasma cortisol concentration
		Plasma cortisol secretion rate
		Plasma cortisol response to ACTH or stressor application
		Plasma cortisone concentration
Non-invasive	Bile	Glucuronated cortisol concentration
	Faeces	Glucuronated cortisol concentration
	Water	Free cortisol release rate
Free + sulphated + glucuronated cortisol release rate		

# Valori specie-specifici

Species	Stressor	Cortisol (nmol/l)	
		Prestress	Poststress
Arctic char	Handling	5	449
		<27	827
Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> )	Sea lice challenge	99	339
Atlantic salmon diploid	Confinement	27	151
Atlantic salmon triploid	Confinement	27	124
Brook trout ( <i>Salvelinus fontinalis</i> ) diploid	Handling + confinement	19	242
Brook trout triploid	Handling + confinement	2	146
Common carp ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Density	19	206
Pallid sturgeon ( <i>Scaphirhynchus albus</i> )	Confinement	5	16
Pallid sturgeon	Handling	5	8
Rainbow trout	Handling + anaesthetic	22	137
Rainbow trout	Confinement	49	110
Rainbow trout diploid	Handling + confinement	77	698
Rainbow trout	Trapping		
Male		16	380
Female	57	764	
Rainbow trout triploid	Handling + confinement	33	640
Red porgy ( <i>Pagrus pagrus</i> )	Background color (black) + crowding	11	171
Sablefish ( <i>Anoplopoma fimbria</i> )	Hooking	82	441
Sea bream ( <i>Sparus aurata</i> )	Crowding	13	358
Sea bream	Handling + anesthetic	5	55
Walleyes ( <i>Stizostedion vitreum</i> )	Capture + transport	33–135	380–480

Variabile secondo:

- Specie
- Momento della giornata (ciclo circadiano)
- Variabilità individuale e familiare
- Status sociale individuale
- Stato di crescita
- Differenze stagionali
- Risposta a stress cronico

Iwama, Afonso and Vijayan, 2006  
In The Physiology of Fishes, Eds Evans & Claiborne

# Cortisolo come indicatore: pro e contro

## **Vantaggi:**

- Aumenta velocemente dopo l'episodio stressorio
- Proporzionale all'intensità dello stress
- Facile da misurare
- Necessita piccoli campioni
- Metodologia simile tra le specie

## **Contro:**

- I livelli basali possono cambiare molto
- Può non riflettere lo stress cronico
- Stress molto forti possono portare a massima stimolazione ed esaurimento
- Può legarsi a proteine
- Il prelievo dei campioni può indurre stress

# Alternative

- Catecolamine
- Glucosio e acido lattico
- Combinazione di molecole
- Osmoliti ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )
- Ematocrito
- Heat shock proteins

Grazie per l'attenzione!

