



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO: SCIENZE BIOMEDICHE VETERINARIE E COMPARATE

CICLO XXII

**IL CORTISOLO COME INDICATORE DI STRESS IN SPECIE ITTICHE
D' INTERESSE COMMERCIALE.**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Massimo Morgante

Supervisore :Ch.mo Prof. Claudia Simontacchi

Dottorando : Daniela Bertotto

INDICE

Riassunto	1
Abstract	3
1. INTRODUZIONE GENERALE	
1.1. Fish welfare	5
1.2. Risposta allo stress nei pesci	9
1.3. Il cortisolo nei teleostei: biosintesi, meccanismi d'azione e funzioni	12
1.4. Lo stress in acquacoltura	23
2. SCOPO DELLA TESI	27
3. MATERIALI E METODI GENERALI	
3.1. L'ANALISI RADIOIMMUNOLOGICA (RIA)	29
3.2. Il RIA su micro piastra	31
3.2.1. Fasi di lavoro	32
3.2.2. I dosaggi ormonali	32
3.2.2.1. Estrazione degli steroidi	32
3.2.2.2. Estrazione del cortisolo dal plasma	32
3.2.2.3. Estrazione del cortisolo dal tessuto muscolare	33
3.2.2.4. Estrazione del cortisolo dalle pinne e dal contenuto intestinale	34
3.2.2.5. Estrazione del cortisolo dalla pinna e dal contenuto intestinale	34
3.2.2.6. Dosaggio del cortisolo nel muco	34
3.2.2.7. Estrazione del cortisolo dalle larve <i>in toto</i>	34
3.2.3. Preparazione della piastra	
3.2.3.1. Adsorbimento dell'anticorpo anti-IgG di coniglio	34
3.2.3.2. Incubazione con l'anticorpo specifico	35
3.2.3.3. Incubazione con i campioni e gli standards	35
3.2.3.4. Separazione libero-legato	36
3.2.3.5. Conteggio della radioattività	37
3.2.3.6. Elaborazione dei dati	37

3.2.3.7.	Allestimento della curva di taratura e dei controlli	37
3.2.4.	Validazione del metodo di dosaggio	38
3.2.4.1.	Il test di parallelismo	38
3.2.4.2.	Il test di ripetibilità	39
3.2.4.3.	Validazione del dosaggio nelle diverse matrici	39
3.3.	LE SPECIE	
3.3.1.	La trota iridea - <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum, 1792)	41
3.3.2.	La spigola- <i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus, 1758)	43
4.	LE SPERIMENTAZIONI	
4.1.	BENESSERE DELLA TROTA (<i>ONCORYNCHUS MYKISS</i>) IN RELAZIONE ALLA DIETA E ALLE MODALITÀ DI MACELLAZIONE	
4.1.1.	Introduzione	47
4.1.2.	Materiali e metodi	49
4.1.3.	Analisi dei dati	52
4.1.4.	Risultati e discussione	53
4.2.	BENESSERE DELLA SPIGOLA (<i>DICENTRARCHUS LABRAX</i>) IN RELAZIONE ALLE CONDIZIONI DI DENSITÀ DI STOCCAGGIO E DEI LIVELLI DI OSSIGENO DISCIOLTO NELLE FASI DI PRE- MACELLAZIONE	
4.2.1.	Introduzione	59
4.2.2.	Materiali e metodi	60
4.2.3.	Analisi dei dati	61
4.2.4.	Risultati e discussione	62
4.3.	VALUTAZIONE DEI TEMPI DI DIFFUSIONE DEL CORTISOLO IN VARIE MATRICI DI SPIGOLA	
4.3.1.	Introduzione	68
4.3.2.	Materiali e metodi	70
4.3.3.	Analisi dei dati	70

4.3.4. Risultati e discussione	71
4.4. ONTOGENESI DELLA RISPOSTA ALLO STRESS NELLA SPIGOLA	
4.4.1. Introduzione	74
4.4.2. Materiali e metodi	75
4.4.3. Analisi dei dati	77
4.4.4. Risultati e discussione	78
5. CONCLUSIONI	83
6. BIBLIOGRAFIA	85

RIASSUNTO

Il benessere dei pesci o “ fish welfare” sta riscuotendo negli ultimi anni sempre maggiore interesse nell’ opinione pubblica e di conseguenza nel mondo della ricerca, dell’ industria e dei governi. In allevamento, i pesci sono sottoposti molto spesso a condizioni stressanti (manipolazione, selezione, densità, trasporto, condizioni di pre-macellazione e tecniche di macellazione), condizioni alle quali non possono sottrarsi dato il confinamento. La risposta allo stress nei pesci è analoga a quella dei cosiddetti vertebrati superiori e, se lo stress si prolunga nel tempo, determina crescita ridotta, immunosoppressione e deficit riproduttivi. Gli stressori in acquacoltura sono in molti casi inevitabili ma la riduzione dello stress e dei suoi deleteri effetti è fondamentale sia per il welfare che per la produttività. Nel presente studio, si è utilizzato il cortisolo per identificare pratiche più idonee al benessere di due specie d’ interesse commerciale: la trota iridea e la spigola. In particolare, si sono valutati gli effetti di diete con percentuali diverse di farina proteica vegetale e di diversi metodi di macellazione sullo stress nella trota e di condizioni diverse di densità di stoccaggio e ossigeno disciolto durante le fasi di pre-macellazione nella spigola. Date le problematiche legate al dosaggio del cortisolo nel plasma e alle modalità di prelievo, negli animali adulti lo steroide è stato valutato anche in altre matrici quali muco, muscolo, pinna e contenuto intestinale. I risultati ottenuti dalle sperimentazioni hanno suggerito tempi di diffusione diversi dello steroide nelle diverse matrici e pertanto si è condotta una verifica di questa ipotesi sottoponendo spigole ad uno stress di esposizione all’ aria. Infine, data la fragilità delle prime fasi di sviluppo e l’ effetto deleterio del cortisolo, si è

valutata la risposta allo stress termico in larve di spigola nei primi quindici giorni di vita. La sperimentazione sulla trota ha messo in evidenza che, in questa specie, le diete testate sono ininfluenti sulla risposta allo stress e che, alla macellazione, l' elettrostordimento è da preferire all' asfissia all' aria. Per quanto riguarda la spigola si è visto che le condizioni di densità di stoccaggio e di ossigeno disciolto testate sembrano ininfluenti sulla concentrazione di cortisolo rispetto alle pratiche di pesca e trasferimento che le fasi di pre-macellazione comportano e quindi è soprattutto questa fase che va pianificata con cura per ridurre il lo stress agli animali. Lo studio dell' ontogenesi della risposta allo stress nella stessa specie ha evidenziato una precoce capacità di secrezione endogena del cortisolo che impone agli allevatori una attenta cura a partire dalle primissime fasi di vita della spigola. La valutazione del cortisolo in matrici diverse dal plasma si è rivelata, nella maggior parte dei casi, uno strumento utile per monitorare lo stato di stress oltre che in pesci macellati, in cui il prelievo di sangue non è possibile, anche in animali ai quali non sia possibile ridurre lo stress prodotto dalle pratiche di pesca e manipolazione.

ABSTRACT

During the last years, fish welfare interest is increasing in the public opinion and, consequently, in scientists, industry and governments. Reared fishes are often exposed to stress conditions, due to practices such as manipulation, grading, high stocking densities, transport, pre-slaughter conditions and slaughter methods.

The stress response in fishes is similar to that of the other vertebrate and, if stress conditions are prolonged, it causes lowered grow rate, immunosuppression and reproductive failure. In aquaculture, stressors are often unavoidable despite the stress control is essential for welfare and productivity.

In this study, cortisol was used to identify the more appropriate practices to improve welfare in two very important farmed species: rainbow trout and European sea bass. Diets with different vegetable protein meal levels and different slaughter methods were evaluated in trout. In sea bass, the study focused on pre-slaughter conditions with different dissolved oxygen concentrations and stocking densities. Due to the difficulties related to blood sampling, cortisol was evaluated also in other matrices such as mucus, muscle, fin and intestinal content. The timing of cortisol diffusion into the various matrices was also evaluated in sea bass exposed to air exposure stress.

The stress response was lastly investigated in the very early stages of sea bass development (zero-fifteen days post hatching). In summary, the electrical stunning is preferable as regard trout welfare and a diet in which fish meal is

replaced by plant proteins could not influence the stress response to slaughter in this species.

In sea bass, stocking densities and dissolved oxygen level seemed to be less effective on cortisol level than the fishing and transport procedures during the pre-slaughter practices. So, an accurate planning of this phase is important to reduce stress of the fishes at slaughter. The cortisol levels in the matrices different from plasma, in most cases, were effective in detecting the stress status of fish.

Lastly, the study on sea bass larvae evidenced a precocity in the stress response ontogenesis which impose very soon accuracy in aquaculture management.

1. INTRODUZIONE GENERALE

1.1. Fish welfare

Il benessere dei pesci o “ fish welfare” sta riscuotendo negli ultimi anni sempre maggiore interesse nell’ opinione pubblica e di conseguenza nel mondo della ricerca, dell’ industria e dei governi. La tematica è alquanto dibattuta soprattutto per il fatto che ancora non si è giunti ad una definizione comune di benessere animale perché il concetto è complesso e la parola viene usata in molti modi diversi (Dawkins, 1998; Appleby, 1999). L’ impossibilità dell’ uomo di comunicare direttamente con gli animali e l’ incertezza esistente sulle loro effettive capacità cognitive, soprattutto quando si parla di pesci, rendono difficile definire quali sono le condizioni necessarie a far sì che questi siano o meno in un effettivo stato di benessere. I pesci, inoltre, presentano ulteriori difficoltà dovuti alla loro grande varietà di specie e relativi adattamenti ai vari ambienti.

Molte sono le review che hanno affrontato questo argomento (Broom 2001, Désiré *et al.* 2002, Rose 2002, Chandroo *et al.* 2004, Conte 2004, Duncan 2006, Huntingford *et al.* 2006) e da queste scaturiscono tre ampie categorie in cui le varie definizioni possono essere raggruppate (Huntingford *et al.*, 2006). Nella prima, le “ *feelings-based definitions*” , i requisiti necessari per il benessere prevedono che l’ animale si senta bene, sia libero da esperienze negative come la paura ed il dolore e che abbia accesso ad esperienze positive come la compagnia di conspecifici nel caso delle specie sociali. Questa definizione di welfare risulta essere la più discussa perché implica il fatto che

l'animale abbia esperienze cosce soggettive e che l'uomo sia in grado di interpretarle.

Nella seconda categoria, le “ *function-based definitions*” , il benessere è legato alla capacità dell'animale di adattarsi all'ambiente e richiede che l'animale sia in buona salute, sia in grado di fronteggiare le perturbazioni dell'omeostasi e che non sia costretto a rispondere a queste oltre la sua capacità. Infine, la terza categoria, le “ *nature-based definitions*” , deriva dalla visione che ciascuna specie animale ha una sua natura che deve poter essere espressa quindi l'animale deve essere in grado di condurre una vita naturale in cui è libero di esprimere il suo naturale comportamento (Huntingford *et al.*, 2006). La definizione di benessere è importante perché determina le modalità con cui questo può essere misurato (Huntingford e Kadri, 2009). La prima categoria, fra le tre, è quella che rappresenta maggiormente l'idea dell'opinione pubblica. Duncan (2002) intervistando alcuni studenti sulla definizione di welfare riscontrò che la maggior parte di questi associava questo termine ad aggettivi come ammalato, sofferente, impaurito, frustrato o annoiato. Quindi quando la gente si riferisce al benessere degli animali è soprattutto dell'esperienza consapevole della sofferenza che si preoccupa maggiormente (Dawkins 1998). Alcuni autori ritengono che, se non fosse per la componente psicologica, il benessere degli animali non importerebbe (Cottee, 2010). Nei pesci, in realtà, la capacità di sperimentare stati mentali soggettivi come il dolore o la paura è ancora un punto poco chiaro e in via di discussione. Ci sono infatti due scuole di pensiero: una ritiene che l'approccio al benessere basato

sui sentimenti non sia applicabile ai pesci perché mancano delle strutture neuro-anatomiche che nell' uomo sono associate agli stati mentali soggettivi (soprattutto neo corteccia; Rose, 2002) e l' altra che attribuisce ai pesci capacità mentali perché ritiene possiedano i sistemi neurologici e fisiologici che gli consentono di soffrire delle esperienze negative (Chandoo *et al.* 2004a, b). Nonostante la struttura cerebrale meno complessa rispetto a quella dell' uomo (dimensioni ridotte, assenza di neocorteccia), a favore della teoria che i pesci sono in grado di sperimentare in modo consapevole la sofferenza c' è il fatto che essi mostrano comportamenti complessi lontani dall' essere stereotipati; studi recenti, inoltre, hanno messo in evidenza che questi animali sono in grado di percepire gli stimoli dolorosi (noicicezione) e di rispondere a questi con cambiamenti fisiologici e comportamentali che lasciano supporre una consapevolezza del dolore avvertito (Huntingford *et al.*, 2006; Sneddon, 2002; Sneddon *et al.*, 2003). Alcune specie, per esempio, sono in grado di costruire rappresentazioni mentali dell' ambiente e di usarle per orientarsi (Reese, 1989; Rodriguez *et al.*, 1994). Altre che vivono in gruppi sono in grado di riconoscere i compagni (Swaney *et al.*, 2001). Altre ancora si sono dimostrate in grado di ricordare le esperienze negative come il pesce paradiso, per esempio, che ha mostrato di evitare il posto dove aveva subito l' attacco di un predatore, manifestando il comportamento per molti mesi (Czanyi e Doka, 1993), e la carpa, che ha mostrato lo stesso comportamento con l' esca, dopo essere stata presa all' amo e rilasciata (Beukema, 1970). Molte specie poi sono in grado di apprendere relazioni spaziali complesse e di formare mappe mentali

utilizzando una parte del telencefalo omologa a quella responsabile della memoria spaziale in uccelli e mammiferi (Broglia *et al.*, 2003). Ancora molte specie si sono dimostrate capaci di imparare e di integrare più informazioni, capacità questa che richiede processi più complessi dell' apprendimento associativo (Braithwaite, 2006; Sovrano e Bisazza, 2003). Huntingford e colleghi (2006) nella sua ampia review sull' argomento conclude che in animali capaci di processi cognitivi e comportamentali così complessi l' esperienza della sofferenza potrebbe essere possibile. Analogamente, molti autori, alla luce di queste evidenze, concludono che a questi animali va comunque lasciato il beneficio del dubbio e quindi che gli animali che sono sotto la nostra influenza o cura devono essere trattati con rispetto minimizzando tutte quelle pratiche che possono in qualche modo minare il loro benessere (Evans, 2009; Volpato, 2009; Iwama, 2007).

Il pesce, in comune con tutti gli altri vertebrati, risponde ai cambiamenti ambientali con una serie di aggiustamenti neuro-endocrini adattativi che sono nel complesso definiti *risposta allo stress*. Questi inducono a loro volta cambiamenti metabolici e comportamentali che consentono al pesce di far fronte all' evento stressante e che, almeno nel breve termine, sono fondamentali per la sopravvivenza dell' animale. Al contrario l' attivazione prolungata della risposta allo stress è dannosa e porta a immunosoppressione, riduzione della crescita e disfunzioni riproduttive. L' esposizione dei pesci a condizioni stressanti, soprattutto in modo continuato, durante le attività

antropiche come la pesca e l'acquacoltura non è eticamente accettabile ed inoltre determina, nel tempo, una riduzione della produttività.

Gli indicatori associati alla risposta allo stress cronico (fisiologici, malattia e comportamento) forniscono una potenziale fonte di informazioni sullo stato di benessere del pesce e sono importanti perché consentono la messa a punto di protocolli che riducano lo stress. La più realistica valutazione dello stato di benessere si ottiene tuttavia attraverso una serie di misure informative combinate insieme mediante un approccio statistico appropriato. E' su queste basi che va affrontata la questione del benessere delle specie allevate.

1.2. La risposta allo stress nei pesci

Un' ampia gamma di stimoli mette alla prova il pesce sia in cattività che in natura. Qualsiasi sia lo stimolo (una minaccia per la sopravvivenza dell' individuo, un nuovo evento o una fonte di malessere) questo viene definito stressore e richiede una risposta dell' animale. Normalmente questa risposta, definita *risposta allo stress*, è essenziale per la sopravvivenza dell' organismo ed è l' essenza dell' adattamento ad un nuovo ambiente.

Fu Claude Bernard, che per primo, nel 1859, introdusse il concetto di ambiente interno che deve essere mantenuto armonioso anche in risposta a stimoli esterni. Successivamente, Walter Cannon sviluppò il concetto di omeostasi, una condizione relativamente stabile attraverso la quale il corpo mantiene il suo equilibrio interno. Il corpo, minacciato da qualsiasi stimolo ambientale, incluso quelli di natura emotiva, si prepara all' azione attraverso l' attivazione del sistema nervoso simpatico (Levine, 2005). Questa preparazione alla cosiddetta

risposta “ combatti o fuggi” (fight or flight) mobilita le energie necessarie per ripristinare l’ omeostasi minacciata o persa. L’ idea di Cannon, proposta nella prima metà del ventesimo secolo, ha dato il maggior contributo alla comprensione dei meccanismi omeostatici e di stress (Galhardo e Oliveira, 2009).

Nel 1956, Hans Selye descrisse il suo concetto di stress fisiologico e la cosiddetta GAS (General Adaptation Syndrome) ovvero la sindrome di adattamento generale (Levine, 2005). Questa consiste in tre stadi: il primo stadio di “ allarme” in cui il corpo mobilita i suoi meccanismi di difesa, il secondo definito “ di resistenza” ed infine “ l’ esaurimento” che si ha quando le energie si sono esaurite e potenzialmente per l’ animale può sopraggiungere la morte. Più recentemente il concetto di omeostasi si è evoluto in quella che viene definita “ omeostasi plus” ovvero l’ allostasi (Sapolsky, 2004). Questo concetto, che significa stabilità attraverso il cambiamento, introduce una visione più dinamica e flessibile dell’ equilibrio interno (McEwen, 1998). A seconda del diverso momento del ciclo vitale l’ equilibrio interno si modifica per assecondare le diverse necessità. I mezzi attraverso i quali l’ animale si misura con tutti gli stimoli ambientali richiedono una serie di processi fisiologici e comportamentali coordinati dal cervello. Questi possono essere diversi in base alla natura dei cambiamenti imposti ed hanno un costo biologico. Animali in sovraccarico allostatico sono considerati in condizioni patologiche e questa condizione si ha quando lo stress diventa male adattativo e diventa una preoccupazione in termini di welfare (Galhardo e Oliveira, 2009).

In riferimento alle specie ittiche, ma estendibile anche agli altri vertebrati, per “ stress” si intende la condizione in cui l’ equilibrio dinamico di un organismo animale, chiamato omeostasi, viene minacciato o disturbato dall’ azione di stimoli interni od esterni definiti comunemente agenti stressanti (Wendelaar Bonga, 1997; Colombo *et al.*, 1990).

Le risposte fisiologiche e comportamentali allo stress sono ben studiate in molte specie di teleostei e presentano analogie strette con quelle degli altri vertebrati (Barton, 1997; Sumpter, 1997; Wendelaar Bonga, 1997; Iwama, 2007).

La risposta allo stress prevede 3 stadi (Barton, 2002;). La risposta primaria coinvolge l’ attivazione di due assi neuroendocrini. L’ asse ipotalamo-simpatico-cromaffine produce catecolamine (adrenalina e noradrenalina) dalle cellule cromaffini che rappresentano l’ equivalente della midollare surrenale dei tetrapodi. Il secondo asse, l’ ipotalamo-ipofisi-interrenale (HPI) produce i corticosteroidi (principalmente cortisolo nei teleostei) dal tessuto interrenale che è l’ equivalente della corticale surrenale dei tetrapodi. La risposta simpato-adenergica attiva le funzioni cardiovascolare e respiratoria e è coinvolta nella mobilitazione delle riserve energetiche necessarie per l’ aumentata richiesta metabolica (Sumpter, 1997). Come negli altri vertebrati, l’ asse HPI è legato al metabolismo energetico ed idrosalino (Mommssen *et al.*, 1999).

La risposta secondaria rappresenta un aggiustamento fisiologico alle condizioni di stress. Include l’ attivazione di un certo numero di vie metaboliche che inducono un ampia gamma di cambiamenti a livello di chimica del sangue e di ematologia, di respirazione, di equilibrio salino a livello branchiale, di risposta

cellulare e di funzione immunitaria (McDonald e Milligan, 1997; Barton, 2002; Iwama, 2007). Enzimi e prodotti metabolici, la funzione del sistema immunitario, il glucosio plasmatico e le heat shock proteins (HSPs) vengono usate per misurare questa risposta (Broom e Johnson, 1993; Mommsen *et al.*, 1999; Iwama, 2007).

La risposta terziaria ha a che fare con l' esposizione cronica allo stress e comprende cambiamenti nell' intero organismo, anche di tipo comportamentale, ed eventualmente sulla popolazione (Iwama, 2007). Lo stress ha un effetto inibitorio sulla crescita, dovuto ai suoi effetti metabolici e all' interferenza con i percorsi endocrini ad essa legati, e sulla riproduzione (Pankhurst & Van Der Kraak, 1997). Anche la resistenza alle malattie può essere profondamente influenzata e condurre ad una immunosoppressione aumentando drammaticamente l' incidenza di malattie e i tassi di mortalità (Broom & Johnson, 1993; McDonald & Milligan, 1997).

1.2. Il cortisolo nei teleostei: biosintesi, meccanismi d' azione e funzioni

Il cortisolo, o idrocortisone, è il principale glucocorticoide circolante nei Teleostei. Si tratta di un ormone liposolubile la cui produzione avviene ad opera delle cellule steroidogeniche interrenaliche, che sono localizzate nella regione anteriore del rene (rene cefalico) principalmente lungo le vene cardinali posteriori e le loro branche (Mommsen *et al.*, 1999). La biosintesi del cortisolo avviene ad opera di vari enzimi, che agiscono in diversi compartimenti cellulari. Nei mitocondri si ha la conversione del colesterolo a pregnenolone, grazie al

distacco della catena laterale ad opera del citocromo P450_{scc} (side-chain cleavage); il pregnenolone poi passa nel reticolo endoplasmatico liscio, dove viene convertito dapprima a 17-idrossipregnenolone per azione del citocromo P450_{c17}, poi a 17-idrossiprogesterone grazie alla 3 β HSD (3 β -idrossisteroide deidrogenasi), e successivamente a 11-desossicortisolo ad opera del citocromo P450_{c21}. Infine, l' 11-desossicortisolo passa nuovamente nei mitocondri, dove è trasformato in cortisolo grazie all' azione del citocromo P450_{c11}, che media l' idrossilazione in posizione 11 β (Hanukoglu, 1992).

Da uno studio condotto da Stocco e Clark (1996), sembra che il principale fattore limitante la steroidogenesi sia il trasporto del colesterolo sulla membrana interna dei mitocondri, dove avviene la prima di queste reazioni.

A causa della sua natura liposolubile, il cortisolo non può essere accumulato all' interno delle cellule che lo producono, perciò passa nel circolo sanguigno, grazie al quale raggiunge i tessuti bersaglio sui quali esplica la propria azione (Hanukoglu, 1992).

Il rilascio del cortisolo è sotto il controllo dell' asse ipotalamo-ipofisi-interrenale (HPI) (Donaldson, 1981). L' ACTH è il maggiore fattore corticotropo ipofisario e la sua secrezione è regolata da molti fattori, tra cui gli ormoni, lo stress ed il feedback negativo del cortisolo a livello ipotalamico ed ipofisario (Mommsen *et al.*, 1999). L' ACTH può anche stimolare il rilascio delle catecolamine e l' aumento cronico del cortisolo può influire sul loro deposito e secrezione nella trota. Dato che sia il tessuto interrenale che quello cromaffine, dal quale sono secrete le catecolamine, sono localizzati

nella parte anteriore del rene, è ipotizzabile che nel pesce esista un controllo paracrino della regolazione degli ormoni dello stress (Reid *et al.*, 1996). Nei teleostei l' ACTH esogeno è stato impiegato per valutare la funzionalità del tessuto interrenale sia *in vivo* che *in vitro* (Brodeur *et al.*, 1997; Hontela, 1998) ed è stato dimostrato che questo tessuto nel pesce stressato è meno sensibile alla stimolazione *in vitro* rispetto a quello derivato da animale non stressato (Mommsen *et al.*, 1999).

Anche se l' ACTH è il principale ormone stimolante il rilascio del cortisolo, numerosi altri ormoni possono influenzare la produzione dello steroide nel tessuto interrenale. Alcuni di questi agiscono indirettamente, altri sono in grado di modulare la steroidogenesi indotta dall' ACTH (Mommsen *et al.*, 1999). Fra questi ricordiamo soprattutto il CRH (Corticotropin Releasing Hormone) ma anche l' AVT (Arginine vasotocin), fattori prodotti a livello ipotalamico che stimolano la secrezione dell' ormone adrenocorticotropo, l' angiotensina II che agisce sinergicamente con l' ACTH, le urotensine I e II e alcuni steroidi gonadici (Decourt e Lahlou, 1987; Arnold-Reed e Balment, 1991;1994; Pottinger *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1996; Wendelaar Bonga, 1997).

I corticosteroidi, essendo molecole idrofobiche, viaggiano legati a particolari glicoproteine plasmatiche (Mommsen *et al.*, 1999). Nei mammiferi si tratta di specifiche globuline, le CBG (Corticosteroid Binding Globulin), che sono in grado di regolare la distribuzione plasmatica e la biodisponibilità dell' ormone nel sito d' azione (Mommsen *et al.*, 1999). Solamente il

cortisolo libero è infatti biologicamente attivo e, nei mammiferi, questa quota si limita al 5-10% del totale (Fleshner *et al.*, 1995). Piccole variazioni nella concentrazione delle CBG portano a variazioni significative dei livelli di cortisolo attivo e questo fenomeno è evidente in caso di stress cronico (Fleshner *et al.*, 1995) o infiammazione (Hammond, 1995; Garrel, 1996). Nei pesci non è ancora stata confermata la presenza di queste molecole e va ancora chiarito il ruolo delle altre proteine plasmatiche nel trasporto del cortisolo. Data l' assenza di queste proteine, la clearance metabolica del cortisolo nei pesci è molto probabilmente legata ad altri sistemi ed è essenzialmente mantenuta dalla captazione ad opera dei tessuti bersaglio e dal catabolismo (Mommsen *et al.*, 1999). La clearance di questo steroide può essere alterata da molti fattori ambientali quali lo stress, la salinità, lo stadio di sviluppo, lo stato nutrizionale dell' animale e i contaminanti ambientali (Mommsen *et al.*, 1999).

Il fegato è l' organo preposto all' eliminazione del cortisolo attraverso il sistema epato-biliare (Idler e Truscott, 1972; Redding *et al.*, 1984; Vijayan e Leatherland, 1990; Vijayan e Moon, 1994; Wilson *et al.*, 1998) seguono le branchie e il rene (Idler e Truscott, 1972; Cravedi *et al.*, 1993). Gli enzimi chiave nel metabolismo steroideo sono le citocromo P450 (Mommsen *et al.*, 1999).

Il cortisolo, data la sua natura lipofila, potrebbe entrare nelle cellule mediante diffusione passiva. Tuttavia ci sono evidenze che esistano proteine di trasporto (carrier) a bassa affinità nella membrana cellulare e che queste,

presentando un certo grado di saturazione, siano in grado di regolare l' assorbimento dello steroide (Porthé-Nibelle e Lahlou, 1981; Vijayan *et al.*, 1997).

I corticosteroidi agiscono come fattori di trascrizione legandosi a specifiche sequenze del DNA (Mommsen *et al.*, 1999). Per svolgere questa funzione devono legarsi a specifici recettori (CRs), che rendono i vari organi bersaglio per l' ormone, e che nel caso degli steroidi sono localizzati, almeno in teoria, nel citosol e a livello nucleare. I mammiferi possiedono due CR citosolici: un recettore per i glucocorticoidi (GR tipo II) e un recettore per i mineralcorticoidi (MR tipo I). Classicamente, MR ha affinità per il mineralcorticoide aldosterone. Nei pesci, a causa della mancanza di quantità significative di questo ormone, si è a lungo pensato che fosse presente un solo tipo di recettore con entrambe le funzioni, denominato GR (Ducouret *et al.*, 1995). Questo recettore è stato identificato in molti tessuti fra i quali il fegato, il rene, le branchie, l' intestino, il muscolo scheletrico e il cervello nonché nelle cellule del sangue (eritrociti e leucociti) di diverse specie (Mommsen *et al.*, 1999). Tuttavia, studi recenti hanno identificato recettori del tipo MR nella carpa (Prunet *et al.*, 2006; Stolte *et al.*, 2008). Entrambi i tipi di recettori, GR ed MR, hanno mostrato affinità simili per il cortisolo e l' espressione del loro messaggero è stata riscontrata a livello di prosencefalo e in tutte le componenti neuroendocrine dell' asse HPI, con un pattern molto simile a quello descritto per gli altri vertebrati (De Kloet *et al.*, 2005; Stolte *et al.*, 2008). Nei mammiferi, la presenza dei recettori GR ed MR a livello di

corteccia prefrontale e delle aree limbiche (amigdala e ippocampo) suggerisce che la regolazione della risposta allo stress non inizi sempre a livello di ipotalamo e di tronco encefalico. Piuttosto, quando sono presenti input sensoriali e la necessità di una loro interpretazione, la risposta allo stress inizia a livello di corteccia prefrontale, amigdala e ippocampo (De Kloet *et al.*, 2005).

Quando il cortisolo si lega al GR, il recettore cambia conformazione e questo cambiamento porta il complesso ligando-recettore nel nucleo, dove si lega al DNA. Nei pesci ci sono evidenze che esista un complesso GR-HSP (Heat Shock Protein) (Mommsen *et al.*, 1999) e che il complesso HSP sia essenziale per il trasporto ligando-recettore-HSPs a livello nucleare (Pratt, 1993).

La risposta tissutale ai corticosteroidi dipende dal tipo e dal numero di recettori presenti ed è influenzata sia dalla up- che dalla down-regulation recettoriale.

Oltre all' azione genomica, esistono evidenze che suggeriscono che gli ormoni steroidei esercitino effetti non genomici. Per i mammiferi l' argomento è stato rivisto da Wehling (1997) e la lista di ormoni e dei tessuti coinvolti è estesa. L' effetto non genomico degli ormoni è rapido (da secondi a pochi minuti). Per esempio, l' azione del dexametasone, un corticosteroide di sintesi, sul metabolismo del glicogeno raggiunge il suo picco massimo dopo 5-15 minuti dall' esposizione (Baqué *et al.*, 1996). Simili fenomeni di azione rapida sono stati descritti anche nei pesci. In tilapia,

per esempio, il rilascio della prolattina determinato da un mezzo iposmotico viene bloccato in maniera significativa dalla somministrazione di cortisolo in 20 minuti (Borski *et al.*, 1991).

Per quanto riguarda le azioni del cortisolo nei pesci, molto spesso in letteratura si trovano dati discordanti determinati dalle differenze fra le specie o, all' interno della stessa specie, dal momento del ciclo vitale monitorato o ancora dalle modalità sperimentali di esposizione all' ormone. Si riconoscono tuttavia, fra gli altri, effetti sul metabolismo di carboidrati, proteine e lipidi.

Nei mammiferi, i glucocorticoidi regolano il metabolismo epatico stimolando la gluconeogenesi e aumentando la riserva di glicogeno negli epatociti (Goldstein *et al.*, 1992,1993).

Nei pesci, la maggior parte degli studi sul metabolismo dei carboidrati è stata condotta sull' effetto del cortisolo sul glucosio plasmatico e sul glicogeno epatico e i risultati ottenuti, come premesso, si sono rivelati non comparabili e/o discordanti per differenze di specie, di stadio di sviluppo e di stato metabolico dell' animale. Infatti, l' esposizione a livelli crescenti di cortisolo ha prodotto un aumento, una diminuzione oppure ha lasciato inalterati i livelli di glicemia e glicogeno epatico, nelle stesse oppure in specie diverse. Questi risultati hanno generato una certa confusione sul ruolo del cortisolo sul metabolismo dei carboidrati.

Nei pesci, è opinione comune che il cortisolo stimoli la gluconeogenesi anche in presenza di livelli invariati o addirittura più bassi di glucosio plasmatico.

Questa conclusione è basata sull' osservazione che il trattamento con cortisolo aumenta l' attività degli enzimi gluconeogenici chiave (Mommsen *et al.*, 1999).

Il cortisolo sembra avere un ruolo importante anche nella regolazione del glicogeno a livello muscolare con dati contrastanti nelle diverse specie (Eros e Milligan, 1996).

Nei mammiferi i glucocorticoidi producono un aumento del lattato plasmatico, ma ancora una volta, nei pesci i dati non sono concordi nelle diverse specie. Tuttavia, poiché il lattato è senza dubbio un importante substrato per la gluconeogenesi nei pesci, e questa è stimolata dal cortisolo, è probabile che la sua produzione dal glicogeno muscolare serva proprio a fornire il substrato alle cellule epatiche.

Data la sua azione catabolica, è opinione comune che il cortisolo eserciti nei pesci un' azione proteolitica periferica. Il suo ruolo tuttavia è sostanzialmente legato ad un aggiustamento del metabolismo degli aminoacidi, mediante deaminazione, transaminazione e produzione di ammoniaca e direzionamento dell' utilizzo del carbonio aminoacidico alla glicogenosintesi, alla gluconeogenesi e alla sintesi di proteine. Oltre a queste azioni periferiche, il cortisolo influenza anche le proteine del fegato, come mostrano le variazioni dell' indice epato-somatico registrate per varie specie (Mommsen *et al.*, 1999).

In generale, i glucocorticoidi rallentano la crescita tissutale ed inibiscono la proliferazione dei diversi tipi cellulari. Il cortisolo riduce i tassi di crescita

anche nei pesci ma è difficile determinare se questo è dovuto a proteolisi o a ridotta sintesi proteica o ad entrambe. Ancora, la crescita ridotta potrebbe essere determinata dagli effetti negativi del cortisolo sulla disponibilità dei nutrienti (ridotta digeribilità delle proteine e malassorbimento del cibo per danneggiamento della mucosa intestinale, quindi ridotta efficienza nella conversione del cibo) magari attraverso una diminuzione della triiodotironina (T3) nel sangue (Brown *et al.*, 1991). Infatti è largamente accettato che la T3 sia un regolatore della captazione dei nutrienti nei pesci e sia positivamente correlata alla permeabilità dell' intestino al glucosio. Essendo il cortisolo secreto in elevate quantità durante lo stress, la ridotta crescita può essere determinata anche dalla redistribuzione dell' energia necessaria per il mantenimento dell' omeostasi soprattutto se lo stress è prolungato nel tempo.

Anche se è generalmente considerato un ormone catabolizzante, il cortisolo stimola anche la sintesi di numerose proteine epatiche, soprattutto quelle coinvolte nel metabolismo aminoacidico.

Come per altri percorsi metabolici nei pesci, anche la regolazione del metabolismo lipidico ad opera del cortisolo non è chiara a causa dei dati discordanti provenienti dai vari studi.

L' ipotesi che prevale è che il cortisolo eserciti una forte azione lipolitica periferica ed epatica che determina un aumento nel plasma di acidi grassi non esterificati (NEFA). Il fegato sembra essere l' organo che fa fronte a questa aumentata disponibilità di acidi grassi attraverso l' ossidazione ed

eventualmente la ri-sintesi mentre il glicerolo fornisce un substrato ideale per la gluconeogenesi (Mommsen *et al.*, 1999).

In generale, i glucocorticoidi nei mammiferi sono vitali per il mantenimento dell'omeostasi. In condizioni di riposo il cortisolo mantiene la glicemia nella norma e previene l'ipotensione arteriosa mentre in condizioni di stress il cortisolo è importante per l'attivazione del sistema nervoso centrale mediante aumento del glucosio circolante ed aumento della pressione sanguigna, entrambi importanti per far fronte allo stress. Il cortisolo, inoltre, riduce la reazione immunitaria infiammatoria indotta dallo stress che potrebbe diversamente danneggiare i tessuti (Bamberger *et al.*, 1996).

Lo stress è un processo che richiede energia e infatti vari studi hanno riscontrato un aumento del tasso metabolico e della captazione dell'ossigeno nei pesci stressati (Barton *et al.*, 1987). Per far fronte all'aumentata richiesta energetica il pesce mobilita vari substrati per rifornire i processi cellulari. Il glucosio è un importante carburante per il metabolismo e alcuni tessuti dipendono da questo, per esempio il cervello, il cuore, le cellule del sangue e le branchie. Sfortunatamente l'utilizzo periferico del glucosio non è ancora stato chiarito, soprattutto durante lo stress (Mommsen *et al.*, 1999).

Durante lo stress quindi il cortisolo ha un'importante ruolo metabolico: la regolazione glicemica e la promozione dei processi di ricostituzione delle riserve di glicogeno, entrambi indispensabili per il recupero dallo stress. E' probabile tuttavia che lo steroide per svolgere queste azioni agisca insieme

ad altri ormoni gluco-regolatori come l' adrenalina, il glucagone e l' insulina (Mommsen *et al.*, 1999).

Il cortisolo è considerato anche un importante osmoregolatore sia nei pesci di acqua dolce che salata in quanto si è visto che animali trattati con questo ormone risultano più tolleranti ai cambiamenti salini. In acqua salata favorisce il differenziamento delle cellule a cloruro e incrementa l' attività della pompa sodio-potassio ATPasi branchiale (McCormick, 1995). L' azione del cortisolo in questo caso si esplica in sinergia con altri ormoni come l' ormone della crescita (GH) e il fattore insulino simile IGF-1 (Madsen,1990; McCormick, 1996). In acqua dolce invece, l' ormone stimola l' assorbimento del calcio e l' attività della pompa Ca^{++} branchiale (Flik e Perry, 1989).

E' noto che i glucocorticoidi sopprimono l' attività riproduttiva (Mommsen *et al.*, 1999). In caso di stress infatti, il processo di redistribuzione dell' energia penalizza tutte le attività che non sono necessarie per la sopravvivenza dell' individuo e fra queste c' è appunto la riproduzione. In molte specie di pesci, anche se non in tutte, durante uno stress acuto e cronico si determina una riduzione degli ormoni sessuali circolanti (androgeni ed estrogeni) (Pankhurst e Van der Kraak, 1997). Il cortisolo inoltre sembra ridurre la sintesi di vitellogenina (la glicofosfolipoproteina che costituisce il tuorlo delle uova) agendo direttamente sugli epatociti oppure sulla capacità di legame dell' estradiolo (l' ormone che stimola la produzione di questa proteina nel fegato) con le sue proteine di trasporto riducendo il suo rilascio a

livello epatico con conseguente diminuzione della sua attività (Carragher *et al.*, 1989; Pottinger e Pickering, 1990).

Fra le sue innumerevoli azioni, il cortisolo svolge anche un importante ruolo nella regolazione del sistema immunitario nei pesci e l' aumento dei suoi livelli, soprattutto in caso di stress cronico, può determinare immunosoppressione. E' riportato infatti che ad esempio, condizioni stressanti o la somministrazione di cortisolo abbassano le capacità dei pesci di resistere ad infezioni da batteri e funghi patogeni (Maule *et al.*, 1989; Pickering *et al.*, 1989). Si è appurato inoltre che il cortisolo nei pesci è in grado di indurre deficit linfocitari (Pickering, 1984; Pulsford *et al.*, 1994) o un aumento di neutrofili e macrofagi (Pulsford *et al.*, 1994) o ancora il blocco della sintesi o del rilascio di alcune citochine (Kaattari e Tripp, 1987).

1.4. Lo stress in acquacoltura

L' interesse dell' opinione pubblica per il benessere dei pesci è cresciuto in questi anni grazie anche all' espansione che ha caratterizzato il settore dell' acquacoltura.

In allevamento i pesci sono sottoposti molto spesso a condizioni stressanti, condizioni alle quali non possono sottrarsi dato il confinamento.

Gli stressori in acquacoltura sono in molti casi inevitabili ma la riduzione dello stress e dei suoi deleteri effetti è fondamentale sia per il welfare che per la produttività. E' per questa ragione che in questi anni, anche grazie al crescente interesse dell' opinione pubblica per il benessere del pesce allevato,

il mondo della ricerca ha direzionato gli sforzi per identificare quali sono le pratiche legate all' allevamento che risultano stressanti per le varie specie ittiche allevate (Huntingford e Kadri, 2009). Gli effetti di una vasta gamma di pratiche legate all' allevamento sulla fisiologia dello stress sono quindi ben documentati almeno in alcune specie (per review vedi Pickering, 1992; Wedemeyer, 1997; Conte, 2004). Fra le pratiche che vengono annoverate ritroviamo la manipolazione, la selezione delle taglie, la densità di stoccaggio, il digiuno, il trasporto, le condizioni di pre-macellazione e le tecniche di macellazione (Poli, 2009; Asley, 2007; Conte, 2004).

La rimozione dall' acqua e l' esposizione all' aria, pratiche che si verificano in caso di trasferimenti, selezioni e trasporto, si è visto che producono nel pesce una risposta fisiologica elevata e dovrebbero essere per questo ridotte al massimo. L' esposizione all' aria per 3 minuti nell' orata, per esempio, produce, entro 30 minuti, un incremento dei livelli di cortisolo di 50 volte superiore ai livelli basali (Arends *et al.*, 1999). Anche la manipolazione e l' utilizzo di reti risultano deleterie per l' animale in quanto possono produrre abrasioni e privare il pesce dello strato protettivo determinato dalle scaglie e dal muco che è fondamentale come barriera contro le infezioni, per l' osmoregolazione e la locomozione.

Un altro fattore altamente stressante è l' affollamento ovvero le elevate densità di stoccaggio in vasca. Questo parametro, determinato dalla necessità dell' industria di produrre quantitativi elevati riducendo i costi, in alcune specie più che in altre, può essere un fattore notevole di stress. Esso infatti può

determinare stress dovuto alle interazioni sociali o all' impossibilità di esibire il comportamento normale, per esempio nelle specie non gregarie, ma soprattutto è legato alla qualità dell' acqua che può risultare compromessa dall' eccessiva capacità di carico (ovvero il numero massimo di pesci che il sistema può supportare in termini di ossigeno disciolto e rimozione dei rifiuti metabolici quali anidride carbonica e composti azotati; Ashley, 2007).

Ancora, fra i parametri più impattanti sullo stato di benessere del pesce ci sono le pratiche di pre-macellazione (che includono pesca, eventualmente trasporto, condizioni di stoccaggio, manipolazioni) e la macellazione (Poli, 2009; Terlouw et al., 2008). Quest' ultimo è il fattore che più di tutti ha catalizzato l' attenzione, tanto che fra le raccomandazioni maggiori a proposito di welfare, la FAWC (Farm Animal Welfare Council) per esempio intima che la macellazione deve avvenire nel modo più umano possibile, il che significa che deve essere rapida, e il meno dolorosa possibile (www.fawc.org.uk). Date le diversità fra specie, anche l' EFSA (European Food Safety Authority), il braccio operativo della Comunità Europea in termini di sicurezza alimentare e welfare degli animali, si è dedicata alla tematica ed ha pubblicato negli ultimi anni, le linee guida per la macellazione di molte delle specie ittiche allevate (<http://www.efsa.europa.eu>).

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è stato valutare la possibilità di utilizzare il cortisolo come indicatore di stress, in specie ittiche d' interesse commerciale, al fine di ottimizzare alcune pratiche legate all' allevamento che possono essere stressanti per questi animali.

Date le problematiche legate al dosaggio del cortisolo nel plasma e alle modalità di prelievo, negli animali adulti lo sterioide è stato valutato anche in altre matrici quali muco, muscolo, pinna e contenuto intestinale.

In particolare, si è valutato:

- 1) se diete con percentuali diverse di farina proteica vegetale producono cambiamenti nella risposta allo stress da macellazione nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*);
- 2) se è preferibile, in termini di benessere, effettuare la macellazione della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) mediante elettrostordimento oppure asfissia all' aria;
- 3) se diverse condizioni di pre-macellazione, in termini di densità di stoccaggio e di concentrazione di ossigeno disciolto, influiscono sullo stato di stress nella spigola (*Dicentrarchus labrax*);
- 4) se il cortisolo diffonde con tempistiche diverse nelle varie matrici testate in spigole sottoposte a stress da esposizione all' aria;
- 5) se la spigola (*Dicentrarchus labrax*) è in grado di rispondere ad uno stress indotto da innalzamento termico nei primissimi giorni di vita in

modo da avere dati sull' ontogenesi della risposta allo stress nei primissimi stadi di sviluppo della specie.

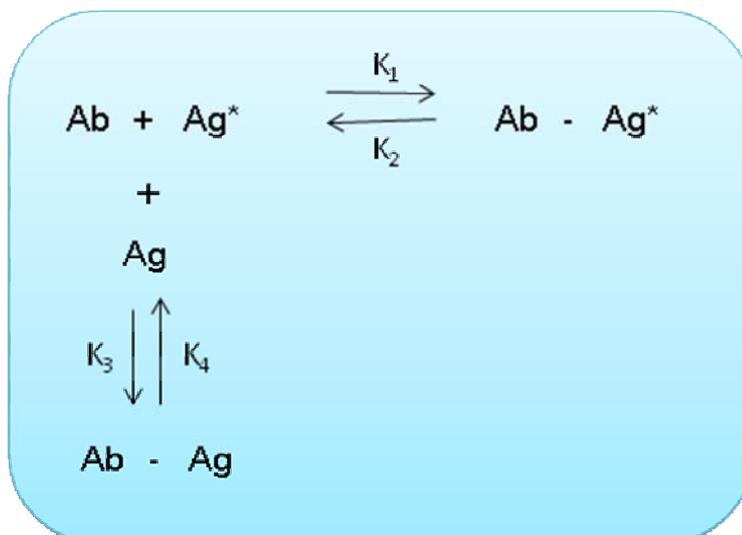
3 MATERIALI E METODI GENERALI

3.1. ANALISI RADIOIMMUNOLOGICA (RIA)

Il RIA (RadioImmunoAssay) è un sistema analitico immunologico che, grazie alla sua sensibilità e specificità, è in grado di determinare minime quantità, dell'ordine di nanogrammi o picogrammi, di sostanze presenti in campioni biologici. La sensibilità del metodo è garantita dall'affinità dell'anticorpo per l'antigene, mentre la specificità dall'uso di un anticorpo che identifica e si lega selettivamente alla sostanza che si vuole misurare.

Il principio sul quale questo metodo si basa è la competizione che si instaura tra una molecola di antigene non marcato (Ag) e una di antigene marcato (Ag*) per un anticorpo (Ab) specifico comune (Fig. 1).

La competizione è determinata dal fatto che l'anticorpo è presente in difetto e ciò significa che maggiore è la concentrazione dell'analita e minore sarà la quantità di tracciante radioattivo che si lega all'anticorpo.



Ab = anticorpo specifico

Ag = antigene non marcato
(campioni incogniti o standard)

Ag* = antigene marcato (tracciante)

Ag*-Ab = complesso antigene
marcato-anticorpo (misurabile)

Ag-Ab = complesso antigene non
marcato-anticorpo (non misurabile)

K₁, K₃ = costanti di associazione

K₂, K₄ = costanti di dissociazione

Fig.1. Rappresentazione schematica della reazione di competizione tra l' antigene marcato e non marcato per l' anticorpo specifico.

Come tracciante radioattivo si può usare una molecola tritiata (^3H) oppure iodinata (^{125}I). Dopo un periodo di incubazione a temperatura costante la reazione raggiunge l' equilibrio portando alla formazione di due immunocomplessi $\text{Ag}^*\text{-Ab}$ e Ag-Ab e di frazioni di analita e di tracciante liberi. La frazione di antigene marcato libero viene quindi separata mentre quella legata all' anticorpo viene utilizzata per il conteggio della radioattività. La concentrazione dell' analita incognito viene ricavata costruendo una curva di taratura realizzata inserendo nella reazione quantità note, crescenti, di antigene non marcato (standard).

Alla base di un dosaggio RIA vi sono quindi 5 condizioni:

1. l' anticorpo (Ab) deve essere presente sempre in quantità costante ed in difetto, allo scopo di determinare la competizione tra antigene incognito (Ag) e antigene marcato (Ag^*);
2. il tracciante (Ag^*) deve essere sempre in quantità costante e inferiore o uguale a quella dell' antigene incognito (Ag);
3. l' antigene standard ed incognito devono avere la stessa struttura chimica e la reazione deve avvenire per entrambi in condizioni identiche;
4. il processo di marcatura dell' antigene non deve determinare nella molecola variazioni della sua struttura, tali da determinare variazioni delle costanti di affinità;

5. il metodo di separazione legato-libero non deve alterare in maniera significativa quello che è l' equilibrio della reazione.

3.2. RIA SU MICROPIASTRA

Il cortisolo presente nelle varie matrici utilizzate nel presente studio è stato dosato mediante analisi RIA su micropiastra, come descritto da Simontacchi *et al* (1995). Il RIA su micropiastra è una variante in fase solida del tradizionale RIA nella quale si utilizzano micropiastre in polistirene da 96 pozzetti (Packard, optiplate 96 well PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA). Questo metodo è stato preferito al primo in quanto consente di risparmiare reagenti e di semplificare la fase di separazione libero-legato.

La procedura prevede che venga fatto adsorbire sulla superficie dei pozzetti un anticorpo anti γ globuline di coniglio, prodotto nella capra, e successivamente si aggiunga l' anticorpo specifico, prodotto nel coniglio, in modo da formare un primo complesso anticorpo-anticorpo. Si aggiungono quindi l' antigene standard o i campioni incogniti ed il tracciante radioattivo per indurre la reazione immunologica. In questo modo i complessi Ab- Ag* e Ab-Ag rimangono solidali con la piastra, mentre il tracciante e l' antigene liberi rimangono nel surnatante e possono venire facilmente eliminati mediante semplici lavaggi della piastra con tampone. Si conclude quindi la procedura con il conteggio della frazione di radioattività legata, utilizzando un β -counter.

3.2.1. FASI DI LAVORO

L' analisi RIA prevede le seguenti fasi di lavoro:

1. Estrazione degli steroidi dai campioni
2. Adsorbimento dell' anticorpo anti-IgG di coniglio sulla piastra
3. Incubazione con l' anticorpo specifico
4. Incubazione con il campione e gli standard
5. Separazione libero-legato
6. Conteggio della radioattività
7. Elaborazione dei dati

3.2.2. DOSAGGI ORMONALI

L' analisi RIA in questo studio è stata condotta su:

- 1) plasma, muco, muscolo, pinna di trota iridea;
- 2) plasma, muco, muscolo, pinna e contenuto intestinale di spigola;
- 3) larve *in toto* di spigola.

3.2.2.1 Estrazione degli steroidi

L' analisi RIA è stata preceduta da una fase di estrazione degli steroidi mediante un solvente organico, l' etere dietilico.

3.2.2.2. Estrazione del cortisolo dal plasma

Dai campioni di plasma si sono prelevati 50-100 μ l ai quali sono stati addizionati 8 ml di etere dietilico. Le provette sono state poste su agitatore orizzontale a

temperatura ambiente per 10 minuti per permettere al solvente di estrarre efficacemente gli steroidi; successivamente i campioni sono stati centrifugati a 1500 rpm per 5 minuti a 5°C e quindi congelati a -20 C. Il congelamento permette la separazione fra la fase solida acquosa sul fondo della provetta e la fase lipofila liquida in superficie. Il surnatante così ottenuto è stato decantato in altre provette di vetro coniche e portato a secco mediante corrente d' azoto su piastra termostata. Il residuo secco è stato infine ripreso con 1 ml di tampone RIA ($\text{Na}_2\text{HP0}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 21,85 g/l; $\text{NaH}_2\text{P0}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ 4,38 g/l; NaCl 9 g/l; BSA, albumina serica bovina 0,17 %; pH 7,2) e agitato per 10 minuti su agitatore orizzontale. Al termine del procedimento il campione risultava pronto per essere caricato sulla piastra per l' analisi.

3.2.2.3. Estrazione del cortisolo dal tessuto muscolare

I campioni di muscolo, dopo essere stati scongelati, sono stati sottoposti ad un pretrattamento prima dell' estrazione necessario a garantire una corretta liberazione del cortisolo dal tessuto. Allo scopo, aliquote di 100 mg di tessuto sono state congelate mediante azoto liquido, pestate e polverizzate in un mortaio d' acciaio. Ad ogni omogenato così ottenuto è stato quindi aggiunto 1 ml di tampone RIA. L' estrazione è stata fatta con 8 ml di etere dietilico analogamente a quanto descritto per il plasma. Il residuo secco infine è stato ripreso con 0,5-1 ml di tampone RIA.

3.2.2.4. Estrazione del cortisolo dalle pinne e dal contenuto intestinale

Aliquote da 100 mg di pinna sono state sottoposte ad estrazione con etere dietilico dopo essere state congelate e polverizzate come al punto precedente. Il contenuto intestinale, una volta scongelato, è stato invece processato in modo analogo al plasma.

3.2.2.5. Dosaggio del cortisolo nel muco

I campioni di muco, una volta scongelati sono stati dosati direttamente sulla piastra RIA senza procedimento di estrazione e pretrattamento.

3.2.2.6. Estrazione del cortisolo dalle larve *in toto*

Pools di 50-100 larve sono stati pesati, congelati e polverizzati in azoto liquido quindi risospesi in 1 ml di tampone RIA. L' estrazione degli steroidi è stata fatta con 8 ml di etere dietilico analogamente a quanto descritto per il plasma. Il residuo secco infine è stato ripreso con 0,5 ml di tampone RIA.

3.2.3. PREPARAZIONE DELLA PIASTRA:

3.2.3.1. Adsorbimento dell' anticorpo anti-IgG di coniglio

La micro piastra è stata preparata procedendo per prima cosa con l' adsorbimento dell' anticorpo anti- γ globuline. Nel presente studio, è stato utilizzato un anticorpo anti- γ globuline di coniglio prodotto in capra (Tamanini, Parma). L' antisiero è stato diluito 1:1000 con tampone sodio acetato (0,15

mM pH 9) e distribuito nei 96 pozzetti della micropiastra (200 μ l/pozzetto). Dopo un' incubazione a + 4 °C per 24 ore la piastra è stata svuotata e sono stati aggiunti, ad ogni pozzetto, 200 μ l di tampone RIA. In seguito ad un' ulteriore incubazione di 1 ora a + 4 °C la piastra è stata nuovamente svuotata e conservata a – 20 °C, per non più di 4 settimane, fino al momento dell' utilizzo.

3.2.3.2. Incubazione con l' anticorpo specifico

La piastra al momento dell' analisi è stata incubata per 24 h a + 4 °C con l' anticorpo specifico utilizzando un antisiero anti-cortisolo-CMO (Biogenesys) prodotto in coniglio alla diluizione di 1:20000 (200 ml/pozzetto tranne in quelli deputati ai controlli dell' attività totale, AT e del legame non specifico, NSB; vedi oltre).

Le caratteristiche di specificità dell' anticorpo sono le seguenti:

cortisolo 100%, prednisolone 44.3%, 11-desossicortisolo 13.9%, cortisone 4.95, corticosterone 3.5%, prednisone 2.7%, 17-idrossiprogesterone 1.0%, 11-desossicorticosterone 0.3%, desametasone 0.1%, progesterone < 0.01%, 17-idrossipregnenolone < 0.01%, pregnenolone < 0.01%.

3.2.3.3. Incubazione con i campioni e gli standards

Dopo l' incubazione con l' anticorpo specifico, ciascun pozzetto della piastra (tranne AT e NSB) è stato lavato con 200 μ l di tampone RIA. Successivamente

la piastra è stata svuotata, asciugata e quindi caricata in doppio come riportato in Tabella 1.

	AT	NSB	Co	Curva	Campioni
Buffer RIA	-	200 μ l	200 μ l	150 μ l	variabile
Standard	-	-	-	50 μ l	-
Campione	-	-	-	-	variabile
Tracciante*	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
TOTALE	10 μ l	210 μ l	210 μ l	210 μ l	210 μ l

Tab.1. Schema di caricamento della piastra.

Come tracciante è stato utilizzato l' 1,2,6,7-3H cortisolo della ditta Duport Nen. Sia il tracciante che lo steroide marcato sono stati opportunamente diluiti prima del loro utilizzo. La piastra caricata è stata infine posta su un agitatore orizzontale per 3 minuti quindi coperta con pellicola trasparente e lasciata incubare per 24 ore a + 4°C.

3.2.3.4. Separazione libero-legato

La separazione dell' antigene marcato libero dall' antigene marcato legato all' anticorpo è stata effettuata mediante semplice risciacquo dei pozzetti con tampone RIA. La piastra è stata lavata per 4 volte con 200 μ l/pozzetto di tampone RIA che è stato eliminato per aspirazione con pompa ad acqua. Questa fase risulta molto semplificata rispetto al tradizionale RIA su fase liquida che prevede l' utilizzo di carbone destrano (charcoal-destrano), un materiale in

grado di inglobare molecole di piccole dimensioni come l' antigene ma non quelle grandi come il complesso antigene-anticorpo.

3.2.3.5. Conteggio della radioattività

Ogni piastra è stata preparata infine per il conteggio della reattività. In ogni pozzetto sono stati aggiunti 200 μ l di liquido scintillante (MICROSCINT 20-PACKARD); la piastra è stata sigillata con pellicola termosaldabile (TOPSEAL S-PACKARD) e in seguito messa a contare nel β -counter (TOPCOUNT-PACKARD).

3.2.3.6. Elaborazione dei dati

Il β -counter, dotato di software di elaborazione, ha formulato per ogni piastra una curva di taratura fornendo direttamente i risultati dell' analisi.

3.2.3.7. Allestimento della curva di taratura e dei controlli

I punti della curva di taratura sono stati preparati partendo da una soluzione di 100 ng/ml di etanolo diluita con tampone RIA per ottenere le seguenti 8 concentrazioni standard:

40 μ l SOL C + 960 μ l tampone RIA	Standard 8 200 pg/50 μ l
300 μ l St 8 + 300 μ l tampone RIA	Standard 7 100 pg/50 μ l
300 μ l St 7 + 300 μ l tampone RIA	Standard 6 50 pg/50 μ l
300 μ l St 6 + 300 μ l tampone RIA	Standard 5 25 pg/50 μ l
300 μ l St 5 + 300 μ l tampone RIA	Standard 4 12.5 pg/50 μ l
300 μ l St 4 + 300 μ l tampone RIA	Standard 3 6.25 pg/50 μ l

300 µ l St 3 + 300 µ l tampone RIA

Standard 2 3.125 pg/50 µ l

300 µ l St 2+ 300 µ l tampone RIA

Standard 1 1.565 pg/50 µ l

3.2.4. VALIDAZIONE DEL METODO DI DOSAGGIO

La validità di un metodo di dosaggio viene verificata mediante test specifici, quali il test di parallelismo e il test di ripetibilità intra-saggio (intra-assay), che sono in grado di stabilire l' accuratezza e la precisione del sistema analitico.

3.2.4.1. Test di parallelismo

L' obiettivo di tale test è verificare che a diluizioni seriali del campione corrisponda una proporzionale riduzione della concentrazione dell' ormone da dosare; in caso contrario, il sistema di misura deve essere definito " non accurato" .

Le cause che conducono alla non accuratezza del sistema possono essere dovute ad una un' erronea taratura del sistema (reazione immunologica, separazione libero.legato...) oppure alla presenza di interferenti che agiscono in maniera non proporzionale alla loro concentrazione, provocando, ad ogni diluizione, una sovrastima o sottostima.

Per misurare l' andamento di eventuali interferenti nel sistema di dosaggio quindi vengono effettuate delle diluizioni seriali degli estratti eterei dei campioni, da un fattore di diluizione $\frac{1}{2}$ fino ad arrivare ad un fattore di $\frac{1}{16}$. L' assenza di interferenti nel sistema è dimostrata quando il coefficiente di correlazione " R²" della retta interpolante il fattore di diluizione e la reciproca concentrazione tende a 1 (deve essere superiore a 0.98, indicativo di una

ridotta dispersione dei valori) e l' intercetta all' origine " a" passa per il " punto zero" .

3.2.4.2. Test di ripetibilità

Questo test permette di valutare la riproducibilità all' interno dello stesso saggio (intra-assay) e tra saggi diversi (inter-assay) e si effettua inserendo fra i campioni incogniti dei campioni di controllo a concentrazioni note. La valutazione del risultato viene fatta calcolando il coefficiente di variazione (C.V. % = Deviazione Standard x 100 / valore medio dei risultati). Si ritiene che un sistema di analisi immunologica presenti una buona riproducibilità se il C.V.% intra-assay è minore del 10% e se il C.V.% inter-assay è inferiore al 20%.

3.2.4.3. Validazione del dosaggio nelle diverse matrici

La validazione del dosaggio del cortisolo in plasma, pinna, muscolo, contenuto intestinale di spigola e trota è stata effettuata in uno studio precedente utilizzando il test di parallelismo e il test di ripetibilità intra-saggio (intra-assay). Le curve costruite con gli estratti diluiti sono risultate parallele alla curva standard (Fig. 2 da Bertotto *et al.*, 2010) e i test di ripetibilità hanno mostrato una buona riproducibilità essendo i coefficienti di variazione intra-saggio sempre inferiori al 10%.

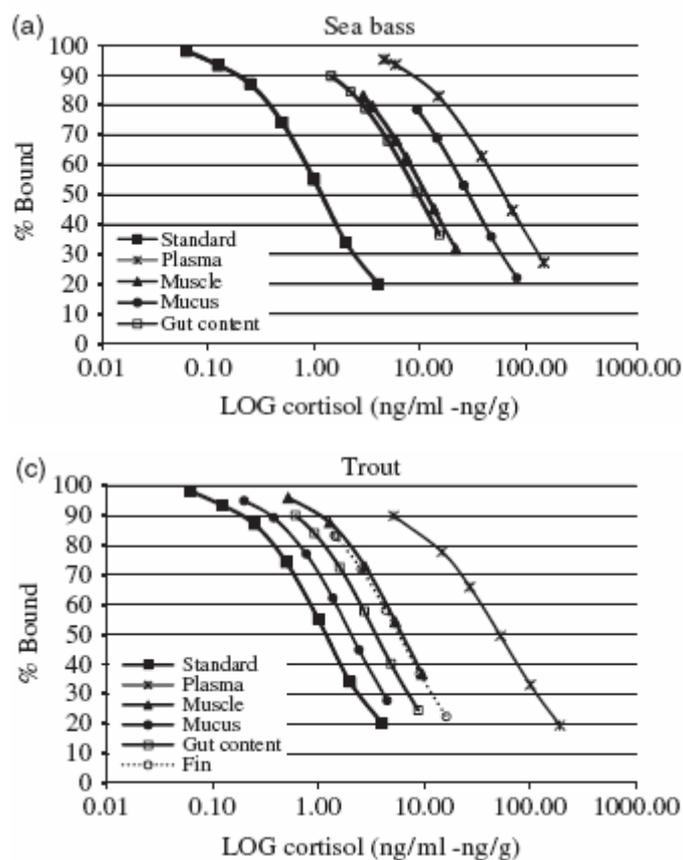


Fig. 2. Parallelismo delle curve standard ed elaborate dagli estratti diluiti del cortisolo nelle matrici di spigola (a) e trota (c; da Bertotto *et al.*, 2010).

La validazione del dosaggio del cortisolo nelle larve *in toto* di spigola è stato effettuato nel corso del presente studio, applicando gli analoghi tests, e i risultati sono riportati nel capitolo relativo (pag. 74).

3.3. LE SPECIE

3.3.1. TROTA IRIDEA - *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)



Classe: Actinopterygii
Ordine: Salmoniformes
Famiglia: Salmonidae
Genere: *Oncorhynchus*
Specie: *O. mykiss*

Fig.3. Esempio di trota iridea.

Caratterizzata da un corpo lungo e fusiforme, la trota iridea presenta una colorazione blu-verde sul dorso, una banda rosa lungo la linea laterale e il ventre argenteo. Il dorso, i fianchi, la testa e le pinne sono coperti da piccoli puntini neri (Fig.3). La colorazione varia con l'habitat, la taglia e la condizione sessuale.

È una specie bento-pelagica e anadroma (migra dal mare al fiume per riprodursi) che è stata trovata in un grande varietà di habitat, da quelli d'acqua dolce, salmastra a quelli d'acqua marina fino ad una profondità di 200 m.

Nativa dei fiumi del Nord America, sin da 1874 è stata introdotta nelle acque di tutti i continenti, eccetto l'Antartide, per la pesca sportiva e l'acquacoltura.

È una specie forte, a crescita rapida e che si riproduce facilmente ed è stata la prima ad essere domesticata. La prima avannotteria è stata allestita nel 1879 in California. Le trote, inizialmente a riproduzione primaverile, sono state selezionate per riprodursi anche in tutte e tre le altre stagioni dell'anno. La maturità sessuale viene raggiunta a 1-3 anni nel maschio e a 2-4 anni nella

femmina. La maggior parte dei pesci si riproduce una sola volta nel corso della vita. In natura, le uova (diametro 3-7 mm) vengono deposte in buche scavate dalla femmina stessa. I giovanili più piccoli sono bento-pelagici e rimangono nelle vicinanze del letto del fiume mentre i più grandi sono pelagici.

In allevamento la trota non depone naturalmente ma le uova vengono ottenute per spremitura. Poiché la maturità sessuale determina una riduzione della qualità del prodotto, soprattutto nei maschi, per questa specie si sono sviluppate tecnologie che consentono l'allevamento di animali triploidi (corredo cromosomico $3n$) oppure di popolazioni a sole femmine. La triploidia è indotta dall'esposizione delle uova a shock termico o pressorio mentre le popolazioni a sole femmine si ottengono fecondando le uova con il seme di femmine mascolinizzate.

Dagli anni '50, la produzione di trota ha avuto una crescita esponenziale soprattutto in Europa. Fra i maggiori paesi produttori troviamo il Cile e in Europa la Norvegia, la Francia, l'Italia, la Spagna e la Danimarca (Fig. 4). La produzione mondiale nel 2005 è stata di 537.000 tonnellate delle quali 273.000 provenienti dall'Europa.

Fonti bibliografiche:

<http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/search/>

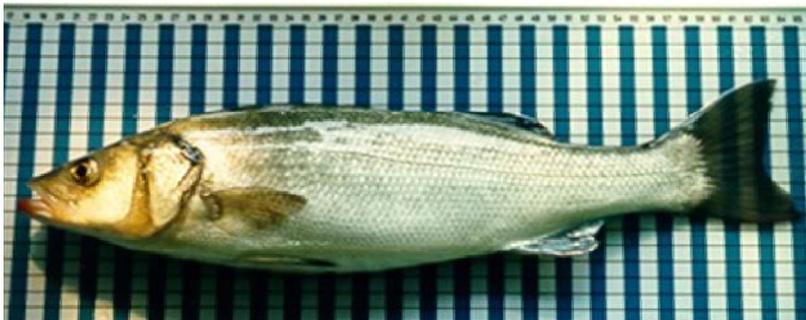
<http://www.aquabreeding.eu/Documents/tabid/98/Default.aspx>

http://www.inra.fr/reprofish_eng



Fig.4. Principali paesi produttori di trota iridea (FAO Fishery Statistics, 2006)

3.3.2. LA SPIGOLA *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus 1758)



Classe: Actinopterygii
 Ordine: Perciformes
 Famiglia: Moronidae
 Genere: *Dicentrarchus*
 Specie: *D. labrax*

Fig.5. Esemplare di spigola.

La spigola o branzino è caratterizzata da un corpo piuttosto allungato, il muso appuntito e la bocca larga con mascella prominente. La colorazione è grigio bluastra sul dorso, argentea sui fianchi e bianca o talvolta giallastra sul ventre (Fig.5). L' opercolo presenta una diffusa macchia nera. Raggiunge la taglia massima di un metro e 10-12 kg di peso. Non presenta dimorfismo sessuale a parte nella taglia con le femmine generalmente più grandi.

E' una specie euriterma ed eurialina che preferisce le acque costiere, profonde al massimo 100 m. Vive nelle zone litorali in vari tipi di fondali, lungo gli estuari, le lagune ed occasionalmente le rive. Popola le rive costiere in estate, ma migra in acque profonde in inverno quando la temperatura dell' acqua si abbassa.

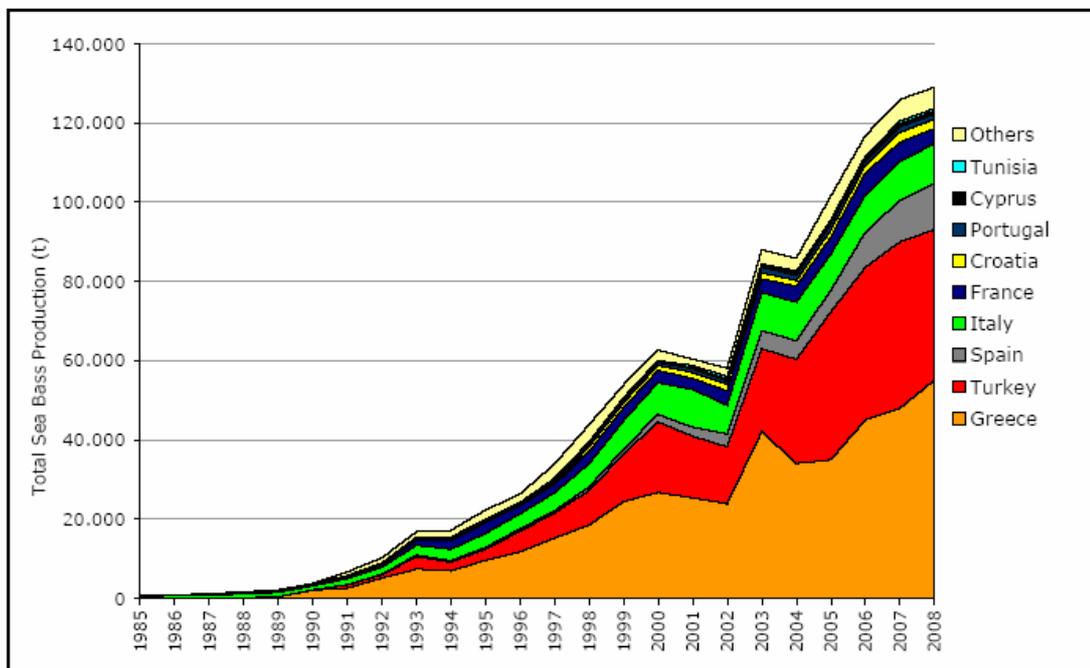
Il suo areale è europeo, dall' oceano Atlantico (dalla Norvegia al Senegal) ai mari Mediterraneo e Nero. La maturità sessuale viene raggiunta nel maschio a 2 anni e nella femmina a 3 anni. Nel Mediterraneo si riproduce da dicembre a marzo, mentre lungo le coste atlantiche da marzo a giugno. La femmina, in natura, depone alcune migliaia di uova pelagiche del diametro di 1-1,2 mm.

Il sistema di allevamento principale per la spigola è stato per lungo tempo la produzione estensiva cioè la cosiddetta vallicoltura. Questo sistema prevede la cattura di giovanili e il loro confinamento in lagune semiartificiali per l' ingrasso. Alla fine degli anni ' 60, Francia e Italia competerono per lo sviluppo di tecniche di produzione massiva della specie e verso la fine degli anni ' 70, le tecniche risultarono sufficientemente sviluppate nella maggior parte paesi mediterranei da fornire centinaia di migliaia di larve. La spigola è stato il primo pesce marino (non salmonide) ad essere allevato e commercializzato in Europa.

Grecia, Turchia, Italia, Spagna, Croazia ed Egitto sono i maggiori produttori e la loro produzione è in continuo aumento (Figs.6-7).



Fig.6. Principali paesi produttori della spigola (FAO Fishery Statistics, 2006)



Source: APROMAR and FEAP

Fig.7. Produzione mediterranea di spigola dal 1985 a 2008.

Fonti bibliografiche:

<http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/search/>

<http://www.aquabreeding.eu/Documents/tabid/98/Default.aspx>

http://www.inra.fr/reprofish_eng

<http://www.faosipam.org/>

4. LE SPERIMENTAZIONI

4.1. BENESSERE DELLA TROTA (ONCORYNCHUS MYKISS) IN RELAZIONE ALLA DIETA E ALLE MODALITÀ DI MACELLAZIONE

4.1.1. Introduzione

Il benessere dei pesci, incluso quello al momento della morte, sta riscuotendo sempre maggiore interesse nei consumatori tanto che molti governi dell'Unione Europea stanno spingendo da alcuni anni gli allevatori di pesce verso l'utilizzo di metodi eticamente adeguati di macellazione dell'animale attraverso procedure rapide e indolori di stordimento e morte.

Nell'ottica del rispetto e del benessere animale, una delle raccomandazioni che il Consiglio d' Europa ha elaborato nel 2005 per i pesci allevati (Documento AP(97)1,2005; ec.europa.eu/food/animal/welfare/international/index_en.htm) riporta che i metodi di stordimento e uccisione utilizzati devono causare immediata perdita di conoscenza o rendere il pesce rapidamente insensibile al dolore e alla sofferenza finché non sopraggiunga la morte o causare la morte di un pesce che è stato preventivamente anestetizzato o effettivamente stordito. Per la prima volta vengono indicate chiaramente le pratiche che dovrebbero essere proibite, quali mettere il pesce vivo in ghiaccio o in miscele di acqua e ghiaccio, lasciarlo fuori dall'acqua, tagliargli le branchie se non stordito precedentemente e somministrare composti chimici. Produrre una morte rapida ed indolore agli animali ha motivazioni etiche in quanto ci sono molte evidenze che i pesci percepiscano il dolore in maniera simile ai cosiddetti animali "superiori" ma anche economiche, considerato che i consumatori, soprattutto

negli ultimi anni, tendono a premiare chi agisce in maniera eticamente corretta, evitando agli animali quante più sofferenze possibili. Va sottolineato inoltre che benessere dell' animale è sinonimo di buona produttività in quanto le procedure di premacellazione e di macellazione possono influenzare negativamente la qualità del prodotto finale. Condizioni che in queste fasi produttive producano un forte stress come una lunga agonia agiscono infatti sui processi biochimici del *post mortem* con conseguenze negative sulla qualità della carne sia in termini organolettici che di conservazione del prodotto (Poli *et al.*, 2005).

E' generalmente riconosciuto che l' utilizzo delle risorse marine derivanti dalla pesca per lo sviluppo dell' acquacoltura non è una pratica sostenibile (Naylor *et al.*, 2000; New e Wijkstroem, 2002). La sostituzione della farina di pesce con fonti proteiche alternative è stata quindi oggetto di molti studi negli ultimi decenni (Tacon *et al.*, 1983; Smith *et al.*, 1988) sia allo scopo di ridurre i costi di produzione ma anche per ridurre l' impatto delle produzioni sull' ambiente e per la conservazione degli stock selvatici (Hardy, 1995; Barrias e Oliva-Teles, 2000). Nonostante il basso contenuto proteico e la presenza di fattori antinutrizionali che si trovano spesso nelle fonti proteiche vegetali molti studi hanno verificato la possibilità di incorporare alcuni ingredienti nelle diete di salmonidi senza compromettere la crescita e quindi la produttività (Gomes *et al.*, 1993, 1995; Oliva-Teles *et al.*, 1994; Burel *et al.*, 2000; Vielma *et al.*, 2000) tanto che attualmente più del 30% delle proteine dei mangimi

commerciali è stato sostituito con proteine derivanti da fonti vegetali (De Francesco *et al.*, 2004).

Alcuni studi hanno dimostrato poi che le diete possono influire sulla tolleranza a condizioni stressanti in diverse specie di pesci per esempio mediante l' introduzione di sostanze naturali immunostimolanti come i glucani (Jeney *et al.*, 1997). Nel caso degli immunostimolanti la risposta allo stress viene migliorata in quanto la stimolazione del sistema immunitario contrasta l' azione dei glucocorticoidi che, come si è detto, agiscono riducendo la funzione di linfociti, macrofagi e neutrofili (Elsaesser e Clem, 1986; Ainsworth *et al.*, 1991; Anderson, 1992).

In quest' ottica, la sperimentazione intende valutare la risposta allo stress in termini di livelli di cortisolo in trote alimentate con diete a diverso tenore di proteine vegetali (sostituzione dell' 80 % delle proteine animali o nessuna sostituzione) e macellate con due metodi (un metodo tradizionale, l' asfissia in ghiaccio, e un metodo innovativo ovvero un elettrostordimento a due stadi). Il cortisolo è stato valutato sia nel plasma che in matrici alternative quali muco, contenuto intestinale, muscolo e pinna.

4.1.2. Materiali e metodi

La sperimentazione è stata svolta nell' ambito di un progetto PRIN (Progetto di Rilevanza Nazionale) che ha visto coinvolte tre Unità Operative con l' intento di valutare l'influenza di diete a diverso contenuto proteico sul benessere, la crescita e la qualità della carne nella trota iridea: l' Unità 1, responsabile

Prof.ssa Poli B.M. del Dipartimento di Scienze Zootecniche dell' Università di Firenze deputata alla messa a punto dello strumento innovativo per l' elettrostordimento e alla valutazione della qualità della carne, l' Unità 2, responsabile Prof.ssa Simontacchi C. del Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie dell' Università di Padova, deputata della valutazione dello stress (la sperimentazione che viene descritta in questa tesi) e infine l' Unità 3, responsabile Prof. Tibaldi E. del Dipartimento di Scienze Animali dell' Università di Udine, deputata alla formulazione delle diete e alla gestione dell' allevamento degli animali sperimentali. Le trote sono state acquistate presso un allevamento commerciale e sottoposte ad un periodo di adattamento alle condizioni sperimentali di 3 settimane presso le installazioni sperimentali dell' Università di Udine. Alla fine dell' acclimatamento gli animali sono stati alimentati metà (4 lotti) con un mangime commerciale per trote con, come unica fonte proteica, la farina di pesce (dieta FM-fish meal) e l' altra metà con un mangime formulato appositamente caratterizzato da un mix di proteine vegetali (concentrato proteico di pisello e glutine di frumento) in sostituzione dell' 80% della farina di pesce (dieta PV80, vegetable protein). Gli animali alimentati con la dieta FM sono stati usati come controllo. L' alimento è stato somministrato due volte al giorno *ad libitum*. Le condizioni delle vasche sperimentali in termini di temperatura dell' acqua, fotoperiodo, flusso idrico e livelli di ammoniaca e nitriti sono state mantenute strettamente controllate e quotidianamente è stata registrata la quantità di alimento consumato e l'eventuale mortalità. Il peso medio iniziale degli animali era di 106,6 g e la sperimentazione si è protratta per

210 giorni. Per valutare l'effetto delle due diete sulla risposta allo stress, gli animali (12 per ciascun tipo di dieta) sono stati sottoposti a due diversi metodi di macellazione (6 con storditore elettrico e 6 per asfissia). Lo stordimento elettrico è stato effettuato utilizzando uno strumento appositamente progettato dall' Unità 1 e capace di produrre lo stordimento in due stadi (2 secondi a 500 Hz in un campo elettrico di 2,5 V/cm e poi 58 s a 50 Hz in un campo elettrico di 0,75 V/cm). Per la valutazione dello stress, da ogni pesce sono stati prelevati il sangue, il muco cutaneo con l' ausilio di una bacchettina di plastica, il contenuto intestinale, una porzione di 1cmx1cmx1cm di muscolo laterale e una di 1cmx1cm di pinna caudale (Fig.8). I campioni così ottenuti e il plasma, derivante dalla centrifugazione del sangue trattato con anticoagulante EDTA, sono stati congelati e stoccati a -20°C fino al momento della determinazione radioimmunologica (RIA) del cortisolo. L' analisi RIA, le cui modalità sono state descritte nel precedente capitolo (pagg. 29-39) è stata messa a punto e validata per le matrici di trota in uno studio precedente (vedi Bertotto *et al.*, 2010).

Durante i due anni della ricerca sono stati effettuati due campionamenti, il primo dopo 3 mesi dall' inizio della sperimentazione ed il secondo dopo 7 mesi.



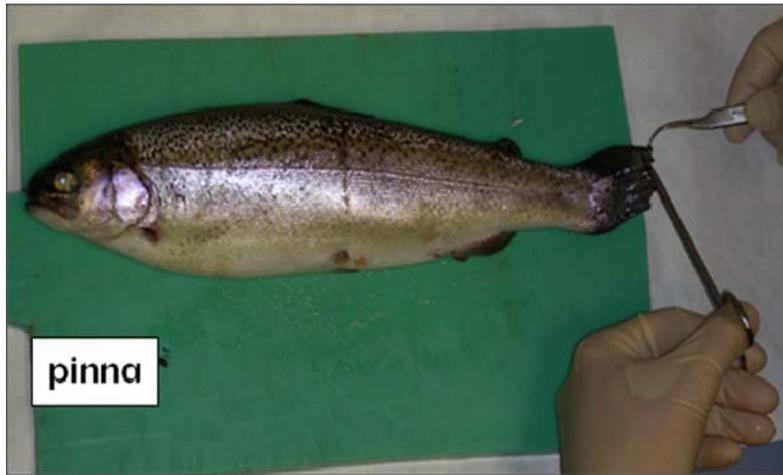


Fig. 8. Prelievo di muco cutaneo e di una porzione di pinna caudale da trota iridea.

4.1.3. Analisi dei dati

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando il software Statistica 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Per l'elaborazione dei dati si è scelta l'Analisi della Varianza utilizzando la procedura GLM (General Linear Model) secondo un arrangiamento bifattoriale (2x2) con i metodi di macellazione e le diete come principali fattori di variabilità. I valori del cortisolo plasmatico sono stati inoltre correlati con quelli dell'ormone delle altre matrici utilizzando la regressione lineare di Pearson. Nel testo, i risultati sono espressi come media \pm errore standard (S.E.) e sono stati considerati significativi quando il p-value era inferiore allo 0,05.

4.1.4. Risultati e discussione

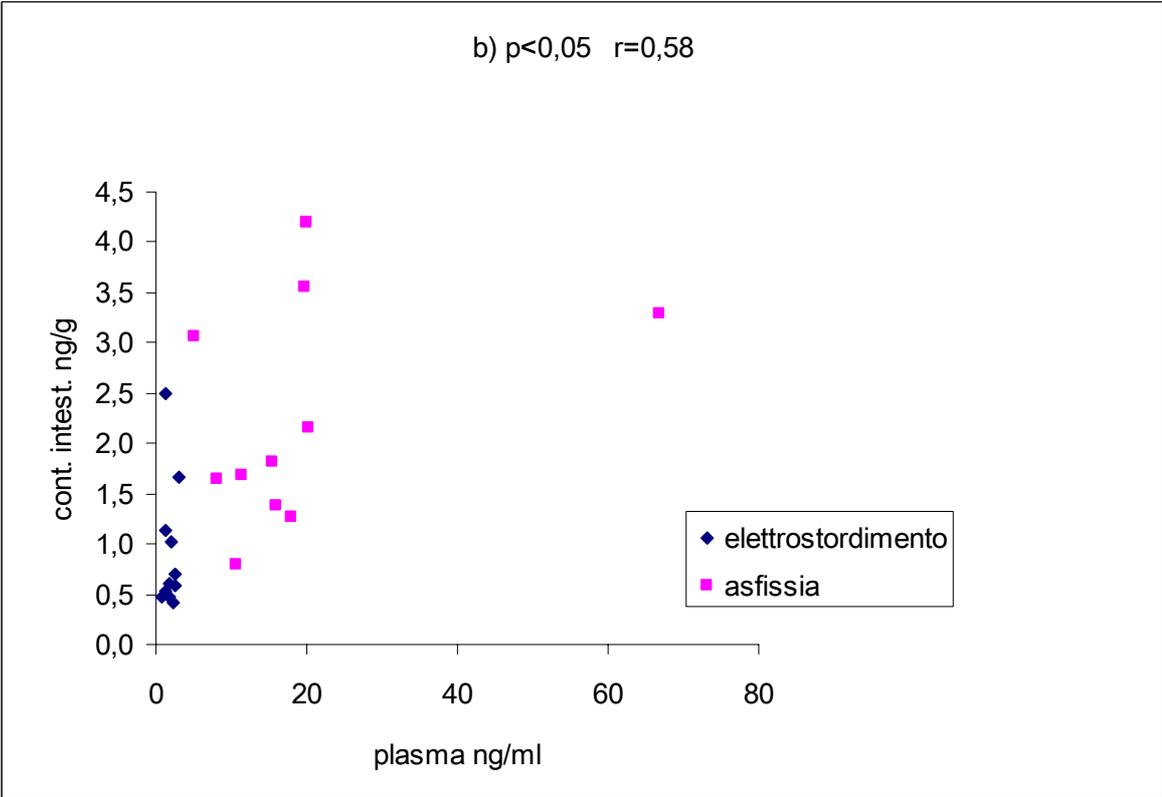
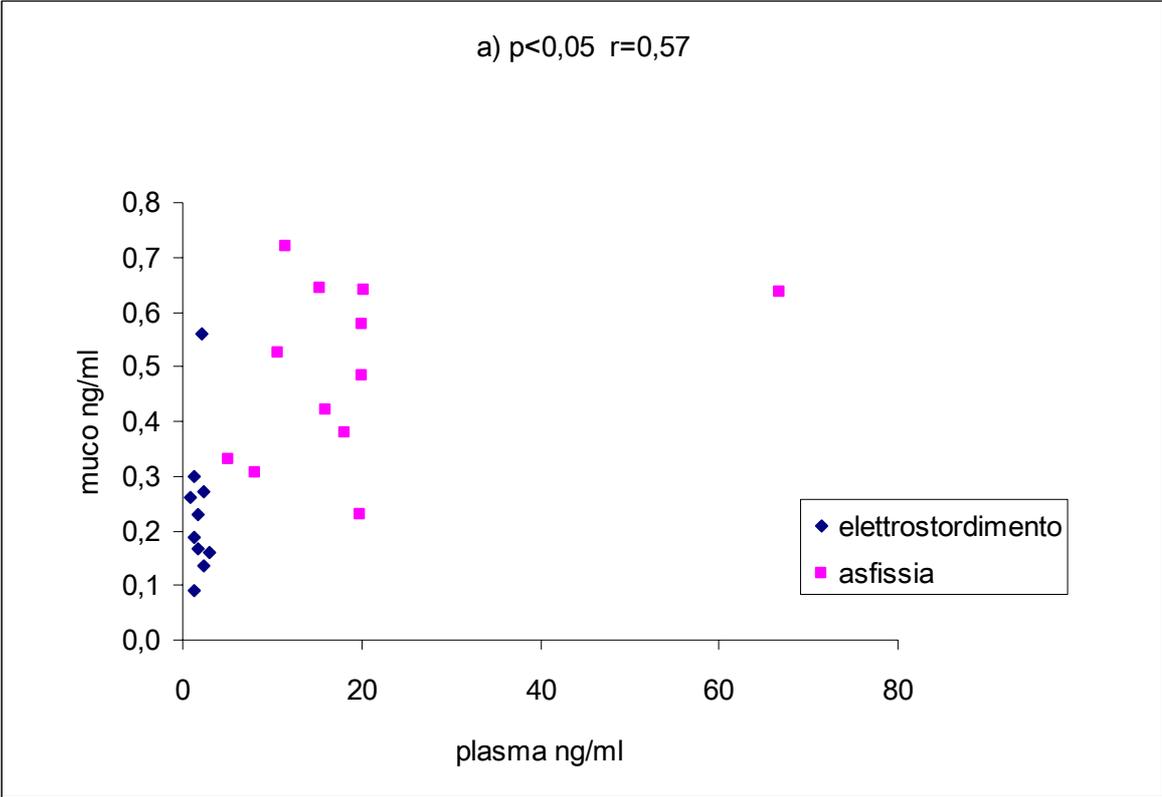
I livelli di cortisolo rilevati nelle varie matrici analizzate nei due campionamenti sono riportati in Tabella 2. I risultati dei dosaggi si sono dimostrati sovrapponibili per entrambi i campionamenti e hanno messo in evidenza valori plasmatici di cortisolo significativamente più elevati nei gruppi sottoposti ad uccisione per asfissia rispetto a quelli in cui è stato utilizzato lo stordimento elettrico ($P < 0,01$ in entrambi i campionamenti), mentre i due tipi di dieta non hanno influenzato la produzione di cortisolo (1° campionamento $P = 0,34$; 2° campionamento $P = 0,54$). I livelli di cortisolo registrati in questa sperimentazione sono molto simili a quanto rilevato da Bertotto *et al.* (2010) in trote sottoposte ad uno stress da trasporto di 1,5 ore.

Anche i livelli di cortisolo nelle varie matrici si sono dimostrati generalmente più alti negli animali macellati mediante asfissia (Tab. 2). Nel primo campionamento è stata registrata una correlazione positiva fra il cortisolo plasmatico e quello presente nel muco ($r = 0,57$; $P < 0,05$; fig. 9a) e nel contenuto intestinale ($r = 0,58$; $P < 0,05$; fig. 9b) ma non con quello muscolare e delle pinne (rispettivamente $r = 0,2$; $P = 0,36$ e $r = 0,64$; $P = 0,1$; Fig.9, c,d). Nel secondo campionamento è stato possibile verificare la correlazione solamente fra cortisolo plasmatico e muscolare e fra cortisolo plasmatico e della pinna (Fig.10) in quanto il contenuto intestinale raccolto durante il campionamento non è stato sufficiente per l'analisi dell'ormone mentre il cortisolo del muco era in quantità inferiore alla sensibilità del RIA. La correlazione in questo caso si è riscontrata fra il cortisolo plasmatico e quello muscolare ($r = 0,43$; $P = 0,39$; Fig.10a) ma non per quello

della pinna ($r=0,71$; $P=0,11$; Fig.10b). La mancata correlazione fra cortisolo plasmatico e cortisolo muscolare e della pinna del primo campionamento e di quello della pinna nel secondo campionamento non trova riscontro con quanto riportato da Bertotto *et al.* (2010) in cui la correlazione è alta in tutte le matrici testate, in trote sottoposte a stress da trasporto. Questo risultato può essere dovuto al fatto che l' asfissia, a differenza del trasporto, non ha consentito la fisiologica diffusione dell' ormone nelle varie matrici perché l' agonia fuori dall' acqua ha ridotto le funzioni vitali degli animali, oppure a causa della durata relativamente breve (20') dell' evento rispetto al trasporto. In questo caso quindi il cortisolo delle matrici, soprattutto nella pinna e nel muscolo, non si è rivelato un buon indicatore di stress.

dieta		FM		PV80	
metodo di macellazione		E	A	E	A
trote	n°	6	6	6	6
1° campionamento					
plasma	ng/ml	1,65±0,28	24,10±8,70	2,01±0,29	14,49±2,59
muco	ng/ml	0,30±0,07	0,62±0,03	0,17±0,02	0,36±0,04
pinna	ng/ml	1,01±0,13	0,65±0,07	0,96±0,11	3,15±0,94
muscolo	ng/ml	0,25±0,04	0,38±0,05	0,39±0,06	0,41±0,03
contenuto intestinale	ng/ml	0,85±0,16	2,32±0,50	1,07±0,34	2,52±0,51
2° campionamento					
plasma	ng/ml	3,59±0,88	45,85±7,33	1,48±0,51	39,67±8,56
muco	ng/ml	0,26±0,03	1,43±0,19	0,29±0,001	0,45±0,09
pinna	ng/ml	0,53±0,05	3,31±0,64	0,46±0,06	1,56±0,23
muscolo	ng/ml	0,31±0,05	1,11±0,44	n.r.	0,33±0,04

Tab.2. Valori medi di cortisolo nelle varie matrici di trote macellate mediante elettrostordimento (E) o asfissia in ghiaccio (A) nei due campionamenti effettuati rispettivamente dopo 3 e 7 mesi dall' inizio della sperimentazione.
n.r. indica non rilevabile dall' analisi.



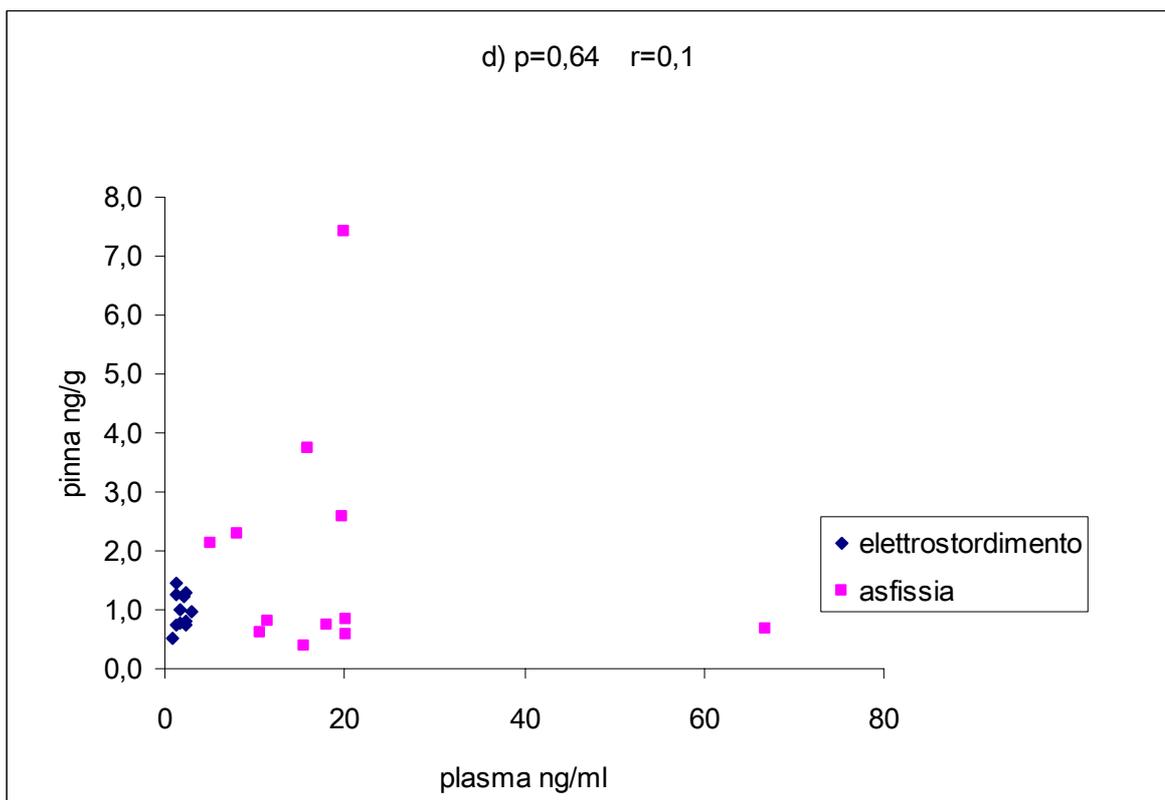
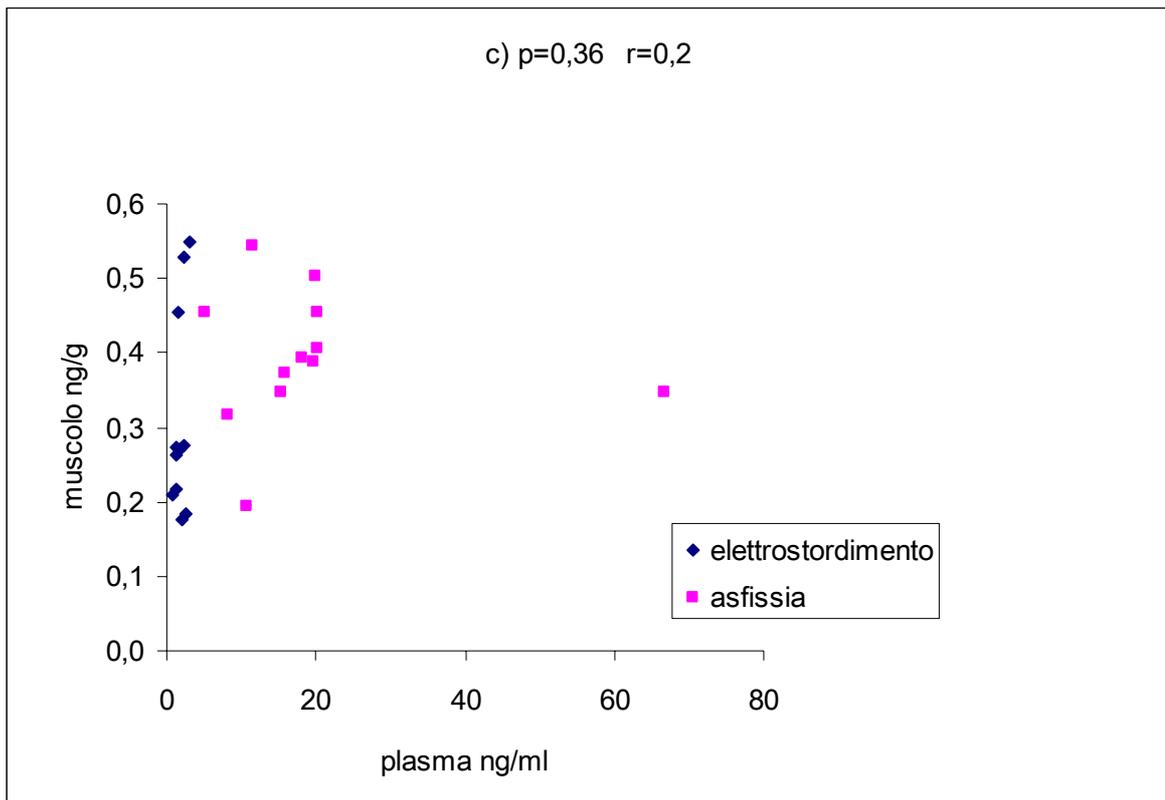


Fig.9. Correlazioni fra il cortisolo plasmatico e il cortisolo rilevato nelle diverse matrici nel primo campionamento (a: muco; b: contenuto intestinale; c: muscolo; d: pinna).

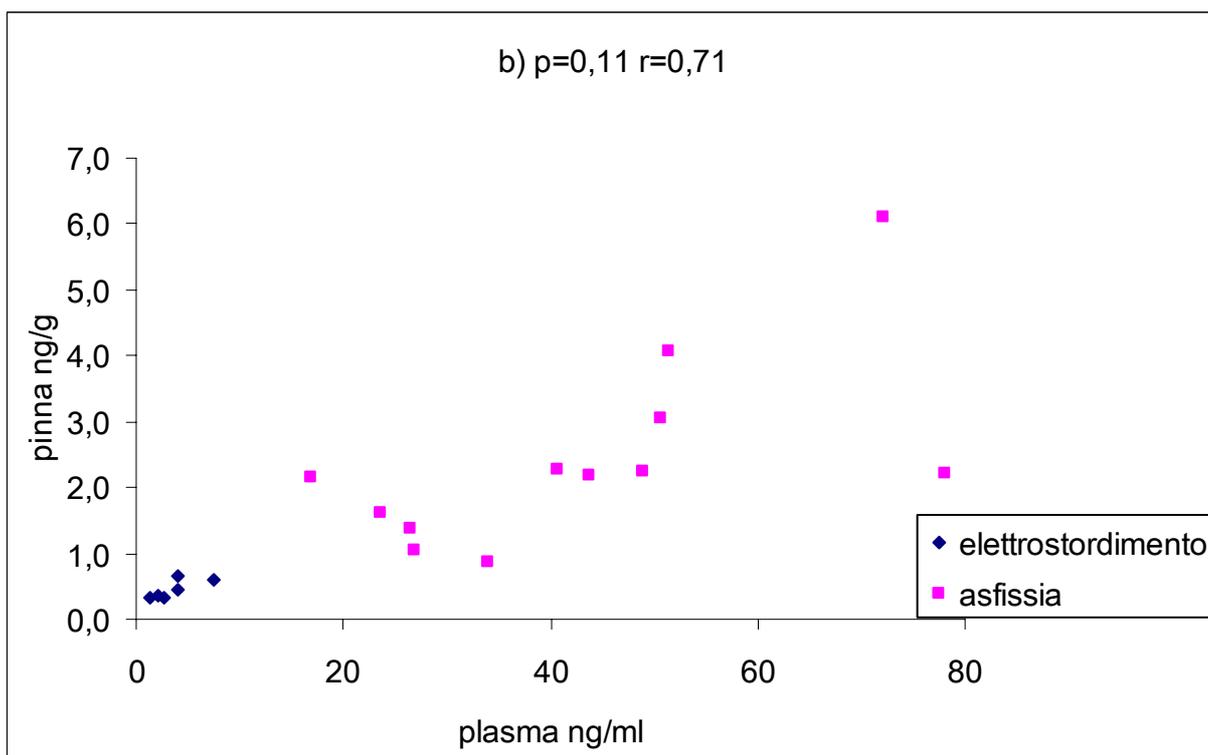
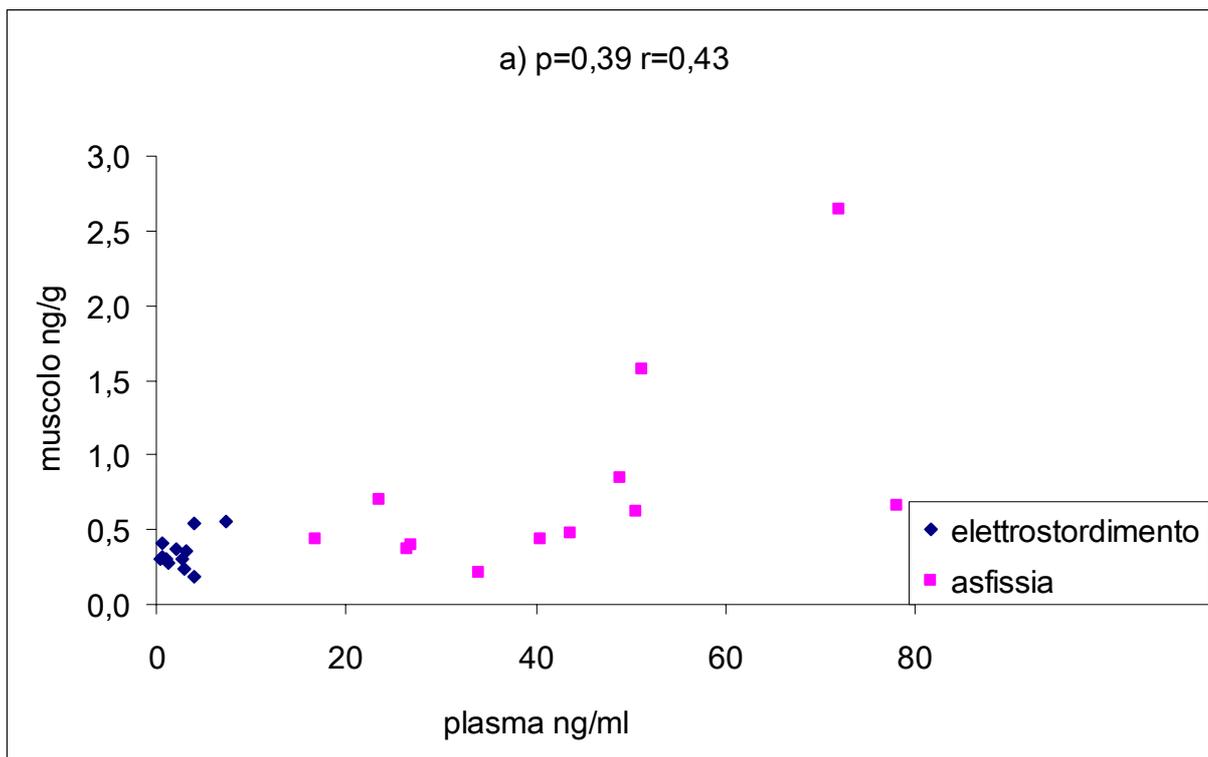


Fig. 10. Correlazioni fra il cortisolo plasmatico e il cortisolo rilevato nelle diverse matrici nel secondo campionamento (a: muscolo; b: pinna).

In conclusione il metodo di uccisione con l' elettricità si è rivelato migliore dal punto di vista del benessere dell' animale rispetto all' asfissia, mentre la dieta è stata ininfluenta sulla risposta allo stress degli animali alla macellazione. Le matrici alternative invece non si sono dimostrate dei validi indicatori di stress per quanto riguarda questi due metodi di macellazione, non essendo in grado di mostrare le differenze di produzione del cortisolo che invece vengono ben evidenziate nel plasma.

4.2. BENESSERE DELLA SPIGOLA (*DICENTRARCHUS LABRAX*) IN RELAZIONE ALLE CONDIZIONI DI DENSITÀ DI STOCCAGGIO E DEI LIVELLI DI OSSIGENO DISCIOLTO NELLE FASI DI PRE-MACELLAZIONE

4.2.1. Introduzione

Le procedure di pre-macellazione e macellazione sono fasi critiche dell' allevamento dei pesci sia in termini di benessere animale che in termini di qualità del prodotto finale. Dato il loro impatto dal punto di vista etico e produttivo, dovrebbero essere condotte senza causare eccessivo eccitamento, paura o condizioni di stress in modo da limitare anche l' innescarsi di alcuni processi biochimici che hanno luogo a livello della carne e influenzano negativamente la qualità del prodotto finale. Prima della macellazione, generalmente, i pesci vengono lasciati a digiuno per alcuni giorni (1-3 giorni a seconda della temperatura) per garantire lo svuotamento del canale digerente, e, quando non vengono macellati immediatamente, vengono pescati, eventualmente trasferiti di vasca se non di impianto, e comunque mantenuti a densità di stoccaggio elevate (oltre 70-100 kg m³) prima di essere uccisi (Bagni *et al.*, 2007; Poli *et al.*, 2005). Il processo di cattura è un momento molto traumatico per il pesce che, insieme al confinamento in sovraffollamento, oltre a produrre uno stato potenzialmente stressogeno e quindi di malessere nel pesce, determina un' attività muscolare elevata che depaupera le riserve energetiche e determina produzione di acido lattico, due fattori che influenzano la qualità del filetto e la sua conservabilità. La cattura, il confinamento in sovraffollamento, le condizioni critiche di ossigeno disciolto e infine la

manipolazione caratterizzano in molti casi le fasi *pre mortem* del pesce e producono inevitabilmente uno stato di stress negli animali soprattutto se a queste condizioni si associano perdita di scaglie, abrasioni e prolungata agonia (Pankhurst e Sharples, 1992). A differenza dei salmonidi, gli studi dell'effetto delle procedure di pre-macellazione sullo stress e sui processi *post-mortem* della spigola si sono condotti solo di recente (Poli *et al.*, 2005; Bagni *et al.*, 2007; Simontacchi *et al.*, 2008). Nell' ambito del progetto PRIN 2005 già citato, la ricerca ha inteso quindi valutare la risposta allo stress, in termini di variazione dei livelli di cortisolo, in spigole sottoposte a condizioni di pre-macellazione differenti per densità di stoccaggio e livelli di ossigeno disciolto dell' acqua.

4.2.2. Materiali e metodi

La sperimentazione è stata svolta presso il Centro Ittico Valle Bonello di Veneto Agricoltura (Legnaro, Padova). Poiché in una prima sperimentazione le analisi hanno rivelato livelli elevati di cortisolo già nel plasma degli animali di controllo, la sperimentazione è stata replicata l' anno successivo (seconda sperimentazione) facendo attenzione a ridurre al massimo i tempi di pesca e di trasporto alle vasche sperimentali.

In entrambe le sperimentazioni spigole adulte (peso medio 605 ± 105 g), mantenute a digiuno da due giorni, sono state pescate mediante reti da una vasca di allevamento esterna e trasferite in vasche di pre-macellazione distanti circa 400 metri dalle prime e alloggiate presso un capannone. Gli animali sono stati ripartiti in quattro gruppi, secondo un disegno sperimentale bi-fattoriale,

che ha considerato come variabili la densità di sosta *pre mortem* (50 e 150 kg/mc) e la concentrazione di ossigeno nell'acqua, normale (8 -10 ppm) e ipossica (< 6 ppm). Ciascuna condizione è stata replicata in 2 vasche. Un gruppo di pesci, utilizzato come controllo, è stato campionato subito dopo la pesca ed il trasporto al capannone, mentre gli altri gruppi dopo 2 ore di sosta nelle vasche di pre-macellazione. A 10 animali per condizione sperimentale sono stati prelevati il sangue, il muco, una porzione di pinna e di muscolo. Al momento dei prelievi, i pesci sono stati mantenuti in acqua e ghiaccio per 10' e poi, una volta registrati la lunghezza e il peso e prelevato il sangue, sono stati sacrificati tramite rapida resezione della colonna vertebrale. I campioni sono stati trasportati in borsa termica al laboratorio del Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie (tempo di trasporto circa 2 ore e mezza) dove tutte le matrici e il plasma ottenuto dalla centrifugazione del sangue sono stati congelati e stoccati a -20°C fino al momento delle analisi. Il dosaggio del cortisolo è stato effettuato tramite RIA e l' analisi, descritta in dettaglio nel precedente capitolo (pagg. 29-39), è stata messa a punto e validata per le matrici di spigola nello studio descritto da Simontacchi *et al.* (2008).

4.2.3. Analisi dei dati

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando il software Statistica 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Per valutare l' influenza delle condizioni di pre-macellazione sui livelli plasmatici di cortisolo degli animali si è applicata l' Analisi della Varianza utilizzando la procedura GLM (General

Linear Model) secondo un arrangiamento bifattoriale (2x2) con la densità e l'ossigeno disciolto come possibili fattori di variabilità. Eventuali differenze fra il cortisolo delle matrici nelle varie condizioni sperimentali sono state testate tramite ANOVA ad una via e successivo Test di Tukey *a posteriori*. Il cortisolo plasmatico e quello rilevato nelle matrici alternative nella seconda sperimentazione è stato correlato tramite correlazione di Pearson. Nel testo, i risultati sono espressi come media \pm errore standard (S.E.) e sono state considerate significative differenze tra le medie associate ad una probabilità inferiore allo 0,05.

4.2.4. Risultati e discussione

I livelli di cortisolo registrati nelle matrici di spigola nelle due sperimentazioni sono riportati in fig.11 e in tabella 4. Nella prima sperimentazione i livelli di cortisolo plasmatico degli animali di controllo sono risultati molto elevati e non statisticamente diversi da quelli degli animali stabulati per due ore nelle vasche di premacellazione ($P < 0,001$). Il cortisolo delle altre matrici (muco, contenuto intestinale, muscolo e pinna) invece si è mantenuto a livelli significativamente più bassi nei controlli rispetto a quello degli animali stabulati alle diverse condizioni sperimentali (Tab.4). L'elevato livello di cortisolo plasmatico degli animali di controllo è stato probabilmente causato da procedure di pesca troppo lunghe ed è per questa ragione che la sperimentazione è stata ripetuta qualche mese dopo cercando di ridurre i tempi di questa fase. Nella seconda sperimentazione il cortisolo di tutte le matrici, compreso il plasma, si è rivelato

significativamente più basso nei controlli rispetto agli animali mantenuti nelle vasche di pre-macellazione indicando che effettivamente le procedure lunghe di pesca avevano influito sullo stato di stress degli animali nella prima sperimentazione. Il cortisolo plasmatico e quello delle altre matrici testate si è dimostrato altamente correlato con quello di muco e muscolo e correlato, in modo meno marcato ma comunque significativo, con quello della pinna (fig.12). L' Analisi della Varianza fattoriale non ha messo in evidenza influenze né della densità di stoccaggio né della concentrazione di ossigeno disciolto sui livelli di cortisolo plasmatico (1° sperimentazione: $P=0,38$ per densità e $P=0,62$ per concentrazione di ossigeno; 2° sperimentazione: $p=0,88$ per densità e $P=0,10$ per concentrazione di ossigeno). Questo risultato si è ripetuto anche nella seconda sperimentazione e consente di ipotizzare che il trasferimento e la stabulazione nelle vasche di pre-macellazione siano condizioni già sufficientemente stressanti da causare l' innalzamento dei livelli dell' ormone a livelli tali da non essere alterati da fattori quali la diversa densità di stoccaggio o la concentrazione di ossigeno. Questo indica che già a livello di cattura e confinamento nelle fasi di pre-macellazione è necessario prestare la massima attenzione riducendo i tempi e cercando di rendere queste pratiche meno traumatiche possibile o in alternativa di lasciare agli animali un certo periodo di recupero dallo stress prima della macellazione. Il cortisolo presente nelle matrici diverse dal plasma negli animali di controllo, ma anche in quelli sperimentali, è risultato sempre più basso ad indicare che probabilmente lo steroide prodotto dal tessuto interrenale non ha avuto tempo sufficiente per diffondere dal sangue

alle altre matrici. Questa ritardata presenza dell' ormone nelle matrici potrebbe essere un utile strumento per evitare di avere controlli con livelli già elevati dell' ormone causati dallo stress dovuto al prolungarsi delle pratiche alle quali gli animali vengono sottoposti (quando le pratiche ai quali vengono sottoposti gli animali (pesca, cattura, movimentazione, prelievo di sangue). Lo studio di dinamica ormonale che segue in questa tesi fornisce indicazioni più precise sui tempi di diffusione del cortisolo nelle diverse matrici.

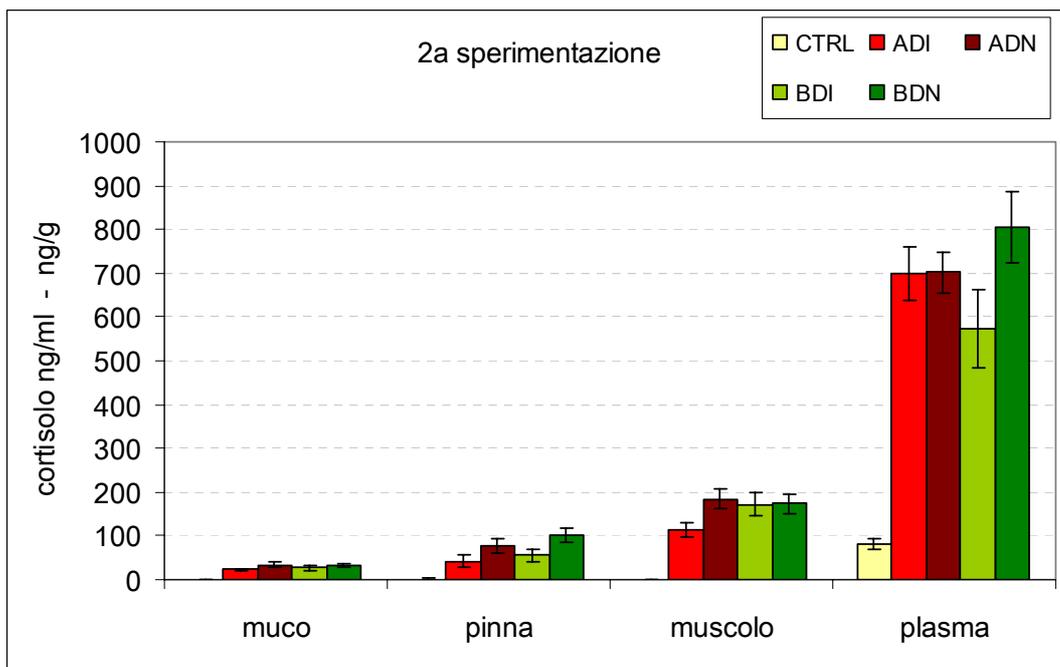
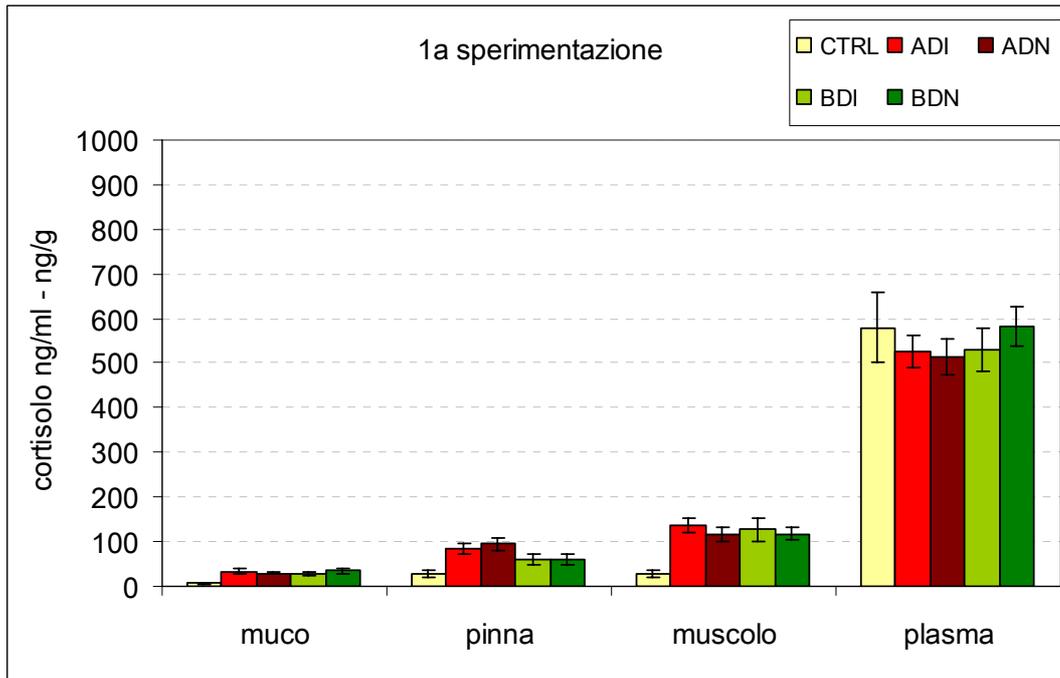


Fig. 11. Valori di cortisolo nelle matrici di spigole sottoposte a stabulazione in diverse condizioni di densità di stoccaggio e di concentrazione di ossigeno disciolto nelle due sperimentazioni. Le barre rappresentano gli S.E.

CTRL: controllo; BDN: bassa densità e normossia; BDI: bassa densità ed ipossia; ADN: alta densità e normossia; ADI: alta densità ed ipossia. Unità di misura: plasma e muco ng/ml; muscolo e pinna ng/g.

n		CTRL	BDN	BDI	ADN	ADI
		10	10	10	10	10
1a sperimentazione						
plasma	ng/ml	579,6±79,2	583,1±43,5	531,3±48,5	515,1±40,6	524,3±36,1
muco	ng/ml	7,6±1,6	35,1±5,6	29,5±4,4	29,5±3,3	33,4±7,0
pinna	ng/g	28,4±8,6	59,1±12,3	59,0±12,2	95,9±13,7	84,3±12,7
muscolo	ng/g	27,5±7,2	118,1±13,4	127,1±25,5	115,4±15,6	137,9±15,8
2a sperimentazione						
plasma	ng/ml	80,2±12,6	806,6±81,3	572,0±88,8	701,3±45,3	698,9±61,5
muco	ng/ml	0,75±0,22	31,3±4,7	26,8±6,7	33,7±5,0	22,6±2,1
pinna	ng/g	1,8±0,6	100,1±16,3	56,2±14,7	77,1±14,7	42,2±13,3
muscolo	ng/g	1,0±0,2	174,1±22,9	172,5±26,3	184,7±21,4	112,8±16,8

Tab.4. Valori di cortisolo nelle varie matrici testate nelle due sperimentazioni.

Pertanto, in conclusione è possibile affermare che le diverse condizioni di pre-macellazione testate sembrano ininfluenti sulla concentrazione di cortisolo rispetto alle pratiche di pesca. Inoltre i risultati ottenuti permettono di evidenziare come le matrici testate siano delle valide alternative al plasma per l' analisi del benessere della spigola in fase di pre-macellazione.

I risultati di questo studio trovano conferma in un lavoro di Poli *et al.* (2005) in cui le stesse variabili (densità di stoccaggio in vasca e concentrazione di ossigeno) non hanno influenzato la concentrazione del cortisolo plasmatico in spigole adulte in fase di pre-macellazione.

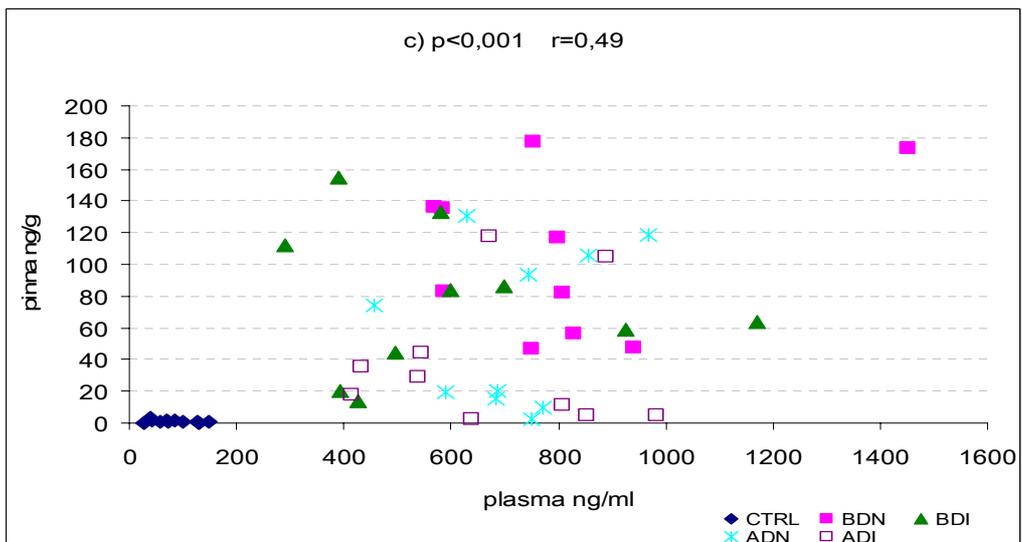
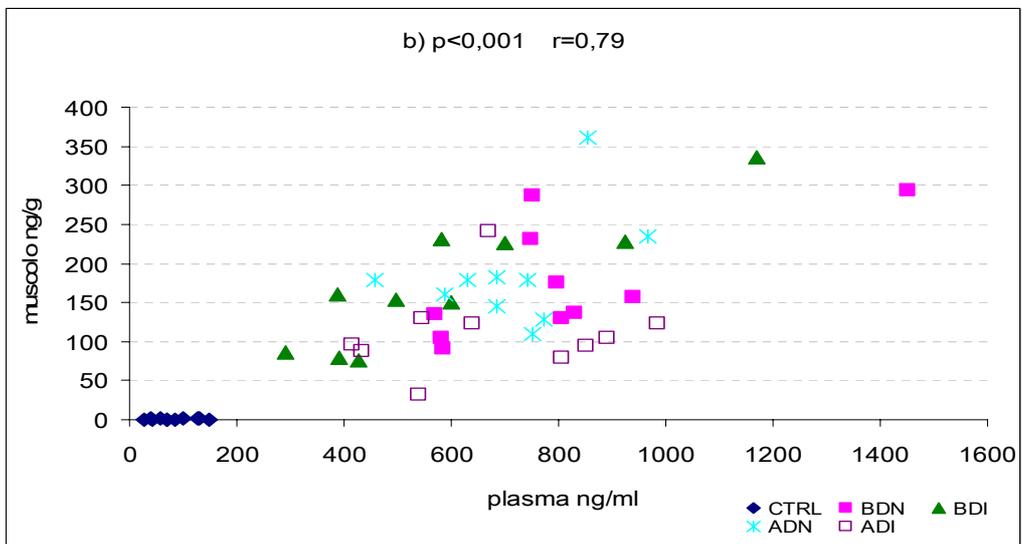
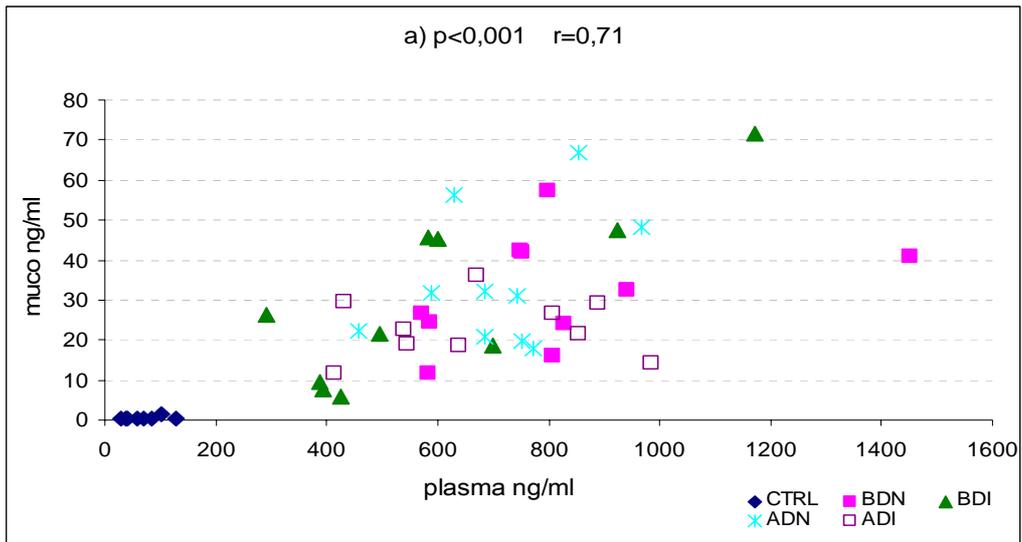


Fig.12. Correlazione fra il cortisolo plasmatico e quello del muco (a), del muscolo (b) e della pinna (c) nella seconda sperimentazione.

4.3. VALUTAZIONE DEI TEMPI DI DIFFUSIONE DEL CORTISOLO IN VARIE MATRICI DI SPIGOLA

4.3.1. Introduzione

Negli ultimi anni con lo sviluppo dell'acquacoltura è aumentato l'interesse nei riguardi delle problematiche legate al benessere delle specie ittiche allevate sia per ragioni etiche che produttive (Montero *et al.*, 1999; Vazzana *et al.*, 2002). Come si è detto, il benessere dei pesci è influenzato dalle pratiche di allevamento (densità di stoccaggio, procedure di selezione delle taglie, trasporto, qualità dell'acqua) e viene valutato attraverso la misura di indici comportamentali, anatomici e fisiologici (Montero *et al.* 1999; Vazzana *et al.* 2002; Huntingford *et al.*, 2006). Tra questi, il cortisolo rappresenta uno degli indicatori più comunemente utilizzati in quanto la sua concentrazione ematica aumenta drasticamente in conseguenza di eventi stressanti (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen *et al.*, 1999). La cattura, la manipolazione e il prelievo di sangue, tuttavia, rappresentano già di per sé uno stress per l'animale (Laidley e Leatherland, 1988; Marino *et al.*, 2001) ed essendo l'aumento dei parametri ematici molto rapido questi ultimi non sempre sono degli indicatori affidabili di uno stato di stress. Da qui nasce l'esigenza di disporre di metodi meno invasivi e sensibili all'effetto prelievo e/o applicabili in animali nei quali non è possibile prelevare il sangue come ad esempio nel " *post mortem*". La misura del cortisolo in acqua per esempio, indagata negli ultimi anni (Scott *et al.*, 2001; Ruane e Komen, 2003; Scott e Ellis, 2007), è un metodo totalmente non invasivo ma che, per essere applicabile, necessita di determinate

condizioni quali il ricircolo dell' acqua e la conoscenza di informazioni precise quali la biomassa, il tasso di ricambio idrico e il volume delle vasche per il calcolo del tasso di rilascio dell' ormone (Scott e Ellis, 2007).

Data la natura lipofila dell' ormone e la presenza ubiquitaria dei suoi recettori, altri autori, in questi anni, hanno cercato di individuare delle matrici alternative al plasma per il dosaggio del cortisolo indagando su muco cutaneo, contenuto intestinale, tessuto muscolare e pinna caudale. In particolare l' indagine è stata condotta sulla spigola (*Dicentrarchus labrax*) sottoposta a condizioni diverse di pre-macellazione in termini di densità di stoccaggio (Simontacchi *et al.*, 2008) e successivamente ancora sulla spigola e su altre due specie di interesse commerciale, la carpa comune (*Cyprinus carpio*) e la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) sottoposte ad un evento stressante tipico delle pratiche di acquacoltura quale il trasporto (Bertotto *et al.*, 2010). Questi autori hanno dimostrato la validità dell' utilizzo di queste matrici per la valutazione dei livelli di cortisolo e quindi dello stato di stress degli animali e, dai risultati ottenuti, hanno ipotizzato che lo steroide diffonda in tempi diversi dal sangue ai vari fluidi e tessuti, fenomeno questo che le renderebbe uno strumento valido per ovviare ai problemi legati al prelievo.

Nell' intento di confermare questa ipotesi, il presente studio intende valutare i tempi di comparsa del cortisolo in matrici quali il plasma, il muco, il muscolo e la pinna in spigole sottoposte a stress acuto determinato da esposizione all' aria.

4.3.2. Materiali e metodi

La sperimentazione è stata svolta presso l' Impianto Ittico Sperimentale di Pellestrina (Veneto Agricoltura, Legnaro). Spigole di 14 mesi di età sono state esposte all' aria per 2 minuti mediante sollevamento di una rete posta nella vasca di stoccaggio. Prima di sottoporre gli animali al fattore stressogeno, 8 individui sono stati catturati e immediatamente sacrificati (animali di controllo). Una volta esposto gli animali allo stress (tempo zero), 8 individui sono stati sacrificati ogni 30 minuti fino a 1 ora e mezza dall' evento stressante. Tutti gli animali sono stati sacrificati mediante rescissione della colonna vertebrale preceduta da anestesia (MS222 Sandoz). A ciascun animale sono stati prelevati il sangue, il muco cutaneo utilizzando una palettina di plastica, una porzione di 1cmx1cmx1cm di muscolo laterale e una porzione di 1cmx1cm di pinna caudale. I campioni e il plasma ottenuto dalla centrifugazione del sangue sono stati quindi congelati e mantenuti a -20°C fino al momento dell' analisi. Le matrici sono state processate e sottoposte ad analisi RIA, come descritto nel precedente capitolo (pag. 29-39), per la valutazione del cortisolo.

4.3.3. Analisi dei dati

I dati sono stati analizzati utilizzando il software Statistica 8.0. (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Per valutare l' incremento dei livelli di cortisolo nelle varie matrici nei diversi tempi monitorati si è utilizzata l' analisi della varianza (ANOVA) e laddove erano presenti differenze il test di Tukey *a posteriori*. Il livello di

significatività è stato posto uguale a $p < 0,05$. Nel testo e nelle tabelle i risultati sono riportati come media \pm l' errore standard (S.E.).

4.3.4. Risultati e discussione

Le concentrazioni di cortisolo rilevate nelle varie matrici nei diversi tempi di campionamento sono riportate in Tab.5. L' analisi della varianza applicata per valutare differenze fra le concentrazioni di ormone nella stessa matrice nei diversi tempi di campionamento ha rilevato che il cortisolo plasmatico e quello muscolare aumentano in modo significativo dopo 60' dall' esposizione degli animali all' evento stressante (rispettivamente $P < 0,05$ e $P < 0,001$). Le concentrazioni dello steroide presente nel muco e nella pinna invece aumentano più lentamente e l' incremento diventa significativo dopo 1 ora e mezza dall' evento stressante (rispettivamente $P < 0,05$ e $P < 0,001$).

n°		CTRL	30'	60'	90'
		8	8	8	8
plasma	ng/ml	219,8 \pm 44,0	585,7 \pm 120,6	1015,7 \pm 237,1	1014,8 \pm 295,2
muco	ng/ml	1,8 \pm 0,5	9,4 \pm 1,3	11,4 \pm 4,7	13,0 \pm 3
muscolo	ng/g	10,5 \pm 3,3	23,5 \pm 3,8	24,9 \pm 10,9	58,3 \pm 6,6
pinna	ng/g	13,8 \pm 1,5	40,9 \pm 7,1	88,9 \pm 16,4	201,1 \pm 35,5

Tab.5. Concentrazioni medie di cortisolo nelle varie matrici testate a 0, 30, 60 e 90 minuti dall' evento stressante. CTRL: controllo.

Va fatto tuttavia notare che i livelli di cortisolo dei controlli non sono basali ma piuttosto elevati se si confrontano sia con alcuni dati presenti in bibliografia (Planas *et al.*, 1990; Cerda'-Reverter *et al.*, 1998; Marino *et al.*, 2001; Bertotto *et al.*, 2010) che con dati riportati in questa tesi nella precedente sperimentazione su spigole adulte (pag.58-66) indicando che gli animali, prima della sperimentazione, sono stati esposti ad uno stress. Valutando i possibili fattori di stress si è ipotizzato che, data la posizione della vasca sperimentale, gli animali siano stati disturbati dal passaggio del personale tecnico dell' impianto o degli operatori stessi della sperimentazione nelle fasi iniziali di preparazione della stessa. Il fatto di partire da livelli così alti di cortisolo ha probabilmente rallentato l' innalzamento della sua concentrazione in risposta allo stress prodotto dall' esposizione all' aria e questo spiega l' intervallo di tempo così ampio registrato prima dell' aumento dell' ormone nel plasma. E' riconosciuto infatti che l' innalzamento del cortisolo plasmatico in pesci sottoposti a vari eventi stressanti è dell' ordine di pochi minuti (Marino *et al.*, 2001).

In conclusione, la sperimentazione ha confermato la capacità di muco, muscolo e pinna di registrare la risposta dell' animale ad uno stress in termini di innalzamento dei livelli di cortisolo; inoltre ha messo in evidenza che l' aumento delle concentrazioni dello steroide avviene in tempi diversi nelle varie matrici: in modo più repentino in plasma e muscolo e più ritardato in muco e pinna. Questo risultato, sebbene vada confermato conducendo la sperimentazione con animali mantenuti in condizioni meno stressanti quindi con

livelli basali più bassi di cortisolo, suggerisce che muco e pinna possano essere utilizzati per valutare lo stato di stress, oltre che in animali macellati in cui il prelievo di sangue non è possibile, in animali mantenuti in condizioni tali da rendere impossibile la riduzione dello stress prodotto dalle pratiche di pesca e manipolazione.

4.4. ONTOGENESI DELLA RISPOSTA ALLO STRESS NELLA SPIGOLA

4.4.1. Introduzione

I pesci allevati sono soggetti a molti stimoli ambientali, sociali e fisici che possono essere fonte di stress. Come più volte sottolineato, l' esposizione ad un fattore di stress determina l' attivazione dell' asse ipotalamo-ipofisi-interrenale (HPI) del pesce ed il rilascio di ormoni quali il cortisolo (Wendelaar Bonga 1997, Mommsen *et al.* 1999). Il cortisolo induce risposte secondarie legate principalmente alla richiesta energetica necessaria ad opporsi alla perturbazione prodotta dal fattore stressogeno ed è pertanto comunemente utilizzato come indicatore di stress nei pesci (Pickering *et al.*, 1982, Van Raaij *et al.*, 1996; Rotland e Tort, 1997). Il cortisolo tuttavia è coinvolto anche in molteplici altri processi fisiologici come l' osmoregolazione, l' immunocompetenza e lo sviluppo (schiusa, crescita e metamorfosi). Nei pesci, lo sviluppo dell' asse HPI e l' acquisizione della capacità di rispondere allo stress hanno luogo nelle prime fasi di vita (uova, larve e giovanili) in momenti diversi a seconda della specie: prima o poche ore dopo la schiusa o al completamento della metamorfosi (De Jesus *et al.*, 1991; De Jesus e Hirano, 1992; Hwang *et al.*, 1992; Sampath-Kumar *et al.*, 1995;1997).

Il cortisolo è già presente nelle uova non fecondate e nei primi stadi di sviluppo embrionale di molti teleostei. L' ipotesi più accreditata è che questo cortisolo sia di origine materna e che venga trasferito durante l' oogenesi nel vitello dell' uovo, come succede per altri ormoni lipofili, quali i tiroidei e gli steroidi sessuali (Feist *et al.*, 1990; De Jesus *et al.*, 1991; De Jesus e Hirano, 1992). La

successiva scomparsa di questi ormoni dal sacco vitellino potrebbe essere il risultato di un normale metabolismo o, opinione maggiormente condivisa dai ricercatori, del loro utilizzo durante le fasi di crescita e differenziazione dell' embrione; il cortisolo ricompare nell' animale solo dopo l' acquisizione della capacità di operare una sintesi endogena dell' ormone (Brown e Bern, 1989).

Lo studio dello sviluppo dell' asse HPI nei pesci d' interesse commerciale è un importante strumento di gestione dell' allevamento. Allo stato attuale, le informazioni relative alla spigola sono limitate. Questo studio si propone quindi di indagare l' attivazione dell' asse HPI nelle primissime fasi di sviluppo della spigola (dalla schiusa a 15 giorni di età) mediante l' analisi dei livelli di cortisolo in larve esposte ad uno stress termico.

4.4.2. Materiali e metodi

La sperimentazione è stata effettuata presso l' Impianto Ittico Sperimentale di Pellestrina (Veneto Agricoltura, Legnaro). Le uova di spigola sono state ottenute da animali adulti (3 femmine e 6 maschi) condizionati termicamente e stimolati con una iniezione di un analogo di sintesi dell' ormone rilasciante le gonadotropine (GnRH; des-Gly10, [d-Ala6] LH-RH ethylamide; Sigma, USA; Colombo et al. 1995). Una volta raccolte, le uova fecondate sono state trasferite in vasche tronco-coniche da 500 lt a ricambio continuo con acqua di mare riscaldata e filtrata (temperatura 14° C, salinità 33 ppt, ossigeno disciolto al 100% di saturazione) fino al momento della schiusa. Le pre-larve sono state

quindi trasferite in vasche da 100 lt e mantenute al buio per tutto il periodo di riassorbimento del sacco vitellino. Con l' inizio dell' alimentazione esogena (nauplii di artemia integrati *ad libitum*) a partire dall' 11° giorno dalla schiusa (DPH, days post hatching) le larve sono state sottoposte a fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 di buio (12L:12B) e temperatura di 14-17°. Gli animali sono stati campionati a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 DPH (fig.13). Per ciascuna età si sono campionati 3 gruppi. Un primo gruppo è stato sacrificato immediatamente dopo la raccolta (animali di controllo), un secondo gruppo è stato sottoposto ad uno shock termico (animali stressati) e infine un terzo gruppo è stato campionato dopo essere stato trasferito e mantenuto in un' altra vasca per tutta la durata dello shock termico, per simulare le condizioni sperimentate dalle larve stressate senza l' innalzamento della temperatura (animali trasferiti).

Lo shock termico è stato indotto utilizzando un bagno termostatico nel quale le larve venivano trasferite al momento della sperimentazione. All' inizio di ogni shock, la temperatura del bagno veniva uniformata a quella della vasca di provenienza (temperatura iniziale da 14,2° a 17,3 °C) e una volta trasferite le larve, innalzata gradualmente di 10°C e mantenuta tale per un' ora. Il tempo necessario per raggiungere la temperatura finale è stato di 90±7 minuti (media ± errore standard). Tutte le larve sono state sacrificate mediante eccesso di anestetico MS222 (Sandoz, Milano) e mantenute a -20°C fino al momento dell' analisi.

Il cortisolo è stato dosato sulle larve *in toto* mediante RIA su micropiastra secondo quanto descritto da Simontacchi *et al.* (2009). Pools di 50-100 pre-

larve o larve sono stati trattati ed estratti come descritto nel paragrafo a pag.34 e le varie aliquote, a seconda della quantità di steroide presente, sono state usate per la determinazione RIA (pagg 29-39).

Per validare la metodica sulle larve di spigola si sono utilizzati il test di parallelismo e il test di ripetibilità intra-analisi (intra-assay).

4.4.3. Analisi dei dati

L' analisi dei dati è stata effettuata con il software Statistica 8.0 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA). Le concentrazioni di cortisolo nel testo, nei grafici e nelle tabelle sono riportate come media \pm l' errore standard (S. E.). Le differenze fra i gruppi sperimentali nelle diverse età sono state valutate mediante analisi della varianza (ANOVA) e, quando significative, mediante Test di Tukey *a posteriori*. L' influenza di fattori quali l' età e il trattamento sulle concentrazioni di cortisolo è stata testata tramite analisi della varianza nidificata (ANOVA nested). Il livello di significatività usato è stato $P < 0,05$. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate sui dati trasformati in $\log(x+1)$.

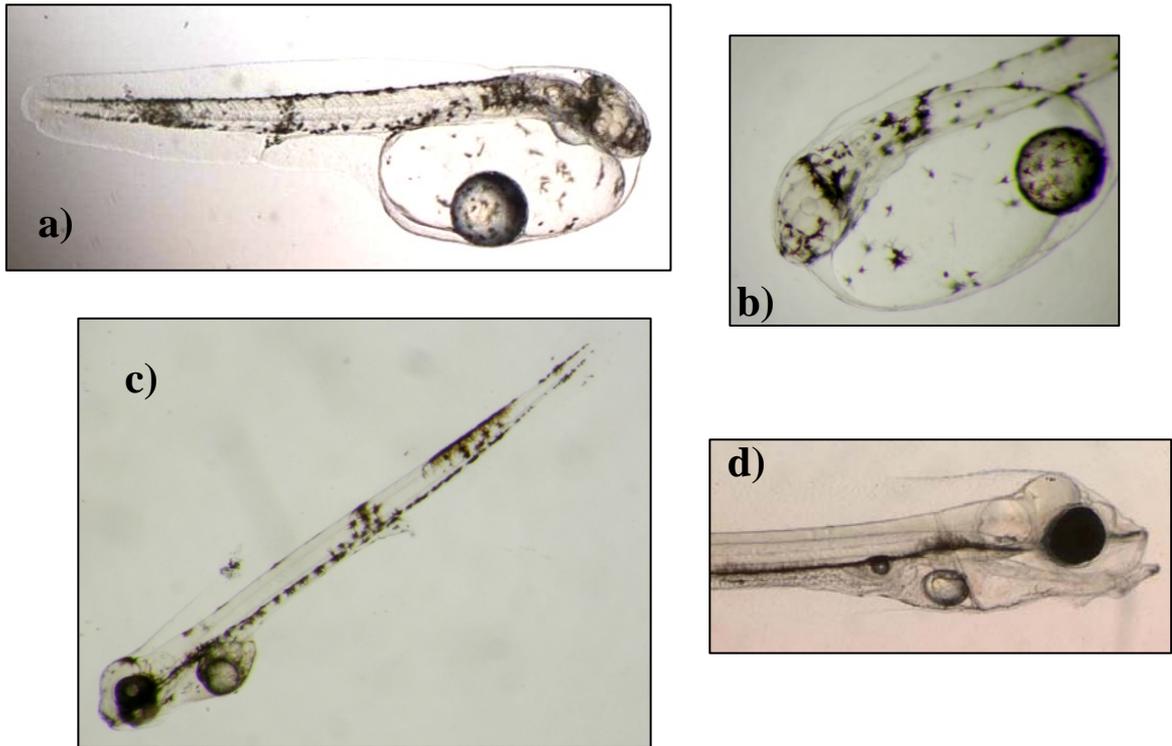


Fig.13. Pre-larve e larve di spigola nei primi giorni di sviluppo: a) e b) alla schiusa; c) 4DPH; d) 8DPH

4.4.4. Risultati e discussione

Il risultato del test di parallelismo, espresso come regressione lineare fra il reciproco del fattore di diluizione e la concentrazione corrispondente dello steroide, ha evidenziato buon parallelismo dei campioni diluiti con la curva standard ($y=105,8x-0,28$; $r^2=0,996$). Anche il test di ripetibilità intra-analisi ha mostrato buona precisione essendo il coefficiente di variazione riscontrato inferiore al 10% (CV %=5,8).

Le concentrazioni di cortisolo negli animali dei diversi gruppi sperimentali sono riportate in fig. 14. L' ANOVA nidificata ha indicato che sia il trattamento che gli animali hanno subito (nessuno trattamento, shock termico o trasferimento) che

l'età hanno influenzato i livelli di cortisolo ($P < 0,001$ in entrambi i casi). Questo significa che i livelli di cortisolo dipendono dal trattamento che gli animali hanno subito ovvero se sono stati o meno sottoposti ad uno stress (termico o trasferimento) e dall'età. I livelli di cortisolo infatti complessivamente aumentano con l'età per raggiungere il massimo in tutti i gruppi sperimentali a 15 giorni dalla schiusa.

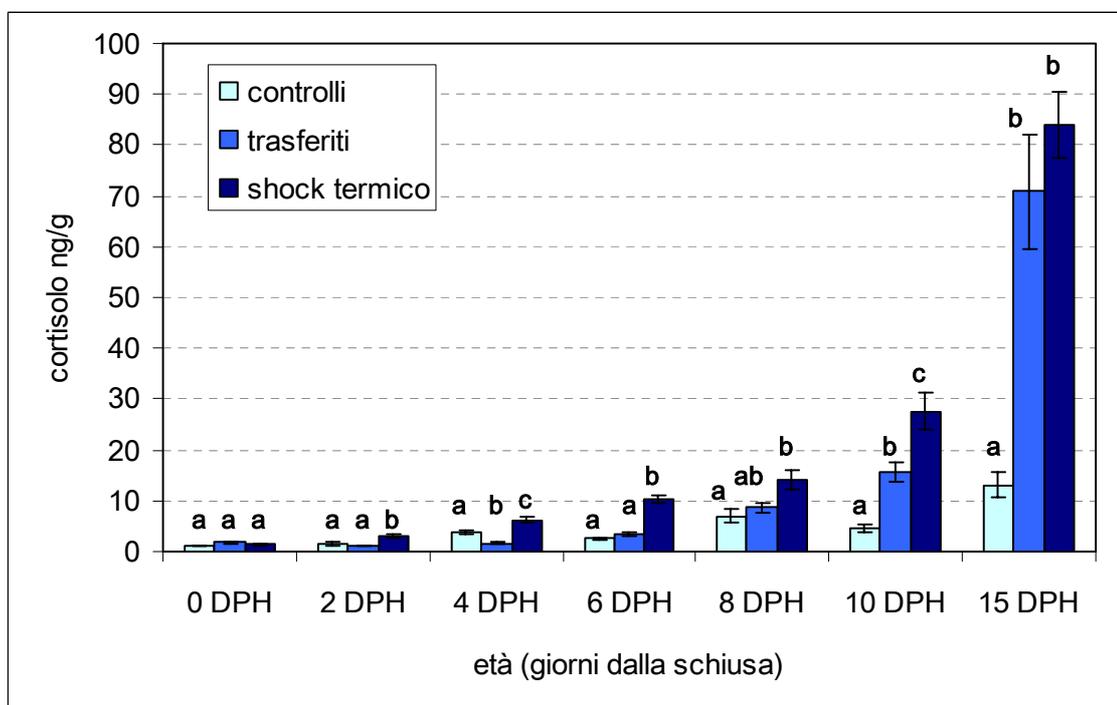


Fig. 14. Concentrazioni di cortisolo nei diversi gruppi sperimentali alle diverse età. I dati sono medie \pm SE. Lettere diverse indicano differenze significative fra gruppi all'interno della stessa classe di età.

Andando ad analizzare in dettaglio le differenze fra gruppi sperimentali all'interno della stessa classe di età si può notare che le larve sottoposte a

shock termico alla schiusa non hanno mostrato concentrazioni di cortisolo più elevate rispetto agli animali dei controlli e ciò indica che in questa fase dello sviluppo l'asse HPI non è funzionante. La sua attivazione tuttavia sembra essere repentina nella specie in quanto già a 2 giorni dalla schiusa i livelli di cortisolo degli animali sottoposti a shock termico aumentano in maniera significativa rispetto ai controlli e si mantengono tali in tutte le successive classi di età testate. È interessante notare che le concentrazioni di cortisolo degli animali stressati hanno fatto registrare i livelli più elevati dello steroide a 15 giorni dalla schiusa, il che suggerisce un aumento graduale della funzionalità dell'asse HPI. La precoce capacità di rispondere allo stress è stata riportata anche per altre specie quali per esempio l'ombrina rossa (*Sciaenops ocellatus*), il salmone reale (*Oncorhynchus tshawytscha*) e tilapia (*Oreochromis mossambicus*), (Applebaum *et al.*, 2010; Feist e Schreck, 2002; Pepels e Balm, 2004).

I livelli di cortisolo degli animali trasferiti si sono dimostrati nella maggior parte dei casi simili a quelli dei controlli. I livelli più elevati e significativamente diversi da quelli dei controlli si sono registrati a 10 e 15 giorni dalla schiusa indicando, a conferma di quanto visto con lo shock termico, un probabile affinamento della funzionalità dell'asse HPI in questa fase dello sviluppo. L'aumentata capacità di rispondere allo stress nelle larve con l'aumentare dell'età è confermata dall'ANOVA nidificata ($P < 0,001$).

Anche i livelli di cortisolo basale aumentano con l'età anche se in maniera graduale. Questi infatti si mantengono abbastanza costanti e bassi nelle prime

classi di età (0-8 DPH) per poi mostrare un incremento evidente fra il 10° e il 15° giorno dalla schiusa. Questo innalzamento ha luogo nel momento di passaggio dall' alimentazione endogena a quella esogena e potrebbe essere a questo collegato. Infatti il cortisolo, essendo implicato nel metabolismo intermedio, potrebbe mediare il passaggio da una situazione di costante presenza di una fonte di energia (tuorlo) ad una situazione di intermittente apporto di cibo, quale si verifica con l' inizio dell' alimentazione esogena (Barry *et al.*,1995).

Le informazioni sulla risposta allo stress nella spigola nelle prime fasi di sviluppo presenti in bibliografia si limitano ad un unico studio condotto da Pavlidis *et al.* nel 2010. Gli autori tuttavia hanno valutato i livelli di cortisolo in larve sottoposte a stress prodotto da corrente elevata in animali a partire dagli 11 giorni dalla schiusa, pertanto il confronto con i risultati del presente studio è possibile solamente con le ultime classi di età investigate (10 e 15 DPH). Pavlidis *et al.* (2010) riportano un innalzamento dei livelli di cortisolo negli animali stressati ad 11 giorni dalla schiusa e quindi la capacità delle larve di rispondere ad uno stress già in questa fase, con concentrazioni intermedie e compatibili con quelle riportate nel presente studio (valori di circa 40 ng/g a 11 dph *vs* rispettivamente 28 ± 3 e 84 ± 7 ng/g a 10 e 15 dph). Viene confermata quindi la capacità di rispondere ad uno stress nelle prime fasi di sviluppo della spigola anche se il presente studio, investigando i primi 15 giorni dalla schiusa identifica il momento preciso in cui questa si evidenzia.

Pavlidis *et al.* (2010) riportano inoltre il livello basale di cortisolo delle larve alla schiusa, che risulta notevolmente inferiore a quanto riscontrato dal presente studio ($0,12 \pm 0,01$ vs $1,2 \pm 0,1$ ng/g). L' incremento dei livelli basali di cortisolo al momento dell' alimentazione esogena trova i due studi d' accordo ed è confortato dalla presenza dello stesso andamento anche in specie diverse dalla spigola quali per esempio l' orata e l' ombrina rossa (Applebaum *et al.*, 2009; Szisch *et al.*, 2005).

Il presente studio indica che la spigola è in grado di rispondere ad uno stress già nei primissimi giorni di vita ed è pertanto importante tenere conto di questa informazione nella gestione delle larve durante il ciclo produttivo e cercare di non sottoporre gli animali a pratiche particolarmente stressanti nell' intento di limitare la mortalità data la fragilità di questi animali all' inizio del loro ciclo vitale.

5. CONCLUSIONI

Lo scopo di questa tesi è stato valutare la possibilità di utilizzare il cortisolo come indicatore di stress, in specie ittiche d' interesse commerciale, al fine di ottimizzare alcune pratiche, legate all' allevamento, che possono essere stressanti per questi animali.

Inoltre, date le problematiche legate al dosaggio del cortisolo nel plasma, dovute al prelievo del sangue, negli animali adulti lo steroide è stato valutato anche in altre matrici quali muco, muscolo, pinna e contenuto intestinale.

I risultati della sperimentazione sulla trota iridea hanno indicato che diete a diverso contenuto di proteine vegetali non influiscono sulla risposta allo stress e che, alla macellazione, l' elettrostordimento, effettuato con strumenti appositamente messi a punto per la specie, è in grado di limitare lo stress. La valutazione del cortisolo in matrici diverse dal plasma ha indicato il muco e il contenuto intestinale come valide alternative al sangue per questo tipo di stress nella trota, mentre il muscolo e la pinna non si sono dimostrati sempre affidabili. Questo risultato è in contrasto con uno studio precedente ed è dovuto probabilmente al tipo di stress al quale gli animali sono stati sottoposti che ha determinato funzioni vitali ridotte che hanno impedito la diffusione dello steroide in queste matrici.

La sperimentazione sulla spigola, sottoposta a diverse condizioni di premacellazione in termini di ossigeno disciolto e densità di stoccaggio, ha indicato che entrambe le condizioni sembrano ininfluenti sulla concentrazione di cortisolo rispetto alla pratica di pesca e quindi è soprattutto questa fase che va

pianificata con cura per ridurre lo stress “ da macellazione” in questa specie . Inoltre i risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare come tutte le matrici testate siano delle valide alternative per l’ analisi del benessere della spigola in fase di pre-macellazione.

La sperimentazione sulla tempistica di diffusione del cortisolo nelle diverse matrici effettuata su spigola, sottoposta a stress da esposizione all’ aria, ha evidenziato un effettivo aumento del cortisolo nelle matrici testate, a conferma della validità del loro utilizzo nel monitoraggio dello stress; inoltre ha registrato un effettivo ritardo nella comparsa dello steroide, rispetto al plasma, nel muco e nella pinna. Questo risultato suggerisce che queste matrici possano essere utilizzate per valutare lo stato di stress, oltre che in animali macellati in cui il prelievo di sangue non è possibile, in animali nei quali è impossibile evitare lo stress prodotto dalle pratiche di pesca e manipolazione.

Infine, lo studio sull’ ontogenesi della risposta allo stress nella spigola ha indicato che questa specie è in grado di rispondere ad uno stress già nei primissimi giorni di vita ed è pertanto importante tenere conto di questa informazione nella gestione delle larve durante il ciclo produttivo e cercare di non sottoporre gli animali a pratiche particolarmente stressanti, data la fragilità di questi animali all’ inizio del loro ciclo vitale

BIBLIOGRAFIA

1. Ainsworth. A.J., Dexiang, C., Waterstratt, P.R., (1991). Changes in peripheral blood leukocytes percentages and function of neutrophils in stressed channel catfish. *J. Aquat. Anim. Health* 3, 41-47.
2. Anderson. D.P., 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Ann. Rev. Fish Dis.* 2, 281-307.
3. Applebaum, S.L., Wilson, A., Holt, G.J., Nunez, B.S., (2009). The onset of cortisol synthesis and the stress response is independent of changes in CYP11B or YP21 mRNA levels in larval red drum. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 269– 276.
4. Appleby, M. C. (1999). Tower of Babel: Variation in ethical approaches, concepts of welfare and attitudes to genetic manipulations. *Anim. Welf.* 8, 381– 390.
5. Arends, R.J., Mancera, J.M., Wendelaar Bonga, S.E. & Flik G (1999) The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *Journal of Endocrinology* 163 149– 157.
6. Arnold-Reed D.E. and Balment R.J. (1991). Atrial natriuretic factor stimulates in vivo and in vitro secretion of cortisol in teleosts. *J. Endocrinol.* 128: R17-R20.
7. Arnold-Reed, D.E. and Balment, R.J. 1994. Peptide hormones influence in vitro interrenal secretion of cortisol in the trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96: 85-91.
8. Ashley P. J. (2007). Fish welfare: Current issues in aquaculture. *App. Anim. Behav. Sci.*,doi:10.1016/j.applanim.2006.09.001.
9. Bagni, M., Civitareale, C., Priori, A., Ballerini, A., Finoia, M., Brambilla, G., Marino, G., (2007). Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 263:52-60.

10. Bamberger, C. M., Schulte, H. M. and Chrousos, G. P. (1996). Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr. Rev.* 17, 245– 261.
11. Baqué, S., Roca A., Guinovart, J.J., and Gómez-Foix, A.M.(1996). Direct activating effects of dexamethasone on glycogen mobilizing enzymes in primary cultured rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 26: 772-777.
12. Barrias, C., Oliva-Teles, A., (2000). The use of locally produced fish meal and other dietary manipulations in practical diets for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac. Res.* 31, 213– 218.
13. Barry T.P., Mallison J.A., Held J.A., and Parrish J.J. (1995). Ontogeny of the cortisol stress response in larval rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97: 57-65.
14. Barton, B. (1997). Stress in sunfish: past, present and future – a historical perspective. In *Fish Stress and Health in Aquaculture*, Society for Experiment Biology, Seminar Series 62 (Iwama, G. K., Pickering, A. D., Sumper, J. P. & Schreck, C. B., eds), pp. 1– 31. Cambridge: Cambridge University Press.
15. Barton, B.A. and Schreck, C.B. (1987). Influence of acclimation temperature on interrenal and carbohydrate stress responses in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquacult.* 62: 299-310.
16. Barton, BA. (2002). Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr Comp Biol*;42:517-25.
17. Bertotto, D., Poltronieri, C., Negrato, E., Majolini D., Radaelli e Simontacchi C. (2010). Alternative matrices for cortisol measurement in fish. *Aqua. Res.*, 41(8), 1261– 1267.
18. Beukema, J. J. (1970). Angling experiments with carp: decreased catchability through one trial learning. *Neth. J. of Zool.* 20, 81– 92.
19. Borski, R.J., Helms, L.M.H., Richman, N.H. III, and Grau, E.G. (1991). Cortisol rapidly reduces prolactin release and cAMP and ⁴⁵Ca²⁺ accumulation in the cichlid fish pituitary in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 2758-2762.

20. Braithwaite, V. A. (2006). Cognitive ability in fish. *Fish Physiol.* 24, 1-37.
21. Brodeur, J.C., Sherwood, J., Rasmussen, J.B., and Hontela A. (1997). Impaired cortisol secretion in yellow perch (*Perca Flavescence*) from lakes contaminated by heavy metals: in vivo and in vitro assessment: *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54: 2752-2758.
22. Broglio, C., Rodriguez, F. & Salas, C. (2003). Spacial cognition and its neural basis in
23. Broom, D. M. (1998). Welfare, stress and the evolution of feelings. *Advanc. Study Behav.* 27, 371– 403.
24. Broom, D.M, Johnson, K.G. *Stress and Animal Welfare*. London: Chapman & Hall, 1993.
25. Broom, D.M. (2001). *Coping with challenge. Welfare in animals including humans*. Dahlem University Press, Berlin.
26. Brown C.L. and Bern H.A. 1989. Thyroid hormones in early development, with special reference to teleost fishes. In “ Development, Maturation and Senescence of Neuroendocrine Systems: A Comparative Approach” , pp. 289-306. Schreibman M. and Scanes C. (eds). New York: Academic Press.
27. Brown, S.B., MacLatchy, D.L., Hara, T.J., and Eales, J.G. 1991. Effects of cortisol on aspects of 3,5,3' – triiodo-L-thyronine metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 81: 207-216.
28. Burel, C., Boujard, T., Tulli, F., Kaushik, S.J., (2000). Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapeseed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 188, 285– 298.
29. Carragher, J.F., Sumpter, J.P., Pottinger, T.G., and Pickering, A.D. (1989). The deleterious effect of cortisol implanation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L. and *Salmo gairdneri* Richardson. *Gen. Comp. Endocrinol.* 76: 310-321.
30. Cerdá-Reverter, J.M., Zanuy, S., Carrillo, M. & Madrid J. A. (1998) Time-course studies on plasma glucose, insulin, and cortisol in sea bass

- (*Dicentrarchus labrax*) held under different photoperiodic regimes. *Physiology & Behavior*. 64, 245-250.
31. Chandroo, K. P., Duncan, I. J. H. & Moccia, R. D. (2004). Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress. *App. Anim. Behav. Sci.* 86, 225– 250.
 32. Chandroo, K.P., Yue, S., Moccia, R.D., (2004). An evaluation of current perspectives on consciousness and pain in fishes. *Fish Fish.* 5, 281– 295.
 33. Colombo, L., Pickering, A.D., Belvedere, P., Schreck, C.B. (1990). Stress inducing factors and stress reaction in aquaculture. In: *Aquaculture Europe '89 - European Aquaculture Society. Special Publication No.12: 93-121.*
 34. Conte, F. S. (2004). Stress and the welfare of cultured fish. *App. Anim. Behav. Sci.* 86, 205– 223.
 35. Cottee, S.Y. (2010). Are fish the victims of ‘ speciesism’ ? A discussion about fear, pain and animal consciousness. *Fish Physiol Biochem.* 10.1007/s10695-010-9449-9.
 36. Cravedi, J.P., Delous G., Debrauwer L., and Prome D. (1993). Biotransformation and branchial excretion of 17 α -methyltestosterone in trout. *Drug. Metab. Dispo.* 21: 377-385.
 37. Czanyi, V. & Doka, A. (1993). Learning interactions between prey and predator fish.
 38. Dawkins, M. S. (1998). Evolution and animal welfare. *Quart. Rev. Biol.* 73, 305– 328.
 39. Dawkins, M. S. (2004). Using behaviour to assess animal welfare. *Anim. Welf.* 13, 3– 7.
 40. De Francesco, M., Parisi, G., Medale, F., Lupi, P., Kaushik, S.J., Poli, B.M., 2004. Effect of long term feeding with a plant protein mixture based on growth and body/fillet quality traits of large size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 236:413-429.
 41. De Jesus E.G. and Hirano T. 1992. Changes in whole body concentrations of cortisol, thyroid hormones, and sex steroids during

- early development of the chum salmon, *Onchorhynchus keta*. Gen. Comp. Endocrinol. 85: 55-61.
42. De Jesus E.G., Hirano T., and Inui Y. 1991. Changes in cortisol and thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Gen. Comp. Endocrinol. 82: 369-376.
43. De Kloet, E.R., Schmidt, M., Meijer, O.C. (2005). Corticosteroid receptors and HPA-axis regulation. In: Steckler T, Kalin NH, Reul JMHM (editors). Handbook of Stress and the Brain. Part 1: The Neurobiology of Stress. Amsterdam: Elsevier.
44. Decourt C. and Lahlou B. (1987). Evidence for the direct intervention of angiotensin II in the release of cortisol in teleost fishes. Life Sci. 41: 1517-1524.
45. Désiré, L, Boissy, A, Veissier I., (2002) Emotion in farm animals: a new approach to animal welfare in applied ethology. Behav Proc 60:165–180.
46. Donaldson, E.M. (1981). The pituitary-interrenal axis as indicator of stress in fish. In Pickering A.D. (ed). Stress and Fish. Academic Press, London, pp. 11-47.
47. Ducouret, B., Tujague, M., Ashraf, J., Mouchel, N., Servel, N., Valotaire, Y. and Thompson, E. B. (1995). Cloning of a teleost fish glucocorticoid receptor shows that it contains a deoxyribonucleic acid-binding domain different from that of mammals. Endocrinol. 136, 3774– 3783.
48. Duncan, IJH (2002). Poultry welfare: science or subjectivity? Br Poult Sci 43:643– 652
49. Elsaesser, CF., Clem, L.W., (1986). Haematological and immunological changes in channel cattish stressed by handling and transport. J. Fish Biol. 28, 511-521.
50. Eros, S.K. and Milligan, C.L. (1996). The effect of cortisol on recovery from exhaustive exercise in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Potential mechanism of action. Physiol. Zool. 69: 1196-1214.

51. Evans J. C. (2009). The ethics of fish welfare. *J. of Fish Biol.* 75, 2872–2874.
52. Feist G., Schreck C.B., Fitzpatrick M.S., and Redding J.M. 1990. Sex steroid profiles of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during early development and sexual differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 80: 299-313.
53. Feist, G. e Schreck C. B. (2002). Ontogeny of the stress response in chinook salmon, *Oncorhynchus Tshawytscha*. *Fish Physiol. Biochem.* 25: 31– 40.
54. Fleshner, M., Deak, T., Spencer, R.L., Laudenslager, M.L., Watkins, L.R., and Maier S.F. 1995. A long term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure. *Endocrinol.* 136: 5336-5342.
55. Flik G. and Perry S.F. (1989). Cortisol stimulates whole body calcium uptake and the branchial calcium pump in freshwater rainbow trout. *J. Endocrinol.* 120: 75-82.
56. Galhardo, L., e Oliveira, R. F. (2009). Psychological Stress and Welfare in Fish. *ARBS Annu Rev Biomed Sci*;11:1-20.
57. Garrel, D.R. (1996). Corticosteroid-binding globulin during inflammation and burn injury : nutritional modulation and clinical implications. *Horm. Res.* 45: 245-251.
58. Goldstein, RE, Wasserman, DH, McGuinness, OP, Lacy DB, Cherrington, AD & Abumrad, NN. (1993). Effects of chronic elevation in plasma cortisol on hepatic carbohydrate metabolism. *Am. J. of Physiol.* 264 E119– E127.
59. Gomes, E.F., Corraze, G., Kaushik, S.J., (1993). Effects of dietary incorporation of a co-extruded plant protein (rapeseed and peas) on growth, nutrient utilization and muscle fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 113, 339– 353.
60. Gomes, F.E., Rema, P., Kaushik, S.J., (1995). Replacement of fish meal by plants proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. *Aquaculture* 130, 177– 186.

61. Hammond, G.L. (1995). Potential functions of plasma steroid-binding proteins. TEM 6: 298-304.
62. Hanukoglu, I. (1992). Steroidogenic enzymes: structure, function and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. J. of Ster. Biochem. and Mol. Biol., 43 (8): 779-804.
63. Hardy, R.W., (1995). Current issues in salmonid nutrition. In: Lim, C., Sessa, D.J. (Eds.), Nutrition and Utilization. Technology in Aquaculture. AOCS Press, Campaign, IL, USA, pp. 26– 35.
64. Hontela A. (1998). Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: *in vivo* and *in vitro* assessment. Environ. Toxicol. Chem. 17: 44-48
65. Huntingford FA, Adams C, Braithwaite VA, Kadri S, Pottinger TG, Sandøe P, Turnbull JF (2006) Current issues in fish welfare. J Fish Biol 68:332– 372
66. Huntingford, F. A. e Kadri, S. (2009) Taking account of fish welfare: lessons from aquaculture. Journal of Fish Biology (2009) 75, 2862– 2867
67. Huntingford, F.A., Adams, C., Braithwaite, V.A., Kadri, S., Pottinger, T.G., Sandoe, P., Turnbull, J.F. (2006). Current issues in fish welfare. J. Fish Biol. 68:332– 372
68. Hwang, P.P., Wu, S.M., Lin, J.H. and Wu, L.S. 1992. Cortisol content of eggs and larvae of teleosts. Gen. Comp. Endocrinol. 86: 189-196.
69. Idler, D.R. and Truscott, B. (1972). Corticosteroids in fish. In: Idler D.R. (ed.). Steroids in Nonmammalian Vertebrates, Academic Press, New York, pp. 126-252
70. Iwama., G.K. (2007). The welfare of fish. Dis Aquat Org Vol. 75: 155– 158.
71. Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti Donatella, Jeney Z., D.P. Anderson. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. Aquaculture 154 (1997) 1-15
72. Kaattari, S.L. and Tripp, R.A. (1987) Cellular mechanisms of glucocorticoid immunosuppression in salmon. J. Fish Biol. 31 (Suppl.A), 129– 132.

73. Laidley, C. W. & Leatherland, J. F. (1988). Cohort sampling, anaesthesia and stocking density effects on plasma cortisol, thyroid hormone, metabolite and ion levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. of Fish Biol.* 33, 73– 88.
74. Levine, S. (2005). Stress: an historical perspective. In: Steckler T, Kalin NH, Reul JM (editors). *Handbook of Stress and the Brain. Part 1: The Neurobiology of Stress.* Amsterdam: Elsevier, 2005.
75. Madsen, S.S. (1990). The role of cortisol and growth hormone in sea water adaptation and development of hypoosmoregulatory mechanism in sea trout parr (*Salmo trutta trutta*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 79: 1-11. *Mar. Behav. Physiol.* 23, 63– 78.
76. Marino, G., Di Marco, P., Mandich, A., Finora, M. G. & Cataudella, S. (2001). Changes in serum cortisol, metabolites, osmotic pressure and electrolytes in response to different blood sampling procedures in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. of Appl. Ichthyol.* doi: 10.1046/j.1439-0426.2001.00284
77. Maule, A.G. and Schreck, C.B. 1991. Stress and cortisol treatment changed affinity and number of glucocorticoid receptors in leucocytes and gill of coho salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 84: 83-93.
78. McCormick, S.D. (1995). Hormonal control of gill Na⁺, K⁺ - ATPase and chloride cell function. In Wood C.M. and Shuttleworth T.J. (eds) *Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation (Fish Physiology, XIV)*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 285-315.
79. McCormick, S.D. (1996). Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on salinity tolerance and gill Na⁺, K⁺ - ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar*): interaction with cortisol. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101: 3-11.
80. McDonald, G, Milligan, L. (1997). Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: Iwama GK, Pickering AD, Sumpter JP, Schreck CB (editors). *Fish Stress and Health in Aquaculture.* Cambridge, UK: Cambridge University Press,.

81. McEwen, B.S. Stress, adaptation, and disease - Allostasis and allostatic load (1998). *Neuroimmunomodulation*, 840:33-44.
82. Mommsen, TP, Vijayan, MM, Moon, TW. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev Fish Biol Fish* 1999;9:211-68.
83. Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M., (1999). High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiol. Biochem.* 20, 53– 60.
84. New, M.B., Wijkstroem, U.N., (2002). Use trap. *FAO Fish. Circ.* 975 (61 pp).
85. Oliva-Teles, A., Gouveia, A.J., Gomes, E., Rema, P., (1994). The effect of different processing treatments on soybean meal utilization by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 124, 343– 349.
86. Pankhurst, N. W. & Sharples, D. F. (1992). Effects of capture and confinement on plasma cortisol concentrations in the snapper *Pagrus auratus*. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 43, 345– 356.
87. Pankhurst, N.M. and Van der Kraak, G. (1997). Effects of stress on reproduction and growth of fish. In: *Fish stress and health in aquaculture*. Iwata G.K., Pickering A.D., Sumpter J.P. and Schreck C.B. (eds). Cambridge Univ. Press, London. pp. 73-93.
88. Pavlidis M., Karantzali E., Fanouraki E., Barsakis C., Kollias S., Papandroulakis N. (2010). Onset of the primary stress in European sea bass *Dicentrarchus labrax*, as indicated by whole body cortisol in relation to glucocorticoid receptor during early development. *Aquaculture*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.013>
89. Peter P.L.M Pepels, Paul H.M. Balm. (2004). Ontogeny of corticotropin-releasing factor and of hypothalamic-pituitary-interrenal axis responsiveness to stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*; Teleostei). *Gen. Comp. Endocrinol.* 139 251– 265

90. Pickering A.D. Pottinger T.G. & Christie P. (1982) Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L. from acute handling stress: a time-course study. *J. Fish Biol.* 20, 229-244.
91. Pickering, A.D. (1984) Cortisol-induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 53, 252– 259.
92. Pickering, A.D., Pottinger, T.G., (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 253±258.
93. Pickering, A.D., Pottinger, T.G., Christie, P., (1982). Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time course study. *J. Fish Biol.* 20, 229– 244.
94. Planas J., Gutierrez J., Fernandez J., Carrillo M. & Canals P. (1990) Annual and daily variations of plasma cortisol in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture* 91, 171-178.
95. Poli B. M. (2009). Farmed fish welfare-suffering assessment and impact on product quality. *Italian Journal of Animal Sciences*, 8: 139-160.
96. Poli B. M., Parisi, G., Scappini F. e Zampacavallo and G. (2005). Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aqua. Intern.* 13: 29– 49.
97. Porthé-Nibelle, J. and Lahlou, B. (1981). Mechanisms of glucocorticoid uptake by isolated hepatocytes of the trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 69B: 425-433
98. Pottinger, T.G., Carrick, T.R., Huges, S.E., and Balm, P.H.M. 1996. Testosterone, 11-ketotestosterone, and estradiol-17 β modify baseline and stress-induced interrenal and corticotropic activity in trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 104: 284-295.
99. Pratt, W.B. (1993). The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 268: 21455-21458.
100. Prunet P, Sturm A, Milla S. (2006). Multiple corticosteroid receptors in fish: from old ideas to new concepts. *Gen. Comp. Endocrinol.*;147:17-23.

101. Pulsford, A.L., Lemaire-Gony, S., Tomlinson, M., Collingwood, N., Glynn, P.J., (1994). Effects of acute stress on the immune system of the dab, *Limanda limanda*. *Comp. Biochem. Physiol.* 109C, 129±139.
102. Redding, J.M., Patino, R., and Schreck, C.B. (1984). Clearance of corticosteroids in yearling coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* in fresh water and seawater and after stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* 54: 433-443.
103. Reese, E. S. (1989). Orientation behaviour of butterfly fishes (family Chaetodontidae) on coral reefs – spacial learning of route specific landmarks and cognitive maps. *Environ. Biol. Fish.* 25, 79– 86.
104. Reid, S.G., Vijayan, M.M., and Perry, S.F. (1996). Modulation of catecholamine storage and release by the pituitary-interrenal axis in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Comp. Physiol.* 165B: 665-676.
105. Rodriguez, F., Duran, E., Vargas, J. P., Torres, B. & Salas, C. (1994). Performance of
106. Rose, J. D. (2002). The neurobehavioural nature of fishes and the question of awareness and pain. *Rev. Fisher. Sci.* 10, 1– 38.
107. Rotllant J. & Tort L. (1997) Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *J. Fish Biol.* 51, 21-28.
108. Ruane N.M. & Komen H. (2003). Measuring cortisol in the water as an indicator of stress caused by increased loading density in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture.* 218, 685-693.
109. Sampath-Kumar R., Lee S.T.L., Tan C.H., Munro A.D., and Lam T.J. 1997. Biosynthesis in vivo and excretion of cortisol by fish larvae. *J. Exp. Zool.* 277: 337-344.
110. Sapolsky, RM. (2004). *Why Zebras Don't Get Ulcers*. New York: Henry Holt and Company.
111. Scott A.P. & Ellis T. (2007) Measurement of fish steroids in water-a review. *General and Comparative Endocrinology.* 153, 392-400
112. Scott A.P., Pinillos M. & Ellis T. (2001) Why measure fish steroids in plasma when you can measure them in water? In: *Perspectives in*

Comparative Endocrinology: Unity and Diversity. (ed. by (H.J.T Goos., R.K. Rastogi., H. Vaudry & R. Pierantoni), pp. 1291-1295. Bologna: Monduzzi Editore.

113. Scott L., Applebaum C., Wilson A., Holt G. J., Nunez B. S.(2010). The onset of cortisol synthesis and the stress response is independent of changes in CYP11B or CYP21 mRNA levels in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). Gen. Comp. Endocrinol. 165 269– 76.
114. Simontacchi C., Bongioni G., Faresin L. e Bono G., 1995. Messa a punto di un metodo RIA su micropiastra per il odsaggio diretto del progesterone ematico. XLIX Convegno Nazionale S:I.S. Vet., Salsomaggiore Terme, 27-30 settembre 1995, pp. 343-344.
115. Simontacchi, C., . Poltronieri. C., Carraro, C., Bertotto, D., Xiccato G. Trocino, A. Radaelli G. (2008) Alternative stress indicators in sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. Journal of Fish Biology 72 (3), pp. 747-752.
116. Smith, R.R., Kincaid, H.L., Regenstein, J.M., Rumsey, G.L., (1988). Growth, carcass composition, and taste of rainbow trout of different strain fed diets containing primarily plant or animal protein. Aquaculture 70, 309 321.
117. Sneddon, L.U., 2003. The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. Appl. Anim. Behav. Sci. 83, 153-162.
118. Sneddon, L.U., Braithwaite, V.A., Gentle, M.J., (2003). Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci. 270, 1115– 1121.
119. Sovrano, V. A. & Bisazza, A. (2003). Modularity as a fish (*Zenotoca eisen*) views it: Conjoining and nongeometric information for spacial reorientation. J. of Exp. Phychol. 29, 199– 210.
120. Stocco, D.M., Clark, B.J. (1996). Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. Endocrine Reviews, 17 (3): 221-244.
121. Stolte, E.H., de Mazon, A.F., Leon-Koosterziel, K.M., Jesiak, M, Bury NR, Sturm, A, Savelkoul HFJ, van Kemenade BMLV, Flik G. Corticosteroid receptors involved in stress regulation in common carp, *Cyprinus carpio*. J Endocrinol 2008;198:403-17.

122. Sumpter, JP. The endocrinology of stress. In: Iwama GK, Pickering AD, Sumpter JP, Schreck CB (editors). *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.
123. Sumpter, JP. The endocrinology of stress. In: Iwama GK, Pickering AD, Sumpter JP, Schreck CB (editors). *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.
124. Swaney, W., Kendal, J., Capon, H., Brown, C. & Laland, K. N. (2001). Familiarity facilitates social learning of foraging behaviour in the guppy. *Anim. Behav.* 62, 591– 598.
125. Tacon, A.G.J., Haaster, J.V., Featherstone, P.B., Kerr, K., Jackson, A.J., (1983). Studies on the utilization of fullfat and solvent extracted soybean meal in a complete diet for rainbow trout. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 49, 1443– 1473.
126. Terlouw, E.M.C., Arnould, C., Auperin, B., Berri, C., Le Bihan-Duval, E., Deiss, V., Lefevre, F., Lensink, B.J., Mounier, L. (2008). Pre-slaughter conditions, animal stress and welfare: current status and possible future research. *Animal*, 2, 1501- 1517.
127. Van Raaij M.T.M., Pit D.S.S., Balm P.H.M., Steffens A.B. & Van den Thillart G.E.E.J.M. (1996) Behavioral strategy and the physiological stress response in rainbow trout exposed to severe hypoxia. *Hormones and Behavior*. 30, 85-92.
128. Vazzana, M., Cammarata, M., Cooper, E.L., Parrinello, N., 2002. Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture* 210, 231– 243.
129. Vielma, J., Makinen, T., Ekholm, P., Koskela, J., (2000). Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. *Aquaculture* 183, 349– 362.
130. Vijayan, M.M. and Moon, T.W. (1994). The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost, the sea raven. *Can. J. Zool.* 72: 379-386.

131. Vijayan, M.M., Feist, G., Otto, D.M.E., Schreck C.B., and Moon T.W. (1997). 3,3' ,4,4' -Tetrachlorobiphenyl affects cortisol dynamics and hepatic function in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 37: 87-98.
132. Volpato, G.L. (2009). Challenges in assessing fish welfare. *ILAR Journal* 50(4): 329-337.
133. Wedemeyer, G. (1972). "Some Physiological Consequences of Handling Stress in the Juvenile Coho Salmon and Steelhead Trout," *J. of Fish. Res. Board of Canada*, 29(12), 178-1783.
134. Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591– 625.
135. Young, G., Thorarensen, H., and Davie, P.S. 1996. 11-Ketotestosterone suppresses interrenal activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 103: 301-307.

Fonti bibliografiche sul web:

<http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/search/>

<http://www.aquabreeding.eu/Documents/tabid/98/Default.aspx>

http://www.inra.fr/reprofish_eng

<http://www.faosipam.org/>

ec.europa.eu/food/animal/welfare/international/index_en.htm

<http://www.efsa.europa.eu>

www.fawc.org.uk

RINGRAZIAMENTI

Un grazie di cuore a Claudia,
a Elena, a Tommaso e a Carlo

