

La salvaguardia delle specie ittiche di allevamento attraverso la conoscenza del loro benessere

ALESSANDRA PELAGALLI

Dipartim Università degli Studi di Napoli Federico II

Il benessere animale in acquacoltura è divenuto una tematica di grande interesse a livello nazionale, europeo e mondiale. La crescente richiesta di prodotto ittico, in considerazione sia dell'aumento della *popolazione mondiale*, sia del sempre maggiore apprezzamento per le qualità del prodotto e per le sue proprietà nutrizionali, ha posto nuovi interrogativi in termini di sicurezza e di benessere. Le ricerche condotte sul campo stimolate anche dai rispettivi governi a tutela del prodotto, hanno permesso di accrescere le conoscenze sull'anatomia, la fisiologia e sul comportamento dei pesci. La capacità da parte del pesce di percepire l'ambiente circostante, così come il suo comportamento in relazione ai conspecifici, ha permesso di chiarire molti aspetti legati alle sue attività e, al contempo, di riconoscere per queste specie il concetto di essere senziente. Sicuramente le conoscenze fino ad oggi acquisite in relazione a più moderne tecnologie di biologia e di genetica molecolare hanno contribuito ad approfondire le suddette tematiche con interessanti risultati.

IL PROBLEMA BENESSERE DEI PESCI A LIVELLO MONDIALE ED EUROPEO

L'acquacoltura fornisce a livello mondiale oltre 60 milioni di tonnellate di pesce (dati ISMEA). Tale attività secondo recenti ricerche della FAO è destinata a crescere in considerazione dell'aumento della popolazione mondiale e soprattutto come risultato dell'impoverimento delle risorse ittiche attualmente disponibili. I dati FAO confermano che ogni anno la produzione di pesce ottenuto da acquacoltura cresce del 7% e che nel 2006 sono stati consumati come cibo oltre il 75% della produzione ittica mondiale (FAO 2012 e 2006).

Sicuramente, l'attualizzazione e lo sviluppo delle differenti branche dell'acquacoltura è conseguito alla crescente acquisizione di conoscenze nel campo non solo dell'alimentazione e della nutrizione di queste specie, ma anche del com-

portamento e di conseguenza di tutela del loro benessere.

La salvaguardia delle specie ittiche è un tema di grande interesse che si è sviluppato e si sta sviluppando grazie all'impegno e l'interesse costante da parte di istituzioni, scienziati e consumatori.

A livello europeo l'EFSA (Autorità europea per la sicurezza alimentare) e al livello mondiale l'OIE (Organizzazione mondiale per la salute animale) hanno promosso una serie di iniziative volte allo sviluppo di nuove conoscenze scientifiche che di fatto hanno maturato lo sviluppo di linee guida per la salvaguardia del benessere dei pesci. In particolare nel 2005 la normativa europea ha adottato una raccomandazione, costituita da ben 21 articoli. Quest'ultima definisce sinteticamente, non solo le caratteristiche anatomiche e fisiologiche del pesce, ma anche le norme disciplinanti la sua uccisione (con metodiche che prevedano la morte immediata e quindi con rapida perdita della coscienza) ed incoraggia lo sviluppo di ricerche riguardanti l'allevamento nel rispetto delle necessità biologiche, del benessere e dello stato di salute del pesce.

Tali normative si riferiscono allo sviluppo di conoscenze sempre più sofisticate ed avanzate in termini di conoscenze della fisiologia dell'animale, ed in senso stretto delle sue capacità di relazionarsi all'ambiente in cui vive. In tale relazione va considerato anche il rapporto con l'uomo che opera in tale ambiente (rifornimento alimento, procedure in vasca, trattamenti farmacologici, ecc).

CONCETTO DI BENESSERE E DI "SENTIENCE"

Gli studi condotti, sulla base delle conoscenze acquisite, da oltre una quindicina di anni, inerenti il benessere delle specie animali e l'individuazione di indicatori di benessere, hanno permesso in questi ultimi anni di aprire la via verso nuovi approcci metodologici, in particolare con riferimento alla capacità dell'animale di provare sensazioni quali dolore, paura o altro tipo di reazioni. Questo ha permesso di superare un antico retaggio, che considerava le specie animali delle

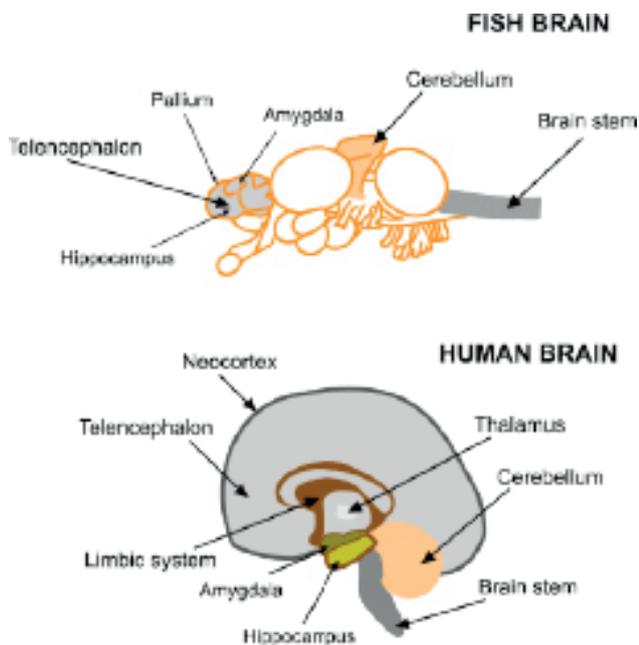


Figura 1. Differente organizzazione del cervello nell'uomo e nei pesci (fonte -<http://www.fishpain.com/fish-and-pain-brain-structures.htm>)

pure e semplici macchine di produzione, e di far emergere un nuovo concetto, quello dell'animale come essere SENZIEN-TE, ossia con un'anima e quindi capace di provare sensazione e mettere in atto azioni. A gettare le basi di questa nuova impostazione è stato nel 1997, il trattato di Amsterdam, che per la prima volta ha definito gli animali esseri senzienti e ha proposto nuove iniziative politiche rivolte a nuove conoscenze in tele campo. Otto anni più tardi la nuova costituzione adottata nel 2004, contiene un articolo riguardante specificamente la protezione ed il benessere degli animali.

Questo nuovo concetto è stato sentito molto dai consumatori che in uno studio finalizzato del 2001 (EU FAIR CT98-3678), ha evidenziato quanto il benessere rappresenti un indicatore importante.

La questione resta, tuttavia, ancora controversa, non esistendo al momento prove scientifiche sufficienti in grado di provarlo. In particolare, nel corso di questo ultimo secolo, le ricerche scientifiche di neuro-anatomia hanno consentito di distinguere le specie ittiche dai mammiferi contribuendo ad invertire un antico concetto dell'evoluzione del cervello. Secondo queste nuove conoscenze, la classificazione tassonomica non viene più rappresentata come una scala ascendente ma bensì come un albero con tante ramificazioni in cui il livello di competenza relativamente a specifiche attività si sviluppa in parallelo nelle differenti specie. Questo ha permesso, inoltre, di introdurre il concetto di meccanismo adattativo applicato a differenti attività (sviluppo della comunicazione, risposta allo stress, capacità di percepire sensazioni, ecc.).

Il concetto di SENTIEN-CE dunque, racchiude in sé complessi fenomeni a livello cerebrale quali: l'intelligenza, la coscienza e la percezione di sé stessi.

Tali concetti sicuramente vanno correlati a strutture ana-

tomiche specifiche ed in particolare ad una tipica organizzazione del cervello. Differenti studi comparativi hanno evidenziato similarità nell'organizzazione del cervello nei pesci rispetto all'uomo e ad altri mammiferi (Figura 1). Allo stesso modo studi di neurofisiologia hanno ipotizzato forti similarità nella percezione emozionale da parte delle specie ittiche (Le Doux, J. 1996). Differenze anatomiche e quindi fisiologiche sono state comunque osservate in relazione alla sensazione dolorosa. I pesci sono dotati di una regione a livello della corteccia media con funzione omologa all'amigdala (che nell'uomo presiede allo svolgimento di questa funzione). Inoltre, il concetto di "sentience" va sicuramente legato a quello di percezione dolorosa che rappresenta normalmente un processo di elaborazione che si realizza a livello razionale tramite la neocorteccia.

BASI FISILOGICHE DEL BENESSERE E CONCETTO DI STRESS

Le basi fisiologiche relative alla condizione di benessere si riferiscono a studi di anatomia e di fisiologia che hanno analizzato le capacità cerebrali notoriamente indispensabili per lo svolgimento di numerose attività fisiologiche fondamentali (controllo del battito cardiaco, controllo della funzione respiratoria, ecc.). Gli studi condotti hanno, dunque, dimostrato che tali specie ittiche hanno la capacità di provare dolore, quando sono state sottoposte a specifici stimoli attraverso l'attivazione di numerosi recettori detti NOCICETTORI. Tali strutture convertono in segnali elettrochimici stimoli termici, chimici e meccanici potenzialmente dannosi per i tessuti. Essi trasmettono il segnale doloroso al midollo spinale dove esso viene filtrato e poi inviato al cervello. Tali concetti inizialmente sviluppati grazie alle ricerche della prof.ssa Braithwait, sono stati ulteriormente confermati dal prof. Brown. Tali studi hanno, infatti, permesso di evidenziare particolari attività fisiologiche dei pesci che risiedono particolarmente a livello degli organi di senso e che, dunque, sono importanti per la percezione dell'ambiente circostante. I pesci, infatti, sono individui sociali, dotati di una memoria spaziale e capaci di cooperare con i consimili. Sono, inoltre, capaci di costruire strutture complesse e meccanismi pur presentando un'evoluzione cerebrale alquanto limitata rispetto ad altri vertebrati. Nonostante ciò nella loro organizzazione anatomica cerebrale manca una regione importante, quale la neocorteccia, che normalmente nei mammiferi assolve funzioni importanti tra cui anche la percezione degli stimoli dolorosi.

Tali ricerche sono iniziate quando si è cominciato a parlare di benessere animale e di quali potessero essere gli approcci più adeguati per il suo studio.

LO STRESS E LE RISPOSTE FISILOGICHE DELL'INDIVIDUO

Il concetto di benessere animale, così come è stato definito nel 1986 da Broom, è "lo stato di un individuo riferito alla

sua capacità di adattamento all'ambiente" A tale riguardo è noto che numerosi fattori (psicologici e/o ambientali) definiti "stressors" sono in grado di perturbare l'omeostasi e l'equilibrio del pesce conducendo ad una situazione di alterato benessere noto con il nome di STRESS.

Nel caso delle specie ittiche molti sono i possibili stressors (densità di allevamento, metodi di cattura ed uccisione, metodiche non adeguate per la distribuzione del cibo, qualità dell'ambiente e quindi dell'acqua, ecc.). Tali condizioni possono modificare in maniera diversa la vita del pesce, il suo ciclo produttivo e quindi la resa del prodotto finale. L'agente perturbante "stressor" viene percepito dall'animale sfruttando solitamente i sensi. Da ciò nasce un meccanismo complesso di reazioni che coinvolgono inizialmente il cervello e le sue strutture, lì dove inizia l'elaborazione attraverso possibili circuiti emotivi e della razionalità. A seguito di ciò si innescano le vie nervose con il rilascio di catecolamine e successivamente l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-tessuto interrenale. Il fattore rilasciante corticotropina (CRF) prodotto a livello ipotalamico agisce sulla ghiandola pituitaria promuovendo la sintesi e la mobilitazione di ormoni glucocorticoidi (cortisolo nei teleostei) da parte delle cellule del tessuto interrenale (Schreck, 1981; Wendelaar-Bonga, 1997). Entrambi le catecolamine ed il cortisolo innescano la risposta secondaria e terziaria allo stress e molti dei loro effetti avversi precedentemente descritti sono associati ad effetti a lungo termine indotti da alti livelli di cortisolo (Schreck et al., 2001) (Figura 2). L'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-tessuto interrenale induce molteplici effetti: mobilitazione delle riserve energetiche, riduzione dei depositi di glicogeno ed incremento dei livelli plasmatici di glucosio, unitamente ad elevata attività muscolare, glicolisi anaerobia ed aumento dei

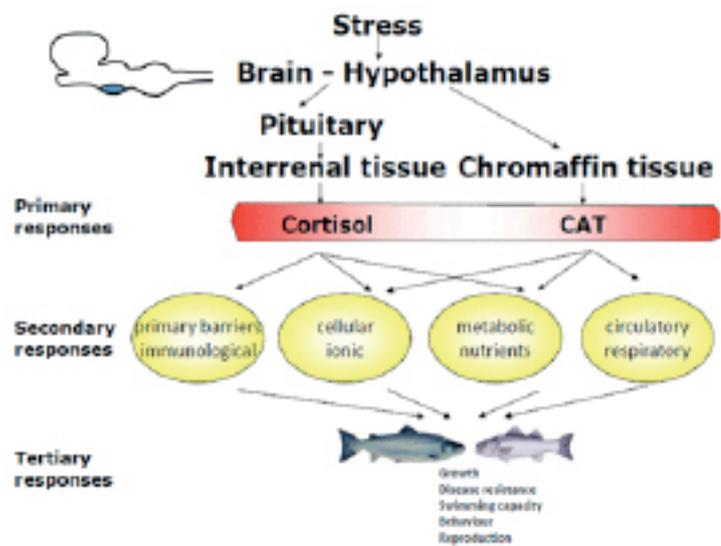


Figura 2 Meccanismo di risposta allo stress nei pesci (fonte -<http://www.slu.se/en/departments/animal-environment-health/research/research-project>)

livelli di lattato plasmatici ed inoltre alterazione delle attività a livello dell'apparato riproduttivo (Figura 3). Per questi motivi, molto spesso i livelli plasmatici di glucosio e lattato unitamente con quelli del cortisolo sono impiegati per la valutazione dello stress (Arends et al., 1999).

INDICATORI FISILOGICI DI STRESS

In relazione alle modificazioni indotte dalle catecolamine e dal cortisolo rilasciato in seguito a stress, differenti distretti corporei subiscono modificazioni delle loro normali attività con il risultato di una alterata omeostasi corporea. La ricerca nel campo del benessere da lungo tempo ha avviato ricerche volte alla individuazione di specifici "marker" o indicatori di benessere. E' stato così possibile distinguere gli indicatori in due categorie:

diretti (correlati alle attività dell'animale) ed **indiretti** (legati all'ambiente in cui l'animale vive). Prendendo in considerazione la prima categoria gli indicatori più interessanti sono fisiologici e comportamentali. Nel primo caso rientrano nella valutazione: la frequenza cardiaca e respiratoria, i livelli della glicemia, le risposte immunitarie, livelli circolanti di ormoni e mediatori chimici. In quest'ultimo caso mol-

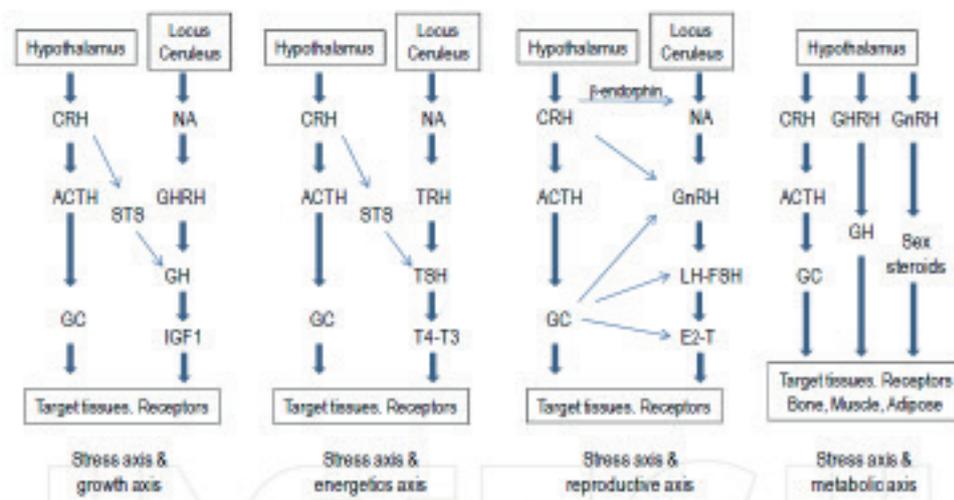


Fig. 3. Organizzazione dei differenti sistemi di interazione tra il meccanismo dello stress e le attività endocrine legate allo sviluppo, la riproduzione il metabolismo (da Tort L. and Teles M., The Endocrine Response to Stress -A Comparative View, 2011).

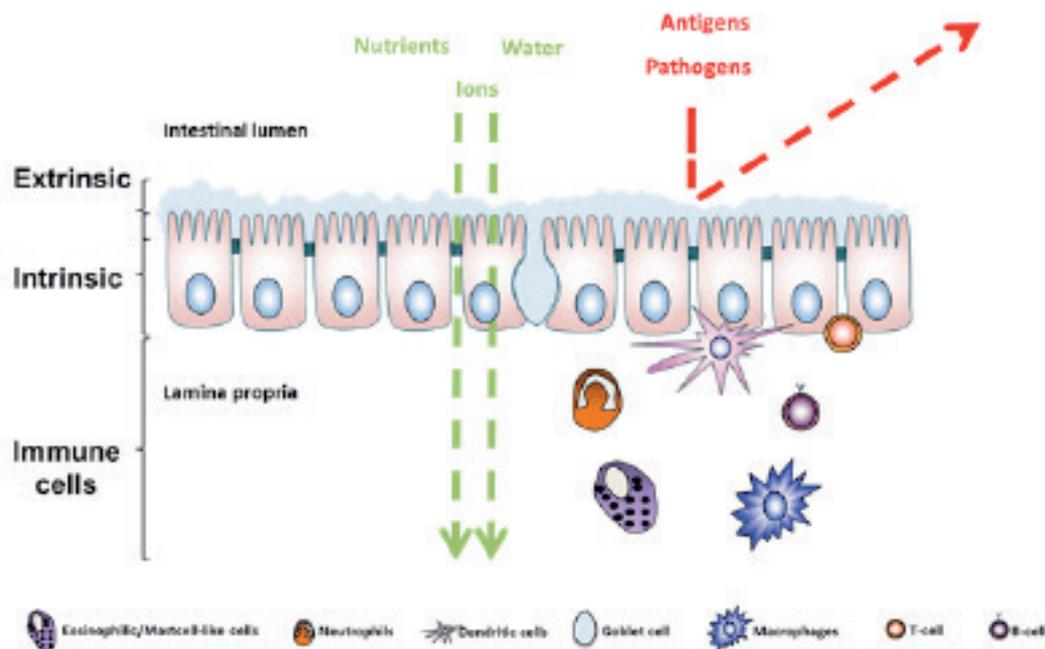


Fig. 4. Organizzazione della barriera intestinale nei pesci

(fonte - <http://www.slu.se/en/departments/animal-environment-health/research/research-project/animal-welfare-in-modern-production-systems-for-fish>)

ti mediatori endogeni di natura nervosa (neurotrasmettitori) e ormoni (cortisolo) possono, di conseguenza, rappresentare indicatori “validati” di stress. Ad esempio, recenti studi condotti su specie di uso commerciale (spigola e orata), hanno consentito di validare l’uso del cortisolo estratto dal muco quale “marker” di stress da trasporto o da ridotta densità di popolazione in vasca.

Anche gli indicatori comportamentali quali le modificazioni della colorazione della pelle (legata a modificazione della distribuzione dei cromatofori), alterazioni nel tipo di nuoto o fenomeni di aggressività e/o di cannibalismo possono sicuramente svolgere un ruolo importante quali manifestazioni di alterato benessere.

Recentemente si stanno facendo strada ricerche innovative riguardanti alcune problematiche conseguenti allo stress, osservabili a livello del tratto gastro-intestinale, (la cosiddetta barriera intestinale) di differenti specie ittiche allevate. E’ ampiamente noto che differenti stressors ed, in particolare, variazioni delle condizioni ambientali sono responsabili, conseguentemente al rilascio di cortisolo, di alterazioni di vario grado a livello della barriera intestinale. L’intestino risulta caratterizzato da un epitelio responsabile di differenti attività: regolazione dei processi di assorbimento dei differenti nutrienti e barriera selettiva nei confronti di differenti agenti esterni (Figura 4).

Differenti studi hanno accertato che lo stress acuto è in grado di alterare notevolmente la funzione della barriera intestinale, modificando la sua capacità di protezione nei confronti di agenti esterni e rendendola in questo caso immunologicamente depressa e quindi suscettibile dell’insorgenza di patologie (Olsen et al. 2002; Olsen et al. 2005). Le possibili fonti di stress in acquacoltura e la elevate densità di popo-

lazione negli allevamenti di salmonidi unitamente al largo uso di alimenti vegetali nella dieta può creare gravi danni all’epitelio intestinale che può subire notevole suscettibilità in risposta a numerosi agenti esterni.

DANNI VALUTABILI IN CAMPO

Nell’ambito dello studio del benessere animale in acquacoltura occorre prendere in considerazione modificazioni nello sviluppo dei pesci. In tal senso differenti indagini sul campo hanno evidenziato anomalie scheletriche in pesci allevati che includono aberrazioni neuro-craniali e spinali. Molteplici sembrano essere le cause ed in particolare, fattori ambientali, quali la luce, temperatura e salinità (Cobcroft et al., 2001; Sfakianakis et al., 2004, 2006). Tali problematiche sono state evidenziate particolarmente nella regione del Mediterraneo con effetti negativi sulla produzione, il benessere, le performances biologiche (crescita, sopravvivenza, efficienza nella conversione dell’alimento) ed i costi di produzione.

Sono state, inoltre, osservate alterazioni quali erosione della pinna dorsale (Noble et al., 2007) e deformità degli opercoli. Quest’ultima sembra verificarsi durante lo stato larvale ed influenza la crescita del pesce, così come la morfologia opercolare con significativa perdita in termini economici (Galeotti et al., 2000).

Le deformità scheletriche possono avere origine diversa: genetica, infettiva, ambientale o alimentare legata quest’ultima, in particolare, a carenze di vitamina C, alti livelli di vitamina A, esposizione a metalli pesanti o composti chimici quali, organofosfati e organoclorurati, infezioni batteriche e virali (Yadegari et al., 2011). Lo stress prima o durante

la macellazione o anche lo stress a lungo termine determina nel pesce, in particolare a livello muscolare, condizioni di facile esaurimento (Figura 5). I muscoli del pesce in seguito a stress presentano un pH più basso (a causa della produzione di acido lattico nei muscoli). Tale valore basso incrementa l'azione di enzimi muscolari responsabili della degradazione delle proteine. Uno studio sostiene anche che lo stress aumenta la quantità di tali enzimi presenti oltre a rendere essi più efficaci. Inoltre, nei pesci sottoposti a stress è stato osservato minore quantità di ATP disponibile nei loro muscoli. È noto infatti, che l'ATP è la fonte di energia che rende i sistemi biologici capaci di rispondere alla comune reazione di fuga. Dopo che un animale muore, i muscoli rimangono flessibili finché sono presenti alcune riserve di ATP. Una volta che l'ATP è esaurito, i muscoli rimangono tesi condizione questa definita *rigor mortis*. Tale condizione può essere abbastanza forte da lacerare le connessioni tra le fibre muscolari, con conseguente modificazioni delle proprietà della carne. I muscoli di pesce con basse riserve di ATP vanno in rigor mortis, più velocemente. Anche se si decapita un pesce, i muscoli del suo corpo potrebbero continuare a subire sollecitazioni dovute all'azione del sistema nervoso autonomo. L'attività del sistema nervoso autonomo o involontario continua a funzionare anche se il cervello è assente. Il midollo spinale continua a inviare messaggi ai muscoli. I muscoli continuano ad utilizzare ATP, e il pesce va in rigor ancora più velocemente e risulta più difficile che i messaggi inviati

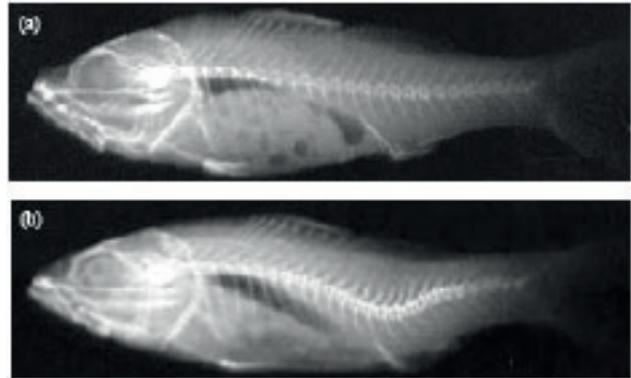


Fig. 5. Alterazioni scheletriche: (A) normale e (b) lordosi in spigola (da Kayim M. et al., 2010)

possano essere arrestati con la conseguente distruzione del midollo spinale. Si può distruggere il midollo spinale eseguendo un taglio con un filo sottile lungo la parte superiore della colonna vertebrale. La distruzione del midollo spinale è particolarmente importante nel tonno: questi pesci sono in grado di regolare la loro temperatura corporea, a differenza della maggior parte dei pesci a sangue freddo.

Lo studio del benessere dei pesci ha riguardato anche gli effetti legati alla macellazione. Sicuramente tra le tecniche adoperate oggi, quella a favore di un minore danno per l'animale in termini di sofferenza, resta quella che determina immediata perdita di coscienza (Fig. 7).

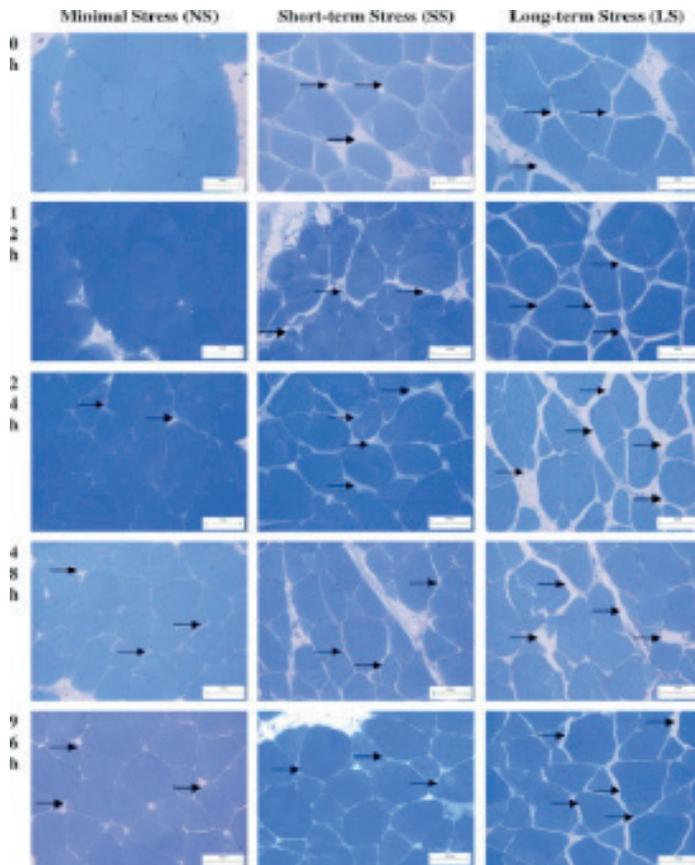


Fig. 6. Illustrazione del danno muscolare in seguito a stress (Bahuaud, et al., 2010)

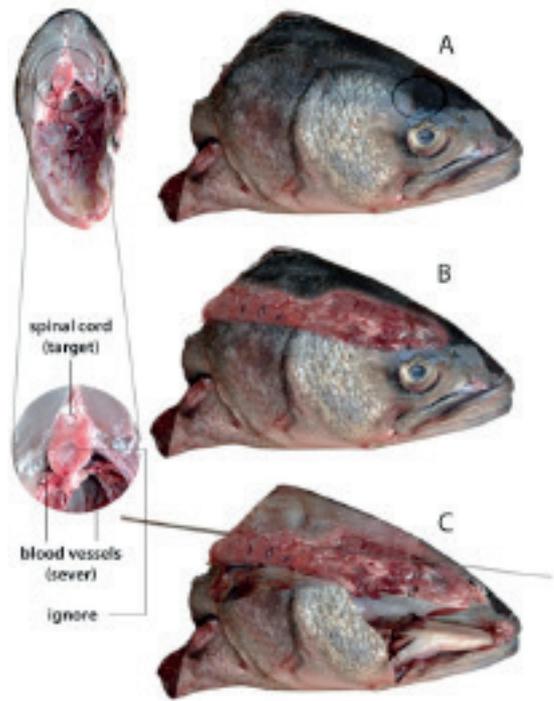


Fig. 7. Tecnica di uccisione di alcuni pesci (da Bahuaud D. et al., 2010)

STUDIO DI NUOVI BIOMARKER PER L'INDIVIDUAZIONE DEL BENESSERE ANIMALE

Nell'ultimo decennio, lo sviluppo di nuove tecnologie e l'acquisizione di nuove conoscenze ha permesso di sviluppare lo studio di nuovi biomarkers per l'individuazione di patologie negli animali come potenziale utile per l'ulteriore sviluppo dell'"animal care". Molti di questi biomarker risiedono nello sviluppo di tecniche di post-genomica. In particolare, le sequenze di gene (genomica strutturale) permettono di associare le risposte somatiche all'attività trascrizionale di specifici geni (genomica funzionale) che, a loro volta, rispondono all'attività di cellule da parte di modifiche ambientali e o nutrizionali. L'attività trascrizionali dei geni può essere determinata quantitativamente mediante il titolo dell'RNA messaggero (mRNA) ottenuto da campioni di tessuto. Analogamente è possibile procedere alla identificazione e quantificazione di tutti gli specifici metaboliti (metabolomica) in un determinato sistema biologico, prodotti finali della sua espressione genica. La metabolomica è una scienza complementare alle più sviluppate scienze genomica funzionale, proteomica e trascrittomica.

In particolare, la proteomica ha permesso di individuare e caratterizzare condizioni di benessere animale apportando nuove conoscenze finalizzate allo sviluppo di pratiche in acquacoltura che assicurino una buona condizione di salute. Il principale organo target in questi studi è il fegato, fondamentale per lo studio dei processi metabolici, analogamente ai fluidi corporei come il plasma sanguigno. Le proteine coinvolte nel trasporto intracellulare dei lipidi, nella catena respiratoria e nei seguenti processi di glicolisi/gluconeogenesi/metabolismo degli amminoacidi erano espresse a bassi livelli nei pesci sottoposti a diete con elevata energia rispetto a quelli a bassa energia. Tali proteine, conseguentemente, potrebbero essere impiegate come marker di prevenzione di eccessivo accumulo di grasso a livello muscolare.

Attualmente gli studi più interessanti mirano alla valutazione di possibili correlazioni tra le sorgenti di stress legate all'ambiente con modificazioni del proteoma. Tra di essi sono stati studiati: la densità di allevamento (Provan et al., 2006; Alves et al., 2010), il maneggiamento (Cordeiro et al., 2012) e lo stress pre-macellazione (Morzel et al., 2006). Studi focalizzati sull'analisi delle proteine plasmatiche hanno interessato l'individuazione e la validazione di marker di benessere prendendo in esame differenti proteine quali: microglobuline, macroglobuline, apolipoproteine, α 1-antitripsina, transferrina, plasminogeno e proteine del sistema del complemento (Russell et al., 2006; Brunt et al., 2008; Bohne-Kjersem et al., 2009; Kumar et al., 2009).

Attualmente la proteomica sta contribuendo ad una migliore conoscenza delle modificazioni metaboliche che conseguono ad alterazioni della dieta come dimostrato per la trota (Martin et al., 2003) ed il salmone atlantico (Morais et al., 2012).

Nella spigola la contemporanea analisi metabolomica, insieme con l'analisi di profili metabolici con spettroscopia

NMR, rappresenta un significativo strumento per la valutazione di differenze sulla base del profilo molecolare, che si evidenzia nei pesci come conseguenza di condizioni di allevamento e sistemi di controllo in acquacoltura.

CONCLUSIONI

La problematica del benessere in acquacoltura, alla luce di quanto esposto, è una tematica sempre più multidisciplinare; le suddette nuove metodologie (proteomica, metabolomica, ecc.), applicabili in allevamento, costituiscono la base di partenza per una visione, sempre più integrata, dell'asse genomico-proteico metabolico, indicativo di un alterata risposta cellulare e conseguenzialmente dell'intero organismo.

Per tali ragioni, i risultati delle ricerche in questo campo, hanno "costretto" il legislatore (anche attraverso direttive sovranazionali) a legiferare in materia di benessere animale al fine di garantire la qualità del prodotto ittico. In particolare, per ciò che riguarda l'Italia sono stati programmati controlli per l'anno in corso concernenti il divieto di mangimi in acquacoltura (2015-7615).

In tal senso è quindi, auspicabile che il legislatore (ricependo le linee guida dettate dai risultati della ricerca in questo settore) disciplini in modo sempre più dettagliato, dando attuazione alle direttive Comunitarie in materia, le pratiche di allevamento in acquacoltura, prescrivendo, tra le altre cose, un minimo impiego di farine e oli di pesce in modo da garantire al consumatore un prodotto con qualità nutrizionali ed organolettiche costanti.

Del pari è necessario che un'attenzione particolare venga rivolta da parte degli enti e delle istituzioni alle conoscenze scientifiche in relazione ai cambiamenti climatici, allo sfruttamento eccessivo delle risorse ittiche, alla perdita degli habitat e all'inquinamento, problematiche oggi estremamente attuali, anche nel tentativo di ripristinare la produttività in relazione alle rinnovate esigenze di mercato.

REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

Alves, R.N., Cordeiro, O., Silva, T.S., Richard, N., de Vareilles, M., Marino, G., Di Marco, P., Rodrigues, P.M., Conceicao, L.E., 2010. Metabolic molecular indicators of chronic stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) using comparative proteomics. *Aquaculture* 299, 57-66.

Arends R.J., Mancera, J.M., Muñoz, J.L., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G., 1999. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *J Endocrinol.*, 163(1), 149-157.

Bahuaud, D., Mørkøre, T., Østbye, T.-K., Veiseth-Kent, E., Thomassen, M.S., Ofstad, R. 2010. Muscle structure responses and lysosomal cathepsins B and L in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) pre- and post-rigor fillets exposed to short and long-term crowding stress, *Food Chemistry*, 118.

Bohne-Kjersem, A., Skadsheim, A., Goksoyr, A., Grosvik, B.E., 2009. Candidate biomarker discovery in plasma of juvenile cod (*Gadus morhua*) exposed to crude North Sea

oil, alkyl phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Marine Environmental Research* 68, 268-277.

Boglionne, C., Pulcini, D., Scardi, M., Palamara, E., Russo, T., Cataudella, S., 2014. Skeletal Anomaly Monitoring in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) Reared under Different Conditions. *Plos one* 9(5), e96983.

Braithwaite V.A., Huntingford F.A., 2004. Fish and welfare: do fish have the capacity for pain perception and suffering? *Animal Welfare*, 13, 581-592.

Brunt, J., Hansen, R., Jamieson, D.J., Austin, B., 2008. Proteomic analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) serum after administration of probiotics in diets. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 121, 199-205.

Cobcroft, J.M., Pankhurst, P.M., Sadler, J., Hart, P.R., 2001. Jaw development and malformation in cultured striped trumpeter *Latris lineata*. *Aquaculture*, 199: 267-282.

Cordeiro, O.D., Silva, T.S., Alves, R.N., Costas, B., Wulff, T., Richard, N., de Vareilles, M., Conceicao, L.E., Rodrigues, P.M., 2012. Changes in liver proteome expression of Senegalese Sole (*Solea senegalensis*) in response to repeated handling stress. *Marine Biotechnology* 14, 714-729

Galeotti, M., Beraldo, P., de Dominis, S., Angelo, L., Ballesstrazzi, R., Musetti, R., Pizzolito, S., Pinosa, M., 2000. A preliminary histological and ultrastructural study of opercular anomalies in gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 22, 151-157.

Kumar, V., Jiang, I.F., Yang, H.H., Weng, C.F., 2009. Effects of serum on phagocytic activity and proteomic analysis of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) serum after acute osmotic stress. *Fish & Shellfish Immunology* 26, 760-767.

LeDoux, J., 1996. *The Emotional Brain: The Mysterious Underpinnings of Emotional Life*. Simon & Schuster.

Martin, S., Vilhelmsson, O., Medale, F., Watt, P., Kaushik, S., Houlihan, D.F., 2003. Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout. *Biochimica EtBiophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1651, 17-29.

Morais, S., Silva, T., Cordeiro, O., Rodrigues, P., Guy, D.R., Bron, J.E., Taggart, J.B., Bell, J., Tocher, D.R. 2012. Effects of genotype and dietary fish oil replacement with vegetable oil on the intestinal transcriptome and proteome of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics* 13, 448.

Morzel, M., Chambon, C., Lefevre, F., Paboeuf, G., Laville, E., 2006. Modifications of trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle proteins by pre-slaughter activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2997-3001.

Noble, C., Kadri, S., Mitchell, D.F., Huntingford, F.A. 2007. Influence of feeding regime on intraspecific competition, fin damage and growth in 1+ Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.) held in freshwater production cages. *Aquacult. Res.*, 38, 1137-1143.

Olsen, R.E., Sundell, K., Hansen, T., Hemre, G.I., Myklebust, R., Mayhew, T.M., Ringø, E. 2002. Acute stress alters the intestinal lining of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: An electron microscopical study. *Fish Physiol Biochem*, 26, 211-221.

Olsen, R.E., Sundell, K., Mayhew, T.M., Myklebust, R., Ringø, E., 2005. Acute stress alters intestinal function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*, 250(1-2):480-495.

Provan, F., Bjornstad, A., Pampanin, D.M., Lyng, E., Fontanillas, R., Andersen, O.K., Koppe, W., Bamber, S., 2006. Mass spectrometric profiling-a diagnostic tool in fish? *Marine Environmental Research* 62, S105-S108.

Russell, S., Hayes, M.A, Simko, E., Lumsden, J.S. 2006. Plasma proteomic analysis of the acute phase response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to intraperitoneal inflammation and LPS injection. *Developmental and Comparative Immunology* 30, 393-406.

Schreck, C.B., 1981. Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors. In: Pickering, A.D. (Ed.), *Stress and Fish*. Academic Press, London, 295-321.

Schreck, C.B., Maule, A.G., 2001. Are the endocrine and immune systems really the same thing? In: Goos, H.J.T., Rostogi, R.K., Vaudry, H., Pierantoni, R. (Eds.), *Monduzzi Editore. CD ROM Book*, Naples, 351-357.

Sfakianakis, D.G., Georgakopoulou, E., Papadakis, I., Divanach, P., Kentouri M., 2006. Environmental determinants of hemal lordosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 254, 54-64.

Sneddon L.U., Braithwaite V.A., Gentle M.J., 2003. Do fish have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proc. Royal Society of London*, 270, 1115-1121.

Toronto Moore, R.E., Kirwan, J., Doherty, M.K., Whitfield, P.D., 2007. *Biomarker Discovery in Animal Health and Disease: The Application of Post-Genomic Technologies*. *Biomarker Insights*, 2, 185-196.

Tort L. and Teles M., *The Endocrine Response to Stress - A Comparative View*. 2011. *The Endocrine Response to Stress - A Comparative View*, Basic and Clinical Endocrinology. Up-to-Date, Dr. Fulya Akin (Ed.), ISBN: 978-953-307-340-8.

Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol Rev*, 77(3), 591-625.

Yadegari, M., Raissi, M., Ansari, M., 2011. A radiographical study on skeletal deformities in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *Global Veterinaria* 7 (6), 601-604.