



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Impatto della manipolazione e del contenimento sulla soglia del dolore e comportamenti complessi

Luca Lorenzini

DIMEVET : Dipartimento di scienze
Mediche Veterinarie

1-Stress: definizione

Lo **stress** è una **sindrome generale di adattamento (SGA)** atta a **ristabilire un nuovo equilibrio interno** (omeostasi) **in seguito a fattori di stress** (stressors). Le alterazioni dell'equilibrio interno possono avvenire a livello endocrino, umorale, organico, biologico.

... lo stress è una **reazione fisiologica essenziale** per il mantenimento dell'omeostasi animale, cioè di quelle condizioni ottimali di operatività di un organismo.

Questa considerazione è valida **finché lo stress si mantiene acuto**, per consentire gli adeguamenti in presenza di una variazione ambientale che li richiede.

Quando lo stress si mantiene nel tempo diventa una condizione **negativa**, che impatta sia sulla componente fisica che psichica/etologica dell'animale



1-Stress: definizione

La **definizione di stress** va di pari passo con la **definizione di benessere** che deve prevedere una serie di parametri.

Cinque libertà necessarie per non mettere a rischio lo stato di benessere di un animale (Brambell Report, 1965):

- ① Libero dalla fame e dalla sete
- ② Libero da fastidi fisici e dal **dolore**
- ③ Libero da traumi o malattie
- ④ Libero dalla **paura** e dallo **stress**
- ⑤ Libero di esprimere la maggior parte dei suoi modelli comportamentali

Definizione di **benessere** fornita da Blood e Studdert :

“il mantenimento di standard appropriati di allevamento, alimentazione e cure generiche, la prevenzione ed il trattamento delle malattie e la salvaguardia dai maltrattamenti, da dolori e sofferenze ingiustificate”



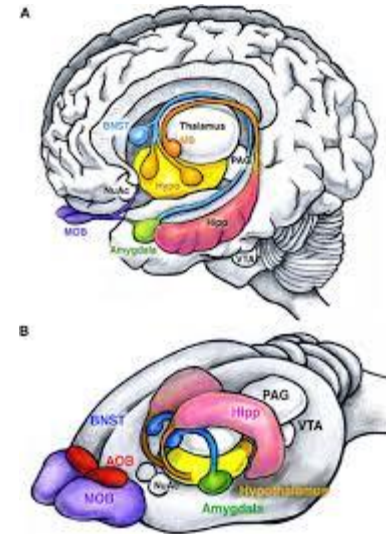
2- Stress: fisiologia

Da un punto di vista fisiologico, lo stress necessita dell'integrazione tra l'operatività di:

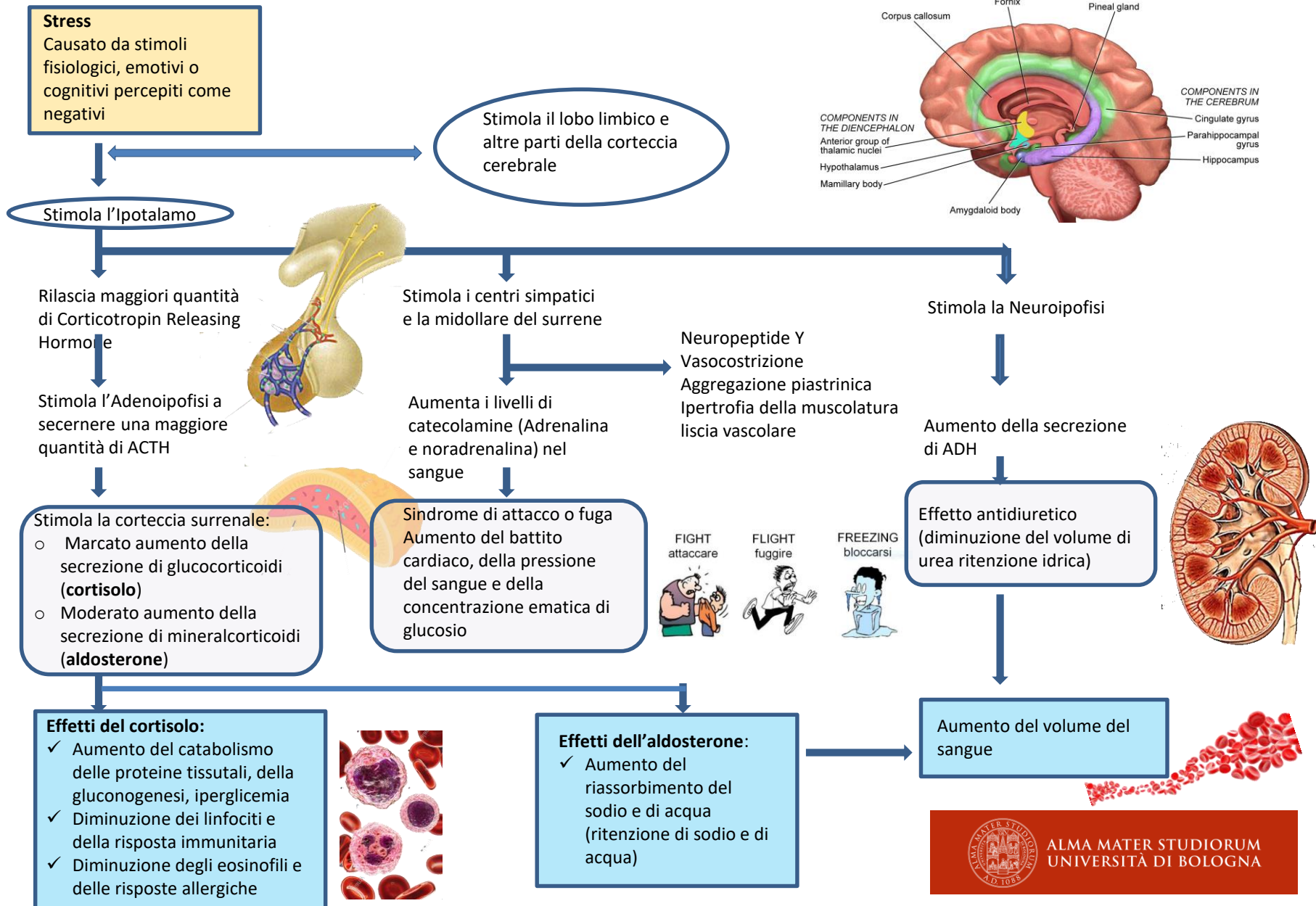
- sistema nervoso
- sistema endocrino
- sistema immunitario

È una risposta integrata che coinvolge il sistema nervoso centrale:

- l'ipotalamo
- il sistema limbico
- le connessioni con l'ipofisi



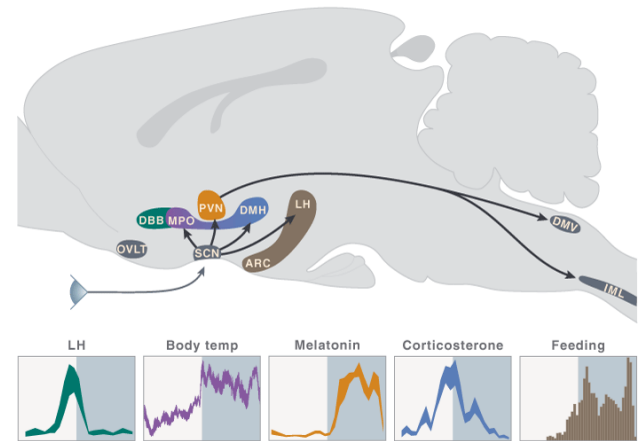
3- Stress: conseguenze sistemiche ipotalamo-dipendenti



3- Stress: conseguenze sistemiche ipotalamo-dipendenti

L'**ipotalamo**, anche se costituito da pochi neuroni, è il centro del sistema nervoso che controlla alcuni aspetti essenziali della vita di un individuo:

- regolazione della riproduzione e dell'aggressività
- regolazione della temperatura corporea,
- regolazione dell'assunzione di cibo
- regolazione dei ritmi biologici



Una disarmonia della funzione dell'ipotalamo come in caso di stress prolungato, influisce su questi parametri

4-Stress: riconoscimento dei sintomi

Comportamento "NORMALE"

MOUSE ETHOGRAM: è un elenco completo di comportamenti specifici per specie, che descrive le caratteristiche e le funzioni di ciascun comportamento eseguito dall'animale



Exploratory behavior

L'esplorazione viene eseguita per fornire all'animale informazioni sull'ambiente circostante, o per individuare elementi particolari (ad es. cibo) o individui (ad es. compagni o concorrenti) nell'ambiente.

Presentano 4 fasi: Ricerca, attesa, approccio, esplorazione



Affiliative Interactions

Sono comportamenti e posture eseguite per ottenere maggiori informazioni sull'ambiente abitativo e sui compagni. Le interazioni affiliate funzionano anche per sviluppare e rafforzare i legami sociali. L'allo-grooming è un modo intimo per esplorare i corpi dei compagni di gabbia, oltre a rafforzare i legami sociali attraverso la cura reciproca. Il sonno di gruppo è un'interazione sociale inattiva che è sia psicologicamente che fisiologicamente benefica ai fini del legame, della sicurezza e del calore.

Agonistic interactions

Consentono a un animale di ottenere il controllo delle risorse effettive o future o di aumentare il suo successo riproduttivo a spese di un secondo animale.

Comportamento di minaccia

Comportamenti aggressivi

Comportamento di sottomissione

Comportamenti difensivi



Sexual behaviors

Lo scopo di un'interazione sessuale è la riproduzione. Affinché abbia luogo la copula, deve esserci prima un «atteggiamento» sessuale. La «motivazione» sessuale può essere vista dalla postura nella femmina e da due diverse manovre: *crawl under*, *push past*.

Dopo l'atteggiamento di motivazione, il topo maschio:

- 1) «esplorerà» la potenziale compagna
- 2) la inseguirà
- 3) la monterà
- 4) copulerà
- 5) finirà con una sessione di auto-grooming post atto.

È importante notare che la femmina può interrompere l'incontro sessuale in qualsiasi momento durante la sequenza di interazione del maschio.



Maternal Behaviors

L'assistenza materna è cruciale per la sopravvivenza di un cucciolo, poiché i giovani di questa specie nascono senza peli e con capacità sensoriali e motorie poco sviluppate.

Le interazioni materne hanno implicazioni nello sviluppo fisiologico, psicologico e sociale o nei topi e alcuni di questi effetti rimangono nell'età adulta.

Il comportamento materno viene stimolato attraverso una combinazione di fattori ormonali e stimoli esterni dai cuccioli.

I cambiamenti ormonali → la costruzione del nido;

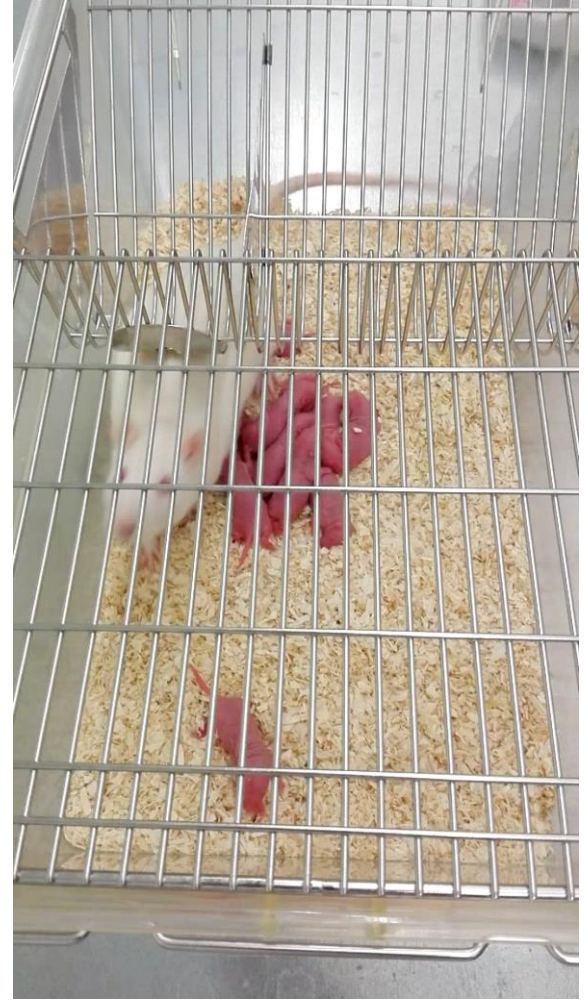
tuttavia il «rumore» dei cuccioli può anche indurre alla costruzione di nidi anche femmine nulliparie non gravide.

Il nido costruito per la riproduzione dalle femmine è in genere più grande e più riparato rispetto ai nidi in cui normalmente si nascondono e dormono i topi (Weber & Olsson, 2008).

Una madre usa segnali olfattivi nel suo latte e nelle sue urine per stabilire un'identità sociale unica per i suoi piccoli. Interferire (aggiungere odori indesiderati dalla manipolazione o rimuovere odori cambiando le gabbie) con questi segnali di identificazione olfattiva rischia di interrompere il comportamento materno, in particolare durante la prima settimana dopo il parto.

In natura l'infanticidio può far parte del comportamento materno; tuttavia, in cattività, è considerato un comportamento disadattato.





Abnormal behaviors

Sono azioni individuali e sociali che sono distruttive o dannose per il benessere fisiologico, psicologico e sociale di un animale e dei compagni di gabbia.

Sono comportamenti che differiscono per modello, frequenza o contesto da quelli mostrati dalla maggior parte dei membri di una specie.

Il tipo di comportamento anomalo, disadattivo o malfunzionante, esposto da un topo dipende dall'individuo e dal suo ambiente. Ciò è esemplificato da tre categorie di comportamenti anomali: infanticidio, «barbiere» e stereotipia.

L'infanticidio è il prodotto comportamentale di un animale normale in un ambiente anomalo, mentre la stereotipia e il barbiere sono le conseguenze di animali anomali in ambienti anomali.



Stress: alcuni suggerimenti

Per quanto riguarda la stabulazione degli animali, prestare attenzione alla cura del macroclima e del microclima, che deve essere specie-specifico:

- Ventilazione
- Rumore
- Luce
- Temperatura
- Umidità
- Odore

Manipolazione (tempo !)

Example exploration of novel radial maze
when mice handled by tail or tunnel

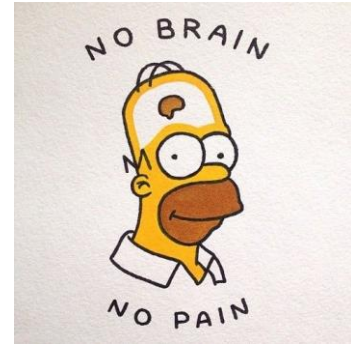


DOLORE

È un'esperienza negativa con una funzione positiva

- è un meccanismo critico di sopravvivenza
- istruisce l'individuo a evitare condizioni pericolose
- modifica il comportamento
- adatta la fisiologia alla situazione di dolore
- promuove processi riparativi nell'organismo

solo se parliamo di **DOLORE ACUTO** (il sintomo dolore)



5- Dolore: altre definizioni dell' International Association for the Study of Pain



Il dolore è un'esperienza sensoriale ed emozionale spiacevole associata a danno tissutale, in atto o potenziale, o descritta in termini di danno

Nocivo: Stimolo che danneggia o rischia di danneggiare il tessuto

Stimolo nocicettivo: Stimolo potenzialmente lesivo per i tessuti

Iperalgesia: Aumento della sensazione di dolore evocata da stimolo nocicettivo

Allodinia: Condizione di dolore evocata da stimoli normalmente non dolorosi

Analgesia: Rimozione del dolore



6-Dolore: vie di trasmissione

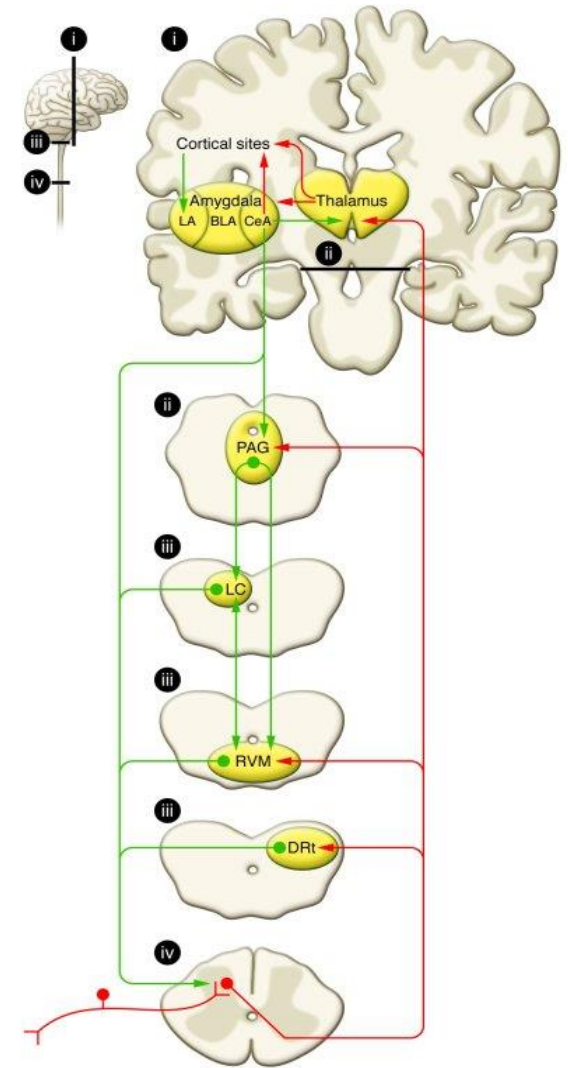
Vie ascendenti del dolore:

Neurone primario: Nocicettori

Neurone secondario: Midollo spinale (corno dorsale I-II lamina);
fascio spino talamico

Midollo allungato (grigio periacquiduttale)

Neurone terziario: Nuclei talamo; Corteccia sensoriale



6- Dolore: sistemi dell'analgesia

Vie discendenti spinali

COMPONENTI:

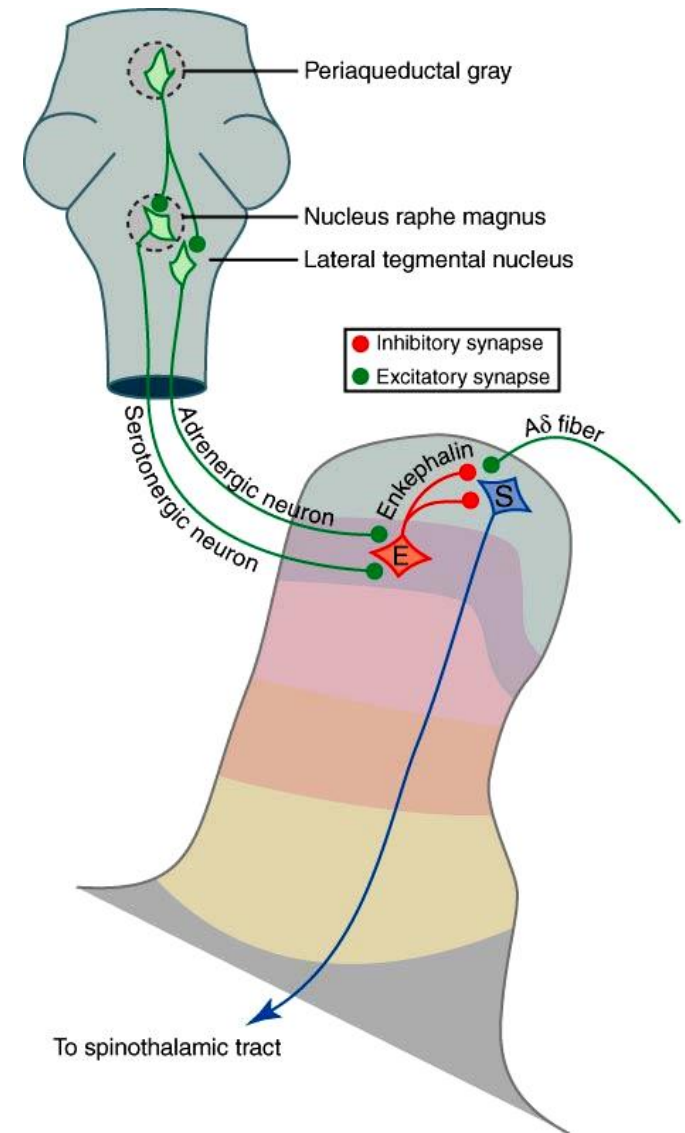
- sostanza grigia periaqueduttale (PAG)
- nucleo raphe magno
- locus coeruleus

Questo sistema può essere diversamente attivato (stimolazione elettrica, farmaci oppioidi, adrenergici, serotonergici, stress, paura)

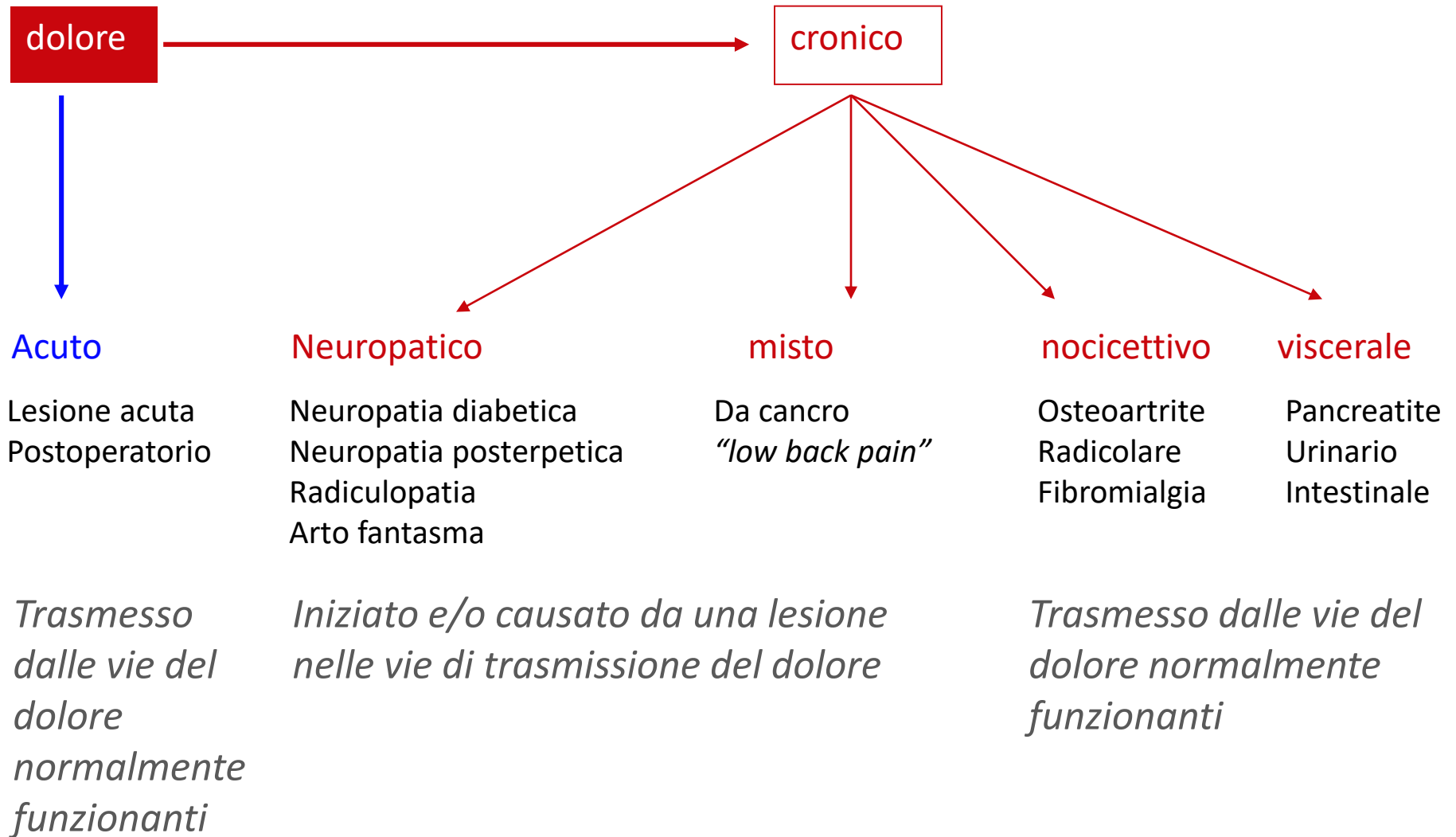
Opera attraverso proiezioni discendenti spinali su un interneurone oppioide ad azioni inibitoria presinaptica sul rilascio di neurotrasmettitore dal neurone sensitivo primario nocicettore

In animali femmine, esiste un sistema discendente aggiuntivo dal PAG, sensibile agli estrogeni, attivato da alti livelli plasmatici di estrogeni (es parto)

Animali in cattività e ritmo circadiano degli oppioidi



5-Dolore



Essendo una *un'esperienza sensoriale ed emozionale spiacevole* → **Pain is always subjective** (IASP 1979)

Gold-standard (umano) = autovalutazione

Può essere impossibile con i parametri fisiologici o comportamentali riuscire a distinguere se il distress sia la conseguenza di un dolore o se sia esso stesso, il distress, la causa dei parametri alterati



Stress- dolore : un rapporto stretto, alcuni suggerimenti

- *Il **dolore** è una condizione che determina stress (acuto e cronico, a seconda della sua durata)*
- *Lo **stress** altera la percezione del dolore (“analgesia da stress”)*

Il medico veterinario e lo sperimentatore devono imparare a riconoscere gli **indicatori comportamentali** del dolore

situazioni evidenti (ferite)

alterate risposte comportamentali (aumento di aggressività, evitamento, riluttanza al tocco, diminuzione appetito, diminuita attività, letargia, vocalizzazione/pianto)

alterazioni fisiologiche (aumento frequenza cardiaca, pressione arteriosa, iperventilazione, salivazione)


alterazioni bio-umorali (aumento cortisolo o adrenalina plasmatiche)



Publication Bias in Animal Welfare Scientific Literature

Authors

[Authors and affiliations](#)

Agnes A. van der Schot, Clive Phillips 

Le osservazioni sono più inclini a bias se:

- 1) la variabile non è chiaramente definita,
- 2) l'oggetto della osservazione è difficile da percepire,
- 3) le osservazioni richiedono una valutazione soggettiva,
- 4) l'osservatore ha un interesse specifico nell'esito dello studio.



Bias
Cognitivi

Il metodo o il meccanismo attraverso il quale gli esseri viventi effettuano scelte e prendono decisioni è da sempre motivo di studio e ricerche, e non solo parlando di metodo scientifico, ma anche per ogni singolo individuo

Bias della negatività si identifica l'eccessiva attenzione verso elementi negativi considerati come i più importanti, con conseguente tendenza a dare maggior peso agli errori e attribuendo così una valutazione negativa alla propria prestazione

La cura: il pensiero logico

BIAS DI CONFERMA

tendenza a considerare solo le prospettive che alimentano i nostri punti di vista preesistenti.

OPEN ACCESS Freely available online



Confirmation Bias in Studies of Nestmate Recognition: A Cautionary Note for Research into the Behaviour of Animals

Ellen van Wilgenburg*, Mark A. Elgar

Department of Zoology, University of Melbourne, Melbourne, Victoria, Australia

Studi effettuati NON in cieco danno risultato positivo nel 73% dei casi a confronto di una positività alla ipotesi negli studi in doppio cieco solo del 21%



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Lo studio del dolore presuppone la possibilità di riprodurre sull'animale una condizione algica per permettere lo studio dei meccanismi e l'eventuale test di molecole o altre strategie terapeutiche.

La difficoltà maggiore è rappresentata dal come effettuare le misurazioni

1) Valutazione del dolore spontaneo: osservazione del comportamento ed in particolare della postura dell'animale, attribuendo uno score numerico incrementale per posture progressivamente più anomale.

2) Misura del dolore evocato (soglia del dolore): per la misura della soglia algica si ricorre a dispositivi che somministrano all'animale uno stimolo potenzialmente algico e si misura la latenza di risposta dell'animale (libero di muoversi)



Reflexive Pain Tests: valutano le risposte a stimoli termici, meccanici ed elettrici. Questi test attivano i nocicettori nel sito di stimolazione e conseguenti risposte motorie localizzate e stereotipate. Molte di queste risposte possono manifestarsi in assenza di attivazione soprasspinale, tuttavia sono modificati dai siti soprasspinali. Queste risposte richiedono un sistema motorio intatto.

Questi test possono fornire informazioni sui casi di dolore evocati in soggetti umani.

Risposta:

a stimoli nocivi (iperalgia),
a stimoli innocui (allodinia)
a riposo (dolore spontaneo).

Gli stimoli possono essere applicati nel sito di lesione o al di fuori del sito di lesione.

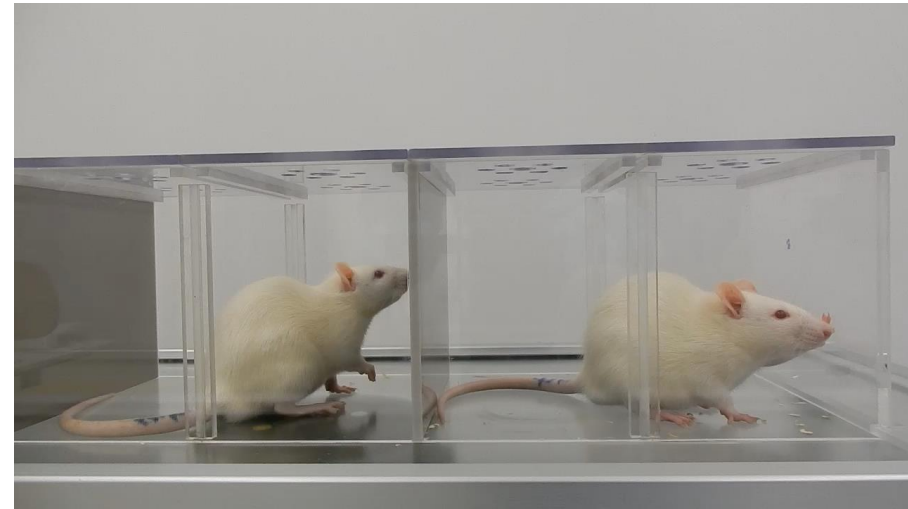
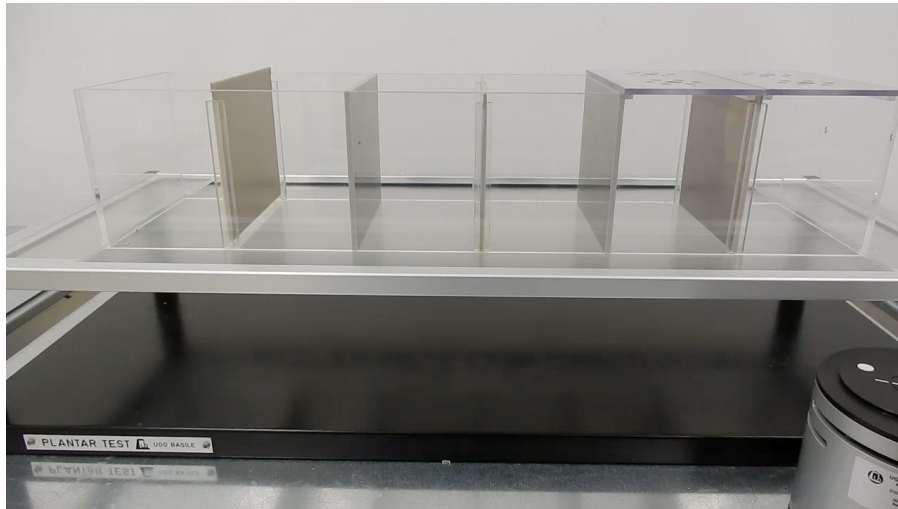
Le variazioni di soglia (o risposta) a stimoli nocivi nel sito di lesione sono definite *iperalgia primaria*

Variazioni di soglia o sensibilità al di fuori del sito di lesione sono definite *iperalgia secondaria* ed è ben rappresentata dalla sensibilizzazione dei neuroni nel midollo spinale o nel SNC.



Test di Hargreaves è stato sviluppato per fornire un test della sensibilità al calore in modo maggiormente localizzata e comporta l'applicazione di calore alle zampe posteriori dei roditori.

Il test di Hargreaves presenta un vantaggio rispetto al Hot Plate Test in alcuni modelli di dolore, poiché l'arto di controllo e sperimentale possono essere testati all'interno dello stesso animale.



Plantar test: “**Hargreaves'** Method

NON Reflexive Pain Tests

Comportamento da dolore spontaneo

Una delle misure più comuni è la quantificazione del numero di leccate alla zampa in seguito ad iniezione di un composto infiammatorio.

Allo stesso modo, la quantificazione dei comportamenti di writhing dopo un'iniezione intraperitoneale di uno stimolo doloroso può essere utile per la quantificazione in modelli di dolore viscerale.

Il test della formalina è stato prezioso poiché è stata una delle prime procedure a produrre una risposta "tonica". Non è tuttavia chiaro quali condizioni cliniche siano associabili a questo tipo di stimolo dolorifico.

Una misura semiquantitativa della forza delle zampe è stata utilizzata in modelli di dolore articolare, dolore neuropatico e dolore postoperatorio per esaminare i comportamenti spontanei (es Catwalk).



Conditioned Place Preference:

Sono stati usati in protocolli quali l'auto-somministrazione di analgesici

Il sistema è composto da un apparato con tre box, una camera neutra e due camere distinte da differenti segnali visivi, materiali e olfattivi.

Pre-condizionamento (somministrazione di un farmaco analgesico in una determinata camera → associazione camera-analgesico

Durante il test, la quantità di tempo trascorso nella camera associata all'analgescico indica una preferenza.

La preferenza di luogo indotta dall'associazione al sollievo dal dolore con un contesto distinto si utilizza per argomentare una manifestazione di dolore in atto o spontaneo, non evocato e non riflessivo.



Avoidance test

Questi test possono essere utilizzati per testare la componente spiacevole del dolore.

Thermal avoidance: una apparato con due box due camere in cui è possibile modificare la temperatura e registrare la preferenza o la latenza di fuga dalla un box. Questo è diverso dal test della piastra riscaldante, in cui gli animali non possono sfuggire.

Il Place Avoidance (CPA) è simile al Conditioned Place Preference in quanto gli animali sono condizionati, ma come condizionamento gli animali hanno una iniezione con una sostanza nociva (come la formalina).

Nel giorno di test successivo viene quantificata la preferenza degli animali per i due box. Clinicamente, le persone con dolore, particolarmente dolori cronici, evitano stimoli che causano dolore.

Un problema con i paradigmi CPP e CPA è che implicano una significativa componente di apprendimento e vi è il rischio di fattori confondenti nel caso in cui il trattamento analgesico (o il dolore stesso) comprometta il funzionamento cognitivo.



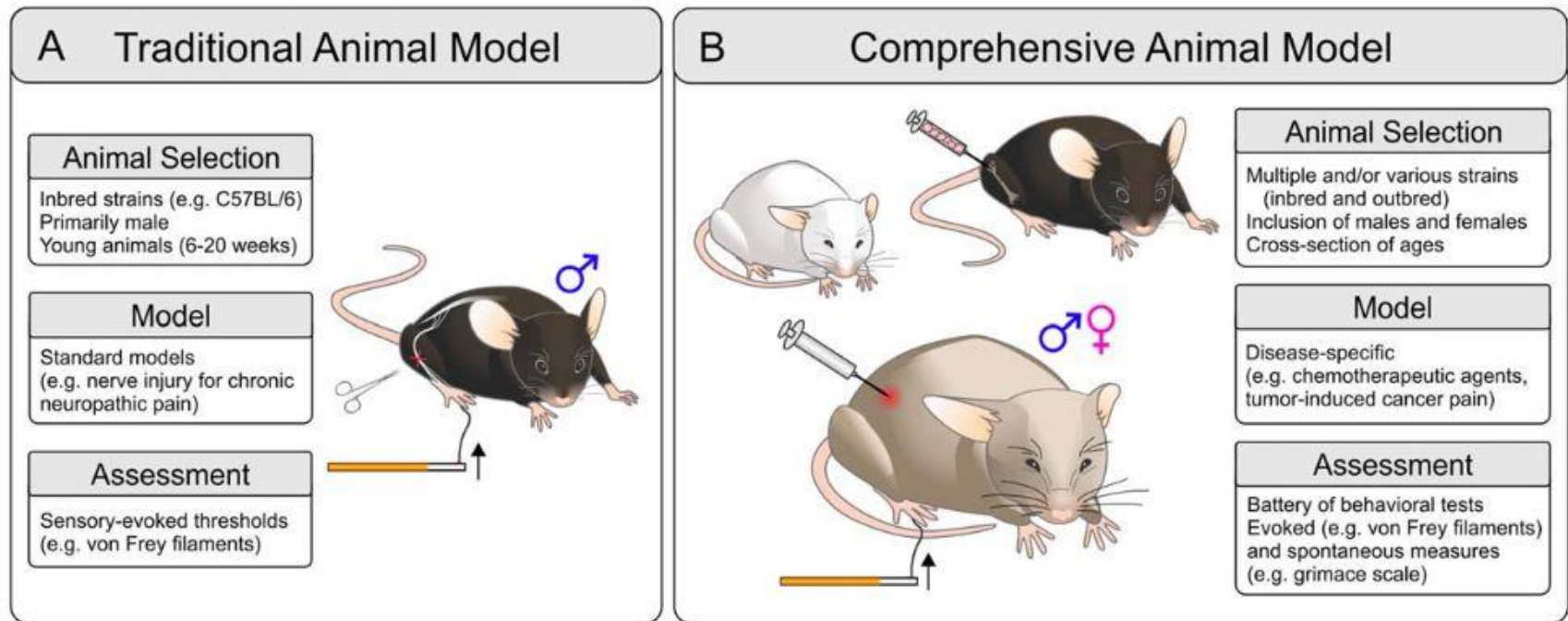
Qualità della vita e normale funzione

Valutazioni generali di attività, inattività, cura, alimentazione e consumo, postura, andatura e interazione sociale possono indicare se l'animale è in una condizione algica.

Queste sessioni di osservazioni possono essere fatte con gli animali nel loro ambiente normali (propria gabbia) oppure in un ambiente nuovo. Le misurazioni dell'attività locomotoria e del comportamento spontaneo sono state utilizzate in modelli infiammatori, neuropatici e artrici e sono probabilmente utili anche in altri modelli animali di dolore.

Le persone con dolore sia acuto che cronico mostrano riduzioni significative dei livelli di attività fisica e partecipazione alle attività quotidiane, e quindi queste misure hanno una rilevanza clinica diretta





Limitazioni dei modelli animali tradizionali

A: Utilizzo di una coorte omogenea per ricapitolare una popolazione umana eterogenea. Animali inbred, un solo ceppo, giovani (in media da 6 a 20 settimane di età) e prevalentemente maschi. Gli studi sono spesso limitati a un modello solo e utilizzano esclusivamente soglie sensoriali evocate (ad esempio, filamenti von Frey)

Suggerimenti per implementare i modelli tradizionali

Ceppi multipli, vari per età e sesso.
 Uso di modelli specifici per la malattia possono migliorare la comprensione.
 Metodi usati per valutare la progressione del dolore potrebbero includere sia un componente sensorio-evocato che misure di dolore spontaneo (per esempio, grimace scale) usate in combinazione, per avere un fenotipo del dolore completo.



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

LUCA LORENZINI

DIMEVET

luca.lorenzini8@unibo.it

www.unibo.it