



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Psicologia Generale
Corso di laurea in Psicologia Cognitiva Applicata

Elaborato finale

Evidenze a supporto della presenza di senienza nei molluschi cefalopodi e nei crostacei
decapodi, una rassegna.

Evidence of sentience in cephalopod molluscs and decapod crustaceans, a review.

Relatore: Prof.ssa Lucia Regolin

Anno Accademico 2021/2022

Laureanda: Silvia Braidò

Matricola: 1233564

Indice

<i>Introduzione</i>	4
1. DEFINIRE LA SENZIENZA: DALL'ASTRATTO AL CONCRETO	6
1.1 Una definizione di senzienza.....	6
1.2 La questione della senzienza negli invertebrati	7
1.3 Risolvere la questione della senzienza	9
1.4 I criteri di Smith & Boyd (1991).....	11
1.5 I criteri di Birch et al. (2021)	13
1.6 Schema di classificazione	16
2. EVIDENZE DI SENZIENZA NEI CEFALOPODI	19
2.1 Criterio uno.....	19
2.2 Criterio due.....	23
2.3 Criterio tre	25
2.4 Criterio quattro.....	27
2.5 Criterio cinque	30
2.6 Criterio sei	35
2.7 Criterio sette.....	39
2.8 Criterio otto	45
3. EVIDENZE DI SENZIENZA NEI DECAPODI	47
3.1 Criterio uno.....	47
3.2 Criterio due.....	51
3.3 Criterio tre	54
3.4 Criterio quattro.....	55
3.5 Criterio cinque	61
3.6 Criterio sei	64

3.7 Criterio sette.....	67
3.8 Criterio otto.....	73
4. I RISCHI DELLE PRATICHE COMMERCIALI.....	75
4.1 Cefalopodi nella pesca marittima.....	75
4.2 Cefalopodi in acquacoltura.....	79
4.3 Maneggiamento durante la cattura, il trasporto e la vendita dei decapodi.....	84
4.4 Stordimento dei decapodi.....	96
4.5 Uccisione meccanica (dispatch) dei decapodi.....	100
4.6 Uccisione dei decapodi mediante temperature estreme.....	102
4.7 Uccisione dei decapodi utilizzando l'immersione in acqua dolce.....	104
4.8 Decapodi nell'acquacoltura.....	105
5. RACCOMANDAZIONI FINALI.....	107
Conclusioni.....	110
Bibliografia.....	111

Introduzione

Nel 2021, la *London School of Economics and Political Science* ha pubblicato un rapporto di più di ottanta pagine con lo scopo di riconoscere la senzienza a due gruppi tassonomici di invertebrati: i molluschi cefalopodi e i crostacei decapodi. Il rapporto firmato da Birch, J., Burn, C., Schnell, A., Browning H. e Crump, A., (2021), evidenzia meticolosamente i risultati di diverse centinaia di studi e individua, con un approccio rigoroso, i criteri più adatti (revisionando quelli già esistenti di Smith e Boyd) a stabilire o meno la presenza di senzienza in questi gruppi tassonomici, con lo scopo di garantire loro dei livelli di benessere adeguati e una vita il più possibile lontana dalla sofferenza. Successivamente, il Dipartimento esecutivo dell'Ambiente, dell'Alimentazione e degli Affari Rurali britannico (DEFRA) ha preso in considerazione il rapporto, sottoscrivendo le richieste di Birch et al. (2021) e ponendo così le specie in questione sotto la protezione dell'*Animal Welfare Act* britannico.

Estendere il concetto di senzienza agli invertebrati è sicuramente un passo rilevante, soprattutto alla luce di quanto sancito dalla Dichiarazione di Cambridge sulla Coscienza (2012). In questa dichiarazione, sottoscritta in accordo da un autorevole gruppo di neuroscienziati cognitivi, neurofarmacologi, neurofisiologi, neuroanatomisti e neuroscienziati computazionali, viene specificato come alcune delle reti subcorticali presenti negli esseri umani siano responsabili di comportamenti e di stati emotivi simili anche negli animali non umani; inoltre, le reti neurali responsabili degli stati comportamentali ed elettrofisiologici dell'attenzione, del sonno e della decisione, sarebbero presenti nei molluschi cefalopodi sin dalla loro comparsa sulla terra. In sintesi, la dichiarazione di Cambridge (2012) riconosce in questo, come in altri gruppi di animali vertebrati e anche invertebrati (per esempio gli insetti e gli aracnidi), dei substrati neurologici che possono generare degli stati di coscienza.

Il riconoscimento di una coscienza rappresenta un grande punto di svolta per il mondo animale, e la senzienza potrebbe essere in questo senso considerata come il suo precursore.

Il rapporto di Birch et al. (2021) ha sicuramente permesso un passo in avanti per gli invertebrati, ma lo stesso discorso vale anche per gli esseri umani: riconoscere il rispetto per l'etica animale, ampliando lo spettro di inclusione per quegli animali che è possibile definire sensibili e

accettando il concetto che la sofferenza non rappresenti una prerogativa unicamente appartenente al mondo dei mammiferi, permette non solo il progresso e le scoperte in nuovi campi, ma anche e soprattutto per quanto riguarda la stessa coscienza umana.

L'obiettivo di questa tesi è dunque quello di riportare in maniera chiara tutte le evidenze che hanno reso possibile al gruppo di lavoro di Birch (2021) di far riconoscere i molluschi cefalopodi e i crostacei decapodi come animali senzienti e meritevoli di rispetto e protezione da parte dalla legge britannica, con la speranza che questo possa rappresentare solo un piccolo passo verso una maggiore consapevolezza dell'impatto delle nostre azioni su una parte del regno animale assai più ampia di quanto sinora considerato.

1. DEFINIRE LA SENZIENZA: DALL'ASTRATTO AL CONCRETO

1.1 Una definizione di senzienza

La senzienza, molto semplicemente, è la capacità di essere sensibili. Tra i tipi di sensibilità possono essere incluse quella allo stress, all'ansia, alla noia, alla fame, alla sete, al piacere, al dolore, al calore, alla gioia, al comfort e all'eccitamento.

Noi esseri umani siamo esseri senzienti, e questa sensibilità ci è familiare grazie al nostro vivere quotidiano; un essere senziente è "cosciente" nel senso più elementare del termine, perché non ha bisogno di essere in grado di riflettere sulla sua sensibilità come facciamo noi, o di comprendere i sentimenti altrui: essere senziente vuol dire semplicemente avere delle sensibilità.

La senzienza va però distinta dalla nocicezione; infatti, la nocicezione è il rilevamento da parte del sistema nervoso di stimoli dolorifici effettivi o potenziali (come un calore estremo, estrema acidità o alcalinità, tossine o ferite sulla pelle). Un nocicettore è quindi un recettore sensoriale ad alta soglia del sistema nervoso somatosensoriale periferico, in grado di trasdurre e codificare gli stimoli dolorifici (International Association for the Study of Pain, 2017). La rilevazione di dolore non richiede necessariamente senzienza; è infatti possibile, in linea di principio, che uno stimolo doloroso venga rilevato, senza però alcuna esperienza diretta o sensazione da parte del sistema/organismo che lo rileva.

Negli esseri umani, sentimenti di dolore, angoscia o danno fisico fanno spesso parte della risposta a stimoli dolorosi, che vengono inizialmente rilevati dai nocicettori. Ad ogni modo, alcune risposte all'attivazione dei nocicettori, come il riflesso di retrazione di un arto dopo aver toccato una pentola bollente, possono essere indipendenti dall'esperienza consapevole del dolore (Birch et al., 2021).

Inoltre, negli esseri umani, le sensazioni di dolore hanno due aspetti principali: un aspetto sensoriale (viene percepito un danno potenziale o effettivo) e un aspetto affettivo (la sensazione è spiacevole, avversa, negativa): questi due aspetti del dolore sono ampiamente riconosciuti dalla ricerca sul dolore umano (Auvrey et al., 2010). È l'aspetto affettivo con valenza negativa del dolore, la principale fonte di preoccupazione etica nell'ambito del

benessere animale. In parole povere, il dolore ci fa stare male -l'impulso di fare qualcosa per alleviarlo è tipicamente forte - e questo lato affettivo del dolore è ciò che si può cercare di controllare con gli analgesici (antidolorifici) come la morfina (Prince et al., 1985; Caputi et al., 2019).

Il dolore è un esempio all'interno di una categoria più ampia di stati affettivi con valenza negativa, categoria che include anche stati d'ansia, paura, fame, sete, freddo, disagio e noia (Burn, 2017). Tutti questi stati ci fanno stare male e motivano comportamenti volti a rimuoverne le cause. Tutti i sentimenti con valenza negativa possono potenzialmente contribuire ad uno scarso benessere, di conseguenza sono tutte fonti di legittime preoccupazioni etiche. Secondo Birch et al. (2021), questi sentimenti negativi sono quindi rilevanti per la questione della senienza.

1.2 La questione della senienza negli invertebrati

Quali animali, oltre agli esseri umani, sono senzienti? Il progresso nel campo delle neuroscienze e della biologia nel tardo ventesimo e agli inizi del ventunesimo secolo ha reso gradualmente confutabile l'idea che la senienza possa essere unicamente umana, e l'idea che possa esistere senienza nei mammiferi e negli uccelli ha ricevuto ampio consenso all'interno della comunità scientifica (Boly et al., 2013). In anni più recenti, alcuni saggi divenuti dei best seller (Montgomery, 2015; Godfrey-Smith, 2016) hanno inoltre reso popolare l'idea che i polpi potrebbero essere senzienti.

Questa è un'idea che è stata tenuta seriamente in considerazione dagli scienziati per diverse decenni: la Gran Bretagna ha fatto la sua parte nel 1993, inserendo l'*Octopus vulgaris* all'interno del gruppo di animali protetto dall'*Animals Act* del 1986 (ASPA). Nel 2010 è stata pubblicata inoltre la direttiva dell'Unione Europea riguardo all'uso degli animali per scopi scientifici, che è stata convertita in decreto legislativo il 4 marzo 2014: in base a questa legge, l'utilizzo di animali (tra i quali vengono inclusi alcuni invertebrati, ovvero i cefalopodi) per scopi scientifici deve essere autorizzato dal Ministero della Salute. Inoltre, devono essere garantiti degli standard di benessere e protezione, e il responsabile del progetto di ricerca deve favorire quelle procedure che consentano di utilizzare il minor numero possibile di soggetti e che garantiscano una

maggior probabilità di ottenere risultati validi con minime situazioni di sofferenza, distress o danno.

Nel 2012, la Dichiarazione di Cambridge sulla coscienza ha sancito il consenso scientifico sul fatto che gli esseri umani non siano gli unici animali coscienti. Ha specificato che *“gli animali non umani, inclusi i mammiferi e gli uccelli e molte altre creature inclusi i polpi”* possiedono substrati neurologici abbastanza complessi da supportare esperienze cosce. Anche se questa dichiarazione è stata formulata in termini di coscienza piuttosto che di senienza, la capacità di un'esperienza conscia e la capacità di senienza sono strettamente legate, perché i sentimenti sono esperienze cosce nel senso più basilare ed elementare del termine “conscio”. Il riferimento ai polpi sottolinea quindi un riconoscimento crescente all'interno della comunità scientifica internazionale del fatto che almeno qualche invertebrato debba essere seniente (Birch et al., 2021).

Secondo Birch et al. (2021), la questione della senienza negli invertebrati conta sia eticamente che legalmente: se un essere è seniente, allora si può affermare che esistano dei limiti rispetto a ciò che una persona può eticamente fare con quell'essere; un essere seniente ha infatti degli interessi propri e non sarebbe, per questo motivo, corretto agire senza considerazione adeguata. Questa idea rappresenta il cuore di quelle che sono gli attuali sistemi di protezione del benessere animale: tutti sono d'accordo, ad esempio, sul fatto che sia sbagliato trattare un cane come se non avesse alcun interesse per un riparo, per del cibo, per dell'acqua e più in generale per una situazione di benessere. Se alcuni invertebrati fossero senienti, allora sarebbe sbagliato, allo stesso modo, trattarli senza la dovuta considerazione per i loro interessi (Birch et al., 2021).

L'evidenza di senienza è trattata in questa tesi con specifico riferimento a due gruppi tassonomici di invertebrati: i molluschi cefalopodi (cefalopodi) e i crostacei decapodi (decapodi). I cefalopodi sono una classe comprendente circa 750 specie nel Phylum dei molluschi, che include tutte le specie di polpi, calamari, seppie e nautiloidi (Tanner et al., 2017). I decapodi sono un ordine di animali invertebrati nel sub Phylum dei crostacei, che comprende circa 15.000 specie inclusi i granchi, le aragoste, i gamberi di fiume e i gamberi propriamente detti (De Grave et al., 2009; Wolfe et al., 2019).

1.3 Risolvere la questione della senienza

Secondo Birch et al. (2021), è difficile rispondere alla questione della senienza negli invertebrati con assoluta certezza, in quanto non è possibile, per questi animali, comunicare le proprie esperienze come avviene invece nell'uomo. L'essere umano può infatti riportare le sue sensazioni in modo semplice e diretto: lo stesso problema si riscontra anche per gli altri mammiferi, nei quali sono però state evidenziate somiglianze sostanziali con gli esseri umani nell'organizzazione del cervello, nelle funzioni, nella cognizione, nelle emozioni e nel comportamento. La parte del cervello più strettamente legata ad esperienze soggettive negli esseri umani è la neocorteccia, una struttura nella corteccia cerebrale costituita da sei strati organizzati di tessuto neurale. Negli esseri umani la neocorteccia è spessa tra i 2 e i 4 mm e forma la superficie esterna del cervello; la neocorteccia nei mammiferi non primati è pure presente, a dispetto del fatto che la superficie dell'encefalo è assai meno circonvoluta rispetto all'essere umano. La presenza di neocorteccia in altri mammiferi con la stessa organizzazione suddivisa su sei strati ha rappresentato un elemento chiave per l'attribuzione di senienza in questi animali: ha portato ad un consenso scientifico quasi totale sul fatto che anche i mammiferi non umani e non-primati siano senzienti (Birch et al., 2021).

La strategia che mira a cercare similitudini nei meccanismi neurali e nelle strutture cerebrali con il cervello umano regge, anche se in maniera minore, per gli uccelli. Il cervello degli uccelli presenta una struttura chiamata pallio dorsale, che nonostante sia molto diversa dalla neocorteccia umana, in quanto possiede sei cluster di nuclei piuttosto che sei strati laminati, è caratterizzato da sistemi di connettività simili a quelli della neocorteccia (Clayton & Emery, 2015; Güntürkün & Bugnyar, 2016). Questa similarità nell'organizzazione cerebrale tra i mammiferi e gli uccelli ha dunque portato la comunità scientifica ad un ampio accordo sul fatto che anche gli uccelli siano senzienti (Boly et al., 2013).

Questa strategia "antropomorfica" inizia però a venire meno quando si osservano i gruppi di vertebrati più lontanamente imparentati con gli esseri umani, come i pesci: il cervello dei pesci differisce ampiamente da quello dei mammiferi, in quanto non c'è neocorteccia e neanche alcuna struttura che le rassomigli. È per questo motivo che viene talvolta espresso scetticismo rispetto alla senienza nei pesci (Key, 2016).

Il cervello degli invertebrati si differenzia da quello degli umani ancora più radicalmente rispetto a quello dei pesci: gli invertebrati e gli esseri umani sono infatti separati da oltre 500 milioni di anni di storia evolutiva. Anche la struttura generale di base del cervello dei vertebrati (costituita da un proencefalo, un mesencefalo e un romboencefalo) non è presente negli invertebrati (Feinberg & Mallatt, 2016); è a questo punto cruciale sottolineare come possano esistere molteplici percorsi neurologici che portano allo stesso risultato: non c'è dunque ragione di pensare che la senienza non possa essere raggiunta da sistemi strutturalmente diversi rispetto a quelli dei cervelli dei vertebrati (per esempio Feinberg & Mallatt, 2016; Ginsburg & Jablonka, 2019).

Tutto questo porta a chiedersi: cosa può costituire un'evidenza di senienza in una specie che è così evolutivamente lontana dagli esseri umani? Secondo Birch et al. (2021) è necessario fare affidamento almeno in parte alle caratteristiche precipue di tipo comportamentale e cognitivo della senienza: bisogna quindi tracciare attentamente il tipo di comportamenti e di abilità cognitive che implicano un chiaro rischio di dolore, angoscia o danno all'animale, integrando queste evidenze comportamentali e cognitive con le conoscenze sul sistema nervoso dell'animale, così come anche altri ricercatori (per esempio Smith & Boyd 1991; Bateson 1991; Varner 2012; Sneddon et al. 2014; Broom 2014) hanno provato a fare per un lungo periodo. In un rapporto dal titolo "Animal Consciousness" commissionato dalla *European Food Safety Authority* (EFSA) e pubblicato nel 2017 da Le Neindre et al., gli autori evidenziano come la senienza sia una forma di coscienza, notando le similitudini esistenti tra il sistema nervoso centrale e periferico dei mammiferi umani e non umani e includendo pesci e uccelli in quell'insieme di creature capaci di esperire coscientemente il dolore e le emozioni che ne derivano. Gli autori fanno capire come la coscienza sia un concetto controverso, in quanto, oltre ad essere complicato darle una definizione, è difficile stabilire i criteri che permettono di attribuirne l'esistenza per diversi gruppi tassonomici, così come definire i suoi possibili "gradi" di sofisticatezza.

Secondo Birch et al. (2021) sarà sempre possibile, per qualsiasi insieme di caratteristiche precipue di tipo comportamentale, cognitivo e neuroscientifico, che queste possano esistere senza la senienza, e questo è il motivo per cui non è possibile risolvere la questione della senienza degli invertebrati con certezza assoluta. In presenza di gravi minacce per il loro stato

di benessere, è però talvolta necessario agire sulla base di evidenze non conclusive, e questo principio di cautela è generalmente accettato nel campo della scienza del benessere animale (Bateson 1992; Bradshaw, 1998; Birch, 2017).

1.4 I criteri di Smith & Boyd (1991)

Nel 1991, un gruppo di lavoro dell'*Institute of Medical Ethics* del Regno Unito ha prodotto una lista di sette criteri per l'attribuzione di senienza, che sono divenuti influenti nelle successive politiche per il benessere animale (Smith & Boyd, 1991). Per esempio, questi criteri furono applicati nel 2005 da un gruppo di esperti della salute e del benessere animale facenti parte dell'Agencia Europea per gli Standard Alimentari, in un report scientifico che delineava le direttive dell'Unione Europea del 2010 sull'uso degli animali per scopi scientifici (AHAW, 2005).

I criteri sono:

- 1) Possesso di recettori sensibili a stimoli dolorosi localizzati in posizioni funzionalmente utili all'esterno o all'interno del corpo, e connessi da un circuito nervoso alle parti più interne del sistema nervoso centrale.
- 2) Possesso di centri cerebrali che sono più sviluppati in termini di livello di integrazione dei processi cerebrali (specialmente una struttura analoga alla corteccia cerebrale umana).
- 3) Possesso di un circuito nervoso che connette il sistema nocicettivo ai maggiori centri cerebrali.
- 4) Recettori per sostanze oppioidi trovate nel sistema nervoso centrale, specialmente nel cervello.
- 5) Gli analgesici modificano la risposta animale a stimoli che risulterebbero dolorosi per un essere umano.
- 6) La risposta animale ad uno stimolo doloroso per un essere umano è funzionalmente simile alla risposta dell'essere umano (ovvero l'animale si comporta in modo da evitare o minimizzare il danno su sé stesso).

- 7) Persiste una risposta comportamentale dell'animale, il quale mostra una volontà ad evitare di subire di nuovo una procedura dolorosa; l'animale può imparare ad associare eventi apparentemente non dolorosi con eventi apparentemente dolorosi.

Considerando che questi criteri sono stati progettati avendo in mente la valutazione di animali vertebrati, Birch et al. (2021) hanno avuto la necessità di ripensare a dei criteri modificati e aggiornati.

Nello specifico, i criteri (specialmente il criterio neurobiologico) sono in alcuni casi troppo limitanti: il riferimento agli oppioidi nel criterio quattro porta ad una particolare assunzione rispetto al tipo di neurotrasmettitori che modula le esperienze avverse (presumendo che si tratti di oppioidi), ma questa assunzione potrebbe non essere valida nel caso degli invertebrati; ci sono infatti molti altri neurotrasmettitori endogeni che potrebbero potenzialmente modulare le esperienze avverse. Secondo la visione di Birch et al. (2021), le risposte degli animali a stimoli nocivi (di minaccia o effettivi) potrebbero essere modulate soprattutto attraverso un'esperienza di dolore o angoscia.

Secondo Birch et al. (2021) i precedenti criteri sono inoltre vaghi e troppo facilmente soddisficibili (soprattutto i criteri comportamentali, ovvero il sei e il sette): il criterio sei fa riferimento ad una risposta “funzionalmente simile alla risposta umana” il che pare piuttosto vago; quando tocchiamo una stufa calda, per esempio, ritiriamo la nostra mano immediatamente, ma questo è semplicemente un riflesso di retrazione. Anche se proviamo dolore, il dolore non è quello che causa il ritiro della nostra mano: il dolore viene rilevato solo dopo che la mano si è ritirata. Quindi, trovare un riflesso simile in un animale non rappresenterebbe un'evidenza convincente della presenza di dolore. Sono necessari criteri che evidenzino le precise funzioni comportamentali e cognitive e che permettano di portare una prova degli stati affettivi/emotivi negativi. Queste funzioni devono andare oltre l'idea di meri riflessi, e devono implicare un processamento dell'informazione centralizzato e integrato che riguardi gli stimoli nocivi di minaccia o effettivi.

Rispetto al criterio sette, Birch et al. (2021) sostengono che risposte persistenti, insieme alla volontà a non sottostare di nuovo ad una procedura dolorosa, possono essere indicativi di sensibilizzazione (laddove un animale diventa più sensibile in futuro ad uno stimolo o situazione che ha già esperito in passato) piuttosto che di apprendimento associativo. Ma la

sensibilizzazione viene riscontrata in animali che non hanno un sistema nervoso centrale, quali i celenterati (come la medusa e l'anemone di mare) (Ginsburg & Jablonka, 2019, pp. 279-287). Questa non richiede processi centralizzati e integrativi. Un insieme di criteri comportamentali e cognitivi rigorosi per supportare l'ipotesi della senzienza necessitano di identificare abilità che richiedono processi centralizzati ed integrativi. I criteri che possono essere soddisfatti da un sistema privo di sistema nervoso centrale non hanno molte probabilità di ottenere il supporto da parte della comunità scientifica, e non saranno abbastanza robusti da ottenere un consenso.

1.5 I criteri di Birch et al. (2021)

Tenendo conto delle considerazioni di cui sopra, Birch et al. (2021) hanno messo a punto il seguente insieme di criteri per la valutazione della senzienza:

- 1) L'animale possiede recettori sensibili a stimoli nocivi (nocicettori).
- 2) L'animale possiede regioni cerebrali di integrazione capaci di integrare informazioni provenienti da diverse fonti sensoriali.
- 3) L'animale possiede percorsi neurali che connettono i nocicettori alle regioni cerebrali di integrazione.
- 4) La risposta comportamentale dell'animale ad uno stimolo nocivo è modulata da composti chimici con un effetto sul sistema nervoso in uno o entrambi i seguenti modi:
(a) l'animale possiede un sistema di neurotrasmettitori endogeni che modula (in modo coerente con l'esperienza di dolore, angoscia o danno) le risposte a stimoli nocivi di minaccia o effettivi; (b) anestetici locali presunti, analgesici (come oppioidi), ansiolitici o antidepressivi modificano le risposte dell'animale ad uno stimolo nocivo di minaccia o effettivo in modo coerente con l'ipotesi che questi composti attenuino l'esperienza di dolore, angoscia o danno.
- 5) L'animale è soggetto a compromessi motivazionali con i quali la svalutazione di uno stimolo nocivo o di minaccia viene confrontata con il valore di un'opportunità di guadagno, esitando in un processo decisionale flessibile. Deve essere dimostrata la

presenza di sufficiente flessibilità per indicare un processo informativo centralizzato e integrato che coinvolga una modalità di valutazione comune.

- 6) L'animale mostra un comportamento flessibile e auto-protettivo (curarsi le ferite, stare in guardia, pulirsi, sfregare la zona lesa) che fa presumere la capacità di rappresentarsi e localizzare fisicamente lo stimolo nocivo.
- 7) L'animale si mostra in grado di apprendimento associativo attraverso cui lo stimolo nocivo viene associato ad uno stimolo neutro, e/o vengono apprese attraverso il rinforzo nuove modalità per evitare lo stimolo nocivo. Nota: l'abituazione e la sensibilizzazione non sono sufficienti per raggiungere questo criterio.
- 8) L'animale mostra di dare valore a presunti analgesici o anestetici quando danneggiato, in uno o più dei seguenti modi:
 - a) l'animale impara ad auto-somministrarsi presunti analgesici o anestetici quando ferito;
 - b) l'animale impara a preferire (quando ferito) un luogo nel quale può avere accesso ad analgesici o anestetici;
 - c) l'animale ferito ha come priorità quella di ottenere queste risorse rispetto ad altre (come il cibo).

Questi criteri sono la versione revisionata e aggiornata dei criteri di Smith & Boyd (1991), alla luce dei problemi identificati. Anche se i criteri comportamentali e cognitivi (5-8) sono specialmente importanti nel caso degli invertebrati, sono stati inclusi i criteri neurobiologici (1-4), in modo che il disegno generale sia bilanciato da evidenze neurobiologiche e cognitive/comportamentali.

È importante evidenziare come non basti un singolo criterio per ottenere evidenze conclusive della senienza. Questo è vero in particolar modo per il criterio uno, che potrebbe facilmente essere soddisfatto da un animale non seniente. Ad ogni modo, Birch et al. (2021) hanno considerato ognuno di questi criteri come rilevanti per l'intero caso.

I criteri 1-3 si basano sui criteri di Smith & Boyd, con alcune differenze che tolgano l'enfasi ai concetti di "superiori" e "inferiori" regioni cerebrali, ponendola invece alle regioni cerebrali di

integrazione. Al posto di un focus presunto sugli oppioidi, il criterio quattro aggiornato permette varie forme di responsività a composti endogeni o farmaci, che contano come evidenze di senienza se permettono di modulare il comportamento dell'animale in modo coerente con l'ipotesi che questi composti endogeni o farmaci alterino le esperienze di dolore, angoscia o danno dell'animale.

I criteri quattro e cinque di Smith & Boyd sono strettamente legati, in quanto gli analgesici lavorano solitamente rimpiazzando neurotrasmettitori endogeni, fungendo da agonisti e adempiendo quindi agli stessi compiti. Per questa ragione Birch et al. (2021) hanno scambiato questi criteri con un criterio unico che può essere soddisfatto in due modi diversi.

Sono stati poi modificati i criteri comportamentali più vaghi di Smith & Boyd (sei e sette), scambiandoli con un insieme di criteri cognitivi e comportamentali molto più dettagliati e rigorosi (i criteri cinque e otto di Birch et al, 2021). Questi criteri identificano quattro tipi principali di abilità comportamentali e cognitive che possono coinvolgere stati affettivi con valenza negativa: scambi motivazionali, comportamenti auto-protettivi flessibili, apprendimento associativo e la valorizzazione (mostrata dall'auto-somministrazione e dalla priorità o preferenza per un luogo condizionato) di analgesici o anestetici quando l'animale viene ferito.

I criteri cinque e sei enfatizzano tipi specifici di flessibilità, che implicano probabilmente processi di informazione integrativi e centralizzati: il criterio cinque sottolinea la valorizzazione e la svalutazione del danno e della ricompensa attraverso un sistema di valutazione comune; il criterio sei enfatizza un comportamento auto-protettivo specifico per un luogo, probabilmente guidato da una rappresentazione interna di dove nel proprio corpo uno stimolo avversivo sia localizzato. Quindi, è necessario un livello di specializzazione che vada oltre una risposta riflessa ad un danno fisico (Birch et al., 2021).

Un punto da chiarire riguarda secondo Birch et al. (2021) l'apprendimento associativo, che fa riferimento al criterio sette: forme semplici di apprendimento associativo si verificano inconsapevolmente negli esseri umani (Greenwld & De Houwer, 2017), e questo ha portato ad un dibattito tutt'ora in corso, che ha l'obiettivo di capire che tipo di apprendimento associativo sia più fortemente legato alla senienza e perché (Birch et al., 2021). Il condizionamento operante (Skora et al., 2021), il *reversal learning* (Travers et al., 2017), l'apprendimento di

relazioni spaziali “incongruenti” (Ben-Haim et al., 2021), e l'apprendimento attraverso i divari temporali tra gli stimoli (“condizionamento della traccia”; Clark et al., 2002) sono più complessi e più fortemente legati alla senienza rispetto al condizionamento classico, che implica due stimoli presentati assieme. Ad ogni modo, Birch et al. (2021) hanno trattato tutte le evidenze di apprendimento associativo come rilevanti per il disegno probatorio generale.

Secondo Birch et al. (2021) i criteri sviluppati sono rigorosi e robusti senza essere irragionevolmente pretenziosi: questo permette di fornire un disegno di ricerca adeguato nel valutare l'evidenza di senienza, così come di raggiungere un ampio accordo all'interno della comunità scientifica.

1.6 Schema di classificazione

Secondo Birch et al. (2021), se un numero sostanziale di criteri sono soddisfatti da un animale, allora la possibilità che quell'animale sia seniente dovrebbe essere tenuta seriamente in considerazione, valutando i possibili rischi per il suo benessere. Da ciò deriva la necessità di uno schema di classificazione semplice e pratico, che consideri il numero di criteri soddisfatti come forza dell'evidenza di senienza.

Anche se rappresenta una guida approssimativa, uno schema di classificazione è comunque una valida struttura d'aiuto. Le valutazioni devono essere sensibili ai particolari dettagli e ai particolari casi, inoltre va precisato che i criteri non sono esattamente pari nel loro significato: il criterio otto fornisce prove particolarmente convincenti, mentre il criterio uno può rappresentare solo una piccola parte di una prova più ampia dell'esistenza di senienza, e questo a causa della differenza tra senienza e nocicezione, di cui si è parlato in precedenza. I possibili livelli di confidenza utilizzati per comunicare la forza dell'evidenza che gli animali presi in considerazione soddisfino o meno i criteri sono: livello di confidenza molto alto, alto, medio, basso, molto basso e nessuna confidenza. I livelli di confidenza tengono conto della quantità di evidenze, dell'affidabilità e della qualità del lavoro scientifico.

“Livello di confidenza molto alto” significa che il peso dell'evidenza scientifica non lascia spazio ad ulteriori dubbi. La categoria “livello di confidenza alto” viene utilizzata nei casi in cui si è sicuri che gli animali soddisfino o meno il criterio, anche se rimane spazio per qualche minimo dubbio. La categoria “livello di confidenza medio” è utilizzata nei casi in cui c'è qualche dubbio riguardo all'affidabilità dell'evidenza che non permette di avere un livello di confidenza alto. La categoria “livello di confidenza basso” viene utilizzata nei casi in cui esistono poche prove del fatto che un animale soddisfi o meno il criterio, mentre le categorie “livello di confidenza molto basso” oppure “nessuna confidenza” vengono utilizzate quando l'evidenza è seriamente inadeguata o inesistente.

Quando si ha un livello di confidenza basso rispetto al fatto che un criterio sia stato soddisfatto significa che l'evidenza per una direzione o per l'altra è esile, di bassa qualità, o entrambe le caratteristiche.

È importante considerare il fatto che non è possibile dimostrare la presenza di senienza in tutte le specie di decapodi e cefalopodi esistenti attraverso un approccio specie per specie, in quanto la maggior parte di queste specie non è mai stata studiata. È invece utile utilizzare lo stesso metodo adoperato per i mammiferi, in cui l'evidenza di senienza è stata generalizzata a molte specie partendo unicamente dal ratto di laboratorio, *Rattus norvegicus*. Ad ogni modo, è importante cercare di considerare l'evidenza in varie specie all'interno dello stesso ordine (ad esempio quello degli Octopoda), in modo che sia rilevante ai fini di attribuire la senienza alle specie di quell'ordine.

Per organizzare il pensiero rispetto ai gruppi tassonomici nei decapodi è stata utilizzata la tassonomia di De Grave et al. (2009), nella quale i decapodi sono suddivisi in due sottordini (Dendrobrachiata, Pleocyemata) e l'ordine Pleocyemata è a sua volta suddiviso in dieci infraordini. Questo modo di classificare i decapodi è supportato da evidenze molecolari (Wolfe et al., 2019). L'attenzione scientifica in riferimento alla senienza si è focalizzata sui seguenti infraordini: Brachyura (granchi veri), Anomura (granchi anomurani, inclusi i granchi eremiti), Astacidea (aragoste astacidi e gamberi di fiume), Achelata (aragoste spinate) e Caridea (gamberi caridei), con davvero poca ricerca rispetto ad altri infraordini, come i gamberi penaeidi, allevati a scopi commerciali.

Per quanto riguarda i molluschi cefalopodi, gli animali trattati si rifanno a quattro principali categorie: i polpi (ordine Octopoda), le seppie (ordine Sepiida), altri coleoidi (compresi tutti i calamari) e nautiloidi. La categoria degli “altri coleoidi” è relativamente ampia e include per esempio sia il calamaro miopside (ordine Myopsida) che il calamaro a coda di rondine, simile a una seppia.

2. EVIDENZE DI SENZIENZA NEI CEFALOPODI

Sommario

Le evidenze a favore della presenza di senzienza nei cefalopodi sono particolarmente convincenti: è stato raggiunto sia un livello valutato come alto, che molto alto di confidenza per il fatto che i polpi soddisfino i criteri uno, due, tre, quattro, sei, sette e otto e un livello di confidenza valutato come medio che essi soddisfino il criterio cinque.

Minori sono le evidenze nei confronti di altri cefalopodi coleoidi (come il calamaro e la seppia), ma le evidenze disponibili sono comunque valutate come buone. C'è un livello di confidenza alto che gli altri cefalopodi coleoidi soddisfino i criteri uno, due, tre e sette.

Sono disponibili poche evidenze riguardo ai nautiloidi, anche se è stato raggiunto un livello di confidenza alto del fatto che essi soddisfino il criterio uno, ed un livello di confidenza medio che soddisfino il criterio sette.

Nei casi in cui non sia stato raggiunto un livello di certezza alto o molto alto, questo è dovuto alla mancanza di evidenze.

Di seguito è riportata la rassegna di tutte le evidenze che rispettano gli otto criteri di Birch et al. (2021) per la senzienza.

2.1 Criterio uno: l'animale possiede recettori sensibili a stimoli nocivi (nocicettori)

Come è stato già reso noto in precedenza, si può affermare che un nocicettore è un “recettore sensoriale ad alta soglia del sistema nervoso somatosensoriale periferico che è capace di transdurre e codificare uno stimolo nocivo” (International Association for the study of Pain, 2017). Diversamente da altri recettori sensoriali, i nocicettori impiegano più tempo per attivarsi, nel senso che sono attivati solamente da stimoli estremi, ovvero quegli stimoli intensi, prolungati o ripetuti che rappresentano una minaccia (potenziale o effettiva) di un danno

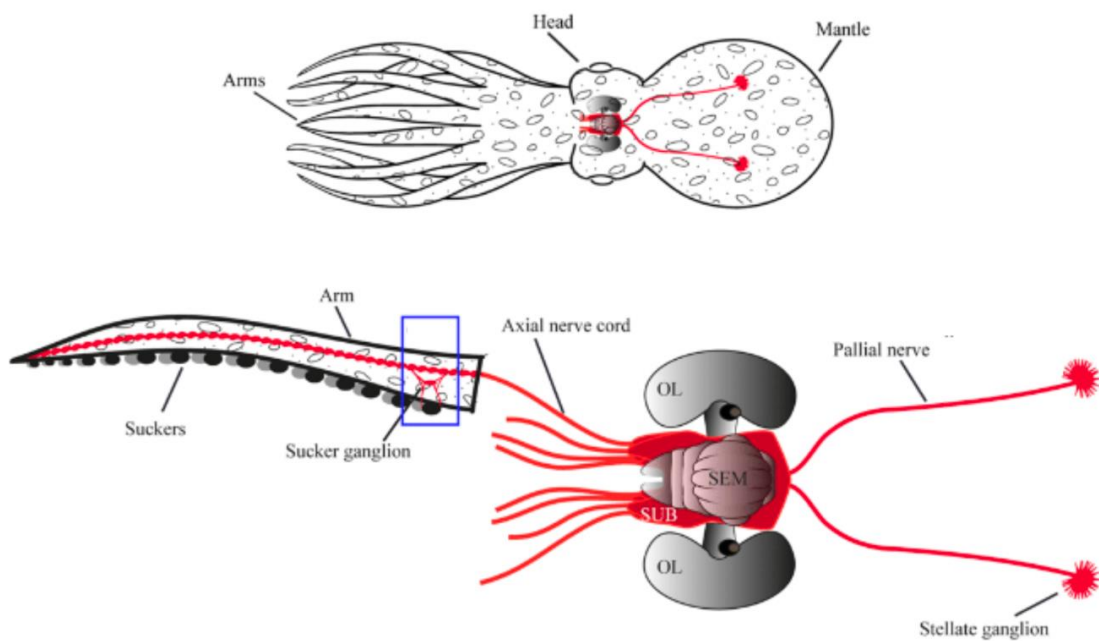
tissutale (Birch et al., 2021). Alcuni nocicettori non vengono mai attivati, a meno che non siano sensibilizzati da molecole infiammatorie che vengono rilasciate quando il tessuto è danneggiato (Smith & Lewin, 2009). Ci sono diversi tipi di nocicettori: alcuni rispondono a stimolazioni meccaniche, chimiche, di calore, freddo o luce estreme, mentre altri sono polimodali, ovvero rispondono a due o più classi di stimoli (Sneddon et al., 2014; Walters, 2018).

Hague et al. (2013) hanno trovato che i bracci mozzati dell'*Octopus vulgaris* mostrerebbero rapide risposte che consistono in un riflesso di retrazione del braccio a stimoli nocivi. Altman (1971) ha anche osservato che i bracci del polpo amputati e denervati si sarebbero ritirati da pezzi di cibo trattati con chinino cloridrato. Un primo studio sull'attivazione neurale nei bracci del polpo (*Octopus vulgaris*) ha rilevato che alcuni neuroni si attivano solo in risposta a stimoli meccanici, come colpi o pizzicotti (Rowell, 1966).

Molti studi più recenti hanno osservato direttamente l'attivazione neurale in risposta al danno tissutale o a stimoli nocivi, sia nel polpo che nel calamaro: Crook et al. (2013) hanno dimostrato la presenza di nocicettori meccanosensitivi nella pinna del calamaro (*Doryteuthis pealeii* anche conosciuto come *Loligo pealeii*), che si attivavano in risposta a dei fili meccanici (*von Frey filaments*) utilizzati per testare la sensibilità cutanea, e che erano sensibili sia a questi stimoli che alle ferite causate dallo schiacciamento della pinna attraverso un forcipe; questo effetto veniva soppresso quando veniva iniettato un anestetico locale. La sensibilizzazione coinvolgeva tutto il corpo e non riguardava un'unica risposta localizzata, il che potrebbe suggerire l'induzione di uno stato di allerta generale piuttosto che di una specifica azione di cura della ferita. Le misurazioni sono state effettuate sul nervo della pinna, che collega i rami del nervo della pinna al cervello, suggerendo percorsi di collegamento dai nocicettori periferici al sistema nervoso centrale.

Queste scoperte sono supportate da uno studio recente di Howard et al. (2019) nel calamaro bobtail *Euprymna scolopes* (ordine Sepiolida), in cui è stata riscontrata una sensibilizzazione dei nervi periferici a seguito di una lesione da schiacciamento; negli animali che subivano lesioni durante la prima parte della loro vita si riscontrava invece un'eccitabilità neuronale persistente (per tutta la durata della vita dell'animale).

Perez et al. (2017) hanno trovato che il polpo possiede neuroni che mostrano sensibilizzazione a breve termine e attivazione spontanea dopo un danno da schiacciamento al mantello.



Anatomia generale del polpo e rappresentazione del sistema nervoso. OL=lobi ottici, SEM=massa sopra-esofagea, SUB=massa sub-esofagea. Adattato da Imperadore et al., 2019.

Le misurazioni sono state effettuate sul nervo palliale, che è il nervo principale che connette il mantello al cervello. In uno studio sul calamaro bobtail hawaiano, *Euprymna scolopes* (ordine Sepiolida), Bazarini & Crook (2020) hanno trovato un aumento del grado di attivazione nel nervo palliale in risposta a stimoli nocivi.

Recentemente, Crook (2021) ha rilevato misure elettrofisiologiche dal connettivo brachiale (che collega le corde nervose del braccio al cervello) nel polpo pigmeo di Bock (*Octopus bocki*) e ha mostrato che c'era attività in seguito all'applicazione dello stimolo nocivo (era stato iniettato dell'acido acetico), che veniva soppressa attraverso l'uso di un anestetico locale (lidocaina). Secondo Birch et al. (2021), questa costituirebbe una forte evidenza del fatto che questi segnali vengono inviati dai bracci al sistema nervoso centrale.

C'è inoltre evidenza molecolare della presenza di nocicettori nei bracci del polpo: in uno studio dettagliato sull'*Octopus vulgaris*, Di Cristina (2017) ha trovato un certo numero di marcatori associati alla detezione dello stimolo nocivo nelle punte del braccio. Di Cristina ha osservato "fibre nocicettive putative" che corrono lungo il nervo assiale del braccio. Questi risultati suggeriscono la presenza di nocicettori periferici e la loro connessione al sistema nervoso

centrale. Il limite di questi risultati, come notato da Birch et al. (2021), è che per ora essi sono stati riportati solamente in una tesi di dottorato e non pubblicati in un articolo scientifico con revisione tra pari (peer-reviewed).

La presenza di nocicettori in altre specie è utile come evidenza della nocicezione sulla base di un ragionamento evolutivo/filogenetico (Andrews et al., 2013), visto che pare che questi processi nocicettivi si conservino in diversi gruppi tassonomici, inclusi molti altri molluschi. Crook & Walters (2011) e Walters (2018) descrivono l'evidenza della nocicezione nei molluschi gasteropodi (per esempio nel mollusco gasteropode *Aplysia*). Secondo Birch et al. (2021), la presenza di nocicettori in altri molluschi rende la loro presenza nei cefalopodi più probabile. Per ultimo, evidenze comportamentali indirette (Ross., 1971) della presenza di nocicettori arrivano dal fatto che i polpi sono in grado di apprendere l'evitamento di stimoli nocivi, suggerendo così la possibilità di captare e processare in modo differenziale questi input. Ross (1971) ha infatti osservato che il polpo (*Octopus vulgaris*) imparerebbe ad evitare i paguri che possiedono delle anemoni di mare sul guscio: il contatto con le anemoni urticanti innescherebbe infatti un comportamento di fuga.

In conclusione, un ampio numero di evidenze rigorose e convincenti riportate da Birch et al. (2021) dimostrano che il calamaro e i polpi possiedono neuroni sensoriali afferenti che rispondono a stimoli nocivi in modo differenziale: questi neuroni sottostanno ad una sensibilizzazione e mostrano attivazione spontanea in seguito ad un'esposizione a stimoli nocivi; è stato inoltre dimostrato che i polpi rispondono a dei marcatori molecolari per i nocicettori che si trovano nei loro bracci. Birch et al. (2021) affermano dunque di aver concluso un livello di confidenza molto alto per il fatto che il polpo, il calamaro miospide (Myospida) e il calamaro bobtail (Sepiolida) soddisfino il criterio uno. È stato inoltre raggiunto un livello di confidenza alto per il fatto che altri cefalopodi inclusi altri tipi di calamari, seppie (ordine delle Sepiida) e nautiloidi (Nautilida) soddisfino anch'essi il criterio uno.

2.2 Criterio due: l'animale possiede regioni cerebrali di integrazione in grado di integrare informazioni provenienti da fonti sensoriali diverse

È innanzitutto importante evidenziare come la struttura complessa e l'organizzazione gerarchica dei cervelli dei cefalopodi coleoidi sia ormai ben documentata (Andrews et al., 2013; Budelmann, 1995; della Rocca et al., 2015; Fiorito et al., 2015; Hochner, 2012; Hochner, et al., 2006; Shigeno et al., 2018; Zarrella et al., 2015; Zullo et al., 2009; Zullo & Hochner, 2011).

I cefalopodi coleoidi hanno un rapporto cervello-corpo più grande rispetto alla maggior parte dei pesci e dei rettili (Packard, 1972). Studi precedenti sull'*Octopus vulgaris* (Young, 1963a; Wells, 1978), sul calamaro del genere *Loligo* (Young, 1974, 1976, 1977, 1979; Messenger, 1979) e sulla seppia del genere *Sepia* (Sanders & Young, 1940; Boycott, 1961) forniscono molti dettagli sulla struttura del sistema nervoso e sulla parte più centrale del cervello dei cefalopodi. Il cervello dei polpi contiene centosettanta milioni di cellule nervose, delle quali centotrenta milioni si trovano nei lobi ottici e quaranta milioni nel cervello centrale; il cervello ha una struttura complessa, costituita primariamente dalle masse sotto e sopra esofagee (entrambe contengono numerosi lobi, circa trenta in totale; Nixon & Young, 2003), così come dai lobi ottici. Il cervello mostra una chiara organizzazione gerarchica e un'alta connettività tra i vari centri. Mentre la massa sotto-esofagea è principalmente un centro di controllo motorio inferiore (SUB), la massa sopra-esofagea (SEM) contiene centri di controllo motorio intermedi e superiori così come centri di memoria e apprendimento. Il SEM ha probabilmente il ruolo di risolvere potenziali conflitti tra gli input e i modelli d'azione in ciascun lato del corpo. I centri motori superiori si collegano a quelli inferiori grazie a input e output (Birch et al., 2021). Shigeno et al. (2018) ha tracciato delle analogie strutturali e funzionali tra le regioni del cervello dei cefalopodi e quelle del cervello dei vertebrati. Il SUB è a grosso modo equivalente al midollo spinale (*spinal cord*) dei vertebrati, e altre regioni del SEM sono equivalenti all'ipotalamo, al talamo, ai gangli della base e al cervelletto. Di più ampio interesse è l'analogia tra il lobo frontale verticale e la corteccia cerebrale, l'ippocampo, e il complesso dell'amigdala. Questo lobo gioca un ruolo nell'apprendimento e nella memoria e ha un probabile ruolo nella valutazione e nel *decision-making* (Young, 1963b, 1991).

Il lobo verticale è spesso descritto come il “più superiore” dei centri cerebrali, analogamente all'ippocampo dei mammiferi (Fiorito et al., 2015; Hochner et al., 2006; Nixon & Young, 2003; Shomrat et al., 2015). Questo contiene venticinque dei quaranta milioni di cellule cerebrali (Shomrat et al., 2015) e queste regioni sembrano inoltre contenere un diverso tipo di cellule: cellule piccole che si ipotizza abbiano una funzione inibitoria (Young 1963a). Brown e Piscopo (2013) hanno trovato che c'è plasticità sinaptica distinta nel lobo verticale dei cefalopodi, una struttura associata con i centri dell'apprendimento e della memoria nei vertebrati.

Il sistema del lobo verticale riceve un'ampia gamma di input dal corpo, inclusi gli occhi, i bracci la bocca e il mantello (Young, 1979). C'è evidenza di integrazione tra i sensi, in quanto l'*Octopus vulgaris* può combinare l'informazione periferica del braccio con l'informazione visiva per guidare il movimento in un compito all'interno di un labirinto (Gutnick et al., 2001).

Una caratteristica insolita della neuroanatomia dei cefalopodi è la distribuzione periferica dell'elaborazione: il sistema nervoso periferico è costituito da almeno due terzi del numero totale dei neuroni, con complessivamente trecento milioni di cellule nei cordoni dei bracci (Young 1963a). C'è una connettività relativamente bassa tra il cervello e la periferia, questo suggerisce che molta parte dell'elaborazione avvenga perifericamente, mentre il cervello centrale ha un ruolo primario nella coordinazione dell'informazione e nei processi decisionali (Hochner, 2012). I cordoni del braccio sembrano agire come centri di riflesso per i singoli bracci, in un certo senso elaborando gli ordini ricevuti dal cervello (Wells, 1978). Ad ogni modo, il cervello centrale rimane altamente sofisticato.

In sintesi, Birch et al. (2021) concludono che si è raggiunta un'evidenza estremamente forte del fatto che i cefalopodi coleoidi possiedono cervelli centralizzati e complessi in grado di integrare diversi tipi di informazione, incluse quelle nocicettive. Sebbene non ci sia alcuna struttura identificata come direttamente analoga alla corteccia cerebrale mammifera, il lobo verticale è il centro cerebrale responsabile dell'apprendimento e della memoria in questi animali (Birch et al., 2021). Gli autori hanno quindi concluso un alto livello di confidenza del fatto che i cefalopodi coleoidi (polpo, calamaro e seppia) soddisfino il criterio due.

2.3 Criterio tre: l'animale possiede percorsi neurali che connettono i nocicettori alle regioni cerebrali di integrazione

In diversi studi già passati in rassegna in precedenza, sono state effettuate misurazioni elettrofisiologiche sui cordoni nervosi (*nerve cords*) che collegano i nervi periferici al cervello centrale, e si è scoperto che questi mostravano una maggiore attività in risposta a stimoli nocivi (Crook et al., 2013; Alupay et al., 2014, Perez et al., 2017; Bazarini & Crook, 2020; Crook, 2021). Questo dimostra che i segnali dei nocicettori raggiungono il cervello, ma non mostra che raggiungono il sistema del lobo verticale (Birch et al., 2021). Secondo Birch e collaboratori (2021), ricerche passate hanno documentato l'esistenza di molte connessioni tra il sistema nervoso periferico e il lobo verticale, ma hanno avuto la tendenza ad ipotizzare (piuttosto che a dimostrare esplicitamente) che queste connessioni fossero coinvolte nella trasmissione di informazioni nocicettive.

Discutendo le funzioni dei lobi cerebrali, Young (1963a) si riferisce a un input al cervello che si "presume appartenga alle fibre nocicettive" (dolore), anche se questo viene ipotizzato sulla base di considerazioni funzionali piuttosto che strutturali. Young (1979) descrive percorsi afferenti al sistema del lobo verticale come possibilmente veicolanti i segnali nocicettivi, e allo stesso modo Nixon & Young (2003) ipotizzano che il sistema del lobo verticale elabori i segnali del dolore dal corpo. Young (1991) descrive la connettività del sistema nervoso, comprese le connessioni di fibre afferenti dai bracci al lobo frontale laterale inferiore, progredire attraverso il sistema del lobo frontale e verticale superiore. Sebbene questo non sia direttamente correlato ai nocicettori, ipotizza che i segnali di dolore/trauma facciano parte di questo percorso.

Budermann & Young (1985) hanno trovato che le fibre afferenti dai bracci attraversano i lobi frontali e sottoverticali (sebbene non il lobo verticale) e ipotizzano che questi potrebbero essere correlati alla nocicezione. C'è un'alta connettività tra le regioni del cervello, in particolare modo tra le regioni del controllo "inferiore" della massa sotto-esofagea e quelle "superiori" della massa sopra-esofagea (per esempio Shigeno et al., 2018), ma questa non rappresenta un'evidenza diretta del trasferimento di segnali nocicettivi (Birch et al., 2021).

Molti dei nervi afferenti periferici (in particolare nei bracci) del polpo non si collegano direttamente al sistema nervoso centrale (SNC), ma ai gangli centrali dei bracci che poi

trasmettono informazioni minori al cervello (Di Cristina, 2017). Ci sono circa centoquarantamila neuroni afferenti che collegano i bracci al cervello centrale (Hochner, 2012; Levy & Hochner, 2017), e molti di questi afferiscono al sistema del lobo frontale (Nixon & Young, 2003). Ad ogni modo, quale tipo di informazione venga presa in considerazione e cosa venga trasmesso non è ancora noto (Birch et al., 2021).

Una potenziale fonte di informazione arriva dagli studi sull'anestesia: anestetici locali e sistemici mostrano di disattivare i segnali neuronali sia afferenti che efferenti da e verso il cervello (Butler-Struben et al., 2018). Visto che gli stimoli utilizzati per testare questo fatto erano dei pizzicotti causati tramite un forcipe (e dunque stimoli sicuramente potenzialmente nocivi), questo è indicativo della cessazione della trasmissione nocicettiva. Secondo Birch et al. (2021), anche la mancanza di risposta ad altre procedure chirurgiche sotto anestesia è rilevante, sebbene si debba prestare attenzione a non confondere gli effetti dell'immobilità con quelli di una vera anestesia e di perdita di sensibilità.

Rassegne meno recenti dell'evidenza delle connessioni tra i nocicettori e lobo verticale concludono che questa sia "incerta" (Andrews et al., 2013), oppure "probabile ma non provata" (Fiorito et al., 2015; Zarrella et al., 2015).

In conclusione, Birch et al. (2021) ha passato in rassegna evidenze di tipo indiretto in riferimento alle connessioni tra i nocicettori e le regioni cerebrali di integrazione nei cefalopodi. C'è inoltre un'alta connettività tra il sistema nervoso periferico e il cervello centrale, così come tra i diversi lobi del cervello, e secondo Birch et al. (2021) questi percorsi potrebbero trasmettere segnali nocicettivi alle regioni cerebrali di integrazione, anche se ciò non è stato ancora del tutto dimostrato. C'è dunque un livello di confidenza alto per il fatto che i cefalopodi coleoidi (polpi, calamari e seppie) soddisfino il criterio tre, anche se sarebbero necessarie maggiori evidenze neurofisiologiche per arrivare ad un livello di confidenza molto alto (Birch et al., 2021).

2.4 Criterio quattro: la risposta comportamentale dell'animale ad uno stimolo nocivo è modulata da composti chimici con un effetto sul sistema nervoso in uno o entrambi dei seguenti modi: (a) l'animale possiede un sistema di neurotrasmettitori endogeni che modula (in modo coerente con l'esperienza di dolore, angoscia o danno) le risposte a stimoli nocivi di minaccia o effettivi; (b) anestetici locali presunti, analgesici (come oppioidi), ansiolitici o antidepressivi modificano le risposte di un animale ad uno stimolo nocivo di minaccia o effettivo in modo coerente con l'ipotesi che questi composti attenuino l'esperienza di dolore, angoscia o danno.

Rispetto alla presenza di un sistema di neurotrasmettitori endogeni, così come alla risposta ad analgesici, rassegne passate hanno concluso che la presenza di un sistema del genere sia possibile, ma che non esistono dati sufficienti a tal riguardo (Andrews et al., 2013; Fiorito et al., 2015; Zarrella et al., 2015). Sebbene ci siano un gran numero di neurotrasmettitori identificati nei cervelli del cefalopode (rassegna di Messenger, 1996), nessuno di questi è stato identificato come responsabile nel mediare le risposte agli stimoli nocivi (Birch et al., 2021).

C'è qualche evidenza della presenza di oppioidi e composti simili (peptidi simil-encefalina) nei cervelli e nei corpi dei polpi, così come leucina-encefalina e recettori dei delta-oppioidi nel sistema nervoso periferico (Sha et al., 2012). Martin et al. (1979) ha utilizzato gli anticorpi per identificare proteine simil-encefalina nella vena cava del polpo, ma la loro azione non è stata influenzata dall'applicazione del naloxone, antagonista dell'oppioide (Voight et al., 1981). Stefano et al. (1981) ha trovato che gli oppioidi (morfina e met-encefalina) sopprimevano il rilascio di dopamina nel tessuto cerebrale del polpo (*Octopus bimaculatus*). L'effetto era contrastato dal naloxone, mostrando una mediazione da parte dei recettori degli oppioidi. Ad ogni modo, Frazier et al. (1973) ha trovato che sia gli oppioidi che il naloxone avevano lo stesso ruolo inibitorio sugli assoni del calamaro (*Loligo pealei*), il che suggerisce che gli oppioidi non stessero agendo da analgesici (Birch et al., 2021).

Nella sua tesi di dottorato, Di Cristina (2017) ha trovato la presenza di trascrittori designati come recettori per gli oppioidi e di peptidi simil-oppioidi nella massa sub-esofagea e nel lobo ottico nel cervello dell'*Octopus vulgaris*, suggerendo così la possibilità di un sistema di modulazione del dolore. Ad ogni modo, siccome queste molecole possono adempiere a diversi compiti oltre a quello di modulare le risposte a stimoli nocivi, sono necessari ulteriori studi

sull'effetto di questi composti, compresi gli effetti degli antagonisti agli oppioidi, come il naloxone (Birch et al., 2021).

Attraverso un ragionamento filogenetico, la presenza di recettori oppioidi diffusi e altamente conservati in molti gruppi tassonomici di vertebrati e invertebrati, porta a pensare che questi possano essere presenti anche nei cefalopodi (Andrews et al., 2013, sebbene cfr. Crook & Walters, 2011).

Nonostante il focus sia tipicamente sugli oppioidi, altri composti come i cannabinoidi o gli steroidi potrebbero fungere da modulatori endogeni per l'elaborazione nocicettiva (Andrews et al., 2013). Sebbene le encefaline non siano risultate promettenti in base ad altri studi sui molluschi, il neuropeptide FMRFamide, responsabile dell'inibizione dei segnali trasmessi dagli oppioidi nei mammiferi, si è dimostrato un buon candidato per i segnali nocicettivi (Crook & Walters, 2011). Loi & Tublitz (1997) hanno identificato l'immunoreattività simil-FMRFamide in tutto il cervello del calamaro pigmeo (*Idiosepius notoides*). Di Cristina (2017) ha trovato la trascrizione dei geni per i recettori del FMRFamide nel cervello e nei tessuti corporei dell'*Octopus vulgaris*.

Gli estrogeni endogeni modulano l'elaborazione nocicettiva nei mammiferi, e ci sono prove simili nei cefalopodi. Bazarini & Crook (2020) hanno esaminato il ruolo degli estrogeni nell'elaborazione e nelle risposte agli stimoli nocivi nel calamaro delle Hawaii (*Euprymna scolopes*). Hanno scoperto che l'esposizione ambientale agli estrogeni alterava le risposte comportamentali a stimoli nocivi (schiacciamento della pinna) e potenzialmente dannosi (vibrazione), abbassando la reattività nel primo caso e creando ipersensibilità nel secondo. L'esposizione agli estrogeni ha anche alterato la sensibilizzazione dell'attivazione neuronale in risposta alla lesione, suggerendo un loro ruolo nel modulare le risposte nocicettive in questa specie. Ad ogni modo, secondo Birch et al. (2021) questo risultato da solo non è sufficiente per concludere che i calamari soddisfino il criterio quattro.

La serotonina svolge un ruolo nel meccanismo di sensibilizzazione nocicettiva, a seguito di uno stimolo nocivo nei molluschi, e nella modulazione dei segnali nocicettivi nei vertebrati (Perez et al., 2017). Il polpo (*Octopus bimaculoides*) possiede siti di legame del trasportatore della serotonina, che sono omologhi a quelli che si trovano nell'uomo (Edsinger & Dölen, 2018). Perez et al. (2017) ha testato l'effetto della fluoxetina (un inibitore della ricaptazione della

serotonina, che aumenta la concentrazione extracellulare di serotonina) sulle risposte nocicettive neuronali nel polpo pigmeo di Bock (*Octopus bocki*). Ha scoperto che il trattamento con fluoxetina aumentava i tassi di attivazione spontanea dopo una lesione, sebbene non vi fosse alcun effetto sulla sensibilizzazione neuronale. Suggerisce che i livelli elevati di serotonina possano migliorare le risposte neuronali e comportamentali alle lesioni tissutali, e che l'attivazione spontanea possa svolgere un ruolo nella protezione delle lesioni e nei comportamenti di fuga. Tuttavia, poiché questi test sono stati eseguiti su campioni di tessuto ricavati da animali sottoposti a eutanasia, essi evidenziano solo cambiamenti nell'attivazione afferente, non cambiamenti nel cervello: secondo Birch et al. (2021), questa non può essere dunque considerata la prova che la fluoxetina attenui un'esperienza di dolore, angoscia o danno in un animale vivo.

La serotonina sembra inoltre avere un ruolo nel modulare l'apprendimento nel polpo, dato che è attiva nel lobo verticale (Shomrat et al., 2010): può fare questo attraverso la modulazione di segnali di ricompensa/punizione (Shomrat et al., 2015). Secondo Birch et al. (2021) *“Anche se questa ipotesi non è ancora confermata, la serotonina potrebbe essere coinvolta nei percorsi nocicettivi e nel processo decisionale”*.

Zarrella et al. (2015) descrive un insieme di geni che evidenziano un aumento o una diminuzione in risposta a condizionamento da paura (ad es. geni per la statmina, tirosina idrossilasi, trasportatore della dopamina). In particolare, suggerisce che un aumento della proteina statmina, in conseguenza a risposte di paura innate o apprese, dimostri la somiglianza tra il ruolo di questa proteina e quello svolto dall'amigdala dei vertebrati per quanto riguarda la formazione della memoria legata ad eventi paurosi e l'espressione delle risposte alla paura. Uno studio recente (Butler-Struben et al., 2018) ha analizzato l'effetto dell'anestesia locale e generale nei cefalopodi. Di particolare rilevanza per il criterio quattro è il risultato che mostra come la lidocaina e il cloruro di magnesio siano anestetici locali efficaci, in quanto sopprimerebbero l'attività nel sistema nervoso periferico, come mostrato dalle registrazioni tramite elettrodi. Ad ogni modo, questo studio non collega l'anestetico locale alle risposte comportamentali a seguito di una lesione (Birch et al., 2021).

Evidenze molto recenti (Crook, 2021), discusse maggiormente entro il criterio otto, evidenziano come la lidocaina abolisca il comportamento di auto-pulizia diretto al sito di azione di uno

stimolo nocivo nel polpo pigmeo di Bock (*Octopus bocki*). Birch et al. (2021) ha considerato questa come una dimostrazione convincente dell'efficacia della lidocaina nel modulare le risposte a stimoli nocivi nei polpi.

Riguardo ad altri composti, Edsinger & Dölen (2018) hanno trovato che il polpo (*Octopus bimaculoides*) risponde all'MDMA con un incremento nel comportamento sociale; ma nessuno studio è stato condotto sugli effetti sul decision-making o sui cambiamenti in risposta a stimoli nocivi.

In sintesi, Birch et al. (2021) ha preso in considerazione le evidenze di modifica delle risposte comportamentali a seguito di stimoli nocivi con successiva somministrazione di un anestetico locale (lidocaina) nei polpi, così come della presenza di rilevanti recettori e neurotrasmettitori endogeni (inclusi encefalina, estrogeno e serotonina) nei polpi. Ha inoltre preso in considerazione l'evidenza del fatto che anche il cloruro di magnesio può agire da anestetico locale nei polpi. In conclusione, i polpi soddisfano il criterio quattro con un livello di confidenza alto, mentre per gli altri cefalopodi non è ancora possibile raggiungere un livello di confidenza medio (Birch et al., 2021).

2.5 Criterio cinque: l'animale è soggetto a compromessi motivazionali nei quali la svalutazione di uno stimolo nocivo o di minaccia viene confrontata con il valore di un'opportunità di guadagno, esitando in un processo decisionale flessibile. Deve essere dimostrata la presenza di sufficiente flessibilità per indicare un processo informativo centralizzato e integrato che coinvolga una modalità di valutazione comune.

Uno studio di Wilson et al. (2018) sulla seppia comune (*Sepia officinalis*) ha mostrato che quando le seppie sono esposte a impulsi infrasonici che imitano le caratteristiche precipue idrodinamiche degli attacchi predatori, queste abbandonano l'opportunità di cacciare, mostrando invece un comportamento difensivo.

Alle giovani seppie (n=9, cioè nove animali) veniva presentato un attacco predatorio simulato mediante un'accelerazione di particelle infrasonica graduata (tre, cinque e otto hz), mentre veniva mostrata una breve sequenza video di prede decapodi vive. Le risposte comportamentali

erano testate in condizioni di luce o di oscurità e dopo ventiquattro ore di privazione del cibo. I risultati hanno mostrato che le seppie tentavano di cacciare la preda in movimento durante la sequenza video, ma hanno cominciato a manifestare comportamenti difensivi quando lo stimolo predatorio è diventato più minaccioso. Ad un livello di intensità di accelerazione più basso, le seppie cambiavano il loro stato corporeo. Con intensità di accelerazione più alta, simulando un predatore più grande o presente nelle vicinanze, le seppie sbiancavano la loro pelle, mostravano un comportamento di fuga rapida e talvolta combinavano questo con il rilascio di inchiostro.

Lo studio ha mostrato un effetto della fame sulle risposte: quando le seppie venivano private del cibo, la loro soglia di fuga era significativamente più alta a tre Hz piuttosto che a nove Hz. Questo comportamento può essere spiegato secondo Birch et al. (2021) come il risultato di un compromesso motivazionale con il quale il valore dell'opportunità di ottenere la risorsa alimentare per l'animale (che è più grande quando è affamato) viene confrontato con la svalutazione dovuta all'esposizione alla potenziale minaccia. Ad ogni modo, una spiegazione alternativa è che la fame inibisca la detezione della minaccia, un fenomeno semplice riscontrato anche nel verme nematode *Caenorhabditis elegans* (Ghosh et al., 2016). Secondo Birch et al. (2021), per garantire un'evidenza contro la spiegazione alternativa sono ad ogni modo necessari più dati: un esperimento ideale dovrebbe mantenere fisso il livello di motivazione (fame), il livello di minaccia e la potenza del segnale, indagando se un'opportunità per una ricompensa di qualità superiore (ad esempio un alimento più desiderabile) aumenti o meno la tolleranza alla minaccia.

In un altro studio, Bedore et al. (2015) ha analizzato le risposte difensive nella seppia (*Sepia officinalis*). Le seppie sono note per il loro comportamento di evitamento del predatore, in particolare per le loro abilità di camuffamento dinamico, che comprende rapidi cambiamenti nel colore, nel disegno e nella trama della loro superficie corporea (Hanlon & Messenger, 2018). I modelli di camuffamento possono essere combinati con una risposta di immobilità tonica (*freezing*), con compressione del mantello (di almeno il 5%), con una riduzione del tasso di ventilazione e con la copertura dei sifoni dell'imbuto o delle cavità del mantello per ridurre i segnali bioelettrici (Bedore et al., 2015). Le seppie venivano posizionate in una vasca e veniva presentato loro un predatore in avvicinamento sullo schermo di un iPad. Alle seppie (n=11; il potenziale elettrico è stato registrato per n=7) sono stati presentati sette video in ordine

casuale (controllo versus sagoma del predatore in avvicinamento). Le seppie hanno mostrato risposte di immobilità tonica agli stimoli di pesci in avvicinamento nell'80% delle prove. Ad ogni modo, questo studio non sottopone a test direttamente i compromessi motivazionali, e i risultati suggeriscono che la necessità di minimizzare la detezione di un predatore in avvicinamento rappresenta una priorità rispetto al comportamento di respirazione normale. I risultati non evidenziano però questo compromesso quando c'è l'opportunità di una ricompensa: è concepibile che sia l'animale a decidere se tollerare un'esperienza avversa (come una privazione di ossigeno), ma non si può essere sicuri che la risposta di freezing porti ad una privazione dell'ossigeno (Birch et al., 2021). I polpi, per esempio, possono sopravvivere fuori dall'acqua per brevi periodi con il loro sifone e le cavità del mantello occluse, “respirando” grazie all'acqua intrappolata nel loro mantello; secondo Birch et al. (2021) le seppie potrebbero dunque fare lo stesso con le cavità del loro mantello durante la risposta di freezing.

In uno studio di Ross (1971), ai polpi (*Octopus vulgaris*, n=12) venivano presentati dei paguri, una preda comune: c'erano due tipi di paguri, quelli con una conchiglia libera e quelli con un'anemone sulla conchiglia. Ross (1971) ha trovato che i polpi attaccavano tutti i paguri, inghiottendo quelli con la conchiglia libera (senza anemone) ma ritirandosi dopo pochi secondi dai paguri con l'anemone. La maggior parte dei polpi ha ripetuto l'attacco al paguro con l'anemone più volte nell'arco di poche ore, ma alla fine gli attacchi sono cessati e i polpi hanno cominciato ad avvicinarsi cautamente. Quando un braccio del polpo veniva in contatto con l'anemone lo ritraeva bruscamente. Dopo ventiquattro ore, non sono state osservate interazioni tra il polpo e i paguri provvisti di anemoni, e il polpo si spostava nella parte superiore della vasca quando il paguro si avvicinava.

I risultati di questo studio suggeriscono che l'*Octopus vulgaris* sia sensibile alle punture delle anemoni, abbandonando le opportunità di caccia che portano ripetutamente a punture e allontanandosi dai paguri che portano sulla conchiglia delle anemoni pungenti. Ad ogni modo, come notato da Birch et al. (2021), questo studio non verifica se questo comportamento implichi un compromesso motivazionale: per fare ciò sarebbe necessario variare la qualità dell'opportunità di ricompensa, e indicare se i polpi fossero disposti a correre maggiori rischi di puntura al fine di accedere a ricompense di qualità superiore.

Un altro studio sulle seppie mostra uno schema simile, laddove le seppie evitano le chele delle loro prede (granchi) dopo essere state pizzicate, imparando ad attaccare il granchio da dietro in

quella che sembrerebbe una modalità di apprendimento per prove ed errori (Boal et al., 2000). Diversi studi sui polpi dimostrano che questi smettono di interagire con altri oggetti nella loro vasca quando vengono presentati degli stimoli nocivi (ad esempio scosse elettriche) (Boycott & Young, 1957; Mackintosh, 1964; Fiorito & Scotto, 1992; Wells, 1978). Secondo Birch et al. (2021) queste scosse elettriche erano chiaramente rilevate come stimoli avversivi: uno studio ha dimostrato che i polpi imparano velocemente quando gli impulsi elettrici sono usati come rinforzo negativo (Sutherland et al., 1963). Ad ogni modo, come lo studio di Ross (1971), questi studi non testano direttamente i compromessi motivazionali nei processi decisionali. È possibile che la soppressione dell'interazione con stimoli desiderabili (ad esempio palle o prede) sia dovuta all'effetto fisiologico dello stimolo avversivo di per sé, piuttosto che da un sistema di valutazione centralizzato (Birch et al., 2021).

Crook et al. (2011) ha analizzato come la lesione influenzi il comportamento del calamaro *Doryteuthis pealeii* (n=18; 8 soggetti sperimentali feriti; 10 soggetti di controllo con trattamento *sham*). Poco dopo l'infortunio, i calamari usano la cripsi, un comportamento difensivo comunemente osservato nei cefalopodi che viene utilizzato per evitare di essere rilevati, e che consiste nel modificare alcune caratteristiche del proprio corpo come la grandezza, la lucentezza e il colore del mantello; a causa del corpo molle di questi animali, questa modalità di difesa viene preferita ad un comportamento alternativo di fuga improvvisato. Tuttavia, tra l'una e le quarantott'ore dopo l'infortunio, i calamari reagiscono con una fuga anticipatoria e i comportamenti di fuga persistono più a lungo. I risultati di questo studio suggeriscono un forte effetto della lesione sulla reattività a stimoli visivi. Secondo Birch et al. (2021), differenze significative nella risposta al tocco tra calamari feriti e di controllo indicano altresì una sensibilizzazione tattile. Inoltre, il danno del braccio ha causato poca o nessuna interferenza con il comportamento di caccia di successo diverse ore dopo l'infortunio: secondo Birch et al. (2021) *“Una possibile spiegazione di questo comportamento risiede nel fatto che i calamari feriti sarebbero consapevoli delle loro ferite, attribuendo maggior valore alla necessità di scappare rispetto alle altre loro necessità”*.

Un diverso studio di Crook et al. (2014) fornisce ulteriori evidenze del fatto che dopo un danno, il calamaro (n=72), *Doryteuthis pealeii*, aumenti la sua responsività alle minacce. In questo studio i bracci del calamaro venivano danneggiati (n= 36 danneggiati senza anestetico; n= 20 non danneggiati; n= 16 non danneggiati e trattati con anestetico), e i comportamenti venivano

registrati per le sei ore successive al danno. Questo studio ha trovato che un danno minore non produceva alcun effetto sulla nuotata spontanea o su altri comportamenti rilevabili (per l'osservatore umano). Ad ogni modo, la perchia striata (un pesce predatorio) prendeva di mira in modo selettivo il calamaro danneggiato. I calamari nel gruppo danneggiato (senza anestetico) tenevano una maggiore distanza di allerta e avevano maggiori comportamenti di allerta nelle fasi precoci degli incontri predatori rispetto ai calamari degli altri gruppi. Questo suggerisce che i calamari danneggiati avessero un inizio anticipato delle risposte difensive (Birch et al., 2021). I calamari danneggiati reagivano inoltre con comportamenti di fuga a distanze maggiori rispetto ai calamari negli altri gruppi di trattamento. Secondo Birch et al. (2021) l'evidenza non distingue però tra una spiegazione basata su dei processi decisionali centralizzati e una spiegazione basata su una sensibilizzazione dei recettori.

Un altro studio sui calamari (Oshima et al., 2016) dimostra che subire un infortunio minore influisce sulla decisione di riunirsi in gruppi sincronizzati (da distinguersi dai gruppi di aggregazione di tipo opportunistico). In questo studio, il calamaro adulto ($n=29$) *Doryteuthis pealeii*, riceveva tre schiacciamenti ravvicinati con una pinza seghettata sulla pinna (sinistra o destra). I calamari di controllo ($n=13$) venivano maneggiati allo stesso modo senza però riportare ferite. Dopo il trattamento, il comportamento di aggregazione in gruppi sincronizzati è stato registrato per ventiquattro ore. I risultati hanno mostrato che i calamari feriti avevano maggiori probabilità di riunirsi in gruppi sincronizzati subito dopo l'infortunio (0,5-2 ore), ma non sono state riscontrate differenze rispetto al gruppo di controllo su periodi di tempo più lunghi (6-24 ore). La posizione del calamaro ferito all'interno del gruppo di aggregazione (non opportunistico) era flessibile e variava a seconda che lo stimolo minaccioso fosse visivo o olfattivo: quando veniva presentato un segnale olfattivo di un predatore, gli individui feriti avevano maggiori probabilità di aggregarsi in gruppi non opportunistici posizionandosi verso l'esterno del gruppo, per impegnarsi in un comportamento di ispezione dei predatori. Al contrario, quando veniva presentato il predatore visivamente (veniva mostrato un modello di pesce), gli individui feriti avevano maggiori probabilità di aggregarsi al gruppo posizionandosi nel centro, suggerendo che i calamari feriti sarebbero stati altamente motivati a ridurre il rischio di predazione durante l'avvicinamento del predatore. Come sottolinea Birch et al. (2021), questo studio dimostra che i calamari con lesioni alle pinne decidono di riunirsi in gruppi non opportunistici, diversamente dai calamari non danneggiati: il calamaro danneggiato

potrebbe essere consapevole delle sue ferite, dando così più valore alla protezione raggiunta stando nel centro del gruppo.

Infine, un altro studio (Howard et al., 2019) sul calamaro delle Hawaii (n=68) *Euprymna scolopes*, mostra che un danno precoce durante la vita produce cambiamenti permanenti nei comportamenti difensivi e nella memoria a breve termine. Sebbene questo studio non testò direttamente i compromessi motivazionali, esso dimostra che il danno possa avere effetti a lungo termine: i calamari che erano stati lesionati precocemente in vita erano più cauti in presenza di predatori, ma non erano in grado di apprendere a inibire il comportamento di fuga quando una preda era presente.

In conclusione, Birch et al. (2021) non ha trovato alcuno studio che abbia testato direttamente la presenza di compromessi motivazionali nei cefalopodi, ma ci sono diversi studi che evidenziano come le lesioni producano un cambiamento comportamentale rilevante. Secondo Birch et al. (2021), i risultati sono compatibili con l'ipotesi che i cefalopodi siano consapevoli delle ferite, cambiando le loro priorità quando feriti, ma sono compatibili anche con l'ipotesi che la ferita produca direttamente una sensibilità aumentata al danno. In sintesi, evidenze indirette dai cefalopodi coleoidi sono state ritenute rilevanti da Birch et al. (2021) nel dimostrare scambi motivazionali, permettendo così di raggiungere un livello di confidenza medio.

2.6 Criterio sei: l'animale mostra un comportamento flessibile e auto-protettivo (curarsi le ferite, stare in guardia, pulirsi, sfregare la zona lesa) che fa presumere la capacità di rappresentarsi e localizzare fisicamente lo stimolo nocivo.

Quello che Birch et al. (2021) ha cercato per questo criterio è una forte evidenza di comportamenti auto-protettivi che andassero oltre ai semplici riflessi: l'animale dovrebbe quindi essere in grado di modificare le proprie risposte in maniera specifica, in base a dove nel corpo si sia verificato lo stimolo nocivo.

Alupay et al. (2014) forniscono prove robuste che supportano il criterio sei nei polpi, dimostrando che il polpo *Abdopus aculeatus*, (n=9) esibisce comportamenti auto-protettivi

flessibili verso la zona danneggiata. I polpi per essere feriti ricevevano un colpo a un braccio con una pinza seghettata (n= 5), mentre il gruppo di controllo (n=4) riceveva un tocco leggero del braccio. I comportamenti venivano registrati prima del danno o del trattamento *sham* e a dieci minuti, sei ore e ventiquattro ore dal trattamento. Quattro dei cinque polpi feriti inducevano l'autotomia (cioè l'amputazione volontaria) del braccio ferito. Tutti i polpi feriti hanno prodotto inchiostro all'inizio della stimolazione, mostrando un comportamento di auto-pulizia delle ferite immediato. In particolare, i soggetti feriti hanno tenuto il moncone del braccio o il sito della ferita nel becco per almeno dieci minuti. Sei ore dopo il trattamento i polpi non hanno mostrato comportamenti di auto-pulizia e la stimolazione meccanica non l'ha indotta. I polpi hanno invece contratto l'area lesa, tenendola vicino al corpo. Un sottogruppo di soggetti lesionati (n=3) ha utilizzato i bracci adiacenti per controllare le ferite, circondando con i bracci non lesionati la zona ferita. Dopo ventiquattro ore, la zona ferita non era più contratta, ma un tocco leggero era sufficiente per indurre la contrazione, che durava per tutto il test comportamentale. I soggetti di controllo non esibivano comportamenti di auto-pulizia o di protezione preventiva. La lesione al braccio ha provocato anche effetti sensibilizzanti a lungo termine nei bracci feriti e in quelli non feriti circostanti. Dopo ventiquattro ore, la stimolazione meccanica ha causato tassi più elevati di attività spontanea nei bracci intatti degli animali feriti rispetto che in quelli fintamente trattati. L'attenzione diretta alla ferita ha rappresentato per Birch et al. (2021) un'evidenza particolarmente convincente per il criterio sei.

In un altro studio (Polglase et al., 1983) su una diversa specie di polpi, il polpo minore (n=12), *Eledone cirrhosa*, tutti gli animali venivano anestetizzati prima di essere feriti, successivamente venivano inflitte due ferite da puntura tra l'apice del mantello e il sifone. Gli autori riferiscono che una volta esaurita l'anestesia i polpi feriti si sarebbero concentrati sulle zone della ferita accarezzando la lesione attraverso la punta di un braccio. Un limite di questo studio è tuttavia rappresentato dalla mancanza di un gruppo di controllo. Un simile comportamento di auto-pulizia della ferita è stato ad ogni modo osservato nei polpi a seguito di un intervento chirurgico alla capsula ottica o al cranio, e come notato dal gruppo di ricerca di Graziano Fiorito (*Guidelines for the Care and Welfare of Cephalopods in Research –A consensus based on an initiative by CephRes, FELASA and the Boyd Group. 2015*), il polpo proteggerebbe il mantello o il cranio dopo l'intervento chirurgico.

In uno studio discusso principalmente nell'ambito del criterio otto, Crook (2021) ha riscontrato che i polpi (*Octopus bocki*) a cui sia stato iniettato acido acetico diluito, andrebbero a pulire la zona della puntura con il loro becco, rimuovendo addirittura parte della pelle. Poiché il comportamento di auto-pulizia ma non di rimozione della pelle è stato registrato in risposta ad altri tipi di lesioni (schiacciamento del braccio, pizzicamento della pelle, taglio della pelle), Crook ipotizza che questa potrebbe essere una risposta messa in atto specificamente in seguito a punture nocive (che inoculano veleno). Secondo Birch et al. (2021), se questo fosse corretto suggerirebbe che il polpo potrebbe rappresentarsi il tipo di dolore (meccanico o chimico), nonché la sua precisa localizzazione corporea.

Diversi studi su diverse specie di polpi hanno mostrato che essi si ritirerebbero in modo auto-protettivo da paguri che portano anemoni pungenti sul loro guscio (Polimanti, 1910; Boycott, 1954; Brooks, 1988; Ross, 1971; Hand, 1975; McClean, 1983; Brooks, 1988). Secondo Birch et al. (2021) questa non rappresenta, ad ogni modo, un'evidenza convincente in relazione al criterio sei, perché sarebbe difficile essere sicuri che tali comportamenti implicino una rappresentazione centralizzata della posizione corporea di una lesione o di uno stimolo nocivo. I polpi comuni (*Octopus vulgaris*), per esempio, sono capaci di un riflesso di retrazione del braccio in risposta a uno stimolo nocivo, senza fare riferimento al cervello (Hague et al., 2013). Uno studio sull'apprendimento delle seppie comuni dimostra che queste evitano le chele della preda del granchio dopo essere state pizzicate, imparando ad attaccare il granchio da dietro (Boal et al., 2000). Prove aneddotiche suggeriscono anche che le seppie possono discriminare tra diverse specie di granchi, ed evitare di attaccare o cacciare specie di granchi più aggressive dopo essere state pizzicate (A. S. Darmaillacq, osservazione personale comunicata in Andrews et al., 2013). Inoltre, dopo l'intervento chirurgico alla capsula ottica, al cranio, alla pelle o ai bracci, le seppie comuni mostrano un'attenzione e una cura dirette alla ferita strofinando i bracci sul sito dell'intervento per diversi giorni o settimane (osservazione personale di A.K. Schnell & C. Jozet-Alves, riportata in Schnell et al., 2020). I dati quantitativi su queste osservazioni non sono stati registrati, ma secondo Birch et al. (2021) si possono considerare osservazioni aneddotiche credibili in quanto provenienti da biologi specializzati sui cefalopodi con esperienza in neuroetologia.

Bazarini & Crook (2000) forniscono l'evidenza di comportamenti difensivi nel calamaro delle Hawaii (n=155), *Euprymna scolopes*, a seguito di una ferita al braccio: i calamari del gruppo

sperimentale venivano feriti tramite un forte pizzicotto alla pinna sinistra con delle pinze seghettate. Le lesioni producevano lividi visibili del tessuto e alcuni strappi lungo il margine che era stato schiacciato. I calamari del gruppo di controllo sottostavano alla stessa procedura ma le pinze toccavano solo leggermente la pinna. A seguito dei due trattamenti (lesione o tocco leggero), i soggetti sono stati esposti a test sensoriali tattili e di vibrazione a sei ore e a quattordici giorni dopo l'infortunio. Il calamaro ha risposto ai test sensoriali tattili e di vibrazione attraverso una postura difensiva del braccio che era qualche volta accompagnata ad una fuga improvvisa o dalla produzione di inchiostro. Come riportato da Birch et al. (2021), questo studio mostra che i calamari rispondono a stimoli nocivi con dei comportamenti di tipo difensivo, ma senza manifestare dei comportamenti specificamente diretti al distretto della ferita.

Birch et al. (2021), chiedendosi cosa spiegasse la mancanza di comportamenti diretti alla ferita in siti specifici dopo una lesione nei calamari, ha deciso di fare riferimento ad uno studio di Crook et al. (2013), che dimostra come a seguito di un infortunio la sensibilizzazione nocicettiva nei calamari sembrerebbe essere amplificata in modo diffuso: i ricercatori hanno mostrato che un danno periferico nei calamari (n=42) comportava un'attività spontanea a lungo termine, così come sensibilizzazione a stimoli meccanici in neuroni afferenti non solo vicino alla zona danneggiata ma anche in altre parti del corpo. La mancanza di localizzazione è quindi in linea con l'ipotesi che lo stato comportamentale generale aumenti le reazioni alle stimolazioni tattili ovunque sulla superficie del corpo. Gli autori dello studio suggeriscono che questo fenomeno potrebbe avere la funzione di attivare uno stato di vigilanza generalizzato: se si mette insieme questo risultato con altri che evidenziano come danni minori nei calamari aumentino il rischio di predazione (Crook et al., 2014), si può ben ipotizzare come uno stato di vigilanza generalizzato permetta agli animali feriti di essere più responsivi ai predatori in avvicinamento.

In sintesi, la prova più evidente di comportamenti di cura della zona ferita e di protezione preventiva viene mostrata nei polpi, dove è stato dimostrato che gli individui feriti arricciano i bracci adiacenti attorno al sito ferito e tentano di raschiare via lo stimolo nocivo. Le prove esistenti basate sull'osservazione della cura delle ferite nelle seppie sarebbero parzialmente convincenti, ma ad oggi non sono supportate da studi sperimentali *peer-reviewed*. Per i calamari ci sono invece prove di una diffusa sensibilizzazione nocicettiva a seguito di una

lesione, ma non c'è nessuna evidenza di comportamento auto-protettivo diretto allo specifico al sito della ferita. Per concludere, Birch et al. (2021) ha concluso un livello di confidenza molto alto per il fatto che il polpo soddisfi il criterio sei, mentre ha concluso un livello di confidenza medio per il fatto che la seppia soddisfi lo stesso criterio.

2.7 Criterio sette: l'animale si mostra in grado di apprendimento associativo attraverso cui lo stimolo nocivo viene associato ad uno stimolo neutro, e/o vengono apprese attraverso il rinforzo nuove modalità per evitare lo stimolo nocivo. Nota: l'abituazione e la sensibilizzazione non sono sufficienti per raggiungere questo criterio.

Quello che Birch et al. (2021) ha cercato per rispondere a questo criterio è una forte evidenza che l'animale sia capace di formare associazioni tra stimoli nocivi e stimoli neutri, attraverso, per esempio, l'apprendimento dell'associazione di un particolare luogo, oppure di un odore neutro, con uno stimolo nocivo. È stata inoltre cercata l'evidenza che l'animale potesse imparare un nuovo comportamento (distinto da ogni risposta di riflesso preesistente) che gli permettesse di evitare uno stimolo nocivo. È in questo senso importante, fa notare Birch et al. (2021), distinguere l'apprendimento associativo dall'abituazione (l'animale diventa progressivamente meno sensibile ad uno stimolo neutro dopo incontri ripetuti) e dalla sensibilizzazione (la maggiore sensibilità è data da una risposta generalizzata dovuta alla presentazione di un secondo stimolo intenso). Queste sono infatti forme di apprendimento di tipo più semplice, ovvero non associativo, e possono essere raggiunte senza un cervello e senza alcun processo informativo e di integrazione centralizzato (Ginsburg & Jablonka, 2019).

Il legame tra apprendimento associativo ed elaborazione integrativa è molto più forte, perché le rappresentazioni di entrambi gli stimoli devono avvenire insieme con lo stesso meccanismo di apprendimento associativo (Ginsburg & Jablonka, 2019; Birch et al., 2020). Uno studio recente ha messo in dubbio questa ipotesi, affermando di poter dimostrare l'apprendimento associativo nelle piante (Gagliano et al., 2016), ma non è riuscito a fornire prove statisticamente significative contro l'ipotesi nulla (Taiz et al., 2019), e non è stato possibile replicare il risultato (Markel, 2020). Diversi tipi di apprendimento associativo sembrano avere un legame

particolarmente forte con la senienza; tra questi si possono citare il condizionamento operante (Skora et al. 2021), il *reversal learning* (Travers et al. 2017), l'apprendimento di relazioni spaziali "incongruenti" (Ben-Haim et al. 2021) e l'apprendimento attraverso intervalli temporali tra gli stimoli ("condizionamento delle tracce"; Clark et al. 2020). Il metodo di Birch et al. (2021) è stato quindi quello di valutare come rilevanti tutte le evidenze di apprendimento associativa, senza avanzare alcuna ipotesi rispetto a quali tipi di apprendimento associativo richiedano la senienza.

In generale i ricercatori si trovano molto d'accordo sul fatto che sia i cefalopodi che le seppie utilizzino un apprendimento di tipo associativo (Hanlon & Messenger, 2018; Hochner et al., 2006; Marini et al., 2017; Mather, 1995, 2008; Schnell et al., 2020); d'altronde, il cervello dei cefalopodi coleoidi è funzionalmente specializzato per facilitare l'apprendimento: sulla base di studi elettrofisiologici, Hochner et al. (2006, p.315) hanno suggerito che: "*Un processo evolutivo convergente ha portato alla selezione di reti simili e ad una plasticità sinaptica*". In particolare, il complesso del lobo frontale superiore mediano verticale ha funzioni di apprendimento e di memoria analoghe a quelle dell'ippocampo nei mammiferi (Hochner et al., 2006, Shomrat et al., 2015). Le lesioni inibiscono la performance in compiti di apprendimento a lungo termine (come discriminazioni visive) senza compromettere altri comportamenti di sopravvivenza (Boycott & Young, 1955; Maldonado, 1965; Young, 1960) e questa struttura si sviluppa contemporaneamente insieme alle abilità di apprendimento nei polpi (Fiorito & Chichery, 1995) e nelle seppie (Dickel et al., 2001). I polpi, inoltre, possono imparare ad associare delle ricompense con svariati stimoli visivi e tattili (rassegna in Schnell et al., 2020; brevemente in Marii et al., 2017). Per esempio, Papini & Bitterman (1991) hanno insegnato al polpo diurno, *Octopus cyanea* (n=37), ad associare uno stimolo neutro con una ricompensa (cibo). Papini e Bitterman hanno trovato che i soggetti che ricevevano ricompense più grandi mostravano un'acquisizione più veloce dell'associazione e una performance successiva migliore, rispetto ai soggetti che ricevevano ricompense più piccole. Diversi altri studi hanno mostrato che i polpi possono apprendere ad associare tra loro due stimoli diversi utilizzando un addestramento impiegando ricompensa o punizione (cioè attraverso delle scosse elettriche) (Fiorito & Scotto, 1992; Kawashima et al., 2020; Mackintosh, 1963; 1964; Sutherland, 1962; Tokuda et al., 2015). Più recentemente, diversi studiosi si sono occupati di addestrare i polpi ad apprendere alcune associazioni per poi testare qualche altra abilità cognitiva: alcuni studi hanno mostrato che i

polpi possono utilizzare l'apprendimento spaziale (Boal et al., 2000), l'apprendimento sociale (Amodio & Fiorito; 2013; Tomita & Aoki, 2014), l'apprendimento condizionato (Hvorecny et al., 2007, Tokuda et al., 2015) e il *reversal learning* (Mackintosh, 1962; Mackintosh & Mackintosh, 1963, 1964; ma vedere Bublitz et al., 2017), ma questi studi non sono stati trattati in dettaglio da Birch et al (2021). La letteratura è dominata dagli studi sull'*Octopus vulgaris*, ma ci sono alcuni studi anche sull'*Octopus bimaculoides* (Boal et al., 2000), sull'*Octopus ocellatus* (Tomita & Aoki, 2014), sull'*Octopus aegina* (Kawamura et al., 2001) e sull'*Abdopus aculeatus* (Kawashima et al., 2020).

Nelle seppie l'apprendimento è stato ampiamente analizzato usando il test del gambero nel tubo (Agin et al., 1998,2006; Boycott, 1961; Cartron et al., 2013; Chichery & Chichery, 1992; Dickel et al., 2000; Messenger 1971, 1973; Sanders & Young, 1940). Il gambero nel tubo è una situazione sperimentale consolidata per studiare l'apprendimento e la memoria nei cefalopodi: si tratta di presentare al soggetto un gambero all'interno di un bicchiere di vetro o di una provetta; inizialmente il soggetto attacca la preda chiusa nel bicchiere o nella provetta, ma scopre rapidamente che non la può ottenere. Una delle principali sfide per i ricercatori che utilizzano il compito del gambero nel tubo sta nel dimostrare che il successo implica l'apprendimento associativo (nello specifico, il condizionamento strumentale), e non solo l'abituazione (Agin et al., 2006). Messenger (1973) ha mostrato che punizioni più grandi per avere attaccato il gambero riducevano il numero di prove necessarie per soddisfare il criterio (cioè lo standard fissato dallo sperimentatore per l'ottenimento dell'apprendimento), laddove punizioni medie aumentavano il numero di prove. Ad ogni modo, questi risultati non hanno escluso una combinazione di fattori, quali l'abituazione al gambero, e una generale riduzione della reattività causata dalla punizione.

Secondo Birch et al. (2021), una caratteristica chiave dell'abituazione è la disabituazione: la disabituazione viene indagata grazie alla presentazione di nuovi stimoli per invertire il processo di abituazione (Pinsker et al., 1970). Agin et al. (2006) ha testato la disabituazione dando alle seppie una preda alternativa (granchio; esp 1-2) o un nuovo stimolo (luce lampeggiante; esp. 3), prima di presentare di nuovo il gambero nel tubo. I risultati dimostrano che non vi era alcuna tendenza statisticamente significativa a riprendere l'attacco dei gamberi, tuttavia, lo studio aveva un limite dovuto alla piccola dimensione del campione. Agin et al. non riporta un'analisi

della potenza statistica, ma risultati nulli in un campione così piccolo non sono una prova convincente dell'assenza di disabituazione.

Considerazioni simili possono essere fatte a partire da un altro studio che ha tentato di distinguere l'apprendimento associativo dall'abituazione (Purdy et al., 2006). Lo studio non ha trovato alcuna evidenza di un effetto di disabituazione in un esperimento che comprendeva due gruppi di sette seppie (*Sepia officinalis*). Anche questo studio era costituito da un campione piccolo, ma i risultati relativi ai due studi, se presi insieme offrono, secondo Birch et al. (2021), un'evidenza più forte di ciascun esperimento preso individualmente.

Darmaillacq et al. (2004) ha portato avanti il primo studio sull'apprendimento di avversione al gusto nei cefalopodi. Ha prima stabilito se le seppie (*Sepia officinalis*; n= 66) preferissero il granchio o il gambero, per poi presentare ripetutamente la preda ricoperta di una sostanza sgradevole (chinino). I soggetti hanno imparato rapidamente a evitare queste prede sgradevoli. Questo gruppo di trattamento è stato confrontato con un gruppo di controllo che è stato addestrato con una preda non coperta con il chinino. Durante le prove di scelta, sia ventiquattro o settantadue ore dopo, ventisei dei trentadue soggetti trattati con il chinino evitavano la preda da loro originariamente preferita. Al contrario, ventisette delle trentaquattro seppie di controllo hanno attaccato la loro preda preferita. Secondo Birch et al. (2021), si può considerare l'esperimento appena citato uno studio di alta qualità con una buona dimensione del campione. La ricerca sulle seppie ha perlopiù utilizzato la seppia *Sepia officinalis*, nonostante anche altre specie siano in grado di apprendere il compito del gambero nel tubo (per esempio *Sepia bandensis*: Bowers et al., 2020; *Sepia pharaonis*: Purdy et al., 2006). C'è inoltre evidenza di condizionamento classico (Agin et al., 1998, 2003; Cole & Adamo, 2005; Messenger, 1971), di apprendimento spaziale (Alves et al., 2007, 2008; Scatà et al., 2016), e di apprendimento condizionato (Hvorecny et al., 2007) nelle seppie, anche se Birch et al. (2021) non ha trattato nel dettaglio questi studi.

È improbabile, secondo Birch et al. (2021), che l'apprendimento associativo sia presente sia nei polpi che nelle seppie, ma non nei calamari: l'evidenza che arriva dai polpi e dalle seppie, combinata con l'evidenza discussa altrove nelle revisioni che trattano la filogenetica (Tanner et al. 2017), la neuroanatomia (Andrews et al. 2013) o l'ecologia (Mather & Kuba, 2013) dei cefalopodi coleoidi, rendono molto probabile il fatto che l'apprendimento associativo sia un

tratto generale dei cefalopodi coleoidi. Tuttavia, rispetto a polpi e seppie, ci sono stati pochi studi di apprendimento sui calamari. Allen et al. (1985) ha analizzato la discriminazione visiva nel calamaro corto dell'atlantico (*Lolliguncula brevis*). Nel primo esperimento (n=3) i soggetti sono stati addestrati ad attaccare un rettangolo orizzontale per una ricompensa di cibo, e ad evitare un rettangolo verticale o al contrario ricevere una scossa elettrica da 20 V. I calamari hanno successivamente attaccato il rettangolo orizzontale un numero significativamente maggiore di volte (trentotto su trentanove) rispetto al rettangolo verticale (sette su trentacinque). Ci sono state alcune prove del mantenimento di questi compiti dopo nove giorni, sebbene non sia stata riportata alcuna analisi statistica. Nel secondo esperimento (n=1), lo stimolo positivo era una pallina bianca e lo stimolo negativo una pallina nera. La pallina bianca è stata attaccata in un numero significativamente maggiore di prove (cinquantotto su cinquantotto) rispetto alla pallina nera (ventuno su cinquantotto). Come è stato riportato anche da Birch et al. (2021), un limite di questo studio è che gli stimoli non sono stati controbilanciati: gli stimoli orizzontali/bianchi venivano premiati per tutti gli individui, mentre gli stimoli verticali/neri venivano puniti per tutti gli individui: questo rende difficile districare l'apprendimento dal comportamento guidato dalle proprietà degli stimoli, come la loro visibilità.

In uno studio recente sull'apprendimento associativo, Zepeda et al. (2017) ha testato il calamaro delle Hawaii (*Euprymna scolopes*) nel compito del gambero nel tubo: i soggetti sono stati addestrati in sessioni di massa (tre prove di dieci minuti con intervalli di dieci minuti) o distanziate (tre prove di dieci minuti con intervalli di un giorno). Il calamaro ha ridotto significativamente la risposta durante la prima prova, e questa tendenza sarebbe stata mantenuta per otto giorni (nel trattamento di massa) e per dieci giorni (nel trattamento distanziato) tra i test. Secondo Birch et al. (2021), questo mantenimento sarebbe una forma di memoria a lungo termine. Tuttavia, questo studio ha anche dei limiti: all'interno delle prove, gli autori hanno confrontato il numero di mancate risposte nella prima metà (della prova) con il numero di mancate risposte nella seconda metà. Una riduzione della risposta potrebbe essere spiegata dai livelli di energia esauriti piuttosto che dall'apprendimento. Anche se l'apprendimento fosse responsabile della mancanza di responsività, Zepeda et al. (2017) non ha stabilito se si trattasse di abitudine o di apprendimento associativo.

Per quanto riguarda i nautiloidi, questi hanno meno neuroni rispetto ai coleoidi, e mancano di lobi chiaramente differenziati, incluso il complesso del lobo verticale-lobo frontale mediano superiore legato all'apprendimento e alla memoria a lungo termine nei coleoidi (Young, 1965, 1991). Eppure, ci sono prove di condizionamento classico e di un probabile apprendimento spaziale nei nautiloidi.

Crook & Basil (2008) hanno addestrato dodici nautili camerati (*Nautilus pompilius*) in un compito di condizionamento classico: lo stimolo incondizionato era il cibo, lo stimolo condizionato era una luce blu di 0,5 secondi, e le risposte erano l'estensione del tentacolo e la respirazione rapida. Sebbene gli autori non avessero criteri per stabilire se i soggetti avessero appreso il compito, lo stimolo condizionato induceva un'estensione dei tentacoli e frequenza respiratoria significativamente più elevate nel gruppo di trattamento rispetto ad un gruppo di controllo non rinforzato a tre minuti e ad un'ora successivi al condizionamento (considerata memoria a breve termine). Non c'era differenza di trattamento per nessuna delle due misure ad un'ora, ma differenze significative sono ricomparse a sei e a dodici ore (memoria a lungo termine). Crook e Basil lo hanno equiparato alla curva bifasica della memoria a breve e a lungo termine osservata nei coleoidi (Agin et al., 2003,2006). Secondo Birch et al. (2021) quest'analogia funzionale è sorprendente, se si tiene conto delle differenze strutturali tra i nautiloidi e i coleoidi.

Per consentire un'elevata confidenza del fatto che i nautiloidi soddisfino il criterio sette sarebbero ad ogni modo necessari ulteriori studi: il p-value per diversi intervalli di tempo, specialmente a tre e a trenta minuti, era solo al limite della significatività (tra 0,02 e 0,05). Inoltre, secondo Birch et al. (2021) sarebbe stato opportuno fare delle correzioni, ad esempio applicando la correzione di Bonferroni. Se fosse stata applicata una correzione, i risultati significativi al limite potrebbero essere stati infatti non significativi.

In un altro studio sui nautiloidi, Crook et al. (2009, esp.1) ha trovato delle prove provvisorie per l'apprendimento spaziale (apprendimento della configurazione spaziale di un labirinto) nei nautili camerati (*Nautilus pompilius*). Dieci soggetti venivano posizionati in un labirinto bidimensionale in campo aperto con luce intensa avversiva e acque poco profonde. Per scappare da questi stimoli incondizionati i nautili dovevano uscire attraverso un foro d'uscita segnalato da un involucro di bolle, uno stimolo condizionato tattile e visivo. I soggetti sono stati sottoposti a cinque prove di addestramento di dieci minuti con un intervallo tra le prove di

quindici minuti. La latenza di uscita è notevolmente diminuita durante le cinque prove di addestramento, mentre la potenza di uscita è rimasta significativamente al di sotto della soglia di latenza (ingenua) a diciotto ore, ventiquattro ore, trentasei ore, quarantotto ore, settantadue ore, novantasei ore, sette giorni e ventuno giorni. Questo tempo di ritenzione è sostanzialmente più lungo rispetto alle dodici ore osservate nel compito di condizionamento classico di Crook & Basil (2008). Come evidenziato da Birch et al. (2021), non è chiaro cosa i nautiloidi stessero apprendendo in questo studio: un'interpretazione è che stessero imparando ad associare l'involucro di bolle con il buco d'uscita; tuttavia, hanno iniziato ogni prova di fronte (180°) al foro d'uscita e potrebbero così aver appreso l'orientamento per scappare, piuttosto che lo stimolo condizionato. È anche difficile escludere una riduzione generale del comportamento esplorativo in caso di esposizione ripetuta alla stessa arena -una forma di abitudine.

L'apprendimento associativo è quindi stato dimostrato in modo convincente sia nei polpi che nelle seppie. Pochi studi hanno indagato l'apprendimento associativo nei calamari, ma il disegno d'insieme fa credere che l'apprendimento associativo sia una capacità condivisa dei cefalopodi coleoidi. Ci sono inoltre pochi studi sui nautiloidi, ma le prove attuali indicano una capacità di apprendimento associativo. In sintesi, è stato concluso un livello molto alto di confidenza per il fatto che i polpi (Octopoda) e le seppie (Sepiida) soddisfino il criterio sette, un livello alto di confidenza per il fatto che il calamaro soddisfi il criterio sette e un medio livello di confidenza per il fatto che i nautiloidi soddisfino il criterio sette.

2.8 Criterio otto: l'animale mostra di dare valore a presunti analgesici o anestetici quando ferito in uno o più dei seguenti modi: (a) l'animale impara ad autosomministrarsi presunti analgesici o anestetici quando ferito; o (b) l'animale impara a preferire quando ferito un luogo nel quale può avere accesso ad analgesici o anestetici; o (c) l'animale ferito ha come priorità quella di ottenere queste risorse rispetto ad altre (come il cibo).

Crook (2021) si è chiesto: *“Un polpo (Octopus bocki), dopo essere stato collocato nella sua camera preferita subito dopo aver ricevuto un'iniezione potenzialmente dolorosa di acido*

acetico, imparerà ad evitare quella camera in futuro? Inoltre, imparerà a preferire una camera in cui riceve un anestetico locale (lidocaina) quando viene ferito? E ancora, questa preferenza dipende dalla lesione?" Attraverso i suoi studi, Crook (2021) è in grado di rispondere affermativamente a tutte e tre le sue domande. Secondo Birch et al. (2021), questo rappresenta infatti il tipo di studio con il potenziale per fornire evidenze di alta qualità rispetto al criterio otto (via 8b), perché mostra che l'animale valuta positivamente un anestetico selettivamente dopo essere stato ferito. Per fare questo, Crook ha utilizzato un paradigma di preferenza del luogo condizionato (CPP), un paradigma consolidato per dimostrare la componente affettiva del dolore nei mammiferi (Navratilova et al. 2013). In particolare, i polpi sono stati introdotti in un apparato costituito da tre camere, ed è stata presa nota della loro camera preferita. I soggetti sperimentali (n=8) hanno ricevuto un'iniezione sottocutanea di acido acetico diluito (0,5%) in un braccio, e ai soggetti di controllo (n=7) è stata iniettata una soluzione salina. I risultati hanno mostrato che i soggetti sperimentali evitavano la camera inizialmente preferita, nella quale venivano confinati subito dopo l'iniezione, e quando veniva offerto sollievo dal dolore (tramite una iniezione topica di lidocaina), i soggetti sperimentali cambiavano la preferenza iniziale per un certo luogo preferendo quello in cui avevano provato sollievo dal dolore. Al contrario, gli animali di controllo non hanno mostrato alcun cambiamento nella preferenza iniziale dopo l'iniezione della soluzione salina, e la successiva iniezione di lidocaina non ha indotto un cambiamento nella preferenza della camera. Crook ha inoltre effettuato delle registrazioni elettrofisiologiche dell'attività nei connettivi brachiali, che collegano i cordoni nervosi del braccio al cervello (criterio tre): le registrazioni hanno mostrato, nel gruppo sperimentale, un periodo prolungato di attività che è stato poi silenziato dall'iniezione di lidocaina.

In conclusione, lo studio recente citato sopra fornisce evidenze del fatto che il polpo impari a preferire, quando esposto ad uno stimolo nocivo (acido acetico), un luogo in cui un anestetico locale è risultato accessibile. Questo articolo fornisce dunque prove convincenti del fatto che i polpi soddisfino il criterio otto. Sebbene si tratti di un singolo studio, secondo Birch et al. (2021) la sua alta qualità permette di deporre un alto livello di confidenza nel risultato.

3. EVIDENZE DI SENZIENZA NEI DECAPODI

Sommario

C'è una forte evidenza di senzienza nei granchi veri (infraordine Brachyura): essi soddisfano i criteri uno, due, quattro, sei e sette con un livello di confidenza alto e molto alto.

C'è in qualche modo meno evidenza rispetto agli altri decapodi. C'è una modesta evidenza di senzienza nei granchi anomurani (infraordine Anomura), i quali soddisfano il criterio uno, due e sei con un livello di confidenza alto e il criterio cinque con un livello di confidenza medio.

Ci sono evidenze di senzienza in aragoste/gamberi astacidi (infraordine Astaidea): questi animali soddisfano i criteri uno, due e quattro con un livello di confidenza alto e molto alto.

Come evidenziato da Birch et al. (2021), nei casi in cui non sia stato possibile avere un livello di confidenza alto o molto alto che un criterio venisse soddisfatto, questo è stato a causa di una mancanza di evidenze positive piuttosto che di una chiara evidenza che l'animale non soddisfi il criterio.

Rassegne rilevanti che hanno trattato questo argomento a partire dal 2000 includono i lavori di Sherwin (2001), AHAW (2005), Elwood et al. (2009), Gherardi (2009), Broom (2014), Sneddon et al. (2014), Sneddon (2015), Burrell (2017), Walters (2018) e Elwood (2019 a, b). Sebbene queste siano rassegne di alta qualità, qualche nuova evidenza è venuta alla luce dopo che queste sono state scritte, e non si applicano quindi al disegno di ricerca di Birch et al. (2021): piuttosto che fare riferimento a rassegne passate, hanno revisionato tutte le evidenze originarie in modo da produrre una rassegna nuova.

3.1 Criterio uno: l'animale possiede recettori sensibili a stimoli nocivi (nocicettori)

Secondo Birch et al. (2021), il metodo più diretto per scovare i nocicettori è quello di identificare neuroni sensoriali periferici che mostrino attività elettrica alterata in risposta ad una stimolazione potenzialmente nociva. Questi metodi non hanno ancora rivelato evidenze

conclusive a favore dei nocicettori nei decapodi (Sneddon et al., 2014; Walters, 2018). Sono stati trovati solo due studi elettrofisiologici che esplorano in modo esplicito la nocicezione nei crostacei decapodi: per valutare le risposte nocicettive ad un PH estremo, è stata recisa la seconda coppia di due paia di antenne del gambero rosso della Louisiana (*Procambarus clarkii*), e sono state prelevate registrazioni extracellulari dalla punta del nervo di ciascun paio di antenne (Puri & Faulkes, 2010). L'attività elettrica dei nervi è stata confrontata in diverse situazioni: quando le antenne erano lavate o tamponate con idrossido di sodio (NaOH; alcalino), acido cloridrico (HCl), benzocaina (un anestetico locale utilizzato nei vertebrati) e una soluzione di controllo (soluzione salina per gamberi d'acqua dolce). Le risposte elettriche differivano notevolmente tra le singole antenne, e non mostravano aumenti o diminuzioni consistenti nella frequenza dei picchi tra i diversi stimoli. Lo studio non ha quindi prodotto prove di nocicettori che rispondano al PH estremo nelle antenne dei gamberi (Puri & Faulkes, 2010), tuttavia, come sottolineato da Birch et al. (2021), il PH estremo è solo uno dei vari possibili stimoli a cui un nocicettore può rispondere.

In un esperimento di *follow-up*, la stessa procedura è stata utilizzata per studiare le risposte elettriche extracellulari dei secondi nervi antennali del *Procambarus clarkii*, ma questa volta in risposta a calore estremo (lavando con una piccola quantità di acqua a 60 °C), ad una soluzione salina di controllo, alla capsaicina (la sostanza chimica che si trova nei peperoncini, disciolta in etanolo), all'isotiocianato (la sostanza chimica che si trova nel wasabi, disciolta in etanolo) o ad una soluzione di etanolo di controllo (Puri & Faulkes, 2015). I risultati evidenziano che c'era significativamente più attività elettrica in risposta all'acqua calda che alla soluzione salina di controllo; non c'erano invece differenze consistenti nell'attività elettrica tra la capsaicina, l'isotiocianato e l'etanolo, anche se l'analisi statistica di questo confronto non è stata riportata. Questo ha fornito a Birch et al. (2021) una prova dell'evidenza di nocicettori antennali specializzati per situazioni di calore estremo, anche se non è chiaro se i recettori di fatto rispondano anche a calore moderato, perché un insieme di temperature non è stato testato, e perché la piccola quantità di acqua calda si è velocemente raffreddata in risposta alla quantità molto maggiore di soluzione salina a temperatura ambiente che ha bagnato le antenne. Se i recettori rispondessero ad un calore moderato, si considererebbero infatti termocettori piuttosto che nocicettori.

Secondo Birch et al. (2021), questa distinzione tra “estrema” e “moderata” non è ben definita: anche una stimolazione estrema dovrebbe rientrare nei confini di ciò che è evolutivamente rilevante per la specie, affinché un nocicettore abbia un valore adattivo per un animale nel prevenire che questo venga danneggiato fisicamente dagli stimoli. Sarebbe necessario, quindi, studiare la nocicezione utilizzando stimoli che vanno da intensità/frequenze/durate lievi a crescenti. Per esempio, la sensibilità al calore è spesso studiata nei vertebrati utilizzando laser, termodi o piastre riscaldate, i quali possono in maniera graduale diventare più caldi finché una risposta nocicettiva non sia osservata (vedi e.g. Ashley et al., 2007 sulla trota arcobaleno). Se i nocicettori esistessero indipendentemente da altri recettori sensoriali, sarebbe da aspettarsi una responsività elettrica bimodale o multimodale con alcuni recettori sensoriali che rispondono a stimolazioni moderate e nocicettori che rispondono solo quando la stimolazione diventa estrema. Secondo Birch et al. (2021) questa rappresenta una mancanza di prove. Un altro studio elettrofisiologico avrebbe dovuto studiare la responsività elettrica alla stimolazione di recettori sensoriali sui bordi interni delle chele pereopodi (chele della zampa) nel gambero di pietra (*Austropotamobius torrentium*) (Altner et al., 1983), ma gli autori hanno notato l'esistenza di meccanicettori che erano associati a *setae* esterne (setole) e che rispondevano solo a “stimoli meccanici forti”. Non hanno quantificato “quanto forti”, ma per Birch et al. (2021) sarebbe significativo sapere se siano abbastanza forti da causare un comportamento evitante, perché in questo caso potrebbe trattarsi di nocicettori meccanici.

Evidenze molecolari relativamente recenti forniscono evidenze indirette della nocicezione nei decapodi. La trascrittomica può rilevare quali geni vengono espressi come RNA messaggero (mRNA) all'interno del tessuto di un animale, provocando così la produzione di proteine specifiche. L'analisi dei trascrittori dell'aragosta dei Caraibi (*Panulirus argus*), dell'aragosta artigliata (*Homarus americanus*), del gambero rosso di palude (*Procambarus clarkii*) e del granchio blu (*Callinectes sapidus*) ha mostrato che tutte e quattro le specie esprimono i canali del potenziale recettore transitorio A (TRPA) (Kokma et al., 2020). La sottofamiglia TRPA dei canali ionici è significativa, perché alcune delle sue varianti funzionano come recettori in molti animali multicellulari bilaterali. Ad esempio, i quattro decapodi esprimevano canali omologhi a TRPA1, che rileva un'ampia varietà di stimoli potenzialmente nocivi in molte specie animali, dai vermi piatti (Arenas et al., 2017) all'uomo (Kádková et al., 2017). I decapodi esprimevano

addizionalmente un canale omologo a quello TRPA conosciuto come “*painless*”, così chiamato perché quando viene messo fuori uso dal moscerino della frutta, i moscerini non evitano più stimoli nocivi termici, meccanici o chimici (Tracey et al., 2003; Im & Galko, 2012).

Complessivamente, i decapodi esprimevano quattro dei cinque canali omologhi al TRPA con altre specie, e due canali TRPA distinti senza omologhi negli insetti. Esprimevano anche il TRPV1 (Kozma et al., 2020), che è un'altro canale ionico altamente conservato coinvolto nella nocicezione polimodale dei mammiferi (Smith & Lewin, 2009). Uno studio correlato ha mostrato che tutti questi canali ionici venivano espressi nelle antenne, negli arti e nel cervello del *Procambarus clarkii* a vari livelli (Kozma et al., 2018). Secondo Birch et al. (2021) questi dati sul trascrittoma forniscono prove rilevanti, ma non sono sufficienti per avere un'elevata fiducia della presenza di nocicettori, perché le stesse proteine possono avere funzioni diverse in specie diverse, e in tessuti diversi nello stesso animale.

Oltre ad essere presenti nei vertebrati, i nocicettori sono stati trovati in vermi anellidi, nematodi, molluschi gasteropodi e insetti (Smith & Lewin, 2009; Walters, 2018). I crostacei sono un gruppo gemello degli esapodi (insetti) all'interno del Phylum degli artropodi, ed entrambi derivano da un antenato comune condiviso con i nematodi (Halanych, 2004). Non è chiaro se i nocicettori si siano evoluti in un antico antenato comune per poi conservarsi in quasi tutte le specie successive, o se si siano evoluti indipendentemente più di una volta attraverso un'evoluzione convergente (Walters, 2018). Secondo Birch et al. (2021), se si fossero evoluti in ogni antenato comune condiviso tra i crostacei e gli esapodi, allora sembrerebbe improbabile che i crostacei li avessero poi persi, perché i nocicettori hanno un chiaro grado di sopravvivenza.

In conclusione, due principali linee di evidenze supportano l'ipotesi che i nocicettori siano ampiamente diffusi nei decapodi: la prima stabilisce che i nocicettori sono presenti in altri artropodi come gli insetti; la seconda che le famiglie di canali ionici presenti nella nocicezione sono ampiamente conservate dal punto di vista evolutivo, essendosi caratterizzate in specie che vanno dai vermi piatti all'uomo, e diverse proteine del canale ionico omologhe sono state trovate nei granchi e nelle aragoste. Considerate insieme alle evidenze di tipo comportamentale, queste evidenze suggeriscono che i nocicettori siano presenti nei decapodi. Le evidenze genetiche e le evidenze a partire da altri artropodi portano quindi a concludere, con

un livello di confidenza alto, che i nocicettori siano ampiamente diffusi nei decapodi, mentre evidenze neurofisiologiche dirette sarebbero necessarie per avere un livello di confidenza molto alto.

3.2 Criterio due: l'animale possiede regioni cerebrali di integrazione in grado di integrare informazioni provenienti da diverse fonti sensoriali

Secondo Birch et al. (2021) c'è ancora molto da scoprire rispetto ai cervelli dei crostacei, mentre tante parti non sono ancora state ben comprese. C'è poi una variazione enorme nella struttura del cervello tra le specie, dal momento che specie diverse si sono adattate a un'ampia gamma di diversi habitat ed ecologie (Sanderman et al., 2014; Strausfeld et al., 2020).

Il cervello dei decapodi è formato da tre principali gruppi di neuropili (neuroni densamente intrecciati) (rassegna di Sanderman et al., 2014) che si collegano gli uni con gli altri attraverso un complesso centrale elaborato (Utting et al., 2009): La prima regione del cervello, quella più dorsale, è il protocerebro, che elabora principalmente le informazioni visive. Le parti laterali del protocerebro si trovano fisicamente all'interno dei gambi oculari nelle specie che li hanno, inoltre il protocerebro laterale contiene anche i corpi emielissoidi. La seconda regione è il deutocerebro, la quale riceve informazioni dal primo gruppo di antenne. Queste informazioni comprendono l'informazione olfattiva, che viene convertita nei lobi olfattivi del deutocerebro, così come l'informazione chimicosensoriale e meccanosensoriale. Un grande gruppo di neuroni connette il deutocerebro con il protocerebro e include il tratto globulare olfattivo. Il deutocerebro include anche lobi accessori, i quali, in alcuni decapodi, aiutano ad integrare l'informazione tattile e olfattiva con l'informazione visiva del protocerebro (Sanderman et al., 1995). La terza regione, perlopiù ventrale, è il tritocerebro, che elabora le informazioni chimiche e meccaniche dal secondo paio di antenne (*antennules*), dall'apparato boccale e dal resto del corpo. L'informazione meccanorecettiva dal trito cerebro viene trasmessa al deutocerebro e alcuni neuroni con i loro corpi cellulari nel tritocerebro si estendono fino al protocerebro laterale (revisione di Sanderman et al., 2014).

Secondo Birch et al. (2021) la struttura cerebrale dei crostacei ha la capacità di integrare informazioni di diverso tipo, in parte grazie all'esteso collegamento di queste tre regioni cerebrali attraverso i percorsi e i punti del complesso centrale (Utting et al., 2000). In più, alcune strutture specifiche sono note anche per l'integrazione dell'informazione, con il corpo emielissoide che rappresenta il centro di integrazione meglio compreso. Sono state raccolte prove del fatto che i corpi emielissoidi sono omologhi ai corpi dei funghi degli insetti, che sono noti anche per avere funzioni di integrazione (Brown & Wolff, 2012; Sayre & Strausfeld, 2019). Per esempio, un ampio studio di Strausfeld et al. (2020), su diciannove decapodi (e uno stomatopode) ha trovato che una proteina nei corpi emielissoidi giocherebbe un ruolo cruciale nell'apprendimento e nella memoria nei moscerini della frutta (Skoulakis et al., 1993). Questa rappresenta un'ampia evidenza del fatto che i corpi emielissoidi svolgono un compito nell'integrazione delle informazioni.

Ulteriori evidenze della funzione di elaborazione superiore dei corpi emielissoidi sono state trovate nel granchio *Neohelice granulata* (Maza et al., 2016). Gli autori hanno mostrato che era possibile colorare i corpi emielissoidi con anticorpi contro le proteine associate ai processi di memoria (noti come 'p-CaMKII- α '), e con anticorpi contro una proteina diversa ('5-bromo-2'-deossipuridina, o 'BrdU') prodotta dalle cellule proliferanti (la produzione di nuove cellule cerebrali è un meccanismo che sta alla base dell'apprendimento e della memoria). Hanno anche presentato ai granchi uno stimolo visivo "minaccioso" ripetuto, che inizialmente li ha indotti a cercare di scappare e ha causato un'attività di risposta (una cascata di calcio) nei corpi emielissoidi, mentre i granchi hanno gradualmente smesso di rispondere allo stimolo ripetuto. Dopo un breve intervallo, Maza et al. (2016) ha nuovamente mostrato ai granchi lo stimolo, anche quando i granchi si trovavano nello stesso luogo di prima, o quando c'era un background visivo differente. I granchi con il background familiare continuavano a ignorare la cascata, ma quelli con il background nuovo reagivano con un comportamento rinnovato e con attività emielissoide. Gli autori, dunque, concludono che i corpi emielissoidi hanno un ruolo nell'apprendimento e nella memoria (Maza et al., 2016), sebbene, secondo Birch et al. (2021), il tipo di apprendimento citato era probabilmente abitudine e non apprendimento associativo. Un meccanismo attraverso il quale i corpi emielissoidi dei decapodi possono integrare le informazioni comprende gli interneuroni, conosciuti come "celle parasole". Queste sono localizzate all'interno del corpo emielissoide e possono integrare l'informazione sensoriale

attraverso diverse modalità, con la capacità di amplificare i segnali (DeForest Mellon, 2003), e possono giocare un ruolo nei processi decisionali e nella prioritizzazione. Senza stimolazione, le cellule evidenziano impulsi di attività sincronizzati e consistenti. Nel gambero, le singole cellule possono ricevere informazioni sull'odore da parte del lobo olfattivo, informazioni visive dal ganglio ottico, oppure informazioni tattili, olfattive e visive dal lobo accessorio. Quando un forte stimolo attiva una cella parasole, c'è un'esplosione di attività potenziata in quella cellula e nelle cellule vicine, anche se quelle vicine non hanno ricevuto l'input dello stimolo originario (DeForest Mellon, 2013). Questa attività a livello di comunità cellulare può consentire l'amplificazione di segnali importanti, permettendo di dare priorità ad informazioni importanti. Secondo Birch et al. (2021), meccanismi neurali come questo potrebbero permettere la percezione, l'apprendimento e il decision-making dell'intero organismo rispetto a potenziali danni.

Alcuni decapodi hanno corpi emielissoidi più sviluppati di altri: su diciannove decapodi studiati, i gruppi con i corpi emielissoidi più grandi erano i granchi veri (*Brachyura*) seguiti dai granchi anomurani (*Anomura*), e successivamente da diversi gamberi dell'infraordine Caridea: gamberi della barriera corallina (*Alpheidae* e *Thoridae*) (Strausfeld et al., 2020) e gamberi idrotermali (esemplificati da *Rimicaris exoculata*) (Machon et al., 2019).

Per quanto riguarda invece le specie di decapodi con corpi emielissoidi relativamente ridotti (come il gambero di fiume e l'aragosta), questi potrebbero, secondo Birch et al. (2021), integrare le informazioni utilizzando una parte diversa del cervello: il lobo accessorio del deutocerebro è relativamente grande negli astacidi, e può integrare informazioni multisensoriali (Sandeman et al., 2014). Nel gambero di acqua dolce australiano (*Cherax destructor*), i lobi accessori relativamente grandi ricevono input da interneuroni deutocerebrali, che trasmettono l'informazione visiva e tattile dai corpi emielissoidi nel protocerebro, così come le informazioni olfattive o altri tipi di informazione sono trasmesse dal deuto- e tritocerebro (Sanderman et al., 1995). Il lobo accessorio a questo punto proietta nuovamente l'informazione indietro al protocerebro. In modo analogo, lobi accessori grandi e ben connessi sono stati trovati nell'aragosta spinata (*Panulirus argus*, infraordine Achelata) (Wachowiak et al., 1996), nei gamberi d'acqua dolce (*Procambarus clarkii* e *Orconectes rusticus*) e nell'aragosta americana (*Homarus americanus*).

La combinazione di corpi emiellissoidi relativamente piccoli e lobi accessori più grandi negli astacidi è in contrasto con le scoperte avvenute con altri decapodi, come il granchio cocco (*Birgus latro*, infraordine Anomura), il quale ha un lobo accessorio estremamente piccolo che è apparentemente poco connesso con il resto del cervello, nonostante il suo corpo emiellissoide sia molto grande (Krieger et al., 2010). È possibile che l'integrazione dell'informazione possa avvenire sia primariamente nel lobo accessorio, come nei gamberi di fiume e nelle aragoste, sia primariamente nei corpi emiellissoidi, come avviene nei granchi e in alcune specie di gamberetti (Sanderman et al., 2014).

In sintesi, i decapodi possiedono cervelli che integrano informazioni da diverse fonti sensoriali: il complesso centrale, i corpi emiellissoidi e i lobi accessori hanno funzioni di integrazione. I granchi veri (infraordine Brachyura) e i granchi anomurani (Anomura) sembrano avere proporzionalmente i più grandi e più sviluppati corpi emiellissoidi di tutti i decapodi studiati fino ad ora, seguiti dai gamberi caridei (Caridea). Le aragoste e i gamberi di fiume (Astacidea, Achelata) hanno corpi emiellissoidi relativamente piccoli, ma integrano le informazioni utilizzando lobi accessori relativamente allargati. Per concludere, Birch et al. (2021) ha concluso un livello di confidenza molto alto per il fatto che il criterio due possa essere soddisfatto dal granchio vero (infraordine Brachyura), dal granchio anomurano (Anomura), dalle aragoste e dai gamberi di fiume (Astacidea, Achelata) e dai gamberi caridei (Caridea), mentre per essere soddisfatto da altri infraordini dei decapodi questi dovrebbero essere studiati più in dettaglio.

3.3 Criterio tre: l'animale possiede percorsi neurali che connettono i nocicettori alle regioni cerebrali di integrazione

Il sistema nervoso è organizzato in modo diverso in specie allungate come le aragoste e i gamberi, rispetto a specie più compatte come i granchi. Nelle specie allungate il cervello è connesso al cordone nervoso ventrale (*ventral nerve cord*), il quale corre per tutta la lunghezza del corpo. Ogni segmento del corpo contiene un ganglio, e il cordone nervoso li connette insieme, convergendo le informazioni dal e al cervello. Nei decapodi dal corpo compatto, i gangli segmentali non sono disposti linearmente lungo un cordone nervoso, ma formano invece

un'unica massa, il ganglio toracico (Ruppert & Barnes, 1994; Smarandache-Wellmann, 2016). Secondo Birch et al. questo punto fa la differenza nell'adoperare metodi di macellazione appropriati.

Come riportato sotto al criterio due, i recettori sensoriali dei decapodi sono generalmente connessi alle regioni cerebrali di integrazione (Sanderman et al., 2014). Questo rende plausibile il fatto che i nocicettori siano anch'essi connessi. Quello che manca nel caso dei decapodi è l'evidenza neurologica di percorsi specifici che si applicano per trasmettere l'informazione nocicettiva.

Secondo Birch et al. (2021) il problema è rappresentato dalla mancanza di evidenze di alta qualità per una tesi o per l'altra: non vi è quindi evidenza contro la connessione dei nocicettori alle regioni cerebrali di integrazione e rimane quindi plausibile che questa connessione sia presente.

Percorsi neurali connettono altri recettori sensoriali alle regioni cerebrali di integrazione nei decapodi; per Birch et al. (2021) è dunque plausibile che i nocicettori siano connessi alle stesse regioni cerebrali, anche se non sono state trovate evidenze che soddisfino nello specifico il criterio tre. È stato concluso, per questo motivo, solo un basso livello di confidenza per il fatto che i decapodi soddisfino il criterio tre.

3.4 Criterio quattro: la risposta comportamentale dell'animale ad uno stimolo nocivo è modulata da composti chimici con un effetto sul sistema nervoso in uno o entrambi i seguenti modi: (a) l'animale possiede un sistema di neurotrasmettitori endogeni che modula (in modo coerente con l'esperienza di dolore, angoscia o danno) le risposte a stimoli nocivi di minaccia o effettivi; (b) anestetici locali presunti, analgesici (come gli oppioidi), ansiolitici o antidepressivi modificano le risposte di un animale ad uno stimolo nocivo di minaccia o effettivo in modo coerente con l'ipotesi che questi composti attenuino l'esperienza di dolore, angoscia o danno.

Il fatto che i crostacei decapodi abbiano sistemi di neurotrasmettitori endogeni, inclusi sistemi endogeni oppioidi, serotoninergici, dopaminergici e octopaminergici è un chiaro punto di consenso scientifico (vedi Harlioglu et al., 2020 per una rassegna recente).

L'interesse di Birch et al. (2021) si è focalizzato quindi sul ruolo di questi sistemi nel modulare le risposte a stimoli nocivi minacciosi o effettivi. Sono stati in questo caso considerati i criteri quattro (a, b) insieme, dacché molti degli stessi studi affrontano nello specifico sia i trasmettitori endogeni che i farmaci che producono gli effetti di questi neurotrasmettitori. I primi decapodi presi in considerazione sono i granchi veri (infraordine Brachyura), per i quali c'è il più grande corpo di evidenze, per poi proseguire con gli altri decapodi.

Granchi veri (infraordine Brachyura). In una serie di esperimenti degli anni '80 e '90, Hector Maldonado e i suoi colleghi dell'Università di Buenos Aires hanno analizzato gli effetti degli oppioidi sulle risposte a stimoli nocivi e al danno nel granchio *Neohelice granulatus* (*Chasmagnathus granulatus*). Valeggia et al. (1989) e Romano et al. (1990) hanno analizzato le risposte di fuga ad uno "stimolo di pericolo", un'ombra che passava sopra la testa: hanno trovato che con un'iniezione di naloxone, un farmaco che blocca gli effetti degli oppioidi, veniva bloccata l'abituazione allo stimolo di pericolo nei granchi, favorendo l'ipotesi secondo cui gli oppioidi endogeni avrebbero un ruolo nel produrre l'abituazione. Lozada et al. (1988) ha analizzato le risposte di difesa (il granchio allunga le chele e si solleva sulle zampe) a scosse elettriche. Ha così scoperto che aumentando la dose di morfina che riceveva il granchio, venivano chiaramente inibite le sue risposte difensive alle scosse elettriche. Maldonado et al. (1989) ha cercato di capire se iniettando morfina sarebbero state ridotte le risposte di fuga allo stimolo di pericolo, e anche qui si è scoperto che aumentando la dose di morfina veniva inibita la reattività. In entrambi gli studi l'effetto non era più presente dal momento in cui veniva somministrato il naloxone. Risultati simili sono stati ottenuti utilizzando un analogo sintetico dell'oppioide met-enkefalina al posto della morfina (Godoy & Maldonado, 1995). A seguito di questi risultati, Birch et al. (2021) si sono chiesti se gli oppioidi lavorassero attenuando uno stato aversivo (di dolore o di paura) oppure inibendo generalmente la reattività allo stimolo. Tomsic & Maldonado (1991) hanno indagato se la morfina producesse una compromissione generale della capacità motoria non correlata alle risposte al pericolo, e non hanno trovato prove di questo nei due gruppi da venti granchi ciascuno testati, rispetto ai controlli a cui era stata iniettata una soluzione fisiologica. Tomsic et al (1991) ha poi confrontato gli effetti della morfina con gli effetti di un neurotrasmettitore conosciuto per la sua capacità di

compromettere le risposte motorie, l'acido gamma-aminobutirrico, o GABA. Hanno scoperto che, sebbene sia il GABA che la morfina compromettano la reattività, solo la morfina compromette l'abitudine a lungo termine allo stimolo di pericolo. Questi risultati possono però essere messi in discussione se si analizzano alcuni risultati diversi di Barr & Elwood (2011). Barr ed Elwood hanno analizzato gli effetti degli oppioidi sulla risposta a scosse elettriche nel granchio di riva *Carcinus maenas*. I granchi venivano sistemati in una zona luminosa vicino ad un riparo scuro. La loro avversione alla luce li motivava a entrare nel riparo, ma ogni tanto ricevevano una scossa elettrica entrando. Barr ed Elwood si sono chiesti: "Se somministrassimo la morfina, i granchi entrerebbero con più probabilità nel riparo, nonostante il rischio della scossa?" Quello che hanno trovato è che la morfina rendeva i granchi in qualche modo meno pronti ad entrare nel riparo, probabilmente a causa di una riduzione generale della reattività. I granchi a cui veniva iniettata morfina "Sembravano flosci e non potevano muovere le loro appendici in modo normale" (2011, p.342), un'evidenza in contrasto con Tomsic & Maldonado (1991). Un'ipotesi verterebbe sull'idea che ci siano delle differenze nella risposta agli oppioidi tra diverse specie di granchi. Vale però la pena notare che Tomsic et al. (1993) ha cercato di replicare i risultati riguardanti la morfina ed il naloxone con un'altra specie di granchio, *Pachygrapsus marmoratus*, senza successo.

Gli oppioidi medierebbero dunque le risposte a stimoli nocivi sia nel *Neohelice granulatus* che nel *Carcinus maenas*, e il modo in cui lo farebbero sarebbe coerente con l'ipotesi che gli oppioidi attenuino le esperienze aversive, ma sarebbe altresì (secondo le prove attuali) coerente con l'ipotesi che gli oppioidi producano una riduzione generale della reattività. Birch et al. (2021) ci tiene a chiarire che prove di questo tipo non sono prove conclusive, ma nessuna singola prova considerata isolatamente potrebbe risolvere la questione: la variazione tra le specie di granchi veri nelle loro risposte agli oppioidi rimane dunque poco compresa.

C'è una piccola quantità di prove sugli effetti di droghe diverse dagli oppioidi sulle risposte alla minaccia nei granchi veri. Quando il laboratorio di Maldonado ha somministrato serotonina al *Neohelice granulatus* al posto di oppioidi, i granchi hanno mostrato sensibilizzazione allo stimolo di pericolo, in linea con l'ipotesi che la serotonina produca uno stato ansioso (Aggio et al., 1996). Hamilton et al. (2016) ha trovato prove che la somministrazione di fluoxetina, un inibitore selettivo della ricaptazione della serotonina (antidepressivo), ha rimosso la preferenza per le aree scure rispetto alle aree chiare nel granchio striato *Pachygrapsus crassipes*. In

combinazione con l'evidenza nei gamberi (vedi sotto), c'è una forte argomentazione a favore dell'ipotesi che la serotonina moduli le risposte a stimoli minacciosi e avversivi nei decapodi. Kaczer & Maldonado (2009) hanno poi trovato prove di un ruolo dell'octopamina, spesso considerata l'analogo per gli invertebrati della noradrenalina (norepinefrina), nel migliorare l'apprendimento appetitivo (basato sulla ricompensa) e nel ridurre l'apprendimento avversivo nel *Neohelice granulatus*, in modo coerente con l'ipotesi che questa faciliti le esperienze di ricompensa e attenui le esperienze avversive (vedi anche Kaczer et al., 2011). Klappenbach et al. (2012) ha trovato prove che la dopamina svolge approssimativamente il ruolo opposto dell'octopamina, migliorando l'apprendimento avversivo e compromettendo l'apprendimento appetitivo nel *Neohelice granulatus*, in modo coerente con l'ipotesi che questa faciliti le esperienze avversive e attenui quelle attraenti. Questo ruolo della dopamina differisce dal suo ruolo nel cervello dei vertebrati, ma è in linea con le prove che esistono per altri gruppi tassonomici di invertebrati, come gli insetti.

Altri decapodi. L'ablazione del gambo oculare è una pratica controversa nell'acquacoltura di gamberi. Il processo prevede la cauterizzazione o il taglio di uno o entrambi i gambi oculari di una femmina matura di gambero in riproduzione per indurre la produzione di uova. Due studi hanno esaminato gli effetti neurofisiologici dell'ablazione del gambo oculare nei gamberi. Taylor et al. (2004) ha applicato l'anestetico topico lidocaina (marchio Xylocaine) prima dell'ablazione del gambo curare nel gambero dalla zampa bianca, osservando che il comportamento di nuoto del gambero (*Litopenaeus vannamei*) che aveva ricevuto l'anestetico era molto meno irregolare, con molte meno spirali, rispetto al comportamento di nuoto di gamberi che non avevano ricevuto l'anestetico. In uno studio simile, Diarte-Plata et al. (2012) ha applicato la lidocaina prima dell'ablazione del gambo oculare nel gambero *Macrobrachium americanum*, riscontrando una riduzione significativa dello sfarfallio della coda. Quello che non è chiaro a Birch et al. (2021), è se l'anestetico stesse attenuando uno stato di valenza o semplicemente inibendo la reattività. Per gli studiosi l'evidenza attuale, sebbene compatibile con la prima possibilità, lascerebbe ancora spazio al dubbio.

Barr et al. (2008) ha analizzato il comportamento di auto-pulizia e sfregamento nei gamberi (*Palaemon elegans*) in risposta a delle sostanze chimiche applicate sulle antenne. Si è scoperto che applicando acido idrocloridico (HCl) o idrossido di sodio (NaOH) su un'antenna, era

possibile indurre comportamenti di auto-pulizia e sfregamento diretti a quell'antenna. I ricercatori hanno anche riscontrato, inaspettatamente, che l'anestetico locale benzocaina attivava anch'esso il comportamento di auto-pulizia. L'anestetico attivava anche lo sfarfallio della coda, un comportamento difensivo, in trentasette dei settantadue animali (in confronto alla risposta di zero su settantadue gamberi quando veniva applicata acqua di mare), suggerendo che l'anestetico fosse fortemente avversivo per gli animali. Quando agli animali su cui era stata applicata la benzocaina veniva dato HCl o NaOH, questi erano con meno probabilità portati a mostrare lo sfarfallio della coda o il comportamento di auto-pulizia, rispetto al gruppo di controllo che aveva ricevuto acqua di mare al posto della benzocaina. Secondo Birch et al. (2021) questo potrebbe essere dovuto ad un effetto dell'anestetico, ma potrebbe essere causato anche dall'esaurimento dell'energia in seguito ad una reazione avversa alla benzocaina.

Un tentativo di replica da parte di Puri & Faulkes (2010), che ha coinvolto altre tre specie di decapodi, ovvero il gambero bianco (*Litopenaeus setiferus*), il gambero d'erba (*Palamonetes sp.*) e il gambero rosso della Louisiana (*Procambarus clarkii*), ha fallito nel registrare qualsiasi comportamento di auto-pulizia o di sfregamento in risposta ad un PH estremo.

In uno studio di alto profilo pubblicato nella rivista *Science*, Fossat et al. (2014) ha analizzato i comportamenti "ansiosi" nei gamberi di fiume (*Procambarus clarkii*, infraordine Astacidea). I gamberi venivano posizionati in un labirinto nel quale erano liberi di esplorare zone di luce e di ombra. Quando dei campi elettrici venivano utilizzati per indurre stress fisiologico nell'animale, questi diventavano meno volenterosi ad entrare nelle zone di luce e si è visto che l'effetto veniva mediato dalla serotonina endogena. I cervelli degli animali stressati contenevano livelli significativamente più alti di serotonina rispetto ai cervelli degli animali non stressati, come misurato da un tipo di cromatografia. Per di più, iniettando agli animali non stressati serotonina (esogena), veniva indotto un comportamento di evitamento della luce significativamente maggiore rispetto a quello riscontrato nel gruppo di controllo a cui era stata iniettata una sostanza salina. Somministrando un ansiolitico comune (antiansia), il chlordiazepoxide, si è riscontrata una ristabilizzazione della volontà di esplorare i bracci luminosi nei gamberi stressati, rispetto al gruppo di controllo a cui era stata iniettata la soluzione salina. Uno studio di *follow-up* (Fossat et al., 2015) ha mostrato una correlazione positiva tra la quantità di serotonina nel cervello e il grado di evitamento della luce, e ha mostrato inoltre che la

somministrazione di chlordiazepoxide eliminava il comportamento di evitamento della luce. Il campione utilizzato in questi studi era molto ampio (duecentosessantasette gamberi in Fossat et al., 2014; centotrenta in Fossat et al., 2015), ed un basso valore del p-value permette di considerare i risultati affidabili.

Un altro studio dello stesso laboratorio (Bacqué-Cazenave et al., 2017), nel quale il comportamento di evitamento della luce è stato indotto a partire da un'aggressione di un altro animale, ha portato a simili risultati: gli animali stressati avevano livelli significativamente più alti di serotonina nel cervello e mostravano un evitamento della luce significativamente maggiore; l'effetto veniva ancora una volta eliminato somministrando chlordiazepoxide. Uno studio di Perrot-Minnot et al. (2017) ha trovato risultati coerenti in un crostaceo anfipode. Sebbene gli anfipodi non siano decapodi, ciò fornisce supporto all'ipotesi che i meccanismi coinvolti non siano diversi da quelli che avvengono nei gamberi. In sintesi, secondo Birch et al. (2021), questa sarebbe una prova di alta qualità del fatto che la serotonina regoli i comportamenti di evitamento della luce indotti da stress fisiologico nei gamberi, e che questi possano essere modulati dai farmaci ansiolitici.

Quello che Birch et al. (2021) riporta, in sintesi, è che i crostacei decapodi possiedono dei sistemi di neurotrasmettitori endogeni, compresi sistemi endogeni oppioidi, serotoninergici, dopaminergici e octopaminergici. Nei granchi veri (infraordine Brachyura), gli oppioidi mediano la reattività a stimoli minacciosi e a scosse elettriche. Questo rafforza, secondo gli autori, l'idea che gli oppioidi attenuino le esperienze avverse e che producano una riduzione generale della reattività. C'è inoltre evidenza di un ruolo della dopamina e dell'octopamina nella mediazione dell'apprendimento a partire da stimoli avversi e attraenti (rispettivamente). Sia nei granchi veri che negli astacidi, esiste l'evidenza del fatto che la serotonina medi le risposte allo stress, e che i farmaci antidepressivi o ansiolitici possano essere utilizzati per modulare la risposta. C'è evidenza anche del fatto che la lidocaina (anestetico topico) moduli le risposte a lesioni nei gamberi caridei e penaidi (Caridea, Penaeidae). Birch et al. (2021) ha dunque un livello di confidenza molto alto per il fatto che il criterio quattro sia soddisfatto dai granchi veri (infraordine Brachyura) e dai gamberi/aragoste astacidi (Astacidea), mentre ha un livello di confidenza medio per il fatto che lo stesso criterio sia soddisfatto per quanto riguarda il gambero caridiano (Caridea) e per il gambero penaidiano (famiglia Penaeidae). Per gli altri

gruppi tassonomici non esistono prove sufficienti che permettano Birch et al. (2021) di avere un livello di confidenza medio, alto o molto alto.

3.5 Criterio cinque: l'animale è soggetto a compromessi motivazionali nei quali la svalutazione di uno stimolo nocivo o di minaccia viene confrontata con il valore di un'opportunità di guadagno, esitando in un processo decisionale flessibile. Deve essere dimostrata la presenza di sufficiente flessibilità per indicare un processo informativo centralizzato e integrato che coinvolga una modalità di valutazione comune.

Quello che Birch et al. (2021) ha voluto cercare in riferimento a questo punto, è una forte evidenza del fatto che l'animale sia motivato da evitare uno stimolo nocivo, e che questa motivazione sia messa a confronto con altre motivazioni attraverso dei processi decisionali flessibili.

Secondo Birch et al. (2021), il lavoro del laboratorio di Elwood presso la Queen's University di Belfast che coinvolge i paguri (*Pagurus bernhardus*) è particolarmente rilevante per questo criterio: i paguri vivono in conchiglie prodotte da altri animali, preferiscono alcuni tipi di conchiglia ad altri e potendo scegliere scambiano una conchiglia di bassa qualità con una di alta qualità (Elwood et al., 1979; Elwood, 1995). Questa rappresenta di per sé una forma di processo decisionale flessibile (paragonabile, ad esempio, alla capacità degli sciami d'ape di scegliere un sito per nidificare; Seeley, 2010), ma non dimostra che la motivazione ad evitare uno stimolo nocivo sia un fattore preso in considerazione per le decisioni degli animali. Per esplorare questa possibilità, Appel & Elwood (2009a) si sono chiesti: *“Se ai granchi vengono somministrate scosse elettriche quando sono nei gusci, lasceranno i loro gusci indipendentemente dalla qualità del guscio, o saranno più riluttanti a lasciare un guscio di alta qualità rispetto ad uno di bassa qualità?”* Hanno così confrontato la tensione elettrica media richiesta per indurre un granchio a lasciare un guscio di alta qualità (Littorina) con la tensione elettrica media richiesta per indurre un granchio a lasciare un guscio di bassa qualità (Gibbula). Hanno trovato che *“I granchi eremiti nelle conchiglie Littorina lasciavano i gusci ad un voltaggio significativamente più alto rispetto a quelli nelle conchiglie Gibbula”* (Appel & Elwood, 2009a). Il voltaggio medio richiesto per

indurre un granchio a lasciare una conchiglia Littorina era di 17.7 V, rispetto ai 15.0 V necessari per la Gibbula.

Ad ogni modo, secondo Birch et al. (2021) alcune note di cautela sono necessarie rispetto alla significatività statistica del risultato. Il p-value riportato era $P = 0.0465$ (Appel & Elwood, 2009a, p.122). Questo livello di significatività è stato concluso con il test U ad una coda di Mann-Whitney. Questo significa che assumendo l'ipotesi nulla di nessun effetto della qualità della conchiglia sulla media del voltaggio per l'evacuazione, c'era una probabilità del 4,65% che i risultati mostrassero una differenza di questa grandezza e direzione. È più comune usare test statistici a due code, ed un test a due code in questo caso avrebbe dato un p-value di $P = 0.093$: questo non verrebbe comunemente considerato un risultato significativo.

In uno studio a parte nel quale Elwood & Appel (2009) hanno utilizzato un voltaggio costante di 8V, è stato trovato che i granchi erano maggiormente motivati a lasciare le conchiglie Gibbula di bassa qualità (otto su ventidue granchi evacuati) rispetto alle conchiglie Littorina di alta qualità (quattro su trentatre evacuati). Il p-value In questo caso era di $P = 0.047$ (test esatto di Fisher). Anche qui una nota di cautela è necessaria perché il risultato è solo appena statisticamente significativo.

Magee & Elwood (2016a) notano un'ulteriore limitazione dell'approccio appena considerato: i gusci di Gibbula e Littorina differiscono nella forma, ed è impossibile essere sicuri che la forma non influisca sulla trasmissione di scosse elettriche al granchio. Scrivono: *“È possibile che i fili fissati alle spirali interne dei gusci per erogare lo shock abbiano fatto un contatto più stretto con l'addome del granchio quando si trovavano nei gusci di Gibbula rispetto ai gusci di Littorina e quindi l'effetto della scossa potrebbe essere stato fisicamente maggiore nelle conchiglie di Gibbula”* (Magee & Elwood, 2016a, p. 32). Ciò ha portato Magee & Elwood (2016a) a provare un approccio diverso; si sono chiesti: *“I granchi eremiti darebbero più valore all'evitamento dello shock o all'evitamento dei predatori? È quindi meno probabile che lascino un guscio, quando ricevono una scossa elettrica, se l'acqua circostante contiene l'odore di un predatore (un granchio costiero)?”* Gli autori non hanno però trovato alcuna differenza nel voltaggio medio di evacuazione tra i granchi esposti a questo odore e i granchi che non lo erano. Secondo Birch et al. (2021), questa potrebbe essere considerata una replica concettuale fallita (ma non diretta) di Appel & Elwood (2009a). Ciò che hanno scoperto, tuttavia, è che i granchi esposti all'odore di un predatore avevano una probabilità sostanzialmente maggiore di rimanere nei loro gusci,

anche se ricevevano una scossa di 25V, rispetto a quelli non esposti all'odore. Curiosamente, questo effetto veniva prodotto anche da un odore forte e non diluito di una potenziale fonte di cibo (una cozza) (Magee & Elwood, 2016a). In questo caso i p-value supportano in modo convincente un effetto dell'odore sull'evacuazione del guscio.

Secondo Birch et al. (2021), i risultati evidenziano che le decisioni rispetto all'evacuazione della conchiglia sono modulate dall'odore, ma non dimostrano in modo convincente un confronto tra la valorizzazione dell'evitamento della scossa elettrica e quella dell'evitamento del predatore, per due ragioni principali: l'osservazione di un effetto anche quando l'odore non era quello di un predatore, e il fallimento nel cercare un compromesso motivazionale tra il voltaggio della scossa e la concentrazione dell'odore.

Anche lo studio di Fossat e colleghi (2014) sul comportamento “ansioso” nei gamberi di fiume (*Procambarus clarkii*), menzionato in relazione al criterio quattro, è rilevante in questo contesto: come spiegato sopra, i gamberi sono stati posti in un labirinto in cui erano liberi di esplorare sia le braccia chiare che quelle scure. Quando i campi elettrici sono stati utilizzati per indurre stress fisiologico negli animali, sono diventati sostanzialmente meno disposti a entrare nelle braccia più chiare. Secondo Birch et al. (2021), questo effetto è certo e non porta a dubbi sulla significatività statistica dei risultati: lo studio mostra che il processo decisionale nei gamberi di fiume dipende dallo stress, e che la dipendenza è mediata dalla serotonina. L'effetto dello stress sul comportamento è stato replicato in studi di *follow-up* (Fossat et al., 2015; Bacqué- Cazenave et al., 2017). Un risultato simile è stato ottenuto nell'anfipode *Gammarus fossarum* (non un decapode) da Perrot-Minnot et al. (2017). Per Birch et al. (2021) ciò mostra che la tolleranza dell'animale nei confronti di una minaccia (esposizione alla luce) dipende dal suo stato interno. Un fenomeno in qualche modo simile è stato osservato nel verme nematode *Caenorhabditis elegans*, che mostra una maggiore tolleranza alle minacce quando ha fame (Ghosh et al., 2016). Sappiamo, grazie al caso del *Procambarus clarkii*, che questo può essere ottenuto attraverso un semplice meccanismo attraverso cui la fame inibisce il rilevamento delle minacce (Ghosh et al., 2016). I risultati di Fossat et al. (2014) potrebbero essere spiegati, secondo Birch et al. (2021), da un meccanismo simile in cui lo stress fisiologico aumenterebbe la sensibilità alla minaccia, piuttosto che da un sistema decisionale che soppesi tra di loro esigenze diverse, quindi, anche se questa sembrerebbe una prova convincente rispetto al criterio quattro, non lo è rispetto al criterio cinque.

Per concludere, ci sono evidenze di alta qualità per il fatto che le risposte a scosse elettriche nei granchi eremiti (infraordine Anomura) siano modulate dall'odore. C'è inoltre evidenza del fatto che le risposte dei granchi eremiti alle scosse elettriche siano modulate dalla qualità della conchiglia, ma questa evidenza è meno affidabile, perché i risultati chiave sono solo appena statisticamente significativi. C'è inoltre evidenza di alta qualità per il fatto che la tolleranza alla minaccia nei gamberi dipenda dallo stress fisiologico, ma questo tipo di sensibilità non rappresenta un'evidenza di processi decisionali centralizzati che pesino tra loro diversi tipi di bisogni. Birch et al. (2021) ha dunque concluso un livello di confidenza medio rispetto al fatto che dei compromessi motivazionali siano presenti nei granchi anomurani (infraordine Anomura).

3.6 Criterio sei: l'animale mostra un comportamento flessibile e auto-protettivo (curarsi le ferite, stare in guardia, pulirsi, sfregare la zona lesa) che fa presumere la capacità di rappresentarsi e localizzare fisicamente lo stimolo nocivo.

Anche per questo criterio, Birch et al. (2021) ha cercato una forte evidenza di comportamenti auto-protettivi che andassero oltre i riflessi: per andare incontro a questi criteri l'animale dovrebbe essere in grado di variare le sue risposte in modo mirato, in accordo con il luogo nel corpo in cui lo stimolo nocivo si trova.

Elwood et al. (2017) ha mostrato che l'applicazione di acido acetico nell'apparato boccale dei granchi di riva (*Carcinus maenas*) faceva sì che i granchi muovessero le parti della loro bocca, che graffiassero la bocca con i loro becchi e che cercassero di scappare significativamente di più rispetto al gruppo di controllo. Questi effetti erano chiari, senza dubbio con un buon livello di significatività statistica. Quando l'acido veniva applicato sugli occhi venivano riscontrate le stesse risposte, con la retrazione dell'occhio danneggiato per un periodo più lungo rispetto al gruppo di controllo. Secondo Birch et al. (2021), questo dimostra che i granchi di riva, quando viene loro presentato uno stimolo nocivo sulla bocca, possono dirigere i comportamenti verso

la bocca, anche se non viene mostrata l'abilità di discriminare la risposta in modo flessibile in diverse parti del corpo.

McCambridge et al. (2016) ha confrontato i granchi edibili (*Cancer pagurus*) a cui era stata manualmente tolta una chela, con i granchi in cui era stata indotta l'autotomia (auto-rimozione) di una chela: hanno scoperto che i granchi a cui era stata tolta manualmente una chela avevano una probabilità significativamente maggiore di toccare la ferita con la chela rimanente o con le zampe anteriori (McCambridge et al., 2016, p. 1041). Secondo Birch et al. (2021), questa è una prova di un comportamento di cura della ferita. Gli autori aggiungono che *“Sebbene non faccia parte del protocollo registrato, un certo numero di granchi a cui era stata manualmente tolta una chela ha mostrato una risposta di ‘brivido’ quando si toccava la ferita”* (McCambridge et al., 2016, p. 1042). Hanno poi aggiunto che *“Alcuni granchi a cui era stata manualmente tolta una chela facevano da scudo alla ferita, posizionando la chela rimanente davanti all'area ferita”* (McCambridge et al., 2016, p. 1042).

Dyuizen et al. (2012) ha iniettato formalina nelle chele dei granchi di riva (*Hemigrapsus sanguineus*) per studiare gli effetti dell'ossido nitrico. Ha osservato che lo strofinamento attivo della chela con l'altra chela era molto più comune rispetto che nei granchi che avevano ricevuto l'iniezione con la soluzione salina (Mann-Whitney U-test, $P < 0.0001$). Ha anche osservato che nei tre minuti dopo l'iniezione i granchi a cui era stata iniettata la formalina preferivano fortemente utilizzare la chela non danneggiata quando camminavano. La chela non danneggiata toccava il terreno approssimativamente quattro volte più spesso rispetto alla chela danneggiata. I ricercatori hanno anche osservato che i granchi feriti *“Sembravano premere le chele danneggiate più vicine al carapace rispetto alla chela intatta fino alla fine dell'esperimento”* (Dyuizen et al., 2012, p. 2670), ma rispetto a questo non è stato collezionato materiale quantitativo.

Un altro studio sui granchi di riva (*Hemigrapsus sanguineus*) di Kotsyuba et al. (2010), che ha utilizzato anch'esso un'iniezione di formaldeide, ha riportato che *“I granchi di controllo e quelli sperimentali hanno mostrato una netta diminuzione dell'attività generale nei tre-cinque secondi dopo l'iniezione: sono arrivati ad un punto morto premendo la chela danneggiata contro il carapace. I granchi dei gruppi sperimentali (iniezione di formaldeide) erano poi iperattivi per tutto il periodo dell'osservazione; hanno compiuto molti movimenti piegandosi, allungandosi e scuotendo le chele ferite”* (Kotsyuba et al., 2010, p. 203). Non sono stati registrati dati

quantitativi su questi comportamenti e i comportamenti osservati non sono esattamente gli stessi di quelli riportati da Dyuizen et al. (2012), però c'è un importante punto d'incontro: entrambi riportano che i granchi di costa mirano a comportamenti auto-protettivi verso l'arto ferito, piuttosto che proteggere ugualmente tutti gli arti.

Gli esperimenti delle scosse elettriche di Elwood & Appel con i granchi eremiti (*Pagurus bernhardus*) sono stati discussi anche in relazione al criterio cinque: in due di questi studi, Elwood & Appel hanno notato un caso (in ogni studio) di un granchio che strofinava il suo addome dopo una scossa. In un terzo esperimento (Appel & Elwood, 2009b), questo comportamento è stato osservato in trentuno dei sessantuno granchi che avevano lasciato i loro gusci. Questa è un'ulteriore e affidabile prova osservativa di un comportamento auto-protettivo mirato, questa volta nei paguri (*Anomura*). Come notano gli autori, la grande differenza tra gli studi potrebbe essere spiegata dall'uso di una procedura di *shock* più efficace nel terzo studio.

Diarte-Plata et al. (2012), in uno studio discusso in riferimento al criterio quattro, ha indagato le risposte all'ablazione del gambo oculare nel gambero carideo *Macrobrachium americanum*. Per quanto concerne il criterio sei, ha trovato che la maggior parte dei gamberi strofinava il luogo della ferita, nel caso in cui questa fosse scoperta. Pochissimi hanno invece strofinato una ferita che era stata coperta per prevenire il sanguinamento, e la differenza tra questi gruppi era statisticamente significativa. Barr et al. (2008), in un altro studio discusso in riferimento al criterio quattro, ha applicato acido cloridrico e idrossido di sodio su una delle antenne di un'altra specie di gambero caridea, *Palaemon elegans*, trovando delle prove di un comportamento di auto-pulizia e di sfregamento diretto verso l'antenna interessata. Ha inoltre scoperto inaspettatamente che anche l'anestetico benzocaina innescava un comportamento di auto-pulizia. Tuttavia, un tentativo di replica di Pauri & Faulkes (2010), che ha coinvolto altre tre specie di decapodi, il gambero bianco (*Litopenaeus setiferus*), il gambero erbivoro (*Palaemonetes* sp.) e il gambero rosso della Louisiana (*Procambarus clarkii*), non è riuscito a registrare alcun comportamento di auto-pulizia o di sfregamento in risposta ad un PH estremo.

Le evidenze che giungono da questi cinque studi supportano l'ipotesi di Birch et al. (2021) che le specie di granchi veri siano in grado di discriminare comportamenti auto-protettivi nella posizione di uno stimolo nocivo (per esempio becco, bocca, addome): anche se nessuno di

questi studi sarebbe pienamente convincente se preso singolarmente, questi permettono una buona evidenza quando valutati nell'insieme. Ci sono anche rassegne convincenti di comportamenti mirati all'auto-pulizia nei granchi eremiti (*Anomura*), mentre le evidenze di comportamenti auto-protettivi diretti alle antenne nei gamberi sono state contestate. In conclusione, è stato concluso un livello di confidenza molto alto per il fatto che i granchi veri (infraordine *Brachyura*) soddisfino il criterio sei, un livello di confidenza alto per il fatto che i granchi anomurani (*Anomura*) soddisfino lo stesso criterio e un livello di confidenza medio per quanto riguarda i gamberi caridei (*Caridea*).

3.7 Criterio sette: l'animale si mostra in grado di apprendimento associativo con il quale lo stimolo nocivo viene associato ad uno stimolo neutro, e/o vengono apprese attraverso il rinforzo nuove modalità per evitare lo stimolo nocivo. Nota: l'abituazione e la sensibilizzazione non sono sufficienti per raggiungere questo criterio.

Birch et al. (2021) ha cercato per questo criterio la capacità nell'animale di creare associazioni tra stimoli nocivi e stimoli neutri, attraverso, per esempio, l'apprendimento dell'associazione di un particolare luogo, oppure di un odore neutrale, con uno stimolo nocivo. Birch et al. (2021) ha inoltre cercato l'evidenza del fatto che l'animale sia in grado di apprendere un comportamento nuovo (diverso da una qualsiasi risposta di riflesso preesistente), che gli permettesse di evitare uno stimolo nocivo. Per la discussione rispetto a quali particolari forme di apprendimento associativo possono essere più fortemente indicative di senienza vedere la sezione 2.6.

Granchi veri (infraordine *Brachyura*). Innanzitutto, Birch et al. (2021) ha deciso di esporre qualche evidenza poco convincente: Dunn & Barnes (1981a) hanno, per esempio, affermato di poter dimostrare che i granchi di riva (*Carcinus maenas*) decerebrati, nei quali il cervello veniva separato dal sistema nervoso toracico, potevano ancora imparare a tenere alzata la zampa per evitare le scosse elettriche, utilizzando quindi solo il sistema nervoso toracico (questo dimostrerebbe che l'apprendimento dell'evitamento sarebbe realizzabile senza un cervello). Secondo Birch et al. (2021), questi risultati non si dovrebbero considerare come affidabili, per due ragioni principali: primo, Dunn & Barnes hanno escluso il 40% dei loro dati dall'analisi

perché *“Quando i dati di tutti gli esperimenti venivano inclusi, non emergevano differenze significative tra gli animali sperimentali (P) e quelli di controllo (R)”* (Dunn & Barnes, 1981a, p. 72); in secondo luogo, Dunn & Barnes hanno calcolato venti diversi p-values per i minuti separati dell'esperimento, in modo da ottenerne tre statisticamente significativi (0.04) ed uno sotto lo 0.01 (Dunn & Barnes, 1981A pp. 73-4). Uno studio di *follow-up* (Dunn & Barnes, 1981b.) ha utilizzato una procedura di controllo problematica, e uno studio simile sui granchi fantasma (*Ocypode ceratophthalm*) decerebrati di Hoyle (1976) non ha prodotto un'adeguata analisi statistica: *“Le differenze tra gli individui erano enormi e si dividevano tra chi apprendeva con una sola prova a chi apprendeva in modo completamente irregolare, così grandi da rendere i dati raggruppati (...) di poco significato (...) di conseguenza in questo documento vengono presentati i risultati individuali per gli animali selezionati”* (Hoyle, 1976, p. 151).

In uno studio di Punzo (1983) sull'apprendimento dell'evitamento di scosse elettriche in granchi del fango (*Eurypanopeus depressus*) intatti (non decerebrati), i dieci animali sperimentali sembravano apprendere in modo rapido e affidabile a tenere la loro zampa fuori dall'acqua, e mantenevano questo comportamento dopo un'ora. Ad ogni modo, secondo Birch et al. (2021), le procedure di controllo utilizzate in questo studio non sono descritte chiaramente e rendono difficile distinguere tra gli effetti dovuti dall'apprendimento e quelli dovuti dalla scossa elettrica di per sé.

Altri studi poco convincenti risalgono alla fine degli anni '80, quando Abramson, Feinman e collaboratori hanno indagato l'apprendimento associativo utilizzando il riflesso di retrazione dell'occhio del granchio di riva *Carcinus maenas* (Abramson & Feinman 1987, 1988; Abramson et al., 1988; Feinman et al., 1990). In Abramson & Feinman (1988), una vibrazione al carapace (presumibilmente neutrale) è stata associata con uno sbuffo d'aria diretto all'occhio (presumibilmente avversivo). I granchi sperimentali avevano una probabilità significativamente maggiore di ritrarre l'occhio in risposta ad una sola vibrazione rispetto ai granchi di controllo e la stessa risposta condizionata è stata trovata in una procedura di apprendimento dell'evitamento, nella quale la retrazione dell'occhio ha impedito del tutto il soffio dell'aria (Abramson et al., 1988). Secondo Birch et al. (2021), la vibrazione del carapace (descritta come uno stimolo neutro) potrebbe però essere considerata come avversiva, e i risultati potrebbero essere spiegati a partire dall'effetto di sensibilizzazione di uno stimolo doppiamente avversivo (vibrazione del carapace più soffio d'aria).

Passiamo ora agli studi considerati più positivamente: un gruppo di ricerca guidato da Hector Maldonado presso l'Università di Buenos Aires ha esplorato l'apprendimento associativo nel granchio *Neohelice granulatus*. Nel primo studio, Denti et al. (1988) ha dimostrato che i granchi che ricevevano una scossa elettrica in una camera luminosa avrebbero successivamente impiegato più tempo per entrare in quella camera da una camera scura. In questo studio il p-value preciso non viene dichiarato ($P < 0.05$). È difficile escludere la possibilità che i granchi fisiologicamente stressati abbiano meno probabilità di esplorare una camera illuminata, il che non ha portato ad una dimostrazione convincente di apprendimento dell'evitamento (punto riportato da Magee & Elwood, 2013). Un secondo studio dello stesso laboratorio (Fernandez-Duque et al., 1992) ha cercato di escludere la spiegazione alternativa utilizzando granchi di controllo "aggiogati" che erano rimasti nella camera scura, ma che ricevevano esattamente gli stessi impulsi elettrici dei granchi nella camera illuminata. I granchi colpiti successivamente nella camera luminosa (dopo un intervallo tra le prove di ventiquattro ore) hanno impiegato molto più tempo per entrarvi di nuovo, rispetto al gruppo di controllo. Nel terzo studio, Dimant & Maldonado (1992) hanno ottenuto risultati simili utilizzando del cibo (un rinforzo positivo) al posto delle scosse elettriche (un rinforzo negativo): i granchi che trovavano il cibo nella camera illuminata erano significativamente più veloci nell'entrarvi dopo ventiquattro ore, rispetto al gruppo di controllo che aveva ricevuto la stessa quantità di cibo nella camera scura. Magee & Elwood (2013, p. 354) evidenziano in modo critico che "*Le scosse elettriche aumentano una riluttanza naturale ad entrare nell'area illuminata, ma i risultati potrebbero essere spiegati attraverso un'inibizione della camminata piuttosto che dell'apprendimento*" (p.354). Ad ogni modo, secondo Birch et al. (2021) questo non spiega la differenza tra gli animali sperimentali e il gruppo di controllo nello studio di Fernandez-Duque et al. (1992), o la differenza tra i granchi a cui era stato somministrato cibo nelle diverse camere, nello studio di Dimant & Maldonado (1992). In sintesi, questi studi forniscono una buona evidenza di apprendimento associativo nel *Neohelice granulatus*.

Orlosk et al. (2011) ha tentato di addestrare i granchi costieri (*Carcinus maenas*) ad associare la luce al cibo e a cercare cibo all'interno di un raggio di luce che brillava in una posizione arbitraria: i ricercatori hanno riportato che ventuno granchi su trenta erano stati addestrati con successo, tuttavia, questo studio sembra non aver utilizzato alcun gruppo di controllo, né fatto

alcun tentativo per escludere la spiegazione alternativa secondo cui l'abituazione piuttosto che l'apprendimento associativo fosse responsabile dell'annullamento dell'avversione dei granchi per la luce.

Magee & Elwood (2013) si sono chiesti se i granchi costieri (*Carcinus maenas*) potessero imparare ad evitare un rifugio in cui venivano somministrate scosse elettriche (un rifugio-shock), in una configurazione in cui i granchi dovevano scegliere tra due rifugi: non hanno trovato alcuna prova del fatto che i granchi evitavano il rifugio dopo una scossa elettrica, tuttavia, hanno riscontrato aumenti statisticamente significativi nel numero di granchi che avevano ricevuto la scossa che cambiavano rifugio dopo cinque delle successive dieci prove. Inoltre, i granchi che avevano ricevuto due scosse nelle prime due prove non erano più portati a cambiare rifugio nella terza prova, rispetto ai granchi che avevano ricevuto una prova con una scossa e una senza.

Una limitazione di questo disegno sperimentale, sottolineato da Magee & Elwood (2016b), risiede nel fatto che i granchi potevano muoversi tra i rifugi durante una singola prova e questo rende difficile escludere una spiegazione alternativa secondo cui i granchi potevano tendere a tornare al rifugio incontrato più recentemente, ma spesso si spostavano dal rifugio in cui c'era stata la scossa al rifugio in cui non c'era stata, all'interno di un'unica prova dopo una scossa. Magee & Elwood (2013, p.357) sostengono che questa tesi è migliore rispetto all'idea basata sulla latenza di Maldonado e colleghi, poiché una scelta forzata tra i rifugi non può essere influenzata da una riduzione generale dell'attività. Ad ogni modo, siccome i granchi erano liberi di spostarsi tra i rifugi, era impossibile confrontare gruppi che incontravano esattamente gli stessi stimoli (per esempio il gruppo sottoposto al test con il gruppo di controllo). Magee & Elwood (2016b) hanno cercato di superare questo inconveniente del loro progetto con una configurazione nella quale la stanza di prova (che conteneva due ripari) era divisa da uno schermo opaco: durante l'addestramento i granchi (di nuovo *Carcinus maenas*) erano posizionati su entrambi i lati della partizione in prove alternate, in modo che in ogni prova fosse loro disponibile un solo rifugio; un rifugio è stato scelto casualmente come "rifugio-shock". Magee ed Elwood si sono chiesti: *"Questo addestramento, in cui sono stati sperimentati i rifugio-shock e non shock in sequenza, porterà i granchi ad evitare il rifugio-shock in seguito, quando verrà data libera scelta tra i due rifugi?"*

Secondo Birch et al. (2021), questa configurazione aveva il potenziale per fornire prove rigorose dell'apprendimento dell'evitamento, ma il risultato è stato chiaramente nullo: quando è stata lasciata libera scelta, trentasei dei sessantasei gamberi hanno inizialmente scelto il rifugio-non shock, e trenta di sessantasei gamberi hanno scelto il rifugio-shock, il che non rappresenterebbe una differenza statisticamente significativa (Magee & Elwood, 2016b, p. 885). Quando è stata lasciata la stessa libera scelta, ventinove su sessantuno gamberi hanno scelto il rifugio-non shock mentre trentadue su sessantuno gamberi hanno scelto il rifugio-shock, il che ha rappresentato un'altra differenza non statisticamente significativa (Magee & Elwood, 2016b, p.885). Non c'era differenza statisticamente significativa altresì tra il gruppo test e il gruppo di controllo (Magee & Elwood, 2016b, p. 885).

Secondo Birch et al. (2021), un risultato nullo in questa configurazione non fornisce evidenze forti contro una capacità di base per l'apprendimento dell'evitamento, poiché il compito era relativamente difficile. L'evitamento delle api del miele (*Apis mellifera*) suggerisce che l'apprendimento a partire da stimoli sequenziali è più difficile rispetto all'apprendimento da stimoli simultanei (Dyer & Naumayer, 2005). Per di più, i granchi avrebbero avuto la necessità di crearsi un ricordo di dove avevano ricevuto una scossa elettrica e di crearsi quel ricordo in un contesto nuovo (senza partizione della stanza).

Come è stato notato da Birch et al. (2021), se presi insieme gli esperimenti visti sopra evidenziano la grande sfida che c'è nel dimostrare apprendimento associativo in un animale, ma mostrano anche dei metodi ingegnosi per superare queste sfide. Gli studi del gruppo di Maldonado negli anni '80 e '90 forniscono una buona evidenza di apprendimento associativo nel *Neohelice granulatus*, e quelli del gruppo di Elwood del 2010 forniscono ulteriori evidenze positive di apprendimento associativo nel *Carcinus maenas*, così come un noto risultato nullo. Questo risultato nullo non compromette sostanzialmente i risultati positivi precedenti, a causa della maggiore difficoltà del compito. Il tipo di apprendimento associativo analizzato in questi esperimenti è il condizionamento operante, e c'è qualche evidenza di un particolare stretto legame tra questa forma di apprendimento e la senienza (Skora et al.,2021).

Altri decapodi. Fine-Levy et al. (1988) ha analizzato l'apprendimento associativo nelle aragoste spinate (*Panulirus argus*); si è chiesto: "Può l'animale imparare ad associare un odore

inizialmente attraente (di un gambero) con uno stimolo avversivo (uno 'pseudo predatore', ovvero un oggetto scuro che si avvicina velocemente), in modo che l'odore inneschi comportamenti di evitamento?" Sono state trovate evidenze di condizionamento per comportamenti di presa, di ricerca e di evitamento attivo. Un limite di questo studio è che sono stati analizzati separatamente quattordici comportamenti diversi, con solo cinque aragoste su quattordici che mostravano evidenze statisticamente significative di condizionamento; un altro limite è che l'analisi confronta gli animali prima e dopo il condizionamento, piuttosto che confrontare gli animali condizionati con quelli di controllo. Non è quindi chiaro se gli animali sperimentali mostrassero maggiormente questi comportamenti rispetto agli animali di controllo.

Kawai et al. (2004) ha esplorato l'apprendimento associativo nei gamberi di fiume (*Procambarus clarkii*): gli autori si sono chiesti se i gamberi potessero imparare ad evitare scariche elettriche leggere (6.5 V) camminando da una stanza all'altra quando veniva visualizzata una spia di avvertimento. Il gambero testato ha mostrato una reattività significativamente maggiore in molte prove ripetute (venti prove al giorno per trentadue giorni). Secondo Birch et al. (2021), è difficile in questo caso escludere spiegazioni che facciano appello alla sensibilizzazione, soprattutto considerato il numero molto elevato di scosse elettriche somministrate. Kawai et al (2004) ha tentato di escludere questa spiegazione con esperimenti di *follow-up*, ma non ha confrontato il gruppo testato con un gruppo di controllo "aggiogato" che ha subito esattamente lo stesso numero di scosse elettriche non associate alla spia luminosa.

Tomina & Takhata (2010) hanno indagato se le aragoste (*Homarus americanus*) potessero imparare ad afferrare un sensore per accedere a del cibo. Secondo Birch et al. (2021), l'utilizzo di un rinforzo positivo (cibo) renderebbe questo lavoro meno direttamente rilevante per la questione della senienza, ma non del tutto irrilevante. Il gruppo delle quattro aragoste testate mostrava un aumento significativo nel comportamento di presa dopo l'addestramento (rispetto a prima dell'addestramento), mentre il gruppo di controllo di quattro aragoste non mostrava questo aumento. Ad ogni modo, non sembrano esserci stati paragoni statistici diretti tra il gruppo testato e il gruppo di controllo.

In sintesi, ci sono stati sostanzialmente meno studi sull'apprendimento associativo in altri decapodi, rispetto a quelli sui granchi veri. La prova del fatto che questo apprendimento esiste

non permette a Birch et al. (2021) di avere un livello di confidenza alto rispetto al fatto che le aragoste e i gamberi di fiume apprendano in maniera associativa, sebbene fornisca un livello di confidenza medio. L'apprendimento associativo in altri decapodi dovrebbe quindi essere valutato come una possibilità plausibile e ampiamente inesplorata.

Diversi altri studi sono stati esaminati in relazione al criterio sette, ma Birch et al. (2021) ha concluso con l'idea che questi non offrano evidenze sufficientemente rilevanti e/o sufficientemente significative da meritare una discussione dettagliata: Stafstrom & Gerstein (1977), Wight et al. (1990), Abramson & Feinman (1990), Hermitte & Maldonado (1991), Panksepp & Huber (2004), Nathaniel et al. (2010), Tierney & Lee (2011).

Studi di Maldonado e colleghi forniscono, in conclusione, evidenze convincenti di apprendimento associativo nei granchi veri (infraordine Brachyura); ad ogni modo, ci sono anche alcuni studi meno convincenti ed un risultato non significativo. Come riportato da Birch et al. (2021), lo studio sull'apprendimento associativo in altri gruppi tassonomici di decapodi (come i gamberi e le aragoste) si trova ad uno stadio comparativamente precoce e non ha ancora prodotto risultati significativi, mentre sviluppare disegni di ricerca sperimentali che distinguano rigorosamente l'apprendimento associativo dall'abituazione e dalla sensibilizzazione rimane una sfida aperta. Questi dati hanno permesso di raggiungere quindi un alto livello di confidenza per il fatto che i granchi veri (infraordine Brachyura) soddisfino il criterio sette e un livello di confidenza medio per quanto concerne le aragoste/granchi (infraordini Astacidea e Achelata).

3.8 Criterio otto: l'animale mostra di dare valore a presunti analgesici o anestetici quando ferito in una o più dei seguenti modi: (a) l'animale impara ad auto-somministrarsi presunti analgesici o anestetici quando ferito; o (b) l'animale impara a preferire, quando ferito, un luogo nel quale può avere accesso ad analgesici o anestetici; o (c) l'animale ferito ha come priorità quella di ottenere queste risorse rispetto ad altre (come il cibo).

Birch et al. (2021) riporta che non esistono evidenze da revisionare in questo ambito; questo criterio rappresenterebbe dunque un'ovvia mancanza di evidenze, così come un punto da

riconsiderare per la ricerca futura. Birch et al. (2021) nota, inoltre, che la procedura di auto-amministrazione sviluppata da Datta et al. (2018) per quanto riguarda le anfetamine nei gamberi di fiume (*Orconectes rusticus*), potrebbe rappresentare una strada promettente per lo studio del criterio otto (a). Le prove trattate in riferimento ad altri criteri suggeriscono altresì che la lidocaina potrebbe essere un anestetico locale particolarmente promettente da studiare in relazione al criterio otto (a).

In sintesi, il livello di confidenza concluso per questo criterio è molto basso per tutti gli infraordini.

4. I RISCHI DELLE PRATICHE COMMERCIALI

In questo capitolo intendo riportare quelle che secondo Birch et al. (2021) rappresentano le pratiche specifiche che possono creare il rischio di un basso livello di benessere. Per fare questo verrà citata la letteratura esistente in riferimento alle implicazioni al benessere di queste pratiche, e verranno evidenziati i punti in cui ci sono delle mancanze di prove.

4.1 Cefalopodi nella pesca marittima

I cefalopodi catturati in natura, se non già morti, di solito muoiono subito dopo essere stati prelevati dall'acqua, con notevoli rischi per il benessere dovuti a traumi fisici e ad asfissia. I problemi legati al benessere sono simili a quelli che sorgono per i pesci catturati in natura: non esiste un modo semplice per mitigare questi rischi, ma dovrebbero essere sviluppati codici di buona pratica per quei casi in cui i cefalopodi vengono catturati vivi (Birch et al., 2021).

I metodi di cattura dei cefalopodi variano a seconda dell'attività di pesca, e includono tecniche di rete, cattura e dragaggio. A differenza della pesca dei decapodi, i cefalopodi catturati non vengono trasportati vivi e quindi i rischi per il benessere durante il mantenimento da vivi e la cattività non sono stati considerati da Birch et al. (2021). Per quanto riguarda i rischi per il benessere che potrebbero sorgere dal momento della cattura allo sbarco, attualmente esiste una letteratura scientifica limitata che identifichi esplicitamente le implicazioni sul benessere nei contesti delle pratiche commerciali; di conseguenza, i rischi per il benessere discussi da Birch et al. (2021) sono in gran parte basati sui dati di cattura, manipolazione e trasporto provenienti da studi che hanno utilizzato (catturato) i cefalopodi per scopi scientifici.

I calamari vengono catturati con reti da traino, da posta e a sciabica, mentre il *jigging* manuale (cattura con le maschere) è comunemente usato nella pesca dei calamari (Pierce et al., 2010). La cattura manuale attraverso le maschere è considerato il metodo di cattura dal vivo più etico per i calamari, ma potrebbe non essere appropriato per tutte le specie (Pierce et al., 2010). La cattura con la maschera dipende anche dalle dimensioni degli animali catturati (Rathjen, 1991), e riduce la necessità di scartare animali di piccole dimensioni.

I polpi e le seppie vengono catturati principalmente utilizzando reti da traino, vasi e trappole (Pierce et al., 2010). Le seppie possono essere catturate utilizzando anche reti da posta e tramagli, mentre i polpi possono essere catturati in vasi e trappole. I cefalopodi catturati in reti sono caricati a bordo solitamente morti o quasi morti, mentre gli animali intrappolati vengono catturati vivi (fonti del settore). Il dragaggio è stato utilizzato anche come metodo di cattura per polpi, seppie e calamari. La pesca a traino e il dragaggio sono i metodi più distruttivi per l'ambiente e in alcuni casi, a causa delle piccole dimensioni, i cefalopodi sottodimensionati vengono scartati e sprecati (Pierce et al., 2010).

Di seguito saranno discussi i rischi potenziali al benessere associati ai diversi metodi di cattura.

Traumi fisici. Le tecniche di cattura possono portare a traumi fisici nei cefalopodi: nello specifico, i traumi fisici possono insorgere da un maneggiamento rudimentale, che causa il distacco del mantello dalla testa dell'animale (A. K. Schnell, osservazione personale). L'allevamento troppo rapido di specie bentoniche può portare ad un malfunzionamento nel galleggiamento dovuto a rapidi cambiamenti di pressione (Forsythe et al., 1991; McDonald, 2011; Sherrill et al., 2000). Tuttavia, a differenza della vescica natatoria dei pesci, l'apparato che permette il galleggiamento nelle seppie non è pressurizzato; quindi, il volume non viene alterato in modo marcato quando l'animale cambia profondità (Denton & Taylor, 1964; Sherrard, 2000); ad ogni modo, un rapido movimento verticale può causare l'intrappolamento dell'aria all'interno della cavità del mantello (A.K. Schnell, osservazione personale) con conseguente potenziale disagio o dolore.

Durante i metodi di cattura che utilizzano le reti, gli individui possono essere portati all'esaurimento e soffocati ed essere infine schiacciati sotto il peso di altri animali; ad ogni modo, ulteriori ricerche sono richieste per determinare la severità di questo rischio (Birch et al., 2021). Infine, l'urto con altri animali ai lati della rete causa quotidianamente danni alla pelle (Boyle, 2010): i cefalopodi hanno una pelle sottile e sono particolarmente suscettibili ad ulcere e a danni delle pinne (particolarmente vero per seppie e calamari, in quanto i polpi non hanno pinne) che possono portare ad un danno permanente; questi danni incrementano la crescita di batteri (Gestal et al., 2019) e possono portare a malattie o alla morte (Hanlon et al., 1984; Boyle, 2010; Gestal et al., 2019).

Secondo quanto riportato da Birch et al. (2021), danni alla pelle e alle pinne diventano un aspetto relativo al benessere se (i) gli individui vengono lasciati nelle reti per ore o giorni prima di essere sbarcati e se (ii) animali vivi sottodimensionati vengono rilasciati di nuovo nell'acqua con delle ferite. La pelle ha un ruolo vitale per la sopravvivenza dei cefalopodi, visto che questi utilizzano configurazioni del corpo sia per la comunicazione che per nascondersi (Hanlon & Messenger, 2018). Per di più, le ricerche evidenziano che ferite minori nei calamari aumentano il rischio di predazione (Crook et al., 2014) e che i calamari con danni alla pelle e alle pinne non rispondono positivamente ai cambi di temperatura e di salinità rispetto ai calamari non feriti (Hanlon et al., 1983). L'uso di un materiale morbido per la rete o di metodi di cattura alternativi (cioè di trappole o cattura con le maschere) possono diminuire alcuni rischi di traumi fisici che riguardano i metodi di cattura con la rete (Iglesias et al., 2007), ma questo non è stato ancora testato in maniera sistematica.

Aggressione e cannibalismo. Ad eccezione di alcune specie, sia i polpi che le seppie sono animali relativamente solitari: l'essere confinati in uno spazio piccolo, come in un vaso o in una trappola, può non solo causare stress, ma portare anche ad una lotta tra gli individui (Birch et al., 2021). L'amputazione limbica viene comunemente osservata nei polpi catturati in natura (Florini et al., 2011), il che può essere il risultato di un'auto-mutilazione (Budermann, 1998; Reimschuessel & Stoskopf, 1990) o potrebbe essere il risultato della lotta. Un altro rischio è dato dal fatto che tutti i gruppi di cefalopodi coleoidi hanno tendenze cannibaliste, e questo è particolarmente vero quando si fa riferimento a situazioni in cui sono presenti individui di misura diversa o quando non viene dato abbastanza cibo (Aguado-Giménez & Garcia Garcia, 2002; Budermann, 2010; Hayter, 2005; Ibáñez & Keyl, 2010; Jacquet et al., 2019; Moltschanowskyj et al., 2007; Pierce et al., 2010). Secondo Birch et al. (2021), proprio per questo motivo, pescherecci che utilizzano trappole e vasi/contenitori per tenere insieme individui vivi dovrebbero assicurare che questi sistemi siano abbastanza grandi per le specie in questione, organizzati con prede sufficienti per sostenere la quantità totale di individui in cattività, e controllati frequentemente; lasciare questi dispositivi senza supervisione per diversi giorni può infatti causare disagio, stress e persino la morte, poiché lo spazio ristretto può indurre gli animali intrappolati a combattere o a mangiarsi a vicenda.

Esposizione a temperature e salinità inappropriate. Come dimostrato dallo studio di Graziano Fiorito *“Guidelines for the Care and Welfare of Cephalopods in Research –A consensus based on an initiative by CephRes, FELASA and the Boyd Group.”* del 2015, i cefalopodi sono degli animali altamente stenoalini e stenotermici, il che significa che non possono tollerare ampie fluttuazioni della salinità e della temperatura dell'acqua (Moltschaniwskyj et al., 2007). Anche negli adulti i cambiamenti della salinità, in particolare, possono provocare indicatori visivi di stress o disagio, come sbiancamento della pelle ed eccessiva produzione di inchiostro, e possono portare alla morte (A. K. Schnell, osservazione personale). Ciò ha portato Birch et al. (2021) a sottolineare il fatto che i dispositivi commerciali che intrappolano gli individui vivi (ad esempio i vasi) dovrebbero essere controllati frequentemente, specialmente durante i periodi in cui i siti costieri sono soggetti a variazioni meteorologiche, come piogge eccessive.

Metodi di macellazione. Gli animali intrappolati nelle reti sono di solito portati sul peschereccio da morti, mentre gli animali nelle trappole o pescati con le maschere sono spesso vivi (fonti interne alle industrie marittime); se l'animale è ancora vivo, questo muore di asfissia prima di essere congelato. Come riportato anche da Birch et al. (2021), l'asfissia è un problema legato al benessere. Alcune evidenze non sperimentali suggeriscono che talvolta vengono utilizzati metodi non etici nei pescherecci europei, come il bastonamento, il taglio del cervello e l'inversione del mantello (Pereira & Lourenco, 2014). Tuttavia, esiste attualmente una mancanza di prove su metodi di macellazione etici commercialmente pratici e disponibili, anche se sono in atto degli sforzi per migliorare e standardizzare l'eutanasia nei cefalopodi in cattività utilizzati per esperimenti scientifici (Andrews et al., 2013; Butler-Struben et al., 2018; Fiorito et al., 2015). Questi metodi, tuttavia, sono inappropriati per le pratiche commerciali, perchè spesso comportano un sovradosaggio di anestetico (tipicamente etanolo) che non è adatto al consumo umano, e per di più, i metodi meccanici che non comportano contaminazioni, come tagliare o forare il cervello, richiedono mani esperte e non sono efficaci per pratiche su larga scala. Secondo Birch et al. (2021), saranno quindi necessarie ulteriori ricerche per determinare i metodi di macellazione migliori per le pratiche di pesca commerciali dei cefalopodi, metodi che permettano di esporre l'animale ai più bassi livelli di dolore e angoscia possibili. La cosa positiva è che l'associazione per la ricerca dei cefalopodi (CephRes) sta attualmente proponendo di

adempiere a questo progetto, che valuterà diversi metodi più sostenibili da attuare nei pescherecci di tutta l'Unione Europea.

Birch et al. (2021) non sono stati in grado di trovare alcun codice di buona pratica o delle linee guida volontarie specifiche per la pesca commerciale dei cefalopodi; sebbene i cefalopodi siano spesso pescati come cattura accessoria (in eccesso), sarebbe utile sviluppare dei codici di buona pratica per le circostanze in cui i cefalopodi siano vivi nel momento in cui vengono catturati.

4.2 Cefalopodi in acquacoltura

In varie parti del mondo si registra un interesse crescente verso gli allevamenti su larga scala di cefalopodi, sebbene sia ormai risaputo che essi siano animali tipicamente solitari, spesso aggressivi l'un l'altro in spazi ristretti; per questo motivo non esiste attualmente un metodo di macellazione affidabile ed etico che possa essere eseguito in ambiti commerciali su larga scala. È quindi con un livello di confidenza molto alto che Birch et al. (2021) sostengono il fatto che l'allevamento commerciale di cefalopodi ad alto benessere sia attualmente impossibile.

Globalmente, l'allevamento di cefalopodi riguarda poche specie e non ha un'ampia portata (O'Brien et al., 2018). Ad ogni modo, allevamenti di cefalopodi si possono trovare in Europa, Australia, America Latina e Asia (Jacquet et al., 2019); questi animali vengono spesso suggeriti come dei possibili candidati per un allevamento a scopo commerciale su larga scala, per via della loro domanda crescente, per il loro valore, per il loro sviluppo rapido, per l'alto tasso di conversione alimentare, per l'alto contenuto proteico e per l'alto grado di fecondità (Pierce et al., 2010). La *Sepia officinalis* e l'*Octopus vulgaris* sono stati descritti come candidati promettenti per un allevamento a scopi commerciali in Europa, e sono nati per questo degli allevamenti di *Octopus vulgaris* in Spagna (Birch et al., 2021).

Mortalità dei piccoli. Secondo Birch et al. (2021), uno dei problemi attualmente limitanti nella gestione in cattività dei cefalopodi è la mortalità dei piccoli: oltre a limitare la vitalità dell'allevamento di cefalopodi, questo può rappresentare anche un problema di benessere. Per l'*Octopus vulgaris*, i tassi di sopravvivenza sono al massimo intorno al 30-40% al quarantesimo giorno (Iglesias et al., 2007) e <10% al sessantesimo giorno (Vaz-Pires et al., 2004). Ciò è dovuto principalmente a problemi di temperatura, di qualità dell'acqua e di nutrizione (Boyle, 2010;

Navarro et al., 2014; Vaz-Pires et al., 2004). I giovani richiedono una grande quantità di cibo vivo (gamberetti larvali e altri crostacei), che può essere difficile da ottenere (Iglesias et al., 2007; Pierce et al., 2010). Per Birch et al. (2021) è dunque molto probabile che i giovani animali che muoiono a causa di una cattiva alimentazione e di condizioni abitative inadeguate, soffrano.

Cattura e trasporto. Dato che gli sforzi di riproduzione in cattività così come l'allevamento dei giovani spesso falliscono nell'aver successo, l'acquacoltura dei cefalopodi assume spesso la forma di *ranching* o *rearing*, in cui i giovani animali vengono catturati e cresciuti in cattività in delle vasche per l'eventuale vendita (Birch et al., 2021). Le attuali linee guida sembrano essere basate principalmente su osservazioni personali o su evidenze sviluppate per i pesci (ad esempio Fiorito et al., 2015), e non sono stati trovati degli studi che abbiano valutato in modo esplicito i diversi metodi di cattura e di trasporto per i cefalopodi in termini di impatto sul benessere; esiste ad ogni modo un gruppo di lavoro presso la FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Association*), il quale cerca di fornire una serie di linee guida sul trasporto di questi animali, così come alcune pratiche di buona cattura.

Un trasporto di scarsa qualità può essere quindi dannoso per i cefalopodi: questi richiedono un'acqua altamente ossigenata, e un trasporto prolungato può portare ad un abbassamento dell'ossigeno e ad un aumento dei nitrati; una camera d'aria, oppure un areatore, dovrebbero per questo motivo essere utilizzati quando necessario (Fiorito et al., 2015; Iglesias et al., 2007; McDonald, 2011). In più, se gli animali producono inchiostro nell'acqua e questa non viene immediatamente pulita (o l'animale trasferito), l'inchiostro può coprire le branchie e causare asfissia (Heyter, 2005; McDonald, 2011). Molte specie di polpo mostrano biomarcatori relativi allo stress dopo la cattura con reti da traino e una compromissione del sistema immunitario, ma in genere recuperano entro ventiquattro ore (Barragán-Méndez et al., 2019); alcune specie sembrano più inclini di altre a questi processi: l'*Octopus vulgaris* e la *Sepia officinalis* mostrano, per esempio, una certa resistenza allo stress da manipolazione e da trasporto (Cooke et al., 2019, Vaz-Pires et al., 2004).

Cattiva alimentazione. La cattiva alimentazione è uno dei problemi principali per lo stabilimento di un'acquacoltura su larga scala, dato che gli animali sono carnivori e richiedono tipicamente

prede vive (Boyle, 2010; Navarro et al., 2014; Pierce et al., 2010). Sebbene ci siano dei lavori sullo sviluppo di alternative adeguate, nessuna ha avuto abbastanza successo da diffondersi (Pierce et al., 2010); inoltre, allo stato attuale non esiste una comprensione sufficiente del metabolismo e delle esigenze nutrizionali di questi animali, che possa permettere di formulare delle diete complete (O'Brien et al., 2018): gli animali che non avranno abbastanza cibo, o che avranno cibo di scarsa qualità, subiranno condizioni di malessere, come la fame e malattie nutrizionali e metaboliche (Birch et al., 2021).

Mancanza di stimoli cognitivi. Così come esiste il problema della salute fisica, esiste un potenziale problema nei cefalopodi in cattività che riguarda il malessere di tipo psicologico, dovuto alla loro complessità comportamentale e cognitiva (Cooke & Tonkins, 2015; Jacquet et al., 2019). Jacquet et al. (2019) ha analizzato la mancanza di stimoli cognitivi nei polpi allevati: la preoccupazione è soprattutto per quegli ambienti monotoni e controllati tipici degli allevamenti, che non permettono la stimolazione cognitiva, l'esplorazione, il controllo ambientale necessario per mantenere il benessere psicologico. I cefalopodi mostrano regolarmente segni di stress in ambienti di cattività di bassa qualità, come una nuotata irregolare, sintomi di depressione, agitazione e anoressia (McDonald, 2011); inoltre, lo stress può causare autofagia (Hayter, 2005).

Mancanza di riparo. I cefalopodi hanno un corpo morbido e vulnerabile ai predatori in natura, e quando si sentono minacciati possono utilizzare dei ripari o delle strategie di ritirata veloce (Cooke & Tonkins, 2015), che sono però limitati in condizioni di cattività. Questo può portare a paura e stress, e l'animale che non abbia un riparo adeguato può mostrare sintomi di depressione e anoressia (Sherrill et al., 2000). È dunque importante che gli animali abbiano a disposizione ampi luoghi per nascondersi, che potrebbero essere camere o grotte per quanto riguarda i polpi (Vaz-Pires et al., 2004), mentre uno strato di sabbia soffice nel quale potersi seppellire, o ancora caratteristiche ambientali che permettano il camuffamento, come alghe di mare artificiali o coperture a tema per i muri per quanto invece concerne le seppie (Cooke et al., 2019; Tonkin et al., 2015). Dato che i calamari sono pelagici (si trovano in mare aperto e in acque profonde), non hanno bisogno di un riparo, ma richiedono una vasca più grande per prevenire i danni causati dagli schizzi di inchiostro (Boyle, 2010).

Ferite alla pelle. Una risposta di sorpresa o di paura comune nei cefalopodi, in particolare in seppie e calamari, è il getto ad alta velocità per allontanarsi da una minaccia: in cattività, ciò si traduce spesso in collisioni con i lati della vasca e/o con oggetti vicini con conseguenti lesioni alla pelle; queste lesioni spesso guariscono male, infettandosi, con la probabilità di causare danni permanenti, diffusione dell'infezione ad altri tessuti e morte (Cooke & Tonkins, 2015; Hanley et al., 1998; Sherrill et al., 2000). Le seppie possono inoltre fratturarsi le ossa (McDonald, 2011). L'incidenza del getto può essere ridotta fornendo ampi nascondigli, barriere visive e un'attenta gestione che garantisca agli animali di non spaventarsi (McDonald, 2011). Le lesioni possono invece essere ridotte al minimo mediante l'uso di vasche arrotondate, che non contengano superfici ruvide e oggetti appuntiti (Fiorito et al., 2015, Slater & Buttling, 2011).

Abitazioni inadeguate. Il fattore determinante principale per la salute e per il benessere dei cefalopodi è la qualità dell'acqua in cui alloggiano: questi animali non sono molto adattabili ai cambiamenti delle condizioni dell'acqua, e richiedono un monitoraggio rigoroso dei livelli di ossigeno, PH, CO₂, nitrati e salinità, per garantire che rimangano entro livelli accettabili, nonché una rapida rimozione dell'inchiostro quando necessario (Cooke et al., 2019; Fiorito et al., 2015; Hayter, 2005, McDonald, 2011; Skyes et al., 2012; Vaz-Pires et al., 2004). La scarsa qualità dell'acqua può causare cattive condizioni di salute, infezioni, problemi respiratori, agitazione, aumento dell'incidenza nella produzione di inchiostro e getti, morte (Fiorito et al., 2015; Hanley et al., 1998; Hayter, 2005).

Altri aspetti relativi all'abitazione, come l'illuminazione, la temperatura e l'incidenza di rumori e vibrazioni, possono influire sul benessere (Fiorito et al., 2015; Hayter, 2005). I cefalopodi hanno capacità sensoriali diverse dalle nostre: alcune di queste sono la capacità di vedere la luce polarizzata, la meccanorecezione e la chemiosensorialità, che si traducono nella necessità di requisiti ambientali unici e altrimenti difficili da considerare (Browning, 2019; Cooke et al., 2019). La temperatura sembra particolarmente importante poiché influenza l'alimentazione, la crescita e la durata della vita (Aguado-Giménez & Garcia Garcia, 2002; Sherrill et al., 2000). È inoltre importante sistemare gli animali in gruppi sociali appropriatamente numerosi in base alla specie di appartenenza: molte specie di cefalopodi sono solitarie e dovrebbero quindi essere sistemate individualmente, perché l'affollamento potrebbe causare aggressioni e

cannibalismo (Aguardo-Giménez & Garcia garcia, 2002; Budelmann, 2010; Hayter, 2005; GiJacquet et al., 2019; Pierce et al., 2010). Per di più, l'affollamento può aumentare lo stress e diminuire il tempo utilizzato per il riposo e per l'alimentazione (Cooke et al., 2019). Alcune specie di seppie sono un'eccezione, perché vivono in coppia (McDonald, 2011) e i calamari sociali dovrebbero essere tenuti in gruppo (Fiorito et al., 2015).

Malattie. Alcuni dei fattori già menzionati come lo stress, l'acqua di scarsa qualità e una nutrizione scarsa o di scarsa qualità possono portare a malattie: animali stressati hanno sistemi immunitari compromessi, che si traducono in infezioni batteriche, virali e fungine (McDonald, 2011, Sherrill et al., 2000); ad ogni modo, il sistema immunitario dei cefalopodi non è ben compreso (O'Brien et al., 2018; Skyes & Gestal, 2014) e i virus sono rari, mentre le infezioni batteriche sono più comuni in lesioni cutanee e sulle branchie (Fiorito et al., 2015; Sykes & Gestal, 2014). La sterilizzazione UV dell'acqua può aiutare a ridurre la presenza di agenti patogeni (Hanley et al., 1998), anche se la mancanza di conoscenza nell'ambito dell'analgesia e dell'anestesia dei cefalopodi potrebbe causare problemi al benessere quando gli animali vengono feriti o quando devono sottoporsi a procedure mediche (Fiorito et al., 2015).

Metodi di macellazione. Attualmente, l'unico metodo raccomandato per una macellazione etica dei cefalopodi è il sovradosaggio di anestetico, spesso seguito da decerebrazione (Andrews et al., 2013; Boyle, 2010; Fiorito et al., 2015). Tuttavia, questo è inappropriato per i cefalopodi che vengono macellati per il consumo umano. La macellazione meccanica comporta il taglio o la perforazione del cervello e richiede operatori attenti e qualificati per garantire che venga eseguita correttamente (Andrews et al., 2013; Boyle, 2010; Fiorito et al., 2015), ma è improbabile che questo possa essere praticato in ambito commerciale su larga scala. Al momento non c'è modo di utilizzare metodi di macellazione affidabili ed etici per l'allevamento dei cefalopodi, tuttavia, questo problema si pone anche per i cefalopodi catturati in natura (Birch et al., 2021).

4.3 Maneggiamento durante la cattura, il trasporto e la vendita dei decapodi

Danni accidentali. Secondo Birch et al. (2021), è generalmente nell'interesse dell'industria marittima evitare danni ai decapodi catturati, dato che gli animali intatti vengono valutati molto di più rispetto a quelli danneggiati, specialmente per quanto riguarda le specie più grandi. Per questo motivo, un maneggiamento attento viene già enfatizzato come esempio di buona pratica nelle linee guida dell'industria marittima (per esempio Jacklin & Combes, 2005). I rischi di danno fisico sono maggiori nei decapodi catturati per quei mercati che mettono minore enfasi sulla qualità dei singoli animali, come succede per quelle specie catturate con reti da traino; i danni fisici accidentali includono lo spezzamento del carapace, danno alle antenne e perdita degli arti; l'emolinfa può fuoriuscire rapidamente dalle fessure, uccidendo l'animale. Nelle specie vive destinate ad uno stoccaggio o ad un trasporto relativamente prolungati, le linee guida del settore raccomandano che gli animali siano attentamente ispezionati, e che a quelli che hanno degli arti danneggiati sia garantita la possibilità di liberarsene tramite l'autotomia (Jacklin & Combes, 2005). Non è però chiaro quale sia l'impatto sul benessere delle lesioni esterne rispetto all'autotomia nei decapodi, ma nel secondo caso, il rischio di infezione o di morte rapida sono ridotti.

Secondo Birch et al. (2021), il rischio di danni accidentali può essere ridotto ridefinendo i metodi di cattura; i granchi marroni (*Cancer pagurus*) tendono per esempio ad aggrapparsi alle reti all'interno delle nasse che vengono comunemente utilizzate per catturarli, quindi, rimuoverli dalle nasse può inavvertitamente strapparne gli arti. Inserti in plastica liscia alla base della nassa aiuterebbero a ridurre questo rischio (Jacklin & Combes, 2005). Le aragoste (*Homarus americanus*) catturate in acque più profonde e a velocità di trasporto commerciali, hanno una probabilità significativamente maggiore di mostrare stress fisiologico e infezioni batteriche dopo la cattura, rispetto a quelle catturate in acque più basse o a velocità di trasporto inferiori (Basti et al., 2010). Gli autori suggeriscono che questo potrebbe essere dovuto alla rapida decompressione e all'esaurimento causato dallo sfarfallio ripetuto durante il rapido trasporto dalle acque profonde. Lo stoccaggio a bordo dei pescherecci in acqua di mare in continuo ricircolo, piuttosto che uno stoccaggio di tipo umido, sembra aiutare le aragoste a riprendersi parzialmente dagli effetti del trasporto; partendo dal presupposto che le velocità di trasporto commerciale e le profondità di cattura delle aragoste non possono essere ridotte, si

consiglia il recupero in acqua di mare in continuo ricircolo (Basti et al., 2010). Le magoustine (*Nephrops norvegicus*) sono un esempio di specie di decapodi che può essere catturata attraverso nasse o reti da traino, e queste ultime si sono dimostrate essere quelle che causavano maggiore stress fisiologico, mortalità e danno fisico, se confrontate alle nasse (Ridgway et al., 2006; Albalat 2009). Gli stessi studi hanno mostrato che il danno fisico e la mortalità sono più probabili quando avviene una cattura prolungata con reti da traino, ed effetti addizionali sono dati dalla stagione e dal momento della giornata. Risultati simili sono stati trovati per i gamberi (*Pandalus borealis*), dov'è stato visto che tempi di cattura prolungati con le reti da traino aumentavano i tassi di mortalità (Larssen et al., 2013). La cattura con reti da traino rappresenta un maggiore rischio per il benessere dei decapodi rispetto alla cattura con nasse, e c'è già un'ampia discussione riguardo agli effetti economici e ambientali della cattura dei decapodi con reti da traino (vedere per esempio Williams & Carpenter, 2016). Secondo Birch et al. (2021), durante il trasporto e lo stoccaggio, i containers in cui vengono posti gli animali possono aiutare nel ridurre potenziali danni fisici, se vengono ben progettati e disposti in maniera appropriata per le specie a cui sono destinati: questi dovrebbero essere programmati in modo da essere resistenti alle rotture, da non permettere ferite agli arti, e non dovrebbero poi contenere molti animali, così da evitare che alcuni di essi vengano schiacciati dal peso di quelli posti sopra. Per esempio, i granchi (*Cancer pagurus*) trasportati dal Regno Unito al Portogallo sul fondo di una vasca, avevano più arti e chele mancanti rispetto a quelli che si trovavano in cima al contenitore, e una volta arrivati in Portogallo sono morti prima rispetto agli altri (Barrento et al., 2010). Ad ogni modo, dopo quattro giorni in una vasca di ricovero, sono stati osservati tassi di mortalità simili sia nei granchi posizionati sulla cima che sul fondo del contenitore durante il trasporto. Quando le aragoste vengono stoccate a bordo, dovrebbero essere posizionate con le code arrotolate sotto il loro corpo, in modo da proteggere la superficie ventrale da eventuali punture; dovrebbero poi essere posizionate nella stessa direzione ed essere in un numero che permetta stabilità ma senza pressare troppo gli animali tra di loro (Basti et al., 2010).

Durante tutte le fasi, il maneggiamento dei decapodi dovrebbe essere accurato e mantenuto al minimo, perché è stato dimostrato che questo causa stress fisiologico (Jacklin & Combes, 2005). Se i decapodi vengono lanciati (ad esempio Barrento et al., 2010) o mossi bruscamente (Levallee et al., 2000) nei container, ci sarà poi un maggiore rischio di danno fisico e perdita di

vigore, rispetto ad un posizionamento più attento. Un maneggiamento grossolano e che manchi di cura è un rischio per il benessere e dovrebbe essere evitato (Birch et al., 2021).

Spezzamento delle chele. Lo spezzamento delle chele è una pratica che consiste nel rimuovere una o entrambe le chele dal decapode vivo. Come già discusso in precedenza, McCambridge et al. (2016) ha trovato prove che i granchi a cui erano state rimosse le chele si prendevano cura della ferita, la coprivano e in alcuni casi mostravano una risposta di “brivido”; ha poi trovato che i granchi a cui erano state rimosse le chele erano in svantaggio competitivo rispetto agli altri granchi, ed era poco probabile che si accoppiassero. Duermit et al. (2015) ha trovato che i granchi di pietra (specie *Menippe*) a cui erano state spezzate le chele, erano meno abili nel procurarsi una delle loro fonti di cibo principali, i bivalvi. Nel caso in cui la ferita fosse stata più grande di 7 mm, i granchi sarebbero morti in qualche giorno. Uno studio di Patterson et al. (2009) ha mostrato che, anche se una chela veniva rimossa attraverso autotomia indotta (auto-rimozione), piuttosto che attraverso una lesione, la capacità dei granchi (*Cancer pagurus*) di procurarsi i bivalvi era ridotta. Un altro studio di Patterson et al. (2007) ha mostrato inoltre che i granchi (*Cancer pagurus*) a cui erano state spezzate le chele, producevano una risposta di stress fisiologico (come indicato da glucosio e lattato nell'emolinfa) per almeno le ventiquattro ore successive al lesionamento, e che la risposta di stress era più forte per lo spezzamento manuale rispetto che per l'autotomia indotta.

Sulla base di queste prove e di quelle già revisionate, Birch et al. (2021) hanno concluso (con un alto livello di confidenza) che lo spezzamento delle chele nei granchi veri (infraordine Brachyura) causi sofferenza.

Disabilitazione delle tenaglie (compresa l'intaccatura). Le tenaglie dei decapodi o le chele più grandi devono essere messe fuori uso, in modo da prevenire danni a chi li maneggi o ad altri animali che condividono lo stesso contenitore: per le aragoste provviste di chele, il metodo comune è quello di trattenere le chele utilizzando fascette o elastici (Jacklin & Combes, 2005). Nelle aragoste americane (*Homarus americanus*) con le chele fasciate, il recupero dei parametri di emolinfa dopo il trasporto aereo in contenitori ghiacciati è stato confrontato tra individui con o senza bendaggio delle chele (Coppola et al., 2019); quelli con le bende rimosse venivano collocati in contenitori per prevenire i combattimenti; quindi, l'effetto della condizione sociale

differiva, così come la condizione di contenimento delle chele. I tassi di recupero di quasi tutti i parametri, incluse le concentrazioni di glucosio e lattato, erano simili nelle diverse condizioni delle chele e sociali. L'unica eccezione si è vista nel calcio che, sebbene inizialmente diminuisse in entrambi i gruppi, ha mostrato un nuovo aumento tra le dodici e le trentasei ore nel gruppo di aragoste sociali con chele fasciate, per poi rimanere in questo gruppo significativamente più alto rispetto che nelle aragoste isolate con le chele libere (nel resto dei quattro giorni e mezzo rimanenti di studio). Le implicazioni sul benessere della concentrazione di calcio non sono tuttavia ben comprese (Birch et al., 2021). Il fatto che i livelli di calcio nelle aragoste con le chele bendate siano aumentati similmente ai valori osservati immediatamente dopo il trasporto aereo potrebbe indicare una deviazione dell'omeostasi, ma è da notare che i consueti indicatori emolinfatici di stress fisiologico (glucosio e lattato) non sono stati influenzati in modo simile (Coppola et al., 2019). Al momento esistono poche prove conclusive del fatto che il bendaggio delle chele o il raggruppamento sociale compromettano il benessere (Birch et al., 2021).

Per i granchi marroni (*Cancer pagurus*), la fasciatura delle chele è considerata inadatta, sebbene questo non sia stato verificato in modo indipendente (Jacklin & Combes, 2005; fonti del settore). Nei casi in cui sia necessario lo stoccaggio da vivo o il trasporto dei granchi, il tendine che collega le due parti di ciascuna chela viene tagliato con una procedura nota come "intaccatura": fonti del settore hanno riportato che questo accade solo quando i granchi sono destinati all'esportazione da vivi. In uno studio, l'intaccamento aumentava i livelli di glucosio e lattato nell'emolinfa, e aumentava anche il rischio di necrosi del muscolo e di patologia (Weish et al., 2013). Un ulteriore studio ha mostrato che l'effetto dell'intaccamento è peggiorato a temperature più calde, mentre temperature più fredde hanno contribuito a ridurre il rischio di stress fisiologico e patologia (Johnson et al., 2016); in particolare, durante le quattro ore successive all'intaccamento, sono stati osservati aumenti di l-lattato e diminuzioni del PH solo a 12 °C e non a 8 o a 4 °C. Anche la mortalità è notevolmente aumentata, specialmente ad alte temperature, con cinque su sei granchi intaccati che sono morti nei quattordici giorni esposti a 12°C, uno su sei che è morto a 8°C, e nessuno a 4°C. Solo uno dei granchi non intaccati è morto (a 12°C). L'attività dell'emolinfa fenolossidasi, che è importante per l'immunità e la guarigione delle ferite, ha mostrato uno schema simile, sia con intaccamento che con alte temperature come cause di un suo aumento significativo nell'arco di quattordici giorni (Johnson et al., 2016).

Il “*nicking*”. Attraverso la pratica del *nicking* vengono tagliati i tendini del granchio bruno (*Cancer pagurus*). Secondo Birch et al. (2021), specialmente in condizioni di temperature calde, questa pratica rappresenta un rischio per la salute dei granchi e un rischio per il benessere; per entrambi i motivi dovrebbero quindi essere sviluppate e implementate alternative alla pratica del *nicking*. In Norvegia, le chele dei granchi bruni (*Cancer pagurus*) sono a volte immobilizzate con degli elastici (Woll et al., 2010). Nei granchi blu (*Callinectes sapidus*), gli elastici possono essere utilizzati con successo per legare le chele se un piccolo blocco o tassello viene prima fatto afferrare dai due dattili di ciascuna chela e poi lasciato in quella posizione (Haefner, 1971). Un'altra soluzione per prevenire i combattimenti potrebbe essere quella di utilizzare scomparti individuali per riporre i granchi, equivalenti ai “tubi” utilizzati per i nefropi (Birch et al., 2021).

Stress sociale e aggressioni. Il codice di buona pratica di Seafish per la manipolazione dei crostacei riconosce che l'aggressività e lo stress si verificano talvolta tra i decapodi quando molti animali sono rinchiusi nella stessa nassa (Jacklin & Combes 2005). Seafish consiglia l'uso di nasse con una seconda camera e con fessure di fuga, oppure una rete a maglie larghe (ove possibile) per consentire la fuoriuscita delle catture accessorie.

Durante lo stoccaggio, decapodi solitamente solitari in natura come le aragoste possono venire posizionati nello stesso contenitore: uno studio di Bacqué-Cazenave et al. (2017), già discusso nel capitolo tre, ha trovato prove che essere vittima di un'aggressione sociale porta ad uno stato “simile all'ansia” nei gamberi di fiume (*Procambarus clarkii*), caratterizzato da alti livelli di serotonina, ed è ragionevole credere che l'aggressione sociale possa produrre stati simili in altri decapodi (Birch et al., 2021). Il raggruppamento sociale delle aragoste (*Homarus americanus*; n = 12) con chele legate non ha causato aumenti significativi di glucosio o lattato emolinfa rispetto agli individui da soli (Coppola et al., 2019). Secondo Birch et al. (2021), questo potrebbe suggerire che il raggruppamento sociale senza volenza tra gli animali potrebbe non essere stressante per le aragoste, anche se non bisognerebbe escludere un effetto delle aggressioni (per esempio una diversa misura dello stress potrebbe mostrare una differenza non precedentemente rilevata).

Una bassa densità di stoccaggio potrebbe essere importante per prevenire lo stress sociale, ma un'indagine condotta in Portogallo ha mostrato che le densità di stoccaggio possono essere molto alte (il massimo riportato è di 300 kg m⁻³) e alcune volte eccedono le quantità

raccomandate (120 kg m⁻³; Barrento et al., 2010). Carder (2017) ha analizzato le condizioni di stoccaggio di aragoste vive in quattro rivenditori di cibo del Regno Unito, e ha trovato che le aragoste venivano stoccate in quantità che facevano sì che alcuni individui si trovassero l'uno sopra l'altro in undici delle ventisei vasche da esposizione osservate; in quattro dei contenitori c'erano almeno due strati pieni di aragoste. Crustacean Compassion (2020) ha riportato dei risultati simili, mostrando che le aragoste lottavano nelle vasche da esposizione del grossista, e fino a cinquanta aragoste venivano mostrate all'interno di un'unica vasca. Secondo Birch et al. (2021), un'alta densità di stoccaggio dei decapodi rappresenta un rischio per il benessere di questi animali.

Esposizione a temperature inadeguate. Nei decapodi le preferenze termiche differiscono tra le specie e dipendono in una certa misura dalla temperatura a cui essi si sono acclimatati: per la maggior parte delle specie, le temperature maggiori e minori che scelgono di evitare sono attualmente sconosciute (Lagerspetz & Vainio, 2006). Lo stress fisiologico, la suscettibilità alle malattie e la mortalità sono aumentati nei decapodi trasportati o conservati a temperature eccessivamente alte; ciò può verificarsi ogni volta che i contenitori di stoccaggio a terra o su nave non possono essere raffreddati ad una temperatura ottimale, come durante la stagione calda (Lavallee et al., 2000; Jacklin & Combes, 2005). Come descritto sopra, nei granchi bruni (*Cancer pagurus*) l'emolinfa lattata e il glucosio sono aumentati, e il rischio di patologia e mortalità è aumentato a 12°C rispetto a 8°C e 4°C, soprattutto nel caso in cui le chele del granchio sono state intaccate (Johnson et al., 2016). Il trasporto simulato di granchi bruni a 16°C ha provocato il 100% di mortalità, mentre la maggior parte è sopravvissuta a 12°C se immersa in acqua di mare di buona qualità, o a 8°C se in condizioni umide (Barrento et al., 2011). Risultati simili sono stati trovati per la stessa specie in un altro studio sullo stoccaggio umido, in cui i granchi hanno mostrato una vitalità ridotta a 5°C e 10°C (Woll et al., 2006). L'immersione in acqua calda di quella ottimale ha fatto sì che i gamberi tigre asiatici d'allevamento (*Panaeus monodon*) mostrassero risposte allo stress, tra cui alimentazione ridotta, colorazione rossa ed espressione genica alterata (De La Vega et al., 2007); in particolare, lo stesso studio ha mostrato che risposte molto simili sono state osservate in condizioni di ipossia a temperature più basse. In Norvegia, i gamberi (*Pandalus borealis*) che sono stati immersi in acqua corrente per quarantotto ore a 2°C e a 5°C, hanno mostrato una

sopravvivenza di oltre il 95%, riducendosi al 70% a 10 °C e al 50% a 15 °C (Larsson et al., 2013). È quindi fondamentale che i decapodi vengano mantenuti al fresco sia nello stoccaggio secco che in quello umido, al di sotto della soglia di temperatura massima consentita per la specie di appartenenza (Jacklin & Combes, 2005).

Anche durante stoccaggi temporanei, ad esempio durante la permanenza nei pescherecci o durante l'attesa di essere trasferiti in altri veicoli o in sistemi di stoccaggio specializzati, i decapodi non dovrebbero essere esposti alla luce del sole o ad ambienti con temperature calde: in uno studio, la perdita di vigore era significativamente maggiore nelle aragoste che venivano trasportate dal peschereccio alla terraferma durante giorni soleggiati piuttosto che in quelle che venivano trasportate durante giornate più nuvolose, e questo era presumibilmente dovuto all'esposizione alla luce solare (Levallee et al., 2000). I rappresentanti dell'industria marittima del Regno Unito hanno riportato che le peschate di aragoste e di granchi a bordo dei pescherecci sono spesso coperte con del tessuto, come delle moquette, e un ambiente fresco buio e umido viene creato utilizzando un tubo in cui scorre continuamente acqua di mare. I tempi di cattura vengono spesso pianificati in modo da evitare le parti più calde della giornata, prevenendo il deterioramento del pescato. Questo è importante perché riduce al minimo il rischio per il benessere degli animali dell'esposizione ai climi caldi (Birch et al., 2021).

Così come per il rischio di temperature troppo calde, è anche possibile che le temperature siano talvolta troppo fredde; il ghiaccio o impacchi di ghiaccio sono a volte utilizzati per raffreddare gli ambienti in cui si trovano i decapodi a bordo dei pescherecci e durante il trasporto, perché riducono i livelli di attività degli animali e diminuiscono le loro richieste di ossigeno, aiutando nel prolungarne la vita (Jacklin & Combes, 2005). In alcuni studi scientifici il ghiaccio viene considerato un metodo per anestetizzare e intontire i crostacei; questo processo viene definito "crioanestesia".

Il ghiaccio non dovrebbe essere posizionato a stretto contatto con i decapodi: i report dell'industria marittima suggeriscono che un freddo improvviso può stressare e anche uccidere molte specie di decapodi pescate in acque Inglesi (Jacklin & Combes, 2005). In alcuni paesi, compresi l'Italia e la Svizzera, l'esposizione ed il trasporto di crostacei vivi in ghiaccio sono diventati illegali. La maggior parte dei decapodi non vive infatti nelle regioni polari (le uniche eccezioni sono le specie di gamberi caridei), ed è quindi raramente a contatto con il ghiaccio in natura; inoltre, la maggioranza dei decapodi si immobilizza ad una temperatura pari o inferiore

a 2 °C (Frderich et al., 2002). Questi diventano inattivi perché, diversamente da altre specie di crostacei che vivono in acque fredde, hanno concentrazioni relativamente alte di ioni di magnesio nella loro emolinfa, che immobilizzano le giunture al di sotto della soglia dei 2 °C (Frederich et al., 2000).

La ridotta attività nei decapodi, quando questi vengono esposti ad una temperatura vicina allo zero termico, viene qualche volta definita “torpore”: questo riduce il tasso metabolico, che li aiuta a sopravvivere a brevi periodi di freddo, e ripristina l'attività una volta che le temperature aumentano nuovamente (Birch et al., 2021).

L'esatta soglia di temperatura minima che induce il torpore sembrerebbe dipendere da quanto rapidamente gli animali vengono raffreddati, e probabilmente cambia di specie in specie: già a partire da temperature di circa 5 °C i livelli di attività dei granchi bruni (*Cancer maenas*) (Young et al., 2006) cominciano a ridursi. In uno studio che confrontava gruppi di granchi bruni che vivevano in acque più o meno calde in Norvegia, è emerso che i granchi di entrambe le popolazioni avevano preferenze per l'acqua di circa 12,5-14 °C, e se raffreddati, il 50% non era in grado di raddrizzarsi quando capovolto, una volta che le temperature scendevano a 1,3 °C. Non è noto se temperature prossime allo zero causino nocicezione o dolore nei decapodi, ma la ricerca in questo ambito è necessaria soprattutto perché l'assunto che il raffreddamento estremo abbia effetti anestetici è in diretto conflitto con la possibilità che possa causare evitamento, nocicezione o dolore (Birch et al., 2021). Anche negli esseri umani questo paradosso è presente, perché le temperature molto fredde possono causare dolore ma possono anche assopire altre fonti di dolore (Yin et al., 2015), quindi la situazione può essere complessa anche nei decapodi (Birch et al., 2021). In genere, la nocicezione del freddo non è ben compresa tra le specie e potrebbe essersi evoluta più tardi rispetto alla nocicezione del calore (Smith & Lewin, 2009). È interessante notare che, sebbene il canale TRPA1 posseduto dai decapodi sia attivato dal freddo (oltre che da altri stimoli nocivi) nei roditori e nell'uomo, questo viene invece attivato dal calore in uno specifico insetto, la drosfila (Viswanath et al., 2003); non si può quindi dare per scontato che questo canale risponda al freddo nei decapodi (Birch et al., 2021).

Secondo Birch et al. (2021), questa rappresenta un'importante mancanza di evidenze: c'è la necessità di una migliore conoscenza delle temperature più basse che le specie dei decapodi

più importanti dal punto di vista commerciale possono tollerare, senza che queste rappresentino un rischio per la salute e il benessere.

Stoccaggio e trasporto fuori dall'acqua. Alcuni decapodi, specialmente i granchi marroni, i granchi verdi e le aragoste, possono tipicamente sopravvivere per due-tre giorni nello stoccaggio “asciutto”, a condizione che venga mantenuto un ambiente sufficientemente umido; questo viene definito come “stoccaggio umido” o “semi-asciutto” (Birch et al., 2021). I contenitori utilizzati per lo stoccaggio asciutto includono bonghi, vassoi, reti e scatole di polistirolo; le scatole di polistirolo contenenti materiale umido e impacchi di ghiaccio sono inoltre comunemente utilizzate per il trasporto di aragoste e granchi vivi per via aerea. È stato poi riscontrato che alcuni decapodi venivano conservati vivi sul fondo di frigoriferi (Jacklin & Combes, 2005).

Uno studio di Woll et al. (2010) ha analizzato gli effetti dello stoccaggio umido sui granchi marroni (*Cancer pagurus*), riportando che prodotti di scarto come l'ammonio cominciavano ad accumularsi nell'emolinfa (l'acqua di mare è necessaria per eliminarla). Secondo Birch et al. (2021), l'accumulo di prodotti di scarto potrebbe causare sofferenza, ma non ci sono prove sufficienti per confermare questa ipotesi. Woll et al. ha riscontrato che *“Per i granchi esposti a 10 °C ed a 5 °C, l'emersione (rimozione dall'acqua) per trentasei ore e settantadue ore, rispettivamente, non sembrava avere conseguenze negative sugli animali”* (Woll et al., 2010). Conseguenze negative per la salute sono state riscontrate in granchi che erano già deboli o moribondi, ed in granchi esposti a temperature superiori ai 10 °C (vedi anche “esposizione a temperature inadeguate”). Questo è in linea con la raccomandazione di Seafish a non eccedere una temperatura di 8 °C.

Un aspetto chiave del rischio al benessere dei decapodi (non anfibi) è l'ipossia (mancanza di ossigeno), che causa l'accumulo di lattato nei tessuti a causa di respirazione anaerobica. Negli esseri umani questo accumulo di lattato è doloroso, ma non è stato confermato (per una mancanza di evidenze), che questo fenomeno sia doloroso anche per i decapodi (Birch et al., 2021). L'ipossia può avvenire quando l'animale viene rimosso dall'acqua, perché le branchie possono collassare; i decapodi sono esposti all'aria durante lo stoccaggio umido, ma talvolta anche quando aspettano di essere trasferiti nei veicoli o nei contenitori di stoccaggio: durante un trasporto dal Regno Unito al Portogallo, i granchi venivano temporaneamente (fino a due

ore) lasciati in dei cesti asciutti, mentre venivano caricati in un camion (Barrento et al., 2010). I granchi che venivano poi messi all'interno delle vasche nella fila più alta erano lasciati nelle ceste un'ora in più rispetto a quelli posizionati nella fila più bassa, e avevano maggiori L-lattato nell'emolinfa, acidità ed emocianina prima del viaggio. Inoltre, il loro PH emolinfatico era rimasto inferiore a quello dei granchi posizionati sul fondo anche dopo un viaggio di cinquantotto ore (Barrento et al., 2010). L'ipossia può avvenire anche quando è presente acqua di mare con bassi livelli di ossigeno; la saturazione dell'ossigeno può diventare bassa per molte ragioni, incluse il riscaldamento dell'acqua oppure un sovrappopolamento di animali nell'acqua (Birch et al., 2021). In uno studio di Lorenzon et al. (2008), i granchi avevano un minor tasso di mortalità e livelli più bassi di emolinfa lattato dopo trentasei ore di trasporto commerciale in contenitori umidi rispetto che nell'acqua di mare (entrambi a 10-13°C); gli autori hanno concluso che l'acqua di mare fosse di scarsa qualità (bassi livello di ossigeno ma anche presenza di contaminazioni). L'ossigenazione dell'acqua di mare nel suddetto camion durante il viaggio in Portogallo è iniziata a soli 3,5 mg l⁻¹ ed è diminuita durante il viaggio a 2,8 mg l⁻¹, che è appena al di sotto del livello di saturazione minimo suggerito per i granchi (Barrento et al., 2010). Mantenere l'acqua di mare pulita e ben areata può essere difficile, ma è molto importante (Jacklin & Combes, 2005).

Altri autori hanno trovato che il trasporto in acqua di mare a 12 °C, così come il trasporto umido a 4-8 °C, erano ugualmente fattibili in termini di bassa mortalità e di bassi livelli di emolinfa lattato e di glucosio nei granchi marroni (Barrento et al., 2011, 2012). Secondo Birch et al. (2021), non si può affermare semplicemente che il deposito in acqua sia sempre preferibile al trasporto fuori dall'acqua: molto dipende infatti dalla sua qualità e temperatura; la durata massima di un deposito umido per queste specie dovrebbe essere secondo gli autori studiata a fondo, in modo da prevenire situazioni di sofferenza.

Mancanza di cibo. I decapodi in depositi a medio e a lungo termine, come le aragoste, sono spesso privati del cibo, spesso per prevenire contaminazioni dell'acqua dovute al cibo scartato. Le aragoste possono sopravvivere senza avere una perdita di peso significativa, così come senza il rischio di un aumento della mortalità dovuta a diverse settimane senza cibo (vedere ad esempio Siikavuopio et al., 2018), sebbene esistano differenze tra le specie (Sacristàn et al., 2017). In natura, i decapodi rispondono a periodi di digiuno come parte integrante del loro ciclo

di muta (Lipcius & Herrnkind, 1982). I decapodi in muta sono stati recentemente eclissati dall'industria, perché la loro carne è molto acquosa e il loro guscio morbido li rende vulnerabili ai danni; quindi, gli individui immagazzinati sono principalmente animali motivati a nutrirsi, e una piccola percentuale pronta per la muta senza quindi la necessità di nutrirsi (Birch et al., 2021). Quando le aragoste (*Homarus gammarus*) europee in fase di muta venivano mantenute per ventiquattro settimane a 4, 8, o 12°C e nutrite o meno durante quel periodo, è stato dimostrato che l'acqua più fresca era un elemento fondamentale per far fronte alla mancanza di cibo nel caso delle aragoste non nutrite (Albat et al., 2019). In particolare, a 12 °C le aragoste non nutrite mostravano un'attività fenolossidasi significativamente maggiore nell'emolinfa, e una maggiore concentrazione di acqua nel muscolo e nella composizione lipidica dell'epatopancreas, rispetto a tutti gli altri gruppi. I granchi della neve (*Chionoecetes opilio*) non nutriti, tenuti per cento giorni a 5 °C, hanno mostrato una riduzione significativamente maggiore nella massa dell'epatopancreas rispetto agli individui nutriti, ma questo non ha avuto effetto sui tassi di mortalità (Siikavuopio et al., 2019). Secondo Birch et al. (2021), la resilienza alla fame a basse temperature in termini di peso corporeo e mortalità, suggerisce che la mancanza di cibo potrebbe rappresentare pochi problemi per il benessere, considerando inoltre il fatto che il digiuno ha degli effetti fisiologici gradualmente.

Mancanza di accesso a ripari bui. I decapodi in natura trascorrono gran parte del loro tempo in ripari bui: messi in condizione di scelta tra una zona illuminata e un riparo buio, i granchi preferiscono tipicamente il riparo buio (per esempio Barr & Elwood, 2011; Hamilton et al., 2016). I gamberi di fiume (*Procambarus clarkii*) in uno stato "ansioso" evitano le zone luminose (Fossat et al., 2014, 2015). Data questa avversione alla luce, è chiaro che una buona pratica per il maneggiamento dei decapodi debba comprendere l'accesso ad ambienti scuri. Questo viene già raccomandato da Seafish in una delle loro "dieci regole d'oro" per il maneggiamento dei crostacei (Jacklin & Combes, 2005). C'è evidenza (ottenuta dal gruppo Crustacean Compassion) del fatto che i supermercati che vendono aragoste vive nel Regno Unito non forniscono comunemente l'accesso a ripari bui (Carder, 2017) e mettono in mostra le aragoste sotto una forte illuminazione (Crustacean Compassion, 2020).

Vendita al dettaglio. I crostacei decapodi vivi possono essere ordinati su Amazon e da altri rivenditori online (Birch et al., 2021). Secondo fonti del settore, solo gli animali importati (dagli Stati Uniti e dal Canada) vengono venduti in questo modo, sebbene non sia stato verificato in maniera indipendente. Non c'è modo di garantire un maneggiamento sensibile al benessere di questi animali, quando questi vengono consegnati a una casa privata. Questa pratica crea intrinsecamente il rischio di un maneggiamento scorretto e di metodi di macellazione inappropriati. Porre fine a questa pratica sarebbe un intervento a basso costo per migliorare il benessere dei decapodi.

Grossisti e supermercati. Un rapporto da parte del gruppo Crustacean Compassion (2020) ha descritto i consigli ampiamente incoerenti che venivano forniti ai clienti che acquistavano aragoste vive dai grossisti del Regno Unito: consigli su come trasportare, immagazzinare o macellare efficacemente gli animali. Secondo Birch et al. (2021), c'è dunque bisogno di un codice di buona pratica applicabile per quanto riguarda la consulenza e la formazione fornite in questi contesti. Secondo gli autori, gli animali vivi dovrebbero essere venduti solo a clienti che sono stati formati sui metodi di maneggiamento e macellazione appropriati. Birch et al. (2021) hanno concluso un alto livello di confidenza per il fatto che la rimozione di una o entrambe le chele del granchio, prima che questo sia messo nuovamente in acqua, causi sofferenza. Lo stesso vale per il taglio del tendine (tagliare il tendine della chela del granchio), che rappresenta con molta probabilità un rischio per la salute di questi animali. È stato inoltre concluso un livello di confidenza molto alto per il fatto che un buon livello di benessere durante il trasporto e lo stoccaggio richieda una densità di stoccaggio appropriata, l'accesso a ripari bui e a temperature fresche (per stoccaggi umidi, non più di 8 °C). Per di più, decapodi importati vivi possono essere ordinati da rivenditori online, e Birch et al. (2021) sono molto sicuri del fatto che questa pratica crei il rischio di un maneggiamento di scarsa qualità e di metodi di macellazione inappropriati.

4.4 Stordimento dei decapodi

Roth e Øines (2010), hanno concluso che lo stordimento elettrico non sia il metodo più etico per macellare i granchi edibili (*Cancer pagurus*). Ad ogni modo, visto che è l'unico metodo efficace in tempi brevi (ci vuole un secondo per applicarlo), è stato considerato preferibile al raffreddamento, alla bollitura e all'utilizzo della CO₂. Lo stordimento pre-macellazione è un requisito legale in Nuova Zelanda ed in Svizzera. Nel Regno Unito due aziende producono la maggior parte dei materiali per lo stordimento: Mitchell e Cooper Ltd (Crustastun) e Polar System Ltd. I macchinari Crustastun sono progettati per stordire e uccidere aragoste, granchi e gamberi. L'azienda produce sia unità per singoli animali, che uno storditore destinato al commercio dei crostacei su larga scala. Polar System produce invece un solo storditore su larga scala.

In alcuni studi non sottoposti a peer-review reperibili online, Neil (2010, 2012) ha rimosso il carapace da sei soggetti trattati (Crustastun: 110 V, 2-5 A, 10s) e da sei soggetti di controllo appartenenti a quattro specie: aragosta (*Homarus gammarus*), aragosta della Norvegia (*Nephrops norvegicus*), granchio di riva (*Carcinus maenas*) e granchio marrone (*Cancer pagurus*). Questo intervento ha esposto i nervi del sistema nervoso centrale (connettivo circumesofageo e, nelle aragoste, cordone nervoso ventrale addominale) e periferico (zampe). La procedura Crustastun solitamente terminava tutta l'attività neurale rilevabile. I soggetti sottoposti a scosse elettriche non effettuavano autotomia, non muovevano le zampe, gli occhi o le antenne, né si riprendevano (Roth & Grimsbø, 2016; Roth & Øines 2010; Weineck et al., 2018). L'unica eccezione ha riguardato due granchi di riva, che hanno entrambi mostrato un ripristino neuronale in una delle tre zampe testate (ma non del sistema nervoso centrale). Uno studio non sottoposto a peer-review di Albalat et al. (2008) ha dimostrato inoltre che Crustastun può uccidere le aragoste (*Nephrops norvegicus*). Secondo Birch et al. (2021), ciò suggerisce l'efficacia del Crustastun, ma poiché i risultati non sono stati formalmente sottoposti ad una peer-review, consentono solo un livello medio di confidenza.

In un altro studio non sottoposto a peer-review sugli effetti fisiologici del crustastun, Neil e Thompson (2012) hanno sottoposto sei aragoste (*Homarus gammarus*) e sei granchi marroni (*Cancer pagurus*) a scosse elettriche. Hanno confrontato la concentrazione di emolinfa lattato

di questi animali con quella di altri sei di ogni specie, i quali erano stati esposti alle stesse procedure di manipolazione ma non alle scosse elettriche (gruppo di controllo). Ogni soggetto sottoposto al trattamento Crustastun è morto, mentre tutti i soggetti di controllo erano ancora vivi dopo una settimana. La procedura di manipolazione aveva aumentato in modo significativo le concentrazioni di emolinfa lattata sia nelle aragoste che nei granchi, e questo aumento non era significativamente diverso tra il gruppo sottoposto a Crustastun e il gruppo di controllo. Gli autori interpretano questo risultato come indicativo del fatto che lo stordimento elettrico non aumenti i livelli di stress fino a raggiungere e superare quelli causati dalla manipolazione, dall'emersione, e dal prelievo di sangue, ma che l'assenza di un risultato significativo non dimostrerebbe l'assenza di un effetto. A questo riguardo uno studio sottoposto a peer-review di Elwood & Adams (2015) ha trovato che, analizzando i livelli di attività, i granchi di riva (*Carcinus maenas*) esposti ad una scossa elettrica più debole per un periodo di tempo più breve, mostravano maggiori livelli di emolinfa lattata rispetto al gruppo di controllo.

Nonostante i risultati di Neil e Thompson (2012) suggeriscano che Crustastun non causi un estremo stress fisiologico, non è possibile concludere che questo trattamento sia indolore (Stevens et al., 2016); altri studi hanno dimostrato che lo stress è, per esempio, un potenziale indicatore di dolore (Elwood, 2016).

Fregin & Bickmeyer (2016), in uno studio sottoposto a peer-review, hanno scoperto che il Crustastun induceva nelle aragoste un modello convulsivo di aumento dell'attività neurale con l'impostazione "cinque secondi", oppure "dieci secondi", a cui si aggiungeva un'assenza di responsività comportamentale in seguito a stimolazione meccanica della durata compresa tra i dieci e i sessanta minuti. Nei gamberi, il Crustastun induceva stati simili a convulsioni "occasional", mentre un dispositivo alternativo (un dispositivo "LAVES" progettato per lo stordimento delle trote) ha indotto stati simili a convulsioni in modo regolare. Hanno scoperto che quando i gamberi venivano lasciati cadere in acqua bollente dopo aver indotto uno stato simile a convulsioni, la risposta neurale era molto ridotta rispetto ai controlli, ma non assente. Fregin e Bickmeyer hanno riassunto le loro scoperte come segue: *"Lo stordimento elettrico induce convulsioni epilettiformi, ma paralizza gli animali e porta ad un declino reversibile dell'attività del sistema nervoso dopo le convulsioni"*.

Come evidenziato da Birch et al. (2021), non è possibile sapere con esattezza cosa provi l'animale quando vengono indotti questi stati neurali attraverso lo stordimento elettrico; una

diminuita attività neurale ed una mancanza di responsività comportamentale sono compatibili con un'anestesia totale (la quale non implica la totale assenza di attività neurale), ma sono compatibili anche con qualche forma di esperienza cosciente continuativa (Alkire et al., 2008). Gli autori non sono quindi stati in grado di concludere che lo stordimento elettrico produca un'anestesia totale, sebbene un altro studio abbia trovato che le scosse elettriche fermerebbero e ridurrebbero il battito cardiaco nel *Procambarus clarkii* e nel *Litopenaeus vannamei* (Weineck et al., 2018).

Secondo Birch et al. (2021), lo stordimento elettrico può essere considerato uno strumento etico in base ai parametri elettrici che vengono utilizzati: tali parametri devono essere regolati in base alla specie, alla taglia, allo stadio di sviluppo e allo stadio di muta degli animali.

L'anestesia farmacologica è una possibile alternativa allo stordimento elettrico: i due candidati principali sono l'olio di chiodi di garofano e AQUI-S, il principio attivo di entrambi questi prodotti è l'eugenolo (4-allil-2-metossifenolo) (Birch et al., 2021). AQUI-S è stato approvato come anestetico per i pesci (Andreson et al., 1997; Keene et al., 1998; Soto, 1995) destinati al consumo umano in Nuova Zelanda, Australia, Cile, Corea del Sud, Costa Rica, Honduras e Norvegia, ma non in Unione Europea o in USA (Priborsky & Velisek, 2018).

Diversi studi indicano che l'olio di chiodi di garofano e l'AQUI-S immobilizzano i crostacei: l'eugenolo ha immobilizzato i granchi a macchie di sangue (*Portunus sanguinolentus*) in quattordici minuti, con un recupero che ha richiesto quarantadue minuti (olio di chiodi di garofano: 0,2 ml/l; Premarathna et al., 2016); per immobilizzare i granchi giganti australiani (*Pseudocarcinus gigas*) ci sono voluti trenta minuti, con un recupero raggiunto in quarantadue minuti (olio di chiodi di garofano: 0,125 ml/l; AQUI-S: 0,5 ml/l; Gardner, 1997). Tuttavia, uno studio su tre specie di granchi del Pacifico ha riportato tempi di induzione molto più lunghi, fino a centottantotto minuti nei granchi costieri pelosi (*Hemigrapsus oregonensis*; olio di chiodi di garofano: 1-3 ml/l; Morgan et al., 2001). Il recupero ha richiesto sessantacinque minuti per i granchi costieri, ma solo dieci minuti per i granchi dungeness (*Cancer magister*; olio di chiodi di garofano: 0,5-1,5 ml/l), e dieci minuti per i granchi kelp (*Pugettia producta*; olio di chiodi di garofano: 0,015-0,25 ml/l). L'eugenolo immobilizza anche altri crostacei, tra cui le aragoste (*Homarus americanus*, Waterstrat & Pinkham, 2005; *Nephrops norvegicus*, Cowing et al., 2015), e i gamberi (*Cherax quadricarinatus*, Ghanawi et al., 2019; *Macrobrachium rosenbergii*, Coyle et al., 2005, *Penaeus monodon*, Cai et al., 2012). Tuttavia, questi studi farmacologici utilizzano

tipicamente indicatori comportamentali di stordimento che non distinguono tra anestesia e paralisi, e anche la modalità di azione dell'eugenolo è poco compresa: per questi motivi saranno necessarie in futuro ulteriori ricerche (Birch et al., 2021).

Come riportato da Birch et al. (2021), il raffreddamento è un'altra tecnica di stordimento utilizzata; i crostacei sono infatti animali "a sangue freddo" (ectotermici): fanno affidamento sul calore esterno per mantenere stabile la propria temperatura corporea. Quando le temperature esterne scendono al di sotto di una certa soglia, i crostacei entrano in uno stato di torpore: questo li fa immobilizzare, prevenendo così l'autotomia e l'aggressione tra individui; inoltre, il torpore facilita anche la distruzione del centro nervoso, permettendo un'uccisione più veloce e etica.

Fregin & Bickmeyer (2016) hanno tenuto delle aragoste (*Homarus gammarus* e *Homarus americanus*) e dei gamberi di fiume (*Astacus astaus* e *Astacus Leptodactilus*) in un impasto di ghiaccio fatto con acqua di rubinetto a 0 °C, o in uno composto di acqua di mare a -1,8 °C per un'ora. Dopo un'ora, l'attività neurale era ancora rilevabile in entrambe le condizioni; ma secondo Birch et al. (2021) questo non sarebbe conclusivo: l'attività neurale da sola non implica coscienza, ma l'assenza di attività neurale, se misurata in modo affidabile, può indicare incoscienza. Weineck et al. (2018) hanno immerso il granchio blu (*Callinectes sapidus*), il gambero rosso di palude (*Procambarus clarkii*) e il gambero bianco (*Litopenaeus vannamei*) in un impasto di ghiaccio della temperatura compresa tra gli 0 e i 4 °C. La frequenza cardiaca è diminuita in tutte e tre le specie, sebbene la maggior parte dei granchi mantenesse ancora una frequenza cardiaca dopo cinque minuti. I granchi hanno anche mostrato un'elaborazione neurale centrale per i riflessi muscolari dopo due minuti. Lo shock dato dal freddo non ha influenzato i livelli di emolinfa serotonina o octopamina, né nei granchi che nei gamberi. Le aragoste (*Homarus americanus*), le aragoste spinate (*Panulirus japonicus*), e i gamberi (*Penaeus japonicus*) hanno neuroni sensibili al freddo nel loro cordone nervoso ventrale, i quali aumentano la loro velocità di attivazione man mano che la temperatura diminuisce all'interno di un range di 0,5-5.5°C (Tani & Kuramoto, 1998). Puri & Faulkes (2015) non hanno trovato evidenze di nocicettori sensibili al freddo nei gamberi (*Procambarus clarkii*), ma questo studio ha utilizzato stimoli molto più freddi (-78°C) rispetto a quelli utilizzati con i metodi di raffreddamento convenzionali o in normali condizioni ecologiche.

Secondo Birch et al. (2021) sono quindi necessarie ulteriori ricerche per stabilire se il raffreddamento sia di per sé doloroso, ed è importante ricordare come questo possa cambiare in diverse specie di decapodi. La letteratura esistente lascia aperta la possibilità che l'immobilizzazione indotta dal freddo lasci i crostacei suscettibili al dolore indotto da eventuali procedure successive.

Da un punto di vista di benessere, i crostacei dovrebbero essere storditi prima della macellazione: lo stordimento elettrico e farmacologico sono gli approcci più promettenti (Birch et al., 2021). La Humane Slaughter Association sta attualmente finanziando la ricerca su metodi efficaci di stordimento e macellazione dei crostacei: i risultati potrebbero migliorare la praticità e la fattibilità a livello commerciale dello stordimento elettrico.

Secondo gli autori, lo stordimento elettrico ha le potenzialità per essere un metodo efficace, ma deve garantire di rendere gli animali incoscienti; Birch et al. (2021) fanno infatti notare che in molti degli esperimenti trattati nel capitolo tre, le scosse elettriche rappresentavano lo stimolo che induceva il dolore. Un voltaggio più alto e una durata maggiore delle scosse elettriche possono stordire, e a voltaggi maggiori o prolungati, uccidere i crostacei.

In sintesi, Birch et al. (2021) hanno concluso un livello di certezza medio rispetto al fatto che lo stordimento elettrico sia efficace nel rendere i decapodi incoscienti: ci sono prove del fatto che lo stordimento produce uno stato simile a convulsioni, durante le quali l'animale non risponde ed è, con tutta probabilità, incosciente. Secondo Birch et al. (2021), lo stordimento di tipo farmacologico è efficace per immobilizzare gli animali, ma la sua efficacia nel renderli incoscienti non è ancora chiara. Gli autori non sono inoltre convinti che il freddo renda i decapodi incoscienti: questo può infatti paralizzare i crostacei senza anestetizzarli. Questo metodo è stato inoltre vietato in Svizzera e in alcune parti d'Italia.

4.5 Uccisione meccanica (dispatch) dei decapodi

Birch et al. (2021) considerano i metodi del doppio *spiking* (perforazione del cervello e del nervo ventrale in rapida successione) per i granchi e di *splitting* (scissione) completa del corpo per le aragoste quali metodi di macellazione ragionevoli, viste le attuali evidenze. Hanno invece

stabilito maggiori rischi per il benessere associati allo spiking singolo, alla scissione (*splitting*) della sola testa, al *tailing* (separazione dell'addome dal torace) e all'utilizzo dell'alta pressione.

A differenza dei vertebrati, i crostacei hanno un sistema nervoso decentralizzato: i granchi hanno due gruppi nervosi principali (gangli) e le aragoste hanno tredici gangli interconnessi lungo il cordone nervoso ventrale, questo comporta che i metodi che prendono di mira solo il cervello non uccideranno necessariamente l'animale in modo rapido (Roth & Øines, 2010). Lo spiking comporta il perforare la parte inferiore con una punta distruggendo i gangli, e come riportato da Birch et al. (2021) questo metodo è consigliato per i granchi, perché il cervello (o ganglio cerebrale) e la massa del nervo ventrale (o ganglio toracico) possono essere entrambi perforati in rapida successione attraverso una procedura nota come "doppio spiking". Uno dei primi studi per la Federazione Universitaria per il Benessere degli Animali (UFAW) raccomandava il doppio spiking come metodo più etico per la macellazione dei granchi (Baker, 1955) sebbene non sia istantaneo (Birch et al., 2021). Il metodo dello spiking non è invece adatto per le aragoste, perché la loro catena di gangli non può essere perforata individualmente in modo rapido e preciso. Secondo Birch et al. (2021), per distruggere tutti e tredici i gangli, la superficie inferiore delle aragoste deve essere tagliata lungo la linea mediana longitudinale usando un coltello: questo processo è noto come *splitting* (scissione); tuttavia, la scissione della testa lascia intatti i gangli posteriori, aumentando le possibilità di sopravvivenza. Per questo motivo, Birch et al. (2021), consigliano che le aragoste vengano divise dalla testa alla coda distruggendo tutti e tredici i gangli in modo da uccidere l'animale. La scissione dell'intero corpo dovrebbe inoltre richiedere meno di dieci secondi se eseguita da un professionista esperto, ma gli autori notano che esiste il rischio che la procedura non riesca a uccidere rapidamente l'animale se eseguita in modo errato da una persona non correttamente addestrata.

La procedura del *tailing* prevede la separazione del torace dall'addome. Nei vasi dei nefropi, ad esempio, l'addome è attorcigliato lontano dal torace (fonti del settore). Vasi di grandi dimensioni possono refrigerare preventivamente i nefropi inducendo l'immobilità, ma senza necessariamente ottenere un'anestesia. Mentre lo spiking e lo *splitting* (se eseguiti correttamente) distruggono tutti i gangli dell'animale, la procedura del *tailing* non lo fa.

La lavorazione ad alta pressione comporta l'esposizione di lotti di crostacei ad una pressione dell'acqua molto elevata (Birch et al., 2021). Si afferma che la lavorazione ad alta pressione uccida i crostacei in meno di sei secondi, equivalente alle procedure di spiking e di splitting (fonti del settore). Ad ogni modo, secondo Birch et al. (2021) non esistono prove scientifiche che confermino questa tesi; inoltre, secondo gli autori, la lavorazione ad alta pressione senza un efficace stordimento preliminare può potenzialmente causare dolore.

In sintesi, la rapida distruzione di ogni ganglio prima di ulteriori processi (come la bollitura, il congelamento o la macellazione a pezzi) assicura che l'animale sia morto e che non provi ulteriore dolore. Tuttavia, tutti i metodi di macellazione meccanici manuali richiedono diversi secondi per essere eseguiti, e lasciano talvolta intatti i gangli. Idealmente, i crostacei dovrebbero quindi essere storditi prima di essere uccisi (Birch et al., 2021).

4.6 Uccisione dei decapodi mediante temperature estreme

Birch et al. (2021) hanno concluso un alto livello di confidenza per il fatto che il refrigeramento nel congelatore sia un metodo di macellazione non etico, in quanto fa sì che l'animale muoia in più di un'ora. Lo stesso livello di confidenza è stato concluso per la bollitura da vivo (senza un precedente stordimento), che è quindi da considerarsi un metodo non etico per decapodi relativamente grandi, i quali potrebbero metterci più di due minuti a morire. È stato inoltre raggiunto un livello di confidenza basso per il fatto che l'aumento graduale della temperatura dell'acqua rappresenti un metodo più etico rispetto alla bollitura dal vivo. Di seguito è riportata un'analisi dettagliata dei diversi metodi di uccisione (refrigeramento, bollitura) mediante temperature estreme.

Refrigeramento. I decapodi vengono talvolta uccisi utilizzando temperature estremamente basse. Le preoccupazioni per il benessere portate a galla nella sezione sullo stordimento si applicano anche qui: il sistema nervoso continua ad essere attivo dopo il refrigeramento, lo scioglimento del ghiaccio può causare uno shock osmotico e la morte può sopraggiungere

lentamente (Birch et al., 2021). Gardner (2004) ha evidenziato che questo metodo di uccisione è lento, inefficace e avversivo. Come notato nel capitolo cinque, l'evidenza non è conclusiva rispetto a questo problema, e c'è evidenza di neuroni sensibili al freddo (Tani & Kuramoto, 1998), ma non è stato possibile identificare i nocicettori sensibili al freddo nei crostacei (Puri & Faulkes, 2015). Se ricerche future confermeranno che questi nocicettori non esistono a diverse temperature in più specie, allora le basse temperature potranno essere concepite come un metodo di uccisione etico (Birch et al., 2021). La refrigerazione è inoltre un metodo di uccisione comune nelle cucine domestiche, e questo crea diversi problemi, perché a differenza degli abbattitori di temperatura commerciali, i congelatori domestici non riducono rapidamente la temperatura; in questo modo, i crostacei nei congelatori domestici ci metteranno più di un'ora a morire (Roth & Øines, 2010). Inoltre, è stato scoperto che i granchi edibili praticano l'autotomia durante il congelamento (Roth & Øines, 2010) e secondo Birch et al. (2021) questo rappresenta un indicatore affidabile di sofferenza, che fornisce notevoli prove a favore della senienza (vedere il capitolo 3). Questa sofferenza prolungata può essere peggiore dei metodi rapidi che non vengono considerati etici (ad esempio la bollitura).

Bollitura. La bollitura è probabilmente il metodo di uccisione più controverso, essendo stato vietato da diverse giurisdizioni (Svizzera, Nuova Zelanda e parti dell'Italia). L'immersione in acqua bollente è invece comune nei ristoranti e nelle cucine domestiche del Regno Unito per quanto riguarda aragoste, nefropi, piccoli granchi, gamberi, nonché a bordo delle navi per quanto riguarda i gamberi marroni.

La bollitura provoca diversi sintomi comportamentali e fisiologici di angoscia: Baker (1955) ha scoperto che i granchi commestibili (*Cancer pagurus*) immersi in acqua bollente praticavano rapidamente l'autotomia e mostravano segni comportamentali di angoscia, come movimenti scoordinati e tentativi di fuga. Lavori più recenti su aragoste e seppie non hanno osservato tali comportamenti, ma hanno scoperto che un'intensa attività neurale è continuata fino a trentacinque secondi dopo l'immersione (Fregin & Bickmeyer, 2016). Ciò suggerisce un periodo di sensibilità che arriva fino a due minuti e mezzo, comportando potenzialmente un'estrema sofferenza. Gli individui più piccoli morivano molto più velocemente di quelli più grandi, suggerendo che la bollitura comporta sofferenze meno prolungate per i crostacei più

piccoli (come i gamberi). La stima di due minuti e mezzo è in linea con la stima di Roth e Øines (2010), ottenuta con un metodo diverso.

Per affrontare i problemi al benessere legati alla bollitura viva, alcuni autori hanno raccomandato di immergere i crostacei in acqua fredda e di aumentare lentamente la temperatura (ad esempio di 1 °C al minuto): utilizzando questo metodo alcuni studi hanno mostrato che i granchi, le aragoste e i gamberi non hanno risposte comportamentali che indicano dolore e angoscia (come, ad esempio, il movimento della coda o il comportamento di fuga; Fregin & Bickmeyer, 2016; Gunter, 1961). Fregin & Bickmeyer (2016) hanno anche osservato che l'attività elettrica del sistema nervoso centrale diminuisce, fino a scomparire, sopra i 32°C nelle aragoste (*Homarus gammarus* e *Homarus americanus*) e nei gamberi (*Astacus astacus* e *Astacus leptodactylus*).

Tuttavia, in altri studi, i granchi commestibili riscaldati lentamente (*Cancer pagurus*; Baker, 1955) e i gamberi rossi di palude (*Procambarus clarkii*; Adams et al., 2019) hanno mostrato comportamenti che indicavano angoscia, inclusi tentativi di fuga, movimenti scoordinati e autotomia. Adams et al. (2019) ha scoperto che nonostante sembrassero morti, i gamberi immobilizzati avevano ancora un battito cardiaco a 40 °C. Alterazioni del battito cardiaco in risposta al tatto e al recupero dei neuroni sensoriali sono state registrate fino a 44 °C, indicando un sistema nervoso funzionale in crostacei apparentemente non responsivi. Secondo Birch et al. (2021), una mancanza di risposte comportamentali alla bollitura potrebbe quindi non indicare un'anestesia totale. Per questo motivo gli autori non hanno potuto raggiungere un medio livello di confidenza del fatto che aumentare gradualmente la temperatura dell'acqua (senza stordimento preventivo) sia più etico del far cadere l'animale direttamente nell'acqua bollente: c'è ancora un serio rischio che questo causi sofferenza per un periodo di alcuni minuti.

4.7 Uccisione dei decapodi utilizzando l'immersione in acqua dolce

Secondo quanto riportato da Birch et al. (2021), i crostacei immersi (affogati) in acqua dolce vengono solitamente lasciati per tutta la notte. Baker (1995) ha riportato che un granchio commestibile (*Cancer pagurus*) immerso in acqua dolce mostrava segni di angoscia, come movimenti scoordinati e aumento di respirazione. Dopo dieci minuti, i granchi giganti

australiani (*Pseudocarcinus gigas*) praticavano l'autotomia e la lacerazione degli arti e dell'addome (Gardner, 1997).

Birch et al. (2021) hanno concluso un alto livello di confidenza per il fatto che l'immersione in acqua dolce sia un metodo di uccisione non etico, e dal punto di vista del benessere non può essere quindi raccomandato: l'immersione in acqua dolce può portare a sofferenza più prolungata rispetto ai metodi più veloci considerati non etici come la bollitura.

4.8 Decapodi nell'acquacoltura

L'ablazione del gambo oculare è una pratica comune, a livello internazionale, nell'acquacoltura dei gamberi, e secondo Birch et al. (2021) questo rappresenta un serio rischio al benessere, nel caso in cui questi animali siano senzienti.

L'ablazione del gambo oculare è una pratica controversa nell'acquacoltura dei gamberi, che comporta la rimozione di uno o entrambi i peduncoli oculari di una femmina di gambero matura (in fase riproduttiva) con lo scopo di indurre la produzione di uova. Uno studio di Taylor et al. (2004) sul *Litopenaeus vannamei* ha messo in luce il fatto che l'ablazione del gambo oculare provoca una reazione di contraccolpo; è stato quindi raccomandato l'uso di un anestetico (lidocaina) per smorzare questa reazione.

Un altro studio di Diarte-Plata et al. (2012) ha trovato che i gamberi (*M. americanum*) su cui era stata eseguita l'ablazione avevano molte più probabilità di muovere la coda e di sfregare il sito della ferita rispetto al gruppo di controllo senza ablazione. Hanno scoperto che coprire la ferita riduceva significativamente queste risposte, e che anche la lidocaina le riduceva significativamente.

Anche se Birch et al. (2021) non hanno trovato molte prove per quanto riguarda la senzienza nei gamberi penaeidi (vedi il capitolo tre), sono molto sicuri che, se fossero senzienti, l'ablazione del gambo oculare rappresenterebbe un grave rischio per il benessere.

Negli ultimi anni, gli esperimenti con un approccio senza ablazione di Zacarias et al. (2019, 2021) hanno suggerito che l'ablazione del gambo oculare potrebbe non essere necessaria in un'acquacoltura di gamberi economicamente sostenibile, e che evitarla porterebbe a migliori

prestazioni riproduttive da parte delle femmine, così come a cuccioli più resistenti e con tassi di mortalità inferiori.

5. RACCOMANDAZIONI FINALI

Secondo Birch et al. (2021), una ferita alla testa con lo scopo di immobilizzare l'animale senza ucciderlo in modo immediato non garantisce una perdita di sensi; per questo motivo non possono essere raccomandati lo spiking singolo, il taglio della testa e nemmeno il tailing. Birch et al. (2021) sconsigliano inoltre la macellazione mediante immersione in acqua dolce, mediante bollitura rapida, attraverso l'innalzamento lento della temperatura dell'acqua o (non esistono abbastanza evidenze a tal riguardo) attraverso il refrigeramento. In sintesi, non si può fare affidamento su questi metodi per uccidere l'animale il più rapidamente possibile.

Birch et al. (2021), in conclusione, raccomandano i seguenti interventi a basso costo per migliorare il benessere dei decapodi:

un divieto sulla vendita di crostacei decapodi vivi a persone non esperte, in quanto questa pratica porta il rischio di un maneggiamento di scarsa qualità e di metodi di macellazione inappropriati;

lo sviluppo di metodi di macellazione affidabili e veloci per i decapodi, come ha riconosciuto la Humane Slaughter Association. Secondo Birch et al. (2021), la politica in questo settore deve infatti riconoscere che in futuro potrebbero essere disponibili metodi di stordimento e di macellazione più etici e che le prove a favore di un particolare metodo o dispositivo sono attualmente limitate.

Birch et al. (2021) raccomandano, inoltre:

che regolamentazioni più chiare vengano prodotte per la macellazione dei decapodi, e che siano vietati i metodi di macellazione meno etici nei casi in cui metodi di macellazione più etici siano chiaramente disponibili: queste regolamentazioni dovrebbero includere tutti i casi in cui decapodi relativamente grandi (come granchi, aragoste o granchi di fiume) vengono macellati a terra;

che i seguenti metodi di macellazione vengano vietati in tutti i casi in cui un metodo di macellazione più etico sia disponibile, a meno che questi non siano preceduti da uno stordimento elettrico efficace: bollitura da vivo, innalzamento lento della temperatura dell'acqua, tailing, ogni altra forma di smembramento da vivo, e immersione in acqua dolce (shock osmotico). In riferimento a questo è utile notare che una revisione precedente (AHAW 2005) è giunta a raccomandazioni in accordo con quelle di Birch et al. (2021), così come ha fatto un'altra revisione più recente (Conte et al., 2021);

che i decapodi storditi non vengano macellati manualmente quando mostrano segni di recupero dallo stordimento, come una resistenza alla manipolazione, movimenti di controllo degli arti o reazioni al tocco degli occhi o delle parti della bocca; che ulteriori ricerche vengano prodotte sulla questione di come raggiungere uno stordimento elettrico efficace, e sulla questione di come lo stordimento elettrico può essere implementato quando i decapodi vengono macellati in mare;

che venga garantito l'accesso a rifugi bui e a temperature adeguate alle specie che li necessitano (per esempio 8 °C o meno per lo stoccaggio umido), e che vengano fatte ulteriori ricerche sulle esigenze di benessere dei decapodi, in grado di fornire informazioni più precise sui range di temperatura appropriati per le diverse specie. Per i granchi marroni (*Cancer pagurus*), è inoltre consigliato lo sviluppo e l'implementazione di alternative al nicking.

Le problematiche legate al benessere che riguardano i molluschi cefalopodi sono diverse: innanzitutto, c'è un'importante mancanza di prove riguardo ai metodi di macellazioni etici nei casi in cui questi animali vengano catturati da vivi; gli studi riportati da Birch et al. (2021) evidenziano come nelle acque europee siano attualmente in uso vari metodi, inclusi il bastonamento, il taglio del cervello, l'inversione del mantello, l'asfissia in reti sospese: tutti questi metodi sono ampiamente sconsigliati dagli autori. Un'altra problematica legata al benessere dei molluschi cefalopodi riguarda l'interesse crescente per gli allevamenti di polpi in altre parti del mondo (come in Spagna, in Australia, in Giappone e in Messico): i polpi sono infatti considerati animali solitari e sono spesso aggressivi con gli altri individui quando posti in

spazi confinati. Secondo Birch et al. (2021) un allevamento di polpi ad alto benessere è quindi impossibile.



Polpo immortalato nel Golfo di Napoli.

Credito per l'immagine: Antonio Colucci

Conclusioni

La rassegna di Birch et al. (2021) si è tradotta in un insieme di evidenze molto forti per quanto riguarda i polpi (ordine degli Octopodi) e forte per i granchi (infraordine Brachyura). Per altri cefalopodi coleoidi (calamari e seppie) e per qualche altro gruppo tassonomico dei decapodi (granchi anomurani, astacidi e gamberi caridei) le evidenze sono state invece moderate.

Birch et al. (2021) ci tengono però ad evidenziare come la quantità di evidenze per un dato gruppo tassonomico biologico dipenda ampiamente da quanta attenzione scientifica quel gruppo ha ricevuto in relazione alla senzienza: i polpi e i granchi hanno ricevuto, per esempio, molta attenzione scientifica, mentre i nautiloidi e i gamberi penaeidi sono stati studiati poco.

Le prove portate da Birch et al. (2021) sono state, in ogni caso, sufficienti per permettere l'inclusione sia dei molluschi cefalopodi, che dei crostacei decapodi, all'interno dello spettro degli animali protetti dall'*Animal Welfare Act* britannico, che ha quindi reso possibile classificare questi animali come senzienti. Nonostante l'argomento sia ancora in parte controverso, la speranza è che pian piano ogni stato si muova a favore del rispetto per diversi gruppi di animali, la cui sensibilità aspetta solo di essere compresa e riconosciuta.

Bibliografia:

Abramson, C. I., & Feinman, R. C. (1990). Lever-press conditioning in the crab. *Physiology & Behavior*, *48*, 267–72.

Abramson, C. I., & Feinman, R. D. (1987). Operant punishment of eye elevation in the green crab, *Carcinus maenas*. *Behavioral & Neural Biology*, *48*, 259-277.

Abramson, C. I., & Feinman, R. D. (1988). Classical conditioning of the eye withdrawal reflex in the green crab. *Journal of Neuroscience*, *8*(8), 2907-2912.

Adams, R., Stanley, C. E., Piana, E., & Cooper, R. L. (2019). Physiological and Behavioral Indicators to Measure Crustacean Welfare. *Animals*, *9*(11), 914.

Aggio, J., Ratikin, A., & Maldonado, H. (1996). Serotonin-induced short- and long-term sensitization in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, *53*, 441-448.

Agin, V., Chichery, R., Dickel, L. and Chichery, M. P. (2006). The ‘prawn-in-the-tube’ procedure in the cuttlefish: habituation or passive avoidance learning? *Learning & Memory*, *13*, 97-101.

Agin, V., Chichery, R., Maubert, E., & Chichery, M. P. (2003). Time-dependent effects of cycloheximide on long-term memory in the cuttlefish. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, *75*(1), 141-146.

Agin, V., Dickel, L., Chichery, R., & Chichery, M. P. (1998). Evidence for a specific short-term memory in the cuttlefish, *Sepia*. *Behavioural Processes*, *43*(3), 329-334.

Agin, V., Poirier, R., Chichery, R., Dickel, L., & Chichery, M. P. (2006). Developmental study of multiple memory stages in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Neurobiology of Learning & Memory*, *86*(3), 264-269. .

Aguado Giménez, F., & García García, B. (2002). Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier 1797: influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International*, 10, 361-377.

Albalat, A., Gornik, S., Theethakaew, C., and Neil, D. (2008) Evaluation of the Quality of Langoustines After Being Killed by the Crustastun Project Report. University of Glasgow, Glasgow, UK

Albalat, A., Gornik, S. G., Atkinson, R. J., Coombs, G. H., & Neil, D. M. (2009). Effect of capture method on the physiology and nucleotide breakdown products in the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). *Marine Biology Research*, 5, 441-450.

Alkire, M. T., Hudetz, A. G., & Tononi, G. (2008). Consciousness and anaesthesia. *Science*, 322, 876-880. <https://dx.doi.org/10.1126/science.1149213>

Allen, A., Michels, J., & Young, J. Z. (1985). Memory and visual discrimination by squids. *Marine Behaviour & Physiology*, 11, 271–282.

Altman, J. S. (1971). Control of accept and reject reflexes in Octopus. *Nature*, 229, 204–206.

Altner, I., Hatt. H., & Altner, H. (1983). Structural properties of bimodal chemo- and mechanosensitive setae on the pereopod chelae of the crayfish, *Austropotamobius torrentium*. *Cell and Tissue Research*, 228, 357-374

Alupay, J. S., Hadjisolomou, S. P., and Crook, R. J. (2014). Arm injury produces long-term behavioral and neural hypersensitivity in octopus. *Neuroscience Letters*, 558, 137–142.

Alves, C., Boal, J. G., & Dickel, L. (2008). Short- distance navigation in cephalopods: a review and synthesis. *Cognitive Processing*, 9(4), 239.

Alves, C., Chichery, R., Boal, J. G., & Dickel, L. (2007). Orientation in the cuttlefish *Sepia officinalis*: response versus place learning. *Animal Cognition*, 10(1), 29-36.

Amodio, P., & Fiorito, G. (2013). Observational and other types of learning in Octopus. In *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 22, pp. 293-302). Amsterdam: Elsevier.

Andrews, P. L., Darmaillacq, A. S., Dennison, N., Gleadall, I. G., Hawkins, P., Messenger, J. B., Osorio, D., Smith, V. J. and Smith, J. A. (2013). The identification and management of pain, suffering and distress in cephalopods, including anaesthesia, analgesia and human killing. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 447, 46–64.

<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.02.010>

Animal Health and Animal Welfare Panel of the European Food Standards Agency [AHAW]. (2005). Aspects of the biology and welfare of animals used for experimental and other scientific purposes (EFSA-Q-2004-105). *Annex to the EFSA Journal*, 292, 1-136.

Appel, M., & Elwood, R. W. (2009a). Motivational trade-offs and potential pain experience in hermit crabs. *Applied Animal Behaviour Science*, 119, 120–124.

Appel, M., & Elwood, R. W. (2009b). Gender differences, responsiveness and memory of a potentially painful event in hermit crabs. *Animal Behaviour* 78(6), 1373-1379.

Arenas, O. M., Zaharieva, E. E., Para, A., Vázquez-Doorman, C., Petersen, C. P., & Gallio, M. (2017). Activation of planarian TRPA1 by reactive oxygen species reveals a conserved mechanism for animal nociception. *Nature Neuroscience*, 20, 1686-1693.

Ashley, P. J., Sneddon, L. U., & McCrohan, C. R. (2007). Nociception in fish: Stimulus-response properties of receptors on the head of trout *Oncorhynchus mykiss*. *Brain Research*, 1166, 47-54.

Bacqué-Cazenave, J., Cattaert, D., Delbecque, J. P., & Fossat, P. (2017). Social harassment induces anxiety-like behaviour in crayfish. *Scientific Reports*, 7(1), 1-7.

Baker, J. R. (1955). Experiments on the Humane Dispatch of crabs. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 34(01), 15- 24.

Barr, S., & Elwood, R. W. (2011). No evidence of morphine analgesia to noxious shock in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Behavioural Processes*, 86(3), 340-344.

Barr, S., Laming, P. R., Dick, J. T., & Elwood, R. W. (2008). Nociception or pain in a decapod crustacean? *Animal Behaviour*, 75(3), 745- 751.

Barragán-Méndez, C., Sobrino, I., Marín-Rincón, A., Fernández-Boo, S., Costas, B., Mancera, J. M., & Ruiz-Jarabo, I. (2019). Acute-stress biomarkers in three octopodidae species after bottom trawling. *Frontiers in Physiology*, 10, 784. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00784>

Barrento, S., Marques, A., Vaz-Pires, P., & Nunes, M. L. (2010). Live shipment of immersed crabs *Cancer pagurus* from England to Portugal and recovery in stocking tanks: stress parameter characterization. *ICES Journal of Marine Science*, 67, 435-443.

Barrento, S., Marques, A., Vaz-Pires, P., & Leonor Nunes, M. (2011) *Cancer pagurus* (Linnaeus, 1758) physiological responses to simulated live transport: Influence of temperature, air exposure and AQUI-S®. *Journal of Thermal Biology*, 36, 128-137.

Barrento, S., Marques, A., Vaz-Pires, P., & Leonor Nunes, M. L. (2012). Physiological changes during simulated live transport of *Cancer pagurus* and recovery in holding tanks. *Aquaculture Research*, 43, 1415-1426.

Basti, D., Bricknell, I., Hoyt, K., Chang, E. S., Halteman, W., & Bouchard, D. (2010). Factors affecting post-capture survivability of lobster *Homarus americanus*. *Diseases of aquatic organisms*, 90, 153-166.

Bateson, P. (1991). Assessment of pain in animals. *Animal Behaviour*, 42, 827-839.

Bazarini, S. N. and Crook, R. J. (2020). Environmental estrogen exposure disrupts sensory processing and nociceptive plasticity in the cephalopod *Euprymna scolopes*. *Journal of Experimental Biology*, 223, jeb218008.

Bedore, C. N., Kajiura, S. M., & Johnsen, S. (2015). Freezing behaviour facilitates bioelectric crypsis in cuttlefish faced with predation risk. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 282, 20151886.

Ben-Haim, M. S., Dal Monte, O., Fagan, N. A., Dunham, Y., Hassin, R. R., Chang, S. W. C., & Santos, L. R.. (2021). Disentangling perceptual awareness from nonconscious processing in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118, e2017543118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2017543118>

Birch, J., Burn, C., Schnell, A., Browning H., Crump, A. (2021). Review of the Evidence of Sentience in Cephalopod Molluscs and Decapod Crustaceans. LSE Consulting. London School of Economics and Political Science.

Birch, J., Ginsburg, S., & Jablonka, E. (2020) Unlimited Associative Learning and the origins of consciousness: A primer and some predictions. *Biology and Philosophy*, 35, 56. <https://doi.org/10.1007/s10539-020-09772-0>

Boal, J. G., Dunham, A. W., Williams, K. T., & Hanlon, R. T. (2000). Experimental evidence for spatial learning in octopuses (*Octopus bimaculoides*). *Journal of Comparative Psychology*, 114(3), 246.

Boly, M., Seth, A. K., Wilke, M., Ingmundson, P., Baars, B., Laureys, S., Edelman, D. B., & Tsuchiya, N. (2013). Consciousness in humans and non-human animals: recent advances and future directions. *Frontiers in Psychology*, 4, 625. <http://doi.org/10.3389/fpsyg.2013.00625>

- Bowers, J., Nimi, T., Wilson, J., Wagner, S., Amarie, D., & Sittaramane, V. (2020). Evidence of learning and memory in the juvenile dwarf cuttlefish *Sepia bandensis*. *Learning & Behavior*, Advance online publication. <https://doi.org/10.3758/s13420-020-00427-4>
- Boycott, B. B. (1954). Learning in *Octopus vulgaris* and other cephalopode. *Pubblicazioni Della Stazione Zoologica di Napoli*, 25, 67-93.
- Boycott, B. B. (1961). The functional organization of the brain of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 153, 603-534
- Boycott, B. B., & Young, J. Z. (1955). A memory system in *Octopus vulgaris* Lamarck. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 143(913), 449-480.
- Boycott, B. B., & Young, J. Z. (1957). Reversal of learned responses in *Octopus vulgaris* Lamarck. *Animal Behaviour*, 6, 45–52
- Boyle, P. R. (2010). Cephalopods. In: R. C. Hubrecht & J. Kirkwood (Eds.), *The UFAW handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals* (8th edition, pp. 787-793). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Bradshaw, R. H. (1998). Consciousness in non- human animals: adopting the precautionary principle. *Journal of Consciousness Studies*, 5, 108-114.
- Brooks, W. R. (1988). The influence of the location and abundance of the sea anemone *Calliactis tricolor* in protecting hermit crabs from octopus predators. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 116, 15–21.
- Broom, D. M. (2014). *Sentience and animal welfare*. Wallingford: CABI.
- Brown, E. R. and Piscopo, S. (2013). Synaptic plasticity in cephalopods; more than just learning and memory? *Invertebrate Neuroscience*, 13, 35–44

Brown, S., & Wolff, G. (2012). Fine structural organization of the hemiellipsoid body of the land hermit crab, *Coenobita clypeatus*. *Journal of Comparative Neurology*, *520*, 2847-2863

Browning, H. (2019). What is good for an octopus? *Animal Sentience*, *4*(26), 7.

Bublitz, A., Weinhold, S. R., Strobel, S., Dehnhardt, G., & Hanke, F. D. (2017). Reconsideration of serial visual reversal learning in octopus (*Octopus vulgaris*) from a methodological perspective. *Frontiers in Physiology*, *8*, 54.

Budelmann, B. U. (1995). Cephalopod sense organs, nerves and the brain: adaptations for high performance and lifestyle. *Marine & Freshwater Behaviour and Physiology*, *25*, 13– 33.

<https://doi.org/10.1080/10236249409378905>

Budelmann, B. U. (1998). Autophagy in octopus. *South African Journal of Marine Sciences*, *20*, 101–108.

Budelmann, B. U. (2010). Cephalopoda. In: R. C. Hubrecht & J. Kirkwood (Eds), *The UFAW handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals* (8th edition, pp. 794-817). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.

Budelmann, B., & Young, J. (1985). Central pathways of the nerves of the arms and mantle of octopus, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *310*, 109–122

Burn, C. C. (2017). Bestial boredom: a biological perspective on animal boredom and suggestions for its scientific investigation. *Animal Behaviour*, *130*, 141-151.

<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2017.06.006>

Burrell, B. D. (2017). Comparative biology of pain: what invertebrates can tell us about how nociception works. *Journal of Neurophysiology*, *117*(4), 1461-1473.

Butler-Struben, H., Brophy, S. M., Johnson, N. A., & Crook, R. J. (2018). In vivo recording of neural and behavioral correlates of anaesthesia induction, reversal, and euthanasia in cephalopod molluscs. *Frontiers in Physiology*, 9, 109. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00109>

Cai, Z., Dong, H. B., Wang, J., & Su, Y. Q. (2012). Anesthetic effect of eugenol at different concentrations and temperatures on *Marsupenaeus japonicus*. *Marine Sciences*, 36, 29-36.

Caputi, F. F., Rullo, L., Stamatakos, S., Candeletti, S., & Romualdi, P. (2019). Modulation of the negative affective dimension of pain: Focus on selected neuropeptidergic system contributions. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), 4010.

<http://dx.doi.org/10.3390/ijms20164010>

Carder, G. (2017). A preliminary investigation into the welfare of lobsters in the UK. *Animal Sentience*, 2, 19. Retrieved from: <https://www.wellbeingintlstudiesrepository.org/animsent/vol2/iss16/19/>

Carton, L., Darmaillacq A. S., & Dickel, L. (2013). The prawn-in-the-tube procedure: What do cuttlefish learn and memorize? *Behavioural Brain Research*, 240, 29–42.

Chichery, R., & Chichery, M. P. (1992). Learning performances and aging in cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Experimental Gerontology*, 27(2), 233-239

Clark, R. E., Manns, J. R., & Squire, L. R. (2002). Classical conditioning, awareness, and brain systems. *Trends in Cognitive Sciences*, 6, 524–531. [http://doi.org/10.1016/s1364-6613\(02\)02041-7](http://doi.org/10.1016/s1364-6613(02)02041-7)

Clayton, N. S. & Emery, N. J. (2015). Avian models of human cognitive neuroscience: A proposal. *Neuron*, 86, 1330-1342.

Cole, P. D., & Adamo, S. A. (2005). Cuttlefish (*Sepia officinalis*: Cephalopoda) hunting behavior and associative learning. *Animal Cognition*, 8(1), 27-30.

Conte, F., Voslarova, E., Vecerek, V., Elwood, R. W., Coluccio, P., Pugliese, M., & Passantino, A. (2021). Humane slaughter of edible decapod crustaceans. *Animals*, *11*, 1089.

<https://doi.org/10.3390/ani11041089>

Cooke, G. M., Tonkins, B.M., & Mather, J.A. 2019. Care and Enrichment for Captive Cephalopods. In: Claudio Carere & Jennifer Mather (eds), *The Welfare of Invertebrate Animals*, Cham: Springer, pp. 179-208.

Cooke, G.M., & Tonkins, B.M. 2015. Behavioural indicators of welfare exhibited by the common European cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Journal of Zoo and Aquarium Research*, *3*(4), 157-162.

Coppola, C., Tirloni, E., Vasconi, M., Anastasio, A., Stella, S. & Bernardi, C. (2019). The effects of claw ligatures in American lobster (*Homarus americanus*) storage: a preliminary study of haemolymph parameters. *Acta Veterinaria Brno*, *88*, 329-335.

Cowing, D., Powell, A., & Johnson, M. (2015). Evaluation of different concentration doses of eugenol on the behaviour of *Nephrops norvegicus*. *Aquaculture*, *442*, 78-85.

Coyle, S. D., Dasgupta, S., Tidwell, J. H., Beavers, T., Bright, L. A., & Yasharian, D. K. (2005). Comparative efficacy of anesthetics for the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of the World Aquaculture Society*, *36*(3), 282-290.

Crook, R. J. (2021). Behavioural and neurophysiological evidence suggests affective pain experience in octopus. *iScience*, *24*, 102229. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102229>

Crook, R. J., & Walters, E. T. (2011). Nociceptive behavior and physiology of molluscs: Animal welfare implications. *ILAR Journal*, *52*, 185– 195.

Crook, R. J., Dickson, K., Hanlon, R. T., & Walters, E. T. (2014). Nociceptive sensitization reduces predation risk. *Current Biology*, *24*, 1121–1125.

Crook, R. J., Hanlon, R. T., & Basil, J. A. (2009). Memory of visual and topographical features suggests spatial learning in nautilus (*Nautilus pompilius* L.). *Journal of Comparative Psychology*, *123*(3), 264.

Crook, R. J., Hanlon, R. T., & Walters, E. T. (2013). Squid have nociceptors that display widespread long-term sensitization and spontaneous activity after bodily injury. *Journal of Neuroscience*, 33(24), 10021- 10026. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0646-13.2013>

Crook, R. J., Lewis, T., Hanlon, R. T., & Walters, E. T. (2011). Peripheral injury induces long- term sensitization of defensive responses to visual and tactile stimuli in the squid, *Loligo pealeii*. *Journal of Experimental Biology*, 24, 3171–3185.

Crook, R., & Basil, J. (2008). A biphasic memory curve in the chambered nautilus, *Nautilus pompilius* L. (Cephalopoda: Nautiloidea). *Journal of Experimental Biology*, 211(12), 1992-1998.

Crustacean Compassion (2020). Summary Report: Makro Lobsters.

Darmaillacq, A. S., Dickel, L., Chichery, M. -P., Agin, V. and Chichery, R. (2004). Rapid taste aversion learning in adult cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Animal Behaviour*, 68, 1291–1298.

Datta, U., van Staaden, M., & Huber, R. (2018). Crayfish self-administer amphetamine in a spatially contingent task. *Frontiers in Physiology*, 9, 433. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00433>

De Grave, S., et al. (2009). A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bulletin of Zoology*, 21 (Supplement), 1-109.

De La Vega, E., Hall, M. R., Wilson K., J., Reverter, A., Woods, R. G., & Degnan, B. M. (2007). Stress-induced gene expression profiling in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Physiological Genomics*, 31, 126-138.

DeForest Mellon, J, (2003). Dendritic initiation and propagation of spikes and spike bursts in a multimodal sensory interneuron: The crustacean parasol cell. *Journal of Neurophysiology*, 90, 2465-2477

- Della Rocca, G., Di Salvo, A., Giannettoni, G. and Goldberg, M. E. (2015). Pain and suffering in invertebrates: an insight on cephalopods. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 10, 77–84. <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2015.77.84>
- Denti, A., Dimant, B., & Maldonado, H. (1988). Passive avoidance learning in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Physiology & Behavior*, 43(3), 317-320.
- Denton, E. J. and Taylot, D. W. (1964). The composition of gas in the chambers of the cuttlebone of *Sepia officinalis*. *Journal of the Marine Biology Association UK*, 44, 203– 207
- Di Cristina, G. (2017). Nociception in the cephalopod mollusc *Octopus vulgaris*: a contribution to mapping putative nociceptors in the octopus arm (Doctoral dissertation, Università degli Studi di Napoli Federico II). Retrieved from: http://www.fedoa.unina.it/11639/1/Di_Cristina_Giulia_29.pdf
- Diarte-Plata, G., Sainz-Hernández, J. C., Aguiñaga-Cruz, J. A., Fierro-Coronado, J. A., Polanco-Torres, A., & Puente-Palazuelos, C. (2012). Eyestalk ablation procedures to minimize pain in the freshwater prawn *Macrobrachium americanum*. *Applied Animal Behaviour Science*, 140, 172-178. <https://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2012.06.002>
- Dickel, L., Boal, J. G., & Budelmann, B. U. (2000). The effect of early experience on learning and memory in cuttlefish. *Developmental Psychobiology*, 36(2), 101-110.
- Dickel, L., Chichery, M. P., & Chichery, R. (2001). Increase of learning abilities and maturation of the vertical lobe complex during postembryonic development in the cuttlefish, *Sepia*. *Developmental Psychobiology*, 39(2), 92-98.
- Dimant, B., & Maldonado, H. (1992). Habituation and associative learning during exploratory behavior of the crab *Chasmagnathus*. *Journal of Comparative Physiology A*, 170, 749-775.

Duermit, E., Kingsley-Smith, P. R., & Wilber, D. H. (2015). The consequences of claw removal on stone crabs *Menippe* spp. and the ecological and fishery implications. *North American Journal of Fisheries Management*, 35(5), 895-905. <https://doi.org/10.1080/02755947.2015.1064836>

Dunn, P. D. C., & Barnes, W. J. P. (1981a). Learning of leg position in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Marine & Freshwater Behaviour & Physiology*, 8(1), 67-82.

Dunn, P. D. C., & Barnes, W. J. P. (1981b). Neural correlates of leg learning in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Marine & Freshwater Behaviour & Physiology*, 8(1), 83-97.

Dyer, A. G., & Neumeier, C. (2005). Simultaneous and successive colour discrimination in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Physiology A*, 191, 547-557.

Dyuizen, I. V., Kotsyuba, E. P., & Lamash, N. E. (2012). Changes in the nitric oxide system in the shore crab *Hemigrapsus sanguineus* (Crustacea, Decapoda) CNS induced by a nociceptive stimulus. *Journal of Experimental Biology*, 215(15), 2668-2676.

Edsinger, E., & Dölen, G. (2018). A conserved role for serotonergic neurotransmission in mediating social behaviour in octopus. *Current Biology*, 28, 3136–3142.

Elwood, R. W. (1995). Motivational change during resource assessment by hermit crabs. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 193, 41–55.

Elwood, R. W. (2016). Stress was never said to be pain: response to Stevens et al. (2016). *Biology Letters*, 12(4), 20160126.

Elwood, R. W. (2019a). Discrimination between nociceptive reflexes and more complex responses consistent with pain in crustaceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 374(1785), 20190368.

Elwood, R. W. (2019b). Assessing the potential for pain in crustaceans and other invertebrates. In C. Carere & J. Mather (Eds.), *The Welfare of Invertebrate Animals* (pp. 147- 177). Dordrecht: Springer.

Elwood, R. W., & Adams, L. (2015). Electric shock causes physiological stress responses in shore crabs, consistent with prediction of pain. *Biology Letters*, *11*(11), 20150800.

Elwood, R. W., & Appel, M. (2009). Pain experience in hermit crabs? *Animal Behaviour*, *77*(5), 1243-1246.

Elwood, R. W., Barr, S., & Patterson, L. (2009). Pain and stress in crustaceans?. *Applied Animal Behaviour Science*, *118*(3-4), 128-136.

Elwood, R. W., Dalton, N., & Riddell, G. (2017). Aversive responses by shore crabs to acetic acid but not to capsaicin. *Behavioural Processes*, *140*, 1-5.

Elwood, R. W., McClean, A., & Webb, L. (1979). The development of shell preferences by the hermit crab, *Pagurus bernhardus*. *Animal Behaviour*, *27*, 940–946.

Feinberg, T. E., & Mallatt, J. M. (2016). *The Ancient Origins of Consciousness: How the Brain Created Experience*. Cambridge, MA: MIT Press.

Feinman, R. D., Llinas, R. H., Abramson, C. I., & Forman, R. R. (1990). Electromyographic record of classical conditioning of eye withdrawal in the crab *Biological Bulletin*, *178*(3), 187-194.

Fernandez-Duque, E., Valeggia, C., & Maldonado, H. (1992). Multitrial inhibitory avoidance learning in the crab *Chasmagnathus*. *Behavioral & Neural Biology*, *57*(3), 189-197.

Fine-Levy, J. B., Girardot, M. N., Derby, C. D., & Daniel, P. C. (1988). Differential associative conditioning and olfactory discrimination in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Behavioral & Neural Biology*, *49*(3), 315-331.

Fiorito, G., & Chichery, R. (1995). Lesions of the vertical lobe impair visual discrimination learning by observation in *Octopus vulgaris*. *Neuroscience Letters*, *192*(2), 117-120.

Fiorito, G., & Scotto, P (1992). Observational learning in *Octopus vulgaris*. *Science*, 256, 545–547.

Fiorito, G., Affuso, A., Basil, J., Cole, A., De Girolamo, P., D'Angelo, L., Dickel, L., Gestal, C., Grasso, F., Kuba, M., Mark, F., Melillo, D., Osorio, D., Perkins, K., Ponte, G., Shashar, N., Smith, D., Smith, J., & Mark, F. (2015). Guidelines for the Care and Welfare of Cephalopods in Research—A consensus based on an initiative by CephRes, FELASA and the Boyd Group. *Laboratory Animals*, 49(S2), 1- 90. <https://doi.org/10.1177/0023677215580006>

Florini, M., Fiorito, G., Hague, T., Andrews, P. L. R. (2011). “Monco”: A natural model for studying arm usage and regeneration in *Octopus vulgaris*. *Journal of Shellfish Research*, 30, 1002.

Forsythe, J. W., Hanlon, R. T., DeRusha, R. (1991). Pilot large-scale culture of *Sepia* in biomedical research. In E. Boucaud-Camou (Ed.), *The Cuttlefish, 1st International Symposium on the Cuttlefish, Sepia* (pp. 313– 323). Caen: Centre de Publications de l'Université de Caen.

Fossat, P., Bacqué-Cazenave, J., De Deurwaerdère, P., Cattaert, D., & Delbecque, J. P. (2015). Serotonin, but not dopamine, controls the stress response and anxiety-like behavior in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Journal of Experimental Biology*, 218(17), 2745-2752.

Fossat, P., Bacqué-Cazenave, J., De Deurwaerdère, P., Delbecque, J. P., & Cattaert, D. (2014). Anxiety-like behavior in crayfish is controlled by serotonin. *Science*, 344(6189), 1293-1297.

Frazier, D. T., Ohta, M., Narahash, T. (1973). Nature of morphine receptor present in squid axon. *Experimental Biology & Medicine*, 142, 1209–1214.

Frederich, M., Sartoris, F. J., Arntz, W. E., & Pörtner, H.-O. (2000). Haemolymph Mg²⁺ regulation in decapod crustaceans: Physiological correlates and ecological consequences in polar areas. *Journal of Experimental Biology*, 203, 1383-1393.

Fregin, T., & Bickmeyer, U. (2016). Electrophysiological investigation of different methods of anesthesia in lobster and crayfish. *PLoS One*, 11(9), e0162894.

Gagliano, M., Vyazovskiy, V. V., Borbély, A. A., Grimonprez, M., & Depczynski, M. (2016). Learning by association in plants. *Scientific Reports*, 6, 38427; <https://doi.org/10.1038/srep38427>

Gardner, C. (1997). Options for humanely immobilizing and killing crabs. *Journal of Shellfish Research*, 16(1), 219-224.

Gardner, C. (2004). Treating the prawn well on its way to the barbie: welfare of aquatic crustaceans. In: Jones B (ed.), *Welfare Underwater: Issues with Aquatic Animals*. Proceedings of the 2004 RSPCA Australia Scientific Seminar, Canberra, February 26 (Deakin West, Australia: RSPCA Australia Inc., pp. 21- 4

Gestal, C., Pascual, S., Guerra, Á., Fiorito, G., & Vieites, J. M. (2019). *Handbook of pathogens and diseases in cephalopods*. Dordrecht: Springer Open.

Ghanawi, J., Saoud, G., Zakher, C., Monzer, S., & Saoud, I. P. (2019). Clove oil as an anaesthetic for Australian redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Research*, 50(12), 3628-3632.

Gherardi, F. (2009). Behavioural indicators of pain in crustacean decapods. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 45, 432-438.

Ghosh, D. D., Sanders, T., Hong, S., McCurdy, L. Y., Chase, D. L., Cohen, N., Koelle, M. R., Nitabach, M. N. (2016). Neural Architecture of Hunger-Dependent Multisensory Decision Making in *C. elegans*. *Neuron*, 92(5), 1049- 1062. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.10.030>

Ginsburg, S., & Jablonka, E. (2019). *The Evolution of the Sensitive Soul: Learning and the Origins of Consciousness*. Cambridge, MA: MIT Press.

Godfrey-Smith, P. (2016). *Other Minds: The Octopus, The Sea, and the Deep Origins of Consciousness*. New York: Farrar, Strauss and Giroux.

Godoy, A. M., & Maldonado, H. (1995). Modulation of the escape response by [D- Ala²]met-enkephalin in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, *50*(3), 445-451.

Gunter, G. (1961). Painless killing of crabs and other large crustaceans. *Science*, *133*(3449), 327-327.

Gutnick, T., Byrne, R. A., Hochner, B., & Kuba, M. (2001). Octopus vulgaris uses visual information to determine the location of its arm. *Current Biology*, *21*, 460–462.

Haefner, P. A. (1971) The use of elastrator rings for binding crab claws. *Chesapeake Science*, *12*, 183-184.

Hague, T., Florini, M., & Andrews, P.L.R. (2013). Preliminary in vitro functional evidence for reflex responses to noxious stimuli in the arms of *Octopus vulgaris*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *447*, 100-105. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.02.016>

Hamilton, T. J., Kwan, G. T., Gallup, J., & Tresguerres, M. (2016). Acute fluoxetine exposure alters crab anxiety-like behaviour, but not aggressiveness. *Scientific Reports*, *6*, 19850. <https://doi.org/10.1038/srep19850>.

Hand, C. (1975). Behaviour of some New Zealand sea anemones and their molluscan and crustacean host. *NZ. J. Mar. Fresh. Res.* *9*, 509–527.

Hanley, J. S., Shashar, N., Smolowitz, R., Bullis, R. A., Mebane, W. N., Gabr, H. R., & Hanlon, R. T. 1998. Modified laboratory culture techniques for the European cuttlefish *Sepia officinalis*. *The Biological Bulletin*, *195*(2), 223- 225.

Hanlon, R. T., & Messenger, J. B. (2018). *Cephalopod behaviour*. Second Edition. Cambridge: Cambridge University Press

Hanlon, R. T., Forsythe, J. W., Cooper, K. M., Dinuzzo, A. R., Folse, D. S., & Kelly, M. T. (1984). Fatal penetrating skin ulcers in laboratory reared octopuses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 44, 67–83.

Hanlon, R. T., Hixon, R. F., & Hulet, W. H. (1983). Survival, growth, and behaviour of the loliginid squids *Loligo plei*, *Loligo pealei*, and *Lolliguncula brevis* (Mollusca, Cephalopoda) in closed sea-water systems. *Biological Bulletin*, 165, 637–685.

Hayter, J. (2005). Blue ringed octopus husbandry manual. Retrieved from <http://nswfmpa.org/Husbandry%20Manuals/Published%20Manuals/Invertebrata/Blue%20Ringed%20Octopus.pdf>.

Hermitte, G., & Maldonado, H. (1991). Conditioned facilitatory modulation of the response to an aversive stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Physiology & Behavior*, 51, 17-25.

Hochner, B. (2012). An embodied view of octopus neurobiology. *Current Biology*, 22, R887–R892.

Hochner, B., Shomrat, T. and Fiorito, G. (2006). The octopus: A model for comparative analysis of the evolution of learning and memory mechanisms. *Biological Bulletin*, 210, 308– 317.

Howard, R. B., Lopes L. N., Lardie C. R., Perez P. P., & Crook R. J. (2019). Early-life injury produces lifelong neural hyperexcitability, cognitive deficit and altered defensive behaviour in the squid *Euprymna scolopes*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 374, 20190281. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0281>

Hoyle, G. (1976). Learning of leg position by the ghost crab *Ocypode ceratophthalma*. *Behavioral Biology*, 18(2), 147-163.

Hvorecny, L. M., Grudowski, J. L., Blakeslee, C. J., Simmons, T. L., Roy, P. R., Brooks, J. A., & Holm, J. B. (2007). Octopuses (*Octopus bimaculoides*) and cuttlefishes (*Sepia pharaonis*, *S. officinalis*) can conditionally discriminate. *Animal Cognition*, 10(4), 449-459.

Iglesias, J., Sánchez, F. J., Bersano, J. G. F., Carrasco, J. F., Dhont, J., Fuentes, L., Linares, F., Muñoz, J. L., Okumura, S., Roo, J., Van der Meeren, T., Vidal, E.A.G. & Villanueva, R. (2007). Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*, 266(1-4), 1-15.

International Association for the Study of Pain. (2017). *IASP terminology*. Washington, D. C. Retrieved from: <https://www.iasp-pain.org/terminology?navItemNumber=576>

Jacklin, M., & Combes, J. (2005). The good practice guide to handling and storing live crustacea. Seafish report. Retrieved from: <https://www.seafish.org/document/?id=4b3b6210-51d6-4e21-97b5-a6eab65020a6>

Jacquet, J., Franks, B., Godfrey-Smith, P. and Sánchez-Suárez, W. (2019). The case against octopus farming. *Issues in Science and Technology*, 35(2), pp.37-44.

Johnson, L., Coates, C. J., Albalat, A., Todd, K., & Neil, D. (2016). Temperature-dependent morbidity of 'nicked' edible crab, *Cancer pagurus*. *Fisheries Research*, 175, 127-131.

Kaczer L, Maldonado H (2009) Contrasting Role of Octopamine in Appetitive and Aversive Learning in the Crab *Chasmagnathus*. *PLoS ONE*, 4(7), e6223.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006223>

Kaczer, L., Klappenbach, M., & Maldonado, H. (2011). Dissecting mechanisms of reconsolidation: octopamine reveals differences between appetitive and aversive memories in the crab *Chasmagnathus*. *European Journal of Neuroscience*, 34, 1170– 1178.

<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07830.x>

Kádková, A., Synytsya, V., Krusek, J., Zímová, L., & Vlachová, V. (2017) Molecular basis of TRPA1 regulation in nociceptive neurons. A review. *Physiological Research*, 66, 425-439.

Kawai, N., Kono, R., & Sugimoto, S. (2004). Avoidance learning in the crayfish (*Procambarus clarkii*) depends on the predatory imminence of the unconditioned stimulus: a behavior systems approach to learning in invertebrates. *Behavioural Brain Research*, 150(1-2), 229-237.

Kawamura, G., Nobutoki, K., Anraku, K., Tanaka, Y., Okamoto, M. (2001). Color discrimination conditioning in two octopus *Octopus aegina* and *O. vulgaris*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, *67*(1), 35-39. <https://doi.org/10.2331/suisan.67.35>

Kawashima, S., Takei, K., Yoshikawa, S., Yasumuro, H., & Ikeda, Y. (2020). Tropical octopus *Abdopus aculeatus* can learn to recognize real and virtual symbolic objects. *Biological Bulletin*, *238*, 12-24. <https://doi.org/10.1086/707420>

Keene, J. L., Noakes, D. L. G., Moccia, R. D., & Soto, C. G. (1998). The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, *29*(2), 89-101.

Key, B. (2016) Why fish do not feel pain. *Animal Sentience*, *1*(3), 1. Retrieved from: <https://www.wellbeingintlstudiesrepository.org/ animsent/vol1/iss3/1/>

Klappenbach, M., Maldonado, H., Locatelli, F., & Kaczer, L. (2012). Opposite actions of dopamine on aversive and appetitive memories in the crab. *Learning & Memory*, *19*, 73–83.

Kotsyuba, E. P., Dyuzen, I. V., & Lamash, N. E. (2010). Stress-induced changes in the nitric oxide system of shore crabs living under different ecological conditions. *Russian Journal of Marine Biology*, *36*(3), 201-208.

Kozma, M. T., Ngo-Vu, H., Wong, Y. Y., Shukla, N. S., Pawar, S. D., Senatore, A., Schmidt, M., & Derby, C. D. (2020). Comparison of transcriptomes from two chemosensory organs in four decapod crustaceans reveals hundreds of candidate chemoreceptor proteins. *PLoS ONE*, *15*, e0230266.

Kozma, M. T., Schmidt, M., Ngo-Vu, H., Sparks, S. D., Senatore, A., & Derby, C. D. (2018). Chemoreceptor proteins in the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*: Expression of

ionotropic receptors, gustatory receptors, and TRP channels in two chemosensory organs and brain. *PLoS ONE*, *13*, e0203935

Krieger, J., Sandeman, R. E., Sandeman, D. C., Hansson, B. S., & Harzsch, S. (2010). Brain architecture of the largest living land arthropod, the giant robber crab *Birgus latro* (Crustacea, Anomura, Coenobitidae): Evidence for a prominent central olfactory pathway? *Frontiers in Zoology*, *7*, 25

Lagerspetz, K. Y. H., & Vainio, L. A. (2006). Thermal behaviour of crustaceans. *Biological Reviews*, *81*, 237-258

Larssen, W. E., Dyb, J. E., Woll, A., & Kennedy, J. (2013). Factors that affect vitality of Northern Shrimp (*Pandalus borealis*, Krøyer 1838) during capture and storage that are destined for live trade. *Journal of Shellfish Research*, *32*, 807-813.

Lavallee, J., Spangler, E., Hammell, K. L., Dohoo, I. R., & Cawthorn, R. J. (2000). Analytical assessment of handling, fishing practices, and transportation risk factors on lobster (*Homarus americanus*) health in Prince Edward Island, Canada. *Journal of Shellfish Research*, *19*, 275-281.

Le Neindre, P., Bernard, E., Boissy, A., Boivin, X., Calandreau, L., Delon, N., Deputte, B., Desmoulin-Canselier, S., Dunire, M., Faivre N., Giurfa, M., Guichet, J., Lansade, L., Larrère, R., Mormède, P., Prunet, P., Schaal, B., Servièrre, J., Terlouw, C. (2017). Animal Consciousness. European Food Safety Authority. doi: <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1196>

Levy, G. and Hochner, B. (2017). Embodied organization of *Octopus vulgaris* morphology, vision, and locomotion. *Frontiers in Physiology*, *8*, 164.

Lipcius, R. N., & Herrnkind, W. F. (1982). Molt cycle alterations in behavior, feeding and diel rhythms of a decapod crustacean, the spiny lobster *Panulirus argus*. *Marine Biology*, *683*, 241-252.

Loi, P., & Tublitz, N. (1997). Molecular analysis of FMRFamide- and FMRFamide-related peptides (FaRPS) in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Journal of Experimental Biology*, 200, 1483-1489.

Lorenzon, S., Giulianini, P. G., Libralato, S., Martinis, M., & Ferrero, E. A. (2008). Stress effect of two different transport systems on the physiological profiles of the crab *Cancer pagurus*. *Aquaculture*, 278(1-4), 156-163.

Lozada, M., Romano, A., & Maldonado, H. (1988). Effect of morphine and naloxone on a defensive response of the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 30(3), 635-640.

Machon, J., Krieger, J., Meth, R., Zbinden, M., Ravaux, J., Montagné, N., Chertemps, T., & Harzsch, S. (2019). Neuroanatomy of a hydrothermal vent shrimp provides insights into the evolution of crustacean integrative brain centers. *eLife*, 8, e47550.

Mackintosh, J. (1962). An investigation of reversal learning in *Octopus vulgaris* Lamarck. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 14(1), 15-22.

Mackintosh, J. (1964). An investigation of reversal-learning in *Octopus vulgaris* Lamarck. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 14, 15-22.

Mackintosh, N. J., & Mackintosh, J. (1963). Reversal learning in *Octopus vulgaris* Lamarck with and without irrelevant cues. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 15(4), 236-242.

Mackintosh, N. J., & Mackintosh, J. (1964). Performance of *Octopus* over series of reversal of simultaneous discrimination. *Animal Behaviour*, 12, 321-324.

Magee, B., & Elwood, R. W. (2013). Shock avoidance by discrimination learning in the shore crab (*Carcinus maenas*) is consistent with a key criterion for pain. *Journal of Experimental Biology*, 216(3), 353-358.

Magee, B., & Elwood, R. W. (2016a). Trade-offs between predator avoidance and electric shock avoidance in hermit crabs demonstrate a non-reflexive response to noxious stimuli consistent with prediction of pain. *Behavioural Processes*, 130, 31–35.

Magee, B., & Elwood, R. W. (2016b). No discrimination shock avoidance with sequential presentation of stimuli but shore crabs still reduce shock exposure. *Biology Open*, 5(7), 883-888.

Maldonado, H. (1965). The positive and negative learning process in *Octopus vulgaris* Lamarck. Influence of the vertical and median superior frontal lobes. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 51(3), 185-203.

Maldonado, H., Romano, A., & Lozada, M. (1989). Opioid action on response level to a danger stimulus in the crab (*Chasmagnathus granulatus*). *Behavioral Neuroscience*, 103(5), 1139.

Marini, G., De Sio, F., Ponte, G., & Fiorito, G. (2017). Behavioral analysis of learning and memory in cephalopods. In J. H. Byrne (Ed.), *Learning and memory: A comprehensive reference* (pp. 441-462). Amsterdam: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.21024-9>

Markel, K. (2020). Lack of evidence for associative learning in pea plants. *Elife*, 9, e57614. <https://doi.org/10.7554/eLife.57614>

Martin, R., Frosch, D., Weber, E., & Voigt, K.H. (1979). Met-enkephalin-like immunoreactivity in a cephalopod neurohemal organ. *Neuroscience Letters*, 15, 253–257.

Mather, J. A. (1995). Cognition in cephalopods. *Advances in the Study of Behaviour*, 24, 317.

Mather, J. A. (2008). Cephalopod consciousness: behavioural evidence. *Consciousness and Cognition*, 17(1), 37-48.

Mather, J. A., Kuba, M. J. (2013). The cephalopod specialties: complex nervous system, learning, and cognition. *Canadian Journal of Zoology*, 91, 431–449. <http://doi.org/10.1139/cjz-2013-0009>

Maza, F. J., Sztarker, J., Shkedy, A., Peszano, V. N., Locatelli, F. F., & Delorenzi, A. (2016). Context-dependent memory traces in the crab's mushroom bodies: Functional support for a common origin of high-order memory centers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*, E7957-E7965

McCambridge, C., Dick, J. T., & Elwood, R. W. (2016). Effects of autotomy compared to manual declawing on contests between males for females in the edible crab cancer pagurus: implications for fishery practice and animal welfare. *Journal of Shellfish Research*, *35*(4), 1037-1044.

McClellan, R. (1983). Gastropod shells: a dynamic resource that helps shape benthic community structure. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* *69*, 151–174.

McDonald, K. (2011). Husbandry guidelines for mourning cuttlefish. Retrieved from: <https://aszk.org.au/wp-content/uploads/2020/03/Invertebrates.-Mourning-Cuttlefish-2012KM.pdf>

Messenger, J. B. (1971). Two-stage recovery of a response in Sepia. *Nature*, *232*(5307), 202-203.

Messenger, J. B. (1973). Learning in the cuttlefish, Sepia. *Animal Behaviour*, *21*(4), 801-826.

Messenger J. B. (1979). The nervous system of Loligo IV. The peduncle and olfactory lobes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *285*, 275–309. <https://doi.org/10.1098/rstb.1979.0007>

Messenger, J. B. (1996) Neurotransmitters of cephalopods. *Invertebrate Neuroscience*, *2*, 95–114

Moltschaniwskyj, N., Hall, K. C., Lipinski, M., and Marian, J. E. A., Nishiguchi, M., Sakai, M., Shulman, D. J., Sinclair, B., Sinn, D. L., Staudinger, M., Van Gelderen, V., Villanueva, E., & Warnke, K. (2007). Ethical and welfare considerations when using cephalopods as experimental animals. *Reviews in Fish Biology & Fisheries*, *17*, 455–476.

Montgomery, S. (2015). *The Soul of An Octopus*. New York: Simon & Schuster.

Morgan, J., Cargill, C., & Groot, E. (2001). The efficacy of clove oil as an anesthetic for decapod crustaceans. *Bulletin – Aquaculture Association of Canada*, 3, 27-31

Nathaniel, T. I., Panksepp, J., & Huber, R. (2010). Effects of a single and repeated morphine treatment on conditioned and unconditioned behavioral sensitization in Crayfish. *Behavioural Brain Research*, 207(2), 310-320.

Navarro, J. C., Monroig, Ó., & Sykes, A. V. (2014). Nutrition as a key factor for cephalopod aquaculture. In J. Iglesias, L. Fuentes, & R. Villanueva (Eds.), *Cephalopod Culture* (pp. 77- 95). Dordrecht: Springer.

Navratilova, E., Xie, J. Y., King, T., & Porreca, F. (2013). Evaluation of reward from pain relief. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1282, 1–11.

<https://doi.org/10.1111/nyas.12095>

Neil, D. (2010). *The effect of the Crustastun™ on nerve activity in crabs and lobsters. Project Report. University of Glasgow, Glasgow, UK*. Retrieved from: <http://eprints.gla.ac.uk/81428>

Neil, D. (2012). *The effect of the Crustastun™ on nerve activity in two commercially important decapod crustaceans: the edible brown Cancer pagurus and the European lobster Homarus gammarus. Project Report. University of Glasgow, Glasgow, UK*. Retrieved from:

<http://eprints.gla.ac.uk/81430>

Neil, D., & Thompson, J. (2012). *The stress induced by the Crustastun™ process in two commercially important decapod crustaceans: the edible brown Cancer pagurus and the European lobster Homarus gammarus. Project Report. University of Glasgow, Glasgow, UK*.

<http://eprints.gla.ac.uk/81433/>

Neil, D.M. (2010). *The effect of the Crustastun™ on nerve activity in crabs and lobsters. Project Report. University of Glasgow, Glasgow, UK*.

Nixon, M., & Young, J. Z. (2003). *The brains and lives of cephalopods*. Oxford: Oxford University Press.

O'Brien, C. E., Mezrai, N., Darmaillacq, A. S., & Dickel, L. (2017). Behavioral development in embryonic and early juvenile cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Developmental Psychobiology*, 59(2), 145-160.

O'Brien, C. E., Roubledakis, K., & Winkelmann, I. E. (2018). The current state of cephalopod science and perspectives on the most critical challenges ahead from three early-career researchers. *Frontiers in Physiology*, 9, 700.

Orlosk, J. L., Walker, J. M., Morrison, A. L., & Atema, J. (2011). Conditioning the crab *Carcinus maenas* against instinctive light avoidance. *Marine & Freshwater Behaviour & Physiology*, 44(6), 375-381.

Oshima, M., di Pauli von Treuheim, T., Carroll, J., Hanlon, R. T., Walters, E. T., and Crook, R. J. (2016). Peripheral injury alters schooling behavior in squid, *Doryteuthis pealeii*. *Behavioral Processes*, 128, 89–95.

Packard, A. (1972). Cephalopod and fish: the limit of convergence. *Biological Reviews*, 47, 241–301.

Panksepp, J. B., & Huber, R. (2004). Ethological analyses of crayfish behavior: A new invertebrate system for measuring the rewarding properties of psychostimulants. *Behavioural Brain Research*, 153, 171–180.

Papini, M. R., & Bitterman, M. E. (1991). Appetitive conditioning in *Octopus cyanea*. *Journal of Comparative Psychology*, 105(2), 107.

Patterson, L., Dick, J. T. A., & Elwood, R. W. (2009). Claw removal and feeding ability in the edible crab, *Cancer pagurus*: Implications for fishery practice, *Applied Animal Behaviour Science*, 116(204), 302-305. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.08.007>

Patterson, L., Dick, J.T.A. & Elwood, R.W. Physiological stress responses in the edible crab, *Cancer pagurus*, to the fishery practice of de-clawing. *Marine Biology*, 152, 265–272 (2007). <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0681-5>

Perez, P. V., Butler-Struben, H. M., Crook, R. J. (2017). The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine increases spontaneous afferent firing, but not mechannocceptive sensitization, in octopus. *Invertebrate Neuroscience*, 17, 10.

Perrot-Minnot, M. J., Banchetry, L., & Cézilly, F. (2017). Anxiety-like behaviour increases safety from fish predation in an amphipod crustacea. *Royal Society Open Science*, 4(12), 171558.

Pierce, G. J., Allcock, L., Bruno, I., Bustamante, P., González, Á., Guerra, Á., Jereb, P., et al. (2010). *Cephalopod biology and fisheries in Europe*. ICES Cooperative Research Report No. 303.

Pinsker, H., Kupfermann, I., Castellucci, V., & Kandel, E. (1970). Habituation and dishabituation of the GM-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*, 167(3926), 1740-1742.

Polimanti, O. (1910). Les cephalopodes ont-ils une memorie? *Archive. de Psychol. Gen.* 10, 84–87.

Premarathna, A. D., Pathirana, I., Rajapakse, R. J., & Pathirana, E. (2016). Evaluation of efficacy of selected anesthetic agents on blood-spotted crab (*Portunus sanguinolentus*). *Journal of Shellfish Research*, 35(1), 237-240.

Priborsky, J., & Velisek, J. (2018). A review of three commonly used fish anesthetics. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 26(4), 417-442.

- Punzo, F. (1983). Localization of brain function and neurochemical correlates of learning in the mud crab, *Eurypanopeus depressus* (Decapoda). *Comparative Biochemistry & Physiology Part A: Physiology*, 75(2), 299-305.
- Purdy, J. E., Dixon, D., Estrada, A., Peters, A., Riedlinger, E., & Suarez, R. (2006). Prawn-in- a-tube procedure: habituation or associative learning in cuttlefish? *Journal of General Psychology*, 133(2), 131-152.
- Puri, S., & Faulkes, Z. (2010). Do decapod crustaceans have nociceptors for extreme pH? *PLoS ONE* 5: e10244.
- Puri, S., & Faulkes, Z. (2015). Can crayfish take the heat? *Procambarus clarkii* show nociceptive behaviour to high temperature stimuli, but not low temperature or chemical stimuli. *Biology Open*, 4, 441-448.
- Rathjen, W. F. (1991). Cephalopod capture methods: an overview. *Bulletin of Marine Science*, 49, 494–505.
- Reimschuessel, R., and Stoskopf, M. K. (1990). Octopus automutilation syndrome. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55, 394–400.
- Ridgway, I. D., Taylor, A. C., Atkinson, R. J. A., Chang, E. S., & Neil, D. M. (2006). Impact of capture method and trawl duration on the health status of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 339, 135-147.
- Romano, A., Lozada M., & Maldonado, H. (1990). Effect of naloxone pretreatment on habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Behavioral & Neural Biology*, 53, 113-122.
- Ross, D. M. (1971). Protection of hermit crabs (*Dardanus* spp.) from octopus by commensal sea anemones (*Calliactis* spp.). *Nature*, 230, 401–402.

Roth, B., & Grimsbø, E. (2016). Electrical stunning of edible crabs (*Cancer pagurus*): From single experiments to commercial practice. *Animal Welfare*, 25(4), 489-497.

Roth, B., & Øines, S. (2010). Stunning and killing of edible crabs (*Cancer pagurus*). *Animal Welfare*, 19(3), 287-294.

Rowell, C. H. F. (1966). Activity of interneurons in arm of octopus in response to tactile stimulation. *Journal of Experimental Biology*, 44, 589–605.

Ruppert, E. E., & Barnes, R. D. (1994) *Invertebrate zoology*. New York: Saunders College Publishing.

Sacristán, H. J., Rodríguez, Y. E., De los Angeles Pereira, N., Lopez Greco, L. S., Lovrich, G. A., & Fernandez Gimenez, A. V. (2017). Energy reserves mobilization: Strategies of three decapod species. *PloS one*, 12, e0184060.

Sandeman, D. C., Kenning, M., & Harzsch, S. (2014). Adaptive trends in malacostracan brain form and function related to behavior. In C. Derby & M. Thiel (Eds.) *Crustacean nervous system and their control of behaviour* (pp. 11- 48). New York: Oxford University Press.

Sandeman, D., Beltz, B., & Sandeman, R. (1995). Crayfish brain interneurons that converge with serotonin giant cells in accessory lobe glomeruli. *Journal of Comparative Neurology*, 352, 263-279

Sanders, F. K., & Young, J. Z. (1940). Learning and other functions of the higher nervous centers of *Sepia*. *Journal of Neurophysiology*, 3, 501–526.

Sayre, M. E. & Strausfeld, N. J. (2019). Mushroom bodies in crustaceans: Insect-like organization in the caridid shrimp *Lebbeus groenlandicus*. *Journal of Comparative Neurology*, 527, 2371-2387.

Scatà, G., Jozet-Alves, C., Thomasse, C., Josef, N., & Shashar, N. (2016). Spatial learning in the cuttlefish *Sepia officinalis*: preference for vertical over horizontal information. *Journal of Experimental Biology*, 219(18), 2928-2933.

Schnell, A. K., Amodio, P., Boeckle, M., & Clayton, N. S. (2020). How intelligent is a cephalopod? Lessons from comparative cognition. *Biological Reviews*, Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/brv.12651>

Seeley, T. D. (2010). *Honeybee democracy*. Princeton, NJ: Princeton University Press.

Sha, A. L., Sun, H. S., & Wang, Y. Y. (2012). Immunohistochemical study of leucine- enkephalin and delta opioid receptor in mantles and feet of the octopus *Octopus ocellatus* Gray. *International Journal of Peptide Research & Therapeutics*, 18, 71–76. <https://doi.org/10.1007/s10989-011-9280-x>

Sherrard, K. M. (2000). Cuttlebone morphology limits habitat depth in eleven species *Sepia* (Cephalopoda: Sepiidae). *Biological Bulletin*, 198, 404–414.

Sherrill, J., Spelman, L.H., Reidel, C.L., & Montali, R.J. 2000. Common cuttlefish (*Sepia officinalis*) mortality at the National Zoological Park: implications for clinical management. *Journal of Zoo & Wildlife Medicine*, 31, 523- 531.

Sherwin, C. M. (2001). Can invertebrates suffer? Or, how robust is argument-by-analogy?. *Animal Welfare*, 10(1), 103-118.

Shigeno, S., Andrews, P. L. R., Ponte, G., & Fiorito, G. (2018). Cephalopod brains: An overview of current knowledge to facilitate comparison with vertebrates. *Frontiers in Physiology*, 9, 952.

Shomrat, T., Feinstein, N., Klein, M., & Hochner, B. (2010). Serotonin is a facilitatory neuromodulator of synaptic transmission and “reinforces” long-term potentiation induction in the vertical lobe of *Octopus vulgaris*. *Neuroscience*, 169(1), 52-64.

Shomrat, T., Turchetti-Maia, A. L., Stern-Mentch, N., Basil, J. A., & Hochner, B. (2015). The vertical lobe of cephalopods: an attractive brain structure for understanding the evolution of advanced learning and memory systems. *Journal of Comparative Physiology A*, 201(9), 947-956.

Siikavuopio, S. I., Johansson, G. S., James, P., & Lorentzen, G. (2019). Effect of starvation on the survival, injury, and weight of adult snow crab, *Chionoecetes opilio*. *Aquaculture Research*, 50, 550-556.

Skora, L. I., Yeomans, M. R., Crombag, H. S., & Scott, R. B. (2021). Evidence that instrumental conditioning requires conscious awareness in humans. *Cognition*, 208, 104546.

<http://doi.org/10.1016/j.cognition.2020.104546>

Skoulakis, E. M. C., Kalderon, D., & Davis, R. L. (1993). Preferential expression in mushroom bodies of the catalytic subunit of protein kinase A and its role in learning and memory. *Neuron*, 11, 197-208.

Slater, M. & Buttlng, O. (2011). Giant Pacific Octopus Husbandry Manual. The British and Irish Association for Zoos and Aquariums (BIAZA). Retrieved from:

https://assets.speakcdn.com/assets/2332/giant_pacific_octopus_care_manual_final_9514.pdf

Smarandache-Wellmann, C. R. (2016). Arthropod neurons and nervous system. *Current Biology*, 26(20), R960-R965, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.063>

Smith, E. S. J., & Lewin, G. R. (2009). Nociceptors: A phylogenetic view. *Journal of Comparative Physiology A*, 195, 1089-1106.

Smith, J. A., & Boyd, K. M. (Eds.). (1991). *Lives in the balance: The ethics of using animals in biomedical research*. Oxford: Oxford University Press.

Sneddon, L. U. (2015). Pain in aquatic animals. *Journal of Experimental Biology*, 218, 967– 976.

<https://doi.org/10.1242/jeb.088823>

Sneddon, L. U., Elwood, R. W., Adamo, S. A., & Leach, M. C. (2014). Defining and assessing animal pain. *Animal Behaviour*, *97*, 201-212.

Soto, C. G. (1995). Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture*, *136*(1-2), 149- 152.

Stafstrom, C. E., & Gerstein, G. L. (1977). A paradigm for position learning in the crayfish claw. *Brain Research*, *134*, 185-190.

Stefano, G. B., Hall, B., Makman, M. H., & Dvorkin, B. (1981). Opioid inhibition of dopamine release from nervous-tissue of *Mytilus edulis* and *Octopus bimaculatus*. *Science*, *213*, 928–930.

Stevens, E. D., et al. (2016). Stress is not pain. Comment on Elwood and Adams (2015) ‘Electric shock causes physiological stress responses in shore crabs, consistent with prediction of pain’. *Biology Letters*, *12*(4), 20151006.

Strausfeld, N. J., Wolff, G. H., & Sayre, M. E. (2020). Mushroom body evolution demonstrates homology and divergence across Pancrustacea. *eLife*, *9*, e52411.

Sutherland, N. S. (1962). Visual discrimination of shape by *Octopus*: squares and crosses. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, *55*, 939–943.

Sutherland, N. S., Mackintosh, N. J., and Mackintosh, J. (1963). Simultaneous discrimination training of octopus and transfer of discrimination along a continuum. *Journal of Comparative Physiology & Psychology*, *56*, 150–156.

Sykes, A. V., & Gestal, C. (2014). In J. Iglesias, L. Fuentes, & R. Villanueva (Eds.), *Cephalopod Culture*, Dordrecht: Springer, pp. 97-112.

Taiz, L., Alkon, D., Draguhn, A., Murphy, A., Blatt, M., Hawes, C., Thiel, G., Robinson, D. G. (2019). Plants neither possess nor require consciousness. *Trends in Plant Science*, *24*(8), 677-687. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.05.008>

Tani, M., & Kuramoto, T. (1998). Cool-sensitive neurons in the ventral nerve cord of crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 119(3), 845-852.

Tanner, A. R., Fuchs, D., Winkelmann, I. E., Gilbert, M. T. P., Pankey, M. S., Ribeiro, A. M., Kocot, K. M., Halanych, K. M., Oakley, T. H., da Fonseca, R. R., Pisani, D., & Vinther, J. (2017). Molecular clocks indicate turnover and diversification of modern coleoid cephalopods during the Mesozoic Marine Revolution. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 284, 20162818. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2818>

Taylor, J., Vinatea, L., Ozorio, R., Schuweitzer, R., Andreatta, E. R. (2004). Minimizing the effects of stress during eyestalk ablation of *Litopenaeus vannamei* females with topical anesthetic and a coagulating agent, *Aquaculture*, 233, 173–179.

Tokuda, K., Masuda, R., & Yamashita, Y. (2015). Conditional discrimination in *Octopus vulgaris*. *Journal of Ethology*, 33(1), 35-40.

Tomina, Y., & Takahata, M. (2010). A behavioral analysis of force-controlled operant tasks in American lobster. *Physiology & Behavior*, 101, 106-116.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.04.023>

Tomita, M., & Aoki, S. (2014). Visual Discrimination Learning in the Small Octopus *Octopus ocellatus*. *Ethology*, 120(9), 863-872.

Tomsic, D., & Maldonado, H. (1990). Central effect of morphine pretreatment on short- and long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 36, 787-793.

Tomsic, D., Maldonado, H., & Rakitin, A. (1991). Morphine and GABA: Effects on perception, escape response and long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Research Bulletin* 26, 699-706.

Tomsic, D., Massoni, V., & Maldonado, H. (1993). Habituation to a danger stimulus in two semiterrestrial crabs: ontogenic, ecological and opioid modulation correlates. *Journal of Comparative Physiology A*, 173, 621-633.

Tracey, W. D., Wilson, R. I., Laurent, G. & Benzer, S. (2003). painless, a *Drosophila* gene essential for nociception. *Cell*, 113, 261-273.

Travers, E., Frith, C. D., & Shea, N. (2018). Learning rapidly about the relevance of visual cues requires conscious awareness. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 71, 1698–1713.
<https://doi.org/10.1080/17470218.2017.1373834>

Utting, M., Agricola, H.-J., Sandeman, R., & Sandeman, D. (2000). Central complex in the brain of crayfish and its possible homology with that of insects. *Journal of Comparative Neurology*, 416, 245-261.

Valeggia, C., Fernandez-Duque, E., & Maldonado, H. (1989). Danger stimulus-induced analgesia in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Brain Research*, 481(2), 304-308.

Vaz-Pires, P., Seixas, P., & Barbosa, A. (2004). Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): A review. *Aquaculture*, 238(1-4), 221-238.

Viswanath, V., Story, G. M., Peier, A. M., Petrus, M. J., Lee, V. M., Hwang, S. W., Patapoutian, A., & Jegla, T. (2003). Opposite thermosensor in fruitfly and mouse. *Nature*, 423, 822-823.

Varner, G. E. (2012). *Personhood, ethics, and animal cognition: Situating animals in Hare's two-level utilitarianism*. New York: Oxford University Press.

Wachowiak, M., Diebel, C. E., & Ache, B. W. (1996). Functional organization of olfactory processing in the accessory lobe of the spiny lobster. *Journal of Comparative Physiology A*, 178, 211-226

Walters, E. T. (2018). Nociceptive biology of molluscs and arthropods: Evolutionary clues about functions and mechanisms potentially related to pain. *Frontiers in Physiology*, 9, 1049.

Waterstrat, P. R., & Pinkham, L. (2005). Evaluation of Eugenol as an Anesthetic for the American Lobster *Homarus americanus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36(3), 420-424.

Weineck, K., Ray, A. J., Fleckenstein, L. J., Medley, M., Dzubuk, N., Piana, E., & Cooper, R. L. (2018). Physiological changes as a measure of crustacean welfare under different standardized stunning techniques: Cooling and electroshock. *Animals*, 8(9), 158.

Wells, M. J. (1978). *Octopus: Physiology and behaviour of an advanced invertebrate*. London: Chapman & Hall.

Wight, K., Francis, L., & Eldridge, D. (1990). Food aversion learning by the hermit crab *Pagurus granosimanus*. *Biology Bulletin*, 178(3), 205– 209.

Williams, C., & Carpenter, G. (2016). The Scottish Nephrops fishery: Applying social, economic, and environmental criteria. New Economics Foundation (NEF) working paper. Available at: <https://bit.ly/2K8jWw1>.

Wilson, M., Haga, J. A. R. and Karlsen, H. E. (2018). Behavioural responses to infrasonic particle acceleration in cuttlefish. *Journal of Experimental Biology*, 221, jeb166074.

Wolfe, J. M., Breinholt, J. W., Crandall, K. A., Lemmon, A. R., Lemmon, E. M., Timm, L. E., Siddall, M. E., & Bracken-Grissom, H. D. (2019). A phylogenomic framework, evolutionary timeline and genomic resources for comparative studies of decapod crustaceans. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 286, 20190079.

<https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0079>

Woll, A. K., Larssen, W. E., & Fossen, I. (2010). Physiological responses of brown crab (*Cancer pagurus* Linnaeus 1758) to dry storage under conditions simulating vitality stressors. *Journal of Shellfish Research*, 29, 479-487.

Yin, K., Zimmermann, K., Vetter, I., & Lewis, R. J. (2015). Therapeutic opportunities for targeting cold pain pathways. *Biochemical Pharmacology*, 93,125– 140, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.09.024>.

Young, J. S., Peck, L. S., & Matheson, T. (2006). The effects of temperature on walking and righting in temperate and Antarctic crustaceans. *Polar Biology*, 29, 978.

Young, J. Z. (1960). The failures of discrimination learning following the removal of the vertical lobes in Octopus. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 153(950), 18-46

Young, J. Z. (1963a). The number and sizes of nerve cells in Octopus. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 140, 229–254. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7998.1963.tb01862.x>

Young, J. Z. (1963b). Some essentials of neural memory systems. Paired centres that regulate and address the signals of the results of action. *Nature*, 198, 626–630.

Young, J. Z. (1965). The central nervous system of Nautilus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 249(754), 1-25.

Young, J. Z. (1974). The central nervous system of Loligo I. The optic lobe. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 267(885), 263-302.

Young, J. Z. (1976). The nervous system of Loligo II. Suboesophageal centres. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274(930), 101-167.

Young, J. Z. (1977). The nervous system of Loligo, III. Higher motor centres: the basal supraoesophageal lobes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276(948), 351-398.

Young, J. Z. (1979). The nervous system of Loligo. V. The vertical lobe complex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 285(1009), 311-354.

Young, J. Z. (1991). Computation in the learning system of cephalopods. *Biological Bulletin*, 180, 200-208. <https://doi.org/10.2307/1542389>

Zacarias, S., Carboni, S., Davie, A., & Little, D. C. (2019). Reproductive performance and offspring quality of non-ablated Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under intensive commercial scale conditions. *Aquaculture*, 503, 460-466.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.018>

Zacarias, S., Fegan, D., Wangsoontorn, S., Yamuen, N., Limakom, T., Carboni, S., Davie, A., Metselaar, M., Little, D. C., Shinn, A. P. (2021). Increased robustness of postlarvae and juveniles from non-ablated Pacific whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*, broodstock post- challenged with pathogenic isolates of *Vibrio parahaemolyticus* (VpAHPND) and white spot disease (WSD). *Aquaculture*, 532, 736033. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736033>

Zarella, I., Ponte, G., Baldascino, E. and Fiorito, G. (2015). Learning and memory in *Octopus vulgaris*: a case of biological plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 35, 74–79.

<https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.06.012>

Zepeda, E. A., Veline, R. J., & Crook, R. J. (2017). Rapid associative learning and stable long- term memory in the squid *Euprymna scolopes*. *The Biological Bulletin*, 232(3), 212-218.

Zullo, L. & Hochner, B. (2011). A new perspective on the organization of an invertebrate brain. *Communicative & Integrative Biology*, 4, 26– 29. <https://dx.doi.org/10.4161/cib.4.1.13804>

Zullo, L., Sumbre, G., Agnisola, C., Flash, T., & Hochner, B. (2009). Nonsomatotopic organization of the higher motor centers in octopus. *Current Biology*, 19, 1632-1636.