

Valutazione sullo stato di benessere dei soggetti sperimentali e considerazioni generali sull'andamento del progetto “Meccanismi anatomo-fisiologici soggiacenti il recupero della consapevolezza visiva nella scimmia con cecità corticale” (n° 803/2018-PR)

Per la preparazione di questa relazione, ho visitato lo stabulario e i laboratori del Dipartimento di Medicina e Chirurgia dell'Università di Parma, dove sono condotti gli esperimenti del progetto in esame. Ho osservato i soggetti sperimentali, e condotto interviste in persona con membri del personale dedicato al progetto.

La visita è stata effettuata il **14 marzo 2022**. Rispetto alla precedente visita effettuata il 26 agosto 2021 ho constatato novità riguardanti sia la stabulazione che le procedure sperimentali, che qui di seguito metterò in risalto. Per il resto ripeterò quanto già scritto precedentemente, dato che il livello di attenzione al benessere dei soggetti sperimentali e il grado di collaborazione tra sperimentatori e soggetti sperimentali sono rimasti immutati.

Questa relazione riguarda le procedure compiute sui due maschi (di età circa 8 anni) della specie macaco reso (*Macaca mulatta*), attualmente coinvolti nel progetto (Larry - ID: 1404035- e Alan ID:1402269). Gli animali sono arrivati a Parma l'8 agosto 2019. Al momento le procedure principali riguardano la calibrazione dei movimenti oculari e compiti di fissazione oculare, che avvengono mediante training a rinforzo positivo e monitoraggio non invasivo attraverso telecamera a infrarossi, come è tradizione consolidata di questo team di ricerca.

La mia valutazione utilizza, come sempre, il “Principio delle “3R” di Russell e Burch come guida per verificare gli aspetti di benessere degli animali e qualità scientifica del progetto in questione, e ribadisce quanto affermato in precedenza.

Sostituzione (“Replacement”): Il macaco reso è una specie appropriata per ottenere il modello animale che è necessario per lo svolgimento del progetto. La complessità del comportamento che deve essere studiata non permette l'uso di un'altra specie che non sia un primate non-umano. Le vie visive di questa scimmia sono molto simili, in termini di funzione e anatomia, a quelle proprie della specie umana. Inoltre, *Macaca mulatta* si è svelata essere una specie particolarmente adatta a programmi di addestramento a rinforzo positivo, come osservato in diversi laboratori europei che utilizzano tale primate per diversi tipi di ricerca.

Riduzione (“Reduction”): Al momento vengono utilizzati due soggetti sperimentali rispetto ai complessivi sei autorizzati dall'autorità competente italiana (Ministero della Salute). Questi numeri sono il minimo indispensabile per ottenere risultati significativi, replicazioni convincenti di tali risultati e un buon livello di riproducibilità. E' anche importante sottolineare che in questo tipo di studi l'unità statistica non è rappresentata dal numero di soggetti sperimentali *per se*, ma bensì dal numero di neuroni dei quali viene registrata l'attività.

Affinamento delle procedure-stabulazione (“Refinement”): Ho visitato lo stabulario dove sono mantenuti i due soggetti sperimentali. Larry e Alan sono alloggiati in coppia, nella stessa stanza e in contatto visivo, olfattivo e acustico con gli altri macachi della colonia utilizzati in altri progetti. Ho osservato a lungo i due individui alla ricerca di eventuali segni di malessere

comportamentale. Al momento del mio arrivo i due soggetti erano confinati in una delle due gabbie normalmente a disposizione, perché l'altra veniva pulita in quel momento. Non ho osservato alcuna stereotipia, nessun comportamento sociale anormale, nessun atteggiamento che denotasse una stato anormale di tensione o stress. I due individui sono apparsi vigili e attenti, curiosi e attivi. Larry, il dominante, ha sollecitato più volte il grooming da parte di Alan, e in un paio di occasioni è stato accontentato.

Differentemente da quanto osservato durante la mia precedente visita, i due soggetti non si sono mai toccati l'impianto ferma testa.

Le scimmie, in generale, mostravano un'atteggiamento positivo verso tecnici e ricercatori: assenza di stress o paura, e accettazione di cibo dalle loro mani. In particolare, ho notato una grande maestria e conoscenza delle dinamiche sociali da parte del tecnico che si occupa del loro mantenimento. Il cibo (uvetta o altro premio) veniva dato ai due individui simultaneamente, senza creare nessun tipo di tensione legato al differente rango sociale. Il premio viene dato a ogni spostamento da una gabbia all'altra, come richiede la procedura di training a rinforzo positivo.

Le dimensioni delle gabbie sono superiori alla norma, gli animali hanno spazio per muoversi allungando gli arti, saltare e arrampicarsi. Sono rimasto positivamente colpito dall'utilizzo di differenti arricchimenti ambientali che vengono alternati nelle diverse gabbie. Gli arricchimenti sono di tipo sensoriale, strutturale e cognitivo. Il tecnico di laboratorio che si occupa di questo aspetto è una persona di grande esperienza, motivazione e creatività. Recenti arricchimenti includono: i) scatole e cilindri di cartone sigillati, da strappare, con dentro paglia e semi; ii) bottiglie del latte di plastica, con dentro ramoscelli di rosmarino. I macachi li estraggono, se li strusciano addosso e poi li mangiano; iii) rami con foglie, con le foglie cosparsa di miele e semi; iv) bicchierini di plastica con frullato congelato; v) contenitori cilindrici di plastica con dentro tappi di plastica che vengono estratti; vi) palle di plastica forate, con dentro semi e altri premi che i macachi devono estrarre. Questi arricchimenti, aggiuntivi rispetto a quelli fissi e strutturali, sono alternati tra gabbie e presentati agli animali tre volte alla settimana. Mi è stato riferito che specialmente Alan (il subordinato) passa molto del suo tempo a lavorare sugli arricchimenti che necessitano lavoro per ottenere cibo, ed è anche particolarmente interessato a arricchimenti che producono rumore.

Differentemente dalla mia precedente visita, Larry e Alan possono adesso utilizzare la "playroom" (una gabbia più larga delle gabbie normalmente utilizzate), dedicata esclusivamente all'uso di arricchimenti, ma non di tipo alimentare. Tale playroom viene messa a disposizione tre o quattro volte alla settimana, dopo le sessioni di training, dal pomeriggio alla sera. Per il riposo notturno i due macachi ritornano nella loro gabbia. E' in fase di allestimento una playroom più grande di quella attualmente in uso, che presto sarà utilizzabile da tutte le scimmie della colonia, a turno.

Quando la pulizia della gabbia è terminata, Larry e Alan sono stati spostati nella loro gabbia adiacente (normalmente le utilizzano entrambe) in attesa di essere portati, per mezzo di sedia trasportabile, nella stanza sperimentale. In quel momento ho notato una stereotipia comportamentale, molto probabilmente dovuta all'attesa dell'inizio della sessione di training, attività alla quale si mostrano particolarmente motivati a partecipare (le scimmie possono mostrare stereotipie locomotorie quando sono in attesa di un evento particolarmente gradito, come per esempio l'arrivo del cibo).

In generale, ribadisco la sensazione di grande tranquillità mostrata dai due soggetti sperimentali.

Affinamento delle procedure sperimentali ("Refinement"):

Per non disturbare gli animali con la mia presenza, non ho assistito all'uscita di Alan dalla gabbia per sedersi sulla sedia per essere trasportato nella stanza sperimentale. Mi è stato riferito che la

scelta tra i due individui a chi partecipa per primo alla sessione di training viene lasciata, in questa coppia di animali, agli individui stessi. Chi esce per primo dalla gabbia spontaneamente e si siede sulla sedia è il primo a partecipare. Gli animali non vengono mai forzati a fare qualcosa che non vogliono fare.

Ho quindi assistito a una sessione di calibrazione dell'oculometro nell'animale a testa fissa, mediante un sistema di rilevazione non invasivo che registra la fissazione da parte dell'occhio di uno stimolo che appare su uno schermo. Il tutto avviene nel più completo silenzio, gli unici che interagiscono direttamente con il soggetto sperimentale (in questo caso Alan) sono un tecnico e un ricercatore che Alan conosce molto bene. L'individuo siede sulla sedia, e spontaneamente mette la testa in posizione per essere fissata. A ogni passaggio viene ricompensato sia con succo di frutta, che con rassicurazioni vocali. Una volta fissato, viene messo a circa 60 cm dal monitor, e il suo compito sarà quello di fissare degli stimoli visivi che appaiono sul monitor. A ogni risposta corretta Alan (o Larry) viene ricompensato da un po' di succo di frutta. Viene utilizzata la nuova sedia per primati, più robusta e più agevole da usare per il personale, acquistata ai tempi della mia precedente visita. Inoltre, tale sedia permette alla scimmia di sedersi meglio e più comodamente. Ciò è in accordo con le raccomandazioni del NC3Rs di Londra.

Alcuni elementi acquisiti durante la sessione sperimentale:

- i) Il soggetto appare molto calmo, non ho rilevato segni di insofferenza: non vocalizza, non mostra espressioni facciali di disagio, non cerca di liberarsi, ma nemmeno appare apatico.
- ii) Si fa fissare la testa rimanendo immobile e prende il premio alimentare con calma e determinazione.
- iii) La registrazione dei movimenti oculari avviene in maniera non invasiva, mediante l'uso di una telecamera a infrarossi.
- iv) L'animale non cerca di girarsi su se stesso, muove gli arti tra una sessione di training e la successiva. Durante il test vero e proprio è molto attento, fermo e focalizzato.
- v) La percentuale di successo nel task è segno di una condizione di benessere adeguata. La sessione viene interrotta appena prima che questa percentuale diminuisca: segno di stanchezza o disinteresse nel task.
- vi) L'animale determina, con la voglia di partecipare o meno, la complessità del task visivo.
- vii) Nessun task viene fatto senza la completa e spontanea partecipazione del soggetto sperimentale.
- viii) Finita la sessione, l'animale viene liberato dal ferma testa, è molto tranquillo e mi guarda con insistenza, perché sono l'estraneo che non conosce.
- ix) Ancora sulla sedia, prende un preparato di farina di pellet e frutta secca, pezzi di banana, kiwi e mela. A ogni boccone viene anche ricompensato vocalmente.
- x) Viene quindi riportato in stabulario seduto sulla sedia su un carrello.

Ogni sessione dura circa 45-50 minuti e viene condotta giornalmente.

Come notato precedentemente, frutta e verdura, durante il periodo di addestramento, vengono date solo durante tali procedure. Acqua e pellet sono a disposizione sempre *ad libitum*. Quindi, i soggetti sperimentali non vengono sottoposti a deprivazione di cibo o liquidi. Al di fuori del periodo di addestramento i soggetti sperimentali ricevono l'usuale dieta di pellet, frutta e verdura.

Il senso di fiducia degli animali verso gli addestratori, e la mancanza di paura e frustrazione, continuano a essere elementi essenziali per la riuscita dell'addestramento.

Ribadisco che la mia impressione è che il concetto di affinamento delle procedure sperimentali è compreso e applicato in maniera efficace in questo laboratorio, nell'ambito del progetto in oggetto.

INTERVISTE CON IL TEAM SPERIMENTALE

Ho intervistato di nuovo il tecnico che si occupa del mantenimento dei macachi, e il ricercatore che si occupa direttamente del training al quale ho assistito. Come già detto, è mia opinione che è estremamente importante capire l'attitudine generale e le opinioni delle diverse persone coinvolte nel progetto a differenti livelli e con differenti compiti e responsabilità. Tutte queste informazioni servono per comporre uno scenario nel quale possono essere meglio valutati gli aspetti etici relativi al progetto in esame.

Sono rimasto di nuovo favorevolmente impressionato da questi incontri. Ho ancora riscontrato tra i due intervistati un significativo accordo di motivazioni, atteggiamento e attenzione verso gli animali sperimentali. Ho avuto l'impressione di nuovo di un gruppo molto compatto per quanto riguarda sia il benessere degli animali coinvolti che per la qualità del dato sperimentale e del progetto in generale. L'enfasi era differente, chiaramente in relazione al compito svolto, ma per tutti il benessere degli animali e la qualità del dato sperimentale devono andare di pari passo.

Quindi:

- I due intervistati hanno sottolineato più volte l'importanza di avere un rapporto personale con le scimme. I macachi devono essere in grado di fidarsi degli umani che lavorano con loro, e sono in grado di distinguere molto bene una persona dall'altra. E' essenziale che i macachi siano calmi e fiduciosi.
- Ogni particolare scimmia ha una preferenza per un particolare tipo di arricchimento. Il tecnico di laboratorio che si occupa degli arricchimenti tiene sempre molto presente questa informazione, e lo fa con grande cura e attenzione. In particolare, è molto attento a capire per ogni singolo individuo la personalità e il livello di motivazione a partecipare al programma di arricchimento.
- La conoscenza dell'etologia del macaco reso è cruciale per capire il livello di benessere dei soggetti sperimentali. Tale conoscenza è essenziale per un addestramento a rinforzo positivo che abbia successo.
- E' molto importante che gli individui abbiano un certo grado di controllo sull'ambiente e su ciò che accade intorno a loro. L'addestramento è adattato alla personalità, attitudine e posizione sociale di quel particolare individuo. La procedura di addestramento rappresenta una sorta di arricchimento per la vita dei soggetti sperimentali. Sono pronti a partecipare alle sedute di addestramento, e sono messi nelle condizioni di esercitare controllo sui modi e i tempi, se no perdono interesse.
- Ho notato un ottimo livello di comunicazione tra il tecnico di laboratorio e il ricercatore intervistato. C'è continuo scambio di informazioni sul benessere dei soggetti sperimentali: i tecnici di laboratorio conoscono bene il progetto, e i ricercatori ascoltano i consigli dei tecnici di laboratorio per questioni che riguardano il benessere dei soggetti sperimentali.

RAPPORTO DANNO/BENEFICIO

Ribadisco che le misure di affinamento delle procedure adottate, e qui descritte, risultano in una significativa riduzione del disagio imposto ai soggetti sperimentali. I primati sono utilizzati nel pieno rispetto delle loro esigenze di benessere psico-fisico.

Le considerazioni espresse in questa relazione portano a una favorevole valutazione del rapporto danno/beneficio, alla luce del potenziale e significativo progresso delle conoscenze sulle basi neurali della coscienza visiva, e sulle applicazioni pre-cliniche per curare le conseguenze del danno nervoso al sistema visivo umano.

Confermo che tale progetto appare essere in linea con i concetti “sostituzione”, “riduzione” e “affinamento delle procedure”, come indicato dall’articolo 13 del D. Leg.vo 26/2014 (implementazione italiana della Direttiva 2010/63/EU).

Confermo quindi che lo standard etico mantenuto nel progetto “Light-Up” è più che accettabile. In effetti, penso che dovrebbe essere di ispirazione per altri progetti che utilizzano primati non umani in ricerca di tipo neuroscientifico.

Roma, 14/3/2022

Centro di Riferimento per le Scienze Comportamentali e Salute Mentale
Istituto Superiore di Sanità
ROMA