

**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 del Dipartimento di Medicina e Chirurgia dell'Università di Parma, dove sono ospitati i soggetti sperimentali del progetto in esame, e ho condotto interviste in persona con membri del personale dedicato al progetto.**

La visita è stata effettuata il **29 agosto 2023**. Rispetto alla precedente visita effettuata il 21 febbraio 2023 non ho constatato rilevanti novità riguardanti la stabulazione degli individui interessati al progetto. Per lo più 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. Inoltre, il livello di comunicazione tra tutti i membri dello staff rimane molto soddisfacente: questo ultimo punto mi è stato particolarmente sottolineato durante questa visita, sia del medico veterinario designato che dal personale tecnico.

Questa relazione riguarda le procedure compiute sui due maschi (di età circa 9 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.

Rispetto alla mia ultima visita i due soggetti sono stati operati per l'impianto della camera e degli elettrodi per registrazione cronica (Larry), e per l'impianto della sola camera (Alan). Prima della pausa estiva sono state fatte registrazioni su Larry mediante l'uso degli elettrodi. Al momento i due individui hanno appena ricominciato le loro sessioni di training, con possibilità di registrazione delle sessioni di Larry.

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. Il modello animale si rende indispensabile per caratterizzare il substrato neurale relativo alla risposta di stimoli visivi, un dato attualmente non rilevabile nella specie umana in maniera non invasiva. Metodi relativamente non invasivi, quali risonanza magnetica, non permetterebbero di ottenere le informazioni necessarie allo svolgimento del progetto. 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 autorizzato 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 dai soggetti sperimentale *per se*, ma bensì dal numero di neuroni dei quali viene registrata l'attività.

**Affinamento delle procedure-stabulazione e procedure sperimentali ("Refinement"):** Ho visitato come sempre lo stabulario dove sono mantenuti i due soggetti sperimentali. Al momento della mia visita in gabbia c'era solo Larry (il dominante), perché Alan era impegnato nella sessione di training. Larry mostrava stereotipia, dovuta molto probabilmente all'attesa di potere anche lui andare a partecipare alla sessione di lavoro e alla mia presenza. Inoltre, prima di cominciare la sessione sperimentale, viene chiuso abitualmente in metà della gabbia che ha abitualmente a disposizione (comunque ampia da permettere libertà di movimento). Mi viene riferito che l'agitazione cresce quando la routine giornaliera viene in qualche modo disturbata, quando c'è più movimento di persone del normale e quando fa visita il veterinario designato per il controllo delle condizioni di salute.

Durante la mia osservazione il soggetto non si è mai toccato l'impianto con la camera. Il luogo dell'operazione appariva pulito e perfettamente rimarginato. Sia Larry che Alan hanno avuto bisogno di qualche giorno per adattare i propri movimenti, sia in gabbia che in sedia, in relazione alla presenza della camera fissata sul cranio. Mi è stato riferito che, in modo da essere il meno invasivo possibile e facilitarne il fissaggio, le caratteristiche della camera sono state modellate ad hoc per i due individui, basandosi su una immagine 3D del cranio di quel particolare individuo. Ciò ha garantito che la camera aderisse perfettamente alla testa dell'individuo in questione.

Ribadisco che il soggetto che ho osservato, in generale, mostrava un'atteggiamento positivo verso tecnici e ricercatori: assenza di stress o paura, e accettazione di cibo dalle loro mani.

Come osservato precedentemente, le dimensioni delle gabbie sono a norma, gli animali hanno spazio per muoversi allungando gli arti, saltare e arrampicarsi.

Gli arricchimenti ambientali vengono alternati nelle diverse gabbie, e sono quelli già osservati in precedenza. Come già notato precedentemente, il tecnico di laboratorio che si occupa di questo aspetto è una persona di grande esperienza, motivazione e creatività. Gli arricchimenti includono: i) scatolette 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 plastiche forate, con dentro semi e altri premi che i macachi devono estrarre; vii) cerchi da gioco sospesi dal tetto della gabbia (cerchi tipo hula-hoop) Questi arricchimenti, aggiuntivi rispetto a quelli fissi e strutturali, sono alternati tra gabbie e presentati agli animali tre volte alla settimana.

Come osservato nella mia ultima visita, Larry e Alan utilizzano una "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 tutti i pomeriggi, dal pomeriggio alla sera. Per il riposo notturno i due macachi ritornano nella loro gabbia.

In generale, ribadisco che non ho notato evidenti segni di malessere o la presenza di comportamenti anomali.

Ho assistito al ritorno di Alan dalla sessione sperimentale e dal passaggio di Larry dalla gabbia alla sedia per essere portato nella stanza sperimentale. Alan è rientrato senza esitazione nella sua gabbia e ha subito ricevuto un arricchimento (una scatoletta di cartone da aprire con dentro paglia e semi). Larry non ha voluto entrare subito in sedia, molto probabilmente perché ero presente e non è abituato alla mia presenza. Infatti, quando mi sono allontanato dalla stanza, in meno di cinque minuti Larry si è seduto sulla sedia ed è stato portato in stanza sperimentale.

**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 responsabile delle procedure di training e calibrazione dell'occhio. Inoltre ho intervistato il veterinario designato, e le due ricercatrici-dottorande che si occupano giornalmente dell'addestramento di Larry e Alan.

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 gli 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. Subito dopo le operazioni chirurgiche subite da Larry e Alan le due dottorande hanno passato ogni giorno in compagnia dei due esemplari, per essere sicuri che tutto fosse andato bene e il risveglio dall'anestesia fosse stato regolare, e non ci fossero state conseguenze dovute all'operazione.

Quindi, ribadisco:

- Gli 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.
- 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, ma devono essere in grado di esercitare controllo sui modi e i tempi, se no perdono interesse.
- Mi è stato riferito un ottimo livello di comunicazione tra il tecnico di laboratorio, il veterinario designato e i ricercatori. 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 e veterinario designato per questioni che riguardano il benessere dei soggetti sperimentali.
- Il veterinario designato non ha rilevato nessun problema o fonte di preoccupazione in relazione alla salute dei soggetti sperimentali. Le ferite relative agli impianti sono pulite e, nel caso in cui gli animali le toccano, vengono giornalmente controllate. Dal punto di vista comportamentale ha affermato la sua piena fiducia nello spirito di osservazione etologica del tecnico addetto al loro mantenimento, per individuare eventuali problemi di tipo sociale.

- Le due dottorande hanno mostrato sia una chiara passione per la raccolta del dato fisiologico, così come una attenzione ammirevole perché le procedure, come la calibrazione del punto di immissione dell'elettrodo, possano essere efficaci il più possibile, in modo da giustificare l'utilizzo dei macachi, e che questo uso sia ottimale in termini di qualità del dato sperimentale ottenuto.
- Ho notato con piacere parlando con le due dottorande un atteggiamento compassionevole e onesto in relazione allo stato di benessere dei soggetti sperimentali. Ho rilevato la volontà al mettersi continuamente in discussione dal punto di vista etico-morale, ma mantenendo sempre chiaro il fine e lo scopo del progetto. Hanno dato prova di aver sviluppato un forte attaccamento verso i due soggetti sperimentali, e una apprezzamento della complessità delle interazione fra loro e i macachi. Le due giovani ricercatrici al pomeriggio passano tempo Larry e Alan al di fuori delle necessità del protocollo del progetto.

## **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, 2/09/2023

.....

