LIBERAZIONE E REINSERIMENTO DEGLI ANIMALI

Alessandra Berry, Augusto Vitale, Carla Raggi, Francesca Cirulli
 Centro di Riferimento Scienze Comportamentali e Salute Mentale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

In Europa l'utilizzo degli animali per fini scientifici è regolamentato dalla Direttiva 2010/63/UE del 22 settembre 2010 che rappresenta un aggiornamento di quella precedente, la 1986/609/CEE. La Direttiva è stata recepita in Italia come DL.vo 26/2014 il 4 marzo 2014 ed è volta a tutelare il benessere degli animali utilizzati a fini scientifici, assicurandone l'impiego in ricerche ad elevata rilevanza per la salute umana e animale (si veda anche il "Cubo di Bateson" (1)). Essa si fonda saldamente sul "principio delle 3R" (si vedano gli art. 1, 13, 31 nel testo del DL.vo 26/2014) che fa riferimento ai concetti di "Sostituzione" (*Replace*), "Riduzione" (*Reduce*) e "Raffinamento" (*Refine*) (si veda (2) per una trattazione esaustiva sull'argomento).

Questa Direttiva – e il suo recepimento italiano cui si farà riferimento d'ora in avanti in questo contributo – si inserisce appieno in un contesto caratterizzato da importanti progressi nella tecnologia associata alla ricerca scientifica, ma anche e soprattutto da un cambiamento nell'etica relativa all'utilizzo degli animali da laboratorio.

Un interessante aspetto del DL.vo 26/2014 è sicuramente legato alla possibilità di poter reinserire, a fine procedura, gli animali sperimentali che ne posseggano i requisiti, in habitat adeguati, ovvero in sistemi di allevamento consoni alla specie. È qui da notare che non si tratta di un vero e proprio elemento di novità. Infatti, il vecchio decreto DL.vo 92/116 già contemplava la possibilità che l'animale fosse mantenuto in vita al termine di un esperimento e che potesse essere tenuto presso lo stabilimento utilizzatore, o altro stabilimento di custodia o rifugio, purché fossero assicurate alcune condizioni da parte di allevatori, fornitori o utilizzatori di animali da esperimento (art. 6 comma 3 dell'abrogato DL.vo 92/116). Tra queste vanno menzionate:

- possibilità di alloggiamento in ambienti atti a consentire libertà di movimento;
- possibilità di disporre di una alimentazione, acqua e cure consone alla loro salute e al loro benessere;
- riduzione al minimo di qualsiasi limitazione alla possibilità di soddisfare bisogni fisiologici e comportamentali;
- periodici controlli del benessere e delle condizioni di salute degli animali, allo scopo di evitare danni durevoli, dolore, inutili sofferenze o angoscia;
- adozione di misure atte a correggere tempestivamente difetti o sofferenze eventualmente constatati (art. 5. dell'abrogato DL.vo 92/116).

L'elemento di novità è rappresentato dal fatto che si tiene ora in considerazione che l'animale che lascia la struttura di origine per essere adottato o liberato necessita, per la tutela del proprio benessere, di un percorso di preparazione, che in alcuni casi è una vera e propria riabilitazione. La riabilitazione dovrebbe essere messa in atto attraverso la predisposizione di programmi individuali e specie-specifici che tengano conto di aspetti e problematiche inerenti sia il comportamento che la fisiologia dell'animale (socializzazione). L'attuazione di questo aspetto innovativo del DL.vo 26/2014, può contare sull'Organismo Preposto al Benessere degli Animali (OPBA) che dovrebbe poter fornire una consulenza in merito ai programmi di reinserimento, compresa l'adeguata socializzazione degli animali che devono essere reinseriti

(art. 26). Tale organismo, che è presente presso ciascun allevatore, fornitore o utilizzatore, è composto almeno dalla persona o dalle persone responsabili del benessere e della cura degli animali, dal medico veterinario e, nel caso di un utilizzatore, da un membro scientifico (art. 25).

La riabilitazione, che è stata già definita da alcuni come “la quarta R” (in riferimento alle 3R di Russel e Burch), ha di fatto il potenziale di rendere molto più concreta e attuabile la possibilità di liberazione e/o affido in adozione a scopo umanitario degli animali a fine procedura (art. 19 DL.vo 26/2014 attualmente in vigore).

Questo contributo tratterà in dettaglio l’affido in adozione a fine procedura, focalizzandosi anche sugli aspetti riabilitativi. Si farà riferimento all’impatto che i fattori ambientali possono avere nel lungo termine sul fenotipo adulto dell’animale e sulle problematiche inerenti al percorso riabilitativo. Verranno in particolare trattati gli effetti delle esperienze precoci in specie altriciali (immature alla nascita) e le ricadute in termini di vulnerabilità individuale. Illustreremo come alcuni studi di base su modelli animali, mirati ad approcci traslazionali, possano fornire importanti informazioni sul possibile percorso riabilitativo degli animali destinati all’adozione. Verrà anche considerata l’opportunità di applicare l’art. 19 nel caso di animali transgenici. Da ultimo si illustrerà l’esperienza dell’Istituto Superiore di Sanità nella cessione di una colonia di scimmie marmoset (*Callithrix jacchus*), e le precauzioni prese in relazione alla scelta della destinazione e la preparazione per il trasporto.

Gestione degli animali a fine procedura e importanza delle esperienze precoci nel percorso riabilitativo

Poiché la liberazione e il reinserimento degli animali sono aspetti contemplati solo alla fine di una “procedura” è bene introdurre preventivamente questo concetto. Nell’attuale DL.vo 26/2014 si intende per procedura, qualsiasi uso, invasivo o non invasivo, di un animale ai fini sperimentali o ad altri fini scientifici dal risultato noto o ignoto, o a fini educativi, che possa causare all’animale un livello di dolore, sofferenza, *distress* o danno prolungato equivalente o superiore a quello provocato dall’inserimento di un ago secondo le buone prassi veterinarie. Ciò include qualsiasi azione che intende o può determinare la nascita o la schiusa di un animale o la creazione e il mantenimento di una linea di animali geneticamente modificata con fenotipo sofferente in queste condizioni (art. 3). Una procedura si considera terminata quando non è necessario effettuare ulteriori osservazioni ovvero quando, nel caso di nuove linee di animali geneticamente modificate, la trasmissione dell’alterazione genetica non ha dato luogo o si prevede che non dia luogo per la discendenza ad un livello di dolore, sofferenza, *distress* o danno prolungato. Al termine di una procedura o per qualsiasi eventuale interruzione della stessa il medico veterinario decide se l’animale deve essere tenuto in vita o soppresso (art. 17).

Qualora un animale debba essere mantenuto in vita, esso riceve la cura e la sistemazione adeguate alle sue condizioni di salute. Gli animali utilizzati o destinati a essere utilizzati nelle procedure, previo parere favorevole del medico veterinario, possono essere reinseriti o reintrodotti in un habitat adeguato o in un sistema di allevamento appropriato alla loro specie, alle seguenti condizioni:

- a) lo stato di salute dell’animale lo permette;
- b) non vi è pericolo per la sanità pubblica, la salute animale o l’ambiente;
- c) sono state adottate le misure del caso per la salvaguardia del benessere dell’animale;
- d) è stato predisposto un programma di reinserimento che assicura la socializzazione degli animali ovvero un programma di riabilitazione, se animali selvatici, prima della reintroduzione nel loro habitat (art. 19).

A questo punto è importante notare che, in linea teorica, l'art. 19 si applica a qualsiasi animale coinvolto in una procedura ivi inclusi animali transgenici. Anche mammiferi che si siano sviluppati da forme fetali oggetto di procedure sperimentali, a partire dall'ultimo terzo della gravidanza, potrebbero ricadere nel campo di applicazione dell'art. 19. Quest'ultimo aspetto offre un eccellente spunto per introdurre il concetto di flessibilità e di periodi sensibili agli effetti dell'ambiente nel programma di sviluppo dei mammiferi. Va però considerato che tale flessibilità può diventare un'arma a doppio taglio per il completamento ottimale dello sviluppo dell'organismo, portando a conseguenze di lungo termine nel fenotipo adulto. Queste considerazioni assumono una notevole importanza nel caso di cani, gatti e conigli, animali d'affezione spesso utilizzati in procedure sperimentali, e che rappresentano una categoria particolarmente ambita nel contesto delle adozioni a fine procedura. Per quel che riguarda cani e gatti (per l'utilizzo dei quali il DL.vo 26/2014 pone comunque limiti stringenti), essi sono sicuramente animali che presentando un elevato sviluppo neurologico; sono caratterizzati da un vasto e ricco repertorio comportamentale che è il risultato di complesse interazioni tra patrimonio genetico ed effetti dell'ambiente e richiedono pertanto particolari cure e attenzioni in fase di preparazione all'adozione o di riabilitazione.

Lo sviluppo del mammifero è un processo graduale in cui fattori non solo genetici ma anche ambientali giocano un ruolo chiave nel determinare quello che sarà il fenotipo dell'individuo adulto. Tale processo ha inizio in utero e, soprattutto per le specie altriciali (cioè inette alla nascita), si completa ampiamente dopo la nascita. Per quanto riguarda lo sviluppo intrauterino, il programma ontogenetico del mammifero mostra (entro i limiti della specie-specificità) un elevato livello di plasticità che consente all'organismo di potersi adattare a quello che sarà l'ambiente futuro (vita postnatale). In particolare, è possibile individuare delle vere e proprie "finestre di plasticità" durante le quali l'organismo è particolarmente sensibile agli effetti ambientali. Tuttavia, se da un lato questi periodi sensibili rappresentano un'opportunità per lo sviluppo ottimale dell'individuo, dall'altro possono trasformarsi in periodi di potenziale vulnerabilità (3, 4). Ad esempio, gli studi seminali di Barker sull'incidenza di alcune patologie croniche nell'uomo (es. cardiovascolari, metaboliche, ecc.) come conseguenza di condizioni avverse esperite in utero hanno confermato l'importanza dell'ambiente prenatale nel normale sviluppo fetale (5). Perciò lo stile di vita e le esperienze vissute dalla madre durante la gravidanza assumono un ruolo tale da poter alterare lo sviluppo del feto sia da un punto di vista metabolico che non, determinando conseguenze in grado di manifestarsi anche nel lungo termine, quando il bambino sarà ormai adulto. Studi preclinici su modelli animali (soprattutto ratto e topo) hanno ampiamente confermato le osservazioni di Barker chiarendone, almeno in parte, alcuni dei meccanismi ed evidenziando come l'ultimo terzo del periodo di gravidanza (che nel topo è complessivamente di circa 19 giorni e nel ratto di 21) rappresenti un periodo particolarmente sensibile per l'esposizione agli effetti ambientali. L'ambiente intrauterino (anche attraverso variazioni nella fisiologia e nella funzionalità della placenta) è così in grado di veicolare gli effetti di differenti tipi di stress prenatale (es. metabolico, psicofisico, infettivo) portando a una vasta gamma di conseguenze di lungo termine. Tra queste vanno sicuramente annoverate disfunzionalità a carico del sistema neuroendocrino che, a loro volta, rappresentano un importante fattore di rischio per l'insorgenza di patologie metaboliche e/o per il possibile sviluppo di comportamenti aberranti, condizioni queste anche osservabili in comorbidità tra loro (6-9).

Come precedentemente accennato, lo sviluppo del mammifero ha inizio durante la vita prenatale e si completa dopo la nascita. Numerosi studi indicano come le esperienze precoci determinate in massima parte dall'interazione con la madre e con i fratelli contribuiscano in modo preponderante allo sviluppo delle competenze sociali e della capacità di fronteggiare situazioni stressanti attraverso variazioni nelle risposte emozionali del soggetto adulto (10). Esperienze quali la deprivazione materna o la carenza di stimoli (sociali ma anche ambientali) in

periodi critici durante fasi ontogenetiche precoci, caratterizzati dallo sviluppo di competenze sensorimotorie, possono portare a conseguenze di lungo termine sul comportamento sociale, rendendo l'individuo adulto vulnerabile all'insorgenza di disturbi comportamentali (11).

Nel cucciolo di cane, ad esempio, la fase sensibile dello sviluppo che corrisponde alla socializzazione primaria comprende un periodo che va dalla 3^a alla 12^a settimana di vita con un periodo sensibile al rinforzo sociale tra i 6 e gli 8 mesi (12, 13). Un ottimale sviluppo delle competenze sociali adulte necessita quindi che il cucciolo sia esposto ad appropriate esperienze sociali almeno fino agli otto mesi di vita. Durante tutto questo periodo lo sviluppo del sistema nervoso centrale del cane è sensibile alle esperienze e la spinta motivazionale all'esplorazione dell'ambiente e dei conspecifici supera di gran lunga la tendenza alla neofobia che si instaurerà solo in seguito (a partire dalla 12^a settimana) (12, 13). Un interessante studio di Fox sullo sviluppo del comportamento sociale del cane ha mostrato come cani allevati esclusivamente con gatti durante il periodo critico di socializzazione tendessero a evitare i conspecifici, mostrassero una mancanza di identificazione con la propria specie e con la propria immagine e fossero caratterizzati da scarsa capacità di comunicazione con i conspecifici. Questi effetti tuttavia scomparivano in seguito ad una opportuna socializzazione con altri membri della propria specie. Inoltre, solo cani cresciuti insieme a gatti erano capaci di una corretta interazione sociale interspecifica (12). Questi studi hanno contribuito a chiarire l'importanza della fase di socializzazione nella formazione di relazioni sociali di attaccamento non solo con conspecifici, ma anche con quei non-conspecifici cui sono esposti durante questo periodo dello sviluppo (14). Le relazioni di attaccamento, che si instaurano durante la fase di socializzazione, determineranno quindi i futuri partner sociali e le modalità di approccio/interazione sia intra- sia inter-specifiche (15). Un altro aspetto interessante che emerge dallo studio di Fox, soprattutto nel contesto della riabilitazione, è quello relativo alla possibilità di correggere gli effetti di una socializzazione estrema (esposizione esclusiva al gatto) attraverso un opportuno intervento.

La fase di socializzazione assume una elevata importanza anche nel determinare le caratteristiche di attaccamento all'ambiente in cui il cane viene allevato (13, 14). Cuccioli di cane allevati in ambienti ristretti e monotoni privati della possibilità di esplorare ambienti nuovi durante la fase critica della socializzazione potrebbero sviluppare in età adulta comportamenti neofobici e di forte difesa del territorio (13). Da quanto detto, si evince chiaramente che le esperienze precoci in periodi sensibili dello sviluppo possono avere importanti effetti di lungo termine sull'individuo adulto, influenzandone il comportamento emotivo e sociale oltre che la capacità di fronteggiare appropriatamente situazioni stressanti. Questi aspetti non possono assolutamente essere trascurati se si considera che molti dei cani allevati e utilizzati a fini scientifici sono svezzati e allontanati precocemente dalla madre per completare lo sviluppo in ambienti scarsamente stimolanti, sia dal punto di vista sociale che dell'ambiente fisico.

Come precedentemente accennato, in linea teorica, l'art. 19 si applica a qualsiasi animale coinvolto in una procedura – inclusi animali transgenici. Ci riferiremo qui solo ed esclusivamente ai roditori più comunemente usati nella ricerca scientifica (topi e ratti) tralasciando ad esempio il pesce zebra (*Danio rerio*) che pure rappresenta un organismo modello sempre più diffuso. Innanzi tutto, è bene sottolineare che l'inclusione di animali transgenici nell'ambito di applicazione del DL.vo 26/2014 si deve al riconoscimento di una maggiore vulnerabilità di questi animali che sono quindi “meritevoli” di protezione.

Per un'ampia discussione in merito si rimanda al capitolo “Animali geneticamente modificati nel DL.vo 26/2014 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici” di Berry e Branchi, in questo rapporto. A questo proposito, per quel che concerne l'affido in adozione vale la pena riferirsi a due aspetti di particolare importanza: quello del “fenotipo inatteso” e quello relativo a modelli animali che non riproducono caratteristiche patologiche ma sono piuttosto volti a implementare aspetti genetici di protezione o prevenzione da patologie. Un fenotipo inatteso

può essere definito come un effetto aspecifico che può insorgere a seguito dell'interferenza del processo di transgenesi con la normale programmazione ontogenetica dell'animale, dando luogo a cambiamenti fisiologici e/o comportamentali compensatori risultanti in fenotipi completamente inaspettati nell'animale maturo. Se molti di questi aspetti sono immediatamente evidenti, altri (soprattutto per le finalità descritte all'art. 19) necessitano di un'attenta valutazione da parte dei veterinari che dovrebbero essere affiancati da personale esperto e competente in materia attraverso batterie di test specifici. Alcuni animali, ad esempio, potrebbero essere particolarmente suscettibili a situazioni di stress ambientale o potrebbero essere caratterizzati da modifiche importanti nella soglia nocicettiva (ipo- o iper-algesia) o nel metabolismo (sviluppo di obesità o eccessiva magrezza) che potrebbero rendere complesso il processo di adozione e/o metterne a rischio la vita (16, 17).

Una considerazione importante riguarda anche la generazione di modelli animali geneticamente modificati volta a implementare aspetti della fisiologia umana attraverso un'attenta caratterizzazione del fenotipo mutante. Molti studi sull'invecchiamento si avvalgono della generazione di topi transgenici con una più estesa longevità (18); studi volti al miglioramento di deficit cognitivi si avvalgono della generazione di topi "superintelligenti" (19) mentre studi sulla riproduzione potrebbero portare alla creazione di topi con elevata fertilità (anche attraverso linee di topi generate a partire da accoppiamenti selettivi per molte generazioni) (20). In tutti questi casi pur non essendo a rischio il benessere animale si impone un principio di precauzione per il quale l'adozione di animali transgenici potrebbe rappresentare, in caso di fuga, un grave pericolo per l'ecosistema portando alla contaminazione progressiva di colonie naturali di roditori. Sebbene tale evenienza sia da considerarsi improbabile, in quanto molti studi condotti finora hanno dimostrato come gli animali geneticamente modificati mostrino notevoli difficoltà ad adattarsi e a sopravvivere in ambienti naturali, questa possibilità non può essere esclusa (21).

Programmi riabilitativi

La liberazione e il reinserimento degli animali in habitat adeguati o in sistemi di allevamento consono alla loro specie richiedono molte precauzioni per la tutela del loro benessere e la predisposizione di programmi riabilitativi ad hoc. Sebbene, come precedentemente detto, l'OPBA, attraverso le competenze del medico veterinario e delle persone responsabili del benessere degli animali, sia in grado di fornire una consulenza in merito ai programmi di riabilitazione, di fatto nella maggior parte dei casi il percorso riabilitativo viene effettuato a valle della cessione degli animali a fine procedura. In questo caso il personale esterno allo stabilimento utilizzatore si avvale dell'esperienza maturata in questo settore che consente di proporre degli schemi di carattere generale per possibili protocolli riabilitativi per alcune delle specie più utilizzate in laboratorio (topi, ratti, porcellini d'india, conigli). Tali programmi comprendono elementi di riabilitazione fisica per il recupero della piena mobilità motoria; rieducazione alimentare; rieducazione comportamentale sia per le interazioni con i conspecifici che con l'essere umano. Per una trattazione completa sull'argomento si rimanda a (22).

A questo proposito, è interessante notare come alcuni studi di base su modelli animali, mirati ad approcci traslazionali, possano fornire importanti informazioni di carattere scientifico per implementare i programmi riabilitativi degli animali destinati all'adozione che, come precedentemente detto si basano fondamentalmente sull'esperienza del personale che opera in questo settore.

Studi condotti sul ratto hanno rivelato come la procedura di sostituzione alla nascita della madre naturale (stressata durante la gravidanza) con una madre adottiva rappresenti un valido

intervento in grado, attraverso un aumento nelle cure materne, di ripristinare nella prole il corretto funzionamento del sistema neuroendocrino (23). Studi molto più recenti mostrano come il comportamento ansioso di ratti stressati prenatalmente può essere attenuato, durante l'adolescenza, attraverso l'interazione sociale e il gioco con giovani ratti non stressati (nidiate di controllo) (24). L'aumentata plasticità del sistema nervoso in risposta alla stimolazione ambientale si conserva anche in età avanzata. Topi anziani di due anni di età se esposti ad un ambiente fisicamente arricchito per un periodo di tre mesi mostrano prestazioni migliori in un paradigma di apprendimento e di *food seeking* rispetto a soggetti mantenuti in gabbie standard (25, 26). Quest'ultimo esempio indica come sia possibile intervenire mediante metodiche non farmacologiche, volte alla stimolazione dei naturali meccanismi di reazione e recupero dell'organismo, al fine di rallentare i deficit comportamentali conseguenti alla neurodegenerazione, che è normalmente associata al processo di invecchiamento.

Un ulteriore studio ha caratterizzato le conseguenze positive dell'allevamento in condizioni di ambiente arricchito sull'espressione dei deficit comportamentali di origine genetica (27). Topi caratterizzati da una mutazione che induce una degenerazione cerebellare presentano un certo numero di deficit in paradigmi sperimentali che richiedono capacità di equilibrio, e più in generale coordinazione sensorimotoria. Tali alterazioni vengono ridotte notevolmente quando questi soggetti vengono allevati sin dalla nascita in un ambiente fisicamente complesso. È noto infatti che in tali condizioni viene favorita la stimolazione sensoriale assieme alla possibilità di esercizio fisico, e di conseguenza ne traggono notevole giovamento i processi di coordinazione motoria (28). Ancora più sorprendente è quanto osservato da Cao *et al.* in differenti modelli animali di tumore (29). Topi esposti ad ambienti arricchiti sia dal punto di vista sia sociale che ambientale mostrano una ridotta crescita tumorale e un aumento nella remissione dei sintomi. Questi effetti sono mediati da una complessa interazione tra fattori metabolici (adipochine) e attivazione del sistema neuroendocrino in risposta alla condizione di arricchimento (29, 30).

Da quanto finora esposto, si evince chiaramente che l'esposizione ad ambienti arricchiti – non solo in periodi di plasticità durante lo sviluppo – può rappresentare un valido strumento per il recupero morfo-funzionale di diverse condizioni patologiche. Tuttavia, queste pratiche dovrebbero sempre essere effettuate con competenza e da personale con esperienza specifica sull'eco-etologia della specie oggetto del programma di riabilitazione. Per esempio, Branchi *et al.* hanno osservato un aumento del comportamento aggressivo in topi *outbred* del ceppo CD-1 esposti ad arricchimento ambientale. Tale effetto, riscontrato solo in soggetti maschi, è stato messo in relazione ad aspetti agonistici del comportamento sociale legati soprattutto allo stato gerarchico e alla territorialità (31).

Nonostante le sopramenzionate precauzioni/limitazioni, la condizione di arricchimento nel contesto del benessere animale è comunque un aspetto di fondamentale importanza non solo per la riabilitazione, ma anche per la prevenzione dell'insorgenza di sintomi di stress nell'animale sperimentale.

Esperienza dell'Istituto Superiore di Sanità nella cessione di una colonia di scimmie marmoset (*Callithrix jacchus*)

Nell'estate del 2014 si è resa necessaria la chiusura dello stabulario delle scimmie marmoset (*Callithrix jacchus*), ospitate per circa 20 anni presso il Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze dell'Istituto Superiore di Sanità, in particolare presso l'allora Reparto di Neuroscienze Comportamentali (diventato dal marzo 2017 Centro di Riferimento Scienze

Comportamentali e Salute Mentale). Il tempo impiegato per riuscire a trovare una sistemazione adeguata per i 18 individui costituenti la colonia è stato di circa un anno.

Una prima scelta per la nuova destinazione è stata quella di individuare soggetti che ancora potevano essere impiegati in procedure sperimentali e soggetti che, per così dire, avrebbero dovuto trovare un meritato riposo dopo gli anni passati a eseguire test comportamentali. Il primo gruppo di individui sarebbe stato indirizzato verso un centro di ricerca comportamentale; il secondo gruppo invece, costituito dai soggetti più anziani, avrebbe raggiunto uno zoo o un centro di recupero. Questa suddivisione però appariva semplice in teoria, ma difficile da applicare in realtà. La ragione è che non avevamo nessuna intenzione di dividere le famiglie (cinque nel nostro caso) costituenti la colonia. Infatti una caratteristica di questa specie è quella di formare legami molto forti fra i membri di una stessa famiglia: una separazione forzata all'interno di un gruppo familiare avrebbe generato uno stato di malessere nei soggetti interessati. Nel nostro caso, un paio di famiglie comprendevano sia individui anziani, che i loro figli più giovani (i quali sarebbero stati ottimi potenziali soggetti sperimentali). La scelta finale fu quella di destinare le due famiglie miste per età a un eventuale centro di ricerca, e invece di donare a zoo, o strutture simili, gli altri tre nuclei familiari composti solo da individui più maturi.

Quindi, da quel momento, la ricerca di una futura destinazione per i membri della colonia ha seguito due binari paralleli. Comunque, le destinazioni sarebbero dovute essere all'interno della Comunità Europea, e questo per due ragioni: evitare viaggi troppo lunghi, e evitare l'eventuale burocrazia legata al viaggio verso paesi extra-comunitari (inoltre, la quasi totalità delle compagnie aeree si rifiuta di trasportare primati non umani).

Per quanto riguarda i potenziali soggetti sperimentali, la ricerca si è indirizzata verso colleghi che avevano esperienza con marmoset, che conducevano studi puramente osservazionali e che, ovviamente, avessero avuto lo spazio per ospitare le due famiglie miste (una di cinque e l'altra di sei individui). Essendo una situazione con risvolti di grande emozionalità, la scelta sarebbe stata indirizzata verso un gruppo che mostrasse non solo qualità della ricerca, ma anche qualità nella cura del benessere degli animali. Dopo una serie di contatti per email, fu invitato un gruppo di Vienna, che si era reso disponibile a ospitare le due famiglie più numerose, a visitare lo stabulario, conoscere gli animali, e discutere sul tipo di ricerca che avrebbe interessato le marmoset nella loro nuova destinazione. Furono discusse con i responsabili dello stabulario le caratteristiche degli alloggiamenti delle scimmie, in termini di misure e complessità dello spazio disponibile. Era di massima importanza essere sicuri che le famiglie non sarebbero state divise, che membri delle due famiglie non sarebbero venuti in contatto fisico, essendo la marmoset comune una specie estremamente territoriale (vedi il sito www.marmoset.com per informazioni sulla specie e necessità in cattività) – comunque, i colleghi erano stati anche individuati per la loro conoscenza e passata esperienza con questa specie. Un'altra particolarità fu che all'interno di una delle due famiglie stava nascendo una rivalità fra due individui. In questa specie, infatti, possono avvenire quelle che possono essere definite come “espulsioni sociali” (32), per le quali un particolare membro di un gruppo sociale improvvisamente attacca un altro familiare. In cattività questa situazione è pericolosa perché può portare alla morte di uno dei due contendenti per aggressione. Noi avevamo predetto che in un ambiente nuovo questa rivalità nascente sarebbe esplosa, provocando una espulsione. Quindi ci siamo assicurati che la nuova sistemazione prevedesse la possibilità di separare e alloggiare “l'espulso”. Infatti, ciò è puntualmente accaduto circa dopo una settimana dall'arrivo degli animali a Vienna. Però bisogna anche registrare la nascita di nuovi individui da una femmina che non figliava più da anni.

Per quanto riguarda gli altri tre nuclei familiari, vista l'età dei soggetti, cominciammo a cercare una collocazione in uno zoo o centro di recupero europeo. Questa ricerca è durata quasi

un anno. Dopo molti rifiuti, dovuti al sovraffollamento di scimmie provenienti da laboratori di ricerca, abbiamo individuato una organizzazione di volontari francesi, che hanno accettato di prendersi cura della ricerca di un posto per le sette scimmie rimaste nei nostri stabulari. L'organizzazione in questione, *Rehabilitation Graal*, ha offerto un aiuto più che prezioso e risolutivo, con grande attenzione per il benessere degli animali coinvolti, con l'accordo però che gli animali non sarebbero stati destinati a istituti di ricerca (www.graal-defenseanimale.org). Innanzitutto i membri dell'associazione si sono personalmente recati negli zoo e centri di recupero francesi che avevano dato la loro disponibilità ad ospitare le nostre scimmie. In effetti, una delle possibili destinazioni sembrava appropriata per ricevere le marmoset, ma i rappresentanti della suddetta associazione non lo consideravano adeguato. Alla fine si è optato per uno zoo francese che aveva una solida esperienza nell'ospitare primati confiscati da traffici illegali.

Una volta individuata la struttura, il servizio del Corpo Forestale dello Stato CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*, attività del Programma delle Nazioni Unite per l'Ambiente) ha emesso una dichiarazione attestante che le scimmie provenivano da allevamenti in cattività e non erano stati sottratti da popolazioni in natura. Inoltre, l'ufficio locale della ASL (Azienda Sanitaria Locale) ha emesso un certificato di buona salute. Questi due certificati avrebbero accompagnato le scimmie nei loro viaggi. L'organizzazione *Rehabilitation Graal* ha individuato un corriere abilitato al trasporto degli animali e ha provveduto al pagamento del trasporto stesso. Il trasportatore fu avvertito di procurare e portare con sé trasportini grandi abbastanza da ospitare fino a 4-5 individui insieme, in modo da non separare le famiglie durante il viaggio, per limitare lo stress del viaggio provvedendo a una situazione sociale familiare e confortevole per gli individui. Il giorno della partenza tutti gli individui sono stati leggermente sedati, disposti nei trasportini con molta paglia, acqua e pezzetti di mela. Inoltre, sono stati ricontrollati tutti i numeri di microchip, che sono stati trascritti per ogni individuo, e consegnati all'autista del mezzo.

Il legame che si instaura con una colonia di scimmie in cattività può essere particolare (33). Non è quindi da sottovalutare la reazione emotiva di chi ha curato una colonia per anni, nel vedere le scimmie andare via. Chi è responsabile della colonia deve essere pronto a stare vicino e comprendere se per gli stabularisti coinvolti il momento del distacco è particolarmente difficile. Nel nostro caso l'emozione è stata contenuta fino all'ultima scimmia, la preferita Emilia la quale, a differenza di tutte le altre, si è fatta prendere e mettere nel trasportino senza opporre resistenza e senza la necessità di essere sedata. Quel momento, compreso per chi scrive, è stato di grande emozione e molto significativo.

Conclusioni

La letteratura scientifica, negli anni intercorsi tra il vecchio e il nuovo DL.vo 26/2014 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici ha fornito un crescente numero di elementi che consentono di individuare e definire con sempre maggior dettaglio quei fattori che possono influenzare la capacità degli animali di provare o esprimere dolore, sofferenza e angoscia. I principali cambiamenti osservabili nell'attuale decreto, trovano ragione in una rinnovata consapevolezza della comunità scientifica nell'approccio alla sperimentazione. In tal senso, l'animale è ora considerato dalla legislazione europea come portatore di un valore intrinseco che deve essere rispettato, e viene in effetti descritto come "essere senziente", e quindi in grado di provare dolore e sofferenza. Da quanto appena detto la riabilitazione si configura a tutti gli effetti come "la quarta R" (in riferimento alle 3R di Russel e Burch) è legata alla consapevolezza che l'animale che lascia la struttura di origine per essere adottato o liberato

necessita, per la tutela del proprio benessere, di un percorso di preparazione che in alcuni casi è una vera e propria riabilitazione. Inoltre, attraverso la predisposizione di programmi individuali e specie-specifici che tengano conto di aspetti e problematiche inerenti sia il comportamento che la fisiologia dell'animale, la riabilitazione ha il potenziale di rendere molto più concreta e attuabile la possibilità di liberazione e/o affidamento in adozione a scopo umanitario degli animali a fine procedura.

Bibliografia

1. Bateson P. When to experiment on animals. *New Scientist* 1986(109):30-2.
2. Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen; 1959.
3. Bateson P. Fetal experience and good adult design. *Int J Epidemiol* 2001;30(5):928-34.
4. Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, *et al*. Developmental plasticity and human health. *Nature* 2004;430(6998):419-21.
5. Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)*. 1998;95(2):115-28.
6. Bellisario V, Berry A, Capoccia S, Raggi C, Panetta P, Branchi I, *et al*. Gender-dependent resiliency to stressful and metabolic challenges following prenatal exposure to high-fat diet in the p66(Shc^{-/-}) mouse. *Front Behav Neurosci* 2014;8:285.
7. Iozzo P, Holmes M, Schmidt MV, Cirulli F, Guzzardi MA, Berry A, *et al*. Developmental ORIGins of Healthy and Unhealthy AgeiNg: the role of maternal obesity--introduction to DORIAN. *Obes Facts* 2014;7(2):130-51.
8. Vallee M, Mayo W, Maccari S, Le Moal M, Simon H. Long-term effects of prenatal stress and handling on metabolic parameters: relationship to corticosterone secretion response. *Brain Research* 1996;712(2):287-92.
9. Welberg LA, Seckl JR, Holmes MC. Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behaviour. *Neuroscience* 2001;104(1):71-9.
10. Cirulli F, Francia N, Berry A, Aloe L, Alleva E, Suomi SJ. Early life stress as a risk factor for mental health: role of neurotrophins from rodents to non-human primates. *Neurosci Biobehav Rev* 2009;33(4):573-85.
11. Bateson P. Behavioural development in the cat. In: Turner DC, Bateson P (Ed.). *The domestic cat*. Cambridge: Cambridge University Press; 1988. p. 9-22.
12. Fox MW. Behavioral effects of rearing dogs with cats during the "critical period of socialization". *Behaviour* 1969;35:273-80.
13. Serpell J, Jagoe JA. Early experience and the development of behaviour. In: Serpell J (Ed.). *The domestic dog: its evolution, behaviour and interactions with people*. Cambridge: Cambridge University Press; 1995. p. 80-102.
14. Scott JP, Stewart JM, De Gheff VJ. Critical periods in the organization of systems. *Developmental Psychobiology* 1974;7(6):489-513.
15. Francia N, Alleva E. Etologia canina - Sviluppo del Comportamento sociale nel cane. In: Cirulli F (Ed.). *Animali terapeuti*. Torino: Carocci Faber; 2013. p. 52-3.
16. Lipp HP, Wolfer DP. Genetically modified mice and cognition. *Curr Opin Neurobiol* 1998;8(2):272-80.
17. Newmark P. Guidelines produced for the use of transgenic animals in research. *Nature* 1989;337(6205):295.

18. Chen YF, Wu CY, Kao CH, Tsai TF. Longevity and lifespan control in mammals: lessons from the mouse. *Ageing Research Reviews* 2010;9 Suppl 1:S28-35.
19. Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 1999;401(6748):63-9.
20. Langhammer M, Michaelis M, Hoeflich A, Sobczak A, Schoen J, Weitzel JM. High-fertility phenotypes: two outbred mouse models exhibit substantially different molecular and physiological strategies warranting improved fertility. *Reproduction* 2014;147(4):427-33.
21. Giorgio M, Berry A, Berniakovich I, Poletaeva I, Trinei M, Stendardo M, et al. The p66Shc knocked out mice are short lived under natural condition. *Aging Cell* 2012;11(1):162-8.
22. Berry A, Giorgi M, Cirulli F. Le adozioni nel quadro normativo del DL.vo 26/2014 e la loro importanza nel contesto del benessere animale. In: Garattini S, Grignaschi G, Luzi F, Riva F (Ed.). *Benessere e animal care dell'animale da laboratorio*. Milano: Le Point Veterinaire Italie; 2015.
23. Maccari S, Piazza PV, Kabbaj M, Barbazanges A, Simon H, Le Moal M. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J Neurosci* 1995;15(1 Pt 1):110-6.
24. Berry A, Panetta P, Luoni A, Bellisario V, Capoccia S, Riva MA, et al. Decreased Bdnf expression and reduced social behavior in periadolescent rats following prenatal stress. *Developmental Psychobiology* 2015;57(3):365-73.
25. Warren JM, Zerweck C, Anthony A. Effects of environmental enrichment on old mice. *Developmental Psychobiology* 1982;15(1):13-8.
26. Green EJ, Greenough WT, Schlumpf BE. Effects of complex or isolated environments on cortical dendrites of middle-aged rats. *Brain Research* 1983;264(2):233-40.
27. Caston J, Devulder B, Jouen F, Lalonde R, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. Role of an enriched environment on the restoration of behavioral deficits in Lurcher mutant mice. *Developmental Psychobiology* 1999;35(4):291-303.
28. Chapillon P, Manneche C, Belzung C, Caston J. Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. *Behavior Genetics* 1999;29(1):41-6.
29. Cao L, Liu X, Lin EJ, Wang C, Choi EY, Riban V, et al. Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition. *Cell* 2010;142(1):52-64.
30. Cao L, Choi EY, Liu X, Martin A, Wang C, Xu X, et al. White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis. *Cell Metabolism* 2011;14(3):324-38.
31. Pietropaolo S, Branchi I, Cirulli F, Chiarotti F, Aloe L, Alleva E. Long-term effects of the periadolescent environment on exploratory activity and aggressive behaviour in mice: social versus physical enrichment. *Physiology & Behavior* 2004;81(3):443-53.
32. De Filippis B, Chiarotti F, Vitale A. Severe intragroup aggressions in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). *J Appl Anim Wel Sci* 2009;12:214-22.
33. Coleman K. Caring for non-human primates in biomedical research facilities: scientific, moral and emotional considerations. *Am J Primatology* 2011;73:220-5.