



RAPPORTI ISTISAN 17|23

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Contributo delle scienze comportamentali alla qualità della ricerca biomedica e alla tutela del benessere animale

A cura di
I. Branchi e W. Adriani



FORMAZIONE
E INFORMAZIONE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Contributo delle scienze comportamentali
alla qualità della ricerca biomedica
e alla tutela del benessere animale**

A cura di
Igor Branchi e Walter Adriani

Centro di Riferimento Scienze Comportamentali e Salute Mentale

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Rapporti ISTISAN
17/23

Istituto Superiore di Sanità

Contributo delle scienze comportamentali alla qualità della ricerca biomedica e alla tutela del benessere animale.

A cura di Igor Branchi e Walter Adriani

2017, iii, 56 p. Rapporti ISTISAN 17/23

Il rapporto descrive le strategie per la tutela e la protezione del benessere delle specie animali utilizzate nella sperimentazione in campo biomedico. Dopo la descrizione dei principi teorici alla base della tutela del benessere animale, come quello delle 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*), sono descritte le strategie da implementare da un punto di vista pratico. Queste includono, l'implementazione di approcci statistici appropriati al fine di ottenere una riduzione del numero di animali necessari al raggiungimento degli obiettivi della ricerca, l'affinamento delle procedure sperimentali da usare in modo da massimizzare il benessere del soggetto sperimentale, le cautele da utilizzare in casi particolari, come nel caso degli individui geneticamente modificati e degli invertebrati. In conclusione, il presente contributo si pone l'obiettivo di illustrare, sia da un punto di vista concettuale che pratico, l'implementazione delle attuali conoscenze sulle problematiche relative alla sperimentazione animale, in modo da tutelare il benessere dei soggetti sperimentali.

Parole chiave: Benessere animale; Principio delle 3R; Comportamento

Istituto Superiore di Sanità

The role of behavioural sciences in promoting the quality of biomedical research and protecting animal welfare.

Edited by Igor Branchi and Walter Adriani

2017, iii, 56 p. Rapporti ISTISAN 17/23 (in Italian)

This report describes the strategies for the safeguard and the protection of well-being of the animals used in the biomedical research field. In particular, theoretical principles, such as the 3R (Replacement, Reduction, Refinement), and the strategies to be implemented from a practical point of view for the protection of animal welfare will be described. Special attention will be paid to the implementation of appropriate statistical approaches to obtain a reduction in the number of animals needed to achieve the research goals, the refinement of experimental procedures to be used to maximize the well-being of the experimental subjects, the caution to be used in particular cases, as in the case of genetically modified individuals and invertebrates. In conclusion, this issue aims to illustrate, from a conceptual and practical point of view, the implementation of current knowledge on animal experimentation, so as to protect and improve the well-being of experimental subjects.

Keywords: Animal welfare; Principle of the 3Rs; Behaviour

Si ringraziano: Antonella Torrice, per il prezioso supporto nell'ambito dell'attività valutativa tecnico-scientifica prevista per l'appunto dal DL.vo 26/2014; Stella Falsini, Irene Pistella e Luigia Cancemi per il loro ineguagliabile supporto tecnico durante la stesura di questo fascicolo.

Per informazioni su questo documento scrivere a: walter.adriani@iss.it, igor.branchi@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Branchi I, Adriani W (Ed.). *Contributo delle scienze comportamentali alla qualità della ricerca biomedica e alla tutela del benessere animale*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2017. (Rapporti ISTISAN 17/23).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Paola De Castro e Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



INDICE

Presentazione <i>Igor Branchi, Walter Adriani</i>	iii
Modello delle “3R” come riferimento culturale nella sperimentazione animale <i>Augusto Vitale, Isabella De Angelis</i>	1
“R” come riduzione: il dimensionamento dello studio è meno difficile (e più utile) di quanto si pensi <i>Laura Ricceri, Flavia Chiarotti</i>	6
Arricchimento ambientale, benessere animale e validità dei dati sperimentali <i>Simone Macrì</i>	17
Problematiche relative al benessere degli animali geneticamente modificati utilizzati a fini scientifici <i>Alessandra Berry, Igor Branchi</i>	23
Rilevanza dello studio del comportamento per la valutazione del benessere animale <i>Francesca Zoratto, Marta Borgi, Enrico Alleva, Nadia Francia</i>	30
Sperimentazione animale e linee guida per la cura e il benessere dei cefalopodi, una classe “eccezionale” di invertebrati <i>Alessandra Berry, Enrico Alleva</i>	41
Liberazione e reinserimento degli animali <i>Alessandra Berry, Augusto Vitale, Carla Raggi, Francesca Cirulli</i>	47

PRESENTAZIONE

Negli ultimi anni, la tutela e la protezione delle specie animali utilizzate per la sperimentazione è divenuta una problematica sempre più di primo piano e ha posto gli operatori del settore della ricerca scientifica davanti alla necessità di attuare un processo costante di miglioramento delle procedure sperimentali che coinvolgono animali al fine di preservare il loro benessere. I principi teorici alla base di tale processo e gli strumenti tecnici da implementare sono l'argomento del presente *Rapporto ISTISAN*.

Il primo contributo, firmato da Augusto Vitale e Isabella De Angelis, fornisce una introduzione alle problematiche relative al benessere animale, dando conto del quadro teorico e culturale sottostante le norme che regolano la sperimentazione animale. In particolare, è illustrato il principio delle 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*) che è divenuto un riferimento imprescindibile per una corretta sperimentazione animale nel campo della ricerca biomedica. Il secondo contributo, redatto da Laura Ricceri e Flavia Chiarotti, affronta una delle criticità più spinose, ovvero il corretto approccio statistico per definire il numero di animali minimo, ma efficace, per valutare in modo affidabile e replicabile una specifica ipotesi scientifica. Simone Macrì approfondisce invece la necessità di fornire agli animali sperimentali un appropriato arricchimento dell'ambiente in cui vivono, sottolineando come questo elemento, finalmente obbligatorio in base alle norme vigenti, sia chiave nel determinare il benessere dei soggetti sperimentali. Le problematiche da prendere in considerazione in modo specifico quando nella sperimentazione sono coinvolti animali geneticamente modificati vengono descritte nel contributo di Alessandra Berry e Igor Branchi. In questo caso, sono forniti gli elementi teorici necessari per comprendere come si generino le potenziali conseguenze negative delle modificazioni genetiche sul benessere animale e vengono descritte le strategie per misurare tali conseguenze. Il fenotipo comportamentale e la sua appropriata valutazione etologica come strategia per misurare il benessere animale è l'argomento affrontato nel contributo di Nadia Francia e Francesca Zoratto. Inoltre, il benessere degli animali invertebrati, almeno di alcune specie, anche questo finalmente regolamentato dalle normative vigenti, è illustrato da Alessandra Berry ed Enrico Alleva, i quali descrivono come trasferire il concetto di "benessere" nel caso si passi dagli animali vertebrati agli invertebrati. L'ultimo contributo, di Alessandra Berry, Augusto Vitale, Carla Raggi e Francesca Cirulli, descrive le problematiche da affrontare quando la sperimentazione si conclude, prendendo in considerazione strategie come la liberazione, il reinserimento e l'"adozione".

In conclusione, il presente *Rapporto ISTISAN* rappresenta dunque un'occasione per fornire informazioni chiave agli operatori del settore per un corretto approccio alla sperimentazione animale nel campo della ricerca biomedica, con particolare riguardo al benessere dei soggetti sperimentali, ma vuole anche rappresentare uno stimolo valido alla discussione sugli aspetti etici e filosofici che concernono il rapporto che esiste tra società, sperimentatore e animale sperimentale.

Igor Branchi e Walter Adriani

MODELLO DELLE “3R” COME RIFERIMENTO CULTURALE NELLA SPERIMENTAZIONE ANIMALE

Augusto Vitale (a), Isabella De Angelis (b)

(a) Centro di Riferimento Scienze Comportamentali e Salute Mentale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Nel 1959 due accademici britannici, Rex Burch e William Russell, membri della *University Federation of Animal Welfare*, associazione tuttora molto attiva nel campo del benessere animale, pubblicarono un libro destinato a diventare seminale per l'evoluzione della sperimentazione animale: “The principles of humane experimental technique” (Russell & Burch, 1959). In questo volume i due studiosi presentavano una ricetta da seguire per praticare la ricerca con gli animali da laboratorio, in un modo da tener conto sia della qualità del dato sperimentale che del benessere dei soggetti utilizzati. Questa ricetta è tuttora indicata come il principio, o modello, delle “3R” (*Replacement, Reduction e Refinement*). In particolare, chi vuole fare ricerca con gli animali dovrebbe inizialmente chiedersi se sia possibile sostituire il modello animale prescelto con modelli non senzienti (*Replacement*); quindi deve cercare il più possibile di ridurre il numero di individui utilizzati nel proprio protocollo sperimentale (*Reduction*); infine deve adoperarsi per minimizzare il più possibile il livello di sofferenza imposto agli animali sperimentali (*Refinement*). Le “3R” si sono evolute nel tempo, anche se i principi di fondo sono rimasti sempre gli stessi e, riteniamo, sempre validi.

Il modello delle “3R” è una delle spine dorsali della Direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati nelle procedure scientifiche. Naturalmente, questo modello è anche presente nel recepimento italiano, per esempio, nell'articolo 13 sulla scelta dei metodi:

“1. Non sono autorizzabili le procedure che prevedono l'impiego di animali vivi per le quali esistono altri metodi o strategie di sperimentazione, riconosciute dalla legislazione dell'Unione europea, ovvero prevedono metodi vietati dalla normativa vigente nazionale. 2. Qualora il ricorso all'impiego di animali è inevitabile sono seguite, a parità di risultati, le procedure che: a) richiedono il minor numero di animali; b) utilizzano animali con la minore capacità di provare dolore, sofferenza, distress o danno prolungato; c) sono in grado di minimizzare dolore, sofferenza, distress o danno prolungato; d) offrono le maggiori probabilità di risultati soddisfacenti; e) hanno il più favorevole rapporto tra danno e beneficio”

Replacement

Russell e Burch hanno descritto *Replacement* come: “any scientific method employing non-sentient material which may, in the history of experimentation, replace methods which use conscious living vertebrates”. *Replacement* rappresenta forse il concetto più innovativo e ambizioso del modello delle “3R”, prevedendo la sostituzione di animali con materiale non senziente. Può essere assoluto, quando l'animale non viene usato in nessuna fase dell'esperimento, o parziale, se comunque organi o tessuti animali (es. per la preparazione di

colture primarie) o prodotti di origine animale (come siero fetale o tripsina) vengono utilizzati nelle procedure sperimentali.

Il *Replacement* può essere ottenuto attraverso molteplici strumenti. È importante sottolineare che il singolo metodo di *Replacement* spesso non è in grado di dare risposte univoche, ma può essere parte di un approccio integrato in cui vari metodi contribuiscono al raggiungimento del risultato finale. Diverse sono le strategie attualmente disponibili e applicabili al *Replacement*, alcune basate su sistemi normalmente utilizzati nella ricerca biologica di base, altre su strategie innovative altre, infine, su strumenti informatici. In pratica, ai tradizionali e più conosciuti metodi *in vitro* (comprendenti tessuti, colture cellulari o frazioni subcellulari) si affiancano sistemi basati su approcci biochimici che utilizzano molecole di sintesi come indicatori di siti tossici reattivi, biomarcatori e tecnologie *high-throughput*, con cui è possibile processare un elevato numero di campioni in tempi brevi (circa 10.000/giorno rispetto a circa 100/anno ottenuti con i tradizionali saggi *in vivo*) e modelli *computer-based* che includono la classificazione e il raggruppamento di sostanze chimiche strutturalmente affini (*Read-Across*).

La possibilità di poter disporre di modelli non-animali offre numerosi vantaggi allo sperimentatore; in particolare le colture cellulari, consentendo un elevato controllo delle condizioni sperimentali, portano ad una maggiore riproducibilità dei dati. Inoltre, la possibilità di utilizzare cellule umane e/o di miniaturizzare e automatizzare alcuni saggi *in vitro*, consente di migliorare la predittività e l'efficacia dei risultati, velocizzando le procedure di saggio. Infine lo sviluppo di nuove tecnologie, quali i sistemi tri-dimensionali sia di tipo statico che dinamico, che attraverso la combinazione di più modelli di organo o tessuto simulano realisticamente diverse condizioni fisio-patologiche, consentono di avvicinarsi alla complessità dell'organismo vivente. Ad esempio, la messa a punto e successiva validazione di modelli cellulari 3D cutanei e oculari per valutare l'azione irritante e corrosiva di prodotti commerciali, ha portato una significativa riduzione del numero di animali.

Recentemente si è affermata in campo tossicologico la teoria che l'identificazione di eventuali effetti avversi debba basarsi sulla precisa conoscenza dei meccanismi di azione di una sostanza sull'organismo umano. Questo approccio ha fortemente contribuito a generare una strategia alternativa di ampio respiro in cui, oltre alla messa a punto di nuovi metodi *in vitro*, hanno acquistato forte rilevanza approcci metodologici (le cosiddette tecnologie -omiche) basati principalmente sui progressi della biomedicina e delle biotecnologie.

Il ricorso ad organismi a basso sviluppo neurologico, cioè appartenenti a livelli tassonomici inferiori, in alternativa ai tradizionali modelli animali rappresentati dai mammiferi rappresenta, infine, un'altra importante forma di *Replacement* (generalmente definito *Partial Replacement*). Per esempio, l'impiego dei cosiddetti Organismi Modello, come ad esempio il pesce *Danio rerio*, noto come Zebrafish, le cui dimensioni ridotte, il breve ciclo di vita e la elevata fecondità ne favoriscono l'impiego in ecotossicologia, o il nematode *Caenorhabditis elegans*, utilizzato per lo studio di alcuni dei meccanismi molecolari di patologie neuro-degenerative (morbo di Parkinson, morbo di Huntington, Alzheimer). È da notare però che la sostituzione di una specie con un'altra come esempio di *Partial Replacement*, non è una operazione condivisa da tutti. È un concetto proprio della normativa italiana, ma non della normativa europea originale. Per i britannici, il *Partial Replacement* è comunque riferito a "senziente" verso "non-senziente" e, per definizione data dalla Direttiva 2010/63/UE, dove gli animali protetti dalla Direttiva sono tutti "sentient", un pesce è comunque senziente come un macaco, e quindi non è giustificabile il suo uso al posto del primate in nome del *Partial Replacement*. Quindi, *Partial Replacement* corrisponde semplicemente con *Replacement*, nell'accezione originale proposta da Russell e Burch.

Reduction

Russel e Burch descrivono *Reduction* come: “reduction in the number of animals used to obtain information of a given amount and precision”. Questo concetto si riferisce alla riduzione del numero di soggetti utilizzati in un particolare protocollo sperimentale, ma è importante notare che i due autori già sottolineavano l’idea che la riduzione del numero dei soggetti non può condurre a una inefficace potenza statistica. È essenziale quindi chiedere consiglio a un esperto in statistica, qualora il ricercatore o la ricercatrice, non si senta sicuro su come operare. Mediante uno studio pilota si può determinare, per esempio, il numero di variabili estranee al protocollo che possono influenzare la validità del risultato, e come tale variabilità possa richiedere un campione di una certa consistenza numerica. Questo tipo di informazioni può quindi essere utilizzato per calcolare con precisione il numero di soggetti sperimentali necessari per ottenere risultati significativi in quel particolare caso. Un altro modo per ridurre il numero di soggetti sperimentali utilizzati da diversi laboratori è quello di armonizzare il più possibile, a livello nazionale e internazionale, le metodologie utilizzate sia per test di tossicità che per ricerche di tipo biomedico. Ciò ridurrebbe significativamente la possibilità di ripetere gli stessi test in differenti paesi. Inoltre, i risultati non significativi dovrebbero essere resi disponibili, in modo da evitare il ripetersi di test inefficaci e quindi, automaticamente, si ridurrebbe drasticamente il numero di individui sperimentali utilizzati. Quindi un’interessante evoluzione del concetto di *Reduction* è che tale concetto può essere pensato come applicabile non solo a livello del singolo esperimento, o di un particolare progetto di ricerca. Invece, lo si può pensare anche in un contesto più generale, dove però tale applicazione richiede uno sforzo diverso e alle volte più complesso. Il risultato è una migliore della qualità della scienza prodotta, con un minor spreco di animali e risorse.

Refinement

Veniamo al *Refinement*. La definizione originale di *Refinement* offerta da Russell e Burch recita: “simply to reduce to an absolute minimum the amount of stress imposed on those animals that are still used”. Anche il concetto di *Refinement* si è evoluto nel tempo. Russell e Burch avevano già indicato nel loro testo che rifinire le procedure sperimentali voleva dire non solo occuparsi del benessere animale durante un esperimento (evitare casi di “direct inhumanity”), ma anche migliorare la qualità di vita di un individuo durante tutte le procedure che accompagnano la vita di un animale in cattività (evitare casi di “contingent inhumanity”). Nel 2005 fu introdotta una nuova definizione di *Refinement*, da parte di Buchanan-Smith *et al.* (Buchanan-Smith *et al.*, 2005):

“Any approach which avoids, alleviates or minimises the actual or potential pain, distress and other adverse effects suffered at any time during the life of the animals involved, or which enhances their well-being as far as possible.”

Ciò che è particolarmente rilevante in questa definizione è il riferimento a tutta la vita dell’animale in laboratorio, e a uno sforzo attivo e necessario per il miglioramento dello stato di benessere dell’animale sperimentale, dove benessere non è semplicemente assenza di malessere. Quindi, oggi per *Refinement* si intende la tutela del benessere dell’animale sperimentale sia durante l’esperimento vero e proprio, che durante tutta la vita che l’animale passa in laboratorio, dal trasporto fino all’eutanasia.

Un esempio di *Refinement* delle procedure che negli ultimi anni si è sempre più diffuso, è la tecnica del rinforzo positivo in campo primatologico (*positive training*). In questo caso, sfruttando le potenzialità dell'apprendimento associativo e mediante l'uso di ricompense alimentari, all'animale viene insegnato a cooperare nelle procedure routinarie sperimentali. Il risultato di questa metodologia, per esempio, è l'offerta spontanea di un arto da parte di una scimmia per una certa inoculazione, oppure per la somministrazione di un certo farmaco per via orale (Westlund, 2014).

Una forma di *Refinement* che riguarda la qualità della vita dell'animale nella sua vita in laboratorio è il miglioramento delle condizioni di stabulazione. Qui di nuovo l'idea è che animali più "felici" forniscono dati più attendibili (Poole, 1997). L'idea tradizionale di arricchimento ambientale, cioè l'idea forte e principale di questa pratica, è di fornire all'animale in cattività la possibilità di sperimentare un repertorio comportamentale il più possibile simile a quello dell'animale in natura. Secondo la legislazione sulla protezione degli animali utilizzati in procedure scientifiche, l'uso degli arricchimenti ambientali è ora obbligatorio per legge. Infatti, nell'allegato III si legge al capo b):

“Arricchimento. Tutti gli animali dispongono di spazio sufficientemente complesso che consenta loro di esprimere un ampio repertorio di comportamenti normali. Essi dispongono di un certo grado di controllo e di scelta rispetto al proprio ambiente per ridurre comportamenti indotti da stress. Gli stabilimenti mettono in atto tecniche adeguate di arricchimento per ampliare la gamma di attività a disposizione degli animali e aumentare la loro capacità di risposta tra cui l'esercizio fisico, il foraggiamento e le attività di manipolazione e cognitive adeguate alle specie interessate. L'arricchimento ambientale offerto negli alloggiamenti è adattato alle specie e alle esigenze individuali degli animali. Le strategie di arricchimento negli stabilimenti sono riviste e aggiornate periodicamente.”.

Interazioni fra le “3R”

Le tre “R” possono non agire indipendentemente una dall'altra. Infatti, vi sono casi nei quali l'applicazione di una delle tre “R” può avere un impatto positivo su una o tutte e due le altre “R”. Per esempio, una maggiore attenzione alla qualità della vita degli animali sperimentali, dove siano enfatizzati i bisogni specie-specifici dell'individuo (*Refinement*), può portare ad animali che affrontano con meno stress un particolare test. Conseguentemente, ciò può portare a una minore variabilità dei risultati sperimentali ottenuti dal nostro campione, e ciò conduce, a sua volta, a poter ridurre il numero degli animali utilizzati per quel particolare protocollo sperimentale (*Reduction*), conservando comunque la necessità di applicare test statistici adeguati. Ancora, per esempio, nel caso di un particolare protocollo sperimentale si può pensare di sostituire una particolare specie con un'altra caratterizzata da un minore sviluppo del sistema nervoso (es. un topo per una scimmia), e quindi adottare una forma di Sostituzione (*Replacement*). Nonostante sia necessario essere prudenti nell'affermare che un topo abbia un livello di sofferenza minore di quello di una scimmia, applicare questa forma di Sostituzione porterebbe anche ad adottare il concetto di Perfezionamento (*Refinement*), perché il livello di sofferenza imposto all'animale sarebbe minore.

Vi sono però anche casi nei quali due “R” sono in contrasto tra di loro. Per esempio, nel caso dello studio della malattia di Parkinson utilizzando le scimmie marmoset (*Callithrix jacchus*), a un certo punto si è arrivati, grazie a un progresso della metodologia, alla possibilità di usarne un numero minore, ma essere più sicuri che tutti quegli individui avrebbero sviluppato una grave forma di parkinsonismo (Vitale *et al.*, 2008). Qui vediamo un contrasto tra *Refinement* e

Reduction: un numero minore di soggetti sperimentali, ma con un grado di invasività maggiore che non in precedenza quando se ne usavano di più. Quale “R” scegliere? Come ci si deve comportare in questi casi? La legislazione corrente non indica una regola precisa da seguire, che aiuti a dare maggiore peso a una “R” invece che un’altra. Un’indicazione in tale senso però ci è offerta dalla normativa nazionale britannica, dove viene data maggiore importanza al miglioramento delle procedure sperimentali, che non alla riduzione del numero di individui utilizzati in un certo protocollo. Ciò vuol dire che la sofferenza provata dal singolo individuo è il valore più importante del quale tenere conto: provocare maggior sofferenza ad un numero relativamente minore di individui non è accettabile. Se si trattasse di un lieve aumento della sofferenza, utilizzando un numero significativamente minore di individui, allora la riduzione potrebbe essere accettata. Bisogna attuare un’analisi costo/beneficio e, in generale e banalmente, adottare decisioni di buonsenso riguardo a quel particolare protocollo sperimentale.

Considerazioni conclusive

Il modello delle “3R” è sempre più considerato come un punto di riferimento per l’impiego di scienza di alta qualità nei settori accademici e industriali che mostrano maggiore attenzione e consapevolezza allo sviluppo di approcci alternativi che evitino/riducano l’uso di animali aumentando, nello stesso tempo, i livelli di sicurezza per l’uomo e l’ambiente dovuti all’uso di farmaci e sostanze chimiche.

Il modello delle “3R” riguarda le alternative alla sperimentazione animale e le alternative nella sperimentazione animale, dove si possono cambiare alcune procedure, pur continuando a usare gli animali. Troviamo sbagliata, e potenzialmente pericolosa, la tendenza a ridurre il modello delle “3R” solo come *Replacement*: *Replacement* è la “R” più difficile da applicare però può rappresentare facilmente uno sterile campo di battaglia tra le solite fazioni “pro” e “contro” la sperimentazione animale. Chi è pro si intestardisce sul fatto che gli animali devono essere sostituiti, chi è a favore continua a fare ricerca come sempre è stato fatto, perché non si può fare *Replacement*.

Invece, è opinione di chi scrive che il processo di applicazione del modello, là dove sia possibile, deve considerare tutte tre le possibilità. Il modello delle “3R” deve essere considerato non solo come un artificio metodologico, ma come un modo di pensare diversamente la ricerca con gli animali: quindi il modello delle “3R” come *forma mentis*.

Bibliografia

- Buchanan-Smith HM, Rennie AE, Vitale A, Pollo S, Prescott MJ, Morton DB. Harmonising the definition of refinement. *Animal Welfare* 2005;14:379-84.
- Italia. Decreto Legislativo 26/2014. Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale* n. 61 del 14 marzo 2014.
- Poole T. Happy animals make good science. *Lab Anim* 1997;31:116-24.
- Russell W, Burch R. *The Principles of Humane Experimental technique*, Hertfordshire: UFAW Publications; 1959.
- Vitale A, Mancio A, Alleva E. The 3R principle and the use of non-human primates in the study of neurodegenerative diseases: the case of Parkinson’s disease. *Neurosci & BioBehav Rev* 2008;33:33-47.
- Westlund K. Training is enrichment – And beyond. *Appl Anim Beh Sci* 2014;152:1-6.

“R” COME RIDUZIONE: IL DIMENSIONAMENTO DELLO STUDIO È MENO DIFFICILE (E PIÙ UTILE) DI QUANTO SI PENSI

Laura Ricceri, Flavia Chiarotti

Centro di Riferimento Scienze Comportamentali e Salute Mentale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Molti ricercatori italiani per svolgere attività sperimentale *in vivo* devono presentare un progetto di ricerca al Ministero della Salute in cui è necessario fornire dettagli relativi al numero di animali che si intende utilizzare, specificando *come è stato determinato il numero di animali necessari per lo studio*. È un errore considerare con fastidio la richiesta dello studio di dimensionamento del campione, sia perché proprio essa può rivelarsi un’opportunità di progettazione di un’attività sperimentale che miri alla *massima riduzione del numero di animali utilizzati compatibile con gli obiettivi del progetto*, sia perché si tratta di una richiesta in linea con documenti di indirizzo internazionali (1, 2) relativi alla sperimentazione animale mirati sia alla pubblicazione di lavori scientifici sia alla presentazione di progetti per il finanziamento della ricerca. Il corretto dimensionamento dello studio è stato di recente uno degli argomenti trattati in un ampio e più esteso dibattito sulla riproducibilità degli studi preclinici e sul loro effettivo valore traslazionale; da più parti si è sottolineata l’importanza di un corretto dimensionamento per la riproducibilità degli studi preclinici (3, 4).

Formulazione statistica del problema

Da un punto di vista statistico, per ottenere la “R” di Riduzione si debbono disegnare gli esperimenti, fare studi di dimensionamento e analizzare i risultati in modo appropriato. Nel Riquadro 1 abbiamo riportato un glossario ragionato degli elementi del disegno sperimentale; i termini sono poi utilizzati nel resto del testo. Gli elementi di statistica di base che è necessario conoscere per effettuare un corretto dimensionamento di uno studio sperimentale sono riportati nel Riquadro 2. In questo contesto è importante mettere a fuoco che la dimensione campionaria prescelta ha un’influenza diretta sulla potenza dell’analisi statistica, in ultima analisi sull’affidabilità dei risultati dello studio che viene condotto, ed è quindi necessario che sia stimata appropriatamente. Da un punto di vista pratico, per effettuare *a priori* la stima della dimensione campionaria in uno studio sperimentale è necessario conoscere 4 elementi (Riquadro 3 e Figura 1). Due di questi hanno usualmente valori prestabiliti: per α si utilizza solitamente il valore di 0,05 (più raramente 0,01); per la potenza del test ($1-\beta$) si utilizza solitamente il valore di 0,80. Viene scelto questo valore di potenza perché risulta sufficiente ad evidenziare come statisticamente significativi effetti grandi (in caso di variabili quantitative, effetti corrispondenti a differenze tra medie dei gruppi \geq a una deviazione standard, *Standard Deviation*, SD). È interessante notare che valori di potenza maggiore lasciano sostanzialmente invariata la capacità discriminativa del test nel caso di effetti grandi, mentre aumentano la capacità discriminativa del test solo nel caso di effetti medi e piccoli (al di sotto di 1 SD), solitamente meno rilevanti da un punto di vista biologico, e questo al costo di un notevole aumento della dimensione campionaria (5). Valori di potenza $>0,80$ devono quindi essere presi in considerazione solo in casi particolari e con grande cautela in una prospettiva di Riduzione.

RIQUADRO 1**Disegno sperimentale: glossario ragionato degli elementi****Disegno sperimentale**

Per disegno sperimentale di uno studio si intende la struttura secondo cui lo studio viene condotto, ovvero selezione delle unità statistiche, dei fattori di cui si vuole valutare l'effetto, del metodo di attribuzione delle unità statistiche ai diversi livelli di tali fattori, delle variabili di interesse e le loro caratteristiche. Tali elementi influiscono sul metodo di rilevazione delle osservazioni sulle unità statistiche, sul tipo di analisi statistica dei dati appropriata e sulla presentazione dei risultati.

Unità statistica

È l'unità più piccola a cui possa essere assegnato un trattamento. In generale, la scelta dell'unità statistica dipende dall'ipotesi che si vuole verificare con lo studio. Gli studi *in vivo* vengono solitamente condotti su soggetti umani o animali; gli studi *ex vivo* su campioni biologici, quali ad esempio sangue, urina, saliva; gli studi *in vitro* su colture cellulari. Le unità statistiche possono essere fra loro indipendenti o dipendenti. Due unità statistiche si dicono indipendenti quando l'osservazione effettuata su una di esse non fornisca alcun elemento utile a prevedere quale possa essere l'osservazione sull'altra unità. Due unità statistiche si dicono dipendenti quando l'osservazione effettuata su una di esse permetta di prevedere quale sarà l'osservazione sull'altra unità. Ad esempio, nel caso della sperimentazione animale due unità statistiche sono da considerarsi dipendenti quando i due animali siano fratelli, cioè provengano dalla stessa nidiata. Un altro caso, meno evidente, di dipendenza si ha quando gli animali appartengano allo stesso gruppo sociale (nel quale si siano stabiliti e consolidati rapporti di gerarchia) e vengano ad esempio testati per comportamenti di interazione sociale.

Fattore/i in studio

Il fattore in studio può essere uno (disegno uni fattoriale) o più di uno (disegno multifattoriale): ciascuno dei fattori può includere da due a più livelli. Nel caso più semplice in cui il fattore includa solo due livelli, solitamente uno è il livello di riferimento o controllo, e l'altro è il livello di interesse per lo sperimentatore.

Attribuzione delle unità statistiche ai livelli del fattore in studio

Negli studi sperimentali, l'attribuzione è sotto il controllo dello sperimentatore, che deve preferibilmente adottare una procedura di assegnazione casuale della singola unità al singolo livello (nel caso di disegno uni fattoriale) o alla combinazione di livelli (nel caso di disegno multifattoriale). La procedura di assegnazione casuale è detta randomizzazione.

Variabile di interesse

La variabile di interesse può essere descritta in termini di scala di misurazione, contenuto numerico o non numerico, e delle relazioni che è possibile stabilire tra due osservazioni:

Scala	Contenuto	Relazioni
Nominale	Qualitativo, non ordinabile	Uguaglianza/differenza
Ordinale	Qualitativo, ordinabile	Uguaglianza/differenza Maggioranza/minoranza
	Quantitativo, numerico (origine dell'asse convenzionale = zero non assoluto)	Uguaglianza/differenza Maggioranza/minoranza Somma/differenza
Di rapporti	Quantitativo, numerico (origine dell'asse assoluta = zero assoluto o "fisico")	Uguaglianza/differenza Maggioranza/minoranza Somma/differenza Prodotto/rapporto

Dal tipo di variabile dipendono i metodi di analisi statistica che possono essere utilizzati per descrivere i dati e per valutare le ipotesi in studio.

RIQUADRO 2**Elementi di statistica inferenziale****Test statistico di ipotesi (inferenza classica)**

Serve a verificare ipotesi relative a fenomeni in una popolazione, utilizzando dati sperimentali ottenuti su un campione. Perché i risultati campionari possano essere estesi alla popolazione occorre che gli elementi che compongono il campione siano un sottogruppo casuale degli elementi della popolazione.

Ipotesi

Il test di ipotesi non consente di confermare l'ipotesi oggetto del test (detta, ma solo eventualmente di rifiutarla. Per questo, lo sperimentatore dovrà porre alla base del test l'ipotesi complementare rispetto a quella di suo interesse in modo che, rifiutandola, confermi implicitamente l'ipotesi di suo interesse. Le due ipotesi vengono chiamate ipotesi nulla (indicata con H_0), che viene valutata con il test, e ipotesi alternativa (indicata con H_1), di interesse per lo sperimentatore:

- *Ipotesi nulla H_0*
Solitamente, H_0 ipotizza che il(i) campione(i) provenga(n) da una data popolazione, cioè che non vi siano differenze, correlazioni, effetti nel gruppo (o nei gruppi) a confronto.
- *Ipotesi alternativa H_1*
 H_1 può essere uni- o bi-direzionale: H_1 unidirezionale implica che lo sperimentatore sia interessato a dimostrare l'esistenza di un effetto in una sola specifica direzione (es. il nuovo farmaco un'efficacia maggiore rispetto al farmaco di controllo); H_1 bidirezionale implica che lo sperimentatore sia interessato a dimostrare l'esistenza di un effetto in una qualunque direzione (es. il nuovo farmaco ha un'efficacia diversa rispetto al farmaco di controllo).

Risultato del test: probabilità di Errore di I e II tipo e Potenza del test

Qualunque sia la realtà (H_0 vera o H_0 falsa) il test potrà portare o a rifiutare o a non rifiutare H_0 . Relativamente alla realtà, il test potrà quindi portare a una decisione corretta o a una decisione sbagliata. In particolare, si potranno commettere due tipi di errore:

- Errore di I tipo = in base al risultato del test si rifiuta H_0 , quando in realtà H_0 è vera
- Errore di II tipo = in base al risultato del test non si rifiuta H_0 , quando in realtà H_0 è falsa.

Risultato del test	Realtà	
	H_0 vera	H_0 falsa
Non rifiuto H_0	$1-\alpha$	β
Rifiuto H_0	α	$1-\beta$

Il test permette di quantificare le probabilità di errore di I e II tipo e, conseguentemente, la potenza del test:

- α Prob(rifiutare $H_0|H_0$ vera) = probabilità di errore di I tipo;
- β Prob(non rifiutare $H_0|H_0$ falsa) = Prob(rifiutare $H_1|H_1$ vera) = probabilità di errore di secondo tipo;
- $1-\beta$ Prob(rifiutare $H_0|H_0$ falsa) = Prob(rifiutare $H_0|H_1$ vera) = potenza del test.

La probabilità di errore di I tipo è tenuta sotto controllo direttamente, stabilendo il valore di soglia per la significatività statistica (p ; usualmente, si pone $p \leq 0,05$).

La probabilità di errore di II tipo (e, conseguentemente, la potenza del test) viene controllata indirettamente, intervenendo sulla variabilità della misura ($SD \sigma$), sulla dimensione dell'effetto che si vuole essere in grado di individuare (δ), sulla dimensione campionaria (dimensionamento del campione).

RIQUADRO 3**Dimensionamento del campione**

Per dimensionamento del campione si intende il calcolo della minima dimensione campionaria necessaria a valutare le ipotesi in studio (H_0 e H_1) con un livello di significatività α e con una potenza ($1-\beta$) prestabiliti, e con riferimento al test per la valutazione dell'ipotesi in studio appropriato al disegno sperimentale (uno, due o più gruppi a confronto; unità statistiche indipendenti o appaiate; rispetto o violazione degli assunti di normalità e omogeneità della varianza per la variabile risposta prescelta).

Elementi per il dimensionamento del campione

Per poter procedere occorre stabilire:

Elemento	Significato	Valore da inserire nel calcolo
α	Livello di significatività al quale si vuole condurre il test (valore massimo accettabile)	<u>0,05</u> , 0,01
H_1	Tipologia di H_1 (bidirezionale / unidirezionale), che si riflette sul tipo di test (2 code / 1 coda)	<u>Test a due code</u> Test a una coda
$1-\beta$	Potenza del test (valore minimo accettabile)	<u>0,80</u> , 0,90, 0,95
σ	SD della variabile da esaminare nel o nei gruppi in studio	Si ricava da studi precedenti (propri o presi dalla letteratura), o realizzando un piccolo studio pilota
δ	Dimensione dell'effetto che si vuole essere in grado di evidenziare, perché rilevante ai fini dello studio (da un punto di vista clinico, biologico, ecc.)	A scelta, ragionata e motivata, dello sperimentatore

Sono sottolineati i valori standard da utilizzare per il dimensionamento. Gli altri valori riportati sono comunque accettabili ma, poiché comportano o un aumento anche consistente del numero di soggetti sperimentali, o un vincolo sull'interpretazione dei risultati del test, la loro scelta deve essere adeguatamente motivata.

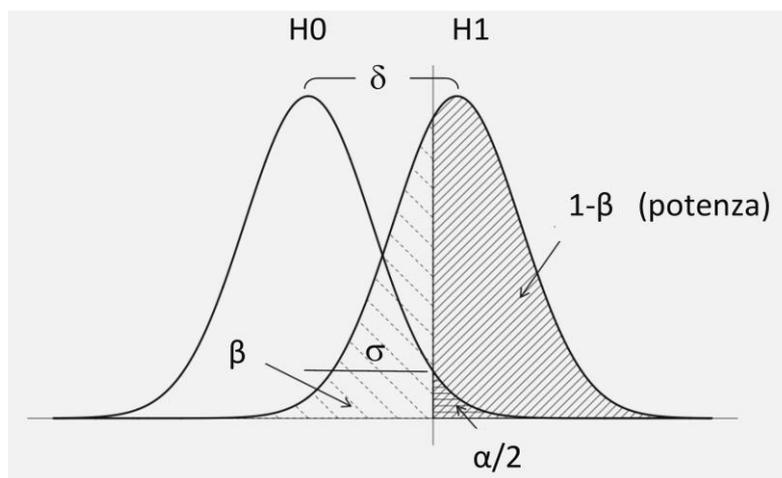


Figura 1. Elementi per il dimensionamento del campione α , β e $(1-\beta)$, σ , δ . Sull'asse delle x è riportato il valore della statistica del test, sull'asse delle y il livello di probabilità

Il terzo elemento che è necessario conoscere, sigma σ , corrisponde alla SD della variabile considerata; poiché si sta operando un'analisi *a priori* è evidente che i valori della SD della variabile non sono ancora noti allo sperimentatore, che deve quindi farne una stima sulla base di studi precedenti che hanno coinvolto quella variabile. Nel caso in cui si può ipotizzare che il trattamento e/o le condizioni sperimentali aumentino la variabilità si può aumentare il valore presunto del sigma per rendere la stima più accurata.

Il quarto elemento è quello forse più "ostico" e che mette maggiormente in difficoltà il ricercatore: il valore δ infatti dovrebbe dipendere completamente da quale sia l'effetto minimo che verrebbe considerato rilevante nell'esperimento che deve ancora essere condotto, e che può divergere (anche molto) da quanto è stato fatto in precedenza da altri o dallo stesso ricercatore. Nel caso di studi di valutazione degli effetti farmacologici di qualche nuova molecola, la presenza di altri farmaci già disponibili sul mercato con effetto noto può fornire valide informazioni sulle dimensioni dell'effetto che possa essere considerato rilevante (es. abbassamento pressione sistolica del 20% del valore pre-trattamento, a cui corrisponde, partendo da un valore di pressione pari a 180 mg/Hg, una riduzione $\delta=36$ mg/Hg, che porterebbe la pressione a 144 mg/Hg, un valore sufficiente a ridurre consistentemente l'incidenza di eventi cardiovascolari pressione-correlati). Nel caso invece di un farmaco destinato a una malattia assai invalidante per la quale non siano disponibili altre terapie può essere considerato rilevante anche un effetto di minori dimensioni.

Più difficile può risultare valutare la dimensione dell'effetto in ambiti meno vicini ad aspetti biomedici/farmacologici. Nel caso in cui non si abbia alcuna idea della dimensione minima da considerare, si può scegliere δ in funzione di σ . Per esempio, per la differenza fra medie Cohen (6) propone dei valori di riferimento per l'indice $d = \delta/\sigma$: effetto piccolo: d da 0,2 a 0,4 (da cui δ da $0,2 \cdot \sigma$ a $0,4 \cdot \sigma$); effetto medio: d da 0,5 a 0,7 (δ da $0,5 \cdot \sigma$ a $0,7 \cdot \sigma$); effetto grande: d da 0,8 a 1,0 (δ da $0,8 \cdot \sigma$ a $1,0 \cdot \sigma$). Ovviamente, minore è la dimensione dell'effetto che si vuole essere in grado di individuare, maggiore sarà la dimensione campionaria necessaria.

La dimensione dell'effetto (*Standardised Effect Size*, SES) è un parametro del proprio studio che può essere utile calcolare non solo ai fini del dimensionamento. Infatti, è l'indice che viene utilizzato negli studi di meta-analisi, permettendo di confrontare studi caratterizzati da diversi contesti e disegni sperimentali, e da diverse variabilità. Recentemente, SES viene anche impiegato per interpretare l'eventuale discrepanza tra ordine di grandezza degli effetti e significatività/non significatività statistica (valore p). Studi sovradimensionati possono portare a risultati significativi anche quando la dimensione dell'effetto sia minima, tale da risultare irrilevante da un punto di vista biologico/clinico; al contrario, nel caso di studi inevitabilmente sottodimensionati come quelli che riguardano malattie rare e farmaci orfani, effetti anche consistenti da un punto di vista biologico/clinico potrebbero non raggiungere la significatività statistica. SES è in tutti questi casi molto più informativo del solo valore p (7).

Un esempio di dimensionamento del campione

A titolo di esempio, consideriamo un esperimento volto a verificare l'effetto della delezione di un gene sull'attività locomotoria di roditori. Allo scopo, piccoli di topo di due genotipi diversi, *wild-type* (WT = gruppo 1) ed emizigoti per il gene di interesse (HZ = gruppo 2), vengono sottoposti a un test di *open-field* della durata di 20 minuti, durante i quali viene rilevata la distanza percorsa (cm) utilizzando il sistema computerizzato di *videotracking* del percorso tracciato dall'animale (software Ethovision, Noldus, NL).

Dai risultati di esperimenti precedenti si può ricavare la distanza media attesa percorsa dai topi WT e la relativa SD; supponiamo inoltre di aver verificato, sempre sulla base dei dati di esperimenti precedenti, che la variabile di interesse rispetti gli assunti di normalità e omogeneità delle varianze dei test parametrici.

Supponiamo che il valore della media della variabile risposta esaminata nel gruppo di controllo WT sia:

$$\text{Media gruppo 1} = 1907 \text{ cm.}$$

Supponiamo inoltre che la SD della variabile risposta nel gruppo di controllo WT sia:

$$\text{SD gruppo 1} = 381 \text{ cm.}$$

Supponiamo di poter ipotizzare che:

$$\text{SD gruppo 2} \approx \text{SD gruppo 1} = 381 \text{ cm.}$$

Supponiamo infine di volere essere in grado di evidenziare come significativo un incremento della media della variabile risposta nel gruppo sperimentale HZ pari al 20%, tale per cui sia:

$$\text{Media gruppo 2} \geq 2289 \text{ cm, cioè } \Delta = 2289 - 1907 = 382 \text{ cm.}$$

Tale valore, rapportato alla SD, dà δ di Cohen = $382 \text{ cm} / 381 \text{ cm} = 1.003$, che secondo Cohen (1988) corrisponde a un effetto di dimensione grande.

Sulla base di questi dati, si può quindi procedere con il dimensionamento del campione. In particolare, si dovranno specificare gli elementi come specificato in Tabella 1.

Tabella 1. Esempio di elementi per il dimensionamento del campione sperimentale e rispettivi valori da inserire nel calcolo

Elementi	Valori da inserire nel calcolo
α (H1)	0,05 (test a due code)
1- β	0,80
Tipo di test	parametrico, per il confronto fra due gruppi
Rapporto tra la numerosità (N) dei due gruppi (N1/N2)	1
Test statistico	T test, scelto in base all'assenza o alla presenza di dipendenza tra le unità statistiche tra ed entro gruppi*

I test statistici appropriati per l'analisi dei disegni sperimentali più frequentemente utilizzati, e ai quali ci si deve quindi riferire per il dimensionamento del campione, sono riportati in Tabella 2.

Nel caso in cui si decida di adottare un disegno per gruppi dipendenti (come indicato precedentemente, ad esempio fratelli di una stessa nidiata nel caso di roditori) (8-11), occorrerà anche specificare la correlazione attesa tra le due serie di osservazioni, stimata mediante il coefficiente di correlazione lineare di Pearson. Se possibile, converrà utilizzare stime ottenute da esperimenti precedenti, ma qualora non si abbiano dati utili si potrà porre $r = 0,5$ (correlazione positiva di moderata entità).

Tabella 2. Selezione dei più frequenti test statistici per il confronto tra due o più livelli di un fattore in un disegno unifattoriale

Tipo di variabile	N. livelli	Legame tra le unità statistiche	Assunti	Test	Specifiche in G*Power Test family Statistical test
Nominale	2	Indipendenza ENTRO gruppo Indipendenza TRA gruppi		Test della probabilità esatta di Fisher	Exact Proportions: Inequality, two independent groups (Fisher's exact test)
	≥2	Indipendenza ENTRO gruppo Indipendenza TRA gruppi		Test del Chi quadrato	χ ² tests Goodness-of-fit tests: Contingency tables
Ordinale o quantitativa	2	Indipendenza ENTRO gruppo Indipendenza TRA gruppi	Continuità della variabile (anche se misurata nel discreto)	Test U di Mann-Whitney	t tests Means: Wilcoxon-Mann-Whitney test (two groups)
		Indipendenza ENTRO gruppo Dipendenza TRA gruppi	Continuità della variabile (anche se misurata nel discreto)	Test di Wilcoxon	t tests Means: Wilcoxon signed-rank test (matched pairs)
Quantitativa	2	Indipendenza ENTRO gruppo Indipendenza TRA gruppi	Distribuzione della variabile Normale σ omogenei tra gruppi	Test t di Student per gruppi indipendenti	t tests Means: Difference between two independent means (two groups)
		Indipendenza ENTRO gruppo Dipendenza TRA gruppi	Distribuzione della variabile Normale	Test t di Student per gruppi appaiati	t tests Means: Difference between two dependent means (matched pairs)
Quantitativa	>2	Indipendenza ENTRO gruppo Indipendenza TRA gruppi	Distribuzione della variabile Normale σ omogenei tra gruppi	ANOVA per gruppi indipendenti	F tests ANOVA: Fixed effects, omnibus, one-way
		Indipendenza ENTRO gruppo Dipendenza TRA gruppi	Distribuzione della variabile Normale	ANOVA per misure ripetute	F tests ANOVA: Repeated measures, within factors

ANOVA: Analysis Of VAriance

A questo punto abbiamo tutti gli elementi per effettuare il dimensionamento e possiamo utilizzare uno specifico software; ne esistono molti disponibili in rete sia gratuiti che a pagamento. Ne consigliamo uno gratuito e costantemente aggiornato, messo a punto da un gruppo di ricercatori dell'università di Düsseldorf, per il quale sono anche disponibili delle pubblicazioni esplicative (12, 13) e un sito con materiale informativo (<http://www.gpower.hhu.de/en.html>). Per segnalare l'importanza del disegno sperimentale riportiamo lo stesso esempio, nella situazione 1 considerando i due gruppi indipendenti, nella situazione 2 considerando i due gruppi dipendenti o appaiati (*paired*).

Situazione 1: gruppi indipendenti

Se i piccoli di topo, sia WT sia HZ, provengono tutti da nidiate diverse, le unità statistiche saranno da considerarsi indipendenti tra ed entro gruppi. Poiché dobbiamo confrontare fra loro due soli gruppi relativamente a una variabile quantitativa che per ipotesi rispetta gli assunti alla base dei test parametrici, per il dimensionamento faremo riferimento al test t di Student per gruppi indipendenti, che nel programma *G*Power* viene individuato selezionando le seguenti opzioni (Figura 2).

Sulla base dei dati sopra riportati la dimensione campionaria ottimale sarà di 17 unità per gruppo sperimentale, per un totale di 34 unità sperimentali. Questo valore è gestibile da un punto di vista sperimentale, ma potrebbe essere inferiore se la variabilità delle misure entro ciascun gruppo fosse minore, a parità di altre condizioni. La variabilità entro gruppo si può ridurre o cercando di essere più rigorosi nelle procedure sperimentali, o agendo sul disegno sperimentale, passando ad esempio da un disegno per gruppi indipendenti a un disegno per gruppi appaiati.

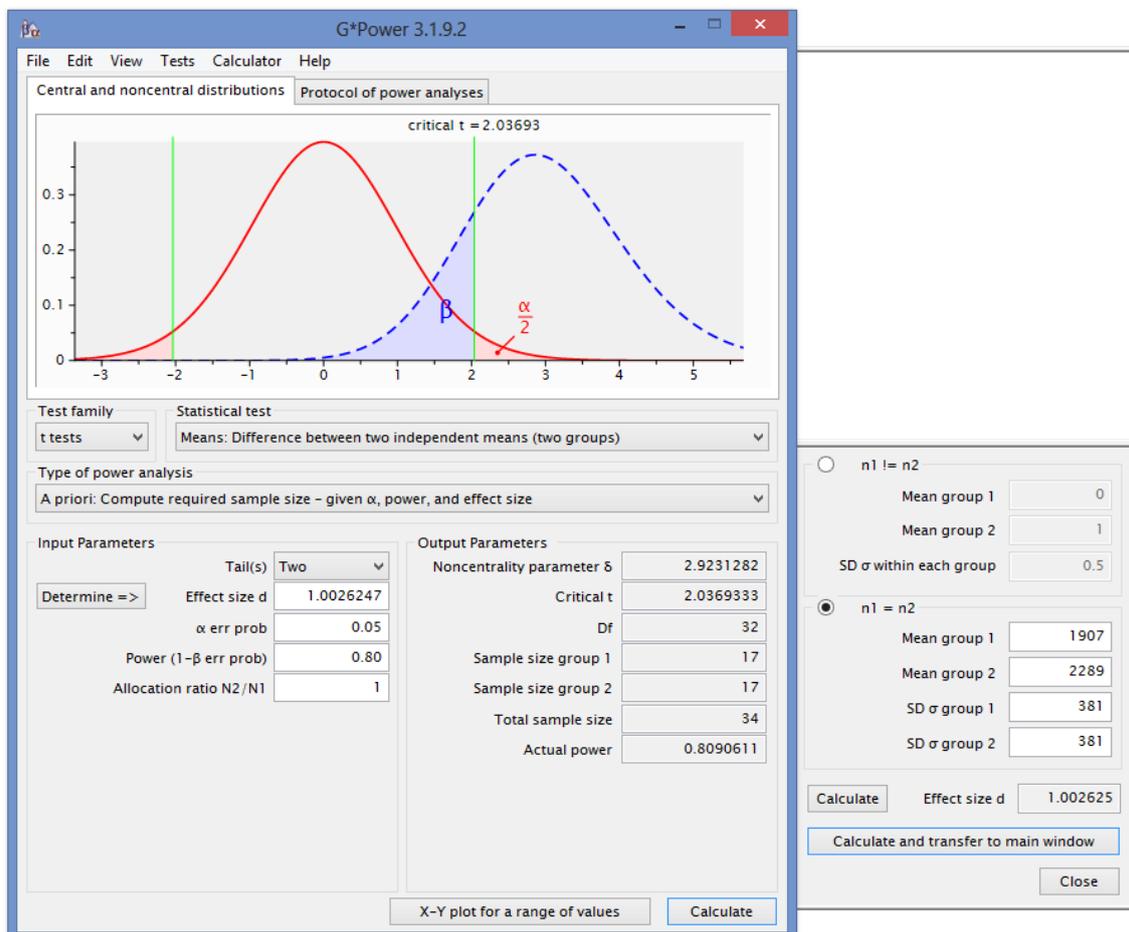


Figura 2. Schermata del programma *G*power* relativa all'esempio per campioni indipendenti

Situazione 2: gruppi dipendenti

Se i piccoli di topo provengono a coppie dalle stesse nidiatae (un WT e un HZ per nidiatae), le unità statistiche sono da considerarsi indipendenti entro gruppo ma dipendenti tra gruppi di genotipo. Poiché dobbiamo confrontare fra loro due soli gruppi relativamente a una variabile quantitativa, possiamo far riferimento per il dimensionamento al test t di Student per gruppi dipendenti, che nel programma *G*Power* viene individuato selezionando le seguenti opzioni (Figura 3). Supponiamo di non avere informazioni riguardo alla correlazione tra coppie di misure, e ipotizziamo quindi che tale correlazione sia $r = 0,50$ (correlazione positiva moderata).

A tali condizioni, la dimensione campionaria ottimale sarà di 10 coppie, per un totale di 20 unità sperimentali, con una forte riduzione rispetto al disegno sperimentale per gruppi indipendenti. La dimensione campionaria verrebbe ulteriormente ridotta se la correlazione tra coppie di misure fosse più alta: ad esempio, qualora fosse $r = 0,70$ (buona correlazione positiva), il numero di coppie richieste a parità di altre condizioni sarebbe pari a 7, per un totale di 14 unità statistiche.

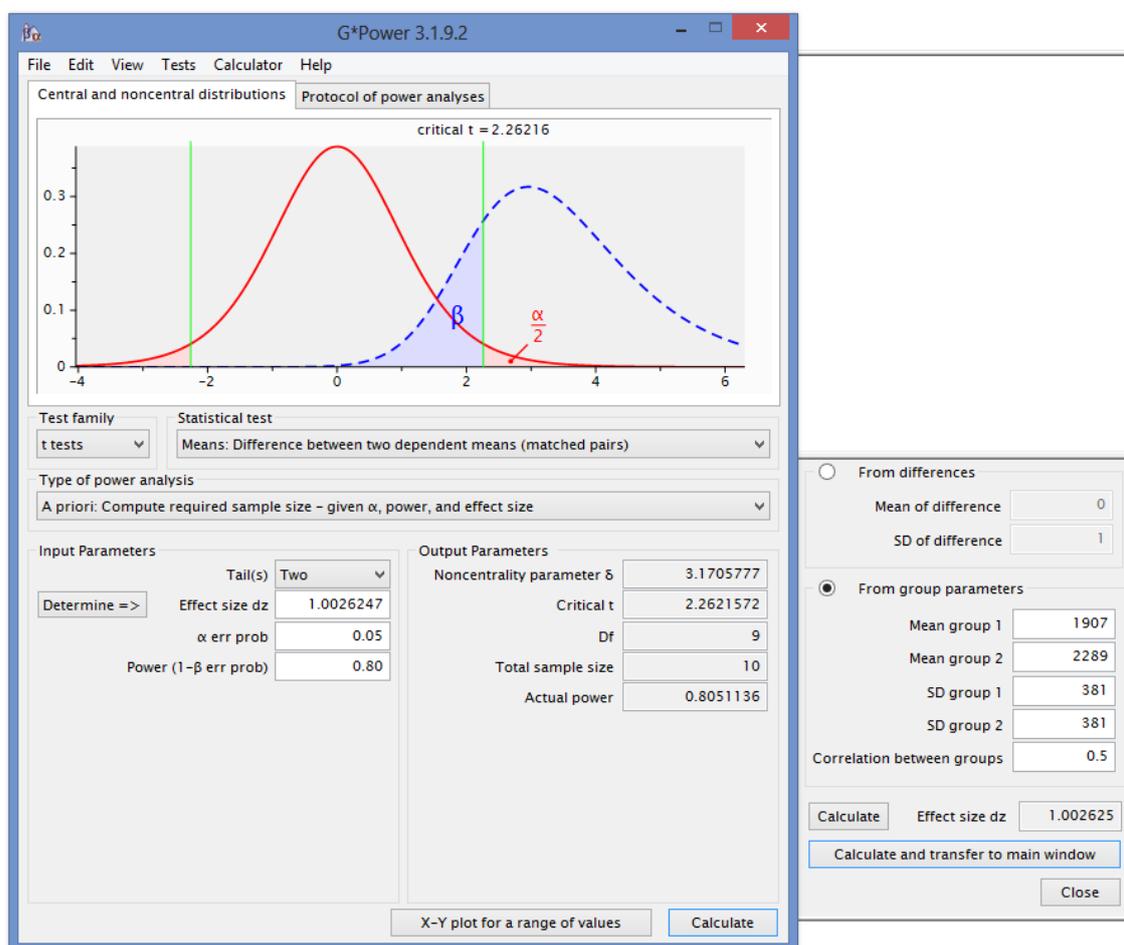


Figura 3. Schermata del programma *G*power* relativa all'esempio per campioni dipendenti

Prima di procedere con la sperimentazione, la plausibilità biologica dei valori ipotizzati per la differenza tra le medie che si vuole essere in grado di evidenziare, la variabilità entro gruppo

e il coefficiente di correlazione, andrebbe accuratamente verificata sulla base dei risultati di esperimenti precedenti.

Dimensionamento come valore aggiunto

A volte il numero di animali è limitato da esigenze di fattibilità dell'esperimento: in questi casi si raccomanda comunque di fare uno studio di sensibilità, per valutare la dimensione dell'effetto che si è in grado di evidenziare con la dimensione campionaria imposta e per valori di α e $1-\beta$ ritenuti accettabili. Qualora la dimensione dell'effetto risultante dal calcolo di sensibilità sia palesemente irrealistica (troppo grande per poter essere raggiunta in quel *setting* sperimentale), il ricercatore è fortemente consigliato di non effettuare lo studio, in quanto le conclusioni di esso sarebbero inaffidabili e gli animali utilizzati, anche se pochi, verrebbero sacrificati inutilmente.

La linea guida ARRIVE (*Animal Research: Reporting of in vivo Experiments*) per la sperimentazione su animali (1) costituisce un interessante tentativo della comunità scientifica del Regno Unito – in particolare dell'attivo e fattivo centro nazionale britannico per le 3R, (*National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research*, NC3Rs) – da sempre assai sensibile e attiva nella protezione del benessere degli animali da laboratorio, per diffondere tra i ricercatori la cultura del dimensionamento. Secondo questo documento – che sempre più gruppi editoriali, società scientifiche e agenzie di finanziamento della ricerca stanno adottando* – il dimensionamento è obbligatorio e va documentato in dettaglio in ogni studio sperimentale che preveda l'utilizzo di animali. Anche la scelta del disegno sperimentale adottato deve essere esplicitata insieme ai test statistici adottati per l'analisi dei dati. Si tratta di informazioni quasi scontate, ma è opportuno ricordare che indagini condotte sempre nel Regno Unito mostrano una certa reticenza/resistenza da parte dei ricercatori su questi temi nelle loro pubblicazioni (14).

Ci piace sottolineare che in lingua inglese si parla più di *power analysis* che di *sample size estimation*, quasi a dare la precedenza all'analisi della potenza statistica *post hoc* piuttosto che alla determinazione *a priori* della dimensione campionaria, suggerendo quindi una prospettiva un po' ribaltata rispetto a quella fin qui presentata. In questo ribaltamento, su studi effettuati ci si può chiedere quale sia la potenza statistica effettivamente raggiunta con i valori di n , α , σ e δ dati. La maggiore familiarità con questi elementi di statistica e la loro conoscenza fa inoltre acquisire una chiave di lettura importante per ri-esaminare non solo i propri risultati ma anche la letteratura di riferimento, tenendo presente che non sempre, soprattutto sulla statistica, ci si può affidare al vaglio editoriale, anche nel caso di riviste prestigiose.

E' importante saper cogliere il valore aggiunto che il dimensionamento dello studio e l'analisi di potenza portano nel disegnare l'esperimento, in modo che esso possa fornire risultati affidabili e replicabili, riducendo al minimo necessario il numero di animali da utilizzare.

Bibliografia

1. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology* 2010;8(6):e1000412.

* Per un elenco aggiornato vedi "ARRIVE endorsers" all'indirizzo: <https://www.nc3rs.org.uk/arrive-animal-research-reporting-vivo-experiments>.

2. Henderson VC, Kimmelman J, Fergusson D, Grimshaw JM, Hackam DG. Threats to validity in the design and conduct of preclinical efficacy studies: a systematic review of guidelines for *in vivo* animal experiments. *PLoS Medicine* 2013;10(7):e1001489.
3. Cressey D. UK funders demand strong statistics for animal studies. *Nature* 2015;520(7547):271-2.
4. Button KS, Ioannidis JP, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ES, *et al.* Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience* 2013;14(5):365-76.
5. Fitts DA. Ethics and animal numbers: informal analyses, uncertain sample sizes, inefficient replications, and type I errors. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2011;50(4):445-53.
6. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 1980/10/01 ed. Hillsdale, NJ: Lawrence Earlbaum Associates; 1988.
7. Festing MF. Extending the statistical analysis and graphical presentation of toxicity test results using standardized effect sizes. *Toxicologic Pathology* 2014;42(8):1238-49.
8. Chiarotti F. Statistical analysis of behavioral data. *Curr Protoc Toxicol* 2005;Chapter 13:Unit13.8.
9. Chiarotti F, Alleva E, Bignami G. Problems of test choice and data analysis in behavioral teratology: the case of prenatal benzodiazepines. *Neurotoxicology and Teratology* 1987;9(2):179-86.
10. Lazic SE, Essioux L. Improving basic and translational science by accounting for litter-to-litter variation in animal models. *BMC Neuroscience* 2013;14:37.
11. Zorrilla EP. Multiparous species present problems (and possibilities) to developmentalists. *Developmental Psychobiology*. 1997;30(2):141-50.
12. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods* 2007;39(2):175-91.
13. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behavior Research Methods* 2009;41(4):1149-60.
14. Kilkenny C, Parsons N, Kadyszewski E, Festing MF, Cuthill IC, Fry D, *et al.* Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals. *PloS one* 2009;4(11):e7824.

ARRICCHIMENTO AMBIENTALE, BENESSERE ANIMALE E VALIDITÀ DEI DATI SPERIMENTALI

Simone Macrì

Centro di Riferimento Scienze Comportamentali e Salute Mentale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

“Tutti gli animali dispongono di spazio sufficientemente complesso che consenta loro di esprimere un ampio repertorio di comportamenti normali. Essi dispongono di un certo grado di controllo e di scelta rispetto al proprio ambiente per ridurre comportamenti indotti da stress. Gli stabilimenti mettono in atto tecniche adeguate di arricchimento per ampliare la gamma di attività a disposizione degli animali e aumentare la loro capacità di risposta tra cui l’esercizio fisico, il foraggiamento e le attività di manipolazione e cognitive adeguate alle specie interessate. L’arricchimento ambientale offerto negli alloggiamenti è adattato alle specie e alle esigenze individuali degli animali. Le strategie di arricchimento negli stabilimenti sono riviste e aggiornate periodicamente”.

(Allegato III della Direttiva 2010/63/UE)

Questa è la sezione della Direttiva 2010/63/UE (da qui in poi “Direttiva”) riguardante la necessità di inserire qualche forma di arricchimento ambientale all’interno delle gabbie adibite alla stabulazione di animali sperimentali. In altre parole, a partire dal recepimento della Direttiva (variabile da Stato Membro a Stato Membro, e avvenuta in Italia il 4/3/2014) tutte le strutture di stabulazione devono alloggiare gli animali in gabbie provviste di arricchimento ambientale. Si prevede che questa richiesta possa comportare un notevole beneficio a livello del benessere individuale (1) poiché, rispetto alla situazione preesistente, garantisce un miglioramento nelle condizioni di vita degli animali utilizzati nelle procedure scientifiche (2).

Nonostante i potenziali benefici a livello del benessere individuale, l’esigenza di adeguare le condizioni di stabulazione a nuovi requisiti apre una serie di importanti quesiti di carattere teorico e metodologico (3).

Nello specifico, indipendentemente dai vantaggi legati al miglioramento del benessere individuale, l’arricchimento ambientale comporterà per la maggior parte degli stabilimenti (quelli in cui tale procedura non era consuetudine) una variazione nelle condizioni di allevamento/stabulazione. Da un punto di vista sia teorico sia metodologico, un’alterazione delle condizioni sperimentali è ritenuta un rischio poiché potrebbe:

1. mettere a rischio la riproducibilità di dati consolidati in decenni di ricerca;
2. aumentare la variabilità dei dati sperimentali (3);
3. in alcuni casi, peggiorare le condizioni di vita di alcuni soggetti sperimentali (*vedi* 4 per una rassegna bibliografica);
4. rappresentare una variabile confondente poiché identificare un’unica forma di arricchimento ambientale – adatta a individui di ceppo, sesso ed età differenti – è impossibile e, probabilmente, non consigliabile.

Nel testo discuterò sistematicamente gli aspetti appena enucleati e suggerirò alcune possibili interpretazioni alternative o ipotesi di soluzione al problema.

L'arricchimento ambientale può inficiare la riproducibilità dei dati sperimentali?

In termini generali, l'arricchimento ambientale può essere definito come l'insieme di procedure atte a fornire un contesto in grado di:

1. stimolare comportamenti specie-specifici;
2. aumentare le possibilità di controllo del proprio ambiente da parte dell'animale;
3. favorire l'esercizio fisico;
4. incrementare e favorire le capacità cognitive individuali (5-7).

L'arricchimento ambientale può pertanto essere sia fisico (es. oggetti da manipolare, ruote per aumentare l'esercizio fisico e rifugi) sia sociale (più individui alloggiati nella stessa gabbia). Uno degli aspetti che maggiormente preoccupa chi fa ricerca è legato alla possibilità che l'arricchimento ambientale, così diverso dalle tradizionali condizioni di stabulazione, possa aumentare la variabilità dei dati sperimentali (3). Gli assunti sottostanti questo timore si basano sia sulla difficoltà di mantenere costanti le condizioni di stabulazione tra uno stabilimento e l'altro sia sulla variabilità di risposta che gli individui possono mostrare ai diversi ambienti. In riferimento al primo aspetto, le condizioni di stabulazione tradizionali erano caratterizzate da un livello pressoché nullo di variabilità: nella loro semplicità (dimensioni prestabilite e costanti, uno strato di segatura, acqua e cibo sempre a disposizione), le gabbie standard garantivano una omogeneizzazione delle condizioni ambientali tra diversi stabilimenti. Inoltre, poiché il fenotipo di un individuo è la risultante dell'interazione tra genetica e ambiente, si ritiene che un ambiente omogeneo possa promuovere la somiglianza tra un individuo e l'altro e ridurre la variabilità interindividuale, fattore cruciale per la riproducibilità dei dati sperimentali. Inoltre, le esigue possibilità di interazione con l'ambiente offerte dalle condizioni di stabulazione tradizionali faciliterebbero ulteriormente l'omogeneizzazione tra un individuo e l'altro. Alla luce di quanto appena riferito, l'arricchimento ambientale costituirebbe un rischio per la validità dei dati sperimentali poiché difficilmente standardizzabile (4) e in grado di permettere l'espressione di un più ampio repertorio comportamentale ai soggetti sperimentali (si veda la definizione di arricchimento ambientale). La combinazione di questi fattori potrebbe contribuire ad aumentare le differenze comportamentali e fisiologiche tra soggetti e, conseguentemente, la variabilità inter-individuale nei dati sperimentali. Per ragioni di ordine statistico, un aumento della variabilità inter-individuale ridurrebbe la riproducibilità dei dati sperimentali (8). Alla luce di queste considerazioni, l'arricchimento ambientale è considerato, da alcuni, rischioso per la validità dei dati scientifici.

Questa ipotesi di lavoro è stata scientificamente saggiata da alcuni autori svizzeri (9). Al fine di analizzare la possibilità che l'arricchimento ambientale aumentasse la variabilità dei dati sperimentali, gli autori hanno allevato diversi gruppi di topi in condizioni ambientali tradizionali o in gabbie arricchite. Successivamente, è stata condotta un'ampia batteria di test comportamentali ed è stata misurata la variabilità dei dati: cioè quanto il valore ottenuto da ciascun individuo in un determinato test comportamentale si discostasse dalla media del gruppo. Qualora l'arricchimento ambientale avesse influenzato negativamente la variabilità inter-individuale, gli autori avrebbero dovuto osservare un aumento di questo parametro in topi alloggiati in ambienti più complessi rispetto a quelli alloggiati in condizioni standard. Contrariamente a questa ipotesi, i dati hanno mostrato come l'arricchimento ambientale non modificasse la variabilità inter-individuale (9). Pertanto, i dati presenti in letteratura sembrano contraddire l'ipotesi che l'arricchimento ambientale possa aumentare la variabilità dei dati riducendone la riproducibilità.

Quale arricchimento?

Come accennato precedentemente, la necessità di fornire arricchimento ambientale comporterà per molti stabilimenti una variazione delle condizioni di stabulazione poiché, fino a poco tempo fa, la maggior parte di questi alloggiava topi e ratti in gabbie provviste esclusivamente di segatura, acqua e cibo. La Direttiva prevede che, oltre a garantire le necessità fondamentali, le nuove condizioni di stabulazione promuovano l'esercizio fisico, la manipolazione degli oggetti e lo sviluppo delle capacità cognitive individuali. Tuttavia, la Direttiva non fornisce indicazioni specifiche riguardanti i dettagli delle strategie di arricchimento; anzi, impone che dette strategie siano adattate alle esigenze del singolo individuo, variabile per specie, ceppo, sesso ed età. La combinazione di queste necessità - fornire arricchimento ambientale e adeguare l'arricchimento ai bisogni individuali - potrebbe comportare il fatto che diversi animali, anche appartenenti alla stessa specie, siano allevati e mantenuti in condizioni differenti. Esistono molti articoli, infatti, che dimostrano come diversi tipi di arricchimento ambientale inducano adattamenti variabili a seconda di caratteristiche individuali quali età e sesso. Per esempio, diversi autori hanno dimostrato come un arricchimento ambientale fisico fornito a topi maschi adulti, non familiari tra di loro, stimoli comportamenti aggressivi (10, 11). Analoghe osservazioni sono state condotte nelle galline (12). Si ritiene che l'esibizione di comportamenti aggressivi sia il risultato della naturale tendenza del topo maschio adulto a monopolizzare risorse appetibili quali ripari e fonti di cibo. Contrariamente ai maschi, analoghi comportamenti aggressivi non vengono osservati nelle femmine della stessa specie (13) poiché queste ultime sono naturalmente predisposte a cooperare e a condividere spazi e risorse con individui della stessa specie (14). Indipendentemente dal sesso, topi immaturi non mostrano comportamenti aggressivi se posti in condizioni di arricchimento ambientale durante le fasi più precoci dello sviluppo (13). Pertanto, a meno di identificare una forma di arricchimento ambientale minima – valida per tutti gli individui indipendentemente da sesso ed età (4) – topi maschi e femmine di diversa età dovrebbero essere mantenuti in condizioni ambientali differenti. Tale necessità comporta un indubbio quesito di ordine metodologico poiché in conflitto con uno degli assunti fondamentali delle scienze degli animali da laboratorio, ovvero la necessità di mantenere costanti tutte le variabili intervenienti a esclusione della variabile indipendente in esame. In altre parole, qualora si volessero ipoteticamente valutare i potenziali effetti nocivi di un nuovo farmaco su una variabile (fisiologica o comportamentale) si dovrebbe condurre un esperimento su individui diversi per età e sesso (es. maschi e femmine di età diverse). I testi di metodologia prevedono che gli animali del medesimo esperimento siano mantenuti e allevati in condizioni identiche al fine di dimostrare che gli eventuali effetti del farmaco vadano ascritti al farmaco stesso e non a variabili “nascoste” o “intervenienti”. Tale assunto sarebbe violato in una condizione in cui i maschi adulti vivessero in condizioni ambientali diverse da quelle delle femmine di pari età. Come comportarsi in una situazione analoga?

Una possibile soluzione a questo dubbio metodologico, suggerita da Wuerbel e Garner (4), prevede l'utilizzo di un'unica forma di arricchimento ambientale minimo, in grado di promuovere il benessere, le attività individuali, la manipolazione e il controllo dell'ambiente senza stimolare comportamenti agonistici. Al fine di sostanziare questa proposta, gli autori hanno analizzato sistematicamente diversi tipi di arricchimento ambientale alla luce di due parametri: la rilevanza biologica, cioè quanto una determinata forma di arricchimento ambientale costituisca uno stimolo biologicamente rilevante per l'animale di laboratorio; e i potenziali effetti positivi o negativi sul benessere individuale. Alla luce di questi semplici parametri, gli autori hanno proposto che la presenza, all'interno delle gabbie, di materiale con cui costruire il nido rappresenti una possibile strategia di arricchimento ambientale, utilizzabile

per topi e ratti maschi e femmine indipendentemente dall'età (4). Il materiale per costruire il nido, infatti, permette un controllo sul proprio ambiente, rappresenta uno stimolo biologicamente rilevante e non stimola comportamenti aggressivi in quanto, data la sua natura frammentata, non è monopolizzabile da un individuo in particolare. Quindi, nell'ipotesi di standardizzare l'arricchimento ambientale, si può suggerire di inserire all'interno delle gabbie del materiale, non monopolizzabile, con cui costruire il nido. Alcuni produttori di materiale per scienze degli animali da laboratorio hanno già sviluppato metodiche in grado di adempiere a questa richiesta.

Un'alternativa alla standardizzazione dell'arricchimento: l'eterogeneizzazione delle condizioni sperimentali

Sebbene la possibilità di fornire un arricchimento ambientale univoco, uguale per tutti gli animali di una determinata specie e in grado di garantire il soddisfacimento dei bisogni fondamentali individuali, rappresenti una soluzione ipotizzabile, ritengo che questa soluzione non sia né l'unica né la migliore. Infatti, la ritengo in contrasto sia con lo spirito della Direttiva sia con considerazioni metodologiche di ordine generale.

In riferimento al primo aspetto, come descritto in precedenza, la Direttiva è stata promulgata al fine di migliorare le condizioni individuali degli animali utilizzati per procedure scientifiche. I requisiti dell'arricchimento ambientale, estremamente ampi, offrono al ricercatore la possibilità di operare affinché gli animali utilizzati nella sperimentazione conducano un'esistenza migliore rispetto a quella vissuta dagli animali coinvolti nella sperimentazione in anni passati. Inoltre, nel testo della Direttiva, è espressamente dichiarato che "Le strategie di arricchimento negli stabilimenti sono riviste e aggiornate periodicamente". Il legislatore ha anche previsto una revisione della Direttiva stessa pochi anni dopo la sua implementazione. In altre parole, è possibile che alcuni assunti fondamentali della Direttiva varino nel corso degli anni a seguito di nuove conoscenze e tecniche (si veda p. es. lo sviluppo di metodi alternativi alla sperimentazione animale). Questi aspetti denotano una natura estremamente dinamica, che favorisce e auspica lo sviluppo di approcci innovativi volti al miglioramento del benessere animale. Ritengo che l'implementazione di una forma di arricchimento "minimo", per quanto parzialmente in accordo con i requisiti di legge, denoti un approccio volto alla staticità, in contrasto con la natura dinamica e "progressiva" della Direttiva stessa. Inoltre, la Direttiva prevede esplicitamente che l'arricchimento ambientale sia "adattato alle specie e alle esigenze individuali degli animali". Anche in questo caso, sebbene una forma di arricchimento "minimo" possa rispondere alle necessità di molti animali, è probabile che alcuni animali (p. es. le femmine di topo) possano trarre beneficio da arricchimenti ambientali che per altri animali (p. es. topi maschi) risulterebbero inutili o addirittura dannosi. Alla luce di questi aspetti, ritengo che la proposta di sviluppare e implementare un'unica forma di arricchimento ambientale non sia da preferire in quanto in contrasto con la Direttiva stessa.

Sarebbe invece opportuno adattare l'ambiente alle predisposizioni individuali. Ovviamente, questo atteggiamento potrebbe comportare la necessità di mantenere animali destinati a una medesima sperimentazione in condizioni ambientali differenti. Per esempio, nell'ipotesi di saggiare gli effetti di una sostanza sconosciuta, sarebbe auspicabile condurre la sperimentazione in individui maschi e femmine di età diverse, che per loro natura andrebbero alloggiati in condizioni differenti. È necessariamente un problema? È possibile ipotizzare un simile scenario mantenendo elevato il livello di validità della sperimentazione? Diversi autori hanno provato

analizzato sistematicamente questa possibilità e hanno osservato che la presenza di un certo grado di eterogeneità delle condizioni sperimentali, se tenuto statisticamente sotto controllo, non ha effetti deleteri sulla validità dei dati sperimentali (15-17). Nello specifico, questi autori hanno condotto diversi studi atti a valutare gli effetti dell'eterogeneizzazione delle condizioni sperimentali sulla riproducibilità dei dati sperimentali (classici test comportamentali) in topi di diversi ceppi. In questi studi, le popolazioni sperimentali (tre diversi ceppi di topo) potevano essere omogenee (gruppo di controllo) o eterogenee (gruppo sperimentale), cioè differenti per diverse caratteristiche, sia individuali (come sesso ed età) sia ambientali (ambienti impoveriti o arricchiti). Successivamente, dopo aver confrontato la variabilità dei dati ottenuti in condizioni omogenee o eterogenee, hanno concluso che la variazione sistematica delle condizioni sperimentali non solo non peggiora la validità dei dati, ma è addirittura in grado di migliorarne la riproducibilità (16). Ovviamente, l'eterogeneizzazione delle condizioni sperimentali non deve essere implementata in maniera casuale, ma deve essere distribuita equamente nei vari gruppi sperimentali. Per tornare all'esempio del test di un nuovo farmaco, il suggerimento è quello di condurre uno studio che preveda un disegno sperimentale a blocchi randomizzati. Nell'ipotesi di saggiare la soluzione di controllo e una dose del farmaco, andrebbero previste diverse popolazioni sperimentali: maschi e femmine di due età diverse (giovani e adulti). In questo caso si avrebbero quattro diverse popolazioni sperimentali: maschi giovani, maschi adulti, femmine giovani e femmine adulte. Ognuna di queste popolazioni potrebbe avere necessità ambientali diverse e andrebbe pertanto alloggiata in condizioni eterogenee. Questa necessità non comporterebbe alcuno svantaggio metodologico purché l'attribuzione dei soggetti ai diversi gruppi sia bilanciata, purché cioè ogni trattamento sia saggiato in un numero uguale di individui appartenenti alla medesima popolazione. In breve, questo studio ipotetico andrebbe condotto su otto gruppi sperimentali, di cui quattro inoculati con la soluzione di controllo e quattro (a essi appaiati) inoculati con il farmaco in esame. Come accennato in precedenza, questa strategia si è dimostrata valida nell'identificare differenze comportamentali (15-17), senza che ciò comportasse un aumento nella numerosità totale della dimensione campionaria (15).

Bibliografia

1. Ricceri L, Vitale A. The law through the eye of a needle. How and when to apply the new European Directive on animals used in research. *EMBO Rep* 2011;12:637-40.
2. Laviola G, Rea M, Morley-Fletcher S, Di Carlo S, Bacosi A, De Simone R, Bertini M, Pacifici R. Beneficial effects of enriched environment on adolescent rats from stressed pregnancies. *Eur J Neurosci* 2004;20:1655-64.
3. Pasalic I, Bosnjak B, Tkalcevic VI, Jaran DS, Javorscak Z, Markovic D, Hrvacic B. Cage enrichment with paper tissue, but not plastic tunnels, increases variability in mouse model of asthma. *Lab Anim* 2011;45:121-3.
4. Wuerbel H, Garner JP. Refinement of rodent research through environmental enrichment and systematic randomization. *NC3Rs Journal* 2007;9:1-9.
5. Rosenzweig MR, Bennett EL. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res* 1996;78:57-65.
6. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 2000;1:191-8.
7. Nithianantharajah J, Hannan AJ. The neurobiology of brain and cognitive reserve: mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Prog Neurobiol* 2009;89:369-82.

8. Macrì S, Pasquali P, Bonsignore LT, Pieretti S, Cirulli F, Chiarotti F, Laviola G. Moderate neonatal stress decreases within-group variation in behavioral, immune and HPA responses in adult mice. *PLoS One* 2007;2:e1015.
9. Wolfer DP, Litvin O, Morf S, Nitsch RM, Lipp HP, Wurbel H. Laboratory animal welfare: cage enrichment and mouse behaviour. *Nature* 2004;432:821-2.
10. McQuaid RJ, Audet MC, Anisman H. Environmental enrichment in male CD-1 mice promotes aggressive behaviors and elevated corticosterone and brain norepinephrine activity in response to a mild stressor. *Stress* 2012;15:354-60.
11. Mesa-Gresa P, Perez-Martinez A, Redolat R. Environmental enrichment improves novel object recognition and enhances agonistic behavior in male mice. *Aggress Behav* 2013;39:269-79.
12. Hartcher KM, Tran KT, Wilkinson SJ, Hemsworth PH, Thomson PC, Cronin GM. The effects of environmental enrichment and beak-trimming during the rearing period on subsequent feather damage due to feather-pecking in laying hens. *Poult Sci* 2015;94:852-9.
13. Hutchinson EK, Avery AC, Vandewoude S. Environmental enrichment during rearing alters corticosterone levels, thymocyte numbers, and aggression in female BALB/c mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2012;51:18-24.
14. Branchi I. The mouse communal nest: investigating the epigenetic influences of the early social environment on brain and behavior development. *Neurosci Biobehav Rev* 2009;33:551-9.
15. Richter SH, Garner JP, Wurbel H. Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments? *Nat Methods* 2009;6:257-61.
16. Richter SH, Garner JP, Auer C, Kunert J, Wurbel H. Systematic variation improves reproducibility of animal experiments. *Nat Methods* 2010;7:167-8.
17. Richter SH, Garner JP, Zipser B, Lewejohann L, Sachser N, Touma C, Schindler B, Chourbaji S, Brandwein C, Gass P, *et al.* Effect of population heterogenization on the reproducibility of mouse behavior: a multi-laboratory study. *PLoS One* 2011;6:e16461.

PROBLEMATICHE RELATIVE AL BENESSERE DEGLI ANIMALI GENETICAMENTE MODIFICATI UTILIZZATI A FINI SCIENTIFICI

Alessandra Berry, Igor Branchi

Centro di Riferimento Scienze Comportamentali e Salute Mentale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

L'aumentata consapevolezza sulle problematiche relative alla sperimentazione animale che ha caratterizzato sia la comunità scientifica che il grande pubblico ha spinto a definire nuovi standard nella regolamentazione sull'uso degli animali nella ricerca scientifica in Italia. Tali nuovi standard includono una vasta gamma di normative atte a migliorare gli standard di tutela del benessere animale, ribadendo il principio delle tre R (Russell & Burch, 1959): "Sostituire" (*Replace*), "Ridurre" (*Reduce*) e "Perfezionare" (*Refine*) (per ulteriori dettagli si veda anche la pagina "Animals used for scientific purposes" dal sito della Commissione Europea: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm). Le nuove normative trovano fondamento nelle recenti conoscenze scientifiche relative ai fattori che influenzano il benessere degli animali nonché alla capacità degli animali di provare ed esprimere dolore, sofferenza e angoscia, e hanno come obiettivo quello di migliorare le procedure atte a salvaguardare il loro benessere identificando i fattori chiave per la loro tutela in linea con i più recenti sviluppi scientifici.

Negli ultimi 25 anni sono stati fatti importanti progressi tecnologici e scientifici in campo biomedico che hanno permesso l'avanzamento delle conoscenze su molte malattie sia rare sia comuni come i tumori, il diabete e le malattie neurodegenerative. Tali progressi includono la produzione e lo studio degli animali geneticamente modificati. Questi sono organismi viventi che possiedono un corredo genetico modificato tramite tecniche di ingegneria genetica, che permettono di aggiungere, eliminare o modificare specifici elementi genici. Di conseguenza, gli animali geneticamente modificati hanno permesso di comprendere il ruolo di specifici geni o gruppi di geni in funzioni fisiologiche chiave per l'individuo e nell'insorgenza di alterazioni patologiche. Il benessere di questi organismi, oramai molto diffusi nella ricerca scientifica, deve essere tutelato al pari di tutti gli altri individui utilizzati a scopi scientifici. Tuttavia, il loro uso implica una serie di problematiche particolari che non sono rilevanti per gli animali non geneticamente modificati.

Nell'aprile 1997 si è svolto il ventottesimo workshop dello *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM), che ha avuto come scopi principali: i) formulare una serie di linee guida per assistere le autorità regolatorie nella stesura delle leggi nazionali e internazionali relative all'uso degli animali transgenici – colmando così parzialmente il vuoto legislativo; ii) valutare l'utilizzo di tali animali nell'ottica del principio delle "tre R" (Mepham *et al.*, 1998). Infatti, se da un lato animali geneticamente modificati possono contribuire a "Ridurre" l'utilizzo di soggetti sperimentali attraverso interventi mirati su specifici geni (molto più efficaci rispetto alla tradizionale selezione genetica ottenuta tramite accoppiamenti tra individui selezionati), d'altro canto le tecniche legate alle procedure di generazione degli animali stessi (es. una probabilità limitata di ottenimento ricombinazione omologa)

contribuiscono ad aumentare il numero dei soggetti necessari per il singolo “transgene” diminuendo così il potenziale di “riduzione” del *targeting* genetico.

Vantaggi associati alla modificazione di specifici geni nella specie topo

I roditori, e il topo in particolare, sono la specie attualmente più utilizzata nella sperimentazione animale per una serie di ragioni che includono la prolificità (fino a 20 nuovi nati in un solo parto), i ridotti tempi di gestazione (19 giorni), le ridotte dimensioni e il basso costo di mantenimento. Inoltre, il topo è stata, negli anni '80, la prima specie animale manipolata per diventare “transgenica” (Palmiter *et al.*, 1982; Palmiter *et al.*, 1983). Diversi autorevoli scienziati hanno chiaramente illustrato gli importanti vantaggi portati alla ricerca scientifica dall'applicazione dell'ingegneria genetica in questa specie (Crawley, 2000). Questi includono: i) la specificità, si possono scegliere i caratteri su cui lavorare, riducendo teoricamente al minimo le interferenze; ii) la rapidità, una data combinazione di caratteri può essere ottenuta in una generazione quando il “metodo della selezione” ha bisogno di un numero più elevato di generazioni per ottenere un risultato analogo; iii) la flessibilità, poiché il DNA (acido deossiribonucleico) è strutturato secondo le regole di un codice universale praticamente comune a tutte le specie viventi ed è quindi possibile trasferire materiale e informazioni genetiche tra specie filogeneticamente anche molto distanti e iv) l'economia, possono essere scelte specie animali che, come nel caso del topo, permettono di lavorare su un grande numero di individui in breve tempo e con costi ridotti. Inoltre, è importante sottolineare come negli ultimi anni una serie di nuove tecnologie che hanno permesso di migliorare notevolmente l'efficacia della modifica di specifici geni. Tra queste, una delle più note e promettenti è basata su CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, tradotto in Brevi Ripetizioni Palindrome Raggruppate e Separate a Intervalli Regolari) in combinazione con l'enzima endonucleasi Cas9, ovvero CRISPR/Cas9. Tale tecnologia sfrutta un meccanismo immunitario che permette di effettuare, in modo preciso e relativamente semplice ed economico, degli interventi di *editing* genetico (Didovyk *et al.*, 2016).

Problematiche legate alla modificazione di specifici geni nella specie topo

Le tecniche di ingegneria genetica per la produzione di animali geneticamente modificati portano con sé un numero di problematiche che, sebbene non ne limitino la portata scientifica, devono essere prese in seria considerazione al fine di evitare la produzione di dati di scarsa qualità. Ad esempio, nel caso di modificazione genetica costitutive, i cambiamenti che possono insorgere in seguito alla modificazione di un gene, a partire da fasi precoci dell'ontogenesi, possono interferire con il normale programma di sviluppo dando luogo a cambiamenti fisiologici e/o comportamentali compensatori, portando così a fenotipi completamente inattesi nell'animale maturo (Newmark, 1989; Lipp & Wolfer, 1998). Vi sono inoltre altri fattori che possono confondere l'interpretazione del fenotipo, come la presenza di geni adiacenti a quello su cui si vuole intervenire selettivamente, i cosiddetti geni *flanking*, che vengono inseriti nel processo di *backcross*, ovvero di trasferimento di una mutazione genetica da un ceppo a un altro. Particolare attenzione poi andrebbe rivolta all'ambiente genetico in cui si fa esprimere una

data modificazione genetica, ovvero il *background* genetico che caratterizza ciascun ceppo murino. Ad esempio, il ceppo 129, largamente impiegato per la produzione di knock-out, porta con sé una serie di geni che determinano ridotte capacità di apprendimento, ipomobilità e ipoplasia del corpo calloso rendendoli poco adatti a studi comportamentali (Balogh *et al.*, 1999); i topi C57BL6 sono invece suscettibili all'insorgenza di mutazioni che possono provocare sordità (Zheng & Johnson, 2001) mentre gli FVB possono subire una degenerazione della retina che interferisce con la performance in test che implicano l'uso delle capacità visive.

Una serie di fattori può interferire indirettamente con la corretta interpretazione degli effetti di una specifica mutazione genetica. Ad esempio, nelle prime fasi della vita postnatale dei roditori altriciali, il comportamento materno influenza fortemente lo sviluppo neurobiologico della prole. In particolare, è stato osservato come la modulazione della qualità e quantità del comportamento materno, ottenuta mediante modifiche nella composizione del numero di madri e di giovani di diverse età che costituiscono il nido (es. *communal nesting*, nido condiviso), influenzi in modo significativo il comportamento aggressivo adulto della prole (Branchi *et al.*, 2013). Di conseguenza, mutazioni, anche in un singolo gene, possono comportare profonde alterazioni del comportamento materno, influenzando indirettamente lo sviluppo della generazione successiva. Inoltre, la pleiotropia, il fenomeno per il quale un singolo gene influenza più caratteri dello stesso organismo, rende estremamente difficile predire gli effetti biologici globali della mutazione anche di un singolo gene (per una rivisitazione critica sull'argomento si veda Gingrich & Hen, 2000, e Gerlai, 1996). Quindi, la generazione di topi mutanti può a volte provocare effetti aspecifici non gravi ma che, se non sufficientemente caratterizzati, possono interferire con la valutazione di risposte fisiologiche e/o comportamentali a specifici stimoli portando a possibili interpretazioni confondenti del fenotipo. Ad esempio, in test cognitivi basati sulla capacità visiva del soggetto sperimentale per l'apprendimento di un compito spaziale (es. labirinto acquatico di Morris), se il rischio di ipovisione non è stato accuratamente valutato, si può attribuire un significato erroneo alle prestazioni del soggetto geneticamente modificato, incorrendo in falsi positivi o negativi. Gli effetti aspecifici possono anche essere di grave entità come ad esempio un'alta mortalità prenatale e neonatale e un peso fetale anormalmente aumentato o diminuito creando una condizione di stress nella madre che, a sua volta, si può ripercuotere sulla fisiologia e il comportamento della prole a breve e a lungo termine. Inoltre, è necessario controllare gli effetti inaspettati della manipolazione genetica sulla sofferenza psicofisica o sulla soglia del dolore. Per esempio, iper- o ipoalgesia (accentuata o, viceversa, ridotta sensibilità al dolore), difficoltà locomotorie o sensoriali, scarsa capacità di interazione sociale, ecc., possono rendere l'animale particolarmente suscettibile a situazioni generanti stress o dolore. Sulla base di queste considerazioni, appare quindi evidente, nel contesto degli esperimenti che prevedono l'impiego di individui geneticamente modificati, l'importanza del problema del benessere animale, che deve essere considerato in modo specifico e peculiare, valutando le alterazioni genotipiche e, di conseguenza, fenotipiche dei soggetti in esame (Hazecamp *et al.*, 1998; Duncan & Fraser, 1997; Vitale & Alleva, 1999; De Cock & Buning, 1999).

Mantenimento e cura di colonie transgeniche

Chiunque lavori con animali geneticamente modificati dovrebbe essere consapevole di come valutare il benessere degli individui sperimentali al fine di evitare l'insorgenza di uno stato di malessere (Petrocelli *et al.*, 2003). È possibile, attraverso la valutazione di alcuni parametri, ottenere informazioni dettagliate sul loro benessere. Tali parametri includono, ad esempio, la manifestazione di comportamenti specie-specifici legati alla soddisfazione delle necessità

fisiologiche e che quindi permettono all'individuo il raggiungimento di uno stato di omeostasi. Al contrario esiste una vasta gamma di misure relative alla mancanza di benessere: stereotipie (comportamenti ripetuti e senza apparente funzione), riduzione dell'aspettativa di vita, della capacità di crescita e riproduzione; insorgenza di patologie; immunosoppressione; sforzi fisiologici e comportamentali per interagire con l'ambiente circostante, ecc., solo per citarne alcuni (Broom & Johnson, 1993).

Dal punto di vista del miglioramento del benessere animale, i topi geneticamente modificati devono avere alti livelli di mantenimento. Per questo motivo, tutte le procedure operative standard relative alla gestione della stabulazione dovrebbero essere effettuate da uno staff di persone in grado di valutare i diversi aspetti legati alle specifiche necessità relative al benessere di questi individui. In particolare, le conoscenze etologiche possono e debbono essere utilizzate per migliorare le condizioni di vita dei roditori usati nella sperimentazione animale, in particolare nel caso dei topi geneticamente modificati (Vitale & Alleva, 1999; Alleva & Carere, 2000). Van der Meer *et al.* ad esempio suggeriscono un monitoraggio quotidiano dell'animale geneticamente modificato a partire dalla nascita, da parte di stabularisti esperti che abbiano seguito corsi di formazione specifici. Tale monitoraggio potrebbe essere effettuato attraverso l'utilizzo di moduli standardizzati che permettano la raccolta di informazioni riguardanti, ad esempio, la postura o la reattività dell'animale sperimentale. Inoltre, è importante che il monitoraggio non sia limitato alla prima generazione ma che includa almeno due generazioni successive al fine di prestare particolare attenzione al comportamento riproduttivo, alla gestazione, alla capacità di allevare i giovani e al numero di nati (Van der Meer, 2001). Alcuni degli elementi del repertorio comportamentale materno della specie topo considerati buoni indicatori del livello di cure parentali sono: la costruzione del nido durante la gravidanza, il *licking* (leccare) della zona anogenitale dei neonati che permette ai questi ultimi di espletare una serie di funzioni vitali, e il *retrieving* ovvero il comportamento di trasporto all'interno del nido dei neonati che si sono allontanati.

Per facilitare e rendere più efficiente il monitoraggio degli animali, Wells e collaboratori hanno proposto l'utilizzo di un passaporto identificativo di ciascuna linea murina geneticamente modificata prodotta, in cui sono descritte le sue caratteristiche fisiologiche e comportamentali e le potenziali conseguenze negative per il benessere (Wells *et al.*, 2006). Il passaporto è di particolare importanza nel caso in cui si sia interessati all'allevamento/riproduzione di tali linee in modo da poter predisporre le condizioni di stabulazione e di sperimentazione più idonee (Ormandy *et al.*, 2011).

Altri elementi utili nella valutazione del benessere dell'animale geneticamente modificato dovrebbero tenere in considerazione l'osservazione del comportamento sociale. La procedura di pulizia della gabbia, ovvero del cambio della segatura, rappresenta un'occasione per tali osservazioni in quanto destabilizza l'equilibrio gerarchico all'interno di gruppi di maschi, permettendo di esaminare i comportamenti agonistici (Gray & Hurst, 1995). Tali comportamenti sono mediati da stimoli olfattivi emanati dal corpo e dalle deiezioni presenti sulla lettiera (particolarmente l'urina). Questi stimoli sono coinvolti nella comunicazione relativa all'organizzazione sociale e alla dominanza sul territorio (gabbia) e nel riconoscimento e mantenimento della tolleranza sociale fra individui familiari. Così alterazioni nel comportamento sociale potrebbero facilmente essere osservabili a seguito della routinaria procedura di pulizia delle gabbie da parte del personale addetto alla stabulazione, con un investimento minimo in termini di tempo e di finanziamenti. Quindi, il benessere degli animali usati nelle procedure dipenda fortemente dalla qualità e dalle competenze professionali del personale incaricato della supervisione delle procedure, di coloro i quali le attuano, nonché di coloro i quali controllano chi si occupa degli animali su base giornaliera. Gli organi competenti

dovrebbero assicurare, attraverso un sistema di controllo, che il personale sia adeguatamente istruito, formato e competente.

Benché il topo sia la specie animale oggi più utilizzata nell'ambito delle scienze biomediche, anche altre specie, quali il ratto e pesci quali *Danio rerio* (pesce zebra), sono impiegate nell'ambito dell'ingegneria genetica; di conseguenza, le problematiche, soprattutto a carattere bioetico, legate alle nuove biotecnologie debbono essere seriamente considerate anche per queste specie. Un potenziale problema associato all'uso di animali geneticamente modificati è quello della contaminazione dell'ecosistema da parte di individui con un patrimonio genetico alterato. Sebbene tale evenienza sia assai improbabile, in quanto tutti gli studi condotti finora hanno dimostrato come gli animali geneticamente modificati abbiano difficoltà ad adattarsi all'ambiente naturale, questa non può essere esclusa. Infatti, la fuga di questi soggetti potrebbe portare alla "contaminazione" progressiva di colonie naturali circostanti (soprattutto nel caso di animali di dimensioni ridotte quali piccoli roditori). La prevenzione di tale evento indesiderato deve divenire una priorità per i laboratori che contengano animali geneticamente modificati. Un approccio preventivo attendibile ed efficace dovrebbe includere appropriate barriere per impedire eventuali fughe.

In un'ottica più filosofica è importante considerare che le nuove tecnologie genetiche utilizzate al fine di raggiungere obiettivi utili alla nostra specie, quali la comprensione del funzionamento del nostro organismo o lo sviluppo di nuovi farmaci, potrebbe incidere sulla biodiversità e/o sollevare problematiche relative al rispetto per la vita o allo sfruttamento della vita animale violandone la dignità, ovvero alterandone il patrimonio genetico creato dalla storia naturale specie-specifica (Petrocelli *et al.*, 2003). Di fronte a tali incertezze si dovranno adottare misure precauzionali per la tutela dell'essere vivente.

Conclusioni

In conclusione, l'ingegneria genetica applicata al mondo animale porta con sé questioni etiche assai rilevanti relative al benessere degli animali, definito anche come "la capacità di adattamento di un animale alle proprie condizioni di vita" in base alla definizione della *World Organisation for Animal Health* (World Health Organisation, 2010). Tali aspetti, dovrebbero essere considerati da tutti i soggetti interessati, dai ricercatori ai veterinari, per assicurare che le parti coinvolte siano a conoscenza delle questioni etiche in gioco in modo da poter contribuire attivamente al dibattito sulla creazione e l'utilizzo degli animali geneticamente modificati (Ormandy *et al.*, 2011). La conoscenza delle problematiche relative al benessere degli animali geneticamente modificati ha effettuato negli ultimi anni un necessario e imprescindibile passo avanti. Tuttavia, considerati i delicati aspetti legati alla loro intrinseca condizione biologica e a caratteristiche fenotipiche non sempre facilmente valutabili e prevedibili, riteniamo che il benessere degli animali transgenici meriti particolare attenzione al fine di rendere pienamente consapevole la comunità scientifica delle problematiche relative al loro uso in studi di biomedicina.

Bibliografia

Alleva E, Carere C. Etologia. In: *Appendice 2000. Istituto della Enciclopedia Italiana "Giovanni Treccani"*. Roma: Enciclopedia italiana "Giovanni Treccani"; 2000. p. 625-9.

- Balogh SA, McDowell CS, Stavnezer AJ, Denenberg VH. A behavioral and neuroanatomical assessment of an inbred substrain of 129 mice with behavioral comparisons to C57BL/6J mice. *Brain Res* 1999;836:38-48.
- Branchi I, Curley JP, D'Andrea I, Cirulli F, Champagne FA, Alleva E. Early interactions with mother and peers independently build adult social skills and shape BDNF and oxytocin receptor brain levels. *Psychoneuroendocrinology* 2013;38:522-32.
- Broom DM, Johnson KG. *Stress and animal welfare*. London: Kluwer Academic Publisher; 1993.
- Crawley JN. *What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice*. New York: John Wiley & Sons Inc.; 2000.
- De Cock Buning T. The real role of intrinsic value in ethical review committees. In: Dol M, Fentener van Vlissingen M, Kasanmoentalib S, Visser T, Zwart H (Ed.). *Recognising the intrinsic value of animals, beyond animal welfare*. Assen, The Netherlands: Van Gorcum; 1999; p. 133-9.
- Didovyk A, Borek B, Tsimring L, Hasty J. Transcriptional regulation with CRISPR-Cas9: principles, advances, and applications. *Curr Opin Biotechnol* 2016;40:177-84.
- Duncan IJH, Fraser D. Understanding animal welfare. In: Appleby MC, Hughes BO (Ed.). *Animal welfare*. Wallingford: Can International; 1997. p. 19-31.
- Gerlai R. Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *TINS* 1996;19:177-81.
- Gingrich JA, Hen R. The broken mouse: the role of development, plasticity and environment in the interpretation of phenotypic changes in knockout mice. *Curr Opin Neurobiol* 2000;10:146-152.
- Gray S, Hurst JL. The effects of cage cleaning on aggression within groups of male laboratory mice. *Animal Behaviour* 1995;49:821-6.
- Hazecamp A, De Cock Buning T. *Health and welfare of transgenic farm animals: Past, present and perspectives*. Leiden: University of Leiden; 1998.
- Lipp HP, Wolfer DP. Genetically modified mice and cognition. *Curr Opin Neurobiol* 1998;8:272-80.
- Mephram TB, Combes RD, Balls M, Barbieri O, Blokhuis HJ, Costa P, Crilly RE, de Cock Buning T, Delpire VC, O'Hare MJ, Houdebine LM, van Kreijl CF, van der Meer M, Reinhardt CA, Wolf E, van Zeller AM. The use of transgenic animals in the European Union. The report and recommendations of ECVAM Workshop. *ATLA* 1998;26:21-43.
- Newmark P. Guidelines produced for the use of transgenic animals in research. *Nature* 1989;337:295.
- Ormandy EH, Dale J, Griffin G. Genetic engineering of animals: ethical issues, including welfare concerns. *The Canadian Veterinary Journal* 2011; 52:544-50.
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 1982;300:611-5.
- Palmiter RD, Norstedt G, Gelinas RE, Hammer RE, Brinster RL. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science* 1983;222:809-14.
- Petrocelli A, Rodriguez D, Spadafora C, Tamino G, Zannini P. Transgenesi. In: Ravarotto L, Pegoraro R. (Ed.). *Transgenesi clonazione xenotrapianto. Analisi scientifica, giuridica ed etica sull'impiego degli animali*. Padova: Piccin; 2003. p. 13-41.
- Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London, 1959. Reprinted by Universities Federation for Animal Welfare; 1992.
- Van der Meer M, Rolls A, Baumans V, Olivier B, van Zutphen LFM. Use of score sheets for welfare assessment of transgenic mice. Laboratory Animals Ltd. *Laboratory Animals* 2001;35:379-89.

- Vitale A, Alleva E. Ethological and welfare considerations in the study of aggression in rodents and nonhuman primates. In: Haug M, Whalen RE (Ed.). *Animal models of human emotion and cognition*. Washington: American Psychological Association; 1999. p. 283-95.
- Wells DJ, Playle LC, Enser WE, Flecknell PA, Gardiner MA, Holland J, Howard BR, Hubrecht R, Humphreys KR, Jackson IJ, Lane N, Maconochie M, Mason G, Morton DB, Raymond R, Robinson V, Smith JA, Watt N. Assessing the welfare of genetically altered mice. *Laboratory Animals* 2006;40:111-4.
- World Health Organisation (OIE). *Terrestrial Animal Health Code. Glossary*. Paris: International Office of Epizootics; 2017. Disponibile all'indirizzo: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/glossaire.pdf; ultima consultazione 29/9/17.
- Zheng QY, Johnson KR. Hearing loss associated with the modifier of deaf waddler (*mdfw*) locus corresponds with age-related hearing loss in 12 inbred strains of mice. *Hearing Research* 2001;154:45-53.

RILEVANZA DELLO STUDIO DEL COMPORTAMENTO PER LA VALUTAZIONE DEL BENESSERE ANIMALE

Francesca Zoratto, Marta Borgi, Enrico Alleva, Nadia Francia

Centro di Riferimento Scienze Comportamentali e Salute Mentale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

I risultati degli studi orientati a un approccio etologico, in animali allevati in laboratorio o in condizioni semi-naturali, hanno un'importante valenza conoscitiva, rappresentando un valore aggiunto, anche traslazionale, per la psicobiologia comparata. In particolare, nell'ambito delle neuroscienze, le metodologie sperimentali basate sulla valutazione del comportamento rappresentano un valido approccio per lo studio pre-clinico delle patologie associate alla funzionalità del sistema nervoso. Il comportamento rappresenta, infatti, il risultato di meccanismi cerebrali che presiedono all'elaborazione, integrazione e risposta a stimoli endogeni e/o esogeni. La descrizione del fenotipo comportamentale fornisce informazioni rilevanti che integrano quelle ottenute mediante valutazioni molecolari, cellulari o istologiche. Per esempio, i processi neurodegenerativi che interessano i pazienti affetti da malattia di Alzheimer sono spesso correlati a deficit cognitivi, con progressiva compromissione delle capacità di apprendimento e memoria. Nei modelli animali di malattie neurodegenerative tali deficit di apprendimento e memoria possono essere caratterizzati e misurati valutando la risposta comportamentale in appropriati test etologici (Branchi & Ricceri, 2004).

Qualsiasi uso, invasivo o non invasivo, di un animale a fini sperimentali o ad altri fini scientifici solleva varie problematiche teoriche e pratiche. Anche studi comportamentali, che prevedono quindi l'attuazione di metodiche che possono interferire con le caratteristiche etologiche specie-specifiche, possono causare all'animale distress - anche prolungato - e ricadono quindi nella definizione di "procedura" come definita dal DL.vo 26/2014 (attuazione della Direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici).

Anche in studi di tipo etologico è quindi fondamentale attuare delle misure per ridurre la sofferenza imposta all'animale, non solo durante l'esecuzione delle procedure, ma anche durante l'allevamento e tutte le fasi della permanenza dell'animale nelle strutture di stabulazione.

La prima parte di questo capitolo è quindi dedicata agli accorgimenti che dovrebbero essere implementati per garantire un ambiente che tenga conto delle esigenze fisiologiche ed etologiche della specie da ospitare.

Nella seconda metà del capitolo ci soffermeremo, riportandole come esempio, su alcune delle procedure più comunemente utilizzate per la valutazione del profilo comportamentale nei roditori. Vedremo nello specifico quali sono le precauzioni e gli accorgimenti tecnici da adottare per ottimizzare queste metodiche, al fine anzitutto di ridurre la sofferenza imposta agli animali e inoltre di raccogliere dati maggiormente accurati e riproducibili.

Ottimizzazione della fase di mantenimento

Nell'ottica di promuovere misure per evitare o attenuare il livello di sofferenza dell'animale utilizzato a fini sperimentali in tutte le fasi della sua esistenza (dalla nascita alla morte), in questa sezione del capitolo verranno descritti alcuni accorgimenti per la sistemazione e la cura degli animali mantenuti nei laboratori di ricerca.

Tali accorgimenti possono venir adottati per ottimizzare la fase di allevamento e mantenimento degli animali, non trascurando le condizioni di arricchimento utilizzate per garantire il loro benessere. Tutte le potenziali fonti di stress cui l'animale può andare incontro nel corso della permanenza nelle strutture di stabulazione andrebbero attentamente considerate in modo da provvedere con gli appropriati accorgimenti per monitorare le condizioni degli animali e minimizzare i potenziali fattori di disagio (Jennings *et al.*, 1998). Per esempio, è altamente sconsigliato che specie tra loro incompatibili, come predatori e prede, siano fatte coabitare nello stesso locale o, più in generale, siano stabulate a una distanza tale da potersi reciprocamente vedere, annusare o ascoltare.

Qui di seguito sono brevemente illustrati alcuni esempi di accorgimenti da adottare per ottimizzare il mantenimento di topi e ratti nelle strutture di stabulazione.

Illuminazione

È molto importante che agli animali siano garantiti fotoperiodi regolari e un'intensità luminosa adatta alle varie specie. L'illuminazione (naturale o artificiale controllata) deve quindi rispettare le esigenze biologiche degli animali. Topi e ratti sono animali notturni e, in quanto tali, sono attivi durante la fase di buio del ciclo luce/buio (12h/12h) cui vengono mantenuti in stabulario. È questo un aspetto di fondamentale importanza, in particolare negli studi di caratterizzazione comportamentale. Va infatti evitata l'esecuzione di un paradigma comportamentale nella fase di luce, quando topi e ratti tendono a essere meno attivi e a riposare (Abou-Ismaïl *et al.*, 2008). Questo sia per non interferire con il benessere degli animali (la privazione di sonno rappresenta, infatti, uno stress per questi roditori) sia per migliorare la qualità dei dati raccolti (es. la performance in un test cognitivo di un animale disturbato durante il riposo per essere sottoposto al test non è certamente confrontabile con quella di un animale sottoposto al test nella fase in cui è spontaneamente attivo).

Per evitare che lo sperimentatore debba eseguire gli esperimenti durante la notte, nei locali di stabulazione in cui gli animali vengono mantenuti sarebbe opportuno impostare un ciclo luce/buio invertito. Per garantire lo svolgimento delle procedure di allevamento e ispezione degli animali e per fornire un adeguato ambiente di lavoro, si dovrebbero utilizzare lampade a luce bianca opportunamente schermate o, preferibilmente, lampade a luce rossa, che è invisibile ai roditori.

Salute

Per garantire che tutti gli animali malati o feriti siano individuati e che si adottino misure adeguate, gli animali devono essere sottoposti a controlli almeno giornalieri da parte dello sperimentatore e/o del veterinario responsabile. In questo contesto l'osservazione del comportamento è fondamentale in quanto può fornire una indicazione precoce di una compromissione del benessere. Informazioni utili per la valutazione del benessere si possono ottenere attraverso la valutazione di indici quali la presenza di stereotipie e di morsicature, il

peso ponderale, le condizioni della pelliccia, la numerosità della nidiata e la presenza nella madre del comportamento di cannibalismo dei piccoli.

Particolare cura deve quindi essere posta nel monitorare con costanza i comportamenti che gli animali esibiscono spontaneamente nei loro alloggi, soprattutto nel caso si preveda l'impiego di ceppi geneticamente modificati. Questi ultimi, infatti, potrebbero mostrare alterazioni comportamentali come elevati livelli di aggressività intraspecifica (soprattutto tra gli esemplari di sesso maschile) tali da provocare stress e ferite. Inoltre, i ceppi geneticamente modificati potrebbero presentare alterazioni della soglia del dolore. Nel caso di una ridotta soglia nocicettiva, l'animale potrebbe essere particolarmente sensibile alla stimolazione dolorifica. Viceversa, nel caso di un'aumentata soglia nocicettiva, il soggetto potrebbe presentare scarsa sensibilità agli stimoli nocicettivi e potrebbe ferirsi senza averne cognizione. Sarebbe quindi opportuno effettuare un'accurata valutazione dei potenziali effetti inaspettati della modificazione genetica che potrebbero comprometterne il benessere psicofisico.

Lettiere

Gli animali stabulati nei laboratori di ricerca devono sempre avere a disposizione dormitori puliti e asciutti e, più in generale, materiali per lettiera o giacigli per il riposo adeguati alle specie. A tal proposito è fondamentale tenere conto non tanto della propria concezione di "pulito e asciutto" ma piuttosto delle esigenze etologiche della specie da ospitare.

Topi e ratti tendono a marcare lo spazio in cui vivono e riconoscono la propria gabbia di stabulazione (*home cage*) dal proprio odore. Inoltre, soprattutto nel caso di topi alloggiati in piccoli gruppi, queste marcature contribuiscono al mantenimento di una chiara e stabile gerarchia sociale. Il cambio della gabbia e/o della lettiera, soprattutto se troppo frequente, può quindi costituire una fonte di stress: gli animali vengono a trovarsi improvvisamente in un ambiente nuovo (privo di odori) che non riconoscono e devono ristabilire la gerarchia sociale. A volte l'affermazione del rango di dominante o subordinato può avvenire per mezzo di scontri, anche fisici, durante i quali gli animali possono ferirsi a vicenda, con evidente compromissione dello stato di benessere (Gray & Hurst, 1995; Sharp *et al.* 2002; Burn *et al.*, 2006; Burn & Mason, 2008).

I seguenti accorgimenti potrebbero rappresentare un compromesso tra la necessità di pulizia e le esigenze etologiche della specie:

- effettuare il cambio della lettiera una volta a settimana, preferibilmente sempre nello stesso momento della giornata
- cambiare solo la lettiera e non la gabbia, in modo che gli animali possano riconoscere gli odori sulle pareti della gabbia stessa
- dopo aver effettuato il cambio, distribuire sulla lettiera pulita una manciata della lettiera sporca; ciò può contribuire, in particolare nel caso dei topi, a un più facile ripristino della gerarchia
- sostituire l'intera gabbia solo quando strettamente necessario e comunque non in prossimità dell'esecuzione di osservazioni o paradigmi comportamentali

Trasporto

Si dovrebbe prestare attenzione anche a tutte le fasi non strettamente inerenti al mantenimento o alle procedure sperimentali, ma ove sia comunque possibile intervenire per prevenire, o contribuire a minimizzare, ogni eventuale forma di disagio cui possono essere esposti gli animali. Per esempio, le condizioni degli animali durante il trasporto dalle stanze di

stabulazione alle stanze sperimentali dovrebbero essere attentamente considerate e monitorate al fine di rilevare e minimizzare l'eventuale disagio derivante dal trasporto stesso.

Si dovrebbe inoltre operare per ridurre i tempi di stazionamento degli animali tra l'arrivo dalle ditte fornitrici e la stabulazione nelle strutture dedicate, al fine di limitare al massimo lo stress termico, meccanico e acustico cui possono essere esposti gli animali.

Ottimizzazione delle metodiche comportamentali

Anche se la semplice osservazione del comportamento animale può fornire, di per sé, informazioni preziose, oggigiorno la maggior parte degli studi mirati a validare modelli animali di disturbi neurocomportamentali e/o a valutare gli effetti di potenziali trattamenti farmacologici innovativi per questo tipo di patologie fa ricorso a paradigmi sperimentali focalizzati su specifici aspetti del profilo comportamentale.

Il contributo dell'etologia è cruciale per lo sviluppo di tali paradigmi. Ciascun paradigma è, infatti, teorizzato grazie a una profonda conoscenza della biologia della specie che viene presa in considerazione e del suo etogramma, che rappresenta l'insieme dei comportamenti che la caratterizzano. Nel caso dei roditori, è fondamentale che nella messa a punto dei paradigmi sperimentali si tenga conto del fatto che, per orientarsi nella ricerca di risorse (es. il cibo), topi e ratti utilizzano principalmente stimoli olfattivi e uditivi. La conoscenza della biologia comportamentale di una specie può procedere attraverso lo svolgimento di studi seminaturalistici. Per esempio, le ricerche condotte in condizioni naturali o semi-naturali sulle capacità di navigazione e orientamento in diverse specie di roditori sono state fondamentali per lo sviluppo dei paradigmi per la misurazione di apprendimento e memoria spaziale oggi comunemente utilizzati in ambito preclinico (De Filippis & Alleva, 2014).

Nel caso di studi orientati a un approccio etologico, è importante adottare accorgimenti per prevenire, o almeno limitare, i livelli di sofferenza psicofisica associati ai paradigmi comportamentali.

In questa seconda metà del capitolo ci soffermeremo, a titolo di esempio, su alcune delle procedure più utilizzate per la valutazione dell'emozionalità, dell'apprendimento e della memoria spaziale, e infine del dolore nei roditori. Vedremo nello specifico quali sono le precauzioni e gli accorgimenti tecnici da adottare per ottimizzare queste metodiche, al fine anzitutto di ridurre la sofferenza imposta agli animali e inoltre di raccogliere dati maggiormente accurati e riproducibili. Sebbene gli esempi riportati riguardino topi e ratti, alcuni degli accorgimenti descritti sono molto generali e possono essere adattati e applicati ad altre specie.

Emozionalità

Nei modelli animali che fanno uso di roditori quali topi e ratti, le procedure in grado di evidenziare sintomi comportamentali riferibili a stati di ansia rappresentano un esempio di metodiche la cui ottimizzazione determina sia la riduzione del disagio imposto all'animale sia la raccolta di dati maggiormente accurati e riproducibili. Queste procedure si basano generalmente sull'utilizzo di apparati sperimentali in cui l'animale deve risolvere il conflitto tra la sua naturale tendenza a esplorare un ambiente nuovo (che potrebbe nascondere preziose fonti di nutrimento) e quella a evitare una situazione potenzialmente pericolosa per la sua sopravvivenza (come l'esposizione all'attacco da parte di potenziali predatori). Per esempio, il "labirinto a croce rialzata" (*elevated plus maze*) sfrutta la naturale tendenza dei roditori a limitare la propria permanenza in spazi sopraelevati e privi di un riparo in cui nascondersi (dove potrebbero essere

facilmente avvistati da un predatore) a visite esplorative di durata sufficientemente breve da ridurre il pericolo di predazione ma tale da permettere di stabilire se siano presenti fonti di cibo. Analogamente, i box del cosiddetto *light/dark test* sfruttano la tendenza dei roditori a evitare spazi aperti e fortemente illuminati.

Vediamo ora quali sono le precauzioni che sarebbe opportuno adottare per ottimizzare le procedure in grado di evidenziare sintomi comportamentali riferibili a stati di ansia. Si tenga presente che, più in generale, l'implementazione di questi accorgimenti tecnici è raccomandata quando si esegue una qualunque procedura sperimentale basata sulla valutazione del comportamento degli animali da laboratorio.

Un primo accorgimento che dovrebbe essere adottato quando si eseguono questo tipo di procedure è rappresentato dalla cosiddetta abituazione. Prima dell'inizio del test, gli animali sperimentali dovrebbero essere trasferiti, trasportandoli nelle loro gabbie, dal locale di stabulazione alla stanza sperimentale per un periodo di abituazione all'ambiente di almeno 40 minuti. Tale operazione contribuisce a ridurre il disagio che il trasferimento stesso e l'esposizione a un ambiente nuovo possono causare all'animale. Inoltre, essa è fondamentale se si considera che elevati livelli di stress possono influire sull'esecuzione del test falsandone i risultati, in particolar modo nel caso dei test per la valutazione della risposta di tipo ansioso.

Nei giorni che precedono il test, gli animali andrebbero sottoposti al cosiddetto *handling*, che consiste in una breve manipolazione dei soggetti sperimentali, di durata prefissata e ripetuta più volte. Tale operazione è necessaria in quanto consente agli animali di abituarsi allo sperimentatore e al tipo di manipolazione, contribuendo a ridurre i livelli di stress, che potrebbero influire non solo sul benessere dell'animale ma anche sull'esecuzione del test falsandone i risultati.

Durante la procedura di valutazione della risposta ansioso-simile, l'animale andrebbe preso delicatamente per la porzione basale della coda e trasferito dalla sua gabbia all'apparato sperimentale, con la testa rivolta sempre dallo stesso lato (es. verso la parte centrale del labirinto a croce elevata), e lasciato libero di esplorare il labirinto o il box per la durata della sessione. Al termine del test, l'animale andrebbe sollevato, sempre delicatamente, per la coda e ricondotto nella sua gabbia di stabulazione. Nel caso di ratti adulti, soprattutto se di peso considerevole, andrebbe evitato il sollevamento per mezzo della coda, che potrebbe risultare doloroso; si possono invece posizionare entrambe le mani intorno all'animale, appena dietro le zampe anteriori, passare poi una mano appena dietro gli stessi arti anteriori e poi sotto la pancia e lasciare che l'altra mano si posizioni sopra il fondo della schiena dell'animale. In ogni caso, il soggetto dovrebbe essere stato precedentemente abituato (*handling*) al tipo di manipolazione successivamente adottata nel corso del test.

Come già sottolineato in precedenza, ratti e topi sono animali notturni che dovrebbero essere allevati e mantenuti in locali di stabulazione a ciclo luce/buio invertito (in modo tale che lo sperimentatore possa comunque eseguire i test durante il giorno). I test andrebbero quindi svolti durante la fase di buio del ciclo, quando gli animali sono attivi. Ne consegue che, nella stanza sperimentale, il test andrebbe eseguito in condizioni di luce bianca soffusa o di luce rossa.

Oltre a tutte le precauzioni standard, finalizzate a limitare effetti di interferenza da parte dello sperimentatore sul test in corso (lo sperimentatore che manipola l'animale dovrebbe essere sempre lo stesso, indossare lo stesso abbigliamento, non dovrebbe utilizzare profumi, ecc.). L'ideale sarebbe svolgere il test in una stanza sperimentale insonorizzata, in modo da evitare che eventuali rumori possano disturbare i soggetti sperimentali spaventandoli, oppure attrezzata a produrre un rumore di fondo costante ("rumore bianco") che mascheri quelli eventualmente provenienti dall'ambiente esterno. Si dovrebbe prestare la massima attenzione anche agli odori eventualmente presenti negli ambienti in cui vengono svolti i test. I roditori hanno un senso dell'olfatto molto sviluppato e la presenza di taluni odori (es. sangue, odore del predatore) può

metterli in allerta e indurre uno stato di ansia. A tal proposito si tenga presente che, in condizioni naturali, il ratto è un potenziale predatore del topo.

La presenza dello sperimentatore all'interno della stanza sperimentale durante lo svolgimento del test può influenzare il comportamento degli animali: si può osservare una preferenza per una certa porzione dell'arena in funzione della posizione dello sperimentatore oppure una riduzione della *performance* dovuta al fatto che lo sperimentatore distrae gli animali distogliendoli dal compito che stanno svolgendo. Di conseguenza, nel corso di uno stesso test comportamentale, lo sperimentatore o non dovrebbe mai essere presente (le sessioni vengono videoregistrate per consentire una successiva quantificazione dei parametri comportamentali; predisponendo un monitor al di fuori della stanza sperimentale, è comunque possibile controllare in tempo reale gli animali) o dovrebbe essere sempre presente, rimanendo però fermo nella stessa posizione spaziale (e in tal caso bisogna avere la piena consapevolezza dei potenziali effetti di interferenza).

Un ulteriore affinamento si ottiene prendendo in considerazione, oltre ai parametri classici, anche delle misure di tipo etologico. Ne è un esempio l'*elevated plus maze* in cui, oltre ai parametri convenzionali spazio-temporali (es. numero di ingressi nei bracci, tempo trascorso nei bracci aperti, ecc.), possono essere particolarmente informativi comportamenti quali l'*head-dipping* (l'animale si sporge con la testa e parte delle spalle dall'apparato) e la *stretched-attend posture* (l'animale, da fermo, sposta in avanti tutto il corpo e poi lo ritrae rapidamente). Sono entrambi considerati comportamenti di valutazione del rischio e possono fornire preziose informazioni sullo stato di ansia.

Apprendimento e memoria spaziale

Esistono diverse procedure che consentono di misurare l'apprendimento e la memoria spaziale (procedure cosiddette di *spatial learning*) e si basano sull'uso di labirinti, che sfruttano la naturale tendenza dei roditori a esplorare ambienti nuovi. Ne sono un esempio il "labirinto acquatico di Morris" (*Morris water maze*), il "labirinto radiale" (*radial arm maze*) e il "labirinto a T" (*T maze*).

Qui di seguito ci soffermeremo in particolare sull'esecuzione del *Morris water maze*, portandola come esempio di metodica la cui ottimizzazione permette di ridurre considerevolmente il disagio imposto all'animale. Si sottolinea che gli accorgimenti descritti in questa sezione, come del resto quelli trattati in tutto il contributo, sono molto generali e possono essere sviluppati e applicati (adattandoli appropriatamente) ad altri test comportamentali. Inoltre, l'implementazione degli accorgimenti tecnici di seguito descritti permette anche di produrre dei risultati maggiormente accurati e riproducibili (e ciò consente anche di ridurre il numero degli animali utilizzati).

Il *Morris water maze* è uno dei test comportamentali più utilizzati per la valutazione delle abilità di apprendimento spaziale nei roditori. Il test era stato inizialmente messo a punto da Richard Morris (1984) per la specie ratto e solo successivamente è stato adattato alla specie topo (Crawley, 2000). I topi, al pari dei ratti, sono buoni nuotatori, ma, diversamente da questi, in natura mostrano una marcata avversione per l'ambiente acquatico. Il test si basa proprio su questa naturale preferenza dei roditori per la terraferma e, diversamente da altri test di apprendimento, non richiede l'esposizione a restrizioni alimentari. Durante il test, i soggetti sperimentali devono apprendere che l'unica via di fuga dall'acqua è una piattaforma nascosta sotto la superficie e, per trovarla, devono orientarsi basandosi su una serie di riferimenti visivi spaziali posti sulle pareti della stanza sperimentale.

L'apparato sperimentale consiste in un'arena circolare in plexiglas di 150 cm di diametro e di 50 cm di altezza riempita d'acqua alla temperatura di 24-25°C. Per i topi si possono utilizzare

arene più piccole. La procedura classica dura complessivamente cinque giorni e prevede una fase di acquisizione (*acquisition*) della durata di tre giorni, una fase di verifica (*probe*) che consiste in un'unica prova, senza piattaforma, 24 ore dopo la fase di acquisizione, e una fase di inversione (*reversal*) della durata di due giorni, in cui la piattaforma viene spostata e si valuta la capacità dell'animale di riapprendere il test. Il numero di giorni e il numero di prove per ciascun giorno possono essere modificati secondo le esigenze sperimentali. Il criterio che il soggetto sperimentale deve raggiungere per il superamento della prova consiste nel nuotare verso la piattaforma, salirci sopra e rimanerci per almeno tre secondi. L'intera procedura viene videoregistrata per consentire una successiva quantificazione dei parametri comportamentali per mezzo di appositi programmi; generalmente si considerano i seguenti parametri: latenza a raggiungere la piattaforma, velocità di nuoto, lunghezza del percorso, traiettoria seguita, numero di attraversamenti e tempo trascorso in ciascun quadrante.

Vediamo ora quali sono gli accorgimenti che sarebbe opportuno adottare per ottimizzare questa metodica:

- La temperatura dell'acqua è un fattore che dovrebbe essere accuratamente controllato: escursioni anche minime possono demotivare l'animale nell'esecuzione del test, soprattutto negli esperimenti con i topi e in particolare nel caso di soggetti geneticamente modificati, che potrebbero presentare delle alterazioni delle soglie nocicettive e percepire la temperatura dell'acqua come stimolo particolarmente spiacevole. Particolare attenzione andrebbe prestata anche nel caso di soggetti giovani e anziani (si veda per esempio Schenk 1985; Rudy *et al.*, 1987). La procedura andrebbe eseguita in una stanza sperimentale illuminata con luce soffusa.
- Un altro aspetto importante in un'ottica di ottimizzazione della metodica è rappresentato dai tempi scelti per il cut-off. Infatti, se il soggetto non trova la piattaforma entro il tempo stabilito, viene comunque tolto dall'acqua e la prova si considera terminata. L'utilizzo di cut-off eccessivamente lunghi può indurre un forte disagio nell'animale; cut-off di 60 secondi nel caso del topo e di 120 secondi per il ratto sembrano adeguati.
- Al fine di evitare l'orientamento visivo prima dell'ingresso nell'arena, l'animale andrebbe trasportato dalla sua gabbia all'apparato all'interno di un contenitore con pareti opache e rilasciato nell'arena, facendolo scivolare delicatamente nell'acqua con la testa rivolta verso la parete dell'apparato.
- Al termine della prova, al topo andrebbe data la possibilità di salire su un'apposita griglia per poi essere trasportato nella sua gabbia, dove andrebbe lasciato ad asciugarsi al calore moderato di una lampada rossa. Il ratto, invece, andrebbe allontanato dalla piattaforma e rimesso nella sua gabbia prendendolo delicatamente per la porzione basale della coda.
- Tra una prova e l'altra dovrebbe intercorrere un intervallo di tempo di 40-50 minuti (*inter trial interval*). La durata di tale intervallo rappresenta un altro fattore critico per l'apprendimento e la memorizzazione del test e dovrebbe essere sufficientemente lungo da ridurre i livelli di stress e, allo stesso tempo, da consentire all'animale di consolidare l'esperienza della prova.
- Un ulteriore affinamento della procedura si ottiene prendendo in considerazione, oltre ai parametri classici sopraelencati, anche comportamenti considerati indicativi di stati di ansia (*anxiety-like behaviours*). Possono essere particolarmente informativi comportamenti quali la tigmotassi (cioè il tempo trascorso dall'animale a nuotare in prossimità della parete dell'arena) e il galleggiamento passivo (*passive floating*). La valutazione di questi parametri dovrebbe essere considerata con particolare attenzione soprattutto quando i soggetti sperimentali sono topi, e in particolar modo transgenici, in cui la manipolazione genetica può modificare lo stato emozionale in maniera inaspettata. Infatti, è possibile che l'animale non riesca a risolvere il test, o presenti una scarsa

performance, non perché abbia deficit di apprendimento e memoria ma perché il suo stato emozionale interferisce con la *performance* stessa, limitando la sua capacità di apprendere con successo il test. Si può limitare questa interferenza dello stato emozionale sottoponendo gli animali a una procedura di pre-addestramento (prima del test), durante la quale vengono collocati, per una serie di prove consecutive, direttamente sulla piattaforma, dove dovrebbero rimanere per almeno 10 secondi.

Dolore

La sensibilità al dolore di topi e ratti viene saggiata con diverse tecniche tra cui il test della formalina (*formalin test*) (Dubuisson & Dennis, 1977), che viene utilizzato per valutare i comportamenti indotti dalla percezione di uno stimolo doloroso di moderata intensità e di lunga durata, e il test della piastra calda (*hot plate*) (Woolfe & MacDonald, 1944), che viene invece utilizzato per misurare la reazione comportamentale determinata dalla percezione di uno stimolo doloroso di moderata intensità e di breve durata. L'ottimizzazione delle procedure per la valutazione del dolore risponde alla necessità (i) di ridurre il disagio imposto all'animale e (ii) di diminuire le fonti di variabilità inevitabilmente indotte dalla mancata standardizzazione delle procedure stesse.

Qui di seguito sono descritti brevemente alcuni accorgimenti per l'esecuzione del test dell'*hot plate*, largamente utilizzato in ricerche neuro- e psico-farmacologiche. Per una trattazione più approfondita si rimanda al contributo di Cirulli *et al.* (2001) per il test della piastra calda, e al contributo di Capone e Aloisi (2004) per il test della formalina.

La stimolazione termica utilizzata nel test della piastra calda rappresenta una metodologia particolarmente efficace per la valutazione della sensibilità al dolore; la temperatura rappresenta, infatti, un elemento naturale e che può essere controllato direttamente alla sorgente. Inoltre, durante il test, l'animale può reagire allo stimolo doloroso alzando o leccando le zampe, minimizzando così la propria sofferenza.

Il test è estremamente semplice e consiste nel posizionare il soggetto sperimentale su una superficie riscaldata per un periodo di tempo generalmente non superiore ai 60 secondi e nel misurare l'intervallo di tempo (latenza) che intercorre prima che si verifichi una risposta (es. il leccarsi la zampa o *licking*).

Vediamo ora quali sono gli accorgimenti che sarebbe opportuno adottare per ottimizzare questa metodica:

- Un primo fattore è rappresentato dalla temperatura utilizzata per la piastra, che deve essere tale da non arrecare dolore acuto o scottature alla pelle del roditore. In passato si utilizzavano valori anche molto elevati (fino a 70°C); successivamente, già a partire dal 1950, essi sono stati abbassati fino a 55°C, valore generalmente adottato ancora oggi. Sarebbe auspicabile un'ulteriore riduzione dell'intensità dello stimolo termico per due ragioni. Innanzitutto per limitare la sofferenza dell'animale; inoltre, la riduzione dell'intensità della stimolazione dolorosa permette allo sperimentatore di saggiare effetti "fini" di potenziali trattamenti farmacologici innovativi, che non sarebbero rilevabili ad alte temperature. Per esempio, il tempo di latenza e la frequenza dei comportamenti comunemente mostrati da ratti e topi nel test dell'*hot plate* cambiano quando la temperatura della superficie viene portata da 50 a 55°C (Cirulli *et al.* 2001).
- La scelta del parametro comportamentale utilizzato per saggiare il dolore negli animali è altrettanto importante. In particolare, il tempo di latenza al primo *licking* a una delle zampe posteriori potrebbe essere un comportamento più idoneo (rispetto al primo *licking* a una delle zampe anteriori) per una valutazione accurata della sensazione di dolore nell'animale (Cirulli *et al.*, 2001).

- Più in generale, un approccio di tipo etologico è fondamentale al fine di minimizzare la sofferenza degli animali (Alleva *et al.*, 1998; Visalberghi & Alleva, 1998). Per esempio, l'uso di una scala di valutazione basata su più di una singola categoria comportamentale può consentire il riconoscimento delle componenti locomotorie, esplorative ed emozionali che sottendono al comportamento di un soggetto e rappresenta quindi una strategia da utilizzarsi per ridurre il disagio imposto all'animale.
- Come nel caso delle procedure in grado di evidenziare sintomi comportamentali riferibili a stati di ansia, sarebbe fondamentale che ogni situazione potenzialmente in grado di influenzare lo stato interno dell'animale sia evitata o controllata nella misura più ampia possibile al fine di distinguere tra gli effetti dello stimolo doloroso (formalina, calore) e quelli delle manipolazioni sperimentali. Pertanto, oltre alla standardizzazione delle tecniche sperimentali per l'effettiva esecuzione delle procedure per la valutazione del dolore, sarebbe importante ridurre la variabilità correlata alle condizioni e alle manipolazioni cui gli animali sono sottoposti prima del test (es. *handling*, abituazione, ecc.). Questi accorgimenti possono anche permettere una riduzione del numero di soggetti sperimentali esposti a situazioni particolarmente stressanti.

Severità delle procedure in studi etologici

Secondo la normativa vigente, la gravità di una procedura è determinata in base al livello di dolore, sofferenza, angoscia o danno prolungato cui sarà presumibilmente sottoposto l'animale. In generale, si osserva una tendenza a sottovalutare l'impatto e l'invasività delle procedure previste nell'ambito di studi di tipo etologico, che sono spesso considerate come lievi. Alcune procedure sperimentali basate esclusivamente su un approccio comportamentale, pur non causando alcun dolore o danno fisico, comportano significativi stati di sofferenza psicofisica o angoscia negli animali e possono essere considerate quindi procedure di gravità moderata. Per esempio, anche negli studi orientati a un approccio comportamentale è spesso necessario allontanare il soggetto sperimentale dal partner/gruppo sociale. Infatti, la maggior parte dei paradigmi comportamentali implica necessariamente un periodo di isolamento sociale durante il test individuale. È quindi necessario tenere in considerazione e monitorare questo potenziale stress da isolamento sociale. In generale la durata ridotta del test rende il temporaneo isolamento sociale ben sopportato dagli animali. Sarebbe comunque necessario riconoscere che una seppur breve separazione dal partner/gruppo sociale durante il test sperimentale può creare un lieve e transitorio disagio all'animale. Può essere utile specificare che in letteratura tali test sono ampiamente usati e ben tollerati senza conseguenze a lungo o medio termine. In altri casi i paradigmi comportamentali possono invece avere durate superiori o può essere necessario mantenere gli animali isolati per tutta la durata del test. In queste circostanze sarebbe quindi necessario discutere in dettaglio per quale motivo non è possibile evitare lo stress da isolamento sociale e/o cercare di adottare misure per ridurlo al minimo. Per esempio, nella maggior parte dei casi l'isolamento prolungato consiste nell'alloggiare i soggetti individualmente ma non vi è isolamento acustico, essendo udibili i suoni (e/o ultrasuoni) emessi dagli altri animali, che costituiscono una importante fonte di informazione sociale e di arricchimento ambientale.

Il livello di gravità di una procedura non dipende solo dal tipo di procedura ma anche da una serie di altri fattori (es. età e sesso dell'animale; esperienza di addestramento dell'animale con riferimento alla procedura; metodi usati per ridurre o eliminare dolore, sofferenza, angoscia, tra cui l'ottimizzazione delle condizioni di alloggiamento, allevamento e cura), considerati caso per caso. Per esempio, in molte specie l'isolamento dal partner/gruppo sociale ha un effetto più grave se attuato durante la fase dell'infanzia e dell'adolescenza rispetto all'età adulta. Al

contrario, l'esposizione ripetuta degli animali a una certa procedura può garantire un livello di abitudine tale da ridurre al minimo il disturbo psicofisico.

Conclusioni

Gli studi orientati a un approccio comportamentale richiedono osservazioni accurate e una considerazione della storia evolutiva e del significato adattativo dei comportamenti oggetto di indagine. Adottare accorgimenti per ottimizzare (i) la permanenza degli animali nelle strutture di stabulazione e (ii) l'esecuzione delle procedure può consentire di ridurre la sofferenza imposta agli animali e di raccogliere dati maggiormente accurati e riproducibili. L'applicazione di tecniche di affinamento ("refinement") può avere un impatto positivo sul benessere degli animali e, conseguentemente, anche sul livello di gravità della procedura.

Queste considerazioni sono particolarmente rilevanti nell'ambito della ricerca pre-clinica sui modelli di disturbi neurocomportamentali, che prevede la valutazione di sintomi di tipo comportamentale secondo un approccio etologico che, tenendo conto della biologia e della storia evolutiva della specie, possa migliorare sia la qualità dei dati raccolti sia il benessere psicofisico degli animali.

Bibliografia

- Abou-Ismaïl UA, Burman OHP, Nicol CJ. Let sleeping rats lie: Does the timing of husbandry procedures affect laboratory rat behaviour, physiology and welfare? *Appl Anim Behav Sci* 2008;111:329-41.
- Alleva E, Rankin J, Santucci D. Methodological analysis in behavioral toxicology: an ethotoxicological approach. *Toxicol Industr Health* 1998;14:325-32.
- Branchi I, Ricceri L. Refining learning and memory assessment in laboratory rodents. An ethological perspective. *Ann Ist Super Sanità* 2004;40(2):231-6.
- Burn CC, Peters A, Mason GJ. Acute effects of cage-cleaning at different frequencies on laboratory rat behaviour and welfare. *Anim Welf* 2006;15:161-72.
- Burn CC, Mason GJ. Effects of cage-cleaning frequency on laboratory rat reproduction, cannibalism, and welfare. *Appl Anim Behav Sci* 2008;114:235-47.
- Capone F, Aloisi AM. Refinement of pain evaluation techniques. The formalin test. *Ann Ist Super Sanità* 2004;40(2):223-9.
- Cirulli F, Alleva E, Capogrossi Colognesi S. Problemi metodologici legati alla valutazione del dolore nell'animale da esperimento. In: Vitale A, Laviola G (Ed.). *Sperimentazione animale secondo il Decreto legislativo n. 116/1992: stato di applicazione e opinioni a confronto*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2001. (Rapporti ISTISAN 01/23). p. 47-54.
- Crawley JN. Behavioral paradigms. The Morris water task. In: Crawley JN (Ed.). *What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice*. New York: Wiley-Liss; 2000. p. 87-95.
- De Filippis B, Alleva E. Le malattie neuropsichiatriche e il ruolo dell'etologia. *Sapere* 2014;4:18-21.
- Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977;4(2):161-74.
- Gray S, Hurst JL. The effect of cage cleaning on aggression within groups of male laboratory mice. *Anim Behav* 1995;49:821-826.

- Italia. Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26. Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 61, 14 marzo 2014.
- Jennings M, Batchelor GR, Brain PF, Dick A, Elliott H, Francis RJ, Hubrecht RC, Hurst JL, Morton DB, Peters AG, Raymond R, Sales GD, Sherwin CM, West C. Refining rodent husbandry: the mouse. *Lab Anim* 1998;32:233-259.
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984;11:47-60.
- Rowland NE. Food or fluid restriction in common laboratory animals: balancing welfare considerations with scientific inquiry. *Comp Med* 2007;57:149-60.
- Rudy JW, Stadler-Morris S; Albert P. Ontogeny of spatial navigation behaviors in the rat: dissociation of “proximal”- and “distal”-cue-based behaviors. *Behav Neurosci* 1987;101:62-73.
- Sharp JL, Zammit TG, Azar TA, Lawson DM. Stress-like responses to common procedures in male rats housed alone or with other rats. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2002;41:8-14.
- Schenk F. Development of place navigation in rats from weaning to puberty. *Behav Neural Biol* 1985;43:69-85.
- Visalberghi E, Alleva E. Book review of “The inevitable bond: Examining scientist-animal interactions” (edited by Davis D, Balfour D. Cambridge: Cambridge University Press; 1992). *Quart J Experiment Psychol* 1993;46B:222-4.
- Woolfe G, MacDonald AD. The evaluation of the analgesic action of Pethidine hydrochloride (Demerol). *J Pharmacol Exp Ther* 1944;80:300-7.

SPERIMENTAZIONE ANIMALE E LINEE GUIDA PER LA CURA E IL BENESSERE DEI CEFALOPODI, UNA CLASSE “ECCEZIONALE” DI INVERTEBRATI

Alessandra Berry, Enrico Alleva

Centro di Riferimento Scienze Comportamentali e Salute Mentale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

“Gli animali hanno un valore intrinseco che deve essere rispettato. L’uso degli animali nelle procedure suscita anche preoccupazioni etiche nell’opinione pubblica. Pertanto, gli animali dovrebbero sempre essere trattati come creature senzienti” (1)

Introduzione

L’Europa possiede una lunga storia normativa sull’utilizzo degli animali per fini scientifici che in alcuni Paesi si può far risalire al diciannovesimo secolo (es. 1891, Danimarca; 1876, Regno Unito, una delle prime nazioni con una legislazione all’uopo). Nel 1986, la pubblicazione della Direttiva europea 86/609/CEE relativa alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici segna un grande passo avanti in materia di benessere degli animali da laboratorio e nel contempo rappresenta un importante tentativo di armonizzazione delle normative locali vigenti nei diversi stati europei. Tuttavia, è importante notare che la Direttiva del 1986 non contempla la protezione e il benessere di animali invertebrati. Nei successivi ventiquattro anni (1986-2010) abbiamo potuto assistere ad enormi progressi dal punto di vista della tecnologia applicata alla ricerca scientifica accompagnati da un’evoluzione nell’etica relativa all’utilizzo degli animali da laboratorio e da una nuova consapevolezza della comunità scientifica nell’approccio alla sperimentazione animale. In particolare, la disponibilità di nuove conoscenze scientifiche sui fattori che influenzano il benessere degli animali e sulla loro capacità di provare ed esprimere dolore, sofferenza, ansia o danno prolungato ha reso necessario migliorare le condizioni di benessere degli animali utilizzati nelle procedure scientifiche rafforzando le norme minime di tutela, in linea con le più recenti scoperte scientifiche. È proprio in questo nuovo contesto che si inserisce la Direttiva 2010/63/UE (1) per la protezione degli animali utilizzati nella ricerca scientifica e la sua attuazione italiana, il DL.vo 26/2014 sulla sperimentazione animale. Tra i cambiamenti di maggior rilievo è sicuramente importante menzionare l’estensione dell’ambito di applicazione della Direttiva alla protezione anche di forme fetali di mammiferi a partire dall’ultimo terzo della gravidanza, di forme larvali in grado di nutrirsi autonomamente (art. 1) e di animali geneticamente modificati – definendo la loro creazione e il loro mantenimento come delle vere e proprie procedure (si veda art. 3). Inoltre, la Direttiva si applica anche alla protezione di una intera classe di invertebrati: i cefalopodi.

Come riportato da Smith *et al.* (2), diversi stati possiedono già da tempo normative nazionali in tema di protezione degli invertebrati sottoposti a procedure sperimentali. Il Regno Unito regola, già dal 1993, l’utilizzo di invertebrati nella ricerca scientifica includendo la tutela del benessere del polpo comune (*Octopus vulgaris*) nell’ambito di applicazione dell’*Animals (Scientific Procedures) Act* del 1986. In modo simile, la Svizzera regola le procedure scientifiche che comprendono l’utilizzo di cefalopodi e crostacei (decapodi), mentre la Norvegia

tutela il benessere di calamari, polpi, crostacei decapodi e api mellifere (sempre nell'ambito di procedure scientifiche). Il codice di procedura del Consiglio Nazionale delle Ricerche in campo medico e di salute pubblica del governo Australiano regola l'uso di "cefalopodi come polpi e calamari" e l'*Animal Welfare Act* neozelandese include invece "polpi, calamari, granchi, aragoste e gamberi". Nella normativa nazionale in tema di protezione e cura degli animali utilizzati a fini scientifici il Consiglio Canadese include cefalopodi e alcuni altri invertebrati superiori che possiedono un sistema nervoso così sviluppato da essere assimilabile a quello di alcuni vertebrati. Tale assimilazione appare eticamente giustificabile, essendo essi in grado di provare o esperire dolore, stress, malessere, angoscia o altre forme di sofferenza (si veda (2) e relativi riferimenti bibliografici per ulteriori dettagli).

In questo contesto è quindi evidente che l'inclusione di una intera classe di invertebrati – i cefalopodi, incluse sia forme adulte che giovanili – nell'ambito dell'applicazione della Direttiva 2010/63/UE (che in tal senso si differenzia quindi dalla precedente Direttiva 86/609/EEC) rappresenta un segno di cambiamento nell'approccio all'etica della sperimentazione animale che riflette in gran parte la disponibilità di conoscenze più approfondite relative a fattori in grado di influenzare il benessere di quegli animali utilizzati a fini scientifici (2-5). A tal proposito, non si può non fare riferimento alle recentissime linee guida per la cura e il benessere dei cefalopodi nella ricerca scientifica, di recentissima pubblicazione. Tale documento è il risultato delle competenze e dello sforzo congiunto di CephRes (*Association for Cephalopod Research*), FELASA (*Federation of Laboratory Animal Science Associations*) e del Boyd Group (un forum con sede nel Regno Unito per lo scambio aperto di opinioni su questioni relative all'uso di animali nella ricerca scientifica) ed è probabile che con il tempo avrà un notevole impatto sulla sperimentazione con i cefalopodi, per quanto riguarda aspetti sia pratici sia etici della ricerca con questi animali.

Si può quindi affermare di essere di fronte a un significativo avanzamento nella ricerca scientifica che, questa volta, ha come protagonista il miglioramento nella comprensione e nella valutazione di aspetti legati al benessere animale (nello specifico degli invertebrati) più che ad avanzamenti tecnologici di rilievo (3-5). Tuttavia, è importante considerare che l'atteggiamento dei diversi Stati membri nei confronti degli animali dipende anche dalla percezione nazionale. Infatti, mentre alcuni Stati membri si possono limitare ad applicare i requisiti minimi stabiliti dalla Direttiva, altri possono adottare misure nazionali di attuazione che garantiscono un più elevato livello di protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. La Direttiva consente quindi agli Stati membri una certa flessibilità nella gestione delle norme nazionali che regolamentano la protezione degli animali utilizzati nella ricerca, nella misura in cui esse siano compatibili con il Trattato sul Funzionamento dell'Unione Europea (TFUE), e quindi non costituiscano un ostacolo agli scambi di prodotti e sostanze per lo sviluppo dei quali sono effettuati esperimenti su animali, al fine di garantire il corretto funzionamento del mercato interno.

Proteggere i cefalopodi: una scelta basata sulla scienza

Perché proteggere una specifica classe di invertebrati? La problematica del benessere animale, così come è stata affrontata nella Direttiva 2010/63/UE e nel suo recepimento italiano (DL.vo 26/2014) si basa sulla capacità degli animali di poter provare e/o esprimere dolore, sofferenza angoscia e danno prolungato. Tale concetto si lega alla complessità dell'anatomia e della fisiologia del sistema nervoso dell'organismo che in alcuni casi può portare a una plasticità fenotipica e a un repertorio comportamentale sofisticati. La capacità di un individuo di

provare, percepire e interpretare situazioni e/o contesti è stata definita come ‘senzienza’. Una definizione più accurata del concetto di senzienza suggerisce che gli esseri senzienti possiedano la capacità di valutare le azioni di altri organismi in relazione a se stessi e/o a terze parti, di ricordare alcune delle proprie azioni e le relative conseguenze, nonché di valutare, nello scegliere se compiere o meno una certa azione, i rischi connessi alle possibili conseguenze future. Inoltre, il concetto potrebbe includere la qualità di possedere alcuni sentimenti e un certo grado di consapevolezza (6). Da ultimo, è importante porre l’enfasi sul concetto di senzienza come criterio fondamentale su cui si basa l’ambito di applicazione della normativa attuale in riferimento alle specie protette. Come sottolineato da Donald M. Broom, è di interesse sia pratico che scientifico tenere in considerazione le capacità cognitive degli animali, quali di essi siano senzienti, quali siano in grado di provare sentimenti e dolore e quali quindi debbano essere protetti. Queste caratteristiche dovrebbero essere prese in considerazione quando si è chiamati a valutare il benessere animale. Ci sono prove a sostegno di sostanziali capacità percettive di alcuni cefalopodi e crostacei decapodi. I cefalopodi, in particolare, sono caratterizzati da una fisiologia complessa che consente loro un’incredibile capacità di percezione dell’ambiente circostante e di adattamento a differenti contesti. Questi invertebrati possiedono un sistema adrenergico in grado di secernere noradrenalina e dopamina in risposta a stimoli stressanti (es. esposizione all’aria, deprivazione di cibo); mostrano una memoria sia a breve che a lungo termine e in tal senso l’esperienza è in grado di modificare il loro comportamento. La loro capacità di cambiare colore sembra essere associata a emozioni sgradevoli (es. in seguito a manipolazione o come conseguenza di un incontro agonistico) o legate a un potenziale pericolo. Le seppie, per esempio, sono in grado di cambiare forma e colore per evitare i predatori e catturare le prede. Tuttavia, nei maschi, tale comportamento può anche essere utilizzato per ingannare conspecifici dello stesso sesso. In particolare, un maschio che corteggia una femmina ricettiva sarebbe in grado di mostrare caratteristiche fisiche e comportamentali femminili solo in metà del proprio corpo (quella non visibile alla femmina) per evitare che un maschio rivale interrompa il comportamento di corteggiamento (6-8). Perciò tutelare il benessere di questi animali appare di fondamentale importanza. Tenendo ben salde in mente queste considerazioni, appare evidente come gli Stati Membri dell’Unione Europea (UE) abbiano fatto un importante passo in avanti decidendo di includere tra gli scopi della nuova Direttiva la tutela del benessere dei cefalopodi.

Linee guida per la cura, il mantenimento e il benessere dei cefalopodi utilizzati per scopi scientifici

L’utilizzo dei cefalopodi nella ricerca scientifica, e particolarmente nel campo delle neuroscienze, vanta una storia centenaria. La ragione di questo successo trae le proprie origini da alcune caratteristiche che contraddistinguono questa classe di invertebrati, prime fra tutte le loro eccellenti capacità senso-motorie (*embodiment*) che sarebbero alla base di un sistema nervoso centrale complesso e centralizzato che conferisce ai cefalopodi una sofisticata plasticità sinaptica e un repertorio comportamentale di rilievo (9-11). Va inoltre menzionato che alcune peculiarità anatomiche dei cefalopodi hanno reso questi invertebrati incredibilmente popolari per studi di fisiologia (es. l’assone del calamaro gigante) ma anche per ricerche inerenti i meccanismi cellulari e molecolari che sottendono i processi di memoria e apprendimento (es. potenziamento a lungo termine).

Come precedentemente detto, l’UE ora include i cefalopodi tra le specie animali protette e ciò implica che (come per le altre specie protette dalla Direttiva 2010/63/UE), i progetti di

ricerca che ne prevedono l'utilizzo vengano adeguatamente giustificati e autorizzati da parte delle autorità locali competenti; inoltre la revisione di tali progetti includerà un'analisi del rapporto danno/beneficio, nonché il rispetto del principio delle 3R (Rimpiazzare, Ridurre, Rifinire (12); si veda anche il contributo di Augusto Vitale nel presente fascicolo).

Per supportare la valutazione di progetti e la loro conformità con la Direttiva 2010/63/UE, sono state recentemente sviluppate delle linee guida *ad hoc* per la cura e il benessere dei cefalopodi da utilizzarsi a fini scientifici. Tale documento si propone di assistere i ricercatori, i veterinari e il personale direttamente coinvolto nella cura degli animali (cefalopodi) fornendo loro informazioni puntuali su Nautilus, seppie, calamari e polpi (13). Gli argomenti trattati dalle linee guida includono le principali implicazioni della Direttiva 2010/63/UE nella ricerca sui cefalopodi: l'applicazione del principio delle 3R, il processo di autorizzazione dei progetti, la valutazione del rapporto danno/beneficio e la classificazione di gravità relativamente alle procedure cui saranno sottoposti gli animali oggetto di studio. Sono inoltre illustrati in dettaglio aspetti riguardanti: l'alimentazione, la cattura e il trasporto; le condizioni di stabulazione e la cura – ad esempio controllo della qualità dell'acqua (attraverso il monitoraggio della salinità, del pH, della presenza di metalli, dei livelli di O₂ e CO₂ e dell'accumulo di materiale organico azotato), esigenze di illuminazione e sensibilità alle vibrazioni/rumore – ivi comprese le caratteristiche principali delle vasche, l'alimentazione, la presenza di arricchimenti ambientali e sociali; la valutazione dello stato di salute e benessere (es. attraverso l'osservazione di cambiamenti specifici in parametri comportamentali e fisiologici come il peso e la frequenza respiratoria); strategie di prevenzione e trattamento delle patologie più comuni; anestesia, analgesia e metodi di eutanasia. Sezioni specifiche delle linee guida sono dedicate ai requisiti di formazione e alle competenze tecnico-scientifiche che dovrebbero possedere i ricercatori, i veterinari e gli stabularisti e ai potenziali rischi cui è esposto il personale che lavora con i cefalopodi. È molto probabile quindi che queste linee guida avranno un forte impatto sulla comunità scientifica interessata all'utilizzo dei cefalopodi nella ricerca, non solo perché in grado di assistere il ricercatore nel processo di autorizzazione del progetto ma anche perché il personale direttamente incaricato di monitorare la salute psico-fisica dei cefalopodi, come veterinari e tecnici, può ora far riferimento a questo documento. Fino a oggi invece il personale addetto poteva contare solo su pochi corsi di medicina acquatica, non esclusivamente improntati alla salute degli invertebrati, e su pochi articoli scientifici specifici su questo argomento. È inoltre importante sottolineare come queste linee guida potrebbero avere implicazioni di rilievo anche per gli enti finanziatori (di progetti scientifici) e per i gruppi editoriali afferenti a riviste scientifiche (14). Ad esempio, gli enti finanziatori potrebbero valutare l'opportunità di sovvenzionare progetti che riguardano l'utilizzo dei cefalopodi basandosi sulle linee guida per assicurarsi della conformità delle procedure alla Direttiva europea e alla relativa normativa nazionale. Anche gli editori e i revisori di riviste scientifiche internazionali potrebbero riferirsi a questo documento per la pubblicazione di lavori che rispettino le norme in materia di benessere e cura dei cefalopodi, nonché delle linee guida ARRIVE (*Animal Research: Reporting of in vivo Experiments*) che hanno lo scopo di migliorare il resoconto dell'utilizzo degli animali nella ricerca scientifica massimizzando le informazioni pubblicate, così evitando la possibilità di duplicazione di studi.

Conclusioni

Gli invertebrati vengono ampiamente utilizzati come animali modello nella ricerca scientifica. Molti di essi hanno cicli vitali brevi, un genoma ampiamente caratterizzato e facilmente modificabile, altri possiedono caratteristiche anatomiche e fisiologiche ben definite.

Tutte queste caratteristiche li rendono incredibilmente adatti alla ricerca di base eppure il loro benessere è stato trascurato rispetto a quello dei vertebrati. Tale aspetto si evince dalla quasi totale assenza di normative che regolamentano la ricerca con gli invertebrati – con l'unica eccezione costituita dai cefalopodi nell'UE – e trova ragione nell'idea che questi animali non provino dolore, non percepiscano lo stress e manchino di funzioni cognitive di ordine superiore. Recenti ricerche tuttavia suggeriscono che gli invertebrati possono essere in grado di provare dolore e percepire lo stress; inoltre, alcune specie mostrano capacità cognitive paragonabili a quelle dei vertebrati. Un ulteriore ostacolo a leggi che tutelano il benessere degli invertebrati è sicuramente costituito dall'impatto che questi animali hanno sull'opinione pubblica che li considera perlopiù come parassiti privi di qualsiasi caratteristica individuale (es. personalità) oppure meramente come fonti di cibo (es. crostacei e cefalopodi). Recenti evidenze mostrano invece chiaramente come alcune specie di invertebrati possiedano personalità individuali paragonabili a quelle che si riscontrano nei vertebrati. Per esempio Carere *et al.* hanno recentemente caratterizzato i profili di personalità in maschi adulti di seppia (*Sepia officinalis*) riscontrando ampie differenze individuali relative a livelli di attività/reattività in risposta a stimoli potenzialmente minacciosi (15).

Un crescente numero di studi suggerisce che alcuni, se non tutti, gli invertebrati hanno il potenziale per soffrire a seguito di pratiche che non considerano la loro capacità di provare qualcosa di simile al dolore e/o allo stress. Inoltre, è importante notare che molti invertebrati mostrano capacità cognitive avanzate e per molti inaspettate. L'interesse per aspetti cognitivi degli invertebrati (es. i sistemi di riconoscimento sociale) ha iniziato ad aumentare negli ultimi anni (16). Molti ricercatori, che lavorano con invertebrati, e che hanno familiarità con essi, sanno – per esperienza – che è possibile riconoscere sofferenza e dolore in questi animali attraverso specifici cambiamenti in parametri comportamentali e fisiologici. Queste osservazioni dovrebbero essere alla base di specifici protocolli e linee guida per valutare e classificare la gravità delle procedure sugli invertebrati così come è stato già fatto per i cefalopodi (linee guida). A questo proposito è importante sottolineare che l'utilizzo di indici comportamentali per valutare il grado di sofferenza degli animali utilizzati nelle procedure sperimentali non implica il riferimento al solo criterio di senienza che è ancora di difficile valutazione.

La Direttiva europea prevede la possibilità di una revisione della direttiva stessa, tenendo conto del progresso scientifico. I progressi tecnici e scientifici nella ricerca biomedica possono essere tanto rapidi quanto l'aumento delle conoscenze sui fattori che influenzano il benessere animale. Inoltre l'attenzione dell'opinione pubblica a temi legati all'etica della sperimentazione animale è cresciuta esponenzialmente negli ultimi anni; le istanze legate al benessere e ai diritti degli animali da utilizzarsi a fini scientifici sono così state prese in considerazione nella fase di revisione della vecchia normativa che ha portato alla attuale Direttiva 2010/63/UE. Non è da escludere quindi che anche il benessere di altri invertebrati potrà essere tutelato in futuro.

Ringraziamenti

Si ringrazia la Dott.ssa Marta Borgi per una approfondita lettura critica.

Bibliografia

1. Europa. Direttiva 2010/63/UE del Parlamento e del Consiglio Europeo del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 276 del 20/10/2010.

2. Smith J, Andrews PLR, Hawkins P, Louhimies S, Ponte G, Dickel L. Cephalopod research and EU Directive 2010/63/EU: Requirements, impacts and ethical review. *J Exp Mar Biol Ecol* 2013;447:31-45.
3. Horvath K, Angeletti D, Nascetti G, Carere C. Invertebrate welfare: an overlooked issue. *Ann Ist Super Sanità* 2013;49:9-17.
4. Mather JA, Anderson RC. Ethics and Invertebrates: a cephalopod perspective. *Dis Aquat Organ* 2007;75:119-29.
5. Moltshaniwskyj N, Hall K, Marian J, Nishiguchi M, Sakai M, Shulman D, Sinclair B, Sinn D, Staudinger M, Van Gelderen R, Villanueva R, Warnke K. Ethical and welfare considerations when using cephalopods as experimental animals. *Rev Fish Biol Fisher* 2007;17:455-76.
6. Broom DM. Cognitive ability and sentience: which aquatic animals should be protected? *Dis Aquat Organ* 2007;75:99-108.
7. Broom DM. Evolution of pain. *R Soc Med Int Congr Symp Ser* 2001;246:17-25.
8. Stefano GB, Cadet P, Zhu W, Rialas CM, Mantione K, Benz D, Fuentes R, Casares F, Fricchione GL, Fulop Z, Slingsby B. The blueprint for stress can be found in invertebrates. *Neuroendocrinol Lett* 2002;23:85-93.
9. Zullo L, Hochner B. A new perspective on the organization of an invertebrate brain. *Commun Integr Biol* 2011;4:426-9.
10. Kroger B, Vinther J, Fuchs D. Cephalopod origin and evolution: A congruent picture emerging from fossils, development and molecules. *Bioassays* 2011;33:602-13.
11. Albertin CB, Simakov O, Mitros T, Yan Wang Z, Pungor JR, Edsinger-Gonzales E, Brenner S, Ragsdale CV, Rokhsar DS. The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties. *Nature* 2015;524:220-4.
12. Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*. Wheathampstead, (England): University Federation for Animal Welfare; 1959 (Reprinted in 1992).
13. Fiorito G, Affuso A, Basil J, Cole L, 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, Andrews PLR. Guidelines for the care and welfare of cephalopods in research. A consensus based on an initiative by CephRes, FELASA and the Boyd Group. *Lab Anim* 2015;49:1-90.
14. Fiorito G, Affuso A, Anderson DB, Basil J, Bonnaud L, Botta G, Cole A, D'Angelo L, De Girolamo P, Dennison N, Dickel L, Di Cosmo A, Di Cristo C, Gestal C, Fonseca R, Grasso F, Kristiansen T, Kuba M, Maffucci F, Manciooco A, Mark FC, Melillo D, Osorio D, Palumbo A, Perkins K, Ponte G, Raspa M, Shashar N, Smith J, Smith D, Sykes A, Villanueva R, Tublitz N, Zullo L, Andrews P. Cephalopods in neuroscience: regulations, research and the 3Rs. *Invert Neurosci* 2014;14:13-36.
15. Carere C, Grignani G, Bonanni R, Della Gala M, Carlini A, Angeletti D, Cimmaruta R, Nascetti G, Mather JA. Consistent individual differences in the behavioural responsiveness of adult male cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Appl Anim Behav Sci* 2015;167:89-95.
16. Gherardi F, Aquiloni L, Tricarico E. Revisiting social recognition systems in invertebrates. *Anim Cogn* 2012;15:745-62.

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 affidamento 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'affidamento 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 nociva (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 consoni 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.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di ottobre 2017*

*Stampato in proprio
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, ottobre 2017