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-animale 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 buon senso 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.