

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.