

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**Sperimentazione animale  
secondo il Decreto legislativo n. 116/1992:  
stato di applicazione e opinioni a confronto**

A cura di  
Augusto Vitale e Giovanni Laviola  
*Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e di Sistema*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**

**01/23**

Istituto Superiore di Sanità

**Sperimentazione animale secondo il Decreto legislativo n. 116/1992: stato di applicazione e opinioni a confronto.**

A cura di Augusto Vitale e Giovanni Laviola

2001, 85 p. Rapporti ISTISAN 01/23

Lo scopo di questa iniziativa è quello di fornire agli operatori del Servizio Sanitario Nazionale un supporto operativo, in termini di informazione e aggiornamento, nel contesto del Decreto legislativo n. 116/1992 relativo alla sperimentazione animale. In particolare, dedicando comunque spazio agli aspetti normativi e applicativi di tale decreto, si è cercato di affrontare anche differenti tematiche relative all'ottimizzazione dei modelli sperimentali animali. Altri interventi sono dedicati all'etica della ricerca e alle problematiche che le nuove biotecnologie rappresentano per l'applicazione della normativa sulla sperimentazione animale. Questo rapporto intende offrire al personale del Servizio Sanitario Nazionale gli strumenti necessari per operare sia nel rispetto dei criteri di benessere animale che della qualità del dato sperimentale.

*Parole chiave:* Etica scientifica, Legislazione, Sperimentazione animale, Biotecnologie

Istituto Superiore di Sanità

**Animal experimentation under the Italian Legislative decree n. 116/1992: state of application and debate.**

Edited by Augusto Vitale and Giovanni Laviola

2001, 85 p. Rapporti ISTISAN 01/23 (in Italian)

The aim of this initiative is to offer to the members of the Italian national health service an operational support, in terms of information and up-dating, within the context of the legislative decree n. 116/1992 on animal experimentation. In particular, taking into account the practical aspects of such regulation, different topics in relation to the optimisation of the animal model are dealt with. Furthermore, other contributions are dedicated to ethics of research and challenges that the new bio-technologies represent for the application of the decree on animal experimentation. This report aims to offer to the personnel of the Italian national health service the necessary tools to operate with respect to both the animal welfare and the quality of experimental data.

*Key words:* Animal experimentation, Ethical issues, Regulations, Biotechnologies

Si ringrazia Estella Sansonetti del Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e di Sistema per la collaborazione alla realizzazione di questo rapporto.

Parte delle attività descritte in questo rapporto sono state finanziate dal Progetto di ricerca corrente:

*Approcci biostatistici ed etologici per la tutela del benessere psico-fisico degli animali da laboratorio e della qualità del dato sperimentale* (Responsabile: Maria Puopolo)

(1% del Fondo Sanitario Nazionale, anno finanziario 2000)

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it/pubblicazioni](http://www.iss.it/pubblicazioni).

# INDICE

Introduzione .....	1
<b>ASPETTI NORMATIVI E APPLICATIVI.....</b>	<b>3</b>
<b>Il Decreto legislativo n. 116/1992 e il ruolo del Ministero della Sanità     e dell'Istituto Superiore di Sanità</b>	
<i>Emanuela D'Amore</i> .....	5
<b>La legge sta funzionando?</b>	
<i>Gianluca Felicetti</i> .....	10
<b>ETICA DELLA RICERCA.....</b>	<b>13</b>
<b>Il cubo di Bateson</b>	
<i>Augusto Vitale, Armelle Queyras</i> .....	15
<b>La tutela degli animali non umani e la sperimentazione:     brevi riflessioni su alcune strategie etiche</b>	
<i>Laura Canavacci</i> .....	20
<b>OTTIMIZZAZIONE DEI MODELLI DI SPERIMENTAZIONE ANIMALE.....</b>	<b>27</b>
<b>Benessere animale: spunti di riflessione per la promozione della salute nell'uomo</b>	
<i>Paolo Di Lena, Monica Rea, Giovanni Laviola</i> .....	29
<b>Uso dei primati nella ricerca fisiologica alla luce     del Decreto legislativo n. 116/1992</b>	
<i>Paolo Battaglini</i> .....	41
<b>Problemi metodologici legati alla valutazione del dolore     nell'animale da esperimento</b>	
<i>Francesca Cirulli, Enrico Alleva, Sara Capogrossi Colognesi</i> .....	47
<b>PROBLEMATICHE LEGATE ALLE METODICHE ALTERNATIVE E ALLE BIOTECNOLOGIE.....</b>	<b>55</b>
<b>L'animale da laboratorio e le biotecnologie in Europa:     differenze normative nei Paesi membri dell'Unione Europea</b>	
<i>Gianluca Panzini, Rodolfo Lorenzini</i> .....	57
<b>Considerazioni bioetiche sull'uso di ceppi transgenici di topo     nella ricerca biomedica</b>	
<i>Igor Branchi, Daniela Santucci, Enrico Alleva</i> .....	64
<b>Finalità e limiti dello sviluppo delle metodiche alternative     in campo europeo ed internazionale</b>	
<i>Annalaura Stammati, Flavia Zucco</i> .....	70



## INTRODUZIONE

Nell'ambito delle iniziative di formazione rivolte a una parte consistente della comunità scientifica e biomedica italiana, sia nell'ambito che a favore del Servizio Sanitario nazionale, una importante iniziativa è costituita da questo rapporto che riunisce una serie di contributi offerti da esperti dal settore, che operano sia in campo istituzionale che in quello della tutela e protezione delle specie animali.

Un primo intervento fornisce un quadro degli aspetti più strettamente normativi e legislativi in campo nazionale con le istituzioni più direttamente coinvolte (E. D'Amore) mentre il successivo rappresenta la posizione, mediante un'analisi critica dello stato di applicazione del DL.vo n. 116/1992, di una influente associazione che rappresenta la "coscienza critica" sui temi della sperimentazione animale (G. Felicetti).

Non poteva mancare una parte dedicata all'etica della ricerca biomedica. A questo proposito vengono descritte le elaborazioni metodologiche originariamente formulate in campo etologico (A. Vitale, A. Queyras), e una serie di argomenti di stampo filosofico e applicativi sul tema degli obblighi morali sulla linea di confine tra le specie (L. Canavacci).

Una parte consistente è mirata a individuare criteri di ottimizzazione nell'utilizzo dei diversi modelli sperimentali. Per quanto riguarda il benessere animale vengono forniti spunti di riflessione per la promozione della salute nell'uomo (P. Di Lena, G. Laviola). Più specificatamente, l'intervento successivo fornisce una equilibrata rassegna sullo "stato dell'arte" dell'impiego dei primati non umani in studi di fisiologia (P. Battaglini). In tema di ottimizzazione è essenziale che vengano riportati gli sforzi mirati a affinare le metodiche di valutazione del grado di dolore e stress nell'animale sperimentale (F. Cirulli).

Concludono questa monografia un *excursus* sulle problematiche delle biotecnologie e le differenze normative nei paesi membri dell'Unione europea (L. Panzini, R. Lorenzini), sulle problematiche derivanti dall'utilizzo di animali geneticamente modificati nella ricerca biomedica (I. Branchi *et al.*), e sulle finalità e limiti connessi allo sviluppo di metodiche alternative in campo europeo e internazionale (L. Stammati, F. Zucco).

Questo rapporto rappresenta, da una parte un'occasione per acquisire il know-how necessario a un corretto approccio alla sperimentazione biomedica, e dall'altra un importante stimolo alla discussione su questi temi.



**Aspetti normativi e applicativi**





# **IL DECRETO LEGISLATIVO N. 116/1992 E IL RUOLO DEL MINISTERO DELLA SANITÀ E DELL'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

Emanuela D'Amore

*Servizio Qualità e Sicurezza della Sperimentazione Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Il Decreto legislativo n. 116 del 27 gennaio 1992, applicativo del Decreto 86/609/CEE ha rappresentato un elemento di forte innovazione nel panorama legislativo in materia di protezione animale, modificando sostanzialmente l'approccio all'utilizzo degli animali nel campo della ricerca scientifica. Dal 1941, anno di promulgazione della Legge n. 615 sulla vivisezione degli animali vertebrati a sangue caldo, agli anni '80 una maggiore sensibilità nei confronti degli animali, una analisi del ruolo che la sperimentazione animale gioca nel progresso delle scienze mediche e le posizioni assunte dalle diverse associazioni protezionistiche e scientifiche hanno sollevato dubbi e dato origine ad un ampio dibattito il più delle volte sterili e sull'accettabilità dal punto etico e scientifico dell'utilizzo degli animali nella ricerca biomedica. Da qui è scaturita la necessità di una nuova legge che regolasse tale materia.

Il Decreto CEE, da cui prende spunto il DL.vo n. 116/1992 sulla sperimentazione animale, ha le sue radici nella Convenzione di Strasburgo sulla protezione degli animali negli allevamenti, adottata nel 1976 dai 26 Paesi del Consiglio d'Europa e ratificata nel nostro Paese con la Legge n. 623 del 14 ottobre 1985.

La Convenzione, che non aveva potere legislativo, stabiliva per lo più la necessità di riconoscere agli animali i loro diritti e riconosceva agli animali da laboratorio il loro valore intrinseco e quindi la necessità di tutelarne il benessere, anche nel corso della sperimentazione.

Il Decreto CEE 86/609 e il conseguente decreto italiano hanno quindi riempito un vuoto legislativo che in Italia persisteva da decenni. Tra i vari elementi innovativi, apportati dal DL.vo n. 116/1992, una serie di figure professionali con compiti e responsabilità diverse nel campo della sperimentazione. Tali figure professionali sono: il Responsabile del Protocollo Sperimentale; il Responsabile dello Stabilimento; il Veterinario Responsabile del Benessere Animale; il Ministero della Sanità; l'Istituto Superiore di Sanità.

Una delle principali innovazioni che il DL.vo n. 116/1992 ha apportato, e che contemporaneamente ha determinato maggiori difficoltà di adattamento da parte dei ricercatori, è rappresentato dal concetto di autocontrollo per cui il Responsabile del progetto di Ricerca sotto la propria responsabilità è tenuto ad effettuare dichiarazioni che sono vincolanti per l'esecuzione della sperimentazione. In particolare, il ricercatore deve autonomamente prevedere il minor numero possibile di animali da utilizzare, quelli a più basso sviluppo neurologico e soprattutto dichiarare il grado di sofferenza che verrà esercitato sugli animali; inoltre il ricercatore deve dichiarare per se stesso e per lo staff sperimentale che con lui collabora, di possedere formazione adeguata.

Sarà inoltre compito del Responsabile del Protocollo sperimentale, controllare la corretta esecuzione delle procedure previste e provvedere, in collaborazione con il medico veterinario, al mantenimento degli animali in un ambiente adeguato al loro benessere e che qualsiasi limitazione, alla possibilità di soddisfare i bisogni fisiologici e comportamentali sia ridotta al minimo. Un altro compito è effettuare una adeguata programmazione e preparazione del protocollo sperimentale e quindi la redazione e sottoscrizione della comunicazione o della richiesta di autorizzazione a secondo del tipo di sperimentazione o di specie animale che s'intende utilizzare.

La richiesta di autorizzazione in deroga agli artt. 8 e 9 del DL.vo n. 116/1992 è prevista per qualsiasi tipo di ricerca che preveda:

- sperimentazioni su animali senza l'uso dell'anestesia, in deroga all'obbligo di cui all'art. 3;
- sperimentazioni su primati non umani, su cani e gatti, in deroga al divieto di cui all'art. 3;
- sperimentazioni su animali in via di estinzione, in deroga al divieto di cui all'art. 3;
- sperimentazioni a scopo didattico, in deroga all'art. 3;
- sperimentazioni che comportino gravi lesioni o forti dolori che potrebbero protrarsi dopo l'esperimento;
- sperimentazioni che non siano relative a ordinarie prove di qualità, efficacia ed innocuità, ivi incluse le prove previste dalla Farmacopea Ufficiale nonché da linee guida o norme nazionali ed internazionali.

Per qualsiasi altro esperimento in cui si utilizzino animali è invece previsto l'invio al Ministero, di una comunicazione, adeguatamente redatta con la durata del progetto, la specie animale ed il numero degli animali, il nome del responsabile e la sede autorizzata dove si intendono effettuare gli esperimenti. L'invio della comunicazione abilita all'attività sperimentale senza alcuna comunicazione da parte del Ministero.

Per le autorizzazioni in deroga agli artt. 8 e 9 è invece necessaria l'emanazione di un decreto del Ministero della Sanità, sentito il parere dell'Istituto Superiore di Sanità. Inoltre gli esperimenti a scopo didattico sono ammessi solo in caso di necessità inderogabili e quando risulti impossibile ricorrere ad altri sistemi dimostrativi. Attualmente sono disponibili validi sistemi alternativi all'utilizzo di animali, a scopo didattico, come l'uso di scarto dei mattatoi, l'uso dei sistemi *in vitro*, la modellistica computerizzata, i sistemi audiovisivi interattivi e le simulazioni computerizzate che sostituiscono adeguatamente i modelli animali.

E' inoltre compito del Responsabile del protocollo, istruire o provvedere che venga istruito in maniera adeguata il personale dello staff sperimentale che opera sugli animali. A questo proposito, il Decreto legislativo è piuttosto carente in quanto all'art. comma 6 si cita: "le persone che effettuano esperimenti o quelle che si occupano direttamente o con compiti di controllo di animali utilizzati in esperimenti devono avere un'istruzione ed una formazione adeguata", senza però dare alcuna specifica indicazione in merito e trasferendo al Ministero con decreto successivo, da emanarsi entro un anno dall'entrata in vigore del Decreto legislativo n. i requisiti necessari ai fini di cui agli artt. 6 e 7.

La circolare n. 8 del 22 aprile 1994, esplicativa del DL.vo n. 116/1992, fornisce inoltre il profilo del Responsabile dello Stabilimento ove si svolge la sperimentazione; allo stesso compete di:

- promuovere e curare l'aggiornamento e la formazione del personale che opera nello stabulario;
- provvedere affinché siano rispettate e salvaguardate le condizioni igieniche e la salute degli animali e del personale che lavora a contatto con essi;
- vigilare sul corretto utilizzo e la corretta gestione degli animali stabulati, in collaborazione con il medico veterinario;
- curare la corretta compilazione dei registri.

Il DL.vo n. 116/1992 ha quindi delineato nel Medico Veterinario la figura deputata al controllo delle condizioni di salute degli animali e all'assistenza sanitaria, con una scelta più restrittiva rispetto alla Direttiva CEE 86/609 dove la supervisione del benessere animale è affidata ad un veterinario o altra persona competente.

I compiti fondamentali del Veterinario sono controllare il benessere e le condizioni di salute degli animali prima, durante ed al termine delle procedure sperimentali, allo scopo di evitare danni durevoli, dolori ed inutili sofferenze, fornire la propria assistenza veterinaria, eseguendo regolari ispezioni sugli animali in sperimentazione, controllare la buona esecuzione delle procedure di esperimento, al termine delle quali dovrà stabilire se l'animale debba essere mantenuto in vita o soppresso.

Inoltre compito fondamentale del Medico Veterinario è quello di provvedere, in collaborazione con il responsabile della sperimentazione, all'elaborazione del protocollo sperimentale, più adatto allo scopo che ci si prefigge, senza infliggere inutili sofferenze, sulla base delle conoscenze anatomiche, fisiologiche e patologiche degli animali e quindi ad un controllo e ad una verifica delle stesse. E' necessario aprire una parentesi in quanto la legge ha determinato molti problemi all'adempimento del ruolo del veterinario, sia per una preparazione universitaria inadeguata o insufficiente, sia per la scarsa intermediazione con i ricercatori che abituati fino a quel momento ad una totale libertà d'azione, si sono trovati limitati nella loro attività. Il compito del veterinario è quello di fare da mediatore tra le esigenze specifiche del ricercatore e la necessità di tutelare per quanto possibile il benessere degli animali nel rispetto della normativa.

Un altro elemento fortemente innovativo del DL.vo n. 116/1992 è l'introduzione del concetto dei cosiddetti "metodi alternativi". Il Decreto prevede nell'art. 4 l'utilizzo di metodi alternativi all'uso degli animali e sancisce in modo preciso che: "gli animali possono essere utilizzati solamente quando non sia possibile ricorrere ad altro metodo scientificamente valido, ragionevolmente e praticamente applicabile, che non implichi l'impiego di animali". La definizione di alternativo prende origine dalle 3R (*Replace, Reduce, Refine*) di Russell e Burch e si intende qualunque metodo che sostituisca o riduca il numero di animali necessario per eseguire un determinato studio o che ne riduca la sofferenza. E' ovvio che questi obiettivi non sono raggiungibili con rapidità né con facilità ed è anche probabile che la totale eliminazione degli animali in sperimentazione non sia attuabile, ma certamente la riduzione del loro uso e l'adozione di tutte le misure necessarie ad assicurare il loro benessere prima dell'esperimento e a ridurre al massimo la sofferenza sono facilmente realizzabili ed auspicabili.

A livello europeo, allo scopo di coordinare la validazione dei metodi alternativi, è stato istituito lo European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) che ha il compito di promuovere gli studi sui metodi alternativi, di organizzare prove crociate, di valutare ed analizzare i risultati e di promuovere il dialogo scientifico tra le industrie, i ricercatori, i legislatori, i gruppi animalisti.

Nonostante ciò, l'uso dei metodi alternativi ha ancora un effetto limitato in quanto essi possono, solo in parte, sostituire la completezza di un organismo e allo stato attuale esistono pochi metodi alternativi che possono sostituire totalmente un esperimento sugli animali.

Un ruolo fondamentale nell'ambito del decreto è svolto dal Ministero della Sanità che esercita attività di controllo e di vigilanza. Uno dei compiti fondamentali del Ministero dovrebbe essere di controllo sulle attività di ricerca mediante l'analisi delle attività sperimentali sia in comunicazione che in autorizzazione. In particolare per le attività effettuate in comunicazione, tale azione di controllo si dovrebbe espletare anche attraverso una azione convergente delle diverse strutture interessate per le specifiche competenze (art. 2, punto e). Inoltre il Ministero, come destinatario principale della comunicazione ove ne ravvisi la necessità, può chiedere ulteriori chiarimenti o impartire specifici indirizzi e prescrizioni come cita la circolare n. 8; ma all'atto pratico, questo non si verifica in quanto considerando che i tempi tecnici di invio, ricevimento ed esame del protocollo sono piuttosto lunghi, il più delle volte il ricercatore, abilitato per legge ad iniziare le procedure nel momento stesso in cui invia la comunicazione, potrebbe aver già terminato la sperimentazione stessa.

Inoltre l'attività di controllo del Ministero, da una analisi accurata della Legge e successive circolari esplicative, si esplica anche sugli stabilimenti utilizzatori (art. 6 della Legge 833/78 e artt. 7, 8, 9, 12 del DL.vo n. 116/1992) previo parere igienico-sanitario rilasciato dalla ASL. competente territorialmente (art. 12) mentre gli stabilimenti di allevamento o di fornitura devono essere autorizzati dai Comuni. Tale attività di controllo si esplica anche attraverso la vidimazione dei registri dove devono essere annotati gli animali utilizzati e dove deve essere possibile seguire il destino di ogni singolo animale utilizzato o di ogni singolo lotto.

Il Ministero svolge anche attività di raccolta ed elaborazione dei dati relativi all'utilizzazione di animali ai fini sperimentali in ordine alle specifiche competenze attribuitegli dal DL.vo n. 116/1992. Tale attività indispensabile per l'attività di controllo è codificata dall'art. 15 del decreto laddove è previsto che il Ministero raccolga e pubblichi sulla Gazzetta Ufficiale, con cadenza triennale, i dati relativi all'utilizzo degli animali contenuti nelle richieste di autorizzazione, nelle comunicazioni ricevute nonché nelle relazioni presentate dagli stabilimenti utilizzatori autorizzati. Tale raccolta di dati soddisfa anche l'esigenza di informare la Commissione Europea. Per organizzare la raccolta dei dati, la stessa Commissione Europea con il contributo di tutti gli Stati membri ha elaborato una serie di tabelle da utilizzare per la trasmissione dei dati da parte degli stabilimenti utilizzatori. A livello comunitario lo studio per il miglioramento di tali tabelle viene effettuato in seno all'apposito Comitato *ad hoc* per la raccolta dei dati statistici, formato da rappresentanti di tutti i Paesi membri che si riunisce presso la sede di ECVAM.

A questi compiti di vigilanza e controllo si aggiunge quanto indicato negli artt. 16, 17 e 18. In particolare, nell'art. 17, comma 2, già citato in precedenza, il Ministero della Sanità avrebbe dovuto sancire con proprio decreto i requisiti richiesti per il personale che opera con animali da laboratorio (art. 4, comma 6 e 7) e a tutt'oggi questo non è stato effettuato, nonostante ci siano state sollecitazioni in questo senso, da diverse strutture impegnate nel campo della sperimentazione.

Più sotterraneo, perché citato direttamente solo negli artt.16 e18, ma non per questo, meno importante, il ruolo dell'Istituto Superiore di Sanità, organo tecnico-scientifico del Ministero mediante il Servizio Qualità e Sicurezza della Sperimentazione Animale, istituito da decreto del Ministero della Sanità nel 1992, che gestisce molte delle problematiche connesse alla sperimentazione nella triplice veste:

- di istituzione tecnico scientifica nazionale che si configura tra le più grandi per concentrazione di ricercatori e numero di animali utilizzati;
- autorità consultiva e regolatoria per ciò che concerne la valutazione di protocolli sperimentali che necessitano di autorizzazione in deroga;
- autorità competente per ciò che riguarda le problematiche connesse con la sperimentazione ed in particolare i metodi alternativi.

L'attività consultiva e regolatoria è l'attività che ha impegnato ed impegna notevolmente l'Istituto che in questo settore ha dimostrato di svolgere una attività di analisi e di studio dei protocolli, (oltre 800 protocolli sperimentali provenienti da tutta l'industria farmaceutica e dalle principali strutture di ricerca nazionale) di elevato impegno tecnico-scientifico.

A questo si aggiunge un contributo, non solo nel settore prettamente applicativo, ma di partecipazione a dibattiti etico-scientifici, l'adozione di metodi alternativi, non ultimi argomenti di più scottante attualità quali la clonazione e/o gli xenotrapianti. A questo dobbiamo infine aggiungere l'attività di formazione che è una delle principali attività istituzionali dell'Istituto.

Nonostante gli elementi innovativi che la normativa ha apportato nel campo della sperimentazione, a circa otto anni dall'entrata in vigore del decreto, si sono però già evidenziati

segni di invecchiamento e la necessità di modifiche che hanno portato ad una richiesta di revisione. In particolare è stata evidenziata la necessità di linee guida per valutare le diverse procedure attuate sugli animali in base al grado di dolore inferto all'animale, indicazioni precise sui criteri per la formazione del personale.

### **Riferimenti normativi**

Comunità Europea. Direttiva del Consiglio delle Comunità Europee, 24 novembre 1986 n. 609. *Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea* N.L. 358/1, 18 dicembre 1986.

Italia. Circolare del Ministero della Sanità 22 aprile 1992, n. 8. *Gazzetta Ufficiale - Serie generale* n. 163, 14 luglio 1994.

Italia. Decreto Legislativo 27 gennaio 1992, n. 116. *Supplemento Ordinario - Gazzetta Ufficiale* n. 40, 18 febbraio 1992.

Italia. Legge 1 maggio 1941, n. 615. *Gazzetta Ufficiale* n. 163, 12 luglio 1941.

## LA LEGGE STA FUNZIONANDO?

Gianluca Felicetti

*Lega Anti Vivisezione (LAV)* \*

Conoscete il nostro fine, l'abolizione della sperimentazione animale, pratica che consideriamo antiscientifica ed immorale, un errore metodologico.

Dal varo del DL.vo n. 116 del 1992 abbiamo però rappresentato in ogni sede, compresa quella giudiziaria, la "coscienza critica" di una legge di regolamentazione che è in gran parte fallita o, meglio, è stata fatta fallire per volontà ed inadeguatezza dal Ministero della Sanità.

Nessuno svolge il compito-cardine della normativa, quello previsto dalla prima parte dell'art. 4, di vaglio delle sperimentazioni in regime di comunicazione in base all'art. 7 della legge; vengono ignorati gli artt. 16 e 18 che permetterebbero al Ministro della Sanità di applicare concretamente il principio delle *3R (Replace, Reduce, Refine)* di cui troppi continuano solo a parlare da quarant'anni; si decide invece, senza alcun atto formale, che l'uso degli animali transgenici è possibile senza autorizzazione e deroga; si nega addirittura l'accesso all'elenco degli stabilimenti utilizzatori autorizzati, perdendo poi contro un nostro ricorso al TAR; non si è ancora emanato il dovuto decreto previsto (entro il 1993!) dal comma 2 dell'art. 17 in applicazione del comma 6 dell'art. 4 che stabilisca "il livello di istruzione e formazione adeguata" per gli sperimentatori; si garantisce l'impunità ai non laureati nelle discipline abilitanti per la legge e per il decreto ministeriale 29 settembre 1995 ad operare; si diffondono statistiche che, contro la realtà, forniscono un dato globale in aumento del ricorso agli animali, non riuscendo nemmeno a trasmettere gli stessi dati, per lo stesso anno, alla *Gazzetta Ufficiale* in Italia ed alla Commissione Europea a Bruxelles!

Questo è un caso esemplare: con oltre due anni e mezzo di ritardo su quanto previsto dall'art. 26 della direttiva 86/609/CEE, la Commissione Europea ha infatti presentato al Consiglio ed al Parlamento Europeo, alla fine del 1999, la *Seconda Relazione sulle statistiche riguardanti il numero di animali utilizzati per la sperimentazione e altre fini scientifici negli Stati membri dell'Unione Europea*. I dati inoltrati risultano difforni dagli stessi, dello stesso anno in esame, il 1996, pubblicati sulla *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* il 12 settembre 1998. In particolare, i dati diffusi dalla Commissione di Bruxelles risultano superiori di 28.925 porcellini d'India, 18 anfibi ed un pesce; inferiori di 6.000 conigli e 4 scimmie del Vecchio Mondo (cercopitecidi). Per un totale di 22.937 animali denunciati in più alla Commissione per lo stesso anno (1.094.185 contro 1.071.248)!

Analoga circostanza si era verificata con la Prima Relazione della Commissione Europea laddove per l'anno 1992 i dati pubblicati per l'Italia erano superiori di 84.772 animali rispetto allo stesso anno denunciato sulla *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* del 21 agosto 1995. E' evidente che non siamo di fronte solo ad un errore di trascrizione e che ciò si ripete colpevolmente.

Ad otto anni dall'entrata in vigore del decreto legislativo, a quasi quattordici dalla pubblicazione della Direttiva Europea originaria, a trent'anni dall'inizio del lavoro del Consiglio d'Europa che ha originato la nuova legislazione, dobbiamo ancora ascoltare operatori del settore che giudicano "improvvisate" le "nuove" regole, che giudicano "coercitiva" la presentazione di una documentazione del proprio lavoro inferiore in volume a quella necessaria per l'apertura di

---

\* La LAV fa parte della ECEAE-European Coalition to End Animal Experiments ed è osservatore dell'Eurogroup for Animal Welfare

un chiosco di bibite, che arrivano a negare una definizione di dolore o sofferenza per gli animali rappresentando quindi la parte più retriva e chiusa della ricerca, che continuano a definire “complementari” i metodi sostitutivi o alternativi che dir si voglia; metodi che non possono essere costretti, per entrare nel “salotto buono” della scienza, a fornire gli stessi risultati del ricorso agli animali, un principio di equivalenza, imposto su carta a priori, che è la negazione stessa della vera ricerca scientifica.

La vicenda del continuo rinvio del bando dei test cosmetici sugli animali previsto dalla Direttiva 93/35/CE, settore da troppi considerato futile, è l’esempio più chiaro di quali effettive volontà politiche e commerciali si scontrino su un terreno, concreto, di possibile cambiamento.

In Italia invece è rimasto lettera morta anche l’Ordine del Giorno della Camera dei Deputati accolto dal Governo il 20 novembre 1998 che lo impegnava “a finanziare per ogni progetto di ricerca scientifica con uso di animali una quota parte percentuale d’utilizzo di test alternativi pari ad almeno il 33 per cento del totale a ricercatori che perseguano gli stesso obiettivi sperimentali”: basterebbe scorrere gli stanziamenti del Ministero dell’Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica (MURST) per i programmi “di rilevante interesse nazionale” per capire la portata di un simile atto.

Un’altra occasione di crescita, la legge 413 del 1993 che riconosce l’obiezione di coscienza, è stata tenuta ben nascosta senza alcuna comunicazione agli Atenei ed agli studenti, i finanziamenti ai corsi di studio alternativi (utili, evidentemente, anche ai non obiettori) sono stati solo parzialmente impiegati e solamente, chissà perché, nelle facoltà di Medicina Veterinaria. Il conflitto con le norme sulla sperimentazione didattica è stato poi “risolto” incrementando l’uso di animali morti, uccisi appositamente.

Discutere del DL.vo n. 116/1992, insomma, può risultare insufficiente se, contemporaneamente, non si agisce sulle normative che non solo permettono ma, anzi, fanno aumentare il numero degli esperimenti su animali, ad esempio l’attuazione della direttiva 98/8/CE relativa all’immissione sul mercato dei biocidi ovvero disinfettanti, insetticidi e detergenti antibatterici.

Certo è che il DL.vo n. 116/1992 ha fatto il suo tempo e la stessa Commissione Europea ha annunciato, nel gennaio 2000, una prossima revisione. Avere una legge chiara ed applicata, ottenere un servizio del Ministero della Sanità che sia davvero “campo neutro” di confronto, fornirebbe la certezza dovuta per chi opera e per chi contesta il merito della sperimentazione animale. Vorremmo iniziare a sentire pubblicamente chi, dal mondo della ricerca, è d’accordo e quali iniziative di modifica legislativa si propone. Così avremmo più tempo, tutti, per il confronto scientifico ed etico.

## Riferimenti bibliografici

Cagno S. *Gli animali e la ricerca*. Padova: Muzzio; 1997.

Comunità Europea. Direttiva 98/8/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 16 febbraio 1998, relativa all’immissione sul mercato dei biocidi. *Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea* L. 123, 24 aprile 1998.

Croce P. *Vivisection or science*. Londra: Zed Books; 1999.

Fano A. *Lethal laws*. Londra: Zed Books; 1997.

Italia. Decreto Legislativo 27 gennaio 1992, n. 116. Attuazione della direttiva n. 86/609/CEE in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. *Supplemento Ordinario - Gazzetta Ufficiale* n.40, 18 febbraio 1992.

Regan T. *I diritti animali*. Milano: Garzanti; 1990.





**Etica della ricerca**



# IL CUBO DI BATESON

Augusto Vitale, Armelle Queyras

*Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e di Sistema, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Una gran parte della ricerca che utilizza modelli animali si può descrivere come “invasiva”. Esempi di questo genere si possono trovare nel campo della neurofisiologia, o della virologia. Inoltre, spesso in questi casi gli animali vengono soppressi alla fine dell’esperimento. Si può intuire come in queste situazioni può nascere un conflitto di tipo etico, dove questo conflitto è caratterizzato da tensioni in opposte direzioni: da una parte la necessità di trovare cure efficaci per alleviare la sofferenza dei cittadini, dall’altra i diritti degli animali a non soffrire. Negli ultimi anni la coscienza dell’esistenza di tale conflitto si è estesa, generando un sempre più vasto interesse nel mondo scientifico e filosofico. Libri e pubblicazioni dedicate al tema delle implicazioni morali della sperimentazione biomedica si sono moltiplicate (si vedano, per esempio, Regan, 1990; van Zutphen *et al.*, 1996; Battaglia, 1998).

Il conflitto di interessi che si genera quando si affronta il tema della sperimentazione animale non può essere risolto mediante risposte semplicistiche a un tema così complesso: è inappropriato pensare che la risposta debba essere solamente “No” o “Sì”. Per ogni caso è necessario analizzare e soppesare l’intreccio fra necessità e interessi contrastanti, per arrivare a una decisione sulla liceità o meno di un particolare esperimento. Per fare ciò abbiamo bisogno di particolari strumenti valutativi. In questo nostro contributo illustreremo uno di questi strumenti, proposto nel 1986 da un illustre biologo del comportamento, Patrick Bateson dell’Università di Cambridge. Questo strumento ha assunto il nome di “Cubo di Bateson” (Bateson, 1986).

Il “Cubo di Bateson” propone una riflessione metodologica nel momento in cui ci si trova a dovere decidere se accettare o meno un particolare protocollo sperimentale, e si descrive secondo tre dimensioni: la qualità della ricerca; la sofferenza inflitta agli animali impiegati in quella particolare ricerca; la ricaduta applicativa di quella particolare ricerca. Quindi, la domanda alla quale il “Cubo di Bateson” cerca di rispondere è: “Quali sono le condizioni che permettono un esperimento?” e la risposta viene ricercata analizzando questi tre differenti aspetti.

Ci soffermeremo ora sui tre aspetti del “Cubo di Bateson” singolarmente. L’ordine di presentazione non rappresenta un ordine di importanza.

## La qualità della ricerca

Si potrebbe pensare che, specialmente per coloro i quali sono coinvolti in ricerca di base, la ricerca dell’informazione biologica per se è motivo sufficiente per giustificare l’attività di ricerca. Ma soddisfare la curiosità non è necessariamente equivalente alla ricerca per la comprensione di un fenomeno biologico. Chi scrive pensa sia importante mettere in risalto un aspetto che può essere un parametro valutativo della qualità di un certo progetto di ricerca: la capacità per quella data ricerca di generare risultati che contribuiscano a formulare principi generali, i quali siano utili a sviluppare ulteriori ipotesi biologiche da verificare mediante altri esperimenti. Questo modo di procedere nella ricerca scientifica è tacitamente applicato da tutti

quegli scienziati che intendono la loro attività come un continuo sforzo teso a rafforzare o, meglio ancora, a modificare teorie esistenti (Mayr, 1990).

Facciamo un esempio che riguarda il campo di interesse di chi scrive, cioè l'etologia dei primati. Mettiamo il caso che si sia interessati all'origine evolutiva della capacità dei bambini di usare determinate capacità cognitive per la risoluzione di un problema. Noi sappiamo che i primati non umani sono animali estremamente vicini a noi evolutivamente, lo scimpanzé per esempio condivide con noi più del 98% del patrimonio genetico. Questi animali sono quindi un modello efficace per cercare di capire quando e come noi esseri umani siamo diventati differenti in relazione alle nostre capacità intellettive. Si può quindi pensare a un disegno sperimentale che, comparativamente, prevede la presentazione di un problema a bambini e una specie di primate non-umano. Possiamo raccogliere informazioni sui modi e tempi di risoluzione di bambini e primati non umani della stessa età, e analizzare come questi si modificano con il crescere dell'età. A un certo punto i bambini diventeranno molto più efficaci dei loro coetanei. A questa fase corrisponderà una caratteristica cognitiva particolare sviluppata solo dal bambino come, per esempio, la capacità di capire una relazione causale insita nel problema proposto. La descrizione e analisi di questa caratteristica potrà aiutarci a formulare una serie di ipotesi sulle origini evolutive delle capacità cognitive della specie umana (Frye *et al.*, 1995; Visalberghi & Limongelli, 1996). In questo caso quindi il dato sperimentale si inserisce funzionalmente in un tema di ricerca in continuo progresso e mutamento, come lo è la ricerca sull'origine evolutiva delle nostre capacità cognitive: non è fine a se stesso, ma in grado di generare nuove domande e ipotesi di lavoro.

## La sofferenza animale

Un'altra dimensione del "cubo" di grande importanza è il grado di sofferenza inflitto ai soggetti sperimentali.

Una domanda di partenza è: "Gli animali soffrono, sia fisicamente che psicologicamente?" Vorremmo qui sottoscrivere un'affermazione del filosofo Lockwood, quando afferma che se noi assumiamo che gli animali possono provare paura e dolore, e ci comportiamo di conseguenza, se sbagliamo non causiamo sofferenza; però il contrario non è vero: infatti se assumiamo che gli animali non hanno la capacità di provare paura e dolore, e ci comportiamo di conseguenza, se sbagliamo abbiamo un'alta probabilità di indulgere in atti di crudeltà. Quindi, il suggerimento che qui vorremmo offrire è quello di dare agli animali il beneficio del dubbio.

Detto questo, ci si può chiedere come è possibile misurare la sofferenza animale. E' difficile immedesimarsi nelle sensazioni di un animale. Alcuni animali, per esempio, quando minacciati rimangono fermi e immobili: a noi non sembrano in uno stato di stress, anche perché gli esseri umani non sempre si comportano così. Alcune specie animali sono in grado di percepire odori, suoni, effetti del campo magnetico che noi non siamo in grado di percepire. In questi casi, un campo di studio come l'etologia può aiutarci. Lo studio del comportamento può migliorare le nostre conoscenze su come gli animali manifestano stati di malessere fisico e psicologico se sottoposti a determinate situazioni. Inoltre, la conoscenza del comportamento in natura di una particolare specie può dare indicazione su quale particolare situazione di cattività può essere particolarmente dannosa per un particolare individuo. Per esempio, noi sappiamo che i primati non umani hanno una vita sociale ricca e complicata (ovviamente la letteratura a questo proposito è molto vasta, ma per iniziare si possono consigliare: Smuts *et al.*, 1987; Dunbar, 1988). Sulla base di ciò è ovvio pensare che una scimmia tenuta in isolamento in un laboratorio di ricerca, lontana dai propri simili, prova un senso di grande disagio psicologico che, alla

lunga, si può trasformare in disagio fisico, accompagnato da un indebolimento delle difese immunitarie (Boccia *et al.*, 1997).

Anche se rimane comunque oggettivamente difficile avere un quadro chiaro e complessivo di cosa sia la sofferenza animale, ciò che si deve fare è avvicinarsi al modello animale con un bagaglio di conoscenze di biologia del comportamento che ci aiutino ad individuare velocemente l'insorgere di situazioni di stress psicofisico. A ciò bisogna accompagnare la volontà di dare all'animale quel minimo indispensabile di attenzione in più, di più di ciò che normalmente si fa con una coltura di cellule.

Il DL.vo n. 116 del 1992 in tema di sperimentazione animale fornisce una serie di indicazioni che riguardano l'attenzione al benessere dell'animale sottoposto a una certa pratica sperimentale. D'altra parte però è anche importante sottolineare la necessità di salvaguardare il benessere degli animali anche quando non sono direttamente coinvolti in un esperimento, ma durante la loro vita nello stabulario tra un esperimento e l'altro, nel caso l'animale non debba essere sacrificato al termine del protocollo sperimentale. Bisogna riflettere su come sia differente la vita in natura di un particolare animale, e quella che conduce in laboratorio. Quali sono quelle necessità, sia fisiologiche che comportamentali, che dobbiamo assicurare a un animale chiuso in una gabbia per ragioni di ricerca biomedica? Anche qui il campo è molto vasto. Basta indicare la presenza di tre approcci al problema del benessere animale: un approccio si focalizza sulla necessità di tenere presente le esperienze soggettive dei diversi individui; un secondo si basa sulla necessità di garantire la realizzazione delle necessità fisiologiche degli animali; un terzo approccio evidenzia il bisogno di dover garantire agli animali la possibilità di mettere in atto un repertorio comportamentale il più simile possibile a quello osservato in natura (Appleby & Hughes, 1997). I tre approcci sono chiaramente non in conflitto fra di loro e, probabilmente, il migliore approccio al problema del benessere animale trae elementi da tutti e tre.

Ritornando ai primati non umani, anche un tipo di conoscenza istintiva può essere funzionale a migliorare la qualità della vita, per esempio, di una scimmia in gabbia. La conoscenza del "temperamento" di un particolare individuo può essere acquisita, e comunicata, non necessariamente applicando esclusivamente una metodologia scientifica e, così detta, "oggettiva" e "neutrale". Sensazioni ed emozioni, per quanto possano essere antropomorfe, ed "empatia" per una particolare scimmia possono essere utili strumenti conoscitivi. In questi casi, tecnici di laboratorio e stabularisti "empatici" sono figure assolutamente cruciali. Quindi, la conoscenza istintiva della predisposizione sociale, per esempio, di ogni individuo può essere integrata con la conoscenza più "scientifica" del caratteristico repertorio specie-specifico di quel particolare animale. Questa doppia pratica può essere applicata solo per mezzo di un costante e accurato lavoro di osservazione del comportamento di una colonia di scimmie in cattività. "Conosci il tuo animale" deve essere il motto di ogni ricercatore che lavora con modelli sperimentali animali.

## **La ricaduta applicativa**

La possibile ricaduta applicativa è la terza dimensione che il "Cubo di Bateson" prende in considerazione per valutare la fattibilità di un esperimento. In questo caso la domanda è se quella particolare ricerca può veramente dare delle indicazioni utili per migliorare la qualità della vita degli esseri umani. Il che vale a dire: "gli animali sono dei modelli attendibili per comprendere i meccanismi biologici del nostro vivere?". Secondo la teoria dell'evoluzione darwiniana le caratteristiche morfologiche e fisiologiche dell'essere umano sono tanto più comuni a quelle di un altro animale quanto minore è il tempo passato dalla separazione da un

progenitore comune con l'animale in questione. Tale teoria abbraccia anche le varie discipline inerenti allo studio del comportamento, come l'etologia, grazie all'osservazione di Konrad Lorenz che il comportamento è oggetto della selezione naturale tanto quanto la struttura di un arto o il funzionamento del fegato (Lorenz, 1974). Se si accetta questa impostazione teorica, risulta legittimo l'utilizzo degli animali come modelli in esperimenti che hanno come fine ultimo l'acquisizione di conoscenze utili al miglioramento delle condizioni di vita dell'essere umano.

Il ricorso a dei modelli appropriati è un'esigenza fondamentale della ricerca scientifica. In neurobiologia, per esempio, il mollusco *Aplysia* è un modello particolarmente adatto nel caso si vogliano studiare le basi molecolari dell'apprendimento animale in relazione alla trasmissione di informazione tra le cellule nervose. Tuttavia, visto il limitato repertorio comportamentale e la lontananza filogenetica con l'uomo, questo organismo non rappresenta un modello appropriato per indagini di carattere psicofarmacologico mirate all'identificazione di meccanismi neuro-psichici caratteristici dei mammiferi.

Poiché, data la varietà dei casi, è impossibile offrire un panorama esauriente della sperimentazione animale *in vivo*, vorremmo soffermarci su un esempio riguardante i roditori e che riguarda l'area di indagine in cui ci troviamo più direttamente coinvolti nel nostro laboratorio all'Istituto Superiore di Sanità.

Modelli animali particolarmente adatti per lo studio delle basi biologiche di comportamenti complessi sono rappresentati dai roditori quali il topo e il ratto. Per esempio il test denominato "Mouse Defense Test Battery", utilizzato con i topi da laboratorio, consiste di cinque test sperimentali associati o con una potenziale minaccia, o con una minaccia reale (per esempio, la presenza di un ratto). In questo contesto sperimentale possono essere studiati gli effetti di farmaci ansiolitici di differenti classi, mediante specifici profili di effetto su diversi parametri. Questo è un utile modello che può fornire informazioni nella valutazione di farmaci attivi contro disordini emozionali nella specie umana (Griebel & Janger, 1999). Qualcuno potrebbe giustamente obiettare che tra un topo e un essere umano c'è una gran bella differenza. D'altra parte, da studi di tipo comparativo oggi sappiamo che i roditori, in quanto mammiferi come l'essere umano, condividono con noi le principali caratteristiche del sistema nervoso, e quindi li rendono appropriati modelli per questo tipo di studi. Le capacità cognitive di un topo sono molto più limitate di quelle di un essere umano, ma la fisiologia di base è molto simile.

Infine, vorremmo di nuovo sottolineare che il tema della sperimentazione animale ha molte sfaccettature, e non può richiedere un tipo di approccio semplicistico. Sulla valutazione della liceità di portare avanti una certa sperimentazione gravano tutta una serie di punti di vista, che devono essere valutati l'uno contro l'altro. Il "Cubo di Bateson" ci fornisce uno strumento di valutazione teorica e metodologica in questo senso. Il vantaggio di utilizzare questo tipo di strumento è il riconoscere che, nel momento in cui si decide se una società civile deve tollerare o meno una certa pratica sperimentale, bisogna tenere presente diverse componenti. Quindi è un invito a non pensare in maniera uni-dimensionale, e speriamo che sia un invito che chi legge sia disposto ad accogliere.

## Riferimenti bibliografici

Appleby MC, Hughes BO (Ed.). *Animal welfare*. Wallingford, Oxon, UK: Cab International; 1997.

Bateson P. When to experiment on animals. *New Scientist* 1986;1496:30-2.

Battaglia L (Ed.). *Etica e animali*. Napoli: Liguori editore; 1998.

Boccia ML, Scanlan JM, Laudenslager ML, Berger CL, Hijazi AS, Reite ML. Juvenile friends, behavior, and immune responses to separation in bonnet macaque infants. *Physiology and Behavior* 1997;61:191-8.

- Dunbar RIM. *Primate social systems*. London: Croom Helm; 1988.
- Frye D, Zelazo PD, Palfai T. Theory of mind and rule-based learning. *Cognitive Development* 1995;10:483-527.
- Griebel G, Sanger DJ. The mouse defense test battery: an experimental model of different emotional states. In: Haug M, Whalen RE (Ed.). *Animal models of human emotion and cognition*. Washington, D.C.: American Psychological Association; 1999. p. 75-85.
- Lorenz K. Analogy as a source of knowledge. *Science* 1974;185: 229-34.
- Mayr E. *Storia del pensiero biologico: diversità, evoluzione, eredità*. Torino: Bollati Boringhieri; 1990.
- Regan T. *I diritti animali*. Milano: Garzanti Editore; 1990.
- Smuts BB, Cheney DL, Seyfarth RM, Wranghan RW, Struhsaker TT (Ed.). *Primate societies*. Chicago: University of Chicago Press; 1987.
- VanZutphen LFM, Baumans V, Beynen, AC (Ed.). *Principi di scienza degli animali da laboratorio*. Pavia: La Goliardica Pavese; 1996.
- Visalberghi E, Limongelli L. Acting and understanding: tool use revisited through the minds of capuchin monkeys. In: Russon A, Bard KA, Parker ST (Ed.). *Reaching into thought*. Cambridge: Cambridge University Press; 1996. p. 57-79.

# LA TUTELA DEGLI ANIMALI NON UMANI E LA SPERIMENTAZIONE: BREVI RIFLESSIONI SU ALCUNE STRATEGIE ETICHE

Laura Canavacci

*Università degli Studi di Siena*

La riflessione filosofica ha molto contribuito al dibattito sulla cosiddetta “questione animale”, ovvero a quel vivace confronto, che ha ormai diverse decine di anni di storia e di letteratura, sulla doverosità o meno dell’estensione dei nostri doveri morali anche oltre il confine della sola specie umana. Il nodo della questione riguarda l’opportunità o meno, e per alcuni appunto la doverosità, di connotare i nostri comportamenti che coinvolgono animali non umani in base ad un qualche criterio di dovere morale, nonché le modalità in base alle quali determinare un tale criterio morale e renderlo poi effettivamente operativo nei nostri comportamenti.

Come sempre accade in ambito filosofico il problema della rilevanza morale degli animali non umani ha trovato risposte in differenti elaborazioni teoriche, rese della volte significativamente distanti tra di loro proprio in virtù degli atteggiamenti filosofici assunti quale base per la riflessione specifica in tema di animali. Sebbene dunque la quasi totalità dei filosofi che si sono impegnati in questo ambito sia giunta a riflessioni implicanti l’estensione del nostro universo morale oltre i doveri diretti ai soli nostri conspecifici, le ragioni poste a motivazione della doverosità di una tale estensione sono differenti, così come gli armamentari argomentativi utilizzati.

Non essendo possibile in questa sede passare in rassegna neppure le posizioni filosofiche più rilevanti, potrebbe invece essere interessante provare a impegnarci a scoprire come sia possibile trovare tracce significative di differenti atteggiamenti etici all’interno delle effettive politiche di tutela degli animali che vengono utilizzati e spesso sacrificati in pratiche finalizzate al benessere umano. Mi soffermerò brevemente sul solo caso della sperimentazione animale, ovvero sul problema di quali debbano essere le tutele dovute agli animali utilizzati per la sperimentazione medica e industriale; proverò dunque a vedere quali siano gli atteggiamenti morali in proposito concretamente operanti in questo settore di utilizzo del mondo animale non-umano e a delinearne brevemente i presupposti teorici.

Nelle normative ufficiali dei vari Paesi, così come nelle linee guida e nei codici deontologici riguardanti la ricerca, i capitoli dedicati alla tutela degli animali sono assai numerosi: esistono tuttavia differenze sostanziali tra le varie normative in proposito, riconducibili tanto alle particolari situazioni che caratterizzano i singoli contesti nazionali, quanto alle differenti sensibilità morali assunte circa lo status morale da attribuirsi agli animali non umani.

Proprio con riferimento agli atteggiamenti presenti nelle varie normative in vigore, sono stati descritti alcuni modelli etici di riferimento, a cui è possibile ispirarsi per un orientamento in tema di politiche di tutela degli animali nell’ambito della sperimentazione.

La prima posizione rintracciabile (molto diffusa nella pratica anche se praticamente assente nei testi delle normative più recenti) è quella che è stata definita del “dominio umano”: tale atteggiamento non riconosce gli animali come soggetti di interesse morale. In quest’ottica non ha dunque senso parlare di tutela animale nella sperimentazione proprio perché ciò che viene respinto è l’idea che vi sia un qualche presupposto valido sul quale basare la rivendicazione di qualsivoglia tutela morale da attribuire agli animali non umani. I presupposti su cui la



prospettiva del dominio umano trova fondamento sono sostanzialmente di due tipi: il primo riguarda la convinzione che gli animali siano esseri incapaci di provare stati mentali quali dolore e sofferenza tuttavia vi sono molte prove scientifiche contro questa idea: in primo luogo evidenze neurofisiologiche, neurochimiche e comportamentali; poi la difficoltà di pensare che tali stati mentali siano comparsi miracolosamente solo nell'evoluzione della specie umana (visto anche il fondamentale ruolo che essi giocano proprio in vista della conservazione delle specie); in ultimo, se una tale posizione fosse corrispondente al vero, bisognerebbe domandarsi il perché dell'utilizzo degli animali quali modelli sperimentali per gli esseri umani in considerazione delle profonde differenze che ci dividono.

La seconda prospettiva a favore del dominio umano rinuncia invece ad una pretesa di scientificità, riconducendo a sole ragioni morali l'esclusione degli animali dal nostro universo di interesse etico. Viene detto infatti che la moralità è una sfera d'interesse nata e condivisa da soli esseri razionali, e che mancando gli animali di questa facoltà, essi ne sono per loro stessa natura esclusi. Anche contro questa fondazione per la pretesa d'esclusione totale sono state avanzate molte critiche: perché qualcosa nato tra e per i soli esseri razionali non potrebbe estendere la sua portata logica oltre i confini di questo insieme? Perché gli umani marginali (ovvero tutti quegli individui che, appartenendo geneticamente alla specie umana, non ne posseggono tuttavia le caratteristiche moralmente rilevanti come la sensibilità, la razionalità, la relazionalità ecc.), sebbene non razionali, vengono considerati parte integrante dell'insieme dei soggetti morali ed anzi sono considerati essere meritevoli di una particolare tutela? Certo la sola constatazione che essi appartengono ad una specie razionale non ne giustifica l'inclusione; infatti il tratto rilevante per l'attribuzione di diritti morali non è l'appartenenza ad una specie bensì, secondo questa stessa struttura argomentativa, il possesso della razionalità.

La forza degli argomenti contrari alla teoria che abbiamo definito dominio umano ne ha sostanzialmente reso impopolare l'adozione tanto che, sebbene molte pratiche umane siano di fatto prova della sua ancora persistente diffusione, almeno ad un livello di riconoscimento teorico è estremamente difficile trovarne in letteratura sostenitori non dubbiosi. La maggior parte dell'elaborazione in tema di moralità e animali, infatti, è impegnata a stabilire i fondamenti in base ai quali attribuire una qualche forma di diritti morali agli animali e soprattutto a stabilire, coerentemente a ciò, quali siano tali diritti e fino a che punto essi siano vincolanti per i nostri comportamenti.

Un atteggiamento teorico molto diffuso è quello che è stato definito "priorità dell'essere umano": in questa prospettiva gli animali sono considerati soggetti degni di attenzione morale, anche se i loro interessi sono comunque valutati a priori come secondari rispetto a quelli eventualmente concorrenti appartenenti ad esseri umani.

E' difficile brevemente ricordare quali possano essere le varie ragioni portate a giustificazione di tale atteggiamento pregiudiziale in favore degli esseri umani e dei loro interessi. Ad argomenti strutturati di carattere teorico si somma spesso un retaggio culturale incline per abitudine a tale riconoscimento: ciò non toglie che di fianco alla priorità accordata agli interessi umani non si sia oggi sostanzialmente diffuso anche un atteggiamento attento alla considerazione del benessere animale. Conseguentemente chi segue questa posizione in rapporto alla sperimentazione raccomanda la minimizzazione delle sofferenze animali all'interno della pratica sperimentale, minimizzazione perseguibile attraverso il principio detto delle 3R: replacement (sostituzione, quanto più è possibile, delle sperimentazioni che utilizzano animali con metodologie alternative di ricerca), reduction (riduzione del numero di animali sacrificati nella ricerca), refinement (adozione di strategie che riducono al minimo le sofferenze degli animali utilizzati negli esperimenti).

All'attenzione rivolta alla riduzione delle sofferenze animali evitabili si aggiunge, in alcune posizioni definibili del "bilanciamento degli interessi", una valutazione più rigorosa delle

ragioni supportanti i vari interessi messi in gioco ogni qual volta si faccia uso di animali non umani. Questo atteggiamento condivide con la precedente prospettiva i fondamenti dell'argomentazione, ma ne estende la portata pratica. Non è infatti sufficiente la sola minimizzazione delle sofferenze animali, ma, una volta ammessa la rilevanza morale degli animali non umani, abbiamo bisogno di una qualche giustificazione per poterne usare a nostro beneficio. Una tal sorta di giustificazione deriva da un principio di bilanciamento degli interessi in gioco (rapporto costi-benefici): non tutte le sperimentazioni sono legittime, ma solamente quelle condotte per seguire finalità la cui importanza è reputata sufficiente a bilanciare il peso morale della sofferenza animale. E' comunque bene ricordare che una tale strategia morale di tutela degli animali non prescinde, pur considerandone gli interessi, da una pregiudiziale sfavorevole agli animali, il cui status morale è considerato inferiore, in una ipotetica scala gerarchica, a quello condiviso da tutti e soli gli esseri umani: basti notare infatti che nel bilanciamento degli interessi in gioco, i rischi sono quasi sempre tutti e solo per gli animali non umani e i benefici sono invece attesi per i soli esseri umani.

Anche qui sarebbe difficile richiamare i differenti argomenti adottati per motivare tale atteggiamento: è comunque interessante notare che il riconoscimento, differentemente fondato, della rilevanza morale degli animali, sebbene accompagnato da un'affermazione di differenza di status morale segnata dal confine di specie, comporta la necessità di problematizzare l'uso degli animali a fini umani e quella di legare la sua legittimità al dovere di esplicitare delle ragioni motivanti che sostengano un confronto pubblico.

Un atteggiamento certamente più radicale è quello della "eguale considerazione degli interessi": anche questa posizione è infatti fondata su di un tipo di argomentazione che vede nel principio di bilanciamento degli interessi in gioco la legittimazione o meno di una determinata sperimentazione: tuttavia rifiuta della prospettiva del semplice bilanciamento la parzialità nella valutazione degli interessi stessi. Poco importa bilanciare il peso delle preferenze in conflitto se una tale valutazione è fondata sul presupposto che gli interessi di una parte siano moralmente più importanti di quelli dell'altra. Quando si tratta di sofferenza, sostengono da questa prospettiva, non sono importanti le caratteristiche di coloro che la sperimentano (salvo quelle che contano al fine di stabilire se e quanto un essere è in grado di soffrire o provare piacere); essa deve contare per tutti allo stesso modo, ed egualmente essere evitata. La presupposizione per la quale siamo naturalmente portati a considerare i nostri interessi pregiudizialmente più rilevanti di quelli degli animali non umani, altro non è che un pregiudizio specista (analogamente a quello razzista o sessista), per il quale accordiamo ingiustificatamente favori ai nostri conspecifici, a scapito di eguali o più forti interessi animali. Ovviamente l'eguale considerazione degli interessi in gioco non prevede necessariamente eguali trattamenti per tutti gli interessi: anche in questa prospettiva potrebbe presentarsi un caso in cui interessi animali meno forti potrebbero essere controbilanciati da interessi umani più forti. Questo però solo a condizione che il giudizio sia formulato imparzialmente, senza a priori considerare la sofferenza umana come più seria o più importante di quella animale. Parzialmente diversa in questa stessa prospettiva rispetto alla difesa del diritto degli animali alla non sofferenza, è la sola parziale difesa nei confronti del loro diritto alla vita: in alcuni casi infatti viene sostenuto che l'uccisione indolore di alcuni animali che non hanno coscienza di loro stessi come di entità distinte sia sostanzialmente meno problematica, sempre che ci siano delle ragioni legittimanti tale uccisione riconducibili ai benefici ottenibili tramite la sperimentazione .

Non si deve comunque dimenticare che la condizione per una simile legittimazione è sempre subordinata alla circostanza che tali benefici siano stati giudicati imparzialmente. Non ci si lasci dunque ingannare da queste aperture perché esse giocano quasi sempre tutte in favore degli interessi animali: si pensi ad esempio al "Progetto grande scimmia" con il quale, in questa prospettiva, si tenta di estendere il diritto alla vita e alla libertà anche agli antropoidi superiori .

L'ultima posizione rilevante in tema di atteggiamenti nei confronti della tutela degli animali non umani coinvolti nella sperimentazione è quella che a vario titolo difende i cosiddetti "diritti animali": questa posizione, radicalmente opposta alla prima, è anch'essa completamente assente da qualsivoglia politica ufficiale. Gli animali non umani sono considerati in questa prospettiva possessori, per loro stessa natura, di diritti inalienabili: non che non esistano, in linea di principio, ragioni per le quali tali diritti possano essere violati, ma tali ragioni devono essere di straordinaria importanza, così come accade per i diritti degli umani. Per questa stessa ragione come non è possibile sperimentare su esseri umani in maniera cruenta e contro la loro volontà, quali che siano i benefici ottenibili per mezzo della sperimentazione, allo stesso modo non si dovrebbe farlo con gli animali non umani.

Ritornando alle normative e alle linee guida che i vari Paesi forniscono in materia di tutela animale nella sperimentazione, è ovvio che esse tutte condividano il presupposto di una qualche rilevanza morale degli animali non umani e il conseguente impegno a prendere seriamente in considerazione i loro interessi. La posizione del dominio umano, almeno sulla carta, è dunque assente dai documenti ufficiali: così anche le posizioni animaliste forti, come quelle dei diritti degli animali o dell'eguale considerazione degli interessi.

La strategia argomentativa utilizzata per perseguire il fine della tutela del benessere animale più comune nei legislatori, almeno tra quelli dei paesi occidentali, è quella che abbiamo chiamato della priorità dell'essere umano: pur dotati di valenza morale gli interessi animali sono per principio subordinati a quelli umani, anche se, questa sola considerazione, non è sufficiente a sollevarci dall'obbligo di minimizzare le sofferenze degli animali sacrificati alla nostra causa. In quasi tutte le normative è dunque imposto il "principio delle tre R". Solo nelle legislazioni più avanzate, come quella della Gran Bretagna (tradizionalmente assai sensibile alle problematiche relative al benessere animale, come appare chiaro se solo si considera che la prima legislazione in materia in questo paese risale al 1876, rivista poi nel 1986), Germania, Olanda e Australia, ad esso viene affiancato un principio di bilanciamento degli interessi (solo benefici importanti per gli esseri umani possono giustificare il sacrificio di animali non umani). Si noti, per inciso che questo tipo di bilanciamento è anche previsto tra le indicazioni etiche fornite per il 5th Research Framework Programme (1998-2002) dell'Unione Europea, nel quale, per altro, la tutela del benessere animale è spesso ricordata all'attenzione dei ricercatori.

Il principio della proporzionalità tra benefici ottenuti e sofferenza animale, suggerito tra l'altro anche dalla direttiva dell'Unione Europea, è dunque, al momento, il modello più avanzato di tutela animale e accolto con favore almeno dalla parte più sensibile della comunità dei ricercatori. Tale principio infatti fornisce un metro di valutazione che molti ricercatori utilizzano per stabilire se la loro sperimentazione è giustificabile da un punto di vista etico.

Con più precisione, uno dei metodi proposti per rendere applicabile tale principio è il cosiddetto "cubo della decisione" o "cubo di Bateson". Questa tecnica di valutazione rende possibile valutare e bilanciare i tre fattori determinanti per la legittimità di una scelta sperimentale, ovvero:

1. la qualità scientifica del progetto di ricerca;
2. le prospettive di uso terapeutico e conoscitivo della ricerca sperimentale;
3. il possibile grado di sofferenza animale comportata dall'esperimento

Mentre livelli molto alti di sofferenza animale sarebbero intollerabili e, attraverso questo criterio di valutazione, difficili da giustificare a dispetto di qualunque progresso conoscitivo ottenibile da tale sperimentazione; gradi inferiori di sofferenza, accompagnati da un'elevata qualità della ricerca, e da alte probabilità di ricadute benefiche per la salute umana,

renderebbero possibile la sperimentazione e ne legittimerebbero la conduzione dal punto di vista etico.

L'importanza dell'esistenza di questo metro di valutazione e di legittimazione etica è sentita con forza dalla stessa comunità scientifica, da cui tale strategia proviene, e forse proprio per questa ragione può sicuramente risultare più efficace di pesanti vincoli che alla scienza possano essere imposti dall'esterno. Forse però proprio in questa caratteristica risiede anche la debolezza di tale strumento di tutela animale.

Una prima considerazione deve infatti essere fatta in proposito alla mancanza di efficacia di strategie egualitariste forti: tali strumenti argomentativi, sebbene dotati di grande valore critico e certamente in grado di portare alla luce tanti nostri atteggiamenti pregiudiziali e moralmente incoerenti, sono infatti poco incisivi quanto a potere effettivo nei confronti di cambiamenti pratici. Non volendo certo sminuire il valore di tanta letteratura e azione animalista, è comunque a mio avviso abbastanza chiaro che essa svolge un ruolo sociale importante come pressione politica e culturale e che tuttavia essa difficilmente può costituire un modello etico di riferimento per strategie pratiche di tutela animale da operarsi all'interno delle nostre società: molto del nostro costruito sociale ed economico è dolorosamente fondato sullo sfruttamento del mondo non umano e la strada per la presa di coscienza della rilevanza morale di tale mondo e dell'affermazione dei diritti degli animali non umani è lunga e necessariamente graduale. Non a caso infatti le politiche di difesa del benessere animale si fondano su atteggiamenti riformisti, nei quali, pur persistendo convinzioni radicate relative alla supremazia degli interessi umani, si affiancano anche considerazioni sulla doverosità di una responsabilizzazione umana rispetto alla sofferenza e alla qualità della vita animale.

A questo proposito e in relazione alla sperimentazione si è visto come il cubo di Bateson rappresenti una forma avanzata di presa in carico della sofferenza animale, basata sostanzialmente sulla necessità di vincolare lo sfruttamento animale alla manifestazione pubblica di ragioni forti e ben motivate. Pur riconoscendo la difficoltà di applicare ragioni di giustizia basate sull'ugualitarismo interspecifico in domini troppo lontani dalle conseguenze dell'elaborazione etica teorica poiché caratterizzati già da contesti pratici e applicativi complessi, mi sembra tuttavia riconoscibile in vizio di fondo nascosto in questa strategia. Essa infatti basa tutta l'argomentazione fornita a giustificazione dell'operato sperimentale ad un giudizio interno alle necessità e ai valori condivisi da coloro che ne sono protagonisti. E' evidente come questo sia poco efficace nell'ottica di una decisione per così dire pluralista sulle ragioni motivanti. Se dunque mi sembra poco fruttuoso sperare che l'ottica animalista possa permeare i comportamenti di una società per lo più fondata su forme di sfruttamento animale, tuttavia credo che per sperare in effettivi passi avanti in materia di tutela animale sia necessario aprire i luoghi delle decisioni a tutti i rappresentanti della società stessa: solo per questa strada infatti, ovvero prendendo seriamente in considerazione tutte le posizioni riguardanti i valori morali che dovrebbero essere promossi per mezzo di decisioni di pubblico interesse, si può a mio avviso garantire una valutazione il più possibile equa degli interessi in gioco. Non è infatti sufficiente dare delega ai soli diretti interessati – nella migliore delle ipotesi simpatetici verso le istanze etiche di tutela animale, ma comunque caratterizzati dalla condivisione dei soli valori della comunità scientifica – per valutare gli interessi e le motivazioni in gioco, ma affinché tali decisioni possano trovare un reale contesto di valutazione equa, al tavolo delle trattative dovrebbero essere coinvolti anche attori estranei e indipendenti e comunque rilevanti dal punto di vista della rappresentanza dei valori diffusi all'interno della società.

In questa prospettiva mi sembra che un effettivo apporto possa essere rappresentato dal lavoro dei comitati etici. Questi istituti, sebbene operativi per le sole sperimentazioni che coinvolgono esseri umani, potrebbero effettivamente arricchire la riflessione etica sulle responsabilità umane nei confronti degli animali usati nella ricerca e sostanzialmente per due

motivi: il primo è la conseguenza di quanto appena sostenuto, ovvero la necessità di coinvolgere una rappresentanza più ampia dei valori morali diffusi all'interno della società civile al fine di rendere le decisioni più garantite dal punto di vista dei valori da promuovere per mezzo della ricerca scientifica. La seconda ragione per la quale credo i comitati etici potrebbero rappresentare un effettivo passo in avanti verso una efficace tutela del benessere animale nel contesto della sperimentazione è la convinzione che, laddove si creino luoghi di discussione e di confronto tra persone che possiedono competenze, esperienze professionali e visioni del mondo differenti tra di loro, tutte legate da un problema che si vuole risolvere (nel nostro caso l'effettiva tutela degli animali in sperimentazione), sia anche possibile la ricerca di strade alternative a quelle comunemente percorse e che possano rappresentare compromessi possibili e condivisi anche tra interessi e convinzioni divergenti.

## Riferimenti bibliografici

- Baccarini E, Cancrini T, Perniola M (Ed.). *Filosofie dell'animalità*. Annuari di "Clinamen". Milano: Mimesis; 1992.
- Baier AC. La nostra posizione nel mondo animale. In: Battaglia L (Ed.). *Etica e animali*. Napoli: Liguori; 1998. p. 55-83.
- Battaglia L (Ed.). *Lo specchio oscuro, gli animali nell'immaginario degli uomini*. Torino: Satyagraha; 1993.
- Battaglia L. *Etica e diritti degli animali*. Roma-Bari: Laterza; 1997.
- Battaglia L (Ed.). *Etica e animali*. Napoli: Liguori; 1998.
- Brody BA. *The ethics of biomedical research. An international perspective*. New York-London: Oxford University Press; 1998.
- Carruthers P. *The animal issue: moral theory in practice*. Cambridge-New York: Cambridge University Press; 1992.
- Castignone S (Ed.). *I diritti degli animali*. Bologna: Il Mulino; 1988.
- Castignone S. *Povere Bestie. I diritti degli animali*. Venezia: Marsilio; 1999.
- Castignone S, Battaglia L (Ed.). *I diritti degli animali*. Genova: Le. A. L. Editrice; 1986.
- Cavaliere P. Il concetto di persona e gli animali non umani. *Quaderni della rivista Le scienze* 1996;88:90-1.
- Cavaliere P, Kymlicka W. Expanding the social contract. *Etica & Animali* 1996;8:5-33.
- Cavaliere P. *La questione animale. Per una teoria allargata dei diritti umani*. Torino: Bollati Boringhieri; 1999.
- Cohen C. The case for the use of animals in biomedical research. *N Engl J Med* 1986;315:365-9.
- Didati G. *I filosofi e gli animali*. Padova: Isonomia; 1995.
- Frankena WK. Il diritto alla vita degli esseri non umani. *Rivista di Filosofia* 1983;24-42.
- Midgley M. *Perché gli animali. Una visione più "umana" dei nostri rapporti con le altre specie*. Milano: Feltrinelli; 1985.
- Orlans FB. History and ethical regulation of animal experimentation: an international perspective. In: Kuse H, Singer P (Ed.). *A companion to bioethics*. Oxford: Blackwell; 1998. p. 399-410.
- Pocar V. *Gli animali non umani. Per una sociologia dei diritti*. Roma-Bari: Laterza; 1998.
- Regan T. *I diritti animali*. Milano: Garzanti; 1990.

Rachels J. *Creati dagli animali. Implicazioni morali del Darwinismo*. Milano: Edizioni di Comunità; 1996.

Regan T, Singer P (Ed.). *Diritti animali, obblighi umani*. Torino: Edizioni Babele; 1987.

Rollin BE. *Le basi giuridiche e morali dei diritti degli animali*. In: Battaglia L (Ed.). *Etica e animali*. Napoli: Liguori; 1998. p. 97-122.

Rollin BE. The moral status of animals and their use as experimental subjects. In: Kuse H, Singer P (Ed.). *A companion to bioethics*. Oxford: Blackwell; 1998. p. 411-22.

Sapontzis SF. L'evoluzione degli animali nella filosofia morale. *Etica & Animali* 1988;1:51-61.

Singer P. Liberazione animale: una prospettiva personale. *Etica & Animali* 1988;1:28-34.

Singer P. *In difesa degli animali*. Roma: Lucarini; 1987.

Singer P. *Etica pratica*. Napoli: Liguori; 1989.

Singer P. *Liberazione animale*. Milano: Mondatori; 1991.

Singer P, Cavalieri P. *Il progetto grande scimmia*. Roma: Teoria; 1993.

Travaglini F. *Vivisezione. Gli animali sperimentali nella ricerca e nella vita quotidiana*. Roma: Aporie; 1992.

## Riviste

*Etica & Animali*

(Direttore responsabile: Paola Cavalieri - Corso Magenta 62, 20123 Milano - Tel: 02/4815514; Email: gap\_etica@planet.it)

## Comitati di etica animale

Comitato bioetica per la veterinaria presso l'Ordine dei medici veterinari della Provincia di Roma (Via Panama, 88 00198 Roma. Tel. 06.85356677; fax 06.85831225. E-mail: OrdVetRoma@mclink.it.)

## Pubblicazioni

*La tutela degli animali durante il trasporto*. Torino: Edizioni medico Scientifiche; 1999.

*Le procedure per una decisione clinica informata e responsabile. Riflessioni critiche sul cosiddetto "consenso informato" in veterinaria*. Torino: Edizioni medico Scientifiche; 2000.

## **Ottimizzazione dei modelli di sperimentazione animale**





# BENESSERE ANIMALE: SPUNTI DI RIFLESSIONE PER LA PROMOZIONE DELLA SALUTE NELL'UOMO

Paolo Di Lena (a), Monica Rea (b), Giovanni Laviola (b)

(a) Dipartimento di Psicologia Generale, Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

(b) Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e di Sistema, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Secondo la direzione tracciata in origine dall'Organizzazione Mondiale della Sanità e che ormai rientrano pienamente tra le direttive del Piano Sanitario Nazionale, la salute non può più essere considerata come semplice assenza di malattia o infermità, ma come stato complesso che implica il completo benessere fisico, mentale e sociale dell'individuo.

L'oggetto di studio del tradizionale paradigma di ricerca centrato sull'individuo deve necessariamente essere ampliato, focalizzandosi sullo studio dell'individuo nell'ambiente e delle transazioni che avvengono tra le molteplici componenti di questi due sistemi complessi. La ricerca, in tal senso, richiede l'apporto sinergico di approcci multidisciplinari (che vanno ad esempio, dalla psicologia sociale e dalla sociologia alla psicologia fisiologica e alla biologia).

In parte tale linee e modelli di ricerca hanno influenzato le ricerche e le teorizzazioni che riguardano la salute e il benessere animale e a loro volta possono ricevere spunti da queste. Si procederà, quindi, ad una trattazione sul benessere animale, identificandone i criteri utilizzati nelle ricerche e mostrando come fattori di natura socio-ambientale possano influenzare in senso non esclusivamente negativo e promuovere lo stato di salute di un organismo animale.

## Benessere animale

Numerosi autori hanno dato definizioni del benessere animale diverse tra loro e il significato stesso di questo concetto non è stato ancora chiarificato del tutto (Tannenbaum, 1991). La valutazione della qualità della vita di un animale, infatti, si basa sulla conoscenza scientifica, ma implicando anche principi etici e giudizi di valore può difettare di interpretazioni antropomorfe (Duncan & Fraser, 1997).

Una delle prime definizioni di *welfare* (vocabolo inglese utilizzato per indicare il concetto di benessere) si trova nel Brambell Report del 1965 e comprende riferimenti allo stato fisico e mentale (con particolare riguardo alle sensazioni degli animali). Nello stesso documento si menzionano le cosiddette 'cinque libertà', di derivazione etologica, necessarie per evitare disturbi al benessere degli animali allevati: la libertà da sete, fame e cattiva nutrizione; la necessità di un ambiente fisico adeguato; la libertà da malattia e dolore; la libertà di manifestare il normale comportamento specie-specifico; la libertà dalla paura (Verga M. *Concetto di "benessere" e indicatori bio-etologici*. Intervento presentato al Convegno nazionale dell'Associazione italiana di avicoltura scientifica, Forlì 1993).

Nel 1985 il Department of Agriculture of the United States emanava un atto in cui si raccomanda di tenere conto del benessere animale e dei bisogni psicologici dei primati non umani tenuti in cattività, con particolare riguardo alle pratiche di accudimento e agli ambienti in cui questi vengono allevati (Clark et al., 1997). Secondo Wiepkema e Koolhaas (1992) tutti i vertebrati possono soffrire o sperimentare gratificazione e benessere, concetto, quest'ultimo, comprensivo dello stato di salute sia fisica che mentale.

Il concetto di bisogni fisici è generalmente chiaro e molti sono gli studi riguardanti, ad esempio, la cura veterinaria delle malattie, il nutrimento adeguato, le pratiche umane e la protezione da ambienti pericolosi. Scarse, fino a qualche anno fa, erano le ricerche sui bisogni psicologici, concetto 'a ombrello', multiplo e sicuramente più difficile da definire (Clark *et al.*, 1997). Risulta facile, infatti, definire le necessità comportamentali essenziali per la sopravvivenza e la riproduzione, più difficile è identificare i desideri dell'animale (cioè le rappresentazioni cognitive delle necessità stesse) (Hughes & Duncan, 1988).

Sebbene la salute fisica e la libertà da crudeltà e abusi siano aspetti importanti, attualmente si considera il benessere, o qualità della vita di un animale, come determinato dal suo stato interno somatico e mentale influenzato da ciò che conosce (cognizione), percepisce e sente, dallo stato motivazionale (es. fame, sete, libido), e dalle risposte a stimoli interni ed esterni (Clark *et al.*, 1997). Diventa centrale considerare le sensazioni soggettive degli animali: come l'animale sente riguardo il suo stato corporeo, come percepisce e interpreta gli stimoli del suo ambiente, e come sia conscio di queste sensazioni e percezioni sono tutti aspetti cruciali del suo stato di benessere (Dawkins, 1990; Fraser, 1993).

Gli stimoli e gli ambienti, per esempio, possono essere più o meno avversi o gratificanti e, insieme, le risposte fisiologiche (es. neuroendocrine e immunitarie) e quelle comportamentali adattative, abitative, e di coping (che comprendono le strategie che un animale usa per controllare gli eventi e le sue reazioni ad essi) contribuiscono al mantenimento dello stato interno omeostatico. Il comportamento dell'animale e le sue risposte dipendono da una serie di variabili filogenetiche e ontogenetiche interagenti quali: vulnerabilità individuali (es. età, stato di salute, mentale, fisiologico); genetica; esperienze precedenti e apprendimento; controllabilità e predicibilità delle condizioni ambientali; caratteristiche, frequenza e durata degli stimoli (che possono essere psicologici, somatici, esterni, chimici, psicosociali); stili individuali (Bohus *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1997).

Tanto in campo umano quanto in quello animale i processi che intervengono nella promozione e costruzione della salute di un individuo, quindi, coinvolgono dinamiche molteplici di un organismo: da quelle biochimiche a quelle interpersonali/ecologiche; il paradigma di ricerca, in tal senso, deve necessariamente contestualizzare l'individuo e avere come oggetto di studio e approfondire le transazioni che avvengono tra le varie componenti del sistema individuo e quelle del suo ambiente di vita.

Il benessere è quindi uno stato interno complesso, multidimensionale e dinamico che varia lungo un *continuum* e nelle sue manifestazioni. Implica un buon funzionamento biologico dell'organismo, esperienze positive e libertà da condizioni avverse (o meglio la capacità di farvi fronte) e può variare tra le specie, tra gli individui di una specie, e anche nello stesso individuo nel tempo e nel contesto (Curtis, 1985; Fraser, 1993). L'individualità degli animali, quindi, deve essere considerata se si vuole studiare e stabilire condizioni che promuovano il benessere, nonostante sia difficile dare una valutazione limpida dei fattori o criteri indicativi, e le ricerche dovrebbero dare maggiore spazio e rilievo allo studio delle differenze individuali (Clark *et al.*, 1997).

Assumendo un punto di vista olistico diviene necessario considerare gli aspetti biologico, fisiologico, somatico, comportamentale, sociale e psicologico come mutualmente interagenti. Si tratta, in breve, di utilizzare misure multiple e approcci interdisciplinari avvicinandosi ad un paradigma biopsicosociale, per studiare come determinati fattori psicosociali possano influenzare lo stato di salute (Engel, 1977). Avvalendosi in maniera integrata degli studi condotti in etologia, in psiconeuroimmunologia e neuroendocrinologia e dagli studiosi dell'Animal Care (Dantzer & Mormède, 1983; Dawkins, 1990).

Lo sviluppo e la promozione del benessere in campo animale diviene essenziale ed è un concetto che si dimostra sempre più rilevante sia da un punto di vista etico che per la qualità dei

dati sperimentali prodotti nelle ricerche, ad esempio biomediche e psicofarmacologiche, dove i soggetti utilizzati sono principalmente animali sociali quali primati non umani e roditori. Tale concetto, come già evidenziato, implica processi estremamente complessi il cui studio richiede approcci sistemici e multidisciplinari. Proprio per la molteplicità delle componenti coinvolte, parte degli studi sul benessere animale è interessata al chiarimento dei possibili effetti modulatori esercitati da variabili di natura sociale sullo stato psico-fisico degli organismi animali.

## Indici e criteri di valutazione

Secondo Duncan e Fraser (1997) si possono individuare tre principali filoni di ricerca derivati da modi diversi di intendere il benessere animale. Gli approcci basati sulle sensazioni definiscono il benessere in termini di esperienze ed emozioni soggettive dell'animale, con lo scopo di promuovere le sensazioni positive (es. comfort, piacere) e ridurre quelle negative (es. sofferenza, dolore). Un secondo punto di vista identifica il benessere con il normale o soddisfacente funzionamento biologico dell'organismo (es. longevità, successo riproduttivo, salute fisica). Infine, un terzo approccio tende a promuovere la possibilità di esprimere durante la crescita un repertorio comportamentale il più possibile consono al repertorio esibito in condizioni naturali.

Sebbene basate su principi diversi, le tre concezioni di benessere possono portare a conclusioni complementari. Gli indicatori potenzialmente validi per la valutazione dello stato di benessere, infatti, non sono mutualmente escludentesi e riguardano: lo stato generale di salute (individuabile da segni esterni quali, ad esempio, lo stato della pelliccia), la performance (tra cui, ad esempio, crescita e longevità), la funzione immunitaria, i parametri neuroendocrini, i cambiamenti morfologici, il comportamento, le preferenze e le motivazioni (Novak & Suomi, 1988; Clark *et al.*, 1997).

La valutazione, quindi, sintetizza misure di tipo clinico ricavate mediante l'analisi di indicatori fisiologici e biochimici, e misure di tipo etologico, ricavate attraverso indicatori comportamentali.

Riguardo questi ultimi, va evidenziato che l'assenza di anomalie comportamentali, da sola, non indica necessariamente che l'equilibrio psicologico e somatico dell'animale non sia disturbato (Clark *et al.*, 1997). Sebbene sia impensabile costruire ambienti standard identici a quello naturale (sarebbe anche difficile identificare quale dovrebbe essere l'ambiente "ideale"), gli animali in cattività sono spesso costretti a condizioni nelle quali non possono svolgere pienamente normali attività motorie proprie del repertorio comportamentale di una specie. Anche l'espressione, quindi, di altri comportamenti specie-specifici e individuali (riguardanti, ad esempio, il livello di attivazione generale, postura, locomozione, vocalizzazione, temperamento, assunzione di cibo e acqua) è indice dello stato dell'animale, può rivelare le sue strategie di coping e dare informazioni riguardo la natura dello stimolo (Appleby & Hughes, 1993; Duncan & Fraser, 1997).

Alcuni indicatori fisiologici, tra i quali indicatori endocrini e neurochimici come le catecolamine (dopamina, norepinefrina, epinefrina) e la serotonina, l'ormone di rilascio di corticotropina (CRF), l'ormone adrenocorticotropo (ACTH), glucocorticoidi, prolattina, vasopressina, ossitocina, insulina e glucagone, ormone della crescita e ormoni oppioidi (encefaline, endorfine, dinorfine), possono essere utili nel comparare livelli diversi di un dato stato affettivo (Hennessy & Levine, 1978; Clark *et al.*, 1997). Essi riguardano il rilevamento di variabili neuro-ormonali implicate nell'attivazione dei sistemi simpatico-medullo-surrenale, ipotalamo-ipofisi-cortico-surrenale e peptidergici, la valutazione della frequenza cardiaca e

alterazioni metaboliche. Cambiamenti nei livelli basali dei glucocorticoidi, ad esempio, possono essere misurati per valutare il grado di eccitazione emotiva e possono sensibilmente riflettere l'intensità di diverse stimolazioni psicologiche a cui gli animali vengono sottoposti (Hennessy & Levine, 1978).

## Ambiente e salute

Alterazioni nell'ambiente di vita di un animale possono indurre modificazioni fisiologiche, biochimiche e/o comportamentali. L'ambiente di vita di un animale da laboratorio, in particolare, può essere così complesso e mutevole da far sì che l'animale riceva troppa o viceversa troppo poca stimolazione. Esso comprende l'ambiente sociale (interazioni con conspecifici e contraspecifici, umani inclusi; ordine gerarchico e status sociale), l'ambiente nutrizionale e sensoriale, l'ambiente psicologico (ad esempio la possibilità di esercitare controllo sugli eventi e la loro prevedibilità) e l'ambiente fisico (come la gabbia e ciò che essa contiene) (Seeman & McEwen, 1996; Van de Weerd *et al.*, 1998).

Tenendo conto della qualità di vita dell'animale, e delle particolari condizioni di cattività, tutti questi aspetti possono essere modulati qualitativamente e quantitativamente disponendo determinate condizioni di housing (in particolare per specie "sociali" quali roditori e primati) e attraverso cambiamenti strutturali dell'ambiente fisico necessariamente ben calibrati che non si propongono semplicemente la simulazione di ambienti naturali ed ecologici (Clark *et al.*, 1997; Van de Weerd *et al.*, 1998).

Le caratteristiche degli ambienti di laboratorio non sempre permettono l'espressione di comportamenti sociali che, anche da un punto di vista ontogenetico, permetterebbero l'acquisizione di determinate capacità comportamentali e di reazione a stimoli avversi. La presenza nella stessa gabbia di conspecifici a partire dallo svezzamento, ad esempio, nei topi previene l'irritabilità in seguito ad una sovrastimolazione ambientale e permette l'apprendimento di comportamenti adattativi, mentre una condizione di isolamento aumenta l'irritabilità e predispone ad un comportamento stereotipato (Riittinen *et al.*, 1986).

Quando le caratteristiche ambientali non danno la possibilità di esprimere parte del naturale repertorio comportamentale, infatti, si possono attivare comportamenti anomali tra cui passività e stereotipie (Van de Weerd *et al.*, 1998). Queste ultime, definibili come sequenze di movimenti ripetitivi invariati, apparentemente fuori contesto e privi di funzione immediata, possono invece essere fortemente ridotte o abolite modificando le condizioni ambientali (ad esempio incrementando lo spazio disponibile o agendo sulle condizioni di housing sociale) (Clark *et al.*, 1997).

L'ambiente di vita risulta determinante anche da un punto di vista ontogenetico. Sono ben noti gli studi che riportano che quando i roditori vengono allevati dallo svezzamento al periodo giovanile in ambienti fisici e sociali complessi sia il loro comportamento che la stessa anatomia neurale possono mutare e mostrare profili più eterogenei (Jurasca & Meyer, 1986; Turner & Greenough, 1985; Van Praag *et al.*, 1999). Modificazioni sperimentali dell'ambiente sociale nel primo periodo di vita, inoltre, cambiano anche la sensibilità e l'efficienza di specifici sistemi neuroendocrini che mediano la risposta agli stimoli esterni. Sembrano comunque necessari ulteriori chiarimenti riguardo la direzione di queste modifiche (Seeman & McEwen, 1996).

## Principali meccanismi fisiologici implicati nell'integrazione neuroendocrino-immunitaria

Una delle funzioni principali del sistema endocrino è la possibilità di adattare il metabolismo in modo rapido e preciso al mutare delle condizioni ambientali. Le sue caratteristiche di azione, a distanza e capillare su tutti i tessuti ed organi e la sua pronta reattività agli stimoli emozionali, spiegano perché sia considerato uno dei più importanti sistemi difensivi e adattivi.

Gli ormoni sono i principali regolatori del metabolismo, della crescita, dello sviluppo, della riproduzione ed hanno un ruolo di straordinaria importanza nel mantenimento dell'omeostasi (ossia nella regolazione di importanti funzioni biochimiche dell'organismo). E' ormai ampiamente dimostrato, inoltre, il ruolo centrale del sistema endocrino nella molteplicità di collegamenti biologici che permettono una comunicazione bidirezionale e interdipendente tra il sistema nervoso centrale e il sistema immunitario. I principali assi afferenti ed efferenti che connettono questi sistemi sono:

- 1) *asse ipotalamo-ipofisi-corteccia surrenale (HPA)*: implica la secrezione, rispettivamente, del CRF, dell'ACTH e dei glucocorticoidi (corticosterone o cortisolo). L'attività dell'asse HPA è particolarmente stimolata da fattori psicosociali e ambientali (tra cui traumi, freddo intenso, novità ambientale, incontri aggressivi e nei piccoli dei mammiferi la separazione dalla madre) che inducono stati psicologici quali paura, ansietà, incertezza, conflitto e perdita di controllo. La sua attivazione può influire sulle risposte immunitarie, cardiovascolari e comportamentali a stimoli ambientali di diversa intensità (O'Leary *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 1997). I glucocorticoidi, i cui livelli plasmatici iniziano ad aumentare sensibilmente dopo circa 5-10 minuti dalla presentazione dello stimolo hanno, ad esempio, un'influenza su varie cellule del sistema immunitario: possono ridurre la risposta ad agenti mitogeni da parte dei linfociti, inibire la produzione di linfocine, la funzione dei fagociti e la produzione di immunoglobuline. L'ACTH, a sua volta, può inibire la produzione di anticorpi, la funzione dei linfociti T e dei macrofagi. Il complesso ipotalamo-ipofisario, inoltre, controlla anche la secrezione degli ormoni gonadici e aumenti nei livelli degli estrogeni possono avere effetti soppressivi sulle cellule immunitarie Natural Killer (Haas & Schauenstein, 1997).
- 2) *asse ipotalamo-sistema nervoso autonomo-midollare del surrene*: sia la branca simpatica che quella parasimpatica sono attive nella reazione immediata dell'organismo a fattori avversi con la funzione di redistribuire il sangue tra i muscoli e il cervello e di incrementare il glucosio circolante. Mentre l'attività della seconda viene inibita, la prima stimola il rilascio nel flusso ematico degli ormoni adrenergici e noradrenergici da parte della midollare del surrene. Gli organi linfoidei (timo, milza, linfonodi) sono innervati da una densa rete di fibre nervose provenienti dal sistema nervoso vegetativo. I linfociti, inoltre, presentano recettori per le catecolamine (adrenalina, noradrenalina) che vengono secrete dalla midollare del surrene (Ader *et al.*, 1995).
- 3) *neuropeptidi*: la beta-endorfina e la metencefalina, peptidi oppioidi prodotti sia dall'ipotalamo sia dalle surrenali quando l'organismo è esposto a condizioni avverse, oltre alle ben note implicazioni nell'induzione di stati analgesici avrebbero probabilmente anche la funzione di inibire il rilascio di ACTH. I peptidi oppioidi possono influenzare le funzioni immunitarie, tuttavia i dati disponibili appaiono contrastanti: *in vitro* faciliterebbero la proliferazione linfocitaria in risposta a mitogeni, l'attività delle cellule NK e la produzione anticorpale; *in vivo* sembrano in grado di inibire le risposte cellulari, ma un incremento nei loro livelli può anche rispecchiare alti livelli di attività delle cellule NK e T-citotossiche

(Carr & Serou, 1995; Eisenstein & Hilburger, 1998). I linfociti presentano recettori di superficie deputati al riconoscimento di peptidi quali le endorfine e le encefaline e, come i macrofagi, presentano recettori per la sostanza P, la somatostatina, il peptide intestinale vasoattivo (Ader *et al.*, 1995; Homo-Delarche & Dardenne, 1993). L'ossitocina e la vasopressina, prodotte nell'ipotalamo e rilasciate dall'ipofisi, sono presenti nel timo dell'uomo e dei roditori (Haas & Schauenstein, 1997).

I collegamenti afferenti al sistema nervoso centrale si attuano attraverso due vie: 1) umorale (ad esempio mediante il trasporto di citochine attraverso la barriera ematoencefalica); 2) sistema nervoso periferico (quindi tramite le vie nervose del sistema nervoso simpatico, nervo vago e afferenti nocicettivi).

La comunicazione tra sistemi nervoso, endocrino e immunitario, quindi, è resa particolarmente complessa da meccanismi biologici di feedback e feedforward: nel sistema nervoso centrale (SNC) sono presenti recettori per alcuni mediatori immunitari (ad esempio per l'interleuchina-1); alcuni linfociti a loro volta sono in grado di produrre ormoni e neuropeptidi (ormone della crescita, ACTH e metencefalina) o di stimolare la liberazione di CRF e ACTH agendo a livello ipotalamico o ipofisario; i macrofagi rilasciano e sintetizzano ACTH e molecole endorfino-simili se infettati con virus; l'interferone-beta, un tipo di anticorpo sintetizzato dalle cellule immunitarie, può penetrare il sistema nervoso centrale ed evocare un incremento nell'attività delle cellule NK presenti nella milza (Hiramoto *et al.*, 1993; Dantzer, 1999). La neuroimmunomodulazione, infine, include aree del cervello coinvolte nell'attività emotiva e cognitiva (ad esempio il sistema limbico) e in particolare le citochine, prodotte nel cervello dai macrofagi, hanno effetti modulatori importanti sul comportamento e sull'attività neuroendocrina (Pert *et al.*, 1985; Haas & Schauenstein, 1997).

## **Fattori socioambientali e correlati neuroendocrino-immunitari**

Interazioni tra *housing*, condizioni ambientali avverse e malattia vengono ampiamente riportate nella letteratura: da un punto di vista positivo l'arricchimento dell'ambiente post natale (presenza di conspecifici e gabbie di grandi dimensioni e con specifici oggetti), ad esempio, oltre ad avere un'influenza di base, si è rivelato in grado di contrastare gli effetti deleteri di agenti chimici teratogeni e di una serie di insulti neonatali nei ratti, stimolando la plasticità ancora presente in quella età (Saari *et al.*, 1990; Fisher *et al.*, 1991; Iuvon *et al.*, 1996). La presenza di un gruppo sociale, inoltre, può modulare la risposta corticosurrenale alla separazione dalla madre o alla presentazione di stimoli avversi (quali ad, esempio, la presenza di un serpente o di un oggetto simile ad esso) in piccoli di primati non umani (Voght *et al.*, 1981; Levine, 1993).

Anche la stabilità e la qualità delle relazioni sociali, il tipo di ordinamento sociale e la posizione dell'animale al suo interno risultano essere elementi altrettanto importanti da cui dipendono diversi profili comportamentali, neuroendocrini e neuroimmuni (Barnard *et al.*, 1996; Seeman & McEwen, 1996; Ruis *et al.*, 1999). Le transazioni tra l'ambiente e l'individuo nella sua complessità sono caratterizzate da cicli di mutua influenza dove gli aspetti fisici e sociali degli ambienti influenzano direttamente la salute degli occupanti (Stein *et al.*, 1976; Stokols, 1992). Le associazioni tra legami sociali e longevità e salute derivano, almeno in parte, dagli effetti di modulazione esercitati dalle caratteristiche supportive dell'ambiente sociale nel senso di una riduzione della reattività neuroendocrina (per un quadro sintetico sia in campo umano che animale vedi Tabella 1).

Si ipotizza che le relazioni sociali possano modulare tale reattività, e quindi le risposte emozionali e comportamentali all'ambiente, attraverso la loro influenza sulle interpretazioni cognitivo-emozionali degli stimoli. Le informazioni riguardanti l'ambiente esterno (sociale e non), infatti, vengono processate attraverso i centri limbici (amigdala e ippocampo) e neocorticali del sistema nervoso che risultano implicati nell'attivazione degli assi ipotalamico-surrenale e simpatico-adrenomedullario (Seeman & McEwen, 1996). Questi ultimi, a loro volta, regolano quasi tutti i sistemi di controllo corporei e quindi la valutazione degli stati neuroendocrini dell'organismo risulta di fondamentale importanza per determinare lo stato di salute fisico e mentale di un organismo (Bohus *et al.*, 1987).

**Tabella 1. Effetti dell'ambiente sociale sull'attività neuroendocrina e cardiovascolare**

Dati	Attività cardiovascolare	HPA	SNS
<b>Animali</b>			
Status dominante	[mf]	[mf]	[mf]
Ambiente stabile	[mf]	[mf]	[mf]
Ambiente instabile		[m]	[m]
Isolamento sociale/ deprivazione materna	[mf]	[mf]	[mf]
Comportamenti affiliativi	[mf]	[mf]	[mf]
<b>Umani</b>			
<i>Studi osservazionali</i>			
Status sociale	[mf]	[mf]	[mf]
Supporto sociale generico	[mf]	[mf]	[mf]
Supporto emotivo		[m]	[m]
Supporto strumentale		[m]	[m]
Ostilità	[mf]	[mf]	[mf]
<i>Studi sperimentali</i>			
Supporto di un compagno/ amico vs Isolamento	[mf]	[mf]	[mf]
Amico vs estraneo	[mf]	[mf]	[mf]
Maschi	[mf]	[mf]	[mf]
Femmine	[mf]	[mf]	[mf]
Challenge interpersonale	[mf]	[mf]	[mf]
Separazione materna	[mf]	[mf]	[mf]

\* [mf], effetti rilevati in soggetti di entrambi i sessi; [m], effetti rilevati solo nei maschi

Studi condotti su roditori e primati non umani dimostrano che il contatto con altri conspecifici è un elemento cruciale per un positivo sviluppo sociale, psicologico e fisiologico degli individui e può influire sulle risposte di attivazione fisiologica in seguito a stimoli di natura stressogena (Seeman & McEwen, 1996). L'ambiente sociale, infatti, può costituire effetto di supporto in presenza di condizioni avverse: i ratti che vengono stabulati in isolamento mostrano, in seguito ad una singola perdita di controllo sociale (attacco e sconfitta da parte di un conspecifico aggressivo), un ritardo nella crescita corporea, una maggiore immobilità comportamentale, uno stato di irrequietezza riconducibile a una sindrome di ansietà, attivazione dell'asse HPA e riduzione del peso del timo rispetto a ratti che, al contrario, vengono ristabulati in gruppo (tre soggetti per gabbia) (Ruis *et al.*, 1999). Allo stesso tempo, comunque, ratti allevati in condizioni di affollamento (crowding) mostrano una ridotta adattabilità a stimoli di natura stressogena sia moderati che intensi, con elevati livelli basali di corticosterone e atrofia della ghiandola timica (è noto, infatti, come l'esposizione cronica ai glucocorticoidi possa debilitare le difese immunitarie dell'organismo) (Gamallo *et al.*, 1986).

## **Esempi di studi riguardanti la relazione tra variabili socio-ambientali e fisiologiche**

Sono ampiamente riportati nei roditori effetti di facilitazione sociale (dovuta alla presenza di un conspecifico) su determinati comportamenti. I risultati tuttavia appaiono in alcuni casi conflittuali e dipendenti in buona parte dal tipo di condizione sperimentale (Wills *et al.*, 1983). Dati comportamentali, infatti, suggeriscono che la reazione di paura (rilevabile nel ratto ad esempio da incrementi nella defecazione e da inibizione motoria generalizzata) suscitata da condizioni ambientali di natura ansiogena può essere ridotta dalla presenza di un conspecifico. Usando come indice di emotività il numero di boli fecali secreti da ogni soggetto, Latanè, nel 1969, riporta infatti che i ratti posti in un ambiente nuovo con un compagno defecavano in misura ridotta rispetto a conspecifici posti nelle medesime condizioni da soli. E' importante a questo punto ricordare come l'esposizione ad ambienti sconosciuti e che non presentano caratteristiche familiari introduce un certo grado di incertezza ed una forte attivazione emotiva nell'animale. La novità ambientale, infatti, è una condizione sperimentale che non comporta sofferenza fisica, ma tuttavia se l'animale non è messo in grado di esercitare un controllo essa rappresenta uno degli stimoli più potenti per indurre un incremento nell'attività corticosurrenale, tanto potente quanto quello prodotto dall'esposizione a stimolazioni elettriche dolorose (Hennessy & Levine, 1978; Weinberg & Levine, 1980). I dati riguardanti un possibile effetto di abitudine sulla reattività adrenocorticale, inoltre, appaiono piuttosto discordi e sembrano dipendere dalla specie: mentre Hennessy e Levine (1978) non avrebbero riscontrato alcuna abitudine nel topo (persino dopo dieci esposizioni allo stesso apparato), altri autori (File & Peet, 1980) rilevano nel ratto riduzioni considerevoli nelle concentrazioni plasmatiche di corticosterone a seconda del grado di familiarità acquisito durante ripetute esposizioni.

Si rilevano incrementi nei livelli plasmatici di corticosterone, ad esempio, sia quando ratti o topi, pur restando nella loro gabbia (*home cage*), vengono traslocati in un nuovo locale, sia quando essi vengono mossi ad una nuova stanza mediante una nuova gabbia, o quando anche vengano lasciati nella stanza ad essi familiare ma in un apparato a loro sconosciuto. Trattandosi di animali principalmente notturni la presenza di una luce bianca intensa, a sua volta, può incrementare ulteriormente le reazioni endocrine dovute alla novità dell'ambiente (File & Peet, 1980).

Stimoli di natura psicologica, comunque, non solo partecipano all'attivazione dell'asse ipotalamico-corticosurrenale, ma possono anche inibirlo efficacemente alterando la stessa risposta agli stimoli (Levine *et al.*, 1989). File e Peet (1980), ad esempio, hanno misurato i livelli plasmatici di corticosterone di ratti maschi adulti (del ceppo Hooded) posti in una gabbia nuova singolarmente o con un conspecifico proveniente da un'altra gabbia. Gli animali dimoravano in isolamento durante i cinque giorni che precedevano il test sperimentale, quindi venivano posti nella nuova gabbia per dieci minuti. Al termine della sessione erano riportati nella loro gabbia e soppressi dopo dieci minuti. La reazione corticosurrenale dei soggetti esposti alla novità ambientale con la presenza di un conspecifico era minore di quella rilevata in ratti saggiati singolarmente. Tale decremento, in particolare, risultava equiparabile a quello riscontrato nei ratti posti singolarmente nella nuova gabbia a cui siano state precedentemente somministrate basse dosi di un farmaco ansiolitico. L'effetto di questo farmaco era evidente e specifico della particolare situazione, dal momento che non riduceva i livelli plasmatici di corticosterone nei soggetti non esposti alla novità ambientale. Armario e Balasch (1981), al contrario, non hanno rilevato un simile effetto modulatore da parte del conspecifico se nelle condizioni ambientali nuove gli animali erano sottoposti anche a stimoli di altra natura quali una luce intermittente associata a forte rumore o la presenza di un potenziale predatore, quale ad esempio il cane, a 20 cm dalla gabbia.



I risultati sui possibili effetti supportivi di un conspecifico, quindi, sembrano dipendere dall'intensità della stimolazione a cui i soggetti vengono sottoposti. Vengono inoltre rilevate differenze nella reattività, oltre che per cause genetiche legate al ceppo utilizzato, anche in rapporto al grado di conoscenza acquisito nei confronti del compagno. In una serie di esperimenti, tra cui una replicazione di quello condotto da File e Peet (1980), Armario e colleghi (1983) hanno riscontrato in ratti Sprague-Dawley maschi adulti che né le precedenti condizioni di *housing* (isolamento di venti giorni o allevamento in gruppi non affollati), né la presenza di un conspecifico mai incontrato in precedenza, né l'assenza di questi provocavano effetti diversi sulla risposta corticoadrenale ad una gabbia nuova. Tale risposta, infatti, risultava potente e massimale in ciascun caso. Replicando l'esperimento di File e Peet (1980) sopracitato, inoltre, questi autori hanno evidenziato che la risposta corticosurrenale dai ratti che erano stati posti in isolamento per cinque giorni prima dell'esposizione alla gabbia nuova (condizione di *novelty*) risultava simile sia se i ratti fossero stati sottoposti a test singolarmente oppure in coppia. Rispetto all'esperimento precedente non si rilevava quindi alcun supporto dovuto alla presenza di un conspecifico non familiare. Quando, infine, i ratti venivano saggiati in presenza di un conspecifico ad essi familiare (proveniente cioè dalla stessa gabbia in cui essi avevano dimorato per due settimane) presentavano una maggiore reattività corticosurrenale rispetto a ratti sottoposti a test singolarmente o in presenza di un conspecifico non familiare.

I risultati ottenuti sui ratti Sprague-Dawley di entrambi i sessi osservati durante una particolare fase ontogenetica quale la periadolescenza rivelano una situazione ancora più complessa. Non si riscontrava alcuna differenza nei livelli plasmatici di corticosterone, evidenziabili in seguito ad un'esposizione di trenta minuti ad una gabbia nuova, tra i ratti che facevano questa esperienza in presenza di un conspecifico familiare (con cui avevano dimorato dal momento dello svezzamento) e quelli sottoposti a test in presenza di un compagno sconosciuto. In compenso, la presenza generica di un compagno esercitava importanti effetti modulatori in direzione positiva nei soggetti di sesso maschile esposti alla *novelty* in condizioni di bassa illuminazione del locale sperimentale (Cirulli *et al.*, 1996; Terranova *et al.*, 1999; Di Lena, 2000).

**Tabella 2. Alcune dimensioni e criteri degli ambienti coinvolti nella promozione della salute umana**

<b>Aspetti della salute</b>	<b>Risorse ambientali</b>	<b>Risultati comportamentali psicologici e fisiologici</b>
Salute fisica	Progetto di resistenza agli insulti; <i>comfort</i> fisico, ambiente non tossico e non patogenetico	Salute fisiologica; assenza di sintomi di malattia; <i>comfort</i> percepito; salute genetica
Benessere mentale ed emotivo	Controllabilità e predicibilità ambientale; novità ambientale e <i>challenge</i> ; qualità estetiche; elementi simbolici e spirituali	Senso di competenza personale; crescita; bassa incidenza di <i>distress</i> emotivo; forte senso personale di identità e creatività; senso di appartenenza ad un <i>milieu</i> fisico e sociale
Coesione sociale a livelli organizzazionali e comunitari	Disponibilità di reti di supporto sociale; progetto di partecipazione e processi di <i>management</i> ; flessibilità e sensibilità organizzazionale; stabilità economica; bassa incidenza di conflitti intergruppo; utilizzo dei media e progetti per la promozione della salute	Alti livelli di contatto sociale e cooperatività; impegno e soddisfazione nell'organizzazione e nella comunità; produttività e innovazione a livelli organizzazionali e comunitari; alti livelli di qualità della vita percepita; prevalenza di comportamenti promotivi della salute, preventivi delle malattie e di protezione dell'ambiente

## Conclusioni

In conclusione possiamo ricordare che alcuni criteri della salute nell'animale e nell'uomo si sono rivelati in parte sovrapponibili. Questo non ci meraviglia più di tanto se pensiamo alla storia naturale delle specie animali e alla loro stretta interconnessione biologica.

Per alcune dimensioni del benessere si possono individuare aspetti comuni quali, ad esempio, la possibilità per l'individuo di esercitare un controllo sull'ambiente e il ruolo potenzialmente supportivo delle relazioni sociali che sarebbero in grado, inoltre, di modulare una serie di parametri e risposte fisiologiche. Un valido contributo conoscitivo in tale ambito è ricavabile dall'impiego di animali nella ricerca per l'identificazione e caratterizzazione dei meccanismi e processi psicobiologici coinvolti nelle transazioni individuo-contesto.

Per ciò che riguarda invece le differenze (vedi Tabella 2), è importante ricordare che l'uomo è un animale "culturale", immerso in contesti linguistici, simbolici, spirituali e socio-economici unici e diversificati, che hanno un peso sostanziale e peculiare sulla costruzione della personalità e ovviamente sullo stato di salute delle diverse popolazioni di individui.

## Riferimenti bibliografici

Ader R, Cohen N, Felten D. Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. *The Lancet* 1995 345: 99-103.

Appleby MC, Hughes BO. The future of applied animal ethology. *Applied Animal Behaviour Science* 1993;35:389-95.

Armario A, Balasch J. Corticosterone response in group-housed rats exposed to psychogenic stresses in different social conditions. *Physiology and Behavior* 1981;27:179-81.

Armario A, Luna G, Balasch J. The effect of conspecifics on corticoadrenal response of rats to a novel environment. *Behavioral and Neural Biology* 1983;37:332-7.

Barnard CJ, Behnke JM, Sewell J. Environmental enrichment, immunocompetence, and resistance to *Babesia microti* in male mice. *Physiology and Behavior* 1996;60:1223-31.

Bohus B, Benus RF, Fokkema DS, Koolhaas JM, Nyakas C, Van Oortmerssen GA, Prins AJA, De Ruiter AJH, Scheurink AJW, Steffens, AB. Neuroendocrine states and behavioral and physiological stress responses. *Progress in Brain Research* 1987;72:57-70.

Bohus B, Koolhaas J.M, Heijnen CJ, De Boer O. Immunological responses to social stress: dependence on social environment and coping abilities. *Neuropsychobiology* 1993;28:95-9.

Carr DJJ, Serou M. Exogenous and endogenous opioids as biological response modifiers. *Immunopharmacology* 1995;31:59-71.

Cirulli F, Terranova ML, Laviola G. Affiliation in periadolescent rats: behavioral and corticosterone response to social reunion with familiar and unfamiliar partners. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1996;54:99-105.

Clark JD, Rager DR, Calpin JD. Animal well-being. *Laboratory Animal Science* 1997;47:564-97.

Curtis, SE. What constitutes animal well-being? In: Moberg GP (Ed.). *Animal stress*. Bethesda, Maryland: American Physiological Society; 1985. p. 1-11.

Dantzer R. Emozioni e sistema immunitario. In: Bateson P, Alleva E (Ed.). *Parte prima: biologia del comportamento. Frontiere della vita: il mondo dei viventi*. Vol. 4. Roma: Istituto della Enciclopedia Italiana "G. Treccani"; 1999. p.71-83.

Dantzer R, Mormède P. Stress in farm animals: a need for reevaluation. *Journal of Animal Science* 1983;57:6-18.

- Dawkins MS. From an animal's point of view: motivation, fitness, and animal welfare. *Behavioral and Brain Sciences* 1990;13:1-9 e 54-61.
- Di Lena P. Effetti modulatori delle interazioni sociali sulla risposta corticosurrenale in ratti periadolescenti esposti ad un ambiente nuovo. Tesi di Laurea in Psicologia. Facoltà di Psicologia, Università degli Studi di Roma "La Sapienza"; 2000.
- Duncan IJH, Fraser D. Understanding animal welfare. In: Appleby MC, Hughes BO (Ed.). *Animal welfare*. Cambridge: University Press; 1997. p. 19-31.
- Eisenstein TK, Hilburger ME. Opioid modulation of immune responses: effect on phagocyte and lymphoid cell populations. *The Journal of Neuroimmunology* 1998;15:36-44.
- Engel GL. The need for a new medical model: a challenge for biomedicine. *Science* 1977;196:129-36.
- File SE, Peet LA. The sensitivity of the rat corticosterone response to environmental manipulations and to chronic chlordiazepoxide treatment. *Physiology and Behavior* 1980;25:753-8.
- Fisher KN, Turner RA, Pineault G, Kleim J, Saari MJ. The postweaning housing environment determines expression of learning deficit associated with neonatal monosodium glutamate (M.S.G.). *Neurotoxicology and Teratology* 1991;13:507-13.
- Fraser D. Assessing animal well-being: common sense, uncommon science. In: U.S. Department of Agriculture (Ed.). *Food animal well-being conference and workshop*. West Lafayette, Indiana: Purdue University; 1993. p. 37-54.
- Gamallo A, Villanua A, Tranco G, Fraile A. Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats. *Physiology and Behavior* 1986;36:217-21.
- Haas HS, Schauenstein K. Neuroimmunomodulation via limbic structures - the neuroanatomy of psychoimmunology. *Progress in Neurobiology* 1997;51:195-222.
- Hennessy MB, Levine S. Sensitive pituitary - adrenal responsiveness to varying intensities of psychological stimulation. *Physiology and Behavior* 1978;21:295-7.
- Hiramoto R, Ghanta V, Solvason B, Lorden J, Hsueh C, Rogers C, Demissie S, Hiramoto N. Identification of specific pathways of communication between the CNS and NK cell system. *Life Sciences* 1993;53:527-40.
- Homo-Delarche F, Dardenne M. The neuroendocrine-immune axis. *Springer Seminars in Immunopathology* 1993;14:221-38.
- Hughes BO, Duncan IJH. The notion of ethological 'need', models of motivation and animal welfare. *Animal Behaviour* 1988;36:1696-1707.
- Iuvone L, Geloso MC, Dell'Anna E. Changes in open field behavior, spatial memory, and hippocampal parvalbumin immunoreactivity following enrichment in rats exposed to neonatal anoxia. *Experimental Neurology* 1996;139:25-33.
- Jurasca JM, Meyer M. Behavioral interactions of postweaning male and female rats with a complex environment. *Developmental Psychobiology* 1986;19:493-500.
- Latanè B. Gregariousness and fear in laboratory rats. *Journal of Experimental and Social Psychology* 1969;5:61-9.
- Levine S. The influence of social factors on the response to stress. *Psychotherapy and Psychosomatics* 1993;60:33-8.
- Levine S, Coe C, Wiener SG. Psychoneuroendocrinology of stress: a psychobiological perspective. In: Brush RF, Levine S (Ed.). *Psychoneuroendocrinology*. New York: Academic Press; 1989. p. 341-77.
- Novak MA, Suomi SJ. Psychological well-being of primates in captivity. *American Psychologist* 1988;10:765-73.
- O'leary A, Savard J, Miller SM. Psychoneuroimmunology: elucidating the process. *Current Opinion in Psychiatry* 1996;9:427-32.

- Pert C, Ruff MR, Weber RJ, Herkenham M. Neuropeptides and their receptors: a psychosomatic network. *The Journal of Immunology* 1985;135:820-6.
- Riittinen ML, Lindroos F, Kimanen A, Pieninkeroinen E, Pieninkeroinen I, Sippola J, Veilaht, J, Bergstrom M, Johansson G. Impoverished rearing conditions increase stress - induced irritability in mice. *Developmental Psychobiology* 1986;19:105-11.
- Ruis MAW, Brake JHA, Buwalda B, De Boer SF, Meerlo P, Korte SM, Blokhuis HJ, Koolhaas JM. Housing familiar male wildtype rats together reduces the long - term adverse behavioural and physiological effects of social defeat. *Psychoneuroendocrinology* 1999;24:285-300.
- Saari MJ, Fong S, Shivji A, Armstrong JN. Enriched housing masks deficits in place navigation induced by neonatal monosodium glutamate. *Neurotoxicology and Teratology* 1990;12:29-32.
- Seeman TE, McEwen BS. Impact of social environment characteristics on neuroendocrine regulation. *Psychosomatic Medicine* 1996;58:459-71.
- Stein M, Schiavi RC, Camerino M. Influence of brain and behavior on the immune system. *Science* 1976;191:435-40.
- Stokols D. Establishing and maintaining healthy environments, toward a social ecology of health promotion. *American Psychologist* 1992;47:6-22.
- Tannenbaum J. Ethics and animal welfare: the inextricable connection. *Journal of American Veterinarian and Medical Association* 1991;198:1360-76.
- Terranova ML, Cirulli F, Laviola G. Behavioral and hormonal effects of partner familiarity in periadolescent rat pairs upon novelty exposure. *Psychoneuroendocrinology* 1999;24:639-56.
- Turner AM, Greenough WT. Differential rearing effects on rat visual cortex synapses, synaptic and neuronal density and synapses per neuron. *Brain Research* 1985;329:195-203.
- Van De Weerd HA, Van Loo PLP, Van Zutphen LFM, Koolhaas JM, Baumans V. Preferences for nest boxes as environmental enrichment for laboratory mice. *Animal Welfare* 1998;7:11-25.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience* 1999;2:266-70.
- Voght JL, Coe CL, Levine S. Behavioral and adrenocorticoid responsiveness of squirrel monkeys to a live snake: is flight necessarily stressful? *Behavioral and Neural Biology* 1981;32:391-405.
- Weinberg J, Levine S. Psychobiology of coping in animals: the effects of predictability. In: S. Levine and H. Ursin (Ed.). *Coping and health*. New York: Plenum Press; 1980. p. 39-59.
- Wiepkema PR, Koolhaas JM. The emotional brain. *Animal Welfare* 1992;1:13-8.
- Wills GD, Wesley AL, Moore FR, Sisemore DA. Social interactions among rodent conspecifics: a review of experimental paradigms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1983;7:315-23.

# USO DEI PRIMATI NELLA RICERCA FISIOLOGICA ALLA LUCE DEL DECRETO LEGISLATIVO N. 116/1992

Paolo Battaglini

*Istituto di Fisiologia, Università degli studi di Trieste*

L'uso dei primati non umani nella ricerca fisiologica è dovuto al fatto che essi hanno caratteristiche non solo fisiologiche, ma anche anatomiche, genetiche e comportamentali molto simili a quelle dell'uomo. Tali somiglianze li rendono modelli particolarmente idonei ma anche per lo studio di sistemi neurologici complessi, per i quali altri animali non sarebbero in alcun modo adeguati. Ciò pone, però, problemi organizzativi ed etici ancor più rilevanti di quelli che già pone, di per sé, la sperimentazione animale.

A prescindere dalle valutazioni dottrinali e da quelle più intimamente connesse con la sensibilità individuale, le considerazioni che normalmente portano alla scelta di utilizzare o meno primati in una certa ricerca si basano sulla valutazione delle implicazioni e delle ricadute della ricerca stessa, espresse in termini di costi e benefici. I costi riconosciuti riguardano principalmente la violazione dell'integrità psicofisica di questi animali, il numero di soggetti che dovrebbe essere utilizzato, l'eventuale depauperamento delle popolazioni naturali e l'eventuale necessità di eutanasia. D'altra parte, i benefici obiettivamente valutabili concernono il valore dei risultati scientifici per il benessere della specie umana e l'eventuale risparmio nei costi della ricerca stessa.

E' evidente, già da questa essenziale presentazione del problema, che, mentre la valutazione dei costi è facilmente obiettiva, quella dei benefici è facilmente assoggettabile alle opinioni personali, all'attitudine ed ai sentimenti di chi dovesse esprimersi nel merito e non è quindi corretto che tale valutazione venga effettuata da singoli individui, in particolare se loro stessi sono coinvolti nella specifica ricerca presa in esame.

Questo, insieme all'esigenza, intrinseca nella sperimentazione scientifica, della standardizzazione o, comunque, della omogeneità delle procedure e, non ultimo, grazie alla pressione dell'opinione pubblica, ha da tempo portato la comunità scientifica internazionale a darsi regole precise circa l'utilizzo dei primati in laboratorio.

Inizialmente (fino a circa 40 anni fa) si trattava di semplici e chiare affermazioni o esposizioni di principi cui i singoli ricercatori si impegnavano ad attenersi, senza che fossero previsti controlli espliciti e sistematici. Col tempo, grazie alla sempre maggiore sensibilizzazione dei ricercatori ed alla crescente pressione dell'opinione pubblica, sono state pubblicate le prime direttive esplicite ed i conseguenti vincoli e preclusioni in caso di non osservanza: accesso alle riviste dei vari settori, possibilità di ottenere finanziamenti e così via.

Storicamente, le direttive che più hanno inciso sulla sperimentazione animale in generale e, di conseguenza, su quella fisiologica condotta sui primati non umani sono state quelle del National Institutes of Health (NIH, USA), quelle comprese nella dichiarazione di Helsinki, quelle della American Physiological Society, della Physiological Society (UK) e, finalmente, la prima direttiva comunitaria (CEE): la 609 del 1986 sulla base della quale è stata successivamente redatta la 116/1992 italiana.

Di seguito vengono riportati i capisaldi delle suddette linee-guida, al fine di comprendere l'evoluzione del pensiero e della attitudine "protezionista" nei confronti della sperimentazione primatologica da parte degli stessi ricercatori che la praticano (la maggior parte delle direttive comparse prima di quella comunitaria sono state redatte da organizzazioni o società scientifiche)

e meglio capire le ragioni dell'impatto, inizialmente negativo, che la legge italiana ha avuto al momento della sua promulgazione e se e quanto l'attuale sperimentazione ne sia stata influenzata o condizionata.

## **Direttive dei National Institutes of Health (NIH, USA)**

Nato nel 1887 come Istituto di Igiene, l'NIH è uno dei più importanti centri di ricerca mondiali. Con un budget di 15,6 miliardi di dollari, sostiene ed indirizza la ricerca biomedica in tutti i continenti. La prima guida all'assistenza ed utilizzo degli animali da laboratorio (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*) è stata pubblicata nel 1963 e da allora più volte aggiornata, fino alla stesura attuale, che consiste in un volume di più di 100 pagine, distribuito ad un prezzo quasi simbolico a chiunque ne faccia richiesta e liberamente consultabile in Internet all'indirizzo: <http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guidex.htm>. La guida è rivolta alle istituzioni ed ai singoli ricercatori che intendono sviluppare progetti che coinvolgono la sperimentazione animale, così da condurli in modo scientificamente, tecnicamente ed umanamente appropriato, secondo validi principi scientifici ed etici. La guida elenca le procedure per l'utilizzo "umano" degli animali nella ricerca biomedica, comportamentale, nell'insegnamento e in test di varia natura. Essa proclama la diretta responsabilità di chi organizza/pratica la sperimentazione animale. Per quanto riguarda i primati, in particolare, vengono presi in considerazione l'ambiente di stabulazione, le fonti di approvvigionamento, la medicina preventiva, la chirurgia, il trattamento del dolore, l'analgesia e l'anestesia, l'eutanasia.

## **Dichiarazione di Helsinki**

Adottata dalla 18th World Medical Assembly nel 1964 e varie volte emendata, fino al 1996, la Dichiarazione di Helsinki (consultabile al sito: <http://www.faseb.org/arvo/helsinki.htm>) è indirizzata alla classe medica e fa principalmente riferimento alla sperimentazione sull'uomo. Stabilisce, comunque, che la ricerca biomedica su soggetti umani "dovrebbe essere basata su una sperimentazione animale e di laboratorio adeguatamente condotta" e che "deve essere rispettato il benessere degli animali coinvolti nella ricerca". Valida, quindi, la sperimentazione animale praticata allo scopo di migliorare la salute umana, stabilendo parimenti che debba essere condotta adeguatamente, ma senza specificare i criteri di tale adeguatezza. Ciò nonostante, si è trattato di un importante punto di riferimento, ripreso e periodicamente pubblicato da varie riviste scientifiche, in quanto le apparentemente ovvie affermazioni concernenti il rispetto della individualità e della personalità umane sono state di fatto estese agli animali da laboratorio, assicurando loro una considerazione spesso molto superiore a quella di cui gli stessi animali godono, a volte, allo stato libero o comunque non in laboratorio.

## **Direttive della American Physiological Society**

La American Physiological Society (APS) è uno dei principali e più influenti organi scientifici a livello internazionale. La APS pubblica alcune fra le più prestigiose riviste nel campo della fisiologia, fra cui: *American Journal of Physiology*, *American Journals of Physiology*, *Journal of Applied Physiology*, *Journal of Neurophysiology*.

Le direttive della APS in tema di sperimentazione animale (consultabili al sito: <http://www.faseb.org/aps/animal.html>), pubblicate per la prima volta nel 1980, vincolano i soci, affiliati ed i ricercatori che intendano pubblicare sulle riviste della Società all'osservanza di norme riguardanti gli scopi della sperimentazione, l'approvvigionamento degli animali, la loro stabulazione, l'uso degli anestetici e l'eutanasia, l'utilizzo a scopi didattici. Nella sostanza, le norme non si discostano da quelle dell'NIH, ma la novità è rappresentata dagli aspetti sanzionatori nei confronti di coloro i quali non siano in grado di attestarne l'osservanza.

## Direttive della Physiological Society

La Physiological Society, fondata a Londra nel 1876, è la più influente società scientifica a livello europeo.

Dal 1987, la sua principale rivista, il *Journal of Physiology*, ha dato precise direttive sull'uso degli animali nella sperimentazione (consultabili al sito: <http://physiology.cup.cam.ac.uk/JPhysiol/NtC/ifora.html#experiments>), fra cui: “non pubblicherà lavori che descrivano esperimenti condotti su animali vivi che si possa ragionevolmente presumere abbiano inflitto inutilmente dolore o sofferenza”; e “accetterà esperimenti condotti su vertebrati solo se verrà fornita una dettagliata descrizione della anestesia e chirurgia e se verranno fornite le prove che si è ridotta al massimo la sofferenza degli animali”.

E' evidente come, mentre le direttive dei National Institutes of Health e la Dichiarazione di Helsinki abbiano essenzialmente lo scopo di fornire linee-guida e stabilire principi etico-scientifici cui attenersi nel condurre una sperimentazione animale, quelle delle società scientifiche vadano oltre l'affidarsi al buon senso ed alla coscienza dei singoli sperimentatori e delle istituzioni presso cui operano, ma diventino sanzionatorie verso chi non si adegui esplicitamente a quanto da loro indicato. La forza di tali posizioni è stata tale per cui, di fatto, è diventato praticamente impossibile pubblicare un lavoro scientifico su una rivista di qualità, se si sono utilizzati animali in assenza di rigorosi criteri metodologici e per fini non eticamente validi, ciò in conformità a linee guida dettagliate e dopo l'approvazione di comitati etici.

La elevata mobilità dei ricercatori, inoltre, rende praticamente impossibile nascondere le metodiche utilizzate, quando lo si desidera perché non conformi agli standard qualitativi e non è effettivamente possibile ottenere fondi in quantità adeguata a svolgere una ricerca impegnativa se non si pubblica su riviste di qualità. Questa ultima constatazione crea un circolo virtuoso, appositamente voluto dalla comunità scientifica di buon livello, atto a garantire non solo la tranquillità etica dei singoli ricercatori ed a minimizzare la possibilità di aggressione da parte delle componenti sociali più animaliste, ma ad assicurare anche standard qualitativi indispensabili per rendere i risultati della ricerca quanto più sicuri e paragonabili fra loro. E' questa la componente più egoista (e per questo affidabile) dell'atteggiamento “animalista” di chi pratica la sperimentazione: un animale non in buone condizioni produce risultati variabili e poco attendibili.

I laboratori di fisiologia ove, alla fine degli anni ottanta, si svolgeva sperimentazione su primati erano, in Italia, solo quattro, nelle Università di Bologna, Parma, Roma e Trieste. La complessità tecnologica che l'uso dei primati richiede, insieme alla collocazione internazionale dei laboratori stessi, li hanno da sempre obbligati alla stretta osservanza di procedure convalidate e all'adozione di consolidate norme etiche.

La naturale propensione della maggior parte dei buoni ricercatori alla riservatezza ed alcuni comportamenti criticabili da parte di altri hanno comunque fatto sì che l'opinione pubblica, soprattutto quella internazionale, non si accontentasse della autoregolamentazione e richiedesse ai propri governi la divulgazioni di norme e delle relative sanzioni nei casi di non ottemperanza.

Ciò ha portato alla promulgazione di varie leggi nazionali raccolte, per quanto riguarda l'Europa, nella direttiva CEE n. 609 del 1986, nata anche allo scopo di stimolare la relativa legislazione nazionale da parte degli Stati membri che non si erano ancora attivati.

## **Direttiva CEE n. 609 del 1986**

La direttiva (consultabile al sito: [http://europa.eu.int/eur-lex/it/lif/dat/1986/it\\_386L0609.html](http://europa.eu.int/eur-lex/it/lif/dat/1986/it_386L0609.html)) è forse la prima, importante legge sovranazionale a disciplinare la sperimentazione animale ed alla quale tutti gli Stati membri erano tenuti ad adeguarsi con proprie leggi appositamente promulgate. La direttiva è stata infatti promulgata specificatamente per "il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici" (art. 1). Per quanto riguarda i primati (ma non solo, ovviamente), vi vengono presi dettagliatamente in considerazione le modalità di stabulazione, la programmazione degli esperimenti, l'anestesia e le sue eccezioni, il sacrificio, la necessità di autorizzazione per procurare dolore, la qualificazione degli sperimentatori, la provenienza degli animali, la marchiatura degli stessi. Vengono inoltre riportate, come allegati, numerose tabelle per la stabulazione e la gestione specie (temperatura, umidità, dimensioni delle gabbie, ecc.).

E' particolarmente illustrativo dello spirito della direttiva, l'articolo 3.10.2 dell'allegato II, che recita: "Il comportamento dell'animale durante un esperimento dipende enormemente dalla fiducia che ripone nell'uomo, fiducia che occorre coltivare. L'animale selvatico, o randagio, non sarà probabilmente mai l'animale ideale per gli esperimenti. Diverso è il caso dell'animale domestico, nato ed allevato a contatto con l'uomo. La fiducia, una volta creatasi, va mantenuta. Si raccomanda, quindi, di intrattenere frequenti contatti, in modo che gli animali si abituino alla presenza ed alla attività dell'uomo. Se necessario, occorrerà dedicare un certo tempo a prendere confidenza con gli animali, ad occuparsene ed a pulirli. Nel trattare con gli animali, il personale dovrà dimostrare benevolenza, dolcezza e fermezza".

Nel suo complesso, quindi, la direttiva non si limitava ad indicare norme precise per il trattamento degli animali sperimentali, ma si preoccupava anche che la preparazione e l'atteggiamento psicologico degli addetti alla sperimentazione animale fossero adeguati all'ottenimento di standard qualitativi il più possibile condivisibili. La direttiva fu ben accolta dalla comunità scientifica, ed anche da quella fisiologica che operava sui primati non umani. I principi generali, infatti, erano facilmente accettabili e furono accolti favorevolmente anche i vari allegati che indicavano misure pratiche e precise da adottare nella stabulazione e nel trattamento generale degli animali. Vi furono solo critiche per alcune limitazioni o ristrettezze che non erano condivisibili da chi operava direttamente sul campo e che non furono rispettate, a favore degli animali stessi.

## **Il Decreto legislativo n. 116 del 1992**

Nonostante l'articolo 25 della CEE-609 prevedesse che "Gli Stati membri prendono le misure necessarie per conformarsi alla presente direttiva entro il 24 novembre 1989", fu solo nel 1992 che l'Italia promulgò la sua legge che, questa volta, non fu altrettanto bene accolta. La 116/1992, infatti, applicò pesantemente quanto previsto dall'art. 24 della CEE-609: "La presente direttiva non limita il diritto degli Stati membri di applicare, o di adottare, misure più rigide per la protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o per il controllo e la



limitazione dell'uso degli animali in esperimenti", dando origine a limitazioni che effettivamente portarono a forti rallentamenti, fino alla sospensione, della sperimentazione su primati per circa due anni.

Il DL.vo 116/1992 (consultabile al sito: <http://www.iss.it/leggi/Sperim.htm>) proibisce l'uso di cani, gatti e primati non umani, stabilisce le modalità per la comunicazione della sperimentazione che si intende svolgere (da inviare al Ministero della Sanità, Regione, Prefettura, Comune, USL), stabilisce la durata dei progetti, i criteri per la sperimentazione in deroga (indispensabile per i primati, insieme a cani e gatti) che possono trovare luogo solo in verifiche medico-biologiche essenziali (quindi non ricerca di base); impone la deroga per la conduzione di esperimenti a scopo didattico; impone la deroga per il non uso di anestetici; stabilisce le caratteristiche e le autorizzazioni per gli stabilimenti utilizzatori, cioè i laboratori dove viene svolta la sperimentazione.

Per quanto riguarda la sperimentazione sui primati, quindi, la legge ne consente lo svolgimento solo dopo aver ottenuto una specifica deroga alla proibizione e per un periodo massimo di tre anni. La legge era immediatamente operativa, ma nessuna struttura, ente o organizzazione era pronta a darne attuazione, in particolare ad esaminare e quindi concedere o negare le necessarie autorizzazioni a svolgere la sperimentazione. La nuova norma fu quindi accolta con disappunto dal mondo scientifico interessato: progetti già approvati da comitati etici nazionali e sovranazionali erano bruscamente interrotti e si temeva che ciò si ripercuotesse negativamente sul flusso di finanziamenti che da essi dipendeva. Un progetto scientifico di un certo livello deve, infatti, essere terminato e rendicontato nei tempi previsti al momento della stipula del contratto che ne ha determinato il finanziamento, ed i partner europei avevano difficoltà a capire la situazione che si era creata in Italia, per non parlare poi degli enti finanziatori sovranazionali, cui è preclusa, istituzionalmente, la possibilità di prendere in considerazione problematiche "locali".

Il DL.vo 116/1992 fu seguito da due circolari (17 e 18 del Ministero della Sanità, nel 1993), cui seguì la divulgazione della bozza del DM 22 dicembre 1993 (sempre del Ministero della Sanità), dove venivano dettate misure ancora più rigorose nell'utilizzazione degli animali ai fini sperimentali. Si consentiva, infatti, la sperimentazione su primati esclusivamente per "verifiche medico-biologiche essenziali per il conseguimento di risultati in settori di notevole rilevanza socio-sanitaria" e si vietavano (senza deroghe) gli esperimenti a scopo didattico-dimostrativo. A quasi due anni dalla pubblicazione del DL.vo 116/1992, la sperimentazione fisiologica su primati era di fatto sospesa ed il nostro Paese si trovava, in questo campo, in una posizione unica sia a livello europeo che nei confronti della comunità scientifica mondiale.

Lentamente, le pressioni esercitate dalla comunità scientifica nazionale ed internazionale e la presa di coscienza di una porzione dell'opinione pubblica che, mediamente, non era così estrema da condividere alla lettera le posizioni governative, portarono ad un ridimensionamento regolamentare che si manifestò con la Circolare del Ministero della Sanità n. 8 del 22 dell'aprile 1994. Qui l'intera materia veniva riordinata e regolamentata in modo chiaro e realistico. I principi e le regole del DL.vo 116/1992 non venivano intaccati, ma erano indicati con chiarezza e sobrietà i percorsi normativi per riprendere la normale attività sperimentale. Gli uffici ministeriali e, ancor più, l'Istituto Superiore di Sanità, si erano attrezzati per l'esame delle domande di autorizzazione alla sperimentazione sui primati in deroga alla normativa e diventò quindi possibile riprendere una accettabile attività di laboratorio.

Attualmente, rispetto a prima del DL.vo 116/1992, due nuove sedi universitarie (Modena e Verona) ospitano laboratori di fisiologia dove si conduce sperimentazione su primati non umani. Ciò è probabilmente accompagnato dalla riduzione del numero di primati che vengono utilizzati in ogni laboratorio, a causa del continuo miglioramento delle tecniche sperimentali e statistiche per l'analisi dei risultati raccolti. Dal punto di vista della limitazione della sperimentazione

animale, almeno per quanto riguarda i primati non umani, il DL.vo 116/1992 potrebbe non aver ottenuto l'effetto desiderato dai suoi estensori al momento della promulgazione.

Altri aspetti, però, sono sicuramente stati influenzati dalla legge. E' probabilmente migliorata la cura, negli stabulari e nei laboratori, dei primati, a causa dell'obbligo della supervisione di un veterinario. In passato, era molto difficile trovare medici veterinari con competenze sui primati non umani; recentemente, invece, e proprio per le obbligatorietà imposte dalla legge, un certo numero di questi professionisti ha ritenuto utile di migliorare le proprie conoscenze in questo campo, mettendo a disposizione degli sperimentatori competenze altrimenti difficili o impossibili da reperire. Si è probabilmente ottenuta anche una maggiore tranquillità dell'opinione pubblica che, come già detto, esigeva una regolamentazione nazionale della materia ed ora, più che in passato, rivolge la propria attenzione "animalista" verso settori diversi, forse non ancora adeguatamente sotto controllo. Gli sperimentatori stessi sono ora, generalmente, più tranquilli, grazie anche allo spirito di collaborazione degli organi e delle persone preposte al controllo della loro attività (veterinari, ma anche NAS, questure, ecc.).

Il quadro generale del dopo DL.vo 116/1992 è quindi mediamente positivo, una volta superata la fase iniziale e, fatta salva una certa lentezza burocratica da parte degli uffici ministeriali, è probabilmente legittimo affermare che la sperimentazione fisiologica sui primati non ne ha sofferto, ma potrebbe averne tratto un giovamento, forse superiore a quello comunque dovuto al normale trend internazionale.

# PROBLEMI METODOLOGICI LEGATI ALLA VALUTAZIONE DEL DOLORE NELL'ANIMALE DA ESPERIMENTO

Francesca Cirulli, Enrico Alleva, Sara Capogrossi Colognesi  
*Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e di Sistema, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Non è facile descrivere o analizzare il dolore, proprio per l'estrema soggettività che caratterizza una qualsiasi esperienza di angoscia o sofferenza causata da stimoli negativi o eventi spiacevoli. Il dolore, in particolare, è stato definito come una "spiacevole esperienza sensoriale ed emotiva associata a un danno effettivo o potenziale" (International Association for the Study of Pain, 1979). Oggi, lo sviluppo dell'etologia applicata e di discipline similmente interessate allo studio del benessere animale ha fornito strumenti utili al riconoscimento e allo studio del dolore. Attraverso l'osservazione comportamentale, infatti, si possono distinguere eventuali devianze dal normale comportamento, come manifestazioni esterne di uno stato di sofferenza o di malessere. La diagnosi di dolore negli animali deve dunque basarsi su giudizi sia clinici, sia etologici (Fraser, 1984; Viercki & Cooper, 1984; Wright *et al.*, 1985; Bateson, 1991).

I test attualmente utilizzati per studiare il dolore fisico o nocicettivo nei roditori erano stati originariamente concepiti per valutare l'efficacia delle proprietà analgesiche di determinate sostanze (Taber, 1974). Di questi, i più utili appaiono essere i test del (*radiant-heat tail flick* e dell'*hot plate*, poiché sono particolarmente sensibili agli oppiacei e ai composti oppiacei, sono semplici da organizzare e danno risposte ben precise (D'Amour & Smith, 1941; Woolfe & MacDonald, 1944). La differenza principale tra questi due test è che il primo, attraverso una stimolazione termica, rileva risposte di tipo riflesso, nel caso dell'*hot plate*, invece, si ritiene che le risposte siano "intenzionali", ovvero mediate a livello centrale.

Il test dell'*hot plate*, quello di cui ci occuperemo principalmente nella presente trattazione, venne per la prima volta descritto nel 1944 da Woolfe e MacDonald (Woolfe & MacDonald, 1944) e da oltre cinquant'anni viene utilizzato per saggiare la sensibilità al dolore di topi e ratti. Il test è estremamente semplice e consiste nel mettere un roditore su una superficie riscaldata, misurando l'intervallo di tempo (latenza) che intercorre prima che si verifichi una determinata risposta (es. il leccarsi la zampa) da parte del soggetto; il tutto per un periodo di tempo generalmente non superiore ai 60 secondi. Inizialmente la piastra veniva portata a temperature che si aggiravano tra i 55 e i 70°C. Successivamente, nel 1950, Eddy e alcuni suoi collaboratori (Eddy *et al.*, 1950) ridussero la temperatura della superficie a 55°C, valore generalmente adottato ancora oggi. Numerosi studiosi del comportamento animale si prefiggono tuttavia di ridurre ulteriormente tale temperatura.

La stimolazione termica appare una metodologia particolarmente efficace perché la temperatura rappresenta un elemento naturale che può essere controllato direttamente alla sorgente. Inoltre, durante il trattamento sperimentale, l'animale può reagire allo stimolo doloroso alzando o leccando le zampe, minimizzando la propria sofferenza. Infine, la temperatura attualmente utilizzata nell'*hot plate* (55°C) difficilmente può arrecare dolore acuto o gravi ustioni alla pelle di un roditore.

Sebbene l'*hot plate* sia largamente usato in ricerche neurofarmacologiche e psicofarmacologiche, sono pochi i ricercatori che abbiano condotto analisi sistematiche allo scopo di identificare il parametro comportamentale più adatto a saggiare il dolore negli animali. Eppure la scelta di una migliore variabile dipendente potrebbe facilitare la discriminazione degli

effetti anche di trattamenti blandi (riducendo quindi il rischio di incorrere in valori soglia) e permetterebbe perciò una riduzione del numero di soggetti sperimentali esposti a situazioni altamente stressanti. In questo articolo vogliamo sottolineare l'importanza che può assumere l'uso di una scala, basata su un'osservazione di tipo etologico, composta da tre fino a cinque categorie comportamentali. Con un simile strumento si potrebbero infatti riconoscere le componenti locomotorie, esplorative ed emotive (essendo queste ultime anche una funzione di precedenti esperienze con l'ambiente del test o dell'isolamento sociale), che sottendono al comportamento di un soggetto, e quindi si potrebbero identificare i tratti comportamentali realmente indicativi della paura. In Tabella 1 sono mostrati i comportamenti di ratti e topi sottoposti al test dell'*hot plate*. La scala di valutazione adottata rappresenta un'effettiva metodologia per cercare di minimizzare le sofferenze dell'animale.

**Tabella 1. Etogramma di topi e ratti nel test dell'*hot plate***

Risposte	Comportamento
<b>al dolore</b>	
<i>forepaw licking</i>	L'animale si appoggia sulle zampe posteriori e si lecca quelle anteriori
<i>hindpaw licking</i>	L'animale si lecca le zampe posteriori inclinando la testa
<i>testicles licking</i>	(raro)
<b>di esplorazione/fuga</b>	
<i>wall rearing</i>	L'animale si appoggia alle pareti del cilindro tenendosi sulle zampe posteriori
<i>rearing</i>	L'animale sta eretto sulle zampe posteriori
<i>jumping</i>	L'animale salta per evitare il contatto con la piastra calda

(Modificata da: Cirulli *et al.* In: Balls M, van Zeller AM, Halder ME (Ed.). *Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of animal experimentation*. Elsevier Science B.V.; 2000)

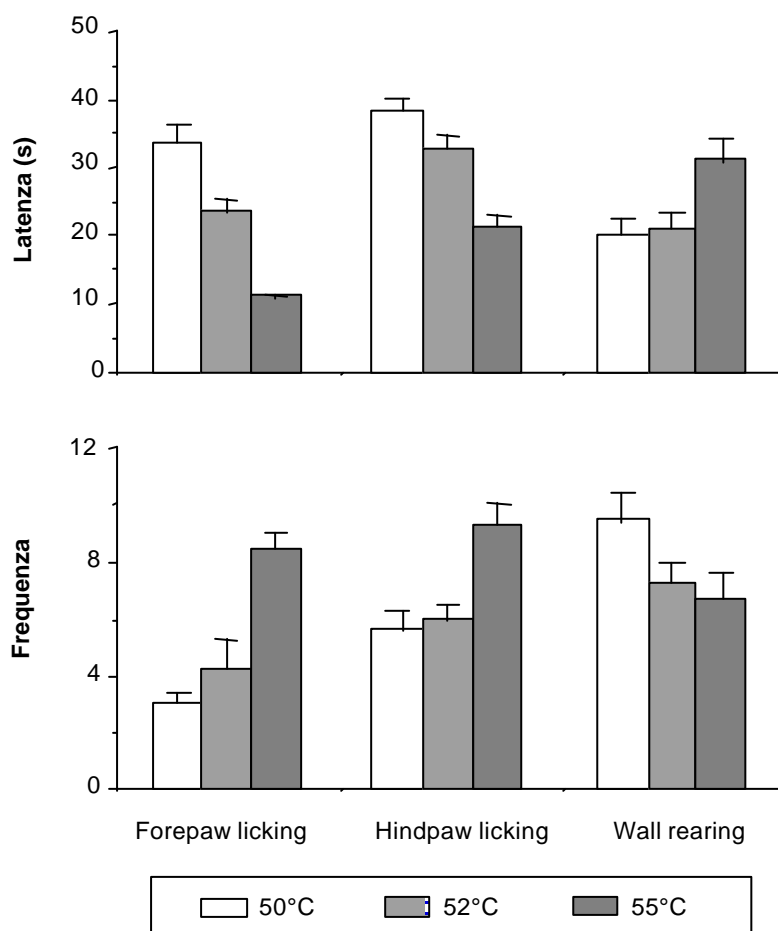
La sensibilità al dolore, nel test dell'*hot plate*, è stata misurata attraverso il calcolo del tempo di latenza al primo *licking* alla zampa anteriore, di quello alla zampa posteriore, o a una qualsiasi delle zampe. Secondo la nostra esperienza il comportamento più idoneo a valutare se l'animale sente dolore è il *licking* di una delle zampe posteriori. Infatti il *licking* delle zampe anteriori può essere falsato dal comportamento di *wall rearing* ed in effetti è stata evidenziata una competizione tra questi due comportamenti: se il soggetto, dopo essere stato messo nell'apparato sperimentale, attua un *wall rearing*, l'intervallo di tempo prima del *licking* delle zampe anteriori sarà maggiore di quello atteso. Infatti durante il *wall rearing* le zampe anteriori non si trovano in contatto con la superficie surriscaldata e quindi, in quell'intervallo di tempo, non sono sottoposte allo stimolo termico. Questa competizione si osserva soprattutto a basse temperature (tra i 50 e i 52°C), poiché in queste condizioni il primo comportamento mostrato è il *wall rearing* e non il *licking* delle zampe anteriori (Figura 1).

Al contrario, quando la temperatura è alta, gli animali si leccano le zampe anteriori appena inseriti nell'apparato. Questi dati spiegano le discrepanze che emergono in studi differenti, in cui si siano utilizzati diversi parametri comportamentali, come il *licking* delle zampe anteriori o quello delle zampe posteriori e soprattutto perché quest'ultimo rappresenta la misura più attendibile per lo studio della sensibilità al dolore nei roditori (Bigi *et al.*, 1993a; Bigi *et al.*, 1993b).

Gli animali presentano, soprattutto ad alte temperature, comportamenti diversi, quali l'accucciarsi o il leccarsi i testicoli. Per eliminare effetti che possono falsare la validità dell'esperimento, oltre che modificare la temperatura, si può scegliere la dimensione più appropriata per l'apparato sperimentale. Infatti, per evitare risposte indesiderate (come es. il

*wall rearing*) la superficie dell'*hot plate* deve tener conto, non solo della dimensione della specie che si sta analizzando, ma anche della razza e dell'età dell'animale.

La presenza di dolore dovrebbe essere studiata non solo attraverso le reazioni comportamentali a un forte stimolo termico, ma anche, e soprattutto, attraverso le variazioni comportamentali provocate da intensità intermedie dello stimolo stesso. Noi abbiamo valutato cambiamenti nel tempo di latenza e nella frequenza dei comportamenti comunemente mostrati da ratti e topi nel test dell'*hot plate*, quando la temperatura della piastra veniva portata da 50 a 55°C.



**Figura 1. Latenza e frequenza di *licking* delle zampe anteriori, posteriori e di *wall rearing* in topi maschi adulti CD-1 esposti a diverse temperature (n.=24 soggetti in ciascun gruppo)**

(Modificata da: Cirulli *et al.* In: Balls M, van Zeller AM, Halder ME (Ed.). *Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of animal experimentation*. Elsevier Science B.V.; 2000)

E' importante sottolineare che, a differenza di quanto avviene per il *licking* delle zampe (anteriori e posteriori), la latenza del *wall rearing* non diminuisce all'aumentare della temperatura. Dall'esperimento risulta infatti che a 55°C la latenza di *wall rearing* è maggiore di quella presente tra i 50 e i 52°C. Questo dato può essere spiegato osservando il comportamento degli animali a temperature differenti: se la temperatura è molto alta i roditori, in genere, prima

si leccano le zampe e poi mostrano comportamenti esplorativi, quali il *wall rearing*. La stessa discrepanza tra i diversi profili comportamentali si osserva analizzando le frequenze, anziché le latenze (Figura 1). Tale risultato rafforza la nozione che la reazione di *wall rearing* non dovrebbe essere utilizzata come indice di dolore.

Un altro comportamento osservabile è costituito dai salti (Della Seta *et al.*, 1994), che potrebbero indicare un tentativo di interrompere il contatto tra le zampe e la superficie surriscaldata, oppure la riduzione di comportamenti esplorativi in un ambiente familiare, o entrambe. La modificazione di questa risposta attraverso prove successive (essa aumenta in test ripetuti per poi attenuarsi nuovamente) suggerisce una curva di apprendimento: il soggetto cerca di evitare lo stimolo termico saltando, ma dopo pochi tentativi inefficaci impara che non può scappare e riduce dunque questo comportamento. È stato inoltre ipotizzato che nel test dell'*hot plate* la risposta di *licking* delle zampe (latenza breve) potrebbe rappresentare la componente sensoriale del dolore, mentre il salto (latenza lunga) potrebbe indicarne la componente affettiva (Amir *et al.*, 1979), essendo quest'ultima una funzione dei cambiamenti indotti dallo stress nella sensibilità al dolore che incide su determinate stimolazioni, come il rilascio di endorfine ed encefaline, che possono influenzare i processi di elaborazione del sistema nervoso centrale (Viercki & Cooper, 1984). In supporto a quest'ultima ipotesi è stato mostrato che se le componenti sensoriali ed affettive del dolore vengono manipolate selettivamente, per esempio attraverso cambiamenti nei ligandi degli oppiacei endogeni, la risposta di salto ne viene influenzata, mentre la latenza di *licking* delle zampe rimane invariata (Amir *et al.*, 1979).

Sono stati condotti ampi e dettagliati studi allo scopo di approfondire le differenze intraspecifiche nella sensibilità al dolore dei roditori. Attraverso il test dell'*hot plate* (Rodgers & Hendrie, 1983) si è dimostrato che in seguito a combattimenti intraspecifici, i topi maschi possono presentare uno stato di analgesia o iperalgesia, a seconda della propria posizione sociale (Alleva, 1993). È soprattutto nelle prime fasi dello sviluppo postnatale, che si verificano i maggiori cambiamenti, quando gli animali affrontano le prime esperienze sociali, e subiscono modulazioni nella sensibilità al dolore (così come alla morfina) che avranno effetti di lungo termine (Alleva *et al.*, 1986). Per esempio i topi maschi cresciuti in lettiera composta unicamente da maschi mostrano una minore sensibilità alla morfina, in confronto ai loro simili cresciuti in lettiera a composizione mista.

Inoltre Rodgers e Hendrie (Rodgers & Hendrie, 1983) hanno dimostrato che topi maschi, alloggiati singolarmente (isolamento sociale), presentano un aumento di circa l'80% nel tempo di latenza del *licking* delle zampe posteriori, rispetto ai loro corrispettivi alloggiati in gruppo. Altri autori, tuttavia, pur usando paradigmi sperimentali molto simili, non hanno trovato lo stesso effetto. Una simile discrepanza può essere dovuta alle differenze nelle popolazioni di recettori oppiacei presenti nei diversi ceppi di topi presi in esame, oppure alle variazioni diurne nell'attività degli oppiacei. In effetti sono state dimostrate variazioni nella sensibilità al dolore tra le varie linee. Per esempio la morfina sembra esercitare un maggiore effetto analgesico sui DBA rispetto agli C57 (Alleva *et al.*, 1980). In particolare, è facile trovare alterazioni nella sensibilità al dolore in linee geneticamente modificate. Mentre alcuni di questi cambiamenti sono attesi (Lee *et al.*, 1992), altri potrebbero essere più difficili da prevedere, risultati di indesiderati effetti pleiotropici o di cambiamenti secondari negli obiettivi neurali dell'intervento genetico. Nel caso degli animali transgenici, è dunque consigliabile cominciare con temperature molto basse dell'*hot plate*, così da stimare i livelli basali di dolore, prima di esporre gli animali a eventuali danni ai tessuti o a inutili livelli di sofferenza.

Oltre a queste differenze dovute al ceppo dell'animale, esistono naturalmente differenze specie-specifiche nella sensibilità al dolore: non è possibile elaborare test standardizzati da usare indifferentemente su varie specie di roditori, poiché ci potremmo trovare di fronte a risposte imprevedibili. Per esempio uno stimolo ecologicamente rilevante, quale l'odore di un predatore,

può dare adito a risposte assai diverse nelle differenti specie di roditori (Carere *et al.*, 1999). La sensibilità di organi e tessuti dipende dal tipo di innervazione, dalle caratteristiche dello stimolo, e da un'eventuale sensibilizzazione a livello del recettore, dovuta, per esempio, a reazioni patologiche del tessuto (come un'inflammazione). Dai dati riportati non è possibile rilevare alcun effetto significativo dei segnali del predatore sui livelli di dolore, sebbene nel comportamento di *licking* delle zampe posteriori siano riscontrabili alcune differenze sesso-dipendenti. E' possibile che la bassa temperatura scelta per l'*hot plate* ( $50\pm 1^\circ\text{C}$ ), con lo scopo di minimizzare la stimolazione dolorosa, abbia mascherato effetti analgesici più marcati. Questa ipotesi è avvalorata dal fatto che nell'esperimento sono stati usati topi del deserto (*Acomys cahirinus*), specie che abita aree rocciose di regioni desertiche o semi-desertiche. E' dunque prevedibile che particolari adattamenti fisiologici abbiano reso la pelle delle zampe di questi topi più resistente al calore, rispetto a quella di altre specie di roditori.

Si è già accennato all'importanza che può avere l'età nello studio della sensibilità al dolore. In particolare lo sviluppo è un periodo critico, durante il quale avvengono processi di maturazione che influenzano la conducibilità stessa delle fibre nervose. Durante tale fase è necessario agire con estrema cautela, poiché gli animali possono mostrarsi particolarmente vulnerabili a stimoli dolorosi. In effetti dai nostri dati emerge che gli animali più giovani presentano latenze maggiori nel test dell'*hot plate* e sono più sensibili alla morfina (Alleva *et al.*, 1987). Inoltre il comportamento di salto è espresso a livelli molto più alti nei giovani topi CD-1 in confronto ai soggetti adulti (Alleva *et al.*, 1997). Negli animali giovani, un'alta frequenza di salto potrebbe rappresentare un indice di maggiore eccitabilità (o aumento nella reazione di dolore), sebbene potrebbe anche essere dovuta ad una immaturità neuromuscolare e di coordinazione motoria.

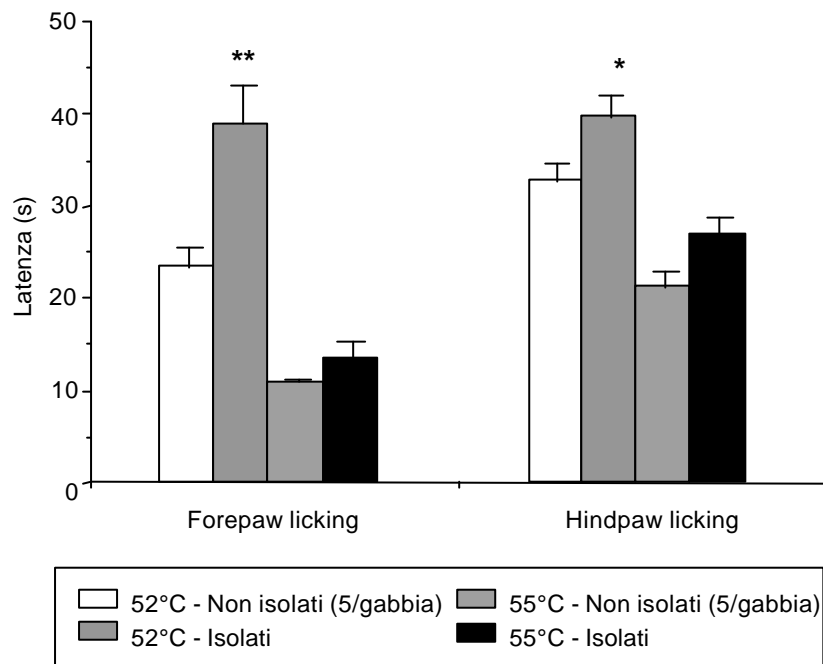
Abbassare l'intensità dello stimolo termico è auspicabile per due ragioni. Innanzitutto permette allo sperimentatore di saggiare effetti lievi del trattamento che non sarebbero rilevabili ad alte temperature, incrementando così la qualità dei dati. Inoltre, riducendo l'intensità della stimolazione dolorosa, si riduce la sofferenza dell'animale. Entrambi questi punti sono in linea con la necessità di migliorare le procedure sperimentali, esigenza espressa per la prima volta da Russell e Burch (Russell & Burch, 1992) nel loro testo classico: "semplicemente per minimizzare il dolore imposto a questi animali che in ogni caso vengono usati" (Flecknell, 1994).

Nella nostra esperienza la temperatura a cui viene portato l'*hot plate* presenta variabili critiche per discriminare gli effetti del trattamento.

La Figura 2 illustra uno studio condotto su topi maschi Swiss albinici CD-1. Questi soggetti maschi sono stati precedentemente isolati per un periodo di quattro settimane. Quando sono state saggiate le loro risposte nocicettive in un test di *hot plate*, è stato osservato un effetto significativo dell'isolamento sui livelli di dolore se la temperatura veniva tenuta a  $52^\circ\text{C}$ , ma questo effetto si perdeva a  $55^\circ\text{C}$  (Figura 2).

In aggiunta a questi dati, studi precedenti hanno dimostrato che mentre gli effetti analgesici della morfina vengono facilmente identificati quando l'*hot plate* si trova a  $55^\circ\text{C}$ , gli effetti di analgesici non-narcotici con deboli effetti nocicettivi possono essere rilevati a  $50^\circ\text{C}$  o a temperature minori (Hunskaar *et al.*, 1986; Anker, 1974).

Questi stessi autori hanno anche ideato un *hot plate* a temperatura crescente per ratti e topi, per saggiare gli effetti di composti farmacologici che non possono essere saggiati con l'*hot plate* classico (Hunskaar *et al.*, 1986).



**Figura 2. Latenza di *licking* delle zampe anteriori e posteriori in topi adulti CD-1 precedentemente isolati o non isolati, saggiati a diverse temperature (n. = 24 soggetti in ciascun gruppo) \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$**

(Modificata da: Cirulli *et al.* In: Balls M, van Zeller AM, Halder ME (Ed.). *Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of animal experimentation*. Elsevier Science B.V.; 2000)

Per concludere quindi vogliamo sottolineare che le esperienze sociali sembrano essere delle variabili importanti da considerare quando si disegna un esperimento che produrrà un qualche grado di sofferenza e che l'accurata pianificazione dell'esperimento può diminuire il grado di dolore subito dagli animali di cui ci serviamo. L'*hot plate* è solo uno dei test che richiederebbero di ulteriori miglioramenti. E' necessaria una valutazione di tipo etologico (Alleva *et al.*, 1998), che implichi uno stretto contatto tra sperimentatore e soggetto animale scelto (e forse inconsciamente preferito) (Visalberghi & Alleva, 1998). Solo attraverso questo tipo di approccio sarà possibile standardizzare i metodi volti a minimizzare la sofferenza animale.

## Riferimenti bibliografici

Alleva E, Aloe L, Cirulli F, De Acetis L, Padoa-Schioppa C. Postnatal NGF administration causes adult hyperalgesia and overreactivity to social stimuli but does not reverse capsaicin induced hypoalgesia. *Psychoneuroendocrinology* 1997;22:591-602.

Alleva E, Caprioli A, Laviola G. Postnatal social environment affects morphine analgesia in male mice. *Physiol Behav* 1986;36:779-81.

Alleva E, Castellano C, Oliverio A. Effects of L- and D-amino acids on analgesia and locomotor activity of mice: their interaction with morphine. *Brain Res* 1980;198:249-52.

Alleva E, Laviola G, Bignami G. Morphine effects on activity and pain reactivity of developing mice with or without late prenatal oxazepam exposure. *Psychopharmacology* 1987; 92: 438-440.



- Alleva E, Rankin J, Santucci D. Methodological analysis in behavioral toxicology: an ethotoxicological approach. *Toxicol Industr Health* 1998;14:325-32.
- Alleva E. Assessment of aggressive behaviour in rodents. In: Conn PM (Ed.). Paradigms for the study of behavior. *Meth Neurosci* 1993;14:111-37.
- Amir S, Brown ZW, Amit Z. The role of endorphins in stress: evidence and speculations. *Neurosci Biobehav Rev* 1979;4:77-86.
- Ankier SI. New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic antagonist activities. *Eur J Pharmacol* 1974;27:1-4.
- Bateson P. Assessment of pain in animals. *Anim Behav* 1991;42:827-39.
- Bigi S, De Acetis L, Chiarotti F, Alleva E. Substance P effects on intraspecific aggressive behaviour of isolated male mice: an ethopharmacological analysis. *Behav Pharmacol* 1993a;4:495-500.
- Bigi S, De Acetis L, De Simone R, Aloe L, Alleva E. Neonatal capsaicin exposure affects isolation-induced aggressive behavior and hypothalamic substance P levels in adult male mice. *Behav Neurosci* 1993b;107:263-369.
- Carere C, Casetti R, De Acetis L, Perretta G, Cirulli F, Alleva E. Behavioural and nociceptive response in male and female spiny mice (*Acomys cahirinus*) upon exposure to snake odour. *Behav Proc* 1999;47:1-10.
- D'amour EE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 1941;72:74-9.
- Della Seta D, De Acetis L, Aloe L, Alleva E. NGF effects on hot plate behaviors in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;49:701-05.
- Eddy NB, Touchberry CF, Lieberman JE. Synthetic analgesics. I. Methadone isomers and derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 1950;98:121-37.
- Flecknell PA. Refinement of animal use-assessment and alleviation of pain and distress. *Lab Anim* 1994;28:222-31.
- Fraser AF. The behaviour of suffering in animals. *Appl Anim Behav Sci* 1984;13:1.
- Hunnskaar S, Berge OG, Hole KA. Modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. *Behav Brain Res* 1986;21:101-8.
- International Association for the Study of Pain. Report of subcommittee on taxonomy. *Pain* 1979;6:249-52.
- Lee KF, Li E, Huber LJ, Landis SC, Sharpe AH, Chao MV, Jaenisch R. Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell* 1992;69:737-49.
- Rodgers RJ, Hendrie CA. Social conflict activates status-dependent endogenous analgesic or hyperalgesic mechanisms in male mice: effects of naloxone on nociception and behaviour. *Physiol Behav* 1983;30:775-80.
- Russel WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*. South Mimms, USA: University Federation for Animal Welfare; 1992.
- Taber RI. Predictive value of analgesic assays in mice and rats. In: Braude MC, Harris LS, May EL, Smith JP, Villarreal JE (Ed.). *Narcotic antagonists. Advances in biochemical psychopharmacology*. New York: Raven Press, 1974. p. 191-212.
- Viercki CJ Jr, Cooper BY. Guidelines for assessing pain modulation in laboratory animal subjects. In: Kruger L, Liebeskind JC (Ed.). *Advances in pain research and therapy*. New York: Raven Press, 1984. p. 305-22.
- Visalberghi E, Alleva E. Book review of: the inevitable bond: Examining scientist-animal interactions. Davis D, Balfour D (Ed.). Cambridge UP (1992). *Quart J Exptl Psychol* 1998; 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.

Wright EM Jr, Marcella KL, Woodso JF. Animal pain: evaluation and control. *Lab Anim* 1985;20.

**Problematiche legate  
alle metodiche alternative e alle biotecnologie**



# L'ANIMALE DA LABORATORIO E LE BIOTECNOLOGIE IN EUROPA: DIFFERENZE NORMATIVE NEI PAESI MEMBRI DELL'UNIONE EUROPEA

Gianluca Panzini, Rodolfo Lorenzini

*Servizio Qualità e Sicurezza della Sperimentazione Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

La continua evoluzione di biotecnologie correlate alla sperimentazione animale impone una riflessione sulla necessità di disporre di una maggiore regolamentazione legislativa in una materia che presenta indubbe ripercussioni etiche.

Il Servizio Qualità e Sicurezza della Sperimentazione Animale (SQSSA), trovandosi spesso chiamato nello svolgimento della sua attività istituzionale a fornire pareri sulla liceità dell'impiego di biotecnologie che implicano l'utilizzo di animali, senza poter disporre dell'ausilio in un substrato normativo adeguato, ha verificato se negli altri paesi dell'Unione Europea siano state adottate soluzioni legislative specifiche nei settori della clonazione animale, della transgenesi animale e dell'utilizzo di animali per l'esecuzione di xenotrapianti a fini sperimentali.

Rivolgendosi direttamente alle autorità competenti degli stati membri dell'Unione, e avvalendosi altresì delle informazioni fornite da alcune associazioni protezionistiche, il SQSSA ha quindi eseguito un'indagine conoscitiva al fine di verificare l'esistenza di legislazioni specifiche e, dove possibile, il numero ed il tipo di sperimentazioni in corso nell'ambito dei settori di ricerca sopraccitati.

Vengono quindi riportate le informazioni, non sempre totalmente esaustive, ottenute da quegli stati, membri dell'Unione Europea, che hanno risposto all'indagine conoscitiva effettuata dal Servizio Qualità e Sicurezza della Sperimentazione Animale.

## Austria

La produzione di vertebrati transgenici è regolamentata in Austria dall'Austria Gene Technology Act che è entrato in vigore in questo paese nel 1995. All'articolo 9 la legge stabilisce che la produzione di vertebrati transgenici, nei casi in cui la specie animale venga modificata, è permessa unicamente per finalità biomediche o di ricerca scientifica; essa regola vari aspetti delle biotecnologie e dell'ingegneria genetica quali l'uso confinato degli organismi geneticamente modificati (OGM), il rilascio di OGM nell'ambiente, l'immissione sul mercato di prodotti contenenti OGM, e l'applicazione di alcune biotecnologie, come l'analisi e la terapia genica, in campo medico.

Questa legge prescrive altresì le procedure amministrative necessarie ad ottenere l'autorizzazione a lavorare con OGM in ambienti confinati.

La clonazione di animali è un problema legale non regolamentato dall'Austria Gene Technology Act, in quanto tale normativa riguarda unicamente gli OGM; attualmente in Austria non esiste alcuna regolamentazione giuridica che vieti o limiti la clonazione animale.

Nel settore degli xenotrapianti l'utilizzo di animali è regolato in Austria unicamente dall'Austria Act on Animal Testing che rappresenta il recepimento austriaco della Direttiva

europea 86/609/EEC ed ha come fine principale la tutela del benessere degli animali utilizzati per scopi sperimentali.

## Belgio

In Belgio non esiste una legislazione specifica che regola la produzione di animali transgenici, la clonazione animale o l'utilizzo di animali per l'esecuzione sperimentale di xenotrapianti.

Tuttavia la produzione e l'uso di animali transgenici sono regolamentati dalle normative regionali finalizzate a garantire un uso confinato di organismi patogeni e/o geneticamente modificati. Le suddette normative regionali regolano anche la clonazione animale e l'esecuzione di xenotrapianti a fini sperimentali allorché tali attività sperimentali implicino, come spesso accade, l'utilizzo di OGM.

Queste leggi regionali rappresentano il recepimento belga della Direttiva 90/219/EEC sulla biosicurezza nelle tre regioni del Belgio e coprono sia l'uso di OGM, quali animali o piante transgeniche e/o materiale transgenico *in vitro* umano o animale, sia l'uso di organismi patogeni per l'uomo, gli animali o le piante.

Tutti i laboratori o le industrie che lavorano con OGM e/o patogeni devono darne comunicazione all'autorità regionale competente e, in relazione al tipo di struttura ed al livello di rischio, sono soggetti ad una preventiva autorizzazione da parte della suddetta autorità regionale competente. Prima che tale autorizzazione venga rilasciata, il dossier del richiedente deve essere analizzato dal Biosafety Council che, insieme al suo segretariato, il Service of Biosafety and Biotechnology (SBB), ha esaminato, a partire dal 1994, 28 dossier correlati con l'uso di animali transgenici.

Il SBB stima che il 50% delle strutture, che attualmente lavorano in Belgio con OGM, hanno ottemperato con quanto previsto dalla normativa vigente, mentre, soprattutto a livello universitario, diverse strutture devono ancora regolarizzare la loro situazione.

Nessun esperimento di clonazione animale o di xenotrapianto sperimentale è stato notificato in Belgio, tuttavia due trial clinici, che comportano l'inoculo intratumorale in pazienti di cellule murine produttori vettori retrovirali, sono stati autorizzati presso l'Hospital Erasme di Bruxelles; il Biosafety Council ha esaminato tale attività sperimentale così come viene fatto per ogni protocollo di *gene therapy*.

Il SBB ha anche proposto all'autorità federale competente in Belgio che il Biosafety Council potrebbe esprimere pareri anche sui protocolli di xenotrapianto al fine di compensare il vuoto legislativo in tale settore.

L'uso di animali a scopo sperimentale è infine regolato dalla normativa federale sul benessere animale che rappresenta il recepimento belga della Direttiva europea 86/609/EEC.

## Danimarca

La produzione di animali transgenici è permessa sia per gli animali da reddito che per gli animali da laboratorio ed il topo dovrebbe essere l'unico mammifero transgenico prodotto in Danimarca.

Il parlamento danese ha votato il 22 maggio 1997 una moratoria sulla clonazione animale; essa è permessa a fini di ricerca, mentre non può essere impiegata per scopi produttivi nel settore zootecnico. E' permesso che vengano fatti nascere individui ottenuti tramite clonazione

embrionale, mentre possono essere iniziate, ma non portate a termine, gravidanze con embrioni ottenuti tramite clonazione somatica.

Un solo gruppo lavora attualmente sulla clonazione nei bovini al fine di studiare le differenze tra gli embrioni clonati ed altri tipi di embrioni.

La produzione di animali da utilizzare nell'esecuzione xenotrapianti sperimentali è permessa in Danimarca, però, attualmente, nessun gruppo sta lavorando in questo settore.

Tutti gli esperimenti sopraccitati, così come qualsiasi utilizzo di vertebrati a scopo sperimentale, sono infine soggetti al recepimento danese della Direttiva europea 86/609/EEC.

## **Finlandia**

Secondo quanto previsto dalla normativa finlandese qualsiasi tipo di sperimentazione animale è regolato dal Act on Animal Protection (247/1996) ed è soggetto al rilascio di una preventiva autorizzazione.

Allorché la sperimentazione implichi la produzione di animali transgenici essa deve essere notificata al Board of Gene Technology.

Il Gene Technoloy Act (377/1995) ed il Gene Technology Degree (821/1995) regolamentano la produzione e l'utilizzo di animali transgenici e prescrivono che debba essere istituito il Board for Gene Technology ed un Advisory Board for Biotechnology. Ogni Istituto deve notificare al Board for Gene Technology l'impiego di animali transgenici insieme ad una valutazione dei possibili effetti negativi prodotti sugli animali; l'utilizzo degli OGM può iniziare 60 giorni dopo l'arrivo della notificazione.

L'Advisory Board for Biotechnology ha, tra i suoi compiti principali, quello di valutare gli aspetti etici delle diverse sperimentazioni.

Vengono qui elencate le attività sperimentali effettuate nei tre settori nelle diverse province finlandesi:

### **Provincia della Finlandia Meridionale**

*Animali transgenici:* circa 30 autorizzazioni/anno con un utilizzo di 6000-8000 animali.  
*Clonazione:* nessun esperimento.  
*Xenotrapianti:* 5-8 esperimenti/anno tra ratto-topo e coniglio-suino con un utilizzo di 200-300 animali.

### **Provincia di Oulu**

*Animali transgenici:* 16000-18000 animali prodotti annualmente nell'Università di Oulu.  
*Clonazione:* nessun esperimento.  
*Xenotrapianti:* nessun esperimento.

### **Provincia di Tampere**

*Animali transgenici:* tutti forniti dagli Stati Uniti.  
*Clonazione:* nessun esperimento.  
*Xenotrapianti:* 200 topi/anno utilizzati in ricerche sul tumore della prostata e del seno.

## **Provincia di Turku**

*Animali transgenici:* 6100 topi e 200 ratti/anno.  
*Clonazione:* 1 progetto (pesce zebra).  
*Xenotrapianti:* nessun progetto.

## **Francia**

Il Ministero dell'Agricoltura è l'autorità competente per quanto riguarda la tutela del benessere degli animale da laboratorio in ottemperanza a quanto previsto dall'applicazione del recepimento francese della Direttiva Europea 86/609/EEC.

In Francia esiste inoltre una normativa relativa al controllo della produzione, dell'utilizzazione e della disseminazione degli organismi geneticamente modificati ed il controllo viene effettuato dal Ministero della Ricerca Scientifica e dal Ministero dell'Ambiente.

In Francia vengono effettuati esperimenti in tutti i tre settori.

## **Germania**

In Germania la produzione di animali transgenici, la clonazione animale e l'utilizzo di animali per esperimenti relativi agli xenotrapianti non sono vietati; qualsiasi utilizzo di animali a fini sperimentali è regolamentato dal German Animal Welfare Act; l'autorità competente è rappresentata dai vari Land che rilasciano le autorizzazioni avvalendosi dell'aiuto di una commissione composta da esperti scientifici e da membri proposti dalle organizzazioni protezionistiche.

In Germania esiste anche il Gene Technology Act che riguarda unicamente gli aspetti relativi alla sicurezza, fornendo, ad esempio, regole atte a prevenire la diffusione nell'ambiente di OGM.

## **Irlanda**

L'utilizzo di animali deve essere autorizzato dal Minister for Health and Children; per quanto riguarda i tre settori interessati dalla indagine conoscitiva non esiste una legislazione speciale e non viene effettuato alcun esperimento.

## **Lussemburgo**

L'utilizzo di animali deve essere autorizzato dal Ministero della Sanità; per quanto riguarda i tre settori interessati dalla indagine conoscitiva non esiste una legislazione speciale e non viene effettuato alcun esperimento.



## Olanda

A partire dal 1997 non è più possibile in Olanda applicare agli animali biotecnologie, quali produzione di transgenici, clonazione o xenotrapianti sperimentali, senza la preventiva autorizzazione del Ministry of Agriculture, Nature Management and Fisheries.

Tale Ministero decide se rilasciare l'autorizzazione dopo aver interpellato un Comitato sulle Biotecnologie Animali.

L'autorizzazione viene rilasciata unicamente se non vi sono conseguenze inaccettabili sulla salute e sul benessere degli animali e se non vi sono obiezioni etiche in relazione agli scopi della sperimentazione, alla possibilità di metodi alternativi e agli effetti sull'integrità dell'animale.

Il rilascio dell'autorizzazione è regolamentato dal Animal Biotechnology Decree che stabilisce anche la composizione del Comitato sulle Biotecnologie Animali: esso deve composto al massimo da nove membri tra i quali vi deve essere un esperto di problemi etici, un esperto di scienze sociali, due esperti di biotecnologie, un esperto di sperimentazione animale, un etologo, un veterinario ed un medico.

Fino ad ora sono state rilasciate 54 autorizzazioni per progetti che riguardano principalmente la produzione di animali transgenici nell'ambito della ricerca biomedica.

Nessun esperimento di clonazione tramite trasferimento nucleare viene effettuato in Olanda; una richiesta di autorizzazione per effettuare clonazione tramite trasferimento nucleare in bovini è stata negata poiché si è ritenuto lo scopo del progetto fosse prematuro, mentre è stata rilasciata un'autorizzazione per la produzione tramite microiniezione nucleare di bovini transgenici.

Un progetto di produzione di topi transgenici per la ricerca nel settore degli xenotrapianti è stato approvato; vi è anche un istituto di ricerca in cui vengono sperimentalmente trapiantati organi di maiale in scimmie antropomorfe.

## Regno Unito

Qualsiasi utilizzo di animali per fini sperimentali è strettamente regolamentato in Inghilterra dal Animals (*Scientific Procedures*) Act 1986, che rappresenta il recepimento inglese della Direttiva europea 86/609/EEC; in ottemperanza a quanto previsto da tale normativa più di 100 stabilimenti sono autorizzati in Inghilterra a produrre per fini scientifici animali transgenici ed animali geneticamente modificati.

La produzione e la detenzione di animali geneticamente modificati sono, in accordo con quanto previsto da un'ulteriore normativa, sottoposte anche al controllo del Health and Safety Executive che valuta anche i possibili rischi di rilascio di tali organismi nell'ambiente.

La clonazione, che può essere effettuata tramite diverse tecniche come l'*embryo splitting*, l'utilizzo di cellule staminali ed il trasferimento nucleare, viene eseguita in vari istituti di ricerca del Regno Unito; attualmente vi sono unicamente due stabilimenti che praticano il trasferimento nucleare.

Con riferimento agli xenotrapianti in Inghilterra viene effettuata una grande attività di ricerca nel settore dell'immunologia di base; in questo momento solo un gruppo sta lavorando attivamente alla produzione di organi potenzialmente trapiantabili nell'uomo.

## Spagna

In Spagna non esiste una normativa che regola i tre settori di ricerca dell'indagine conoscitiva effettuata dal SQSSA e la tutela del benessere degli animali da Laboratorio è affidata al Ministero della Sanità che vigila sull'applicazione del recepimento spagnolo della Direttiva europea 86/609/EEC.

In Spagna non vengono prodotti animali transgenici, in quanto vengono importati principalmente dalla Francia. Vi sono alcuni centri di ricerca che utilizzano topi transgenici su piccola scala, però non esistono registri in cui siano annotati il numero di animali transgenici utilizzati o le finalità sperimentali.

## Svezia

La tutela degli animali da laboratorio in Svezia è regolata dal Swedish Animal Welfare Act che rappresenta il recepimento svedese della Direttiva europea 86/609/EEC; la legislazione svedese riguardante gli animali transgenici, che rappresenta il recepimento svedese della direttiva 90/219 e della direttiva europea 220/EEG sugli organismi geneticamente modificati, è entrata in vigore il 1-luglio-1994. Nel 1994 è stato anche istituito il Gene Technology Advisory Board con l'incarico di monitorare in Svezia gli sviluppi nel settore delle biotecnologie.

La produzione di animali transgenici è permessa in Svezia a condizione che essa sia effettuata in ottemperanza a quanto prescritto dal Swedish Animal Welfare Act. L'attività di ricerca deve essere quindi approvata sia dal Swedish Board of Agriculture sia dai Comitati Etici Regionali che ne danno comunicazione al Gene Technology Advisory Board. Infine la produzione di animali transgenici deve essere effettuata nel rispetto della legislazione svedese sull'ambiente che impone che tali animali siano mantenuti confinati. Dal 1994 al 1998 si è passati in questo settore da 15 richieste di autorizzazione a 181.

Non esiste una legislazione specifica sulla clonazione in Svezia e nessun esperimento viene effettuato, tuttavia è attualmente in corso uno studio del parlamento, dal titolo Biotechnology within society-possibilities and risk, che tratterà anche il problema della clonazione ed i cui risultati sono attesi tra la fine del 2000 e gli inizi del 2001.

Nel 1998 circa 15 gruppi stavano lavorando a livello sperimentale nel settore degli xenotrapianti; attualmente in Svezia non vengono effettuati xenotrapianti tra uomo e animale, mentre dal 1990 al 1993 sono stati effettuati xenotrapianti tra uomo e suino in cui 10 pazienti affetti da diabete hanno ricevuto cellule che producevano insulina e che provenivano da maiali non modificati geneticamente.

## Conclusioni

Tutti e tre settori di ricerca (clonazione, transgenesi ed esecuzione di xenotrapianti a fini sperimentali), sui quali è stata condotta la indagine conoscitiva, sono regolamentati in Europa dai recepimenti dei singoli stati della Direttiva europea 86/609/EEC che ha, come scopo principale, la protezione degli animali da laboratorio e la tutela del loro benessere. Inoltre dalle informazioni raccolte appare chiaramente che, in relazione all'utilizzo ed alla produzione di animali transgenici, le leggi specifiche esistenti in alcuni paesi dell'Unione Europea sono state principalmente finalizzate alla protezione dell'ambiente da possibili fughe e contaminazioni da

parte di OGMs; unicamente Finlandia e Olanda hanno preso in considerazione un aspetto importante, anche se di difficile valutazione, rappresentato dalla necessità di effettuare una stima dei possibili rischi derivanti per il benessere degli animali dall'introduzione di materiale genetico esogeno.

La clonazione non è stata regolamentata da nessuno dei paesi che hanno risposto alla nostra indagine conoscitiva ad esclusione della moratoria approvata dal parlamento danese.

Infine, anche per quanto riguarda il settore degli xenotrapianti esiste un chiaro vuoto normativo a livello europeo, che dovrebbe essere colmato soprattutto alla luce della raccomandazione 1399 sugli xenotrapianti che è stata adottata dall'Assemblea parlamentare del Consiglio d'Europa.

## **Bibliografia di riferimento**

Svendsen P, Hau J (Ed.). *Handbook of laboratory animal science*. Boca Raton: CRC Press; 1994.

Panzini G, Moretti R. Le differenze normative sulla sperimentazione animale nei diversi paesi europei. In: Vitale A, Laviola G (Ed.). *Aspetti applicativi e teorici della sperimentazione animale: il confronto con il Decreto legislativo n. 116/1992*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1998. (Rapporti ISTISAN 98/28). p. 9-16.

# CONSIDERAZIONI BIOETICHE SULL'USO DI CEPPI TRANSGENICI DI TOPO NELLA RICERCA BIOMEDICA

Igor Branchi, Daniela Santucci, Enrico Alleva

Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e di Sistema, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Nell'ultimo decennio la comunità scientifica e l'opinione pubblica sono divenuti sempre più consapevoli dei temi relativi all'utilizzo di organismi geneticamente modificati nella ricerca biomedica di base e applicata. Il crescente interesse è evidenziato dal considerevole numero di pubblicazioni scientifiche e divulgative sul tema. Le questioni poste rimangono tuttavia controverse, in quanto i possibili scenari futuri legati all'utilizzo delle tecniche di transgenesi non sono chiaramente prevedibili e i potenziali rischi assieme alle considerazioni di carattere etico sono al momento di non facile valutazione. Le commissioni comunitarie e internazionali che hanno il compito di monitorare lo sviluppo delle biotecnologie riescono con una qualche difficoltà a tenere il passo delle scoperte scientifiche e talora potrebbero accumulare un ritardo nella valutazione delle relative conseguenze per il benessere degli animali impiegati, per la salute umana e per l'ecosistema planetario, lasciando in questo modo gli organi legislativi e di controllo in una complessa situazione gestionale.

Da secoli, anche non possedendo le attuali e relativamente ampie nozioni di genetica post-mendeliana, vengono prodotti – mediante metodi tradizionali di selezione – soggetti animali che possiedono nel genoma specifiche combinazioni di geni. Le possibilità di intervenire sui caratteri genetici, e conseguentemente sui tratti fenotipici, offerte da tale metodologia è tuttora piuttosto limitata, in quanto di solito solo individui della medesima specie possono essere incrociati. Un ulteriore limite è costituito dal fatto che il prodotto ottenuto è in non piccola parte aleatorio, e per generare la combinazione desiderata è spesso necessario il tempo di parecchie generazioni. Rispetto a tale strategia, le tecniche di transgenesi propongono procedure radicalmente nuove e tali da permettere di modificare molto rapidamente i caratteri di un individuo agendo direttamente sul materiale genetico.

I roditori sono storicamente le specie preferite nella sperimentazione animale per la loro nota prolificità e il basso costo di mantenimento, e continuano a essere massicciamente utilizzati sia per ragioni bioetiche sia grazie a perplessità gestionali interne alla comunità dei ricercatori (soprattutto per gli sforzi dei molto eticamente sensibili primatologi), che hanno rarefatto, anche in Italia, l'utilizzo di primati e carnivori. In particolare, le tecniche di transgenesi sono state sviluppate sul topo (*Mus musculus*) sia per le ragioni appena menzionate sia per la ampia conoscenza e la relativa facilità di manipolazione del suo genoma. L'impiego di animali transgenici nella ricerca biomedica è cresciuto in maniera esponenziale dall'inizio degli anni ottanta come si può verificare dal numero di pubblicazioni scientifiche su animali transgenici reperibile nelle banche dati delle pubblicazioni biomediche (Medline, consultabile al sito: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>).

Un problema emergente riguarda dunque aspetti etici e pratici relativi all'utilizzo di tali animali nella ricerca biomedica e su tali aspetti concentreremo perciò la nostra attenzione in quanto un'approfondita comprensione scientifica è necessaria per la salvaguardia del benessere animale così come della qualità del dato scientifico, per far luce sulle questioni relative e per soddisfare l'interesse del pubblico e dei media.

I vantaggi portati alla ricerca scientifica dall'utilizzo della transgenesi sono chiari e importanti (Crawley, 2000): i) la *specificità*, permette di scegliere i caratteri genotipici su cui

lavorare, riducendo teoricamente al minimo le interferenze; ii) la *rapidità*, perché 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, l'acido deossiribonucleico, è strutturato secondo le regole di un codice universale praticamente comune a tutte le specie viventi, è possibile trasferire materiale e informazioni genetiche tra specie filogeneticamente anche molto distanti, e iv) l'*economia*, perché 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 mantenuti.

Al contrario, le problematiche relative allo sviluppo della transgenesi sono molto meno facilmente valutabili e prevedibili, e riguardano principalmente due ambiti: i) *etico*, la modificazione del genoma può provocare in modo diretto o indiretto sofferenza negli animali; ii) *pratico*, topi geneticamente modificati potrebbero evadere dagli allevamenti controllati andando a interferire con le popolazioni endemiche locali con il conseguente rischio di creare perturbazioni ecosistemiche anche di una certa gravità.

Il problema del benessere animale, nel caso di esperimenti che prevedono l'impiego di individui geneticamente modificati, andrebbe 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, 1999). La preparazione di topi transgenici e *knock-out*, può a volte provocare effetti collaterali anche gravi, come un'alta mortalità prenatale e neonatale e un peso fetale anormalmente aumentato o diminuito. Inoltre, poiché tali soggetti animali sono utilizzati in modo esplosivamente crescente in studi mirati ad analizzare possibili alterazioni del comportamento, è necessario controllare gli effetti della manipolazione genetica sulla sofferenza psicofisica o sulla soglia del dolore. Per esempio, iper- o ipoalgesia (ridotta o viceversa accentuata sensibilità dolorifica), debolezza motoria o sensoriale, bassa capacità di interazione sociale, ecc., possono rendere l'animale particolarmente suscettibile a situazioni generanti stress o dolore.

Per il grande pubblico, lo scienziato che costruisce un topo transgenico ostacola in un certo modo il valore intrinseco dell'animale (un importante economista italiano parlò una volta di turbativa della struttura della materia vivente), confondendo geni e vite degli organismi animali. Questa reazione, in parte non completamente giustificata dai fatti, a un tema morale generale non dovrebbe però essere né trascurata né tanto meno banalizzata. E' importante valutare e discutere l'impostazione etica nell'uso dei topi transgenici e, malgrado l'ovvia rilevanza, questo nuovo strumento scientifico comporta una serie di nuovi problemi che richiedono dunque soluzioni originali. Per esempio, da un lato l'applicazione di un sistema funzionale sull'uso di questi animali modificati può essere non sempre semplice; dall'altro, un'attenzione particolare dovrebbe essere concentrata nel determinare con sufficiente accuratezza l'ambiente per una rilevante trascrizione del gene, e nel separare gli effetti di pleiotropia (effetto collegato dei geni in vari tratti fenotipici) rilevanti e irrilevanti.

I cambiamenti che possono insorgere in seguito all'eliminazione di un gene (mutazione nulla) a partire da fasi precoci dell'ontogenesi possono determinare fenotipi completamente inattesi nell'animale maturo interferendo con il normale programma di sviluppo o dando luogo a cambiamenti fisiologici e/o comportamentali atti a compensare tale mancanza (Newmark, 1989; Lipp & Wolfer, 1998). Vi sono inoltre altri fattori che possano confondere l'interpretazione del fenotipo quali l'inserimento di parte di geni adiacenti quello su cui si vuole intervenire selettivamente, i cosiddetti geni *flanking* provenienti da un diverso *background* genetico, possono introdurre variabili inaspettate oltre che difficilmente controllabili. Particolare attenzione poi andrebbe rivolta all'influenza del background genetico dei ceppi transgenici impiegati. Il ceppo di topo C57B6, per esempio, largamente impiegato per la produzione di *knock-out*, è caratterizzato da sordità congenita tale da rendere tali topi assolutamente non

idonei per molte ricerche. I topi FVB subiscono una degenerazione retinale e quindi hanno ridotte prestazioni in test che implicano l'uso della capacità visiva come per esempio il labirinto acquatico di Morris; alcuni topi che non hanno il recettore per il fattore di crescita epidermico, presentano sostanziali differenze nella durata media di vita così come nei livelli di base nella preferenza per l'alcol a seconda del ceppo su cui è stata introdotta la mutazione. Va ricordato infine che le mutazioni, anche in un singolo gene possono comportare profonde alterazioni nel comportamento materno, influenzando indirettamente lo sviluppo della successiva generazione di topi. Infine, come precedentemente accennato, la pleiotropia, il fenomeno per il quale un singolo gene influenza più caratteri dello stesso organismo, fa sì che sia 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).

Linee-guida eticamente orientate sull'uso di topi transgenici dovrebbero avere come obiettivo quello di ripetere o perfezionare le attuali impostazioni di ricerca, in modo particolare facendo riferimento a comprovate metodologie statistiche e al modello *3R* (Russell & Burch, 1959; Ghislaine *et al.*, 2000). Tale modello è stato creato nel 1959 da due ricercatori inglesi ed è ancor considerato il metodo migliore nella creazione di protocolli che tengano conto dei diritti e dei bisogni degli animali da laboratorio. In breve, il modello richiede al ricercatore di "Ridurre" (Reduce) il numero degli animali coinvolti in protocolli sperimentali, "Raffinare" (Refine) procedure sperimentali con strumenti di tutela, "Sostituire" (Replace) le specie da laboratorio con quelle caratterizzate da un sistema nervoso meno complesso, con esperimenti *in vitro* o simulazione al computer, nei limiti delle possibilità della ricerca (Ekwall *et al.*, 1990). Se si considerano ad esempio anche il numero di animali utilizzati esclusivamente per la produzione di animali modificati geneticamente, la R di Ridurre è fortemente messa in discussione. In tale contesto la figura del bio-statistico diventa cruciale, sia per la protezione della qualità dei dati che del benessere degli animali. Un appropriato metodo statistico può ridurre il numero degli animali quando si affrontano test che mantengano validità statistica (Puopolo *et al.*, 1999; Trajstman, 2000). Le conoscenze etologiche possono e debbono essere usate per migliorare le condizioni di vita dei roditori usati nella sperimentazione animale, in particolare nel caso dei topi transgenici (Vitale & Alleva, 1999; Alleva & Carere, 2000). Porre attenzione ai bisogni di un animale da laboratorio può essere positivamente produttivo a diversi livelli. Un più competente tecnico stabularista può evitare scenari in definitiva nocivi per tutti i soggetti coinvolti; ad esempio, trattare i soggetti con procedure inutilmente violente determina un aumento della paura del soggetto animale, compromettendo la relazione fra sperimentatore e soggetto da laboratorio, falsando altresì importanti parametri fisiologici, ormonali e financo immunitari. Inoltre, tale approccio da un lato rende inaffidabile il risultato dei dati fisiologici e/o comportamentali e dall'altro determina l'aumento dei tentativi di fuga da parte degli animali.

E' noto che ceppi transgenici che esprimano elevati livelli di attività, possono risultare particolarmente deboli nei confronti di un soggetto normale, o inusitatamente aggressivi nei confronti di un conspecifico. Solo una sperimentazione animale basata su regole certe e procedure eticamente condivise anche all'esterno della ristretta cerchia degli sperimentatori sarà in grado di soddisfare la richiesta anche di parte dell'opinione pubblica di un trattamento decente per gli animali da laboratorio. Se non è vera la relazione che la scienza influenza la struttura della società, è vera la relazione opposta: la comunicazione utilizzata fra scienza e società deve rimanere aperta e reciproca.

Appare quindi estremamente rilevante nel giudicare i progetti che coinvolgono animali transgenici tenere presente la possibilità di alterazioni più o meno attese nel fenotipo che possano determinare sofferenza nell'animale. Molte informazioni non pubblicate, la cosiddetta *tacit knowledge* (Cohen, 1999), possono fornire informazioni utili per la creazione l'allevamento e il mantenimento di animali transgenici e *knock-out* (si vedano ad esempio i moduli disponibili sul

sito <http://www.bzl.unizh.ch/de/database/formtransg/index2.html>, per la costruzione di una banca dati in grado di fornire una caratterizzazione estremamente dettagliata delle diverse linee di topi transgenici).

Il problema della contaminazione dell'ecosistema non deve essere sottovalutato nella creazione e utilizzazione di animali da laboratorio geneticamente modificati. Alcuni ricercatori, in larga parte di provenienza veterinaria, ritengono che le strutture di stabulazione siano in genere sufficientemente "barriate" e che la sopravvivenza in condizioni naturali dei soggetti eventualmente vivi non supererebbe le 24 ore. Esperienze personali consolidate di noi altri ricercatori, etologi e zoologi in particolare, propongono un visione meno idilliaca del problema effettivo. La fuga di topi transgenici può portare alla colonizzazione progressiva di colonie negli ambienti naturali circostanti, con il conseguente pericolo che le popolazioni (o meglio, i demi) naturali di *Mus musculus* siano contaminate e quindi, nei casi più gravi, minacciate di estinzione. Non sono certamente rarissimi, i casi in cui l'introduzione di nuove specie di mammifero in una particolare area sia stata la causa della quasi scomparsa di specie locali o laddove le reintroduzioni determinino una condizione di squilibrio genotipico della popolazione (Rachels, 1990; Goodman, 1995; Baskin, 1996, 1998). Per brevità in bibliografia ne citiamo solo alcune, sottolineando il caso degli scoiattoli americani che hanno messo a rischio popolazioni autoctone di una specie autoctona europea (Reggiani *et al.*, 1993; Genovesi & Amori, 1999; Currado *et al.*, 1997; Gurnell & Pepper, 1993). La prevenzione di tale evento indesiderato deve divenire una priorità per i laboratori che contengano organismi animali geneticamente modificati. Un approccio preventivo attendibile ed efficace dovrebbe includere le seguenti precauzioni. Un doppio recinto a prova di evasione dovrebbe essere installato nelle strutture contenenti le popolazioni di laboratorio, i responsabili delle strutture di stabulazione dovrebbero creare un efficiente sistema per catturare gli esemplari eventualmente sfuggiti. Inoltre studi di controllo, mirati a raccogliere informazioni sulle strategie comportamentali di soggetti selvatici, dovrebbero essere condotti sulle popolazioni di *Mus musculus* viventi in ambiente naturale, e soprattutto in habitat limitrofi alle zone di elevato contenimento di soggetti geneticamente modificati. Contemporaneamente, particolare attenzione dovrebbe essere rivolta alle popolazioni locali dei predatori di roditori. Andrebbe instaurato un programma di monitoraggio per la presenza e le strategie comportamentali di base (soprattutto, nutritive vs. predatorie) sia di quelli più comuni – gatti, cani randagi, mustelidi, rapaci notturni, gheppi, civette, gufi comuni – che di quelli meno comuni – rospi, ramari, lucertole, serpenti, nibbi – questi ultimi particolarmente importanti in ambito peri-urbano dato che una notevole parte delle strutture che contengono topi transgenici si trovano in zone ad habitat altamente frammentato. Sarebbe anche preferibile monitorare i precedenti storici dell'ecosistema locale, tenendo conto del grado e della tipologia di frammentazione dell'habitat come base della biodiversità dei predatori che rende alcune specie di predatori stagionalmente dipendenti.

Il topo, è la specie animale oggi più massicciamente utilizzata nelle scienze biomediche, ma alcuni livelli attenzionali andrebbero anche innalzati anche nel caso di altre specie, come ovini e suini, dato che anche per esse le tecniche di transgenesi si stanno notevolmente e rapidamente sviluppando: tale andamento mette in evidenza come le problematiche, anche precipuamente bioetiche, legate alle nuove biotecnologie siano sempre più attuali e importanti. Dato che esiste una reale difficoltà nell'effettuare una stima realistica dei rischi, soprattutto a medio o a lungo termine, sulla base delle conoscenze attuali, risulta urgente una sempre maggiore consapevolezza dei temi concernenti la transgenesi da parte degli esperti del settore e, conseguentemente, della opinione pubblica, in modo da monitorare e valutare l'insieme delle implicazioni che tale innovativa tecnologia può portare con se. E' cioè urgente temperare l'andamento per alcuni versi irrefrenabile della ricerca contemporanea con doverosi sforzi precauzionali per quanto di potenzialmente dannoso si possa temere per le comunità animali

naturali e di riflesso per gli ecosistemi terrestri più in generale. In chiusura ci auguriamo di non aver ingenerato nel lettore un'irragionevole preoccupazione nell'utilizzo (limitato da precisi principi etici e gestionali) degli organismi geneticamente modificati che partono da genotipi di specie di mammiferi così ecologicamente, ed evolutivamente prossime a Homo Sapiens. Il nostro desiderio è invece di provvedere, ancora una volta, un'ottica di trasparente e vicendevole consapevolezza reciproca tra addetti ai lavori del settore biomedico da una parte e pubblico potenzialmente interessato a divenire utente dei processi di innovazione tecnica dall'altra.

## Riferimenti bibliografici

- Alleva E, Carere C. Etologia. In: *Appendice 2000. Istituto della Enciclopedia Italiana "Giovanni Treccani"*. Roma: Enciclopedia italiana "Giovanni Treccani"; 2000. p. 625-629.
- Baskin Y. Curbing undesirable invaders. *Bioscience* 1996;46:732-6.
- Baskin Y. Winners and losers in a changing world. *Bioscience* 1998;48:788-92.
- Bateson P, Alleva E (Ed.). *Biologia del comportamento*. In: Baltimore D, Dulbecco R, Jacob F, Levi-Montalcini R (Ed.) *Frontiere della vita. Il mondo dei viventi*. Roma: Enciclopedia italiana "Giovanni Treccani"; 2000. p. 1-378.
- Cohen N. Judging transgenic projects: what should be known? *ATLA* 1999;27:182.
- Crawley, JN. *What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice*. John Wiley & Sons; 2000.
- Currado I, Mazzoglio PJ, Amori G, Wauters L. Rischi biologici delle introduzioni: il caso dello scoiattolo grigio in Italia (*Sciurus carolinensis* Gmelin). *Suppl Ric Biol Selvaggina* 1997;27:277-84.
- 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.
- Duncan IJH, Fraser D. Understanding animal welfare. In: Appleby MC, Hughes BO (Ed.). *Animal welfare*. Wallingford: Can International; 1997. p. 19-31.
- Ekwall B, Gomez-Lechon MJ, Hellberg S, Bondesson I, Castgel JV, Jover R, Hogberg J, Ponsoda X, Romert L, Stenberg K, Walum E. Preliminary results from the scandinavian multicenter evaluation of *in vitro* cytotoxicity (MEIC). *Toxicology in vitro* 1990;4:688-91.
- Genovesi P, Amori G. Conservation of the Red squirrel and eradication of the Grey squirrel in Italy. *Council of Europe, Special Publication. Environmental encounters*, 1999. p. 101-6.
- Gerlai R. Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *TINS* 1996;19:177-81.
- Ghislaine M, Poirie C, Morton DB. Ethical framework for the use of transgenic mice in basic research. In: Balls M, van Zeller AM, Halder M (Ed.). *Progress in the reduction and replacement of animal experimentation*. Amsterdam: Elsevier; 2000. p. 1465-73.
- Gingrich J, Hen R. The broken mouse: the role of development, plasticity and environment in the interpretation of phenotypic changes in knockout mice. *Current Opinion in Neurobiology* 2000;10:146-52.
- Goodman SM. Rattus on Madagascar and the dilemma of protecting the endemic fauna. *Conservation Biology*, 1995;9:450-3.
- Gurnell J, Pepper H. A critical look at conserving the british Red squirrel *Sciurus vulgaris*. *Mammal Review*, 1993, 23(3/4):127-37.
- 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. *Current Opinion in Neurobiology* 1998; 8:272-80.

Newmark P. Guidelines produced for the use of transgenic animals in research. *Nature* 1989;337:295.

Puopolo M, Santucci D, Chiarotti F, Alleva E. Behavioural effects of endocrine disrupting chemicals on laboratory rodents: statistical methodologies and an application concerning developmental PCB exposure. *Chemosphere* 1999;39:1259-71.

Rachels J (Ed.). *Created from animals: the moral implication of Darwinism*. Oxford: Oxford University Press; 1990.

Reggiani G, Boitani L, D'Antoni S, De Stefano R. Biology and control of the coypu in the Mediterranean area, *Suppl Ric Biol Selvaggina* 1993;21:67-100.

Russel WMS, Burch RL. *The principles of human experimental technique*. London: Methuen & Co, Ltd.; 1959.

Trajstman AC. Engineering to reduce animal numbers. In: Balls M, van Zeller AM, Halder M (Ed.). *Progress in the reduction and replacement of animal experimentation*. Amsterdam: Elsevier; 2000. p. 726-36.

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.

# FINALITÀ E LIMITI DELLO SVILUPPO DELLE METODICHE ALTERNATIVE IN CAMPO EUROPEO E INTERNAZIONALE

Annalaura Stammati (a), Flavia Zucco (b)

(a) *Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Istituto di Tecnologie Biomediche, CNR, Roma*

## Introduzione

Nel 1986 un rapporto redatto per la Commissione Europea (Ryan & McSweeney, 1986) individuava gli ostacoli più rilevanti allo sviluppo di metodi alternativi alla sperimentazione animale:

- nel fatto che non c'erano tecnologie sufficientemente avanzate;
- nella convinzione, largamente diffusa nell'industria e nel pubblico in generale, che le leggi esistenti avrebbero comunque ostacolato e ritardato l'implementazione di metodi alternativi qualora si fossero resi disponibili.

Ma proprio nel 1986 veniva promulgata la Direttiva Europea sulla sperimentazione animale n. 609 (Council Directive, 1986) che recita all'art. 23:

La Commissione e gli Stati Membri devono incoraggiare le ricerche per lo sviluppo e la validazione di tecniche alternative che possano fornire lo stesso livello di informazione di quello ottenuto in esperimenti che facciano uso degli animali, ma che coinvolgano meno animali o che contemplino procedure meno dolorose, e devono attivare ogni altro passo che considerino appropriato ad incoraggiare la ricerca in questo settore. La Commissione e gli Stati Membri devono monitorare le tendenze nei metodi sperimentali.

Tale direttiva è stata recepita in Italia con il DL.vo n. 116/1992 che tratta dei metodi alternativi alla sperimentazione animale agli articoli 16 e 17. In particolare l'art. 16 fa riferimento alla riduzione dell'uso degli animali nella sperimentazione e l'art. 17 allo sviluppo di metodi che non contemplino l'uso di animali.

Un'ulteriore iniziativa della Commissione è stata l'istituzione nel 1991 dell'European Centre for Validation of Alternative Methods (ECVAM) nell'ambito del Joint Research Centre di Ispra, Varese (Comm, 1991).

Il compito prioritario di ECVAM è quello di coordinare la validazione dei metodi alternativi a livello comunitario. Inoltre deve costituire un punto di riferimento per lo scambio di informazioni sullo sviluppo dei metodi alternativi, deve impostare e gestire una banca dati su di essi con i relativi servizi all'utenza, e infine deve promuovere il dialogo tra i legislatori, l'industria, i ricercatori nel settore della biomedicina, le organizzazioni dei consumatori e i gruppi animalisti, per promuovere lo sviluppo, la validazione ed il riconoscimento internazionale dei nuovi metodi.

## Definizione di alternative

Non si ritornerà mai sufficientemente su questo punto: cosa si intende per alternative. Infatti si sente spesso ricorrere ancora oggi, in pubblici dibattiti ed in discussioni specializzate, la notazione che il termine “complementari” sarebbe più adatto.

Il termine “alternativo” è stato scelto da coloro che operano nel settore della sperimentazione animale con il reale intento di innovare ed è stato adottato dalla Commissione Europea, nella sua direttiva e nel nome stesso di ECVAM, in una accezione ampia. Essa si rifà ad un testo del 1959 (Russell & Burch, 1959), ed è comunemente conosciuta come la definizione delle 3R, dall'inglese *replace, reduce, refine*:

“E’ definita come alternativa alla sperimentazione animale una qualsiasi tecnica che:

- rimpiazzati totalmente l’uso degli animali;
- riduca il numero degli animali in un determinato saggio;
- raffini un metodo per ridurre la sofferenza imposta all’animale.”

Rientrano nel primo tipo tutti quei metodi che consentono di ottenere una determinata informazione sperimentale senza ricorrere all’uso di animali.

Rientrano nel secondo tipo tutti quei metodi atti ad ottenere livelli comparabili di informazione utilizzando un numero minore di animali; oppure quelli che consentono di ottenere il massimo numero di informazioni da un dato esperimento sugli animali.

Rientrano nel terzo tipo tutti quei metodi che consentono di alleviare sofferenze e danni dovuti alla sperimentazione.

Il primo approccio fa riferimento, come si può dedurre, a metodiche alternative in senso proprio, in quanto si pensa all’uso di colture cellulari, di approcci molecolari, di modelli computerizzati ed altri ancora.

Gli altri due, sono più focalizzati ad un miglioramento dei protocolli sperimentali *in vivo*, non solo ai fini dell’affidabilità, ma anche del benessere animale.

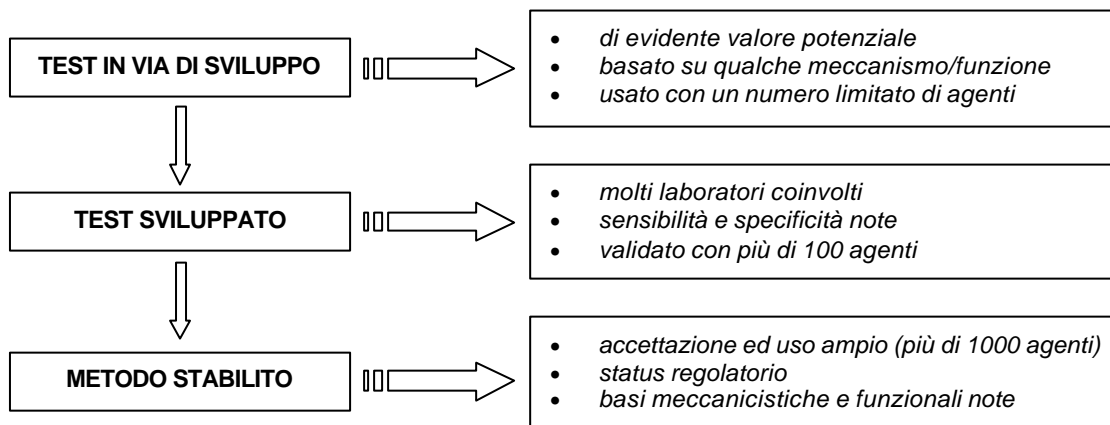
## Sviluppo di metodi alternativi

Un nuovo approccio sperimentale per essere considerato alternativo alla sperimentazione animale tradizionale, deve essere riproducibile, affidabile, rapido e costoso almeno quanto quello che si vuole sostituire, in quanto l’aspetto etico dovrebbe valere come determinante per la scelta tra i due. Se però il nuovo metodo presenta controindicazioni per uno degli altri aspetti (scientifici, tecnici ed economici) la sostituzione del metodo originale può risultare più difficile da fare accettare o addirittura improponibile.

Diventa dunque estremamente importante il processo di “validazione” così come è stato definito da ECVAM (Balls *et al.* 1995):

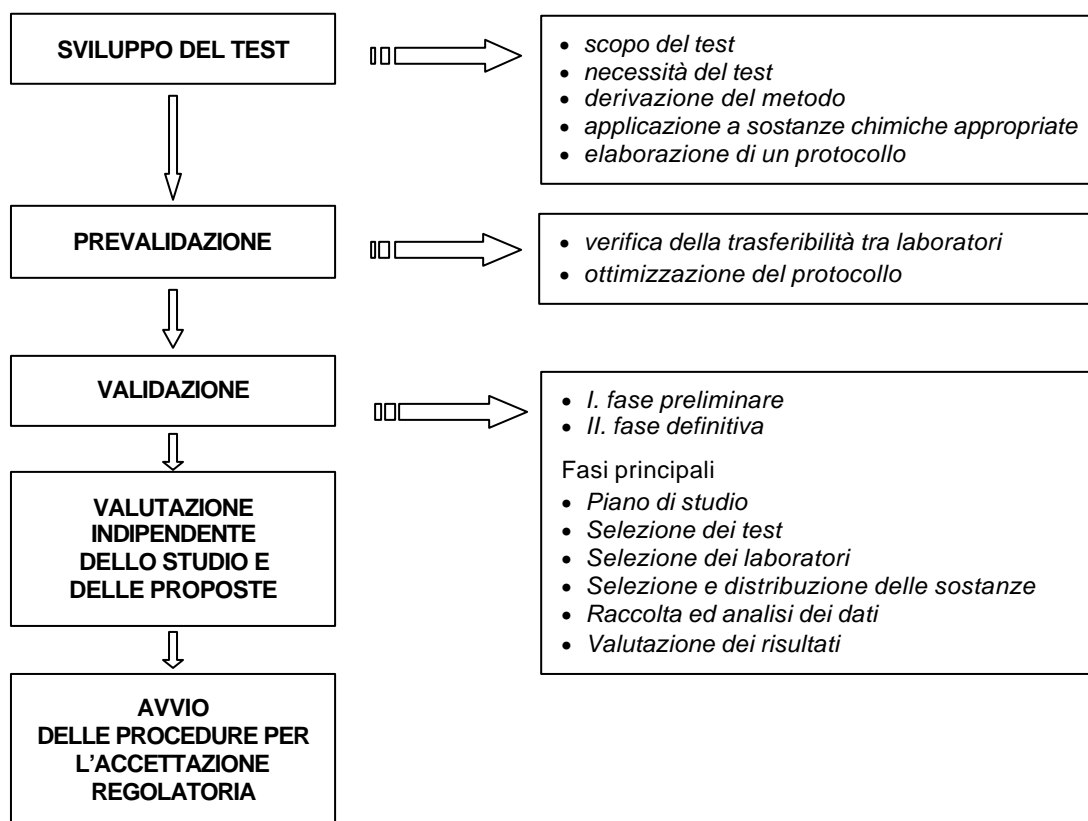
La validazione è quel processo per cui l’affidabilità e la rilevanza di una procedura vengono stabilite per uno specifico scopo. L’affidabilità descrive la riproducibilità di una procedura nel tempo e nello spazio o, in altri termini, la standardizzazione. La rilevanza descrive la significatività ed utilità di una procedura per il fine prefissato.

Fin dal 1987 era partita una elaborazione teorica su come si sarebbe dovuto prefigurare un processo di validazione corretto, in particolare applicato al settore della tossicologia, dove più alto era l’allarme per il benessere degli animali (Figura 1) (Scala, 1987).



**Figura 1. Stadi della validazione**

Da allora una serie di gruppi di lavoro hanno prodotto una riflessione intorno a questo argomento (Frazier, 1990; Balls *et al.* 1990a; Balls *et al.* 1990b; Balls & Clothier, 1991; Ekwall *et al.* 1991) che ha portato alla proposta dello schema riprodotto nella Figura 2.



**Figura 2. Stadi nell'evoluzione di un nuovo test**

Questo schema, molto più complesso, che ha registrato un buon livello di consenso, è la risultante delle esperienze pregresse dei dieci anni intercorsi dalla primitiva proposta ed è anche risultato praticabile nelle esperienze più recenti (Zucco & Vignoli, 1998). Come appare evidente dallo schema, si è resa necessaria una elaborazione concettuale e linguistica che permettesse la costruzione di un tracciato condivisibile, per le sue implicazioni teoriche e pratiche, il quale, dalla ricerca di base, veicolasse nuove procedure e metodi all'applicazione specifica nel settore della tossicologia. La possibilità di successo perché un nuovo metodo diventi "alternativo" nel settore della valutazione del rischio, dipende infatti dalla capacità dello stesso di fornire un certo tipo di risposte, in un contesto rigorosamente predisposto che appunto ne garantisca l'affidabilità e la pertinenza.

Quanto detto, illustra, anche se in maniera sommaria, il contesto in cui si sviluppano i metodi alternativi alla sperimentazione animale e le sfide sia di ordine teorico che pratico, con cui coloro che hanno lavorato con convinzione a questo sviluppo hanno dovuto misurarsi. Oggi possiamo dire che un buono stato di avanzamento comincia ad essere registrato e la parte che segue mira a presentare soprattutto i progressi compiuti.

## **Stato dell'arte rispetto alle linee guida internazionali**

Siccome abbiamo detto che l'approdo finale è l'accoglimento dei nuovi metodi a livello della regolamentazione internazionale, in questa relazione sarà presa in considerazione l'introduzione di test alternativi, nel senso più ampio del termine, nelle linee guida OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development, Organizzazione per la Cooperazione Economica e lo Sviluppo). Questo infatti è l'organismo che raccoglie non solo i Paesi membri europei, ma anche Stati Uniti, Giappone, ecc. e ha il compito di armonizzare e raccogliere in linee guida i protocolli sperimentali. Queste linee guida vengono riviste periodicamente e modificate per metterle al passo con le nuove conoscenze scientifiche e anche per adeguarle ad eventuali nuove leggi come nel caso, per esempio, della direttiva 86/609.

L'Unione Europea ha una politica di regolamentazione per i Paesi membri, che registra l'accoglimento, anche a livello nazionale, di nuove metodiche e interviene con direttive adeguate. Va detto che esistono effettivamente delle differenze di impostazione tra la UE e gli altri Paesi, ma comunque la OECD è la sede dove avviene il confronto.

## **Tossicità acuta orale - GL 401**

La tossicità acuta orale viene definita come l'effetto nocivo che si manifesta entro 24 ore dalla somministrazione orale di una singola dose o di dosi multiple di una sostanza. Il protocollo per eseguire il saggio è contenuto nella linea guida (GL) OECD 401 adottata nel 1981 e rivista nel 1987. Prevede l'uso di 5 roditori (preferibilmente il ratto)/dose (almeno 3 più 5 animali di controllo)/sesso (il saggio viene fatto utilizzando entrambi i sessi) e ha lo scopo di determinare la dose letale 50 (DL50), cioè la dose che provoca la morte del 50% degli animali trattati. E' quindi questo un saggio che richiede l'uso e quindi la sofferenza e la morte di un elevato numero di animali.

Recentemente sono stati adottati altri tre diversi protocolli per la tossicità acuta orale che, come vedremo, riducono notevolmente il numero degli animali rispetto a quelli necessari per la 401: sono quindi tutti e tre saggi di riduzione.

In Tabella 1 vengono riportati i quattro protocolli relativi alla tossicità acuta orale.

**Tabella 1. Test per la tossicità acuta orale**

<b>TEST</b>	<b>Procedura</b>
<b>Classico</b>	
<b>OECD GL 401</b> adottata 1981, aggiornata 1987	almeno 3 dosi + controlli 5 roditori/dose/di un sesso <i>endpoint</i> : letalità/tossicità
<b>Alternativi (riduzione)</b>	
<b>GL 420</b> <b>Fixed Dose Procedure</b> adottata 1992	5 roditori/di un sesso 50% riduzione animali <i>endpoint</i> : tossicità
<b>GL 423</b> <b>Acute Toxic Class Method</b> adottata 1996	3 roditori/di un sesso 70% riduzione animali <i>endpoint</i> : letalità/tossicità
<b>GL 425</b> <b>Up-and-Down Procedure</b> adottata 1998	1 roditore/di un sesso 80% riduzione animali <i>endpoint</i> : letalità/tossicità

## **Saggi di riduzione alternativi alla 401**

### **Fixed Dose Procedure - GL 420**

Questo nuovo approccio suggerito dalla British Toxicology Society (1984) è basato su una procedura a dose fissa. L'*endpoint* non è la morte dell'animale (preferibilmente viene utilizzato il ratto), ma i segni di tossicità sviluppati ad una delle dosi prescelte (5, 50, 500 e 2000 mg/kg p.c.) sulla base delle conoscenze che si hanno sulla sostanza o sulla base uno studio preliminare.

Il protocollo è stato sottoposto ad uno studio di validazione in UK (Van den Heuvel *et al.*, 1987) e a uno studio di validazione internazionale (Van den Heuvel *et al.*, 1990). Questo saggio non riduce solo il numero degli animali, ma anche la loro sofferenza (*refinement*), perché non deve essere prolungato fino alla loro morte, inoltre ha dimostrato di essere riproducibile e capace di classificare le sostanze in maniera simile ai due test che sono descritti di seguito.

Questa linea guida, pur essendo molto recente è già in corso di revisione, perché gli esperti hanno raggiunto un accordo sui valori limite per la classificazione delle sostanze (che sono cambiati rispetto ai precedenti) e perché si considera sufficiente il test su un unico sesso, di solito quello femminile.

### **Acute Toxic Class Method (ATC) - GL 423**

ATC è stato sottoposto ad uno studio di validazione sponsorizzato dal governo tedesco (Schlede *et al.*, 1992) e a uno studio di validazione internazionale (Schlede *et al.*, 1994).

E' basato su un procedimento a tappe, con l'uso di 3 animali per tappa e potrebbe essere più lungo del metodo classico. Richiede comunque un numero di animali minore, sia rispetto al test classico che alla Fixed Dose Procedure, anche perché non è necessario lo studio preliminare al saggio definitivo. Il ratto è la specie preferita. La prima dose da provare viene scelta tra 25, 200 e 2000 mg/kg p.c. e dovrebbe essere quella che presumibilmente provoca la morte di almeno

alcuni degli animali trattati. Per la scelta del sesso e della dose iniziale bisogna utilizzare tutte le informazioni disponibili, comprese informazioni su SAR.

Anche questa linea guida è in corso di revisione per gli stessi motivi della precedente.

#### Up-and-Down Procedure (UDP) - GL 425

Il protocollo proposto dagli Stati Uniti (Bruce, 1985; ASTM, 1987) minimizza il numero di animali perché viene eseguito su un solo animale. Anche in questo caso la specie preferita è il ratto, ma possono essere usati altri roditori. Gli animali vengono trattati, uno alla volta e osservati per 24 ore: il primo riceve la dose ritenuta opportuna, se sopravvive, la dose del successivo animale viene aumentata, se muore viene diminuita. Per scegliere la dose iniziale devono essere usate tutte le possibili informazioni, comprese quelle relative alla QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship). Se su questa base la morte degli animali sembra poco probabile allora è necessario iniziare con il così detto "test limite" alla dose di 2000 mg/kg o in casi eccezionali di 5000 mg/kg. Se invece le indicazioni sulle sostanze non sono sufficienti, il protocollo suggerisce di utilizzare una dose iniziale di 200 o 500 mg/kg p.c.

E' stato dimostrato che la classificazione delle sostanze sulla base delle DL50 ottenute con questo metodo è simile a quelle ottenute con i protocolli descritti precedentemente (Lipnick *et al.*, 1995).

Allo stato attuale gli addetti ai lavori sono ancora liberi di scegliere uno dei quattro protocolli relativi alla tossicità acuta orale, anche perché viene sempre lasciato un certo periodo di tempo per permettere agli operatori e ai legislatori di familiarizzare con i nuovi protocolli, ma entro il 2001, su richiesta degli esperti dei vari Paesi, il test classico dovrebbe essere eliminato dalle linee guida OCSE, consentendo di ridurre il numero di animali utilizzato per questo saggio.

Anche questa GL è in corso di revisione.

## Irritazione dermale acuta/corrosione - GL 404

Questo saggio viene fatto per osservare l'eventuale produzione di alterazioni reversibili di tipo infiammatorio (irritazione) o di danni irreversibili (corrosione) in seguito all'applicazione di sostanze sulla pelle e permette di classificarle in base alla loro pericolosità e di etichettarle, soprattutto ai fini della sicurezza durante la manipolazione ed il trasporto.

Il protocollo, contenuto nella GL 404 adottata nel 1981, prevede l'uso di diverse specie di mammifero, anche se il coniglio albino è quella preferita, perché considerata più sensibile dell'uomo, in particolare agli irritanti deboli e moderati. La sostanza in esame viene applicata sulla pelle rasata del coniglio e alla fine del periodo di esposizione (circa 4 ore) si va ad osservare il danno corrosivo o l'irritazione sviluppatasi (in questo caso viene assegnato un punteggio al grado di eritema/edema osservato), riferendosi come controllo a una parte di pelle non trattata dello stesso animale.

Questa procedura è stata molto criticata dal punto di vista etico, ma anche scientifico, perché il saggio è qualitativo e troppo legato all'interpretazione dell'operatore.

La GL è stata modificata nel 1992 e questa nuova versione prevede la possibilità di valutare anche i risultati di test *in vitro* prima di procedere alla prova sugli animali e la possibilità, in quest'ultimo caso, di utilizzare, almeno in una prima fase, un solo animale per un tempo più breve nel caso di sostanze presunte corrosive sulla base della struttura chimica o del pH.

Si è quindi cercato di sviluppare test *in vitro* in grado di identificare le sostanze corrosive, compito che si è rivelato relativamente più semplice rispetto ad altri tipi di danno, perché questa lesione non è legata a meccanismi di azione particolarmente sofisticati (Tabella 2).

**Tabella 2. Test per l'irritazione dermale acuta/corrosione**

TEST	Procedura
<b>Classico</b>	
<b>OECD GL 404</b> adottata 1981	3 conigli albini <i>endpoint</i> : eritema/edema
<b>OECD GL 404</b> aggiornata 1992	1 solo animale (se sostanza corrosiva) inclusione di dati da test <i>in vitro</i> <i>endpoint</i> : eritema/edema
<b>Alternativi (corrosione)</b>	
<b>Riduzione</b>	Resistenza elettrica transepiteliale (TER) (pelle di ratto)
<b>Sostituzione</b>	EPISKIN-SM™ kit commerciale (pelle umana)

Sono oggi disponibili due saggi alternativi considerati scientificamente validi dal Comitato Scientifico di ECVAM, che consentono la riduzione (TER) o la sostituzione (EPISKIN-SM™) degli animali. Questi protocolli dovrebbero tra breve entrare nelle linee guida OECD.

Un passo avanti in questa direzione è l'accettazione da parte degli Stati Membri della UE di questi test al 27° Meeting for Adaptation to Technical Progress (4 febbraio 2000) in relazione all'annesso V "Testing Methods" e alla Direttiva europea 67/548/EEC.

## Saggi di corrosione alternativi alla GL 404

### Misura della resistenza elettrica transcutanea (TER)

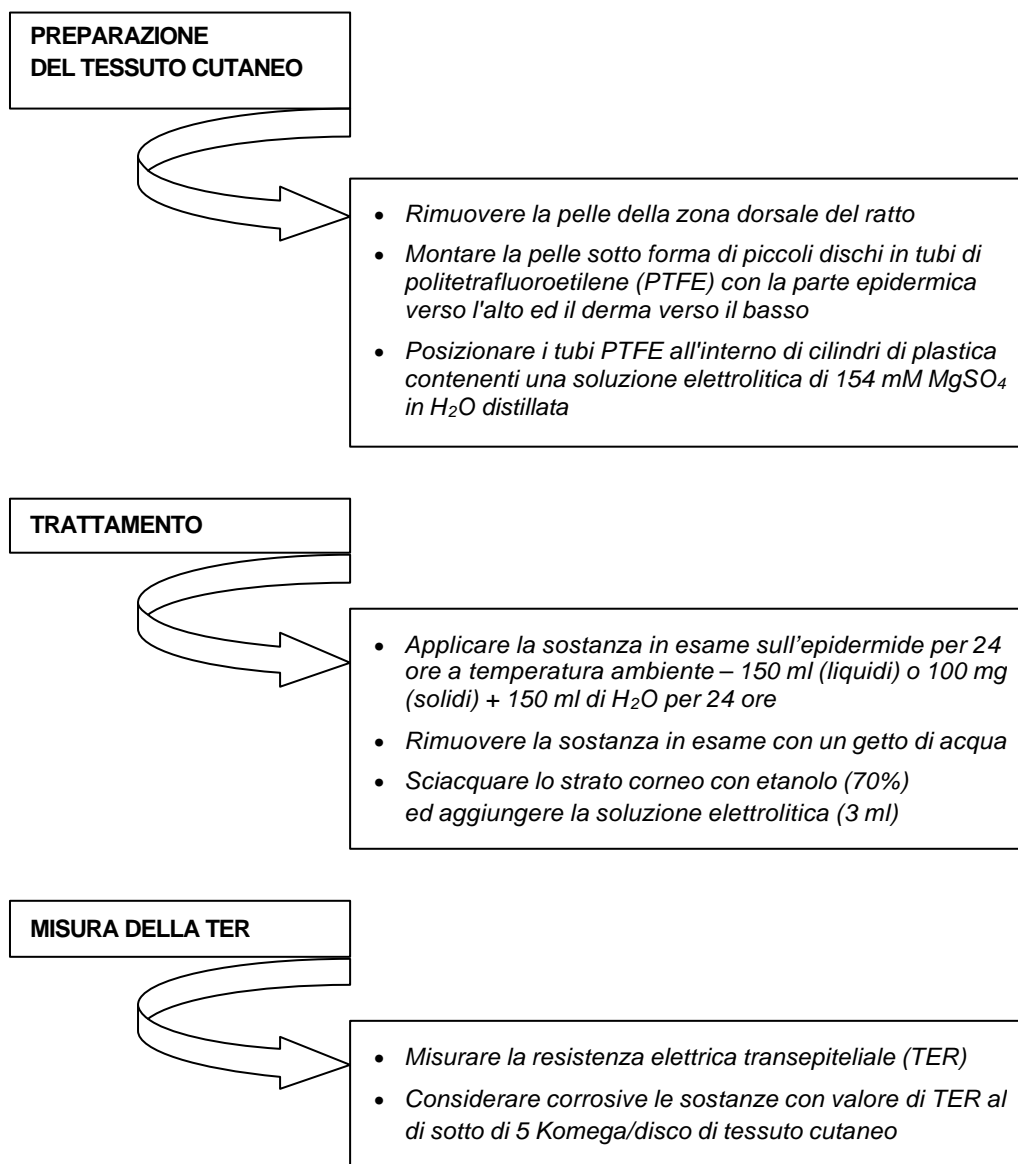
Questo saggio è stato messo a punto già da qualche anno (Oliver, 1988) e utilizzato in diversi laboratori per evidenziare il potenziale corrosivo delle sostanze in esame.

Il protocollo sperimentale descritto nella Figura 3 prevede l'uso della pelle della zona dorsale del ratto della quale viene misurata la resistenza elettrica transcutanea (TER) dopo trattamento con la sostanza in esame.

Il principio del test si basa sul fatto che se la pelle viene danneggiata in seguito all'esposizione alla sostanza, la resistenza elettrica diminuisce ed è stato stabilito di considerare corrosive le sostanze con valore di TER < 5 Komega/disco di tessuto cutaneo. Si tratta quindi di un saggio *ex vivo* che si basa sull'uso di animali, ma che consente di ridurre il numero perché con uno solo è possibile effettuare un certo numero di prove.

TER è stato riconosciuto scientificamente validato dal Comitato Scientifico di ECVAM (ESAC) perché ha fornito risultati riproducibili nei tre laboratori che hanno partecipato allo studio di validazione con 60 sostanze appartenenti a diversi gruppi chimici. Inoltre, in seguito ad una ottimizzazione del protocollo rispetto ad un precedente studio di prevalidazione, ha dimostrato di essere sufficientemente specifico e in grado di poter discriminare tra sostanze corrosive e non.





**Figura 3. Disegno sperimentale del saggio di resistenza elettrica transcutanea (TER)**

### EPISKIN-SM™

Questo è un kit commerciale, costituito da una matrice di collagene umano tipo I e III che rappresenta il derma, coperta da un film di collagene umano tipo IV su cui è stratificata epidermide differenziata derivata da cheratinociti umani. Questi ultimi vengono esposti alla sostanza in esame e la vitalità del tessuto è valutata misurando l'attività mitocondriale con un test come MTT, comunemente usato nei saggi di citotossicità. Questo modello di pelle umana ricostituita è stato considerato valido da ESAC non solo per gli stessi motivi del precedente, ma anche perché ha individuato correttamente sostanze note, classificate *in vivo* in categorie di rischio in base alla loro capacità di provocare corrosione entro tempi stabiliti (Tabella 3).

**Tabella 3. Categorie di rischio europee e americane stabilite in base al tempo necessario per la comparsa dell'effetto corrosivo sulla pelle intatta del coniglio albino dal momento del trattamento**

LINEE GUIDA EUROPEE		LINEE GUIDA AMERICANE (UN)	
Categorie di rischio	Comparsa di effetto corrosivo dal trattamento	Categorie di rischio	Comparsa di effetto corrosivo dal trattamento
R35	3 minuti	UN Gruppo I	3 minuti
-	-	UN Gruppo II	1 ora
R34	4 ore	UN Gruppo III	4 ore

Sulla base di una strategia a tappe proposta da esperti OCSE, che ha dimostrato di poter discriminare con sufficiente affidabilità le sostanze corrosive da quelle non corrosive, prima di ricorrere al test *in vivo* è necessario considerare le informazioni disponibili sulla correlazione struttura/attività, quindi il pH del composto in esame. Se sulla base di questi dati preliminari non si hanno ancora indicazioni di corrosività, si effettua un test *in vitro* e solo in caso di risposta negativa sarà necessario fare il saggio con gli animali (Worth *et al.*, 1998).

Per quanto riguarda invece l'aspetto dell'irritazione della pelle, la situazione è meno avanzata di quella precedente rispetto alla possibilità di usare metodi alternativi. Infatti, sono attualmente disponibili ed usati nella ricerca diversi modelli *in vitro* recentemente valutati durante un workshop di ECVAM (van de Sandt, 1999), ma solo per 3 kit commerciali (EpiDerm, EPISKIN-SM<sup>TM</sup>, PREDISKIN<sup>TM</sup>) il protocollo è stato sufficientemente standardizzato per consentire uno studio di prevalidazione attualmente in corso. Gli altri modelli ancora in fase di sviluppo sono linee immortalizzate e colture primarie di cheratinociti umani, espunti e colture d'organo e modelli di pelle umana ricostituita. In questi ultimi, che meglio degli altri mimano la situazione *in vivo* anche per la presenza dello strato corneo, i cheratinociti differenziati crescono all'interfaccia aria-liquido su substrati di natura diversa. Secondo l'opinione degli esperti tutti questi modelli devono essere ulteriormente migliorati, ma è comunque necessario svilupparne di nuovi sulla base di una consolidata conoscenza dei meccanismi dei processi infiammatori della pelle.

## Fototossicità

Un discorso particolare è quello della fototossicità, reazione acuta che può essere causata da un singolo trattamento con una sostanza contemporaneamente all'esposizione alle radiazioni visibili o UV: se l'esposizione alla sostanza avviene per via topica si parla di fotoirritazione. La fotoallergenicità, meno frequente della prima, è generalmente legata ad una risposta immunitaria e può richiedere un certo tempo prima di manifestarsi dal momento dell'esposizione. Essendo questi due fastidiosi effetti collaterali che possono manifestarsi anche in seguito al trattamento con sostanze di uso corrente come i cosmetici, alcune linee guida internazionali riportano delle raccomandazioni per la conduzione di studi di fototossicità, tuttavia la OECD non ha ancora accettato una linea guida per studi di fotoirritazione *in vivo*, ma ha raccomandato l'uso di saggi *in vitro*, prima di ricorrere ai test con gli animali (OECD, 1996). Gli studi *in vivo* per individuare il potenziale fototossico di sostanze chimiche utilizzano principalmente topi, conigli, ratti e cavie, ma i dati disponibili in letteratura sono difficilmente controllabili perché, in mancanza di un protocollo standardizzato, sono state utilizzate diverse fonti di luce e UV, diversi tempi e siti di esposizione e diverse dosi.

## Saggi di fototossicità alternativi

I metodi *in vitro* sviluppati in questo settore comprendono saggi per lo screening di sostanze fototossiche, che usano principalmente cellule in coltura, e modelli basati sui meccanismi molecolari e cellulari della fototossicità (Spielmann *et al.*, 1994). Di questi solo uno, il saggio di assunzione di rosso neutro con cellule Balb/c 3T3, è stato considerato scientificamente valido da ESAC ed il protocollo sta circolando tra gli esperti OECD e dovrebbe tra breve entrare nelle linee guida. Anche questo test è stato accettato dagli Stati Membri UE nel meeting citato a proposito dei saggi TER e EPISKIN-SM<sup>TM</sup>.

### Saggio di assunzione del rosso neutro con cellule Balb/c3T3

Il saggio 3T3 NRU PT prevede l'uso di fibroblasti di topo (Balb/c 3T3, clone 31), sui quali, dopo trattamento con la sostanza in esame e dopo opportuno irraggiamento, viene effettuato il test di assunzione del rosso neutro (Figura 4).

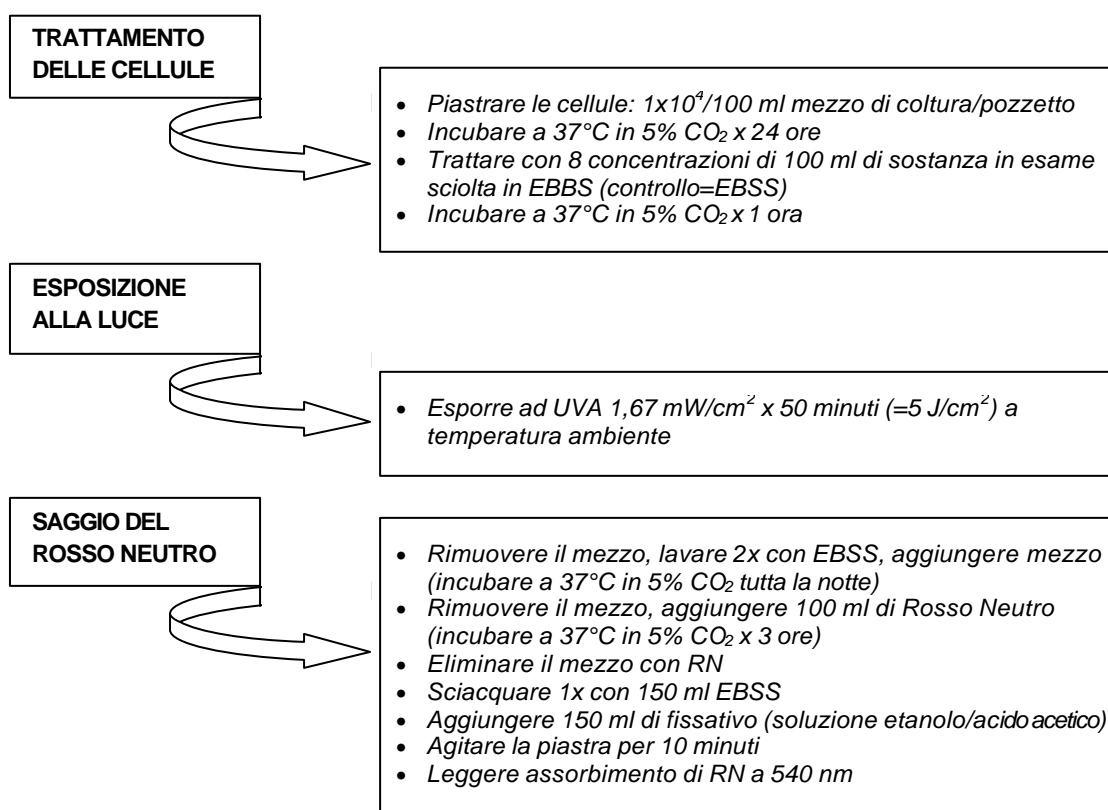


Figura 4. Disegno sperimentale del saggio 3T3 NRU PT

Questo è un test di vitalità che si basa sull'assorbimento del colorante vitale all'interno dei lisosomi delle cellule ancora integre. Questo saggio di citotossicità è stato pubblicato per la prima volta nel 1985 (Borenfreund & Puerner, 1985) come possibile alternativa *in vitro* al test di Draize sul coniglio ed utilizzato, sia pure dopo lievi aggiustamenti, per evidenziare il potere

irritante di sostanze di varia natura. Successivamente il protocollo è stato modificato per adattarlo al test di fototossicità, introducendo una fase di incubazione con la sostanza in esame prima dell'irraggiamento ed utilizzando una soluzione di sali di Earles come mezzo di incubazione delle cellule durante il periodo di irraggiamento. Durante la fase di prevalidazione e lo studio di validazione vero e proprio che è stato condotto da 9 laboratori con risultati riproducibili, il test ha dimostrato di essere predittivo e di saper discriminare tra sostanze fotoirritanti e non. 3T3 NRU PT è dunque un saggio di sostituzione (*replace*) che sarà certamente molto utile per un primo screening delle sostanze di cui si debba accertare un possibile effetto fotoirritante.

## Sensibilizzazione della pelle - GL 406

La sensibilizzazione della pelle è una reazione cutanea mediata dal sistema immunitario. Per identificare le sostanze che possono provocare questo tipo di reazione bisogna ricorrere ai protocolli previsti dalla GL 406, adottata nel 1981 ed aggiornata nel 1992 (Tabella 4).

**Tabella 4. Test per la sensibilizzazione della pelle**

TEST	Procedura
<b>Classico</b>	
<b>OECD GL 406</b> adottata 1981, aggiornata 1992	
<b>Guinea Pig Maximisation Test (GPMT)</b>	10 animali trattati + 5 di controllo usa l'adiuvante
<b>Buehler Occluded Patch Test</b>	20 animali trattati + 10 di controllo non usa l'adiuvante
<i>endpoint</i> per entrambi: eritema + rigonfiamento	
<b>Alternativi sul topo (riduzione della sofferenza)</b>	
<b>Mouse Ear Swelling Test (MEST)</b>	misura aumento di spessore dell'orecchio
<b>Local Lympho Node Assay (LLNA)</b>	misura proliferazione dei linfonodi
<i>devono essere usati come primo approccio prima di ricorrere al test sulla cavia</i>	

In quest'ultima versione la preferenza viene data a due test che utilizzano entrambi la cavia: Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) che usa l'adiuvante per potenziare l'effetto (Magnusson & Kligman, 1969) e il test di Buehler che non usa l'adiuvante (Ritz & Buehler, 1980). Nel primo caso agli animali (almeno 10 cavie) viene iniettata la sostanza in esame e l'adiuvante (Freunds Complete Adjuvant) per via intradermica. Dopo un periodo di riposo (fase di induzione) durante il quale si può sviluppare la risposta immunitaria, gli animali vengono nuovamente esposti alla sostanza per via topica. Nel secondo caso il procedimento è lo stesso, ma il test è meno sensibile del precedente perché non usa l'adiuvante. In tutte e due i casi l'effetto viene misurato dando un punteggio al grado di eritema e rigonfiamento sviluppatosi in seguito all'applicazione topica.

Poiché il sistema immunitario del topo è stato studiato in maniera più approfondita di quello della cavia, sono stati recentemente sviluppati due modelli animali che misurano l'aumento di spessore dell'orecchio (Mouse Ear Swelling Test, MEST) e l'aumento dell'attività proliferativa dei linfonodi (Local lymph Node Assay, LLNA) del topo dopo trattamento con la sostanza in esame. Questi due test hanno dimostrato di saper identificare in maniera affidabile sensibilizzanti non solo forti, ma anche moderati, inoltre riducono la sofferenza degli animali trattati (*refinement*) perché la sostanza non viene iniettata, non viene usato l'adiuvante e richiedono tempi più brevi del test classico (Basketter *et al.*, 1991; Gad *et al.*, 1986). Nell'ultima versione della GL 406 si suggerisce di utilizzarli come primo approccio e di ricorrere al test con la cavia solo in caso di risposta negativa. Comunque il protocollo del saggio LLNA sta circolando tra gli esperti OECD per il suo inserimento nelle linee guida.

Attualmente non ci sono saggi *in vitro* sufficientemente sviluppati da poter essere sottoposti a studi di validazione, tuttavia la ricerca è molto avanzata e si basa prevalentemente sulla misura del rilascio di interleuchine in cellule di natura diversa.

## Saggi per l'assorbimento cutaneo

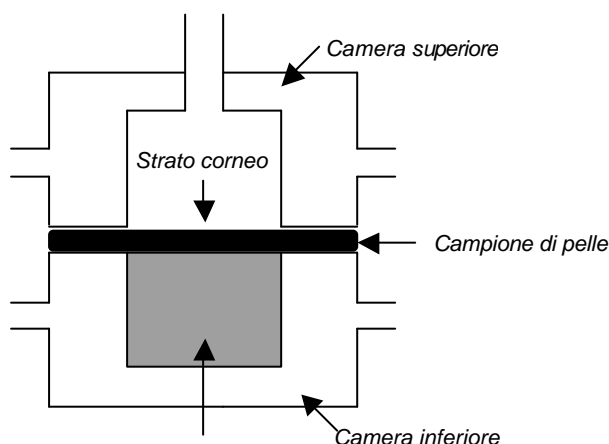
Per assorbimento cutaneo si intende il processo mediante il quale una sostanza è trasportata dallo strato corneo attraverso l'epidermide ed il derma, fino a raggiungere il sistema circolatorio e quindi i diversi tessuti dell'organismo (de Heer *et al.*, 1999). I dati di assorbimento cutaneo sono generalmente richiesti per accertare il possibile rischio di sostanze che possono venire a contatto con la pelle sia volontariamente (es. cosmetici o farmaci) che accidentalmente (pesticidi, ecc.). Al momento le richieste legislative dei diversi Paesi sono molto diversificate e vanno da un protocollo molto esigente della EPA (basato sull'uso di un modello *in vivo* che utilizza il ratto), specifico per i pesticidi, a richieste generiche di dati di tossicocinetica. Sempre a proposito dei pesticidi la Direttiva europea 91/414 richiede i dati di assorbimento cutaneo per l'inclusione dei principi attivi presenti nei pesticidi nell'appendice 1. Per il resto esistono generici documenti di discussione prodotti dall'EPA (US Environmental Protection Agency, 1992) e dalla Food and Drug Administration (FDA) (Skelly *et al.*, 1987; US Federal Register, 1993), una linea guida prodotta da un gruppo della European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA) focalizzata sui prodotti cosmetici (Diembeck, 1999) e due bozze di linee guida OECD per studi di assorbimento cutaneo *in vivo* ed *in vitro* (OECD, 1994).

Esistono metodi più o meno accurati per la stima dell'assorbimento cutaneo *in vivo* (Kempainen & Reifenrath, 1990; Marco *et al.*, 1985) che utilizzano preferenzialmente il ratto. I limiti di questi studi sono legati soprattutto al fatto che la pelle degli animali, anche quella del ratto, è più permeabile di quella umana e quindi, nel caso di una estrapolazione dei risultati all'uomo, è necessario tener conto di questa maggiore sensibilità del modello animale. Esistono anche difficoltà di tipo pratico legate al fatto che è necessario proteggere il sito di applicazione della sostanza in esame per evitare che l'animale possa in qualche modo asportarne una parte.

## Saggi alternativi

I saggi *in vitro* attualmente disponibili, ma non ancora validati, per misurare l'assorbimento cutaneo (Franz, 1975; Bronaugh & Collier, 1991; Howes *et al.*, 1996; Roberts & Walters, 1998) si basano fondamentalmente sulla misura della diffusione del composto in esame dalla superficie del campione di pelle in un recipiente di raccolta. In sostanza la cella di penetrazione è divisa da un campione di pelle in una "camera superiore" e una "inferiore" contenente un

liquido “recettore” la cui composizione non deve alterare l’integrità della pelle e le sue caratteristiche di permeabilità (Figura 5).



**Figura 5. Schema della cella per lo studio dell'assorbimento cutaneo**

I campioni di pelle sono normalmente preparati sotto forma di dischi di grandezza adeguata alla cella e possono essere costituiti da: 1) pelle intera, 2) derma separato dalla parte superiore del derma stesso e dall'epidermide con un dermatomo, 3) membrane epidermiche preparate trattando la pelle intera con mezzi enzimatici o chimici o con il calore. In ogni caso il campione viene collocato nella cella con lo strato corneo rivolto verso la camera superiore e, prima di applicare la sostanza in esame, ogni campione di pelle deve essere controllato per la sua integrità con metodi diversi (penetrazione di una molecola marcata, misura della resistenza elettrica o della perdita di acqua attraverso l'epidermide). I dettagli di questo sistema *in vitro* per l'assorbimento cutaneo sono riportati nella linea guida sviluppata dal COLIPA (Diembeck *et al.*, 1999) che sostanzialmente riprende i principi contenuti nella proposta della OECD (OECD, 1994).

## Conclusioni

Tenendo conto che sono passati solo poco più di dieci anni dalla presa d'atto della necessità di ricorrere, quando possibile, a metodi alternativi alla sperimentazione animale, è possibile trarre un bilancio positivo di questa fase essenzialmente per due motivi. Il primo è che questi dieci anni sono serviti a costruire il substrato teorico e pratico per la messa a punto e validazione di nuovi metodi: questa fase iniziale è ormai consolidata e quindi non si ripeterà, anche se in corso d'opera avverranno ovviamente modifiche e arricchimenti. Il secondo motivo è che l'esperienza acquisita in questa fase sarà d'aiuto nell'ottimizzazione e velocizzazione del processo anche per la cultura e la professionalità nate intorno a questo argomento.

E' ovvio che, trattandosi di un periodo per qualche verso sperimentale quello vissuto fino ad oggi, gli avanzamenti più consistenti si sono avuti nel settore della riduzione del numero e della sofferenza degli animali piuttosto che in quello della sostituzione. Tuttavia i fronti aperti dalla

biologia molecolare nel campo della tossicologia, diagnostica, terapia, ecc. fanno prevedere che il settore della sostituzione completa dell'animale nella sperimentazione verrà alimentato da una quantità notevole di nuovi metodi *in vitro* molto sensibili e fondati su meccanismi di azione.

## Riferimenti bibliografici

ASTM (American Society for Testing and Materials). *Standard test method for estimating acute oral toxicity in rats*. Philadelphia Pa: ASTM; 1987. (E 1163-87).

Balls M, Blaauboer BJ, Brusick D, Frazier JF, Lamb D, Pemberton M, Reinhardt C, Roberfroid M, Rosenkranz H, Schmid B, Spielmann H, Stamatii A, Walum E. Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. *ATLA* 1990a;18:313-37.

Balls M, Blaauboer BJ, Fentem JH, Bruner L, Combes RD, Ekwall B, Fielder RJ, Guillouzo A, Lewis RW, Lovell DP, Reinhardt CA, Repetto G, Sladowski D, Spielmann H, Zucc, F. Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. ECVAM Workshop Report 5. *ATLA* 1995; 23:129-47.

Balls M, Botham P, Cordier A, Fumero S, Kayser D, Koeter H, Kuondakjian P, Lindquist NG, Meyer O, Pioda L, Reinhardt C, Rozemond H, Smyrniotis T, Spielmann H, Van Looy H, Van Der Venne MT, Walum E. Report and Recommendations of an international workshop on promotion of the regulatory acceptance of validated non-animal toxicity test procedures. *ATLA* 1990b;18:339-44.

Balls M, Clothier RH. Comments on the scientific validation and regulatory acceptance on *in vitro* toxicity tests. *Toxicology in vitro* 1991;5:535-8.

Basketter DA, Scholes EW, Kimber I, Botham PA, Hilton J, Miller K, Robbins MC, Harrison PTC, Waite SJ. Interlaboratory evaluation of the local lymph node assay with 25 chemicals and comparison with guinea pig test data. *Toxicology Methods* 1991;1:30-43.

Borenfreund E, Puerner J. Toxicity determined *in vitro* by morphological alteration and neutral red absorption. *Toxicology Letters* 1985;24:119-224.

Bronaugh RL, Collier SW. Protocol for *in vitro* percutaneous absorption studies. In: Bronaugh RL, Maibach HI (Ed.). *In vitro percutaneous absorption: principles, fundamentals and applications*. Boca Raton: CRC Press; 1991. p. 237-41.

Bruce RD. An Up-and-down procedure for acute toxicity testing. *Fundamental Applied Toxicology* 1985;5:151-7.

BTS (British Toxicology Society). Working Party on Toxicity. A new approach to the classification of substances and preparation on the base of their acute toxicity. *Human Toxicology* 1984;3:85-92.

Communication from the Commission to the Council of the European Parliament. Establishment of a European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). 29 Oct. 1991 Ec (91) 1794 final.

Comunità Europea. Direttiva del Consiglio delle Comunità Europee, 24 novembre 1986 n. 609. *Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea* N.L. 358/1, 18 dicembre 1986.

De Heer C, Bosman-Hoefakker S, Hakkert BC. Principles for study protocols addressing the dermal absorption of pesticides. TNO report V98.356, TNO Nutrition and Food Research Institute, 1999. p. 1-29.

Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W. Test guidelines for *in vitro* assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. *Food and Chemical Toxicology* 1999;37:191-205.

Ekwall B, Bondesson I, Hellberg S, Hogberg J, Romert L, Stenberg K, Walum E. Validation of *in vitro* cytotoxicity tests – past and present strategies. *ATLA* 1999;19:226-33.

Franz TJ. Percutaneous absorption: on the relevance of *in vitro* data. *Journal of Investigative Dermatology* 1975;64:190-5.

- Frazier JF. *Scientific criteria for validation of in vitro toxicity tests*. OECD Environment Monograph N. 36, 1990.
- Gad SC, Dunn BJ, Dobbs DW, Reilly C, Walsh RD. Development and validation of an alternative dermal sensitisation test: the mouse ear swelling test (MEST). *Toxicology and Applied Pharmacology* 1986;84:93-114.
- Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR, Hoeck U, Kemper F, Maibach H, Marty, J-P, Merk H, Parra J, Rekkas D, Rondelli I, Shaefe, H, Tauber U, Verbiere N. Methods for assessing percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report 13. *ATLA* 1996;24:81-106.
- Italia. Decreto Legislativo 27 gennaio 1992, n. 116. Attuazione della direttiva n. 86/609/CEE in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. *Supplemento Ordinario - Gazzetta Ufficiale* n.40, 18 febbraio 1992, p. 5-25.
- Kemppainen BW, Reifenrath WG (Ed.). *Methods for skin absorption*. Boca Raton: CRC press; 1990.
- Lipnick RL, Cotruvo JA, Hill RN, Bruce RD, Stitzel KA, Walker AP, Chu I, Goddard M, Segal L, Springer JA, Myers RC. Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD50 and Fixed Dose acute toxicity procedures. *Food and Chemical Toxicology* 1995;33:223-31.
- Magnusson B, Kligman AM. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximisation test. *Journal of Investigative Dermatology* 1969;52:268.
- Marco GJ, Simoneaux BJ, Williams SC, Cassidy JE, Bissig R, Muecke W. Radiotracer approaches to rodent dermal studies. In: Honeycut RC, Zweig G, Ragsdale NN (Ed.). *Dermal exposure related to pesticide use. Discussion of risk assessment*. Washington DC: American Chemical Society; 1985.
- OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development). *OECD Workshop on harmonisation of validation and acceptance criteria for alternative toxicological test methods*. Paris: OECD Environment Directorate, Chemicals Group and Management Committee; 1996. Test Guidelines Programme 15.
- OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development). *Proposal for two new guidelines on percutaneous absorption*. Paris: OECD Environmental Health and Safety Division Discussion Document; 1994. (ENV/EHS/HK/mc/94.103).
- Oliver GJA, Pemberton MA, Rhodes C. An *in vitro* model for identifying skin corrosive chemicals. I. Initial validation. *Toxicology In vitro* 1988;2:7-17.
- Ritz HL, Buehler EV. Procedure for conducting the guinea pig assay. In: Drill VA, Lazar P (Ed.). *Current concepts in dermatology*. New York: Academic Press; 1980. p. 25-40.
- Roberts MS, Walters KA (Ed.). *Dermal absorption and toxicity assessment*. Drugs and Pharmaceutical Sciences series. Vol. 91. New York: Marcel Dekker; 1998.
- Russel WMS, Burch RL. *The principle of human experimental technique*. London: Meuthen; 1959 (University Federation for Animal Welfare, Special Edition, 1992).
- Ryan J, McSweeney B. *Development and use of in vitro toxicity tests in Europe. Final report: study contract EC Biotech 6 and 85.230*. Dublin: National Board for Science and Technology (NBST); 1986.
- Scala RA. Theoretical approaches to validation. In: Goldberg AM (Ed.). *In vitro toxicology: approaches to validation*. New York: MA Liebert Publ.; 1987. p 1-10.
- Schlede E, Mischke U, Diener W, Kayser D. The international validation study of the acute-toxic-class method (oral). *Archives of Toxicology* 1994;69:659-70.
- Schlede E, Mischke U, Roll R, Kayser D. A national validation study of the acute-toxic-class method - an alternative to the LD50 test. *Archives of Toxicology* 1992;66:455-70.
- Skelly JP, Shah VP, Maibach HI, Guy RH, Wester RC, Flynn G, Yacobi A. FDA, AAPS report of the workshop on principles of *in vitro* percutaneous penetration studies: relevance to bioavailability and equivalence. *Pharmaceutical Research* 1987;4:265-7.



Spielmann H, Lovell WW, Holzle E, Johnson, BE, Maurer T, Miranda MA, Pape WJW, Sapora O, Sladowski D. *In vitro* phototoxicity testing. ECVAM Workshop Report 2. *ATLA* 1994;22:314-48.

US Environmental Protection Agency. Department of Commerce. *Dermal exposure assessment: principles and applications*. Washington DC: US EPA, Department of Commerce; 1992. (Report N. EPA/600/8-91/011B).

US Federal Register. Subdivision F Hazard Evaluation - Humans and domestic animals: proposed new guideline section 85-3. Dermal absorption studies of pesticides. *Federal Register* 1993, 58,202: 54,350.

Van De Sandt J, Roguet R, Cohen C, Esdaile D, Ponc M, Corsini E, Barker C, Fusenig N, Liebsch M, Benford D, De Brugerolle De Fraissinette A, Fartasch M. The use of human keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation. *ATLA* 1999;27:723-43.

Van Den Heuvel MJ, Clark DG, Fielder RJ, Koundakjian PP, Oliver GJA, Pelling D, Tomlinson NJ, Walker A. The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. *Food and Chemical Toxicology* 1990;28:469-82.

Van Den Heuvel MJ, Dayan AD, Shillaker RD. Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicology* 1987;6:279-91.

Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M. An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion. *ATLA* 1998;26:709-20.

Zucco F, Vignoli AL. *In vitro* toxicology in Europe (1986-1997). *Toxicology In Vitro* 1998;12:745-928.

*Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità  
e Direttore responsabile: Enrico Garaci*

*Coordinamento redazionale:  
Paola De Castro e Sandra Salinetti*

*Stampato dal Servizio per le attività editoriali  
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
deve essere preventivamente autorizzata.*

*Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988*

*Roma, settembre 2001 (n. 3) 5° Suppl.*

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici  
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori*