

## GLI ANIMALI GENETICAMENTE MODIFICATI NELLA NUOVA DIRETTIVA EUROPEA 2010/63

Alessandra Berry e Igor Branchi

Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La legislazione dell'Unione Europea (UE) include una vasta gamma di normative atte a tutelare il benessere animale. Queste riguardano la fauna selvatica, gli animali degli zoo, gli animali da fattoria, gli animali da reddito e, non ultimi, gli animali utilizzati a fini scientifici. Il 22 settembre 2010, l'UE ha adottato la Direttiva 2010/63/EU per regolamentare l'uso degli animali nella ricerca scientifica. Tale Direttiva è un aggiornamento della pre-esistente Direttiva 86/609/CEE in vigore dal 1986, e ha come principale obiettivo quello di migliorare la legislazione relativa all'uso degli animali nelle procedure sperimentali, ribadendo il principio delle tre R (Russell and Burch, 1959): "Sostituire" (*Replace*), "Ridurre" (*Reduce*) e "Perfezionare" (*Refine*) ([http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/home\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm)). Come si evince nelle considerazioni iniziali della nuova Direttiva, dall'anno di pubblicazione della Direttiva 86/609/CEE, sono ora disponibili nuove conoscenze scientifiche con riguardo ai fattori che influenzano il benessere degli animali nonché alla loro capacità di provare ed esprimere dolore, sofferenza, angoscia e danno prolungato. Per tale motivo si rende necessario migliorare il benessere degli animali utilizzati nelle procedure scientifiche rafforzando le norme minime per la loro tutela in linea con i più recenti sviluppi scientifici. In ventiquattro anni sono stati fatti anche importanti progressi che hanno reso disponibili nuove tecnologie come ad esempio la produzione di animali geneticamente modificati che ha presentato, e continua a presentare, un'opportunità unica per la ricerca di base in campo biomedico. Secondo la nuova Direttiva 2010/63/EU il benessere di questi animali è tutelato al pari di tutte le altre specie utilizzate a scopi scientifici. L'inclusione dei "transgenici" nella nuova Direttiva rappresenta un enorme e imprescindibile passo in avanti, ma è sufficiente tutelare questi animali al pari di tutti gli altri?

Il lasso di tempo tra la pubblicazione delle due Direttive è di non scarso rilievo – ventiquattro anni – soprattutto se si tiene in considerazione che dagli anni ottanta in poi l'utilizzo degli animali geneticamente modificati è cresciuto esponenzialmente. A tal proposito, nell'aprile 1997 si è svolto il ventottesimo workshop dell'*European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM), che ha avuto come scopo principale sia quello di formulare una serie di linee guida per assistere le Autorità regolatorie nella stesura delle leggi nazionali relative all'uso degli animali transgenici – colmando così parzialmente il vuoto legislativo – sia quello di valutare l'utilizzo di tali animali nell'ottica del principio delle "tre R" (Mepham *et al.*, 1998). Infatti, se da un lato animali geneticamente modificati possono contribuire a "Ridurre" l'utilizzo di soggetti sperimentali attraverso interventi mirati su specifici geni (molto più efficaci rispetto alla tradizionale selezione genetica ottenuta tramite accoppiamenti tra individui selezionati), d'altro canto le difficoltà tecniche legate alle procedure di generazione degli animali stessi (es. una bassa probabilità nella ricombinazione omologa) contribuiscono ad aumentare il numero dei soggetti necessari per il singolo "transgene" diminuendo così il potenziale di "riduzione" del targeting genetico.

I roditori, e il topo in particolare, sono la specie attualmente preferita nella sperimentazione animale per la sua nota prolificità (fino a 20 nuovi nati in un solo parto), i ridotti tempi di gestazione (19 giorni), le ridotte dimensioni e il basso costo di mantenimento. Il topo è stata,

negli anni '80, la prima specie animale manipolata per diventare "transgenica" (Palmiter *et al.* 1982; Palmiter *et al.* 1983).

Da allora, le tecniche si sono perfezionate grazie anche al progresso nelle conoscenze relative al genoma del topo e alla relativa facilità di manipolazione. Diversi autorevoli scienziati hanno chiaramente illustrato gli importanti vantaggi portati alla ricerca scientifica dall'applicazione dell'ingegneria genetica in questa specie (Crawley, 2000): i) *la specificità*, si possono scegliere i caratteri su cui lavorare, riducendo teoricamente al minimo le interferenze; ii) *la rapidità*, una data combinazione di caratteri può essere ottenuta in una generazione quando il "metodo della selezione" ha bisogno di un numero più elevato di generazioni per ottenere un risultato analogo; iii) *la flessibilità*, poiché il DNA (acido deossiribonucleico) è strutturato secondo le regole di un codice universale praticamente comune a tutte le specie viventi ed è quindi possibile trasferire materiale e informazioni genetiche tra specie filogeneticamente anche molto distanti e iv) *l'economia*, possono essere scelte specie animali che, come nel caso del topo, permettono di lavorare su un grande numero di individui in breve tempo e con costi ridotti. Tuttavia, le tecniche di ingegneria genetica per la produzione di animali geneticamente modificati portano con sé anche un numero di problematiche che, sebbene non ne limitino la portata scientifica, devono essere prese in seria considerazione al fine di evitare la produzione di dati di scarsa qualità. Ad esempio, i cambiamenti che possono insorgere in seguito alla modificazione di un gene, a partire da fasi precoci dell'ontogenesi, possono interferire con il normale programma di sviluppo dando luogo a cambiamenti fisiologici e/o comportamentali compensatori, portando così a fenotipi completamente inattesi nell'animale maturo (Newmark, 1989; Lipp and Wolfer, 1998). Vi sono inoltre altri fattori che possono confondere l'interpretazione del fenotipo, come l'inserimento di parte di geni adiacenti a quello su cui si vuole intervenire selettivamente, i cosiddetti geni "flanking", provenienti da un diverso background genetico, che possono introdurre una variabilità inaspettata difficilmente controllabile. Particolare attenzione poi andrebbe rivolta all'interazione tra la mutazione genetica indotta e l'ambiente genetico in cui essa si esprime, cioè lo specifico background genetico che caratterizza il ceppo murino utilizzato. Ad esempio, il ceppo 129, largamente impiegato per la produzione di knock-out, è caratterizzato da ridotte capacità di apprendimento, ipomobilità e ipoplasia del corpo calloso rendendoli poco adatti a studi comportamentali (Balogh *et al.*, 1999); i topi C57BL6 sono suscettibili all'insorgenza di mutazioni che possono provocare sordità (Zheng and Johnson, 2001) mentre gli FVB possono subire degenerazione retinale fornendo ridotte prestazioni in test che implicano rispettivamente l'uso dell'udito e delle capacità visive.

Inoltre, nelle prime fasi della vita postnatale il comportamento materno dei roditori altriciali influenza fortemente lo sviluppo neurobiologico della prole. In questo contesto, mutazioni, anche in un singolo gene, possono comportare profonde alterazioni del comportamento materno, influenzando indirettamente lo sviluppo della generazione successiva. Infine, la pleiotropia, il fenomeno per il quale un singolo gene influenza più caratteri dello stesso organismo, rende estremamente difficile predire gli effetti biologici globali della mutazione anche di un singolo gene (per una rievitazione critica sull'argomento si veda Gingrich e Hen, 2000, e Gerlai, 1996). A questo proposito è importante considerare che la generazione di topi mutanti può a volte provocare effetti aspecifici non gravi ma che, se non sufficientemente caratterizzati, possono interferire con la valutazione di risposte fisiologiche e/o comportamentali a specifici stimoli portando a possibili interpretazioni confondenti del fenotipo. Ad esempio, in test cognitivi basati sulla capacità visiva del soggetto sperimentale per l'apprendimento di un compito spaziale (es. labirinto acquatico di Morris), se il rischio di ipovisione non è stato accuratamente valutato, si può attribuire un significato erroneo alle prestazioni del soggetto geneticamente modificato, incorrendo in falsi positivi o negativi. Gli effetti aspecifici possono anche essere di

grave entità come ad esempio un'alta mortalità prenatale e neonatale e un peso fetale anormalmente aumentato o diminuito. Inoltre, è necessario controllare gli effetti della manipolazione genetica sulla sofferenza psicofisica o sulla soglia del dolore. Per esempio, iper- o ipoalgesia (accentuata o viceversa ridotta sensibilità dolorifica), difficoltà locomotorie o sensoriali, scarsa capacità di interazione sociale, ecc., possono rendere l'animale particolarmente suscettibile a situazioni generanti stress o dolore. È comunque importante considerare che, sebbene gran parte dei topi transgenici venga utilizzata come modello di patologie umane, lo studio della funzione di un gene può, in alcuni casi, prevedere manipolazioni genetiche in grado di apportare benefici agli animali modificati. Ad esempio l'inserzione nel genoma di geni che conferiscono resistenza alle malattie può aumentare il benessere dell'animale modificato rispetto a quello del fenotipo selvatico (Petrocelli *et al.*, 2003).

Sulla base di queste considerazioni, appare quindi evidente, nello specifico contesto di esperimenti che prevedano l'impiego di individui geneticamente modificati, l'importanza del problema del benessere animale, che andrebbe considerato in modo specifico e peculiare, valutando le alterazioni genotipiche e, di conseguenza, fenotipiche dei soggetti in esame (Hazecamp *et al.*, 1998; Duncan e Fraser, 1997; Vitale e Alleva, 1999; De Cock e Buning, 1999). A tal proposito, nella nuova Direttiva europea 2010/63, all'articolo 3 viene fornita la definizione di "procedura" come qualsiasi uso, invasivo o non invasivo, di un animale a fini sperimentali o ad altri fini scientifici dal risultato noto o ignoto, o a fini educativi, che possa causare all'animale un livello di dolore, sofferenza, angoscia o danno prolungato equivalente o superiore a quello provocato dall'inserimento di un ago conformemente alle buone prassi veterinarie. Ciò include qualsiasi azione che intenda o possa determinare la nascita o la schiusa di un animale o la creazione e il mantenimento di una linea di animali geneticamente modificata in queste condizioni. A riguardo, l'attuale Decreto legislativo 116/1992 considera "esperimento" la nascita di un animale in condizioni di dolore, tuttavia non fa alcun riferimento al mantenimento di colonie geneticamente modificate portatrici di un fenotipo sofferente.

Ancora, nella nuova Direttiva 2010/63/UE, per quanto riguarda la fine di una procedura, contemplata dall'articolo 17, essa viene definita non solamente come la fine della necessità di effettuare nuove osservazioni, ma anche, riferendosi agli animali geneticamente modificati, quando non è più riscontrato o previsto per la discendenza un livello di dolore, sofferenza, angoscia o danno prolungato equivalente o superiore a quello provocato dall'inserimento di un ago. Altro aspetto della nuova Direttiva 2010/63/UE è la classificazione della gravità delle procedure in quattro gruppi: "non risveglio", "lievi", "moderate" e "gravi", a cui fa riferimento l'articolo 15. Nello specifico, nell'allegato VIII, Sezione III, vengono riportati come esempi di procedure "lievi" la riproduzione di animali geneticamente modificati da cui dovrebbe risultare un fenotipo con effetti lievi e la combinazione o l'accumulo degli esempi seguenti: (i) valutazione della composizione corporea con tecniche non invasive e contenimento fisico minimo; (ii) controllo elettrocardiografico con tecniche non invasive e contenimento fisico minimo o nullo di animali abituati; (iii) applicazione di dispositivi telemetrici esterni che non causano probabilmente alcuna menomazione ad animali socialmente abituati e non interferiscono con l'attività e il comportamento normali; (iv) riproduzione di animali geneticamente modificati da cui non dovrebbe risultare un fenotipo avverso clinicamente riscontrabile; (v) aggiunta di marker inerti alla dieta per seguire il passaggio del contenuto gastrointestinale; (vi) sospensione dell'alimentazione per <24 ore nei ratti adulti; (vii) sperimentazione in ambiente naturale. Vengono invece classificati come esempi di procedure "moderate" la riproduzione di animali geneticamente modificati da cui dovrebbe risultare un fenotipo con effetti moderati; e la creazione di animali geneticamente modificati mediante procedure chirurgiche.

Chiunque lavori con animali transgenici dovrebbe essere consapevole di come valutare il benessere al fine di evitare l'insorgenza di uno stato di malessere (Petrocelli *et al.*, 2003). È possibile, attraverso la valutazione di alcuni parametri, ottenere informazioni preziose sul loro benessere. Tali parametri includono, ad esempio, la manifestazione di determinati comportamenti specie-specifici e gli indicatori comportamentali e fisiologici di "piacere" (inteso come soddisfazione delle necessità fisiologiche). Al contrario esiste una vasta gamma di misure relative alla mancanza di benessere: stereotipie, riduzione dell'aspettativa di vita, della capacità di crescita e riproduzione; insorgenza di patologie; immunosoppressione; sforzi fisiologici e comportamentali per interagire con l'ambiente circostante, ecc., solo per citarne alcuni (Broom e Johnson, 1993). Dal punto di vista del benessere animale, ai topi geneticamente modificati devono essere fornite garanzie di alti livelli di mantenimento. Per questo motivo, tutte le procedure operative standard relative alla gestione della stabulazione dovrebbero essere effettuate da uno staff di persone in grado di valutare i diversi aspetti legati alle specifiche necessità relative al benessere di questi individui. In particolare, le conoscenze etologiche possono e debbono essere utilizzate per migliorare le condizioni di vita dei roditori usati nella sperimentazione animale, in particolare nel caso dei topi transgenici (Vitale e Alleva, 1999; Alleva e Carere, 2000). Van der Meer e colleghi ad esempio suggeriscono che stabularisti, che abbiano seguito corsi di formazione specifici, monitorino quotidianamente l'animale transgenico a partire dalla nascita, adoperando moduli standardizzati che permettano la raccolta di informazioni riguardanti, ad esempio, la postura o la reattività dell'animale sperimentale. Inoltre sarebbe importante che il monitoraggio non fosse limitato alla prima generazione ma che includesse almeno due generazioni successive, prestando particolare attenzione al comportamento riproduttivo, alla gestazione, alla capacità di allevare i piccoli e al numero di nati (Van der Meer, 2001). Altri elementi utili nella valutazione del benessere dell'animale geneticamente modificato dovrebbero tenere in considerazione l'osservazione del comportamento sociale. La procedura di pulizia della gabbia rappresenta un'occasione per tali osservazioni in quanto destabilizza l'equilibrio gerarchico all'interno di gruppi di maschi, permettendo di esaminare i comportamenti agonistici (Gray e Hurst, 1995). Tali comportamenti sono mediati da stimoli olfattivi emanati dal corpo e dalle deiezioni presenti sulla lettiera (particolarmente l'urina). Questi stimoli sono coinvolti nella comunicazione del ruolo sociale di dominanza sul territorio (gabbia) e nel riconoscimento e mantenimento della tolleranza sociale fra individui familiari. Così alterazioni nel comportamento sociale potrebbero facilmente essere osservabili a seguito della routinaria procedura di pulizia delle gabbie da parte del personale addetto alla stabulazione, con un investimento minimo in termini di tempo e di finanziamenti. Sebbene gli animali geneticamente modificati non siano specificamente menzionati, la Direttiva 2010/63/UE riporta come il benessere degli animali usati nelle procedure dipenda fortemente dalla qualità e dalle competenze professionali del personale incaricato della supervisione delle procedure, di coloro i quali le attuano, nonché di coloro i quali controllano chi si occupa degli animali su base giornaliera. Gli Stati membri dovrebbero assicurare, attraverso autorizzazioni o con altri mezzi, che il personale sia adeguatamente istruito, formato e competente. Inoltre, è importante che il personale sia supervisionato finché non dimostri di aver acquisito le competenze necessarie. Linee guida non vincolanti, a livello dell'Unione, in tema di obblighi scolastici potrebbero favorire, sul lungo termine, la libera circolazione del personale.

Benché il topo sia la specie animale oggi più utilizzata nell'ambito delle scienze biomediche, anche altre specie, quali ovini e suini, sono sempre più impiegate nell'ambito dell'ingegneria genetica; di conseguenza, le problematiche, soprattutto a carattere bioetico, legate alle nuove biotecnologie debbono essere seriamente considerate anche per queste specie. Un potenziale problema associato all'uso di animali geneticamente modificati è quello della contaminazione dell'ecosistema. Sebbene tale evenienza sia assai improbabile, in quanto tutti gli studi condotti

finora hanno dimostrato come gli animali geneticamente modificati abbiamo notevoli difficoltà ad adattarsi all'ambiente naturale, questa non può essere esclusa. Infatti, la fuga di questi soggetti potrebbe portare alla "contaminazione" progressiva di colonie naturali circostanti (soprattutto nel caso di animali di dimensioni ridotte quali piccoli roditori). La prevenzione di tale evento indesiderato deve divenire una priorità per i laboratori che contengano animali geneticamente modificati. Un approccio preventivo attendibile ed efficace dovrebbe includere appropriate barriere per impedire eventuali fughe. In un'ottica più filosofica è comunque importante considerare se l'utilizzo delle nuove tecnologie genetiche possa inficiare in qualsiasi modo la biodiversità, se non siano incompatibili con il rispetto per la vita o se non rappresentino un mero sfruttamento della vita animale violandone la dignità (Petrocelli *et al.*, 2003). Di fronte a tali incertezze si dovranno adottare misure precauzionali per la tutela dell'essere vivente.

In conclusione, dall'applicazione della Direttiva 86/609/CEE sono stati fatti importanti progressi in campo scientifico inclusa la vastissima diffusione di animali geneticamente modificati. A ventiquattro anni di distanza la nuova Direttiva 2010/63/EU, con l'inclusione degli animali transgenici nella tutela del benessere degli animali di laboratorio, ha effettuato un necessario e imprescindibile passo avanti. Tuttavia, considerati i delicati aspetti legati alla loro intrinseca condizione biologica e a caratteristiche fenotipiche non sempre facilmente valutabili e prevedibili, riteniamo che il benessere degli animali transgenici meriti particolari attenzioni non ancora pienamente contemplate in questa Direttiva.

## Ringraziamenti

Si ringraziano Sara Capoccia e Veronica Bellisario per il reperimento del materiale bibliografico e per gli utili commenti durante la stesura di questo contributo.

## Bibliografia

- Alleva E, Carere C. Etologia. In: *Appendice 2000. Istituto della Enciclopedia Italiana "Giovanni Treccani"*. Roma: Enciclopedia italiana "Giovanni Treccani"; 2000. p. 625-9.
- Balogh SA, McDowell CS, Stavnezer AJ, Denenberg VH. A behavioral and neuroanatomical assessment of an inbred substrain of 129 mice with behavioral comparisons to C57BL/6J mice. *Brain Res* 1999;836:38-48.
- Broom DM, Johnson KG. *Stress and animal welfare (Chapman & Hall Animal Behaviour Series)*. London: Kluwer Academic Publisher; 1993. p. 211.
- Crawley JN. *What's Wrong with My Mouse?: Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice*. John Wiley & Sons Inc.; 2000.
- De Cock Buning T. The real role of intrinsic value in ethical review committees. In: Dol M, Fentener van Vlissingen M, Kananmouentalib S, Visser T, Zwart H (Ed.). *Recognising the intrinsic value of animals, beyond animal welfare*. Assen, The Netherlands: Van Gorcum; 1999; p. 133-9.
- Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 1982;300:611-5.
- Duncan IJH, Fraser D. Understanding animal welfare. In: Appleby MC, Hughes BO (Ed.). *Animal welfare*. Wallingford: Can International; 1997. p. 19-31.
- Gerlai R. Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *TINS* 1996;19:177-181.
- Gingrich JA, Hen R. The broken mouse: the role of development, plasticity and environment in the interpretation of phenotypic changes in knockout mice. *Curr Opin Neurobiol* 2000;10:146-52.

- Gray S, Hurst JL. The effects of cage cleaning on aggression within groups of male laboratory mice. *Animal Behaviour* 1995;49:821-6.
- Hazecamp A, De Cock Buning T. *Health and welfare of transgenic farm animals: Past, present and presepectives*. Leiden: University of Leiden; 1998.
- Lipp HP, Wolfer DP. Genetically modified mice and cognition. *Curr Opin Neurobiol* 1998;8:272-80.
- Mepham TB, Combes RD, Balls M, Barbieri O, Blokhuis HJ, Costa P, *et al*. The Use of Transgenic Animals in the European Union. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop. *ATLA* 1998;26:21-43.
- Newmark P. Guidelines produced for the use of transgenic animals in research. *Nature* 1989;337:295.
- Palmiter RD, Norstedt G, Gelinas RE, Hammer RE, Brinster RL. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science* 1983;222:809-14.
- Petrocelli A, Rodriguez D, Spadafora C, Tamino G, Zannini P. Transgenesi. In: Ravarotto L, Pegoraro R. (Ed.). *Transgenesi Clonazione Xenotrapianto. Analisi scientifica, giuridica ed etica sull'impiego degli animali*. Padova: Piccin; 2003. p. 13-41.
- Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen; 1959. Reprinted by Universities Federation for Animal Welfare; 1992.
- Van der Meer M, Rolls A, Baumans V, Olivier B, van Zutphen LFM. Use of score sheets for welfare assessment of transgenic mice. *Laboratory Animals Ltd. Laboratory Animals* 2001;35:379-89.
- Vitale A, Alleva E. Ethological and welfare considerations in the study of aggression in rodents and nonhuman primates. In: Haug M, Whalen RE (Ed.). *Animal models of human emotion and cognition*. Washington: American Psychological Association; 1999. p. 283-95.
- Zheng QY, Johnson KR. Hearing loss associated with the modifier of deaf waddler (mdfw) locus corresponds with age-related hearing loss in 12 inbred strains of mice. *Hearing Research* 2001;154:45-53.