

ARRICCHIMENTO AMBIENTALE, BENESSERE ANIMALE E VALIDITÀ DEI DATI SPERIMENTALI

Simone Macrì

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

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

(Allegato III della Direttiva 2010/63/UE)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Quale arricchimento?

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

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

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

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

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

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

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

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

Bibliografia

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

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