

Il Principio delle “3Rs” e la sperimentazione animale

Augusto Vitale

Reparto di Neuroscienze comportamentali – Dipartimento di Biologia cellulare e Neuroscienze – Istituto Superiore di Sanità - Roma

Nel 1959 due accademici britannici, Rex Burch e William Russell, membri della “University Federation of Animal Welfare”, associazione tuttora molto attiva nel campo del benessere animale, pubblicarono un libro destinato a diventare seminale per l’evoluzione della sperimentazione animale: “The Principles of Humane Experimental Technique”. In questo loro volume i due studiosi presentavano una ricetta da seguire per praticare una sperimentazione animale che tenesse presente sia della qualità del dato che del benessere degli animali utilizzati. Questa ricetta è tuttora indicata come il Principio, o Modello, delle “3R”. In particolare, chi vuole fare ricerca con gli animali dovrebbe inizialmente chiedersi se sia possibile sostituire il modello animale prescelto con un modelli non senzienti (*Replacement*); quindi deve cercare il più possibile di ridurre il numero di individui utilizzati nel proprio protocollo sperimentale (*Reduction*); infine deve adoperarsi per minimizzare il più possibile il livello di sofferenza imposto agli animali sperimentali (*Refinement*). Le “3Rs” si sono evolute nel tempo, anche se i principi di fondo sono rimasti sempre gli stessi e sempre validi.

Vediamo le tre “R” in particolare.

Nella dicitura originale di Russell e Burch, *Replacement* era indicato come: “*any scientific method employing non-sentient material which may, in the history of experimentation, replace methods which use conscious living vertebrates*”. Questo concetto si è trasformato, e in generale oggi si distingue un rimpiazzo parziale (*Total Replacement*), e rimpiazzo completo (*Partial Replacement*), concetti tra l’altro già suggeriti dai due autori nel loro testo originale. Per *Total Replacement* si intende la scomparsa del modello animale in tutto il protocollo sperimentale. Nel secondo caso invece il modello animale originario viene sostituito da un modello che prevede l’utilizzo di una specie caratterizzata da una minore complessità del sistema nervoso, rispetto all’originale (un topo per una scimmia, un pesce per un topo, un invertebrato per un pesce...); oppure il modello animale viene sostituito da un modello non animale, in una certa fase del protocollo sperimentale. E’ da notare però che la sostituzione di una specie con un’altra come esempio di *Partial Replacement*, non è una operazione condivisa da tutti. E’ un concetto proprio della normativa italiana, ma non della normativa europea originale. Per i Britannici, il *Partial Replacement* è comunque riferito a “senziente” verso “non-senziente” e, per definizione data dalla Direttiva Europea 2010/63, dove gli animali protetti dalla Direttiva sono tutti “sentient”, un pesce è comunque senziente come un macaco, e quindi non è giustificabile il suo uso al posto del primate in nome del *Partial Replacement*. Quindi, *Partial Replacement* corrisponde semplicemente con *Replacement*, nell’accezione originale proposta da Russell e Burch.

Nel caso dovessimo proporre un’alternativa all’esperimento animale, quali sono le condizioni che devono essere rispettate? Potremmo voler ottenere dal metodo alternativo gli stessi risultati ottenuti in precedenza con il metodo tradizionale, per esempio come nel caso di un test utilizzato per dimostrare l’innocuità di un certo farmaco. Potremmo, oppure, ragionare in modo inverso e modificare il fine o i risultati attesi, in modo da meglio utilizzare il metodo alternativo proposto. E’ necessario però porre l’accento che le prime considerazioni sull’utilizzo o meno di una tecnica alternativa all’uso di un modello animale, dovrebbero sempre riguardare la scientificità dell’esperimento proposto originariamente e il suo specifico fine.

Russel e Burch descrivono *Reduction* come: “*reduction in the number of animals used to obtain information of a given amount and precision*”. Questo concetto si riferisce alla riduzione del numero di soggetti utilizzati in un particolare protocollo sperimentale. E’ quindi importante notare che i due autori già sottolineavano il concetto che la riduzione del numero dei soggetti non può

determinare una inefficace potenza statistica. E' essenziale quindi chiedere consiglio a un esperto in statistica, qualora il ricercatore, o la ricercatrice, non si senta sicuro su come operare. Mediante uno studio pilota si può determinare, per esempio, il numero di variabili estranee al protocollo che possono influenzare la validità del risultato, e come tale variabilità possa richiedere un campione di una certa consistenza numerica. Questo tipo di informazioni può quindi essere utilizzato per calcolare con precisione il numero di soggetti sperimentali necessari per ottenere risultati significativi in quel particolare caso. Un altro modo per ridurre il numero di soggetti sperimentali utilizzati da diversi laboratori è quello di armonizzare il più possibile, a livello nazionale e internazionale, le metodologie utilizzate sia per test di tossicità che per ricerche di tipo biomedico. Ciò ridurrebbe significativamente la possibilità di ripetere gli stessi test in differenti paesi. Inoltre, i risultati non significativi dovrebbero essere resi disponibili, in modo da evitare il ripetersi di test inefficaci e quindi, automaticamente, si ridurrebbe drasticamente il numero di individui sperimentali utilizzati.

La definizione originale di *Refinement* offerta da Russell e Burch recita: “*simply to reduce to an absolute minimum the amount of stress imposed on those animals that are still used*”. Anche il concetto di *Refinement* si è evoluto nel tempo. Russell e Burch avevano già indicato nel loro testo che rifinire le procedure sperimentali voleva dire non solo occuparsi del benessere animale durante un esperimento (evitare casi di “*direct inhumanity*”), ma anche migliorare la qualità di vita di un individuo durante tutte le procedure che accompagnano la vita di un animale in cattività (evitare casi di “*contingent inhumanity*”). Oggi per *Refinement* si intende la tutela del benessere dell'animale sperimentale sia durante l'esperimento vero e proprio, che durante tutta la vita che l'animale passa in laboratorio, dal trasporto fino all'eutanasia. In particolare, nel 2005 fu introdotta una nuova definizione di *Refinement*, da parte di Buchanan-Smith e colleghi: “Any approach which avoids, alleviates or minimises the actual or potential pain, distress and other adverse effects suffered at any time during the life of the animals involved, or which enhances their well-being as far as possible.” Ciò che è particolarmente rilevante in questa definizione è il riferimento a uno sforzo attivo e necessario per il miglioramento dello stato di benessere dell'animale sperimentale, dove benessere non è semplicemente assenza di malessere. Questa definizione è stata adottata, nella sua sostanza, dal testo della Direttiva 201/63/EU, dove il Principio delle “3Rs” è diventato parte integrante e irrinunciabile del testo legislativo. Quindi ecco che procedure di *Refinement* possono essere adottate in tutte le fasi della vita di un animale sperimentale.

Per esempio, un esempio di *Refinement* delle procedure che negli ultimi anni si è sempre più diffusa la tecnica del rinforzo positivo. In questo caso, sfruttando le potenzialità dell'apprendimento associativo e mediante l'uso di ricompense alimentari, all'animale viene insegnato a cooperare nelle procedure routinarie sperimentali. Il risultato di questa metodologia, per esempio, è l'offerta spontanea di un arto da parte di una scimmia per una certa inoculazione, oppure per la somministrazione di un certo farmaco per via orale. Una forma di *Refinement* è poi il miglioramento delle condizioni di stabulazione. Qui di nuovo l'idea è che animali più “felici” forniscono dati più attendibili. L'idea tradizionale di arricchimento ambientale, cioè l'idea forte e principale di questa pratica, è di fornire all'animale in cattività la possibilità di sperimentare un repertorio comportamentale il più possibile simile a quello dell'animale in natura.

Un punto importante che vorrei sottolineare, è che le “3Rs” non sono indipendenti fra di loro, ma possono interagire. Si possono immaginare casi nei quali l'applicazione di una delle tre “Rs” può avere un impatto positivo su una o tutte e due le altre “Rs”. Per esempio, un programma educativo dedicato al personale tecnico che si occupa della manutenzione degli animali, dove siano enfatizzati i bisogni specie-specifici di animali sperimentali, può portare a una maggiore attenzione verso lo stato di benessere. Ciò porta a un'automatica applicazione del concetto di *Refinement*. Conseguentemente, grazie a uno stato generale di benessere più elevato, gli animali affrontano con minore stress una particolare condizione sperimentale: ciò porta ad una minore variabilità dei risultati sperimentali dovuta agli effetti stressanti dell'esperimento stesso. Una minore variabilità dei risultati sperimentali apre, a sua volta, alla possibilità di ridurre il numero degli animali utilizzati

per quel particolare protocollo sperimentale (*Reduction*), conservando comunque la necessità di applicare test statistici adeguati.

Vi sono però anche casi nei quali due “Rs” sono in contrasto tra di loro. Per esempio, nel caso dello studio della malattia di Parkinson utilizzando le scimmie marmoset (*Callithrix jacchus*), a un certo punto si è arrivati, grazie a un progresso della metodologia, alla possibilità di usarne un numero minore, ma essere più sicuri che tutti quegli individui avrebbero sviluppato una grave forma di parkinsonismo. Qui vediamo un contrasto tra *Refinement* e *Reduction*: un numero minore di soggetti sperimentali, ma con un grado di invasività maggiore che non in precedenza quando se ne usavano di più. Quale “R” scegliere? Come ci si deve comportare in questi casi? La legislazione corrente non indica una regola precisa da seguire, che aiuti a dare maggiore peso ad una “R” invece che un’altra. Un’indicazione in tale senso però ci è offerta dalla normativa nazionale britannica, dove viene data maggiore importanza al miglioramento delle procedure sperimentali, che non alla riduzione del numero di individui utilizzati in un certo protocollo. Ciò vuol dire che la sofferenza provata dal singolo individuo è il valore più importante del quale tenere conto: provocare maggior sofferenza ad un numero relativamente minore di individui non è accettabile. Se si trattasse di un lieve aumento della sofferenza, utilizzando un numero significativamente minore di individui, allora la riduzione potrebbe essere accettata. Bisogna attuare un’analisi costo/beneficio e, in generale e banalmente, adottare decisioni di buon senso riguardo a quel particolare protocollo sperimentale.

Il Principio delle “3Rs” riguarda le alternative alla sperimentazione animale e le alternative nella sperimentazione animale, dove si possono cambiare alcune procedure, pur continuando a usare gli animali. Trovo molto sbagliata, e pericolosa, la tendenza a ridurre il Principio delle 3Rs solo come *Replacement*: *Replacement* è la “R” più difficile da applicare però diventare facilmente uno sterile campo di battaglia tra le solite fazioni “pro” e “contro” la sperimentazione animale. Chi è pro si intestardisce sul fatto che gli animali devono essere sostituiti, chi è a favore continua a fare ricerca come sempre è stato fatto, perché non si può fare il *Replacement*. Invece, io credo che il processo di applicazione del Principio, là dove sia possibile deve considerare tutte e tre le possibilità. Il Principio delle “3Rs” deve essere considerato non solo come un artificio metodologico, ma come un modo di pensare diversamente la ricerca con gli animali: quindi il Principio delle “3Rs” come *forma mentis*.