

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO DI
INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

LA REGOLA DELLE 3R: SIGNIFICATO ED IMPLICAZIONI

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureanda: Sara Collodel

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea 20 settembre 2022

Indice

Abstract	1
Capitolo 1. Sperimentazione animale ed introduzione alla regola delle 3R	3
1.1 Sperimentazione animale	3
1.1.1 Ruolo dei modelli animali nella ricerca biomedica	5
1.2 Considerazioni etiche	7
1.3 La regola delle 3R	8
1.3.1 Disumanità: significato e sua rimozione come scopo della regola delle 3R	9
Capitolo 2. Replacement	11
2.1 Definizione	11
2.2 Colture cellulari	11
2.2.1 Organ-on-a-chip	14
2.3 Modelli in silico	15
2.3.1 CADD	16
2.3.2 QSARs	17
2.4 Organismi alternativi	18
2.4.1 Esempio di microorganismo: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2.4.2 Esempio di invertebrato: <i>Drosophila melanogaster</i>	19
2.4.3 Esempio di vertebrato inferiore: <i>Danio rerio</i>	20
Capitolo 3. Reduction	21
3.1 Definizione	21
3.2 Progettazione degli esperimenti ed analisi statistiche	21
3.2.1 Dimensioni, analisi di potenza e risultati statisticamente significativi	23
3.2.2 Analisi statistiche	24
3.2.3 Variabilità	25
3.3 Riproducibilità	26
3.3.1 The ARRIVE guidelines	27
Capitolo 4. Refinement	31
4.1 Definizione	31
4.2 Riconoscimento del dolore	31
4.2.1 La scala Grimace	33
4.3 Anestetici ed analgesici	35
4.3.1 Anestetici	35

4.3.2 Analgesici	36
4.4 Arricchimento dell'ambiente	37
4.5 Applicazione delle procedure di Refinement al caso del topo	38
4.5.1 Alloggi e trattamento	38
4.5.2 Dolore e scala della smorfia	38
4.5.3 Anestetici ed analgesici	39
4.5.4 Arricchimento dell'ambiente	40
Capitolo 5. Implicazioni della regola delle 3R	41
5.1 HBA e le 3V	42
5.1.1 Valutazione del danno	43
5.1.2 Valutazione dei benefici	44
5.2 Una gerarchia capovolta	44
5.3 Sviluppi futuri	46
Capitolo 6. Applicazione della regola delle 3R in Italia	47
6.1 Regole per l'impiego di animali a fini scientifici	47
6.2 Organismo Preposto al Benessere degli animali	48
6.2.1 Progetti di ricerca: requisiti ed iter autorizzativo	49
6.3 Dati sulla sperimentazione animale in Italia	51
6.4 Metodi alternativi alla sperimentazione animale	52
Conclusioni	53
Bibliografia	55

Abstract

Nel 1959, con la pubblicazione del trattato “The Principles of Humane Experimental Technique”, Russell e Burch proposero Replacement, Reduction e Refinement (3R) come mezzi tramite cui condurre una più umana sperimentazione sugli animali utilizzati nella ricerca (in termini di riduzione o eliminazione degli stati di angoscia e stress a cui essi sono sottoposti) e, conseguentemente, migliorare la qualità della ricerca scientifica e medica. Lo scopo della tesi è descrivere i significati di Replacement, Reduction e Refinement, rivolgendo particolare attenzione alle possibili alternative alla sperimentazione su animali vertebrati superiori sinora presentate, quali ad esempio modelli in silico, colture cellulari ed organismi alternativi. Si intende inoltre illustrare l'importanza e le implicazioni dell'utilizzo della regola delle 3R come requisito per realizzare esperimenti efficaci e riproducibili, che portino a risultati accettabili e concretamente utilizzabili. Infine, si analizza l'applicazione della regola delle 3R in Italia (con riferimento particolare all'istituzione dell'OPBA, Organismo Preposto al Benessere degli Animali).

Capitolo 1. Sperimentazione animale ed introduzione alla regola delle 3R

Nel corso dell'evoluzione, l'essere umano ha progressivamente imparato a servirsi degli animali e ad utilizzarli come fonte di cibo, mezzi di trasporto, animali da compagnia e strumenti di intrattenimento, nonché nell'ambito della ricerca scientifica. In particolare, in questo senso, essi vengono impiegati in medicina, farmacologia, biologia, fisiologia e psicologia cognitiva. [1,2]

1.1 Sperimentazione animale

Gli animali vengono largamente impiegati da lungo tempo nella ricerca; le radici di quest'ultima e l'osservazione delle similitudini esistenti tra la fisiologia umana e quella degli esseri non umani risalgono ai tempi dell'antico Egitto e dell'antica Grecia. Nel diciassettesimo secolo, la scienza moderna, ancora ai suoi albori, è stata influenzata dagli ideali di René Decartes, il quale riteneva che gli animali assomigliassero a macchine materiali e che fossero caratterizzati da mancanza di intelletto e di elementi spirituali, peculiarità degli esseri umani. Come conseguenza, a partire da questo secolo, il numero di animali usati nella scienza è bruscamente aumentato (Figura 1.1). Nel diciannovesimo secolo, anche Charles Darwin ha evidenziato profonde analogie tra animali umani e non umani [2].

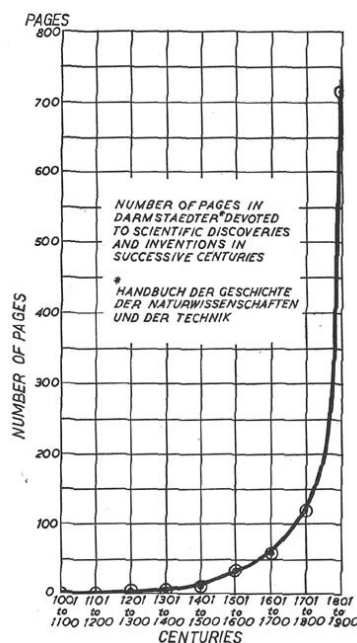


Figura 1.1: espansione della scienza e della sperimentazione animale basata sul numero di pagine dedicate a scoperte ed invenzioni scientifiche nel corso dei secoli, fino al 1900 [3].

Nel corso del ventesimo secolo, gli sviluppi in ambito medico, veterinario e nell'industria farmaceutica (in generale, delle scienze biomediche [2]) hanno portato ad un incremento degli animali non umani che fungono da soggetti degli esperimenti [3]: ogni anno nel mondo ne vengono utilizzati milioni (nel 2020, solo in Gran Bretagna, sono state condotte 2.88 milioni di procedure su animali viventi, dove per “procedure” si intendono studi scientifici, come esperimenti volti ad aumentare la conoscenza scientifica e ricerca medica, e allevamento di animali i cui geni siano stati mutati [4]). Gli animali più comunemente impiegati in questo contesto sono topi, ratti, criceti, conigli, pesci, volatili (prevalentemente galline), porcellini d'india, anfibi (tra questi, di particolare interesse è la rana xenopo), primati, cani, gatti. Essi provengono usualmente da centri di allevamento nazionali o situati all'interno delle università, e vengono poi isolati ed usati indipendentemente dai loro istinti naturali. Un animale può essere impiegato nella sua interezza o ci si può servire soltanto di determinati organi o tessuti, che tipicamente vengono prelevati dopo aver soppresso l'animale in questione secondo metodi prestabiliti. Spesso gli animali vengono soppressi al termine della procedura per evitare condizioni di stress e dolore postume o muoiono nel corso dell'esperimento [1].

Ad oggi, gli esperimenti sugli animali da laboratorio sono condotti a livello globale per perseguire diversi scopi e in differenti campi di studio. Ad esempio, servono a modellare patologie che affliggono umani od altri animali, sviluppare nuovi farmaci, produrre vaccini ed antibiotici, condurre test farmacologici e monitoraggi tossicologici (anche al fine di sviluppare nuovi metodi per trattare malattie infettive e non), valutare gli effetti di procedure mediche o chirurgiche [1,2] (Figura 1.2).

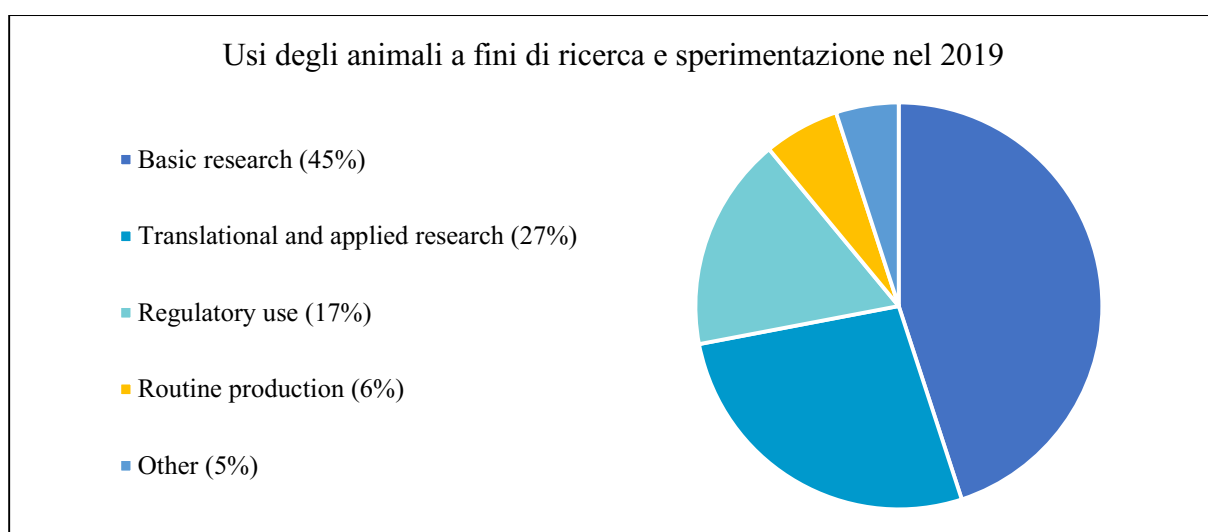


Figura 1.2: nel 2019, in Europa, sono stati registrati 10.61 milioni di usi degli animali nella ricerca e nella sperimentazione; il grafico mostra come questi possono essere suddivisi nei vari ambiti [5].

1.1.1 Ruolo dei modelli animali nella ricerca biomedica

L'applicazione scientifica dei modelli animali nella ricerca biomedica è da lungo tempo consolidata a causa delle somiglianze fisiologiche ed anatomiche in umani e animali, specialmente mammiferi.

I modelli animali sono in grado di mostrare il progresso di una malattia e di mimare le condizioni che questa comporta negli esseri umani, come ad esempio malattie sistemiche autoimmuni, artrite reumatoide, epilessia, Alzheimer, malattie cardiovascolari, diabete, aterosclerosi. Inoltre, rivestono una grande importanza nello sviluppo di farmaci e dispositivi, nell'ingegneria tissutale oppure ancora negli studi sulla rigenerazione di ossa e cartilagine; sono impiegati per lo screening preclinico dei farmaci, per valutare ad esempio la loro tossicità (Tabella 1.1).

In generale, essi hanno dato la possibilità di condurre delle ricerche che, per ragioni etiche, non si sarebbero potute effettuare sugli esseri umani.

Vi è sempre stato un dibattito tra i ricercatori circa l'importanza da attribuire ai modelli animali, dal momento che essi presentano alcune limitazioni [6], e per questo motivo diversi studi possono portare a risultati negativi o non significativi. Un esempio in questo senso è la ricerca condotta al fine di descrivere gli aspetti comportamentali: mentre alcuni studi producono risultati che potrebbero essere applicati anche all'essere umano, altri mostrano che non vi è alcuna similarità tra il modello animale e l'uomo. Il motivo di questa divergenza potrebbe essere il fatto che il modello animale (tipicamente costituito da primati non umani) non è in grado di descrivere la complessità dei disturbi comportamentali che si verificano negli esseri umani [7]. Recentemente, all'interno della comunità scientifica, sono emerse crescenti preoccupazioni riguardanti l'affidabilità degli animali (specialmente dei roditori) come modelli per biologia e patologie umane. Alcune evidenze indicano che almeno l'80% degli studi condotti sugli animali e che si sono rivelati fruttuosi non ha portato ad applicazioni cliniche di successo; si sono riscontrate delle difficoltà anche nel trasporre i risultati dal modello animale all'essere umano in alcune aree della ricerca farmacologica [8].

Il processo di selezione di un modello animale da utilizzare nel corso di un particolare studio è un aspetto delicato e complesso, in quanto non tutti i modelli sono egualmente adeguati ad un determinato scopo. In particolare, la scelta più appropriata è legata alla natura del farmaco o del dispositivo medico che si intende valutare. Occorre dunque considerare tutta una serie di criteri. Il più importante tra questi è la somiglianza fisiologica e/o patofisiologica tra la specie animale selezionata e l'essere umano; vanno poi valutate la disponibilità, la taglia e la durata di vita della specie in esame [9].

Modelli animali	Esempi di ambiti di utilizzo	Importanza e limitazioni
Ratto	Malattie umane, screening preclinico dei farmaci, difetti ossei di dimensioni critiche, osteomielite, osteoporosi, diabete, ferite da ustione.	Facile da allevare, maneggiare. Non è adatto allo studio dell'inflammatione. Ha proprietà biologiche simili agli umani. Le ossa si adattano a vari tipi di fratture ed impianti intramidollari.
Topo	Malattie umane, screening preclinico dei farmaci, osteosarcoma; modello per arteria carotidea.	Facile da allevare, maneggiare. Non è adatto allo studio dell'inflammatione. Ha proprietà biologiche e genetiche simili agli umani. È importante per la ricerca oncologica.
Coniglio	Osteoartrite, guarigione di ferite, studio di farmaci, asma, colesterolo, malattie cardiovascolari, Alzheimer, screening preclinico dei farmaci, difetti ossei di dimensioni critiche, osteomielite, ferite da ustione, riparazione della cartilagine; modello per aorta infrarenale.	Ha proprietà biologiche simili agli umani. Raggiunge velocemente la maturità scheletrica. Le ossa hanno una densità simile, ma dimensioni, forma e microstruttura differiscono. A causa del diverso pattern di camminata, non rappresenta correttamente gli aspetti biomeccanici.
Pecora	Guarigione di ossa e ferite, modello di asma e patologie cardiache, sviluppo di vaccini, difetto osseo segmentale, osteoporosi, riparazione della cartilagine; modello per arteria carotidea.	Natura fisiologica e anatomica simile all'essere umano. Peso corporeo e dimensioni delle ossa simili agli umani.
Capra	Studi ortopedici, dispositivi di supporto meccanici per la circolazione, modelli per la conversione del sesso, difetto osseo segmentale, osteomielite, riparazione della cartilagine; modello per arteria carotidea.	Peso corporeo e dimensioni delle ossa simili agli umani. È possibile usare protesi ed impianti destinati agli umani. Costoso.
Cane	Malattie ereditarie, riparazione della cartilagine; modello per arteria femorale.	Può essere addestrato per svolgere diverse azioni, come ad esempio nuotare. Non utilizzato troppo di frequente per questioni etiche.

Tabella 1.1: modelli animali ed ambiti di utilizzo, con loro importanza e relative limitazioni [6].

Il Talidomide è un significativo esempio che mostra come la scelta di un modello incompleto per la valutazione preclinica di un farmaco porti a conseguenze drammatiche. Nel 1957, questo farmaco è stato commercializzato per curare insonnia, mal di testa e nausea dopo essere stato studiato nei roditori, ma mai durante una gravidanza. Nonostante questo, è stato fatto assumere a numerose donne gravide per alleviare la nausea: durante quel periodo, si è registrato un numero senza precedenti di casi di focomelia e altri difetti alla nascita in ciascuno dei 46 paesi

in cui il Talidomide è stato messo in commercio. Il farmaco è stato poi riconosciuto come la causa di questo disastro ed è stato rimosso dal mercato [2].

La scelta irrazionale di un modello inappropriato porta a risultati scorretti, nonché a sprecare vite e risorse [9]. Ogni ricercatore deve comprendere a fondo il modello animale sotto esame, rivolgendo particolare attenzione alla biologia ed al comportamento della data specie; inoltre, deve essere consapevole dell'importanza del proprio studio, e considerare tutte le premesse che giustificano ogni singolo progetto, basate su di un solido background scientifico [7].

Un altro importante aspetto di cui tenere conto è l'ambiente in cui gli animali utilizzati nella ricerca vivono: provocare dolore non necessario e sottoporre gli animali a situazioni di eccessivo stress altera il loro comportamento e le loro condizioni fisiologiche. Questo a sua volta porta a conclusioni inaffidabili e a variazioni nei risultati scientifici, inficiando attendibilità e riproducibilità degli esperimenti [9].

1.2 Considerazioni etiche

L'uso degli animali nella ricerca biomedica è al centro di intensi dibattiti pubblici¹, basati su valutazioni legali, morali ed etiche [2]; in particolare, l'attenzione rivolta alle questioni etiche nasce da un sempre maggior interesse rispetto al benessere degli animali utilizzati e da una crescente consapevolezza riguardo ai diritti degli animali [7].

Grazie ad alcuni studi scientifici è stato possibile rintracciare fenomeni mentali superiori come emozioni, memoria episodica, autoconsapevolezza sociale, riconoscimento di sé e complesse abilità comunicative in membri di varie specie non umane. Una miglior comprensione di questi aspetti ha portato ad una maggiore stima della complessità cognitiva, psicologica e comportamentale di molti animali, favorendo un crescente interesse per le questioni etiche e scientifiche riguardanti il loro corretto trattamento e la loro cura, anche nel campo della ricerca biomedica e comportamentale [8].

Nell'ambito del dibattito etico concernente i diritti degli animali non è facile trovare un punto di incontro tra le varie posizioni assunte [2], ma è anche vero che non è impossibile conciliare le opinioni di coloro che ritengono necessario l'uso degli animali nella ricerca biomedica e di coloro che si schierano a favore della protezione del benessere degli animali.

Un primo passo compiuto in questo senso è senza dubbio l'introduzione della regola delle 3R di Russell e Burch [8].

¹ Le più recenti ricerche statistiche suggeriscono che la popolazione occidentale si suddivide circa equamente tra coloro che si dichiarano a favore della sperimentazione animale e tra coloro che al contrario si oppongono a quest'ultima.

1.3 La regola delle 3R

Al tempo di Aristotele, Ippocrate e Galeno, ed in generale fino al diciottesimo secolo, gli animali venivano utilizzati come soggetti di esperimenti senza alcuna restrizione morale o legale, in quanto era considerato l'unico modo possibile e legittimo per evitare di impiegare l'essere umano. A partire da questo periodo, un progressivo aumento della consapevolezza della necessità di controllare l'uso degli animali negli esperimenti, ha dato vita a dibattiti morali ed alla promozione di una legislazione specifica; ha posto poi le basi per un nuovo ambito di ricerca, detto "scienza degli animali da laboratorio". Si tratta di una branca della scienza che si propone di perfezionare la qualità degli esperimenti che prevedono l'utilizzo di animali, aumentando il loro benessere. Essa studia la biologia, i requisiti ambientali, la standardizzazione genetica e microbiologica, la prevenzione, il trattamento delle malattie, le tecniche sperimentali, l'anestesia, l'eutanasia e le relative questioni etiche [2].

Nel 1959, tramite la pubblicazione de "The Principles of Humane Experimental Technique", lo zoologo William Moy Stratton Russell e il microbiologo Rex Leonard Burch hanno posto le basi per una nuova scienza, con lo scopo di migliorare il trattamento degli animali da laboratorio e, conseguentemente, la qualità degli studi su di essi condotti [10]. Questi obiettivi possono essere perseguiti osservando la regola delle 3R; ciascuna R rappresenta un requisito per un uso etico degli animali negli esperimenti: Replacement, Reduction, Refinement (Figura 1.3).

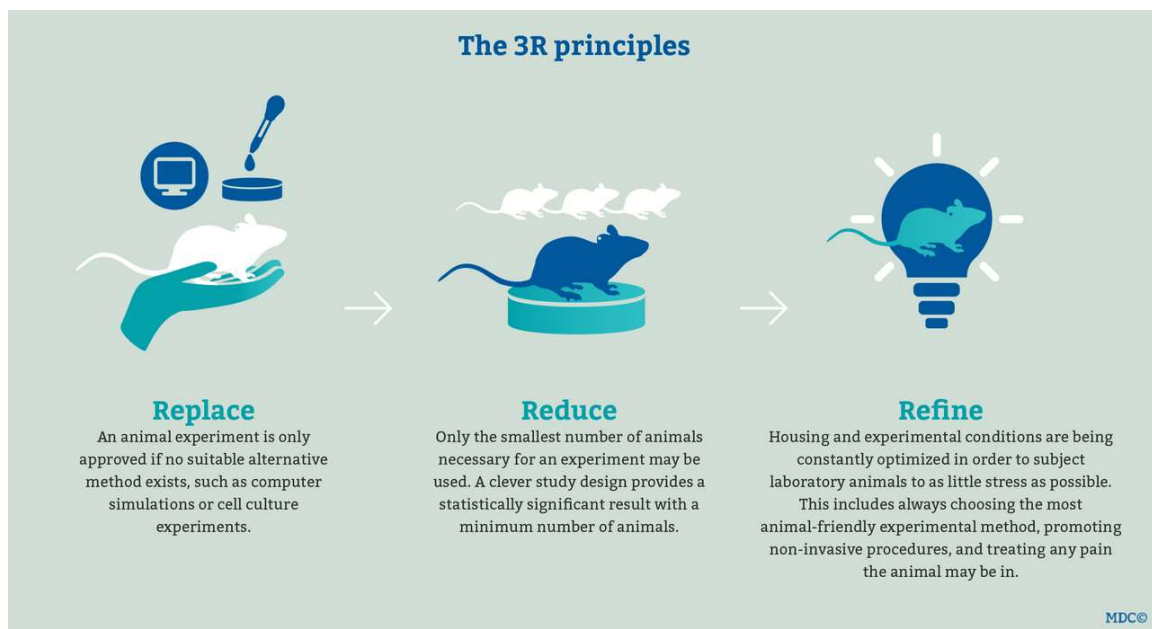


Figura 1.3: la regola delle 3R.

Replacement è la sostituzione degli animali con modelli alternativi, quali modelli in silico, colture cellulari o microorganismi. Reduction riguarda l'applicazione di metodi che consentano di ridurre il numero degli animali usati per condurre un determinato studio; a tal fine, è necessario programmare dettagliatamente gli esperimenti, garantendo risultati statisticamente accettabili. Refinement consiste nell'applicare metodi che riducano la sofferenza provata dagli animali [7]. Lo studio condotto da Russell e Burch, che ha poi portato alla stesura di "The Principles of Humane Experimental Technique", si basa sull'osservazione del fatto che destinare il trattamento più umano possibile agli animali usati negli esperimenti, è un prerequisito fondamentale affinché questi abbiano successo: è presente un'intima relazione tra umanità ed efficacia della sperimentazione [3]. Per efficacia, si intende anche generare i massimi risultati scientifici e medici, ottimizzando le spese legate a risorse monetarie e animali, nonché strutture e personale. Gli autori sostengono che tali risorse sono spesso sprecate e non consentono di ottenere i migliori risultati possibili, se gli animali destinati allo scopo soffrono inutilmente [9].

1.3.1 Disumanità: significato e sua rimozione come scopo della regola delle 3R

Russell e Burch ritengono che l'"umanità", opposta alla "disumanità", sia il fine ultimo della regola delle 3R. La disumanità può essere caratterizzata attraverso una serie di stati mentali spiacevoli sperimentati dagli animali usati nella ricerca, ed in generale riassunta dal termine "angoscia" [10]. Russell e Burch ritenevano di poter determinare la presenza di "angoscia" negli animali, e di poterla quantitativamente misurare grazie ad una scala appropriata [3]. Questa è compresa tra due stati limite: da un lato si ritrova una condizione di "estrema angoscia", al capo opposto una caratterizzata dalla sua assenza. Lo scopo della scienza basata su di una tecnica di sperimentazione umana è abbassare progressivamente il livello di angoscia, raggiungendo livelli sempre più vicini a quest'ultimo. Ridurre l'angoscia equivale a condurre esperimenti e procedure di ricerca sugli animali via via più umani.

Al centro del concetto di disumanità, e della stessa regola delle 3R, vi è la distinzione tra disumanità diretta e contingente [10]. La prima è definibile come l'inflizione di uno stato di angoscia come conseguenza inevitabile delle procedure impiegate, anche se queste vengono condotte in maniera perfettamente efficiente ed eliminando qualsiasi operazione irrilevante per lo studio. La disumanità contingente si ha quando l'angoscia è inflitta accidentalmente ed inavvertitamente nel corso della procedura, e non è necessaria per il successo di quest'ultima; al contrario, spesso essa è dannosa per la riuscita dell'esperimento, in quanto introduce un disturbo psicosomatico che rischia di confondere quasi tutte le indagini biologiche [3].

Capitolo 2. Replacement

2.1 Definizione

Si definisce Replacement la sostituzione di animali viventi e coscienti con materiali che, all'opposto, non lo sono. Più nello specifico, per tecnica di Replacement si intende un qualsiasi metodo scientifico che utilizza materiali non senzienti in grado di sostituire animali vertebrati viventi altrimenti richiesti nella sperimentazione.

Russell e Burch propongono una distinzione tra Replacement assoluto e relativo. Nel primo caso gli animali non sono impiegati in alcuna fase della ricerca. Nel Replacement relativo, invece, gli animali sono ancora necessari ma, nel corso dell'esperimento, non sono soggetti ad alcuna forma di angoscia [3].

Una più recente classificazione divide il Replacement totale da quello parziale. Mentre il primo è assimilabile al Replacement assoluto, il secondo si riferisce all'utilizzo di alcuni animali che, sulla base del pensiero corrente, non sono considerati capaci di provare sofferenza.

Per molti anni gli animali sono stati usati nella ricerca per rispondere ad importanti questioni scientifiche, incluse quelle correlate alla salute dell'essere umano. I modelli animali sono spesso costosi, richiedono tempo e, a seconda degli obiettivi di uno studio, presentano delle limitazioni [4]. Questi sono solo alcuni dei motivi per cui la ricerca di un'adeguata alternativa all'uso degli animali è diventata una delle più stimolanti sfide del nostro tempo, non solo dal punto di vista etico, ma anche scientifico, economico e legale [11].

Tra le alternative suggerite figurano le colture cellulari, i modelli in silico, l'uso di organismi alternativi e di nuove tecniche di imaging [1].

2.2 Colture cellulari

L'uso di colture cellulari in vitro si basa sulla crescita cellulare al di fuori del corpo all'interno dell'ambiente di laboratorio e può rappresentare un'importante alternativa alla sperimentazione animale. Le cellule animali o umane, prelevate ad esempio da fegato, reni, cervello o pelle, vengono mantenute su di un opportuno mezzo di crescita, per periodi di tempo anche molto lunghi [1]. Le colture cellulari sono usate frequentemente per comprendere i processi di differenziazione, migrazione, crescita che avvengono in vivo; rappresentano dunque uno strumento indispensabile per decifrare i meccanismi biofisici e biomolecolari attraverso i quali le cellule si assemblano a formare tessuti e organi, quali funzioni sono associate ad un particolare tessuto e come queste sono compromesse a causa della presenza di una malattia

[12]. Inoltre, oltre a trovare largo impiego nella ricerca biomedica, nell'ingegneria tissutale e nella medicina rigenerativa, vengono usate per lo screening preliminare di potenziali farmaci, per la valutazione della loro tossicità ed efficacia [1,12].

Il più importante aspetto di cui tenere conto nella progettazione di modelli in vitro è la scelta dei materiali per la produzione dello scaffold, classificabili in termini di processabilità, adattabilità, biocompatibilità e stabilità/degradabilità. I materiali più comunemente utilizzati in questo contesto sono gli idrogel, ovvero polimeri fisicamente o chimicamente reticolati a formare una struttura tridimensionale in grado di assorbire o ritenere solventi.

I polimeri utilizzati possono essere di origine naturale o sintetica. I materiali naturali più rappresentativi si basano su proteine e polisaccaridi provenienti da animali, piante e batteri, polimeri naturalmente presenti nella matrice extracellulare. Tra questi, i più rilevanti sono il collagene di tipo I, l'acido ialuronico, la fibronectina, l'alginato, la cellulosa e l'agarosio.

Nonostante le proprietà di adesione cellulare e biodegradabilità, i materiali di origine animale hanno spesso proprietà meccaniche scarse e variabili. Questo è il principale motivo per cui la ricerca è indirizzata verso lo sviluppo di materiali sintetici in grado di coprire l'intero spettro delle proprietà chimiche, fisiche, meccaniche e biologiche desiderate. Gli esempi più significativi sono il glicole polietilenico, la poli(N-isopropilacrilammide) e i poliuretani [11].

Le colture cellulari bidimensionali sono realizzate su superfici piate (tipicamente rappresentate da piastre di Petri in vetro o polistirene) per dare supporto meccanico alle cellule. Esse crescono in forma di singoli strati bidimensionali; poiché ciascuna di esse ha accesso ad un simile quantitativo di nutrienti e fattori di crescita, la crescita e la proliferazione risultano omogenee. Nonostante queste caratteristiche siano altamente desiderabili, in alcune delle tecniche usate per realizzare colture 2D viene a mancare il controllo sulla forma delle cellule, ed è stato dimostrato che anche questo fattore influenza l'attività cellulare in vivo.

Se pur le colture cellulari bidimensionali siano state a lungo impiegate come modelli in vitro per studiare le risposte cellulari a stimolazioni biofisiche e biochimiche e abbiano contribuito significativamente all'attuale conoscenza del comportamento delle cellule in vivo, esse possono talvolta mostrare un'attività che si differenzia da quella reale. Per far fronte a queste limitazioni, sono state introdotte le colture tridimensionali. È stato dimostrato che portare la matrice di supporto da una struttura 2D ad una 3D, può influenzare in maniera significativa la proliferazione, la differenziazione e la sopravvivenza delle cellule; inoltre, le colture tridimensionali forniscono microambienti biochimici e biomeccanici più realistici.

Rimangono tuttavia numerosi aspetti da perfezionare, come l'interfaccia tessuto-tessuto, il controllo della distribuzione spazio-temporale di ossigeno, anidride carbonica, nutrienti e prodotti di scarto, e i fattori microambientali che regolano le attività cellulari in vivo.

Nonostante gli evidenti vantaggi legati all'uso delle colture tridimensionali, le colture bidimensionali rappresentano con adeguata accuratezza le condizioni che si presentano in vivo in determinati sistemi, quali ad esempio quelli epiteliali, e pertanto si può affermare che la scelta dell'uno o dell'altro modello dipende dallo specifico processo che si intende osservare [12].

Le colture cellulari tridimensionali possono essere realizzate con una varietà di tecniche differenti; tra queste figurano i modelli in vitro derivati da microtessuti, definiti come modelli di tessuti umani realizzati su scala microscopica [11,12]. Essi sono candidati particolarmente promettenti per sostituire i test condotti sugli animali, in quanto tramite l'uso di opportuni modelli ingegnerizzati si propongono di replicare solo specifici compartimenti e funzioni dell'organismo umano, consentendo lo sviluppo di nuovi test preclinici applicabili a specifiche condizioni umane e di metodi di monitoraggio precisi. Inoltre, possono essere usati per modellare gli organi e le malattie che li affliggono, nell'ingegneria tissutale e negli studi di distribuzione dei farmaci, in quanto sono in grado di mimare l'anatomia tridimensionale, la funzionalità e la fisiologia dei tessuti.

Per realizzare artificialmente i microtessuti, si può ricorrere al bioprinting o alla microfluidica. La prima tecnica si serve di bioinchiostri, ovvero idrogel con rapidi tempi di gelificazione in grado di trattenere le cellule, e di strumenti opportunamente progettati al fine di non danneggiare le cellule durante il processo di stampa. Nonostante queste caratteristiche, sono richieste proprietà aggiuntive per rappresentare gli aspetti strutturali e biochimici degli ambienti nativi di sviluppo delle cellule, quali le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice [11].

La microfluidica è un metodo per controllare e manipolare con precisione fluidi su scala microscopica [13]. Il potere della progettazione di materiali basati sulla microfluidica risiede nella sua capacità di regolare le dimensioni del microtessuto prodotto, le cui proprietà fisico-chimiche e meccaniche possono essere approssimate a quelle della matrice extracellulare nativa. Tuttavia, simulare l'effetto della matrice extracellulare sulla differenziazione e sulla migrazione cellulare non è un compito semplice, in quanto le miscele di polisaccaridi e proteine, componenti fondamentali della ECM, possono esibire comportamenti fluidi complessi [11].

Attualmente la microfluidica è utilizzata in alcune applicazioni emergenti, e lo sviluppo dei cosiddetti "organs-on-chips" è certamente una di esse [13].

2.2.1 Organ-on-a-chip

Il termine “organ-on-a-chip” fa riferimento ad un dispositivo microfluidico contenente cellule umane in grado di imitare la struttura e la funzione di un organo o di più organi interconnessi [11,12]. Per produrre un tale dispositivo, occorre innanzitutto comprendere la struttura dell’organo e semplificarne le funzioni fisiologiche. In seguito, si considerano la selezione delle cellule e loro coltura, il controllo della perfusione dinamica, la progettazione della microstruttura degli organi artificiali ed il movimento meccanico degli organi biologici.

Il polmone è stato il primo organo ad essere stato riprodotto su di un chip (2010). Huh et al. si sono serviti di cellule epiteliali alveolari e cellule endoteliali di capillari polmonari; il modello presenta una struttura microfluidica multistrato, composta da strati di PDMS (polidimetilsilossano) separati da una membrana porosa flessibile, realizzata a partire da uno strato PDMS ricoperto con fibronectina o collagene. Le cellule vengono coltivate su entrambi i lati della membrana così composta. I movimenti specifici compiuti dall’organo sono stiramenti meccanici ciclici indotti dalla respirazione. Per simulare tale movimento, si pongono due camere, una per ciascun lato della membrana, che vengono riempite di aria e poi svuotate, secondo un processo ciclico (Figura 2.1) [13].

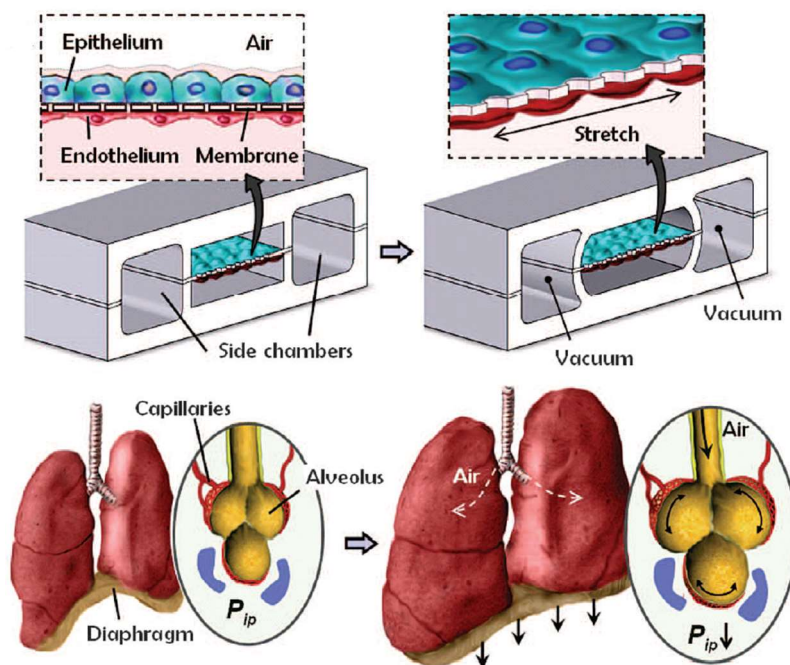


Figura 2.1: lung-on-a-chip, con particolare riferimento alla modalità di simulazione dei movimenti meccanici ciclici indotti dalla respirazione.

Il modello è stato testato valutando gli effetti tossici delle nanoparticelle di silice nei polmoni. I risultati sperimentali hanno evidenziato come l’organo così costruito sia in grado di mimare

in maniera più verosimile il movimento delle particelle all'interno del corpo, se confrontato con i sistemi tradizionali di coltura cellulare.

Nonostante il grande potenziale dimostrato dal lung-on-a-chip nel simulare la funzione dell'organo nativo, il modello presenta evidentemente delle limitazioni. Innanzitutto, il processo di produzione della membrana porosa è tecnicamente difficile; inoltre, il PDMS è in grado di assorbire piccole molecole, e questo fatto potrebbe diminuire la disponibilità dei farmaci durante i test volti alla valutazione dei loro effetti. Per questo motivo, sono state proposte nuove e più avanzate versioni del dispositivo.

In seguito, sono stati sviluppati modelli per fegato, intestino, vasi, barriera ematoencefalica, pelle, rene, midollo osseo, cuore, nonché per riprodurre contemporaneamente più di un organo. Questi dispositivi trovano applicazioni in vari ambiti, quali ad esempio le analisi farmacocinetiche e farmacodinamiche, la nanomedicina e la modellazione di malattie [13].

2.3 Modelli in silico

Storicamente, i modelli in silico sono stati largamente impiegati per prevedere la tossicità degli agenti chimici su diverse specie animali e non animali, quali pesci, invertebrati acquatici, alghe e api. Lo sviluppo di nuovi strumenti ha consentito di espandere il loro utilizzo anche ad altri ambiti [14]. In particolare, nell'industria farmaceutica, modelli in silico specializzati e programmi software forniscono un valido aiuto per progettare nel modo più efficiente possibile nuovi medicinali, mentre simulazioni generate al computer sono usate per prevedere i possibili effetti biologici e tossici di un agente inquinante o di un farmaco senza ricorrere alla dissezione animale [1,14]. Anche le industrie che si occupano della creazione di prodotti per la cura della persona, quelle agrochimiche e quelle alimentari si servono di numerosi strumenti in silico.

Per sviluppare prodotti sicuri per umani e animali occorre comprendere i potenziali effetti degli agenti chimici di cui si compongono: la capacità di un agente chimico di provocare un effetto è determinato dal suo profilo concentrazione-tempo in un sito di interesse e dalla sua tossicità. Tuttavia, non esistono agenti chimici per cui siano disponibili dati che comprendano informazioni riguardanti tutte le specie che potrebbero essere ad essi esposte ed i loro effetti, pertanto è essenziale disporre di metodi predittivi [14]. La ricerca di metodi alternativi ai test sugli animali ha coinvolto diversi ambiti di studio, tra cui tossicologia, chimica, modellazione molecolare e normativa. Tra le proposte individuate, i modelli in silico rivestono un ruolo importante [15].

La caratteristica principale dei modelli in silico è che le capacità predittive derivano interamente dalle strutture molecolari degli agenti chimici di interesse, in cui sono racchiuse informazioni

su proprietà intrinseche, potenziali interazioni ed effetti finali [14]. Essi si basano sulla conoscenza di un range di effetti negativi per la salute, noti a partire da dati sperimentali su agenti chimici ottenuti tramite protocolli di studio differenti. Inoltre, sono meno dispendiosi in termini di risorse rispetto ai test sperimentali in vivo. Non sono invasivi e non richiedono alcun uso di animali; pertanto, non devono rispondere a requisiti etici.

Nonostante le fiduciose aspettative riposte in queste metodologie in quanto possibili alternative ai test condotti sugli animali, occorre considerare i limiti derivanti dall'effetto della scarsa qualità dei dati disponibili sull'accuratezza dei modelli [15]. In particolare, i minimi livelli di validità, accuratezza, affidabilità e rilevanza richiesti, parametri che contribuiscono a definire la "qualità" dei dati, dipendono dallo specifico scopo per cui essi necessitano di essere usati [14].

Tra gli strumenti più comunemente utilizzati in questo contesto figurano i programmi software noti come CADD (Computer Aided Drug Design) e QSARs (Quantitative Structure-Activity Relationships) [1].

2.3.1 CADD

La progettazione di farmaci assistita da computer (CADD) è un software che viene utilizzato per predire il sito di legame tra le molecole che compongono un potenziale farmaco ed il corrispondente recettore. Inoltre, con l'aiuto di tali programmi è possibile progettare farmaci su misura per il sito di legame di interesse; in questo modo, i test sugli animali possono essere eventualmente eseguiti solo per confermare che il legame ligando-recettore avvenga come previsto: il numero totale di animali viene ridotto, consentendo di raggiungere uno degli obiettivi della regola delle 3R [1].

La progettazione di farmaci assistita da computer può rappresentare un utile strumento per la creazione di antibiotici; in questo particolare ambito, può avvenire seguendo due approcci differenti. La progettazione di farmaci basata sulla struttura (SBDD, Structure Based Drug Design) analizza le informazioni relative alla struttura tridimensionale delle macromolecole bersaglio, tipicamente proteine o molecole di RNA, ottenibile tramite la cristallografia a raggi X o la risonanza magnetica nucleare, e alle loro interazioni con i microorganismi ospiti: i farmaci antibiotici possono competere con questi ultimi al fine di impedire la realizzazione di tali interazioni, necessarie per la loro sopravvivenza. La progettazione di farmaci basata sul ligando (LBDD), invece, si concentra sulla relazione struttura-attività esistente tra le proprietà fisico-chimiche dei ligandi antibiotici e la loro attività.

I dati raccolti a seguito dell'applicazione di entrambi gli approcci proposti possono essere utilizzati per condurre delle simulazioni di dinamica molecolare, usate per studiare le interazioni bersaglio-ligando con un livello di dettaglio atomico. Comprendere il meccanismo atomico alla base della resistenza degli antibiotici aiuta a rivelare le limitazioni degli attuali antibiotici, consentendo di sviluppare nuovi e più efficaci farmaci o di ottimizzare quelli esistenti [16].

2.3.2 *QSARs*

I modelli di relazione quantitativa struttura-attività (QSARs) sono usati per dimostrare la relazione quantitativa esistente tra le proprietà di interesse di un agente chimico ed i parametri descrittivi derivanti dalla sua struttura chimica [14].

Tali informazioni possono essere sfruttate per modificare strutturalmente determinate molecole al fine di sviluppare una proprietà desiderata, consentendo di ottimizzare farmaci già esistenti, oppure per la creazione di nuovi farmaci [17].

I modelli sono stati applicati per predire la tossicità e la potenza di un farmaco, nonché le sue proprietà fisico-chimiche [14]. Sono impiegati anche nelle industrie chimiche, agrochimiche e cosmetiche; recentemente hanno trovato uso nell'ambito delle scienze dei materiali e dei nanomateriali, nella medicina rigenerativa e nell'assistenza sanitaria.

I QSARs si basano sulla premessa che composti strutturalmente simili esibiscono simili effetti biologici; pertanto, l'esistenza dei cosiddetti "activity cliffs"¹ limita notevolmente le loro capacità predittive [18]. Ciascun modello QSAR può essere sviluppato se si hanno a disposizione misure quantitative delle proprietà di ciascun agente chimico appartenente ad una classe di composti correlati, parametri descrittivi derivanti dalla conoscenza delle loro strutture chimiche (quali dimensioni, forma, idrofilicità, lipofilicità, capacità di attraversare membrane biologiche e loro recettori) e tecniche statistiche usate per dimostrare la correlazione esistente tra l'attività, intesa come tossicità od altre proprietà di interesse, e i parametri descrittivi.

I metodi statistici utilizzati sono molteplici, e tipicamente si ricorre alla regressione lineare semplice (in cui un unico parametro descrittivo è associato all'attività dell'agente chimico) o alla regressione lineare multipla (in presenza di più parametri descrittivi). Dopo aver determinato una relazione lineare tra la proprietà di interesse e i parametri descrittivi grazie al modello sviluppato, viene tipicamente calcolato il coefficiente di correlazione, poi usato come indice per valutare affidabilità ed utilità del modello stesso [14].

¹ Molecole che, pur presentando minimi cambiamenti a livello della loro struttura chimica, esibiscono notevoli differenze di comportamento [14].

Nonostante la maggior parte dei modelli si basi su relazioni lineari, non c'è ragione di assumere a priori che la relazione struttura-attività segua tale andamento. Per molti dei sistemi biologici, al contrario, ciò non si verifica, a causa dei complessi processi che si verificano in vivo [17].

I QSARs dovrebbero essere usati esclusivamente per i composti chimici che ricadono all'interno del dominio di applicabilità, ovvero l'insieme delle proprietà molecolari su cui ciascun modello è stato validato [14,18]. Le nuove molecole testate devono presentare caratteristiche strutturali affini a quelle delle molecole appartenenti al training set, altrimenti la previsione prodotta dal modello circa la loro possibile attività risulta inaffidabile o addirittura priva di significato [17].

2.4 Organismi alternativi

Al fine di sostituire gli animali vertebrati “superiori” tipicamente impiegati nella sperimentazione, è stato proposto l'uso di organismi alternativi, quali microorganismi, invertebrati e vertebrati inferiori (Tabella 2.1) [1].

Organismo alternativo	Modello
Escherichia coli (Procariote)	Modello per studi molecolari e genetici.
Bacillus subtilis (Procariote)	Modello per la differenziazione cellulare.
Dictyostelium discoideum (Protista)	Modello per studi molecolari e genetici.
Neurospora crassa (Fungo)	Modello per studi su genetica, ritmi circadiani e di regolazione del metabolismo.
Saccharomyces cerevisiae (Fungo)	Modello per studi su genetica, ritmi circadiani e di regolazione del metabolismo.
Schizosaccharomyces pombe (Fungo)	Modello per studi genetici e molecolari.
Amphimedon queenslandica (Invertebrato)	Modello per studi su evoluzione, biologia dello sviluppo e genomica comparata.
Aplysia (Invertebrato)	Modello usato in neurobiologia.
Caenorhabditis elegans (Invertebrato)	Modello per studi dello sviluppo genetico.
Drosophila melanogaster (Invertebrato)	Modello usato per la ricerca neurologica e genetica.
Danio rerio (Vertebrato inferiore)	Modello per studi molecolari e genetici.

Tabella 2.1: esempi di organismi alternativi usati per sostituire gli animali da laboratorio [1].

2.4.1 Esempio di microorganismo: Saccharomyces cerevisiae

Il Saccharomyces cerevisiae, anche noto come lievito di birra, è il più popolare ed importante organismo eucariote impiegato nella ricerca; grazie alle dimensioni microscopiche e alle semplici esigenze di crescita, questo fungo è un modello poco costoso e facile da mantenere in laboratorio [1,19]. I lieviti possono essere coltivati in colture solide o liquide, e isolati in colonie sviluppatesi a partire da una singola cellula. Ciascuna cellula si divide una volta ogni 90 minuti, pertanto si possono ottenere estese popolazioni di cellule in intervalli di tempo limitati [1].

Nel 1996, il genoma del *S. cerevisiae* è stato il primo genoma eucariote ad essere completamente sequenziato con successo, fornendo uno spettro di importanti informazioni circa vari aspetti dell'organizzazione e dell'evoluzione del genoma. Ciò che ha consentito in particolare di attribuire una sempre maggior importanza a questo lievito in quanto possibile organismo alternativo è la relativa facilità con cui i ricercatori possono mutare o manipolare l'espressione genica delle cellule, studiando i conseguenti effetti fenotipici [19].

Il *Saccharomyces cerevisiae* viene utilizzato anche per comprendere i meccanismi alla base della morte cellulare programmata e nella ricerca sul cancro; inoltre, consente di studiare lo sviluppo di malattie neurodegenerative quali l'Alzheimer, il Parkinson e la sindrome di Huntington [1].

2.4.2 Esempio di invertebrato: Drosophila melanogaster

Gli organismi invertebrati rappresentano una valida alternativa all'uso degli animali vertebrati in laboratorio. Tra i vantaggi legati al loro uso figurano un ciclo di vita breve, piccole dimensioni, una semplice anatomia e costi di mantenimento contenuti: in questo modo, in un singolo esperimento, è possibile studiare un cospicuo numero di esemplari. La presenza di un sistema di organi non sviluppato e l'assenza di un sistema immunitario adattativo costituiscono le principali limitazioni del modello.

Ad ogni modo, gli invertebrati sono stati sfruttati per studiare numerose malattie, come il Parkinson, la distrofia muscolare, il diabete, nonché disfunzioni endocrine, la guarigione delle ferite, la morte e l'invecchiamento cellulare; rivestono un ruolo importante anche nell'ambito dei test tossicologici.

La *Drosophila melanogaster*, anche nota come moscerino della frutta, è uno degli invertebrati più largamente studiati ed impiegati nella ricerca; infatti, richiede un basso costo di mantenimento rispetto ai mammiferi tradizionalmente usati nella sperimentazione e produce risultati utili molto rapidamente grazie al suo breve ciclo di vita. Quest'ultimo comprende quattro fasi (l'embrione, la larva, la pupa e la fase adulta), e ciascuna di esse ha i propri vantaggi, potendo essere sfruttata in ambiti diversi. Ad esempio, la fase embrionale consente di studiare lo sviluppo neuronale, mentre la larva è usata negli studi riguardanti i processi ed i comportamenti fisiologici ed evolutivi. Il moscerino adulto, invece, è un organismo sorprendentemente complesso: le funzioni di cuore, polmoni, intestino, reni e apparato riproduttivo sono simili a quelle degli equivalenti organi nei mammiferi, mentre l'estesa rete neurale è in grado di mediare numerosi comportamenti complessi.

Il genoma della drosophila è stato completamente sequenziato ed annotato, e comprende più di 14000 geni contenuti in quattro cromosomi; esso consente di studiare i meccanismi molecolari alla base di numerose malattie umane. Infatti, si pensa che circa il 75% dei geni coinvolti nelle malattie che affliggono gli umani trovi un omologo funzionale nel moscerino.

Grazie alle numerose similarità riscontrate, questo organismo invertebrato può costituire un valido modello per lo studio della genetica e delle malattie umane (prevalentemente quelle neurodegenerative) [1].

2.4.3 Esempio di vertebrato inferiore: Danio rerio

I vertebrati “inferiori” sono un’alternativa che desta particolare interesse a causa delle affinità genetiche con i mammiferi. Tra questi, il Danio rerio è uno degli esempi più significativi.

Il Danio rerio, anche noto come pesce zebra, è un pesce d’acqua dolce che raggiunge una lunghezza di circa 2-4 centimetri [1]. È utilizzato in biologia molecolare e dello sviluppo, in neurobiologia, negli studi genetici e sul cancro e nella scoperta di nuovi farmaci, per i bassi costi di mantenimento, i brevi tempi di gestazione, la trasparenza del corpo durante la fase embrionale dello sviluppo (che consente un diretto accesso visivo all’anatomia interna) e la capacità di manipolarne il genoma [1,20].

A partire dalla fase embrionale e di larva sino alla fase adulta, il pesce zebra può essere usato in una grande varietà di applicazioni, con particolare attenzione rivolta agli screening tossicologici di agenti chimici e possibili farmaci. Inoltre, è impiegato nella ricerca per il cancro, negli studi di malattie cardiache, difetti neurologici e disturbi comportamentali [1].

Capitolo 3. Reduction

3.1 Definizione

Per Reduction si intende la riduzione del numero di animali usati per ottenere informazioni in quantità opportuna e caratterizzate da sufficiente precisione [3]. Per la verità, Russell e Burch non definiscono come fine del principio di Reduction quello di minimizzare in assoluto il numero di animali usati nel corso di un dato esperimento; essi semmai intendono perseguire l'obiettivo di realizzare ricerche scientificamente efficaci. Ambire all'assoluta minimizzazione può avere conseguenze negative in quanto il numero di risultati ottenuti potrebbe non essere sufficiente affinché essi siano statisticamente accettabili; gli animali verrebbero così sottoposti inutilmente a condizioni di stress. Inoltre, in uno studio che richieda l'inflizione di dolore o angoscia, ridurre al minimo il numero di animali potrebbe non essere la più umana scelta possibile, poiché ciascun animale vedrebbe diminuire in misura maggiore il proprio benessere [10].

Per perseguire lo scopo della Reduction occorre realizzare esperimenti che siano stati accuratamente progettati ed analizzati, per assicurare risultati robusti e riproducibili. Inoltre, si possono usare metodi che consentano di massimizzare le informazioni ottenute a partire da un singolo animale, sempre nell'ottica di evitare di provocare ulteriore sofferenza a causa dell'uso ripetuto. Condividere i dati e le risorse tra organizzazioni e gruppi di ricerca potrebbe rivelarsi altrettanto utile [4].

Nel seguito del capitolo vengono approfonditi in particolare l'importanza di un'adeguata progettazione degli esperimenti e di un reporting trasparente delle ricerche biomediche.

3.2 Progettazione degli esperimenti ed analisi statistiche

Le analisi statistiche rivestono un ruolo chiave: oltre a contribuire in modo decisivo alla riduzione del numero di animali necessario, esse garantiscono la possibilità di controllare i fattori che causano variabilità negli esperimenti condotti [3].

Per poter ricorrere alle analisi statistiche, l'esperimento deve essere progettato in modo corretto; se così non fosse, sarebbe impossibile estrarre informazioni utili dai risultati dello studio in esame [21]. In generale, la progettazione dipende dagli obiettivi di quest'ultimo.

Gli esperimenti che richiedono l'utilizzo di animali da laboratorio, inoltre, devono essere eseguiti in maniera efficace, presentati in modo chiaro ed interpretati correttamente. Molti degli studi condotti in passato non si attengono a queste raccomandazioni, e talvolta le conclusioni

proposte non sono supportate dai dati ricavati. Si tratta di un approccio non etico ed il cui unico effetto è un inutile spreco di risorse scientifiche [22].

Un esperimento è una procedura volta a raccogliere in maniera sistematica i dati scientifici associati alla risposta ad un particolare intervento, per massimizzare la probabilità di rispondere correttamente ad una data domanda (esperimento confermativo) o per fornire materiale con lo scopo di formulare nuove ipotesi (esperimento esplorativo), specificando le variabili indipendenti ed il loro effetto sul risultato. Le variabili indipendenti costituiscono i fattori di interesse in un particolare studio: ogni variabile rappresenta un fattore manipolato dai ricercatori all'interno di un ambiente controllato al fine di valutare quali sono gli effetti delle sue variazioni sul risultato. I risultati di uno studio, invece, prendono il nome di variabili dipendenti [22,23].

Il passo successivo è rappresentato dalla selezione del modello animale. Questa viene effettuata sulla base della capacità di quest'ultimo di rispondere ad una specifica domanda [23]. I modelli non devono somigliare all'essere umano in ogni loro aspetto: la validità di un modello animale in quanto opportuno predittore della risposta umana dipende dalla specifica proprietà che si intende studiare [21,22]. Oltre a questo, occorre considerare che le caratteristiche degli animali usati, quali sesso, taglia, peso, potrebbero influenzare largamente la progettazione dell'esperimento, nonché i risultati ed i metodi con cui questi vengono analizzati [23].

Ogni esperimento coinvolge un certo numero di unità sperimentali [22]. Ciascuna di esse può essere definita come l'entità soggetta ad un intervento o ad un trattamento [23]. Tipicamente, l'unità sperimentale delle ricerche condotte sugli animali è il singolo animale; nella ricerca applicata ai neonati, se l'esemplare di femmina gravida e l'intera nidiata sono sottoposti ad un trattamento sperimentale, allora essi costituiscono l'unità sperimentale [24]. In talune circostanze quest'ultima può essere anche rappresentata da una sola parte dell'animale o dall'insieme degli animali confinati all'interno di una stessa gabbia.

L'assegnazione si riferisce alla distribuzione delle unità sperimentali all'interno dei diversi gruppi coinvolti nell'esperimento [23]. I trattamenti dovrebbero essere assegnati in modo da garantire che ciascuna unità sperimentale abbia una nota, spesso uguale, probabilità di ricevere un dato trattamento. Questo processo, noto come randomizzazione, è essenziale per limitare l'effetto delle fonti di variabilità [22]. Inoltre, per evitare di giungere a conclusioni ed interpretazioni deviate del trattamento, si può ricorrere al blinding. Si tratta di una strategia di ricerca che prevede di tenere all'oscuro dell'assegnazione dei trattamenti coloro che conducono gli esperimenti, valutano i risultati e raccolgono i dati; in questo modo, si limita la tendenza,

talvolta non intenzionale, di interpretare i dati ottenuti in modo da supportare le ipotesi su cui si riponevano maggiori speranze. Il blinding è essenziale per assicurare scoperte valide.

Ciascun esperimento, inoltre, dovrebbe includere almeno un gruppo di controllo. Esso può essere composto da animali che non abbiano ricevuto il trattamento o che siano stati sottoposti ad un trattamento placebo (generalmente più appropriato). Anche la scelta del gruppo di controllo dipende dal tipo di esperimento. Ad esempio, se lo scopo dell'esperimento è comparare i metodi di somministrazione di un farmaco, non è necessario prendere in considerazione un terzo gruppo composto da animali che non abbiano ricevuto alcun farmaco [23].

3.2.1 Dimensioni, analisi di potenza e risultati statisticamente significativi

La decisione sulle dimensioni di un esperimento è di importanza critica, a causa delle implicazioni etiche legate all'utilizzo degli animali nella ricerca. Un esperimento "troppo piccolo" potrebbe mancare di rilevare importanti effetti biologici, mentre uno "troppo grande" sprecherebbe vite animali [22].

La dimensione del campione, invece, si riferisce al numero di unità sperimentali per gruppo di animali, e viene comunemente determinata tramite un'analisi di potenza [23,24]. Essa si basa sulla relazione esistente tra i seguenti parametri: dimensione dell'effetto di interesse, deviazione standard delle variabili associate ad effetti quantitativamente misurabili, livello di significatività, potenza scelta, ipotesi alternative, dimensione del campione [22].

È innanzitutto opportuno definire il minimo effetto che l'esperimento dovrebbe essere in grado di rilevare; si definisce dimensione dell'effetto la minima differenza di rilevanza biologica tra due gruppi sotto studio. Esso non si basa su una conoscenza a priori della grandezza dell'effetto del trattamento, quanto piuttosto su una differenza che valga la pena di essere ulteriormente studiata. Un'attenta considerazione della dimensione dell'effetto fa sì che l'esperimento sia implementato al fine di determinare effetti che siano biologicamente e non solo statisticamente rilevanti. Dal punto di vista etico, è importante spiegare come la scelta della dimensione dell'effetto sia stata effettuata e perché questa sia di interesse clinico o biologico [23].

Deve poi essere specificata la deviazione standard tra unità sperimentali appropriata alla progettazione dell'esperimento [22]. Il livello di significatività è la possibilità di ottenere falsi positivi a causa di errori di tipo I (α), che si verificano quando l'ipotesi nulla¹ viene respinta anche se verificata. È tipicamente fissato al 5% [22,25].

¹ L'ipotesi nulla, denotata usualmente come H_0 , si riferisce al fatto che la risposta misurata non sia influenzata dal trattamento sperimentale testato. È l'ipotesi di nessun cambiamento e nessun effetto [23].

La potenza dell'esperimento si riferisce alla possibilità che esso sia in grado di rilevare la dimensione dell'effetto specificata, per il livello di significatività e la deviazione standard dati, e che possa essere considerato statisticamente significativo. La scelta del livello di potenza è arbitraria, e tipicamente varia tra l'80% ed il 95%; è talvolta necessario che esso raggiunga il 99%, quando ad esempio l'esperimento si propone di verificare l'efficacia di un vaccino [22]. Le ipotesi alternative, denotate con H_1 , fanno riferimento al fatto che la manipolazione delle variabili indipendenti di interesse ha effetto sulla risposta misurata [23].

La dimensione del campione è usualmente quanto si vuole determinare, pertanto i valori delle grandezze descritte in precedenza devono essere specificati [22].

Il valore p è la probabilità di ottenere casualmente i risultati di uno studio se l'ipotesi nulla è vera [25]. Se il valore p è minore di α , allora il risultato è detto statisticamente significativo e l'ipotesi nulla è effettivamente rigettata. Se il valore p è maggiore o uguale a α , all'opposto, non si può concludere la significatività statistica, e l'ipotesi nulla potrebbe essere vera [23,26]. Si definisce potenza la probabilità che un esperimento porti al rifiuto di un'ipotesi nulla falsa; in altri termini, è la probabilità di ottenere risultati statisticamente significativi quando l'effetto misurato è biologicamente rilevante. Minore è la potenza, minore è la probabilità che un effetto osservato che goda di significatività statistica rifletta una reale conseguenza del trattamento. Esperimenti sottodimensionati condotti in vivo sprecano tempo e risorse, provocano sofferenza ingiustificata agli animali e portano ad implicazioni biologiche sbagliate. Quando invece la dimensione del campione è troppo grande, un effetto privo di rilevanza biologica potrebbe essere statisticamente significativo. Affinché lo studio in esame porti a conclusioni scientificamente valide, la dimensione del campione deve essere scelta in modo che rilevanza biologica e significatività statistica siano l'una il complemento dell'altra [23].

3.2.2 Analisi statistiche

Nessun esperimento dovrebbe essere iniziato senza avere una chiara idea di come i suoi risultati verranno analizzati statisticamente. L'obiettivo delle analisi statistiche è ottenere risultati riassuntivi che possano essere compresi con chiarezza e che illustrino il range di incertezza nelle conclusioni; le analisi, inoltre, dovrebbero riflettere gli scopi dello studio [22,24]. In generale, si vogliono estrarre tutte le informazioni utili presenti nei dati raccolti, in modo che essi possano essere interpretati, sempre tenendo conto della variabilità biologica e degli errori di misura.

I test statistici possono essere di tipo parametrico e non parametrico. I dati raccolti possono essere analizzati con test parametrici (in generale più potenti e versatili) soltanto se soddisfano

una serie di assunzioni [22,23]. In particolare, le risposte osservate devono essere tra loro indipendenti, i residui² delle analisi normalmente distribuiti e la varianza delle risposte tra i gruppi sperimentali omogenea.

I test parametrici più comunemente utilizzati sono il t-test, l'analisi della varianza (ANOVA) e l'analisi della covarianza (ANCOVA) [23]. Si tratta di metodi statistici usati per valutare le ipotesi alla base di un esperimento dal confronto tra il valore medio dei dati raccolti nei vari gruppi sperimentali [27].

Alla seconda categoria di test statistici, invece, appartengono ad esempio il test di Wilcoxon, il test di Kruskal-Wallis, quello di Friedman e di Mann-Whitney [22].

3.2.3 Variabilità

Gli animali cambiano e mostrano numerose differenze pur appartenendo ad una stessa specie, e questo è un aspetto a cui occorre attribuire rilevante importanza quando si vogliano implementare le tecniche di Reduction e programmare esperimenti efficaci [3,21].

Sono presenti tre diverse fonti di variabilità negli esperimenti che utilizzano animali viventi: la variabilità introdotta dallo sperimentatore, le variazioni innate presenti tra gli animali e quelle risultanti dalle interazioni tra l'animale e l'ambiente in cui esso vive.

La prima forma di variabilità indicata può essere provocata dalla gestione delle procedure che coinvolgono gli animali e dalla mancanza di precisione nell'acquisire le misurazioni; si tratta della causa predominante delle variazioni registrate nei risultati sperimentali. Le procedure sperimentali devono essere realizzate in modo uniforme e preciso e per quanto possibile standardizzato; la variabilità residua viene misurata in modo che la sua influenza possa essere considerata nelle analisi statistiche che seguono. Infine, gli animali vanno maneggiati con cura, al fine di minimizzare lo stress a cui essi sono sottoposti nel corso della procedura.

Nonostante la disponibilità di strumenti sofisticati, molte misurazioni possono risultare imprecise. Questo inficia la possibilità di determinare correttamente gli effetti di un trattamento [28]. È importante prestare attenzione al modo in cui i dati sono raccolti; persino le tempistiche delle misurazioni possono influenzare i risultati, in termini di momento della giornata in cui vengono acquisite, tempo trascorso a partire dall'inizio dell'esperimento e tempo richiesto per effettuare la misura [23,28].

La variabilità innata presente tra gli animali dipende dalla loro origine, dalle variazioni nelle routine di cura, dall'esposizione a diversi ambienti e dal loro stato di salute. Gli animali da

² Per residuo si intende la differenza tra il dato effettivamente osservato ed il suo valore predetto [23].

laboratorio provenienti da diversi fornitori hanno diversa costituzione genetica; inoltre, le diverse modalità di allevamento possono provocare una diversità fenotipica. Variazioni nelle pratiche di allevamento in laboratorio influenzano comportamento, aspetti biochimici e fisiologici degli animali. Essi, inoltre, sono sensibili all'ambiente in cui si trovano: persino cambiamenti minimi in quanto li circonda (ad esempio nella temperatura, nella composizione dell'aria, nell'umidità) possono avere effetti considerevoli sul loro comportamento e sulla loro fisiologia. Tali variazioni possono essere difficili da prevedere, ma la consapevolezza della loro presenza contribuisce ad aumentare la robustezza della progettazione degli esperimenti.

Lo stato di salute degli animali può essere compromesso da malattie cliniche e subcliniche. Mentre le patologie appartenenti alla prima categoria provocano effetti direttamente osservabili (garantendo l'esclusione dei soggetti malati dall'esperimento), la presenza di malattie subcliniche non può essere determinata grazie a segni clinici osservabili. La malattia spesso affligge determinati organi, deprimendo la loro funzione e alterando comportamento e fisiologia, in una modalità che dipende dal suo progresso. Essa influenza anche l'idoneità del modello animale scelto.

L'ultima forma di variabilità, ovvero quella indotta dalle interazioni tra l'animale e l'ambiente, è la più difficile da prevedere, ed è quella che in misura maggiore influenza il numero di animali richiesti per condurre un particolare studio. La variabilità dell'ambiente può sorgere quando si aumenta la complessità dello spazio vitale o quando gli animali sono alloggiati in gruppi, poiché questo può influenzare il conseguente sviluppo delle gerarchie sociali. Lo stress provato dagli animali in diverse posizioni della scala sociale che si viene a creare altera la loro biologia, in modi che difficilmente possono essere predetti.

Infine, occorre valutare come un animale interagisce con le procedure sperimentali a cui è sottoposto. Un esperimento può essere condotto in tempi diversi su animali diversi; il fatto che essi possano manifestare lo stress e l'angoscia provati agli altri componenti del gruppo (ad esempio tramite la trasmissione di ultrasuoni), fa sì che questi ultimi alterino il loro comportamento ed il loro status endocrinologico prima di essere sottoposti alla procedura.

Per tentare di gestire il problema della variabilità, occorre assicurare una formazione opportuna a coloro che si occupano di sottoporre gli animali alle varie procedure previste per un particolare studio; è importante anche far acclimatare gli animali al fine di ridurre i livelli di stress [28].

3.3 Riproducibilità

Ogni ricerca dovrebbe essere descritta in modo tale da poter essere ripetuta. Occorre dunque indicare i suoi obiettivi e/o le ipotesi di cui si vuole valutare la validità, la ragione per la scelta

del particolare modello animale, nonché la specie, il ceppo e l'origine dell'animale. Inoltre, vanno specificati i dettagli di ciascun esperimento riportato, includendo informazioni su come lo studio è stato progettato, sul numero di animali e sui metodi statistici usati per analizzare i risultati [22]. L'accuratezza con cui le ricerche condotte sugli animali sono descritte e la conseguente scarsa robustezza dei dati sono i fattori che maggiormente contribuiscono alla loro scarsa riproducibilità. Gli errori di replicazione possono essere anche dovuti ai fenomeni del "p-hacking" e dell'"HARKing". Il primo riguarda la pubblicazione selettiva dei risultati positivi o la manipolazione delle analisi statistiche; anche il secondo (Hypothesizing After the Results are Known) è una fonte di incertezza: anche se usualmente uno studio è pianificato sulla base di una o più ipotesi di lavoro, è comune che i suoi risultati non siano in grado né di confermare né di respingere queste ultime. Talvolta vi è pertanto la tendenza di cambiare l'ipotesi di lavoro in modo che i risultati ottenuti siano in qualche modo ad essa correlati [29].

L'irriproducibilità è una conseguenza inevitabile della mancanza di rigore in progettazione, esecuzione, analisi, interpretazione di uno studio: è stato stimato che gli studi condotti sugli animali non possono essere riprodotti tra il 51% e l'89% dei casi [30]: si può parlare di una vera e propria "crisi di replicazione". È stato infatti recentemente proposto un sondaggio che ha coinvolto 1500 ricercatori, ai quali è stato chiesto di esprimere la propria valutazione soggettiva circa la riproducibilità degli studi pubblicati. È stato evidenziato che più della metà dei partecipanti concorda sul fatto che tale crisi è significativamente presente.

Il termine "crisi di replicazione" è anche spesso associato all'accusa di un comportamento non etico di manipolazione dei dati e pura fabbricazione dei risultati [29]. La pubblicazione di ricerche metodologicamente approssimative, oltre a limitare il progresso scientifico e la fiducia del pubblico nella ricerca medica, ha effetti negativi anche sulla possibilità di trasporre sugli umani le scoperte precliniche ottenute sugli animali [30].

Si può dunque affermare che riportare in modo trasparente i metodi di ricerca e le scoperte scientifiche è una componente essenziale per la riproducibilità e l'applicabilità degli studi [31].

3.3.1 The ARRIVE guidelines

Al fine di fronteggiare il problema dell'irriproducibilità degli studi, nel 2010 sono state pubblicate per la prima volta le linee guida ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments), una lista di raccomandazioni da seguire per migliorare gli standard con cui stilare i resoconti delle ricerche condotte sugli animali. Questo consente di massimizzare la qualità e l'affidabilità delle ricerche pubblicate e di consentirne la valutazione e la riproduzione [30,32].

Nonostante il successo che la loro pubblicazione ha riscosso, l'adesione alle linee guida è stata incoerente, ed i miglioramenti previsti non sono stati raggiunti [31]. Questo ha reso necessaria una loro recente revisione (resa disponibile nel 2020), e lo sviluppo di una varietà di risorse per aiutare i ricercatori a metterle in pratica [32].

Secondo le rinnovate linee guida, gli elementi da integrare nella descrizione di uno studio possono essere classificati in due distinti gruppi. Il primo gruppo (Tabella 3.1), detto “ARRIVE Essential 10”, è composto dalle informazioni che rappresentano il minimo che occorre includere nel manoscritto; il secondo gruppo (Tabella 3.2), noto come “Recommended Set”, contiene invece tutti quegli elementi che contribuiscono a spiegare il contesto in cui lo studio è stato sviluppato. Il miglioramento del reporting è uno sforzo collaborativo, ed è necessario che ogni membro della comunità della ricerca biomedica si impegni in questo senso [31].

Informazione	Descrizione
Progetto dello studio	Gruppi confrontati, includendo l'eventuale presenza di gruppi di controllo; unità sperimentale.
Dimensione del campione	Esatto numero di unità sperimentali per ciascun gruppo e per ogni esperimento; numero totale di animali usati. Spiegazione circa la modalità con cui la dimensione del campione è stata scelta.
Criteri di inclusione ed esclusione	Eventuali motivi di inclusione o esclusione di animali stabilite a priori, durante l'esperimento o nel corso delle successive analisi. Eventuali esclusioni di animali, unità sperimentali o dati per ciascun gruppo sperimentale e motivazioni.
Randomizzazione	Eventuali procedure di randomizzazione per l'allocazione delle unità sperimentali e metodo con cui esse sono state messe in pratica. Descrizione della strategia usata per ridurre l'effetto di eventuali elementi confondenti, quale l'ordine dei trattamenti o delle misurazioni.
Blinding	Descrizione di coloro che erano consapevoli dell'assegnazione delle unità sperimentali nelle varie fasi degli esperimenti.
Misure del risultato	Chiara definizione delle misure degli esiti valutate (come ad esempio morte cellulare, marcatori molecolari o cambiamenti comportamentali).
Metodi statistici	Dettagli dei metodi statistici impiegati in ciascuna analisi, incluso il software utilizzato. Descrizione di qualsiasi metodo usato per valutare se i dati ricavati incontrassero o meno le assunzioni necessarie per applicare uno specifico approccio statistico, e di cosa è stato fatto nel caso in cui questo requisito sia venuto meno.
Animali	Specie, ceppo, sesso, età o stadio di sviluppo, peso (se rilevante), provenienza, stato di salute, immunologico o di modificazione genetica, genotipo, eventuali procedure effettuate in precedenza.
Procedure sperimentali	Per ciascun gruppo sperimentale, indicazioni su cosa, come, dove, quando, quanto spesso e perché è stata fatta una procedura, e che cosa è stato usato.
Risultati	Riassunto dei risultati statistici per ogni gruppo sperimentale, con eventualmente indicazioni sulla variabilità e la dimensione dell'effetto.

Tabella 3.1: ARRIVE Essential 10 [31].

Informazione	Descrizione
Abstract	Riassunto accurato di obiettivi, specie, ceppo e sesso degli animali, metodi, scoperte principali, conclusioni.
Background	Fondamento e contesto dello studio, spiegazione dell'approccio sperimentale; spiegazione della scelta del modello animale.
Obiettivi	Obiettivi della ricerca e, laddove appropriato, le ipotesi di cui si voleva conoscere la validità.
Dichiarazione etica	Dichiarazione di chi ha approvato l'uso degli animali nello studio ed i protocolli usati. In assenza di approvazione etica, occorre indicare una giustificazione.
Alloggi ed allevamento	Dettagli su alloggi ed allevamento, includendo eventuali arricchimenti dell'ambiente.
Cura degli animali e monitoraggio	Metodi di riduzione di dolore, sofferenza e angoscia; eventi avversi aspettati o inaspettati.
Interpretazione/implicazioni scientifiche	Interpretazione dei risultati alla luce degli obiettivi e delle ipotesi, attuali teorie e studi rilevanti presenti in letteratura; commenti sui limiti dello studio, incluse limitazioni del modello animale e imprecisione dei risultati.
Generalizzabilità/traduzione	Commento circa la possibilità che lo studio possa essere generalizzato ad altre specie o condizioni sperimentali, includendo l'applicabilità dei risultati alla biologia umana (laddove appropriato).
Protocollo di registrazione	Dichiarazione che indichi se un protocollo (domanda di ricerca e caratteristiche della progettazione) è stato preparato e se/dove è stato registrato.
Accesso ai dati	Dichiarazione circa la disponibilità dei dati dello studio, e dove essi possono essere reperiti.
Dichiarazione di interessi	Dichiarazione di ogni potenziale conflitto di interesse; lista delle fonti di finanziamento; ruolo dei finanziatori in progettazione, analisi e resoconto dello studio.

Tabella 3.2: Recommended Set [31].

Capitolo 4. Refinement

4.1 Definizione

Per Refinement si deve intendere qualsiasi diminuzione dell'incidenza o della gravità delle disumane procedure applicate agli animali che ancora devono essere utilizzati [3].

Refinement si riferisce all'insieme di metodi impiegati per minimizzare il dolore, la sofferenza, l'angoscia provati dagli animali usati negli esperimenti, allo scopo di promuovere il loro benessere. Ad esempio, occorre assicurare che gli animali vengano inseriti in un ambiente altamente controllato per tutta la durata dell'esperimento, che consenta loro di esprimere il comportamento proprio della specie cui appartengono; si può inoltre ridurre il dolore da essi provato grazie ad analgesici ed anestetici appropriati [3,4].

In generale, dunque, il concetto di Refinement può essere applicato ad ogni aspetto dell'uso degli animali nella ricerca, dall'allevamento alle procedure a cui essi vengono sottoposti [4].

Reduction e Refinement sono strettamente correlati: oltre all'ottimizzazione del benessere degli animali, gli accorgimenti volti ad implementare il Refinement devono mitigare i rischi legati al verificarsi di eventi imprevisti, il che è direttamente correlato alla riduzione del numero di animali usati nella procedura in esame [33].

4.2 Riconoscimento del dolore

Il dolore è associato a stimoli o eventi nocivi che attivano i nocicettori. Essi producono segnali in grado di rivelare la natura, l'intensità, la posizione e la durata dello stimolo nocivo e che, una volta raggiunto il sistema nervoso centrale, vengono processati per generare una serie di risposte fisiologiche e comportamentali, associate ad una sgradevole esperienza sensoriale ed emozionale. Il dolore può quindi variare nelle sue proprietà sensoriali e quantitative, così come nell'entità dell'avversione e della sgradevolezza che provoca.

Capire le potenziali cause di dolore negli animali usati a fini di ricerca può facilitare la sua prevenzione ed il suo riconoscimento. In generale, si tende a considerare che qualsiasi procedura che provochi dolore o angoscia nell'essere umano, possa sortire gli stessi effetti negli altri animali; tuttavia, questa assunzione non risulta essere sempre verificata, e pertanto è preferibile classificare il dolore sulla base della specie e dei tipi di studi condotti. Ad ogni modo, è possibile identificare una serie di procedure o condizioni che si sono rivelate dolorose per gli animali impiegati nella ricerca (Tabella 4.1) [34].

Sito anatomico	Condizione dolorosa
Addominale	Peritonite, pancreatite, epatite, colelitiasi, distensione dei visceri, ostruzioni intestinali, tumori viscerali, laparotomia.
Cardioracico	Miocardite, polmonite, bronchite, infarto del miocardio, vasculite, innesti vascolari, toracotomia.
Dermatologico	Prurito, ustioni chimiche e termiche, cellulite, otite, tumori della pelle, incisioni, punture di aghi.
Muscoloscheletrico	Artrite, periostite, tendinite, applicazione di lacci emostatici, infiammazione delle articolazioni, ustioni chimiche o termiche profonde, lividi, necrosi, prelievo di innesto osseo, tumore osseo, osteotomia, malattie degenerative a carico delle articolazioni.
Neurologico	Encefalite, meningite, schiacciamento o legatura di nervi, tumore del tessuto neurale, neuroma.
Oculare	Glaucoma, uveite, ulcera corneale, prelievo di sangue orbitale, tumore oculare.
Orofacciale	Tumori orali, malattie dell'articolazione temporo-mandibolare, gengiviti, estrazione di denti, pulpotomia, ascesso dentale.
Sistemico	Setticemia, malattie autoimmuni.
Urogenitale	Pielonefrite, cistite, insufficienza renale acuta, ostruzione ureterale o uretrale, piometra, cateterizzazione urinaria, mastite, castrazione, ovarioisterectomia, tumore urogenitale, distocia.

Tabella 4.1: esempi di procedure o condizioni dolorose per gli animali usati nella ricerca, suddivisi sulla base della loro localizzazione anatomica [34].

L'abilità di identificare e valutare il dolore è fondamentale per riuscire ad applicare il principio del Refinement, nonché per rendere più accettabile la sperimentazione animale agli occhi del pubblico e per rispondere a doveri etici e legali; essa consente di prevenire l'inflizione di immotivata sofferenza e di mitigare i possibili impatti negativi sulla ricerca [35].

È difficile comprendere la natura e l'intensità del dolore e delle emozioni negli animali [36].

Il dolore ha come conseguenze alterazioni fisiologiche, comportamentali e fisiche. Questi cambiamenti possono essere identificati attraverso varie modalità, quali osservazioni del comportamento, variazioni fisiche a livello di locomozione e postura (Tabella 4.2), analisi biochimiche, ematologiche o endocrinologiche¹. Essi comportano un incremento della variabilità degli esperimenti, oltre che la sofferenza degli animali che li sperimentano. Al contrario, stati emozionali positivi sono associati ad una diminuzione della variabilità e ad una maggior robustezza dei risultati sperimentali [35].

¹ Le valutazioni cliniche devono essere condotte in presenza di una solida conoscenza di quali comportamenti o caratteristiche fisiologiche possano essere ritenuti normali e quali anormali per la data specie sotto studio [34].

Segni comportamentali	Segni fisici
Allerta	L'animale altera la propria postura per evitare di muovere o di provocare un contatto con una determinata parte del corpo, o per evitare che questa venga maneggiata.
Aspetto anormale	Specie differenti mostrano diverse variazioni nel loro aspetto esteriore, anche a livello delle espressioni facciali.
Alterazione del comportamento	Gli animali potrebbero rimanere immobili ed essere riluttanti a muoversi anche in presenza di uno stimolo; potrebbero esibire mancanza di riposo e fasi del sonno alterate. Potrebbero inoltre mostrare variazioni a livello delle interazioni sociali con gli altri animali del gruppo.
Vocalizzazione	L'animale emette suoni quando avvicinato, maneggiato, quando una specifica area del corpo viene toccata o palpata, oppure per evitare di essere toccato.
Mutilazione	Gli animali potrebbero leccare, mordere, grattare, strofinare un'area del corpo in cui provano dolore.
Sudorazione	Un'eccessiva sudorazione è spesso associata al dolore.
Inappetenza	Un animale che soffre smette frequentemente di mangiare e bere, perdendo velocemente peso.

Tabella 4.2: segni comportamentali e fisici di dolore persistente [34].

4.2.1 The Grimace scales

La valutazione delle espressioni facciali ha destato particolare interesse in quanto possibile metodo per riconoscere stati emozionali positivi e negativi ed il dolore.

Inizialmente, la metodologia per descrivere il dolore e lo sviluppo di un sistema di codifica dell'azione facciale (Facial Action Coding System, FACS) è stata studiata sugli umani [35].

I FACSs catalogano tutti i possibili movimenti dei muscoli facciali, o delle loro combinazioni [36]. Essi conferiscono l'abilità di codificare e identificare le espressioni di dolore attraverso le singole componenti che definiscono un'espressione facciale, note come unità di azione facciale (Facial Action Units, FAUs) [35]. Poiché queste si sono rivelate utili per quantificare il dolore negli umani in assenza di comunicazione verbale, sono stati realizzati numerosi tentativi con lo scopo di standardizzare la valutazione delle espressioni facciali per captare la presenza del dolore negli animali da laboratorio, che hanno poi dato luogo alla creazione delle "scale della smorfia".

Le scale vengono descritte in termini di validità, affidabilità e sensibilità. La validità ha a che fare con la capacità della scala di misurare il risultato previsto (ovvero il dolore). L'affidabilità, invece, si riferisce al fatto che essa deve essere in grado di produrre il medesimo risultato ogni qual volta venga utilizzata. Infine, la sensibilità descrive l'abilità della scala di identificare accuratamente i cambiamenti nel livello di dolore.

Le "scale della smorfia" sono state inizialmente sviluppate per i topi, e sono state poi adattate per ratti, conigli, pecore, furetti, gatti e cavalli (Tabella 4.3) [36].

Specie	FAUs
Topo	Restringimento orbitale, rigonfiamento di naso e guance, posizione di orecchie e baffi.
Ratto	Restringimento orbitale, appiattimento di naso e guance, cambiamenti in orecchie e baffi.
Coniglio	Restringimento orbitale, appiattimento delle guance, forma del naso, posizione di orecchie e baffi.
Pecora	Restringimento orbitale, conformazione delle guance, posizione delle orecchie, profilo di labbro e mascella, posizione delle narici.
Furetto	Restringimento orbitale, sporgenza di naso e guance, posizione delle orecchie, ritrazione dei baffi.
Gatto	Restringimento orbitale, posizione delle orecchie e della testa, tensione nel muso e cambiamenti nei baffi.
Cavallo	Irrigidimento di orbite e orecchie, tensione al di sopra degli occhi, muscoli masticatori tesi e prominenti, bocca e narici tese, mento pronunciato, appiattimento del profilo.

Tabella 4.3: scale della smorfia per diverse specie animale e rispettive unità di azione facciale valutate [36].

Le scale della smorfia sono state applicate a diversi modelli di ricerca e contesti ambientali, su specie differenti. Esse offrono la possibilità di rintracciare la presenza del dolore e di quantificarlo, nonché di valutare i potenziali benefici di un analgesico; rappresentano inoltre un utile complemento agli strumenti in uso per la valutazione del benessere degli animali. In altre parole, hanno la capacità di soddisfare il principio del Refinement.

L'uso di questa tecnica non invasiva può potenzialmente migliorare il rilevamento del dolore negli animali da ricerca, consentendo ai ricercatori di fornire analgesici o un'umana eutanasia, oppure di identificare gli animali che necessitano di riabilitazione.

Similmente ad ogni altro strumento, anche le “scale della smorfia” presentano delle limitazioni. In particolare, le unità di azione facciale individuate possono essere diverse nel numero e nella tipologia per ciascuna delle specie considerate, e devono essere singolarmente valutate e statisticamente modellate, al fine di determinarne l'effettiva importanza per la creazione della scala. Mentre alcune FAU possono essere conservate come elementi utili a classificare l'espressione facciale di animali appartenenti a specie diverse, altre sono fortemente variabili, e possono dipendere anche dall'età dell'animale e dalla muscolatura facciale. Queste procedure richiedono molto tempo per essere sviluppate, poiché ogni specie richiede l'implementazione della propria “scala della smorfia”.

È necessario condurre ulteriori ricerche per studiare i potenziali utilizzi di questo recente metodo di valutazione del dolore; attualmente, non tutte le scale sono state totalmente validate (ad esempio quelle destinate a furetti) ed altre potrebbero essere create affinché ulteriori specie di animali, in particolare di mammiferi, possano trarne beneficio [35].

4.3 Anestetici ed analgesici

Una gestione efficace del dolore negli animali da laboratorio inizia spesso con un'anestesia generale, ma include anche anestetici locali, analgesici, ansiolitici e sedativi [34].

Anestetici ed analgesici hanno effetti positivi sul benessere degli animali. Sono emerse preoccupazioni circa il fatto che questi farmaci possano temporaneamente disperdere ed influenzare i dati scientifici; queste vengono tuttavia contrastate dalla dimostrazione che simili effetti vengono causati dal dolore.

La costante introduzione di nuove metodologie di ricerca e la richiesta di nuovi dispositivi diagnostici o terapeutici, da sottoporre a test preclinici di sicurezza ed efficacia, richiede l'introduzione di nuovi metodi per mettere in pratica il Refinement. La formazione obbligatoria del personale che segue gli animali da laboratorio fornita al fine di imparare come applicare le moderne tecniche di anestesia, ha ridotto la necessità di operare cambiamenti in questo contesto per stare al passo con le varie novità introdotte nel campo della ricerca. Non si può dire lo stesso in merito all'uso degli analgesici, a causa delle lacune esistenti nel riconoscimento e nell'efficace trattamento del dolore [37].

4.3.1 Anestetici

L'anestesia, definita da Russell e Burch come la procedura di Refinement suprema, ha effetti sulla sopravvivenza degli animali da laboratorio e sui dati ricavabili dagli esperimenti. Essa viene indotta secondo diverse modalità a seconda del tipo di studio e dell'animale.

In generale, essa può influenzare alcuni parametri fisiologici, come pressione, saturazione di ossigeno nel sangue, flusso sanguigno cerebrale ed altri fattori valutati nel follow-up postoperatorio. La maggior parte degli agenti anestetici diminuisce il metabolismo cerebrale e spesso inficia la trasmissione degli impulsi nervosi: occorre monitorare la temperatura corporea e tutta una serie di altri parametri fisiologici, quali risposte autonome e variazioni nelle risposte dei riflessi somatici a stimoli dolorosi, durante l'anestesia [3,34,38].

Quando gli animali vengono anestetizzati per procedure che altrimenti risulterebbero dolorose, è importante mantenere un'adeguata profondità dell'anestesia. Se non accompagnata da inibitori neuromuscolari, la sua profondità può essere valutata tramite le risposte dei riflessi somatici, quale quello di ritiro del piede. Ad ogni modo, occorre usare uno stimolo sufficientemente doloroso, ma non tale da recare danno ai tessuti.

Dosi di agenti anestetizzanti in grado di reprimere i riflessi spinali potrebbero essere ben più elevate di quelle richieste per condurre l'intervento chirurgico in modo umano.

Idealmente, l'anestesia generale dovrebbe indurre rapidamente il rilassamento muscolare ed essere prontamente controllabile e reversibile. Vi sono due categorie di anestetici generali usati negli animali da laboratorio: inalanti volatili e farmaci iniettabili [34]. I primi vengono somministrati con intubazione endotracheale (procedura che deve essere eseguita seguendo un corretto protocollo), e sono particolarmente adeguati negli animali di grossa taglia [38]. I farmaci iniettabili sono utili quando la strumentazione necessaria per l'anestesia inalatoria non sia utilizzabile e per alcune procedure specifiche [34].

Il monitoraggio post-anestetico è importante nella fase di recupero. La presenza di eventuali effetti collaterali può essere valutata grazie a dati generali quali frequenza cardiaca, temperatura corporea, concentrazione di gas ed elettroliti nel sangue.

Un protocollo adatto, efficace e privo di complicazioni per la somministrazione dell'anestesia è importante negli studi sperimentali condotti su modelli animali, poiché potrebbe influenzare i risultati di una prova. Tuttavia, ad oggi non ne esiste uno universalmente valido [38].

4.3.2 Analgesici

L'analgesia è definita come "insensibilità al dolore". Tuttavia, la completa eliminazione del dolore negli animali a seguito di determinate procedure non è comunemente realizzabile, né desiderabile: talvolta, il dolore ha un ruolo protettivo, poiché serve a limitare ulteriori lesioni. In alcuni casi gli animali afflitti da un grave dolore non trattato, potrebbero lottare o auto mutilarsi, provocando ulteriori lesioni a loro stessi.

L'obiettivo di un trattamento analgesico è garantire che l'animale non sia ostacolato dal dolore e al contempo non risenta negativamente degli effetti collaterali prodotti dai farmaci.

La capacità di fornire un'adeguata analgesia agli animali da laboratorio è limitata dalla mancanza di informazioni concernenti gli effetti e le opportune dosi di farmaci da somministrare specifici per la specie sotto studio.

Convenzionalmente, le classi di farmaci analgesici includono oppioidi, farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) e anestetici locali [34].

4.4 Arricchimento dell'ambiente

La tecnica di arricchimento dell'ambiente è un insieme di procedure applicabile agli animali allevati in cattività, in cui stimoli fisici, sensoriali, cognitivi ed esplorativi vengono inseriti nell'ambiente dove essi vengono collocati, al fine di simulare le condizioni che ritroverebbero in natura [39]. Se condotto in maniera corretta, l'arricchimento dell'ambiente migliora la qualità di vita degli animali, garantendo loro di esibire comportamenti desiderabili e tipici della specie di appartenenza [4].

La maggior parte degli studi condotti sull'arricchimento dell'ambiente ha evidenziato una serie di rischi e di requisiti legati alla sua implementazione. In particolare, è emerso che i programmi di arricchimento devono considerare le differenze biologiche (in termini di specie, età, sesso), le restrizioni finanziarie, i problemi pratici e gli effettivi benefici prodotti da tale tecnica; devono inoltre tener conto dei possibili rischi di un'aumentata variabilità o di un'alterazione dei risultati ottenuti, e di danni indesiderati a carico degli animali stessi [40].

Nonostante diverse prove scientifiche abbiano dimostrato un miglioramento delle condizioni fisiche e mentali degli animali su cui sono stati testati gli effetti dell'arricchimento dell'ambiente, occorre interrogarsi sulla possibilità che questa tecnica influenzi l'affidabilità dei risultati sperimentali. Un recente studio ha mostrato come la riproducibilità e la comparabilità di questi ultimi possono essere garantite proponendo una standardizzazione della tecnica di arricchimento dell'ambiente usata in una stessa area della sperimentazione [39].

Gli oggetti per arricchire un ambiente possono essere scelti sulla base dello specifico comportamento che si vuole incentivare od evitare e dei bisogni specifici dell'animale in questione. È importante saper valutare le capacità sensoriali più sviluppate degli animali, per esempio i primati (umani e non) sono particolarmente sensibili agli stimoli visivi, mentre i roditori a quelli olfattivi. Occorre studiare attentamente i potenziali pericoli associati ad un particolare oggetto: alcuni tipi di materiali usati per le lettiere, ad esempio, possono irritare gli occhi o causare problemi respiratori, mentre altri possono rilasciare sostanze nocive se immersi in acqua [4].

4.5 Applicazione delle procedure di Refinement al caso del topo

4.5.1 Alloggi e trattamento

Alloggi e trattamento possono avere un grande impatto sui topi da laboratorio. L'ambiente fisico e sociale in cui essi vivono ha importanti conseguenze sia sul loro benessere che sulla qualità dei dati che si possono ottenere. Condizioni abitative scadenti possono portare a comportamenti anomali, quale ad esempio un aumento dell'aggressività. I topi tendono a separare gli spazi destinati alle attività giornaliere da quelli in cui nidificano, e spesso gli alloggi mancano nel considerare questo aspetto. È stato inoltre dimostrato che persino il colore della gabbia può influenzare i livelli di ansia ed angoscia provate. Occorre dunque valutare tutta una serie di fattori per un alloggio ed un trattamento ottimali: dimensioni della gabbia, cicli luce-buio (con bassa intensità luminosa), temperatura stabile (tra 20 e 24 °C), frequente ventilazione della gabbia, umidità (dal 45% al 60%), suoni, interazioni sociali [4].

4.5.2 Dolore e scala della smorfia

L'elaborazione affettiva e cognitiva del dolore si verifica nei roditori come in qualsiasi altro mammifero, poiché essi mostrano vie nocicettive e meccanismi di segnalazione praticamente analoghi. I roditori, pertanto, non sono specie meno senzienti [41].

I topi sono una delle specie più largamente utilizzate nella ricerca e negli studi legati al dolore, pertanto è importante che i ricercatori acquisiscano l'abilità di riconoscere quando questi provano dolore. Se quest'ultimo è acuto, i topi possono emettere suoni od ultrasuoni, oppure diventare particolarmente aggressivi quando maneggiati [34].

Rimane una certa controversia circa la funzione comunicativa delle espressioni facciali nei roditori, dal momento che queste specie comunicano preferibilmente attraverso olfatto e tatto. È emerso tuttavia che le lesioni a carico della corteccia insulare (associata alla percezione del dolore negli umani), modulano le espressioni facciali, supportando per analogia la teoria che queste possono essere utili per la rilevazione del dolore anche nei roditori.

La "scala delle smorfie" del topo (Tabella 4.4) è stata sviluppata nel 2010 grazie ad uno studio nocicettivo della costrizione addominale ottenuta tramite la somministrazione di acido acetico, che ha permesso di identificare le unità di azione facciale in grado di mostrare con una certa affidabilità la presenza del dolore [36].

	0	1	2
Restringimento orbitale			
Rigonfiamento del naso			
Rigonfiamento delle guance			
Posizione delle orecchie			
Cambiamento nei baffi			

Tabella 4.4: scala della smorfia per il topo. I numeri 0, 1, 2 si riferiscono rispettivamente a dolore assente, moderatamente presente, ovviamente presente [4].

4.5.3 Anestetici ed analgesici

Per indurre l'anestesia negli animali di piccola taglia, tipicamente si utilizzano gas anestetizzanti. Uno studio condotto da Risling et al. ha dimostrato che la somministrazione a goccia di isoflurano o sevoflurano² è un efficace strumento per anestetizzare i topi. L'isoflurano richiede concentrazioni minori rispetto al secondo, e consente di indurre l'anestesia in tempi minori. Ad ogni modo, entrambi garantiscono un recupero rapido [38].

Per quanto riguarda gli analgesici, invece, i più comunemente utilizzati includono buprenorfina, tramadolo, carprofene, Meloxicam, ketoprofene, ibuprofene (Tabella 4.5).

² Gas alogeni, rispettivamente di formula chimica $C_3H_2ClF_5O$ e $C_4H_3F_7O$.

Farmaco	Dose (mg/kg di peso)	Classe
Buprenorfina	0.05-0.1	Oppioidi
Tramadol	5-40	Oppioidi
Carprofene	2-5	FANS
Maloxicam	1-5	FANS
Ketoprofene	2-5	FANS
Ibuprofene	30-40	FANS

Tabella 4.5: farmaci usati come analgesico per i topi, con indicazioni circa la dose da somministrare e la classe di appartenenza [41].

4.5.4 Arricchimento dell'ambiente

L'arricchimento dell'ambiente fornisce stimoli sensoriali e motori agli animali, e consente loro una più ampia scelta di attività a cui dedicarsi e un maggior controllo sull'ambiente che li circonda. La scelta degli oggetti richiesta per implementare questa tecnica non deve essere casuale o effettuata sulla base di quanto è disponibile, bensì occorre avere una certa cura al fine di produrre gli effetti benefici desiderati sugli animali. Nel caso particolare dei topi, garantire la possibilità di esibire comportamenti tipici della propria specie, quali la nidificazione e il foraggiamento, può portare a significativi miglioramenti nelle loro condizioni di vita.

Tra tutte le forme di arricchimento, i topi sembrano preferire la disponibilità di materiale con cui costruire un nido. La qualità del nido prodotto può essere un utile strumento per identificare eventuali problemi di salute o di mancato benessere. Tra i materiali più comuni vi sono fazzoletti, strisce di carta sminuzzate, cotone, trucioli di legno.

I denti dei topi crescono in modo continuo, pertanto è importante fornire loro degli oggetti che possano essere rosicchiati (Figura 4.1); la loro assenza potrebbe portare a malocclusione dentale e malnutrizione [4].



Figura 4.1: esempio di arricchimento dell'ambiente per il topo [4].

Capitolo 5. Implicazioni della regola delle 3R

A seguito della pubblicazione de “The Principle of Humane Experimental Technique”, avvenuta nel 1959, nel corso degli anni ‘60 e ‘70 del secolo scorso sono sorte alcune iniziative allo scopo di promuovere il benessere degli animali impiegati nella ricerca. Tuttavia, la regola delle 3R ha iniziato ad essere considerata come un importante principio etico su cui fondare una sperimentazione animale più umana soltanto a partire dagli anni ‘80.

In quel periodo, in Svizzera e nella Repubblica Federale di Germania sono stati proposti cambiamenti legislativi, al fine di promuovere la ricerca di alternative all’uso degli animali (con particolare interesse rivolto dapprima ai test tossicologici).

Nel novembre del 1986, la Comunità Europea ha introdotto la direttiva 86/609/EEC, tramite la quale richiedeva agli stati membri di mettere in pratica i principi espressi dalla regola delle 3R di Russell e Burch, pur non citandola direttamente. Ad esempio, l’articolo 7.4 suggeriva di progettare esperimenti in modo tale da evitare che gli animali sottoposti alle procedure provassero dolore ed angoscia non necessari, mentre l’articolo 8 promuoveva l’utilizzo di anestetici ed analgesici appropriati; nell’articolo 23.1 della direttiva, si parlava invece dell’impegno degli stati membri per sviluppare e validare tecniche alternative.

La ricerca di queste ultime ha portato alla fondazione della piattaforma di consenso europeo per le alternative (ECOPA, European Consensus-Platforms for Alternatives) nel dicembre del 2000 e, in seguito, di numerose organizzazioni nazionali in Norvegia (NORECOPA), Regno Unito (NC3Rs), Danimarca, Svezia, Belgio, Italia (Centro 3R) e Canada.

Nel 2010, la direttiva 86/609/EEC è stata aggiornata e sostituita dalla 2010/63/EU, entrata poi in vigore nel 2013 [42]. Si tratta del frutto di anni di discussioni che hanno coinvolto non solo i ricercatori, ma anche associazioni di pazienti e per la protezione degli animali [2]. Lo scopo specifico di questa legislazione tuttora in vigore è fornire le indicazioni per applicare opportunamente la regola delle 3R negli esperimenti condotti sugli animali e per promuovere la loro protezione ed il loro benessere [42]. Tali indicazioni riguardano tutti gli animali vertebrati viventi non umani, forme larvali in grado di nutrirsi in modo indipendente, forme fetali di mammiferi a partire dall’ultimo terzo della gestazione e cefalopodi vivi.

Attualmente, pertanto, la sperimentazione animale è strettamente controllata da specifiche leggi, e può essere condotta solo in accordo con esse [2].

L’interesse rivolto al principio presentato da Russell e Burch deriva soltanto in parte da considerazioni di tipo etico: metodi più umani consentono di ottenere risultati scientifici con il livello di qualità desiderato in maniera più efficace, facile ed economica. Ad esempio, i modelli

in silico possono fornire risultati più velocemente, mentre progettare correttamente gli esperimenti e mantenere gli animali in un buono stato di salute si traducono in una riduzione del numero di esemplari necessari e, conseguentemente, dei costi di acquisto e cure. Le nuove tecniche di imaging contribuiscono a loro volta in modo significativo al raggiungimento di questi obiettivi, permettendo inoltre di ridurre l'invasività delle procedure. Infine, una certa considerazione viene destinata anche al Refinement, poiché la presenza di potenziali fattori di stress nell'ambiente in cui gli animali vengono allevati può confondere i risultati sperimentali [42].

5.1 HBA e le 3V

L'uso degli animali può essere approvato soltanto se è in grado di fornire nuove conoscenze significative e benefici rilevanti, senza infliggere danni e dolore non necessari. L'analisi danno-beneficio (HBA, Harm-Benefit Analysis) è lo strumento più comunemente impiegato per stabilire se i protocolli di studio soddisfano queste aspettative; è una fase cruciale per l'approvazione degli esperimenti e viene esplicitamente richiesta dalla direttiva 2010/63/EU. Innanzitutto, per poter condurre una qualsiasi HBA, lo studio deve essere idoneo per il raggiungimento dello scopo specificato; occorre provare che l'uso degli animali è necessario, e che essi non possono essere sostituiti da materiale non senziente o da organismi alternativi. L'analisi vera e propria consente poi di determinare se i benefici attesi superano i danni inflitti agli animali [43].

L'implementazione della regola delle 3R è necessaria al fine di minimizzare la sofferenza e l'angoscia provati dagli animali, ma non è sufficiente a legittimare qualsiasi tipo di ricerca condotta su di essi. Per valutare e promuovere la validità degli studi scientifici basati sull'uso di animali da laboratorio, massimizzando i risultati utili da essi ottenibili, è stata introdotta la regola delle 3V. Similmente a quanto si verifica per la regola delle 3R, ciascuna V rappresenta un aspetto chiave della validità scientifica; quest'ultima può essere caratterizzata in termini di validità costruttiva, interna ed esterna [44] (Tabella 5.1).

V	Descrizione
Validità costruttiva	Affidabilità del modello animale per la proprietà che si intende misurare.
Validità interna	Logica e rigore scientifici alla base dello studio (coerenza tra causa ed effetti).
Validità esterna	Caratteristiche di progetto che migliorano la riproducibilità dei risultati attesi.

Tabella 5.1: le 3V [43,44].

La regola delle 3V, quella delle 3R e l'analisi danno-beneficio consentono di valutare la legittimità di uno studio. L'idoneità delle procedure viene determinata sulla base del principio delle 3V; se il protocollo di studio è ritenuto sufficientemente adeguato a raggiungere gli scopi previsti, in termini di validità costruttiva, interna ed esterna, si procede con la valutazione dell'effettiva necessità di impiegare animali viventi e senzienti tramite il principio delle 3R. Una volta appurato che l'uso degli animali è necessario, si procede con l'analisi danno-beneficio. Infine, se l'esito dell'analisi è positivo, ovvero se i benefici attesi per la società (in termini di possibilità di contribuire al sapere scientifico ed alla salute di esseri umani ed animali) superano i danni inflitti agli animali (dolore, lesioni, impossibilità di esprimere comportamenti propri della specie di appartenenza), allora il protocollo è ritenuto ragionevole per perseguire gli obiettivi dello studio [44] (Figura 5.1).

			Harm		
	Scientific	Societal	Mild	Moderate	Severe
Benefit	Low	Low			
		Moderate			
		High			
	Moderate	Low			
		Moderate			
		High			
	High	Low			
		Moderate			
		High			

Figura 5.1: esempio di analisi danno-beneficio. Il danno viene designato come lieve, moderato o grave sulla base della classificazione della gravità delle procedure proposta nella direttiva 2010/63/EU, mentre per i benefici si propone una suddivisione tra beneficio per la scienza o per la società. Le caselle sono colorate in verde se i potenziali benefici scientifici e sociali superano il livello di danno provocato negli animali (HBA con esito positivo), in rosso se questo non si verifica [45].

5.1.1 Valutazione del danno

La valutazione del danno atteso subito dagli animali nel corso di uno studio può essere effettuata tramite la classificazione della gravità delle procedure proposta all'interno della direttiva 2010/63/EU [45].

Una procedura viene classificata come “lieve” se può potenzialmente causare dolore, sofferenza o angoscia lievi e di breve durata, senza provocare un significativo deterioramento del benessere o delle condizioni generali degli animali. Se le procedure possono provocare dolore, sofferenza, angoscia moderati e di breve durata oppure lievi e di lunga durata, ed un deterioramento moderato di benessere e condizioni generali, vengono invece designate come “moderate”. Infine, qualora la procedura abbia le potenzialità di provocare dolore, sofferenza e angoscia

intensi o moderati ma di lunga durata e gravi deterioramenti di benessere e condizioni generali, si parla di procedura “grave”.

L’assegnazione della categoria tiene conto di ogni intervento o manipolazione a cui ogni singolo animale usato è sottoposto nell’ambito di un determinato studio. Oltre al tipo di procedura, occorre considerare tutta una serie di altri fattori. Tra questi figurano il tipo di manipolazione e di gestione degli animali, la natura di dolore, sofferenza, angoscia o danno prolungato, con indicazione dei relativi livelli di intensità e delle tecniche impiegate. Inoltre, si valutano la specie, l’età e il sesso dell’animale, il tipo di addestramento ricevuto con riferimento alla procedura e se esso è destinato ad essere riutilizzato, nonché i metodi di perfezionamento delle condizioni di alloggiamento, allevamento e cura [46].

5.1.2 Valutazione dei benefici

La direttiva 2010/63/EU descrive sette diversi scopi di ricerca per i quali l’uso di animali potrebbe essere proposto. Essi comprendono la ricerca di base, la ricerca traslazionale, la ricerca applicata, i test per farmaci, cibo o sostanze varie, la protezione dell’ambiente, la preservazione delle specie, la ricerca forense e la formazione per acquisire abilità professionali.

Dal momento che il termine “beneficio” è piuttosto generico, e che gli scopi di ricerca sono così vari (dunque associabili a diversi tipi di benefici e destinatari), potrebbe essere utile proporre una prima distinzione tra beneficio scientifico e beneficio sociale.

I comitati di revisione etica e degli studi condotti sugli animali, come ad esempio il comitato istituzionale per la cura e l’uso degli animali (IACUC, Institutional Animal Care and Use Committee), possono quindi classificare il potenziale beneficio di un esperimento come alto, moderato o basso. Ad esempio, per determinare il livello di beneficio sociale di uno studio, si può valutare in quale misura quest’ultimo possa contribuire a migliorare la salute dell’essere umano, in termini di numero di pazienti affetti dalla patologia per cui si intende trovare rimedio, o di possibilità di applicazione immediata dei risultati ricavati. Ad ogni modo, la scelta è spesso molto soggettiva e la classificazione può risultare complessa [45].

5.2 Una gerarchia capovolta

La regola delle 3R ha mantenuto all’incirca la sua formulazione originale, fatto salvo per alcuni cambiamenti nelle definizioni di ciascuna R e nel loro ordine di importanza (Tabella 5.2) [42]. Russell e Burch espongono le 3R secondo un ordine che riflette una precisa gerarchia: il Replacement è il massimo e più importante obiettivo raggiungibile nell’ambito della ricerca medica, mentre la Reduction precede il Refinement, in quanto quest’ultimo va applicato

soltanto se non è presente una possibile alternativa all'uso degli animali e se qualsiasi mezzo per ridurre al minimo il loro numero è stato impiegato (compatibilmente con gli obiettivi che lo studio si propone di perseguire) [3,47]. Attualmente, invece, tale gerarchia è stata capovolta: vi è la tendenza a dare priorità alle tecniche di Refinement, scegliendo protocolli di ricerca meno invasivi o impiegando opportunamente anestetici ed analgesici; talvolta, tuttavia, si trascurano gli aspetti relativi alla cura destinata all'ambiente in cui gli animali vengono allevati. Seguono la Reduction, messa in pratica principalmente tramite un'appropriata progettazione degli esperimenti, e infine il Replacement [42].

Gerarchia proposta	Gerarchia corrente
1. Replacement La priorità dovrebbe essere quella di evitare l'uso di animali, o di sostituirli in quante più fasi possibili nel corso dell'esperimento.	1. Refinement Angoscia e sofferenza devono essere prevenute, per ragioni etiche e scientifiche; tuttavia, non è sempre possibile applicare il Refinement per il rischio di confondere i risultati.
2. Reduction Se l'uso degli animali è inevitabile, occorre usare il minimo numero di animali possibile per ottenere risultati affidabili.	2. Reduction Occorre usare il minor numero di animali possibile, purché questo non infici il loro benessere.
3. Refinement Quando i principi di Replacement e Reduction sono stati soddisfatti, occorre prevenire e minimizzare angoscia e sofferenza.	3. Replacement Vi è un certo spazio destinato al Replacement, ma si ritiene che l'uso degli animali sia necessario in una qualche fase dello studio. Ad ogni modo, esso dovrebbe essere opportunamente giustificato.

Tabella 5.2: confronto tra la gerarchia proposta da Russell e Burch e l'ordine di priorità attualmente attribuito alle 3R [47].

Nonostante Russell e Burch abbiano attribuito al principio di Replacement la massima importanza, vi è tuttora la tendenza a considerare i modelli non-animali, quali le colture cellulari e i modelli in silico, come complemento all'uso degli animali o al più come potenziali alternative utili in alcune fasi della ricerca biomedica, specialmente con lo scopo di ridurre il numero di esemplari impiegati [2,47]. Ad oggi, infatti, non è possibile riprodurre fedelmente la complessità degli organi e delle funzioni dell'organismo umano, e questo impedisce la completa sostituzione dei test condotti sugli animali da laboratorio in vivo. Per questo motivo, ad esempio, testare un farmaco o un vaccino tramite l'utilizzo di una coltura cellulare o di modelli in silico, aiuta ad identificare importanti caratteristiche che incentivino un loro ulteriore sviluppo; tuttavia, la verifica del loro profilo di efficacia e tossicità richiede test sperimentali in vivo, prima che si possa passare alla fase clinica [2].

5.3 Sviluppi futuri

Alla luce delle considerazioni esposte, risulta pertanto probabile che in futuro la ricerca di metodi alternativi all'uso degli animali in specifici ambiti di studio prosegua, ma che purtroppo persistano o vengano sviluppati campi di ricerca in cui il Replacement risulta difficile o addirittura impossibile. Ciononostante, esistono nuove e diverse opportunità per l'applicazione della regola delle 3R. Ad esempio, una sempre miglior progettazione degli esperimenti e analisi statistiche appropriate possono ridurre l'uso degli animali, mentre la condivisione trasparente dei risultati sperimentali ottenuti offre la possibilità di usare in modo più efficiente le informazioni, rendendo non necessaria la ripetizione degli esperimenti. Per quanto riguarda il Refinement, invece, si stanno implementando nuovi protocolli di addestramento, cosicché gli animali possano collaborare con i ricercatori al fine di ridurre lo stress associato alle procedure sperimentali o di routine, e nuovi metodi per valutare gli impatti che queste hanno sul loro benessere. Inoltre, l'anestesia nelle varie fasi degli esperimenti è diventata una procedura standard, ma poiché potrebbe a sua volta influenzare il benessere degli animali, il personale deve essere adeguatamente formato per la sua somministrazione; è necessario invece lo sviluppo di protocolli ottimali per l'uso degli analgesici. In molti paesi, i requisiti minimi che gli alloggiamenti devono presentare per soddisfare le esigenze degli animali, assieme ad eventuali arricchimenti dell'ambiente, sono opportunamente regolamentati. Si pensa inoltre che in futuro verranno adottati in maniera più diffusa, quando si arriverà a comprendere a pieno il loro impatto sui risultati sperimentali [42].

Capitolo 6. La regola delle 3R in Italia

6.1 Regole per l'impiego di animali a fini scientifici

I conflitti tra l'interesse rivolto alla possibilità di migliorare la salute umana, i preziosi risultati ricavabili grazie alla scienza, il miglioramento del benessere sociale, la protezione dell'ambiente e l'obbligo di prevenire il dolore e la sofferenza degli animali devono essere risolti tramite la creazione di un adeguato quadro giuridico, basato su considerazioni attente e responsabili. La legislazione per la protezione degli animali in Italia e in Europa richiede che ogni fase di ciascun esperimento venga progettata e messa in pratica con cura [48].

A seguito dell'introduzione della direttiva 2010/63/EU, ciascuno stato membro dell'Unione Europea ha potuto stabilire le proprie leggi nazionali per regolare l'uso degli animali da laboratorio, autorizzare protocolli di ricerca per la sperimentazione animale e supervisionare un'opportuna applicazione delle norme.

Il passaggio della direttiva europea a legislazioni di carattere nazionale ha generato inevitabilmente delle differenze tra gli Stati membri. In particolare, in Italia, nel 2014, è stato introdotto il Decreto Legislativo 26/14, il quale rappresenta un'interpretazione molto restrittiva della direttiva 2010/63 [2]. Alla luce della scorretta trasposizione di quest'ultima, la Commissione Europea ha avviato una procedura di infrazione ai danni dell'Italia.

Parte del pubblico ha considerato il nuovo decreto come un miglioramento della direttiva europea, in quanto proibisce gli esperimenti che prevedono l'uso di scimmie antropomorfe (laddove invece la direttiva 2010/63 ammette delle eccezioni) e quelli usati per produrre e controllare materiale bellico; impedisce di riutilizzare gli animali per studi che provocano forti livelli di dolore e ha introdotto sanzioni penali più severe per coloro che violano le minime norme stabilite dalla legge. Oltre a questi, sono stati introdotti anche altri provvedimenti che si differenziano da quanto previsto dalla direttiva proposta dalla Commissione Europea nel 2010. In particolare, è proibito eseguire procedure senza fornire gli adeguati anestetici ed analgesici, a meno che questi non siano l'oggetto dello studio. Non è possibile condurre test tossicologici somministrando la dose letale di una data sostanza o produrre antibiotici monoclonali attraverso l'induzione di ascite (quando siano disponibili metodi alternativi a questo o quando questo non sia obbligatorio per legge) [48]. È proibito l'uso di animali per esperimenti di xenotrapianto e per lo studio degli effetti legati all'uso di sostanze di abuso [2]. È inoltre presente il divieto di allevamento, ma non di utilizzo, di cani, gatti, primati destinati alla sperimentazione nel territorio nazionale.

I cambiamenti introdotti in Italia si pongono l'obiettivo di garantire più elevati livelli di protezione agli animali da laboratorio, introducendo requisiti specifici per il loro allevamento ed il loro uso. Inoltre, la regola delle 3R viene esplicitamente riconosciuta come uno strumento orientato all'implementazione di metodi alternativi all'uso di modelli animali in vivo [48].

Le variazioni di cui sopra, rappresentando restrizioni non indifferenti rispetto a quanto indicato dalla direttiva 2010/63/EU e anche a quanto adottato dagli altri Paesi dell'Unione Europea, limitano i possibili ambiti di ricerca biomedica esplorabili in Italia [2].

6.2 Organismo Preposto al Benessere degli Animali

Ogni allevatore, fornitore o utilizzatore di animali per scopi di ricerca deve costituire, all'interno delle proprie strutture, un Organismo Preposto al Benessere degli Animali (OPBA). Ciascun OPBA deve essere composto da almeno un responsabile del benessere e della cura degli animali, dal medico veterinario e da uno o più membri scientifici [49]. Ad esempio, l'OBPA dell'Università di Padova si compone di almeno tre medici veterinari designati e di vari responsabili del benessere animale. Questi ultimi sono convocati per le strutture di volta in volta coinvolte nei progetti di ricerca in esame e possono essere individuati tra il personale docente e quello tecnico amministrativo. Inoltre, comprende rappresentanti delle aree scientifiche interessate (quali scienze del farmaco, biologiche, mediche, agrarie e medico-veterinarie e psicologiche) ed esperti di bioetica, biostatistica, etologia, giurisprudenza, biosicurezza, nonché un responsabile dei procedimenti amministrativi [50].

L'OPBA ha il compito di esaminare i progetti di ricerca da svolgere presso lo stabilimento autorizzato di cui fa parte, verificando la corretta applicazione della regola delle 3R [49]. In particolare, per poter avviare un particolare studio, occorre valutare la necessità della ricerca ed il contributo probabile in termini di ricadute positive per la salute dell'uomo o degli animali, o per l'ambiente e la necessità dell'utilizzo di animali viventi. Se questi non possono essere sostituiti da alcun metodo alternativo esistente, allora devono essere impiegate specie dotate del minor grado possibile di sviluppo neurologico (Replacement). Occorre rispettare il principio di massima riduzione possibile del numero di animali impiegati, mantenendo la previsione di risultati affidabili (Reduction), e perfezionare le procedure ai fini di massimizzare la tutela del benessere degli animali impiegati. Nella valutazione del protocollo sperimentale, si tiene conto non solo del grado e della durata delle sofferenze, ma anche del numero di animali coinvolti e le misure previste per ridurre la probabilità di nuocere agli animali (Refinement) [50].

Oltre a questo, l'OBPA deve considerare la corretta applicazione della normativa 26/2014, la rilevanza tecnico-scientifica del progetto, l'adeguata formazione e la congruità dei ruoli

professionali del personale utilizzatore e la valutazione del danno/beneficio. L'utilizzatore deve inoltre rispettare gli obblighi imposti dalle normative europee o farmacopee per lo sviluppo e la sicurezza dei farmaci e i test tossicologici di sostanze chimiche o naturali.

In caso di parere positivo, il progetto viene sottoposto al Ministero della Salute per l'approvazione o il diniego all'esecuzione. I progetti approvati possono poi essere svolti nelle modalità e nei tempi previsti ed autorizzati [49].

Secondo quanto riportato nell'articolo 26 del Decreto Legislativo 26/2014, l'Organismo Preposto al Benessere degli Animali ha il compito di esprimere un parere motivato sui progetti di ricerca e su eventuali modifiche successive, fornendone comunicazione al responsabile del progetto [50]. Se per motivi scientifici o tecnici si rendono necessarie eventuali modifiche, occorre informare nuovamente il Ministero della Salute, richiedendone il consenso [49].

L'OPBA ha anche il compito di consigliare il personale di ricerca su questioni relative al benessere degli animali e di seguire lo sviluppo e l'esito dei progetti, tenendo conto degli effetti sugli animali utilizzati e fornendo consulenze su come contribuire ulteriormente ai principi di Replacement, Reduction e Refinement [50].

6.2.1 Progetti di ricerca: requisiti ed iter autorizzativo

Un progetto è un programma di lavoro con un preciso obiettivo scientifico, che prevede il ricorso a una o più procedure. Per procedura si intende qualsiasi uso, invasivo o non invasivo, di un animale a fini scientifici o educativi, che possa causare all'animale dolore, sofferenza, angoscia o danno prolungato, equivalente o superiore a quello provocato dall'inserimento di un ago effettuato seguendo correttamente le prassi veterinarie. È esclusa dalla definizione la soppressione di animali al solo scopo di impiegarne organi o tessuti.

Le procedure autorizzate e quelle proibite sono specificate nel quinto articolo del Decreto Legislativo 26/2014. In particolare, possono essere eseguite per ricerca di base, applicata o traslazionale oppure per lo sviluppo, la produzione e i test di qualità ed efficacia di farmaci, prodotti alimentari, mangimi ed altre sostanze; inoltre, possono essere realizzate per la protezione dell'ambiente o per la ricerca finalizzata alla conservazione della specie, nonché per l'insegnamento e la formazione (ai fini di acquisire, mantenere o migliorare competenze professionali) e per indagini medico legali. Per quanto riguarda la ricerca applicata o traslazionale nello specifico, invece, essa può essere usata per profilassi, prevenzione, diagnosi o cura di malattie o di altre anomalie, per valutazione, rilevazione, controllo o modificazioni delle condizioni fisiologiche in umani, animali e piante oppure per migliorare il benessere e le condizioni di produzione di animali allevati a fini zootecnici.

I requisiti e l'iter autorizzativo di un progetto di ricerca che preveda l'utilizzo di animali vertebrati o di alcuni invertebrati (cefalopodi) a fini scientifici o educativi sono stabiliti dal Decreto Legislativo 26/2014. In particolare, la procedura di presentazione prevede che l'Organismo Preposto al Benessere degli Animali inoltri al Ministero la domanda di autorizzazione, compresa tutta una serie di allegati (tra cui, ad esempio, la proposta del progetto, l'autocertificazione di competenza del personale, il parere motivato dell'OPBA e la sintesi non tecnica del progetto (Tabella 6.1)), tramite la Banca Dati Telematica della Sperimentazione Animale. Quest'ultima è una piattaforma per la gestione telematica dei progetti di ricerca, istituita nel 2015 come parte di un più ampio progetto di semplificazione burocratica [49].

Allegato	Descrizione dei contenuti
Proposta del progetto	Stato dell'arte/delle conoscenze e razionale nel settore della ricerca, obiettivi del progetto, giustificazione del/dei modello/i animale, risultati attesi e contributo al miglioramento delle conoscenze scientifiche nel settore della salute umana, animale e dell'ambiente, referenze, bibliografia.
Autocertificazione di competenza del personale	Dichiarazione dell'OPBA che testa che il personale addetto a cura degli animali, procedure sperimentali, soppressione degli animali possiede un consono ed adeguato livello di istruzione, formazione e competenza ai fini dello svolgimento del progetto in esame.
Parere motivato dell'OPBA	Attestazione della corretta applicazione del Decreto 26/2014 e del rispetto dei principi delle 3R; rilevanza tecnico-scientifica del progetto e valutazione del danno/beneficio.
Sintesi non tecnica del progetto	Titolo, durata e finalità del progetto obiettivi, benefici e danni previsti; applicazione della regola delle 3R.

Tabella 6.1: esempi di documenti necessari per l'autorizzazione di un progetto di ricerca e relativa breve descrizione [49].

Se la documentazione presentata è incompleta o errata, le integrazioni o le eventuali modifiche devono essere presentate entro 30 giorni lavorativi a partire dalla data di ricevimento della richiesta. Il Ministero sottopone poi il progetto alla valutazione dell'Istituto Superiore di Sanità o di altri enti tecnico-scientifici; se il progetto prevede l'utilizzo di primati non umani, cani, gatti o esemplari di specie in via di estinzione, allora esso è presentato al Consiglio Superiore di Sanità. Sia in caso di autorizzazione che di diniego del progetto, il Ministero deve esprimersi entro 40 giorni lavorativi dalla data di ricezione della documentazione, e comunicare l'esito al richiedente in ambo i casi tramite posta elettronica certificata. L'autorizzazione ha durata non superiore a cinque anni e può essere revocata se il progetto non viene realizzato in conformità con quanto concordato [49].

6.3 Dati sulla sperimentazione animale in Italia

Secondo quanto previsto dalla direttiva 2010/63/EU, gli Stati membri devono raccogliere e pubblicare ogni anno le informazioni statistiche sull'uso degli animali, sulla gravità delle procedure e sull'origine e le specie di primati non umani impiegati a scopi di ricerca. In particolare, i dati devono riferirsi all'anno in cui si conclude ciascuna procedura considerata.

In Italia, gli stabilimenti utilizzatori trasmettono entro il 31 marzo di ogni anno i dati statistici riguardanti gli animali utilizzati nell'anno precedente al Ministero della Salute, tramite la banca dati nazionale. I dati attualmente disponibili riguardano gli animali utilizzati dal 2007 al 2018 (Figura 6.1) [49].

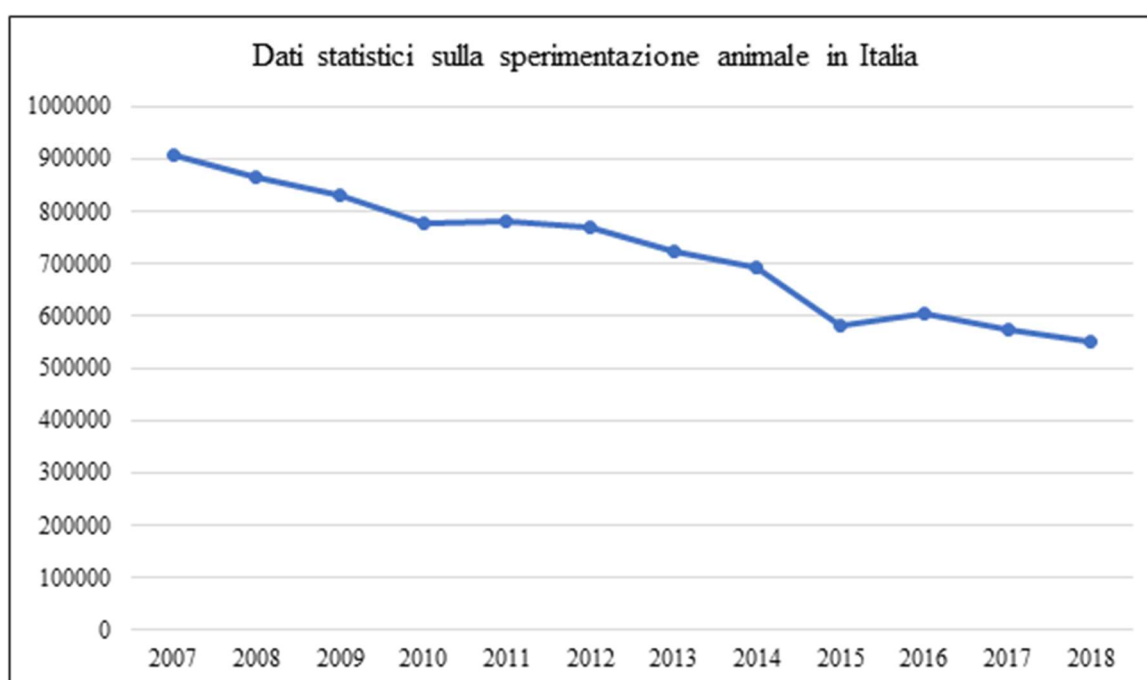


Figura 6.1: dati statistici sulla sperimentazione animale in Italia tra il 2007 e il 2018; il grafico suggerisce come in linea di massima il numero di animali adoperati per la sperimentazione stia effettivamente diminuendo, in accordo con quanto suggerito dai principi di riduzione e sostituzione. Dal 2007 al 2018 i numeri di animali naïve (al primo utilizzo) sono, nello specifico, 908.002 (2007), 864.318 (2008), 830.453 (2009), 777.731 (2010), 781.815 (2011), 768.796 (2012), 723.739 (2013), 691.666 (2014), 581.935 (2015), 607.097 (2016), 575.352 (2017), 553.208 (2018) [49].

Deve essere rendicontato il numero di volte in cui si utilizza l'animale nel corso delle procedure, dal momento che uno stesso animale può essere sfruttato più volte, nonché nuove specie animali utilizzate (ad esempio, gli animali geneticamente modificati). Inoltre, deve essere indicata l'effettiva sofferenza subita dall'animale durante ciascuna procedura, non sommandola a quella eventualmente inflitta negli utilizzi precedenti [49].

Nelle Tabelle 6.2 e 6.3 sono raccolti i dati relativi agli utilizzi totali dei topi a fini sperimentali nell'anno 2018, rispettivamente suddivisi sulla base della finalità delle procedure effettuate e della gravità di queste ultime.

Specie	Ricerca di base	Ricerca traslazionale o applicata	Uso a fini regolatori o produzione	Protezione dell' ambiente	Conservazione delle specie	Istruzione	Indagini medico legali	Mantenimento di colonie di animali geneticamente modificati	Totale utilizzi
Topo	129.702	136.418	67.679	701	0	159	0	828	336.487

Tabella 6.2: esempio per il topo, anno 2018. Nel report annuale viene specificato il numero di utilizzi per ciascuna specie animale, in relazione alla finalità delle procedure effettuate [49].

Specie	Non risveglio	Lieve	Moderata	Grave	Totale
Topo	11.357	130.052	119.630	75.448	336.487

Tabella 6.3: esempio per il topo, anno 2018. Nel report annuale viene indicato il numero di utilizzi rispetto alla specie e al livello di gravità delle procedure effettuate [49].

6.4 Metodi alternativi alla sperimentazione animale

In accordo con quanto specificato nell'articolo 37 del Decreto Legislativo 26/2014, il Ministero della Salute è chiamato a promuovere lo sviluppo e la ricerca di metodi alternativi. Secondo la direttiva 2010/63/EU, questi ultimi possono essere utilizzati dai ricercatori dopo essere stati approvati dalla legislazione europea attraverso un preciso iter di validazione.

L'organismo deputato alla validazione, allo sviluppo e alla diffusione dei metodi alternativi alla sperimentazione animale è il Laboratorio di Riferimento dell'Unione Europea (EURL-ECVAM). Quest'ultimo accoglie le richieste di validazione e valuta la rilevanza a livello regolamentare e l'affidabilità tecnica dei modelli non animali proposti.

Per ottimizzare i tempi di validazione dei metodi alternativi ed assicurare una corretta e significativa applicazione della regola delle 3R, la direttiva 2010/63/EU stabilisce inoltre che in ciascun Paese membro vengano individuati i cosiddetti "Punti di contatto nazionali". In Italia, il punto di contatto designato è il Centro di Riferenza Nazionale per i Metodi Alternativi, Benessere e Cura degli Animali da Laboratorio, con sede presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) [49].

Conclusioni

In via del tutto generale si può affermare che la relazione tra umani ed animali è contraddittoria, e si trova in uno stato che oscilla tra l'affetto ed il perseguimento di interessi personali. Sino ad ora, gli animali hanno rappresentato uno strumento essenziale per l'avanzamento della ricerca medica e scientifica, in qualità di modelli dell'organismo umano. Il conflitto emerge poiché da un lato, per poter applicare i risultati sperimentali e contribuire al miglioramento della salute di umani ed altri animali, essi devono rispondere a specifici requisiti di sicurezza, ma dall'altro si sente il dovere morale di proteggere gli animali da laboratorio. Questo è senza dubbio uno dei motivi per cui la sperimentazione animale è soggetta a stringenti limiti imposti da una legislazione specifica (ad esempio, la direttiva 2010/63/EU), che fa tuttora riferimento a quanto suggerito dalla regola delle 3R [48]. Storicamente, quest'ultima rappresenta un progresso fondamentale nella promozione del benessere degli animali e della "buona scienza", ed è ora accettata a livello internazionale (se pur con qualche differenza a livello della sua implementazione) come principio etico su cui basare qualsiasi esperimento che preveda l'uso di animali viventi [8,42].

Sono passati più di sessant'anni dalla pubblicazione di "The Principles of Humane Experimental Technique", e nonostante i progressi sinora ottenuti, è importante continuare ad educare i ricercatori e ad investire sull'applicazione della regola delle 3R, per far sì che l'uso degli animali nella ricerca venga via via ridotto al minimo, e che il benessere degli esemplari che ancora necessitano di essere utilizzati sia massimizzato [42]. In particolare, l'interesse maggiore dovrebbe essere rivolto alle tecniche di Replacement, nella speranza che in futuro le difficoltà ad oggi presenti, che ora impediscono il progressivo e definitivo abbandono dei modelli animali, possano essere superate [4].

Bibliografia

- [1] Doke SK, Dhawale SC. Alternatives to animal testing: A review. Saudi Pharm J. 2015 Jul; 23(3):223-9.
- [2] Petetta F, Ciccocioppo R. Public perception of laboratory animal testing: Historical, philosophical, and ethical view. Addict Biol. 2021 Nov; 26(6).
- [3] Russell WMS, Burch RL. The Principles of Humane Experimental Technique. 1959.
- [4] <https://www.nc3rs.org.uk/>.
- [5] European Commission, Summary Report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union and Norway in 2019. 2022 Jul.
- [6] Mukherjee P, Roy S, Ghosh D, Nandi SK. Role of animal models in biomedical research: a review. Lab Anim Res. 2022 Jul;38(1):18.
- [7] Andersen ML, Winter LMF. Animal models in biological and biomedical research – experimental and ethical concerns. An Acad Bras Cienc. 2019;91(suppl 1).
- [8] DeGrazia D, Beauchamp TL. Beyond the 3 Rs to a More Comprehensive Framework of Principles for Animal Research Ethics. ILAR J. 2021 Sep;60(3):308-317.
- [9] Prescott MJ, Lidster K. Improving quality of science through better animal welfare: the NC3Rs strategy. Lab Anim (NY). 2017 Mar;46(4):152-156.
- [10] Jerrold Tannenbaum, B. Taylor Bennett, Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose, 2015 Mar; 54(2):120-132.
- [11] Stengelin E, Thiele J, Seiffert S. Multiparametric Material Functionality of Microtissue-Based In Vitro Models as Alternatives to Animal Testing. Adv Sci (Weinh). 2022 Apr;9(10).
- [12] Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. Physiology (Bethesda). 2017 Jul;32(4):266-277.
- [13] Li Z, Hui J, Yang P, Mao H. Microfluidic Organ-on-a-Chip System for Disease Modeling and Drug Development. Biosensors (Basel). 2022 May 27;12(6).
- [14] Madden JC, Enoch SJ, Paini A, Cronin MTD. A Review of *In Silico* Tools as Alternatives to Animal Testing: Principles, Resources and Applications. Altern Lab Anim. 2020 Jul;48(4):146-172.
- [15] Alves VM, Auerbach SS, Kleinstreuer N, Rooney JP, Muratov EN, Rusyn I, Tropsha A, Schmitt C. Curated Data In - Trustworthy *In Silico* Models Out: The Impact of Data

- Quality on the Reliability of Artificial Intelligence Models as Alternatives to Animal Testing. *Altern Lab Anim*. 2021 May;49(3):73-82.
- [16] Yu W, MacKerell AD Jr. Computer-Aided Drug Design Methods. *Methods Mol Biol*. 2017;1520:85-106.
- [17] Guha R. On exploring structure-activity relationships. *Methods Mol Biol*. 2013;993:81-94.
- [18] Muratov EN, Bajorath J, Sheridan RP, Tetko IV, Filimonov D, Poroikov V, Oprea TI, Baskin II, Varnek A, Roitberg A, Isayev O, Curtarolo S, Fourches D, Cohen Y, Aspuru-Guzik A, Winkler DA, Agrafiotis D, Cherkasov A, Tropsha A. QSAR without borders. *Chem Soc Rev*. 2020 Jun 7;49(11):3525-3564.
- [19] Duina AA, Miller ME, Keeney JB. Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*. 2014 May;197(1):33-48.
- [20] <https://norecopa.no/species/fish/zebrafish>.
- [21] Michael F. W. Festing. The Design and Statistical Analysis of Animal Experiments. *ILAR J*. 2002;43(4):191–193.
- [22] Michael F. W. Festing, Douglas G. Altman. Guidelines for the Design and Statistical Analysis of Experiments Using Laboratory Animals. *ILAR J*. 2002;43(4):244–258.
- [23] <https://eda.nc3rs.org.uk/>.
- [24] Festing, Michael. Design and Statistical Methods in Studies Using Animal Models of Development. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*. 2006;47:5-14.
- [25] Banerjee A, Chitnis UB, Jadhav SL, Bhawalkar JS, Chaudhury S. Hypothesis testing, type I and type II errors. *Ind Psychiatry J*. 2009 Jul;18(2):127-131.
- [26] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459346/>.
- [27] Mishra P, Singh U, Pandey CM, Mishra P, Pandey G. Application of student's *t*-test, analysis of variance, and covariance. *Ann Card Anaesth*. 2019 Oct-Dec;22(4):407-411.
- [28] B. R. Howard, Control of Variability. *ILAR J*. 2002;43(4):194–201.
- [29] Spanagel R. Ten Points to Improve Reproducibility and Translation of Animal Research. *Front Behav Neurosci*. 2022 Apr;16.
- [30] Sansbury BE, Nystoriak MA, Uchida S, Wysoczynski M, Moore JB 4th. Rigor Me This: What Are the Basic Criteria for a Rigorous, Transparent, and Reproducible Scientific Study? *Front Cardiovasc Med*. 2022 Jul;9.
- [31] Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Karp NA,

- Laz SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Exp Physiol*. 2020 Sep;105(9):1459-1466.
- [32] <https://arriveguidelines.org/>.
- [33] Musk GC. Refinements to Animal Models for Biomedical Research. *Animals (Basel)*. 2020 Dec 18;10(12).
- [34] National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. Washington (DC): National Academies Press (US); 2009.
- [35] Cohen S, Beths T. Grimace Scores: Tools to Support the Identification of Pain in Mammals Used in Research. *Animals (Basel)*. 2020 Sep;10(10).
- [36] Mota-Rojas D, Olmos-Hernández A, Verduzco-Mendoza A, Hernández E, Martínez-Burnes J, Whittaker AL. The Utility of Grimace Scales for Practical Pain Assessment in Laboratory Animals. *Animals (Basel)*. 2020 Oct;10(10).
- [37] Clutton RE. An Anglocentric History of Anaesthetics and Analgesics in the Refinement of Animal Experiments. *Animals (Basel)*. 2020 Oct;10(10).
- [38] Cicero L, Fazzotta S, Palumbo VD, Cassata G, Lo Monte AI. Anesthesia protocols in laboratory animals used for scientific purposes. *Acta Biomed*. 2018 Oct 8;89(3):337-342.
- [39] Fischer ML, Rodrigues GS, Agüero WP, Zotz R, Simão-Silva DP. Refinement as ethics principle in animal research: Is it necessary to standardize the Environmental enrichment in laboratory animals? *An Acad Bras Cienc*. 2021 Mar 24;93(1).
- [40] Ratuski AS, Weary DM. Environmental Enrichment for Rats and Mice Housed in Laboratories: A Metareview. *Animals (Basel)*. 2022 Feb 9;12(4).
- [41] Foley PL, Kendall LV, Turner PV. Clinical Management of Pain in Rodents. *Comp Med*. 2019 Dec 1;69(6):468-489.
- [42] Hubrecht RC, Carter E. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Animals (Basel)*. 2019 Sep 30;9(10):754.
- [43] Würbel H. More than 3Rs: the importance of scientific validity for harm-benefit analysis of animal research. *Lab Anim (NY)*. 2017 Mar 22;46(4).
- [44] Eggel M, Würbel H. Internal consistency and compatibility of the 3Rs and 3Vs principles for project evaluation of animal research. *Lab Anim*. 2021 Jun;55(3):233-243.
- [45] Bout HJ, Fentener van Vlissingen JM, Karssing ED. Evaluating the ethical acceptability of animal research. *Lab Anim (NY)*. 2014 Nov;43(11):411-414.

- [46] Unione Europea, Direttiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali usati a fini scientifici. Allegato VIII.
- [47] Franco NH, Sandøe P, Olsson IAS. Researchers' attitudes to the 3Rs-An upturned hierarchy? PLoS One. 2018 Aug 15;13(8).
- [48] Maestri, E. The 3Rs Principle in Animal Experimentation: A Legal Review of the State of the Art in Europe and the Case in Italy. BioTech 2021, 10(9).
- [49] <https://www.salute.gov.it/>.
- [50] <https://www.unipd.it/opba>.