

**PETA**

# Plan para modernizar la investigación



La inversión de enormes cantidades de recursos públicos no está resultando en tratamientos eficaces para muchas de las enfermedades que matan e incapacitan a los seres humanos.



**PETA invita a compartir y descargar el contenido de este documento** para uso personal y no comercial. Si desea usar cualquiera de los materiales del documento (textos, imágenes, fotografías, etc.) para cualquier otro propósito, deberá obtener nuestra autorización expresa por escrito antes de hacerlo, comunicándose con [Info@peta.org](mailto:Info@peta.org).

# PLAN PARA MODERNIZAR LA INVESTIGACIÓN

## Resumen ejecutivo

Numerosos estudios y reseñas de carácter científico revelan que los experimentos en animales no conducen a tratamientos efectivos ni a curas para enfermedades humanas, incluidas las principales causas de muerte. Dependiendo de modelos animales está desviando fondos de áreas de investigación más prometedoras, retrasando el desarrollo de medicamentos y tratamientos eficaces y limitando nuestra capacidad de proteger la salud humana y ambiental.

Sin embargo, una gran cantidad de recursos públicos continúa usándose para financiar experimentos en animales. Por ejemplo, los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH, por sus siglas en inglés) –la agencia de financiamiento de investigación biomédica más grande del mundo– usan aproximadamente el 47 % de su presupuesto en la financiación de experimentos en animales. Los NIH y otras agencias financiadoras alrededor del mundo no han adoptado medidas eficaces para abordar los siguientes problemas:

- El 95 % de todos los medicamentos nuevos que resultan seguros y eficaces en experimentos en animales fracasa o causa daño en los ensayos clínicos en humanos.
- Las tasas de fracaso de los nuevos medicamentos desarrollados con el uso de animales en áreas de investigación específicas superan el 95 %. Por ejemplo:

• Enfermedad de Alzheimer.....	99.6 %
• Cáncer .....	96.6 %
• Vacuna contra el VIH/SIDA .....	100.0 %
• Accidente cerebrovascular .....	100.0 %
(1000 fármacos nuevos probados en animales y en 100 ensayos clínicos)	
• Septicemia .....	100.0 %

- El 90 % de la investigación básica no conduce a ningún tratamiento para los humanos dentro de los 20 años siguientes.
- Hasta un 89 % de los experimentos no se puede reproducir, aunque la reproducibilidad es un componente fundamental de la investigación científica.

Los métodos de investigación prometedoros y relevantes para los seres humanos –como los órganos-en-chip, los usos sofisticados de las células madre humanas, la genómica y la proteómica, las imágenes y el modelado por computador– pueden reemplazar a los animales.

Para mejorar los resultados de las investigaciones y proteger la salud humana y ambiental, PETA propone lo siguiente:

- Poner fin al uso de animales en áreas de investigación en las que se ha demostrado que los animales son “modelos” deficientes de los humanos y su uso ha impedido el progreso científico y médico.
- Realizar reseñas científicas de la eficacia del uso de animales para identificar áreas adicionales en las que se dispone de métodos sin animales o en las que el uso de animales no ha logrado proteger la salud humana o ambiental y, por lo tanto, puede ponerse fin.
- Redirigir los fondos previamente destinados a estudios en animales al uso y desarrollo de métodos confiables sin animales.
- Aplicar, tal como se ha hecho en el Reino Unido, un sistema de análisis de daños y beneficios para la investigación en animales que incluya una perspectiva ética y la consideración de los daños permanentes que se infligen a los animales.
- Trabajar con líderes mundiales para armonizar y promover la aceptación internacional de métodos sin animales para cumplir con los requisitos regulatorios en materia de ensayos de toxicidad.
- Educar y capacitar a los investigadores y las agencias reguladoras sobre los beneficios y el uso de los métodos de experimentación sin animales.

# ● ÍNDICE

● <b>Introducción</b>	<b>4</b>
● <b>Limitado valor predictivo de la investigación en animales</b>	<b>4</b>
● Falta de validez	4
● Asignación inapropiada de recursos	5
● <b>Necesidad de un cambio de paradigma</b>	<b>6</b>
● <b>Oportunidades económicas</b>	<b>8</b>
● El alto costo del desarrollo de fármacos	8
● Crecimiento económico y laboral en el sector tecnológico	9
● <b>Oportunidades normativas para la evaluación de la toxicidad</b>	<b>10</b>
● <b>Opinión pública y sintiencia animal</b>	<b>11</b>
● <b>Liderazgo mundial</b>	<b>13</b>
● <b>Plan de acción: recomendaciones para modernizar la investigación biomédica</b>	<b>14</b>
● Poner fin al uso de animales en áreas de investigación en las que se ha demostrado que los animales son “modelos” deficientes de los humanos y su uso ha impedido el progreso científico y médico.	14
● Realizar reseñas científicas de la eficacia del uso de animales para identificar áreas adicionales en las que se dispone de métodos sin animales o en las que el uso de animales no ha logrado proteger la salud humana o ambiental y, por lo tanto, puede ponerse fin.	15
● Redirigir los fondos previamente destinados a estudios en animales al uso y desarrollo de métodos confiables sin animales.	15
● Aplicar, tal como se ha hecho en el Reino Unido, un sistema de análisis de daños y beneficios para la investigación en animales que incluya una perspectiva ética y la consideración de los daños permanentes que se infligen a los animales.	16
● Trabajar con líderes mundiales para armonizar y promover la aceptación internacional de métodos sin animales para cumplir con los requisitos reglamentarios en materia de pruebas de toxicidad.	16
● Educar y capacitar a los investigadores y a las agencias reguladoras sobre los beneficios y el uso de los métodos de experimentación sin animales.	16
● <b>Conclusión</b>	<b>17</b>
● <b>Glosario</b>	<b>18</b>
● <b>Apéndices</b>	<b>19</b>
● <b>Bibliografía</b>	<b>55</b>

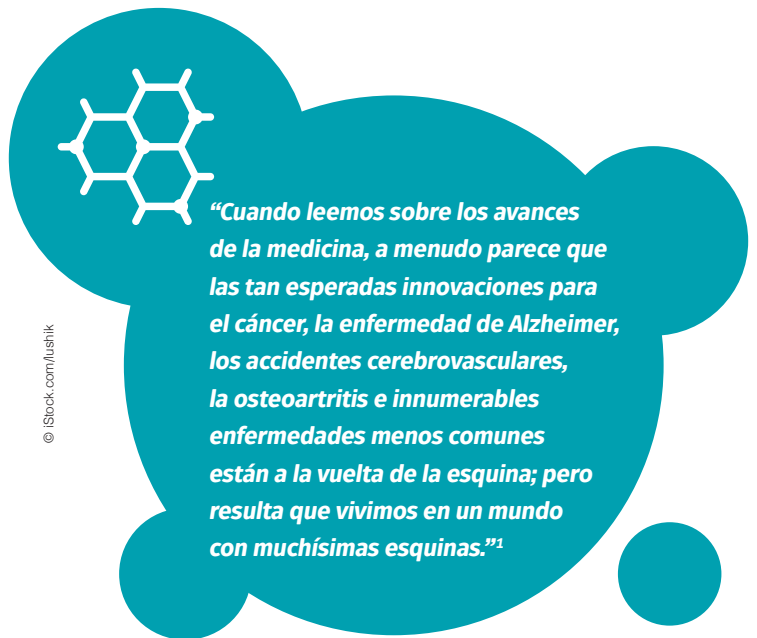


## Introducción

La observación (derecha) realizada por el exitoso periodista científico Richard Harris resuena en cada persona que sufre o conoce a alguien que padece una enfermedad incurable, y por una buena razón: miles de millones en dinero público asignados a la investigación no están logrando generar tratamientos eficaces para muchas de las enfermedades que matan e incapacitan a los seres humanos. Esto sucede, por ejemplo, con los recursos concedidos por la mayor fuente de financiación de investigación biomédica del mundo, los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU. (NIH, por sus siglas en inglés).

La razón de este fracaso parece ser una confianza injustificada en los estudios en animales. Numerosas investigaciones científicas realizadas en las últimas décadas demuestran que los estudios en animales son defectuosos y hacen uso de recursos financieros e intelectuales que podrían invertirse en métodos más confiables y relevantes. Desde un punto de vista crítico, las diferencias biológicas y genéticas intrínsecas entre especies contribuyen de forma significativa a problemas ineludibles al extrapolar los resultados en animales no humanos a los humanos, incluso en los diseños de estudio mejor controlados y ejecutados.

Además de la creciente evidencia de que los resultados de los experimentos en animales no se extrapolan de forma confiable a los humanos, y del aumento del desarrollo y la aplicación de tecnologías que pueden reemplazar el uso de



*“Cuando leemos sobre los avances de la medicina, a menudo parece que las tan esperadas innovaciones para el cáncer, la enfermedad de Alzheimer, los accidentes cerebrovasculares, la osteoartritis e innumerables enfermedades menos comunes están a la vuelta de la esquina; pero resulta que vivimos en un mundo con muchísimas esquinas.”<sup>1</sup>*

animales en los laboratorios, la sociedad ha sido testigo de una creciente preocupación moral por los experimentos en animales. Por ejemplo, una encuesta realizada en agosto de 2018 por el Pew Research Center reveló que la mayoría de los adultos de EE. UU. se opone al uso de animales en la investigación científica.<sup>2</sup>

En este reporte presentamos un plan para reemplazar el uso de animales en la experimentación, identificamos una serie de prioridades estratégicas y compartimos información sobre las áreas en las que existen oportunidades para reemplazar el uso de animales de manera inmediata y en el futuro cercano. Además, incluimos información sobre las áreas en las que se necesita trabajar más en el desarrollo de métodos sin animales, su validación y aplicación.

## Limitado valor predictivo de la investigación en animales

Muchos integrantes de la comunidad científica son conscientes de las fallas de los estudios en animales. De acuerdo con los NIH, los nuevos medicamentos fracasan en “más del 95 %”<sup>3</sup> de los estudios en humanos, a pesar de parecer seguros y eficaces en los experimentos preclínicos realizados en animales. Un análisis de 2014 publicado en *The BMJ* concluyó que los estudios que usan animales no han ampliado los conocimientos en el campo de la salud humana ni han conducido al desarrollo de tratamientos para las enfermedades que afectan a los humanos.<sup>4</sup>

## Falta de validez

Los problemas de validez interna y externa contribuyen al fracaso de los experimentos en animales en la transferencia de la investigación biomédica del laboratorio al paciente.



La validez interna de los experimentos en animales se ve socavada por su diseño deficiente, incluida la falta de aplicación de procesos para evitar sesgos, como el cegamiento, en el que los individuos que realizan los experimentos o analizan los datos no saben si los animales o las muestras pertenecen al grupo de tratamiento o de control.

Tras un metaanálisis de revisiones sistemáticas de experimentos preclínicos en animales en una amplia variedad de enfermedades, científicos de la Universidad de Oxford descubrieron que la falta de medidas para reducir el sesgo en los experimentos en animales probablemente resulta en una sobreestimación de los beneficios del tratamiento estudiado.<sup>5</sup> Los autores concluyeron que “[e]s menos probable que la investigación sesgada en animales proporcione resultados confiables, es menos probable que sirva de fundamento para una investigación que beneficie a los humanos y desperdicia recursos escasos”.<sup>5</sup> También señalaron que “[d]ado que los estudios en humanos a menudo se justifican con base en los resultados de estudios en animales, nuestros resultados sugieren que los estudios indebidamente sesgados en animales no deberían permitirse como parte de la justificación de los ensayos en humanos”.<sup>5</sup>

La deficiente validez interna significa que muchos experimentos en animales no pueden reproducirse, un aspecto fundamental del proceso científico que habla de la validez potencial de un hallazgo. Por lo tanto, no es de extrañar que una investigación de 2015 concluyera que entre el 18 % y el 89 % de toda la investigación preclínica, gran parte de la cual implica ensayos en animales, no puede reproducirse.<sup>6</sup> Según la estimación más conservadora de EE. UU., esto se traduce en un gasto anual de aproximadamente 28 mil millones de dólares en experimentos que son engañosos para la salud humana.<sup>6</sup> Francis Collins, exdirector de los NIH, y Lawrence Tabak, exdirector interino, han admitido que “[l]a investigación preclínica, especialmente el trabajo que usa modelos animales, parece ser el área que actualmente es más susceptible a los problemas de reproducibilidad”.<sup>7</sup>

Sin embargo, las debilidades de los experimentos en animales no pueden superarse simplemente mejorando el diseño de los estudios debido a que la validez externa, o la “medida en que los resultados de la investigación obtenidos en un entorno, población o especie pueden aplicarse de

**Las diferencias inherentes entre especies hacen que los animales no humanos no puedan ser modelos equivalentes para comprender los efectos biológicos de los fármacos y las sustancias químicas en los humanos.**

forma confiable a otros entornos, poblaciones y especies”,<sup>8</sup> nunca se podrá alcanzar. Las diferencias inherentes entre especies hacen que los animales no humanos no puedan ser modelos equivalentes para comprender los efectos biológicos de los fármacos y las sustancias químicas en los humanos. Como señalan R. J. Wall y M. Shani, incluso los “resultados extrapolados de estudios con decenas de millones de animales no logran predecir con precisión las respuestas humanas”.<sup>9</sup>

Por lo tanto, los experimentos en animales carecen de validez interna y externa. En otras palabras, suelen ser ejecutados deficientemente, pero, aunque se mejoraran los métodos experimentales, los resultados no podrían extrapolarse a los humanos.

En una reseña publicada en el *Journal of Translational Medicine*, en 2018, Pandora Pound y Merel Ritskes-Hoitinga analizan las diferencias entre especies como un problema insuperable de validez externa para los modelos animales preclínicos.<sup>8</sup> Los intentos de controlar o corregir las diferencias entre especies dan lugar a lo que las autoras denominan el “círculo del extrapolador”. Ellas señalan que “si queremos determinar si un mecanismo en animales es suficientemente similar al mecanismo en humanos para justificar la extrapolación, debemos saber cómo funciona el mecanismo pertinente en humanos. Pero si ya conocemos el mecanismo en humanos, es probable que el estudio inicial en animales haya sido redundante”.<sup>8</sup>

Pound y Ritskes-Hoitinga también describen la preocupante tendencia de quienes se dedican a experimentar en animales a minimizar el problema de las diferencias entre especies y los efectos sobre la validez externa, el cual varios investigadores reconocen.<sup>10,11</sup> Las autoras agregan que no es de extrañar que se reste importancia al problema de las diferencias entre especies ya que, de lo contrario, los experimentadores se verían obligados a enfrentarse a la “posibilidad de que el paradigma de la investigación preclínica en animales ya no tenga mucho que ofrecer”.<sup>8</sup> Existe un creciente consenso científico en que se puede ganar mucho más con métodos de investigación sin animales, que son más adecuados para resolver preguntas de investigación biomédica humana y de evaluación reglamentaria. Como destacó un informe de la industria británica, ha llegado el momento de humanizar el descubrimiento de fármacos y la toxicología.<sup>12</sup>

Las dificultades para aplicar a una especie datos derivados de otra se ven agravadas por el confinamiento y las condiciones antinaturales de la vida en el laboratorio, que limitan la capacidad de los animales de exhibir comportamientos naturales.<sup>13,14</sup> Esta privación genera estrés y altera su fisiología y neurobiología, lo cual resulta en diversas psicopatologías.<sup>15-20</sup>

## Falta de éxito clínico



© iStock.com/mr.suphachai.praserdumrongchai

El fracaso de los estudios científicos básicos y aplicados en animales es quizás más evidente en la cruda letanía de tratamientos aparentemente prometedores que no han funcionado en humanos. Por ejemplo, los experimentos de accidentes cerebrovasculares en animales han sido un rotundo fracaso. El Instituto de Investigación sobre Accidentes Cerebrovasculares y Demencia de Múnich ha descrito las deficiencias:

Se han probado más de 1000 compuestos neuroprotectores en modelos de roedores con el objetivo de minimizar las consecuencias del accidente cerebrovascular... En efecto, muchos fármacos redujeron el daño cerebral (en la mayoría de los casos medido como disminución del volumen del infarto) en modelos experimentales de accidente cerebrovascular en roedores. De estos candidatos, se probaron aproximadamente 50 agentes neuroprotectores en más de 100 ensayos clínicos de accidente cerebrovascular, pero ninguno ha mejorado los resultados en pacientes con accidentes cerebrovasculares.<sup>69</sup>

Los fármacos oncológicos, que se someten a pruebas exhaustivas en animales, solo tienen una tasa de éxito del 3.4 %.<sup>70</sup> Esto mismo sucede en muchas enfermedades humanas. Existe una abundante literatura científica que documenta el fracaso de diversos modelos animales de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, en la que la tasa de fracaso clínico de los nuevos fármacos es del 99.6 %.<sup>71</sup> (Los apéndices contienen información detallada por grupos de enfermedades.)

Es importante destacar que el hecho de que la fisiología y la neurobiología de los animales en los laboratorios estén alteradas significa que ni siquiera serán buenos “modelos” para sus homólogos en la naturaleza. Un ratón en un laboratorio no responderá a un fármaco de la misma manera que lo haría un ratón en el campo. Entonces, cabe preguntarse ¿cómo puede este ratón biológicamente distinto representar de manera confiable la biología de los seres humanos?


### Asignación equivocada de recursos

A pesar de la creciente evidencia de que los experimentos en animales son un despilfarro y pueden impedir los avances médicos, aproximadamente el 47 % de todos los fondos de investigación de los NIH se destina a experimentos en animales.<sup>21</sup> Los fondos públicos disponibles para la

investigación biomédica son un recurso finito. Durante el ejercicio fiscal 2020, solo el 20.6 % de las solicitudes presentadas a los NIH recibió financiación.<sup>22</sup> Cada decisión de aprobar una solicitud implica que otros proyectos no sean financiados, lo que resulta en un gran costo de oportunidad para la investigación relevante para los seres humanos que tiene el potencial de ayudar a los pacientes. Esto mismo podría estar sucediendo en las agencias financiadoras de otros países.

Un artículo sobre este problema publicado en 2014 en el *BMJ* señala que “si la investigación en animales sigue siendo incapaz de predecir razonablemente lo que puede esperarse en los seres humanos, que el público siga respaldando y financiando la investigación preclínica en animales parece equivocado”.<sup>4</sup>





**En el sistema actual, sacar un nuevo medicamento al mercado puede costar 2000 millones de dólares o más y puede tardar 14 años en promedio.<sup>3</sup>**

La financiación de la investigación biomédica se distribuye en dos categorías: investigación básica e investigación aplicada. Los NIH definen la investigación básica como aquella que “respalda una amplia comprensión del comportamiento y la biología de los seres humanos”, mientras que la investigación aplicada es un “estudio sistemático para conocer o comprender” con el fin de satisfacer una necesidad específica.<sup>23</sup> Gran parte de la investigación básica implica estudios en animales.

Los NIH consideran que la investigación básica en animales es importante porque su objetivo es producir conocimientos para comprender mejor las causas y los factores determinantes de las enfermedades. En otras palabras, los resultados de la investigación básica deben señalar el camino hacia la investigación aplicada que,

a su vez, debe beneficiar a los humanos. Sin embargo, la evidencia demuestra lo contrario. Para evaluar si las promesas de la investigación biomédica básica se cumplían o no, John Ioannidis, profesor de medicina, investigación y política sanitaria de la Universidad de Stanford, y sus colegas identificaron 101 artículos publicados en las revistas médicas más prestigiosas en los que los autores afirmaban explícitamente que su investigación conduciría a una nueva aplicación con potencial real para un avance clínico. La mayoría de los artículos analizados (63 %) describía experimentos en animales. Su investigación de la aplicación de la ciencia básica a los desarrollos clínicos encontró que menos del 10 % de estos descubrimientos de la ciencia básica, autoproclamados como muy prometedores, se incorporó al uso clínico rutinario dentro de los siguientes 20 años.<sup>24</sup>

Sin embargo, la Oficina de Presupuesto de los NIH estima que esta agencia consistentemente gasta más de la mitad de sus fondos en investigación básica cada año,<sup>23</sup> la mayor parte de la cual involucra animales.

## Necesidad de un cambio de paradigma

Si nuestros limitados fondos públicos se usaran de forma responsable, estos deberían financiar investigaciones confiables y métodos que conduzcan al tratamiento efectivo de las enfermedades y a la protección de la salud humana y el ambiente. Pero la evidencia de que la investigación básica y aplicada en animales está impidiendo el desarrollo de tratamientos y curas para las dolencias humanas no ha motivado una suficiente reconsideración de las prioridades de investigación y financiación por parte de los NIH y otras agencias que proporcionan recursos para la investigación. Este cambio de paradigma es crucial tanto dentro como fuera de EE. UU.

En apoyo del uso de un enfoque basado en la evidencia para acelerar el acceso a medicamentos útiles para los pacientes que los necesitan, 15 investigadores de la Universidad de Vanderbilt publicaron un artículo en 2017 pidiendo la eliminación del uso de animales en experimentos para los que hay pruebas claras de que los animales no son útiles o no predicen las enfermedades humanas:

La literatura está repleta de ejemplos de contradicciones y discordancias entre los efectos en animales y en humanos, incluidos muchos casos en los que resultados prometedores en animales no se han traducido en una eficacia clínicamente significativa en humanos. Esto es especialmente cierto en algunas áreas terapéuticas como las enfermedades neurodegenerativas, psiquiátricas y del sistema nervioso central, así como en la septicemia y las enfermedades inflamatorias.

Estas complejidades inherentes a la investigación traslacional brindan una importante oportunidad para explorar enfoques novedosos que produzcan con éxito y eficacia resultados lo más próximos posible al beneficio humano final. Con el respaldo de varios ejemplos ilustrativos encontrados en nuestro programa de reutilización de fármacos, proponemos aquí un enfoque para evaluar cuándo es apropiado llevar a cabo el “último experimento primero”; es decir, avanzar directamente a las investigaciones en humanos cuando es probable que el trabajo

en animales no proporcione datos apropiados para su translación a aplicaciones humanas de interés. Esto representa un obstáculo significativo –y creemos que evitable– a la introducción de medicamentos.<sup>25</sup>

El cambio en el consenso científico sobre el uso de animales en experimentación puede observarse en varios ámbitos, como en las publicaciones que documentan el limitado valor predictivo de los experimentos en animales,<sup>4</sup> en la mayor concientización sobre la cognición y la sintiencia de los animales,<sup>2</sup> y en la rápida erosión del apoyo público a los estudios en animales.<sup>2</sup>

Por ejemplo, el Dr. Hakan Şentürk, antiguo director de *The Turkish Journal of Gastroenterology* –la revista de la Sociedad Turca de Gastroenterología– prohibió oficialmente en sus páginas la publicación de estudios que involucran experimentos en animales. Şentürk señaló que la nueva política representaba “la creciente preocupación por la falta de aplicabilidad de la investigación en animales a los seres humanos”<sup>27</sup> Además, afirmó que “[c]uando reconocemos que la dependencia de modelos animales inherentemente defectuosos de enfermedades humanas es en gran parte responsable del fracaso clínico... no tiene sentido seguir promoviendo esta práctica. En su lugar, deberían desarrollarse y usarse de forma más contundente enfoques que sean relevantes para los humanos”.<sup>27</sup> Lamentablemente, la nueva dirección editorial no parece haber mantenido esta política.

El abandono de los experimentos en animales permitirá un crecimiento sustancial de los sectores científicos y tecnológicos y un retorno más rápido de la inversión en investigación y desarrollo de fármacos,<sup>28</sup> como se ha visto tras la prohibición de las pruebas cosméticas en animales en la Unión Europea, a pesar de la resistencia inicial de algunos sectores de la industria. La evolución de las prioridades de financiación de la investigación hacia métodos relevantes para los seres humanos, que recapitulan la fisiología y la biología humanas sin usar animales ni sus tejidos, permitirá que los tratamientos lleguen a los pacientes que los necesitan de forma más segura y probablemente en menos tiempo.<sup>29,30</sup>

## Oportunidades de progreso económico

### El alto costo del desarrollo de fármacos

Al exigir que se abandonen los experimentos en animales y se opte por métodos científicos avanzados, los países tienen la oportunidad de impulsar la investigación biomédica, aumentar rápidamente el crecimiento del empleo en ciencia

## Los peligros de los resultados engañosos

© iStock.com/Martin Barraud



Muchos fármacos novedosos no solo fracasan, lo que representa una enorme pérdida de tiempo y dinero, sino que perjudican a los seres humanos. En 2016, una empresa portuguesa desarrolló un fármaco destinado a ayudar con el estado de ánimo, la ansiedad y los problemas motores relacionados con enfermedades neurodegenerativas. El fármaco se administró por vía oral a voluntarios en el marco de un ensayo clínico de fase I realizado por una empresa francesa de evaluación de fármacos. Seis hombres, de entre 28 y 49 años, sufrieron reacciones tan adversas que tuvieron que ser hospitalizados. Un participante tuvo muerte cerebral y falleció poco después. Un reporte sobre este incidente revela que “[n]o se observaron efectos nocivos en los animales, a pesar de las dosis 400 veces más potentes que las administradas a los voluntarios humanos”.<sup>72</sup>

y tecnología y reducir los costos de atención médica. De acuerdo con la reseña de Meigs y sus colegas *Animal Testing and Its Alternatives—the Most Important Omics Is Economics* [La experimentación en animales y sus alternativas: la ómica más importante es la economía], “se ha desarrollado una economía de enfoques alternativos que está superando a la experimentación tradicional en animales”.<sup>28</sup>

En el sistema actual, sacar un nuevo fármaco al mercado puede costar 2000 millones de dólares o más y puede tardar 14 años en promedio.<sup>3</sup> Los elevados costos de investigación y desarrollo (I+D) pueden trasladarse a los pacientes a través de precios cada vez mayores de los fármacos que requieren prescripción.<sup>31</sup> Durante una conferencia en 2017, el entonces director de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en

En su artículo de 2010 *TGN1412: From Discovery to Disaster* [TGN1412: del descubrimiento al desastre], Husain Attarwala, de la Universidad Northeastern, relata el trágico desenlace del ensayo clínico de Theralizumab, un fármaco inmunomodulador, en 2006. Attarwala señala que “[t]ras [la] primera infusión de una dosis 500 veces menor que la considerada segura en los estudios en animales, los seis voluntarios humanos se enfrentaron a cuadros potencialmente mortales que incluyeron insuficiencia multiorgánica, por lo que fueron trasladados a [la] unidad de cuidados intensivos”.<sup>73</sup> Cinco de los seis participantes estuvieron hospitalizados durante tres meses tras la dosis inicial, mientras que el otro quedó en coma. Incluso seis meses después, los participantes sufrían dolores de cabeza y pérdida de memoria. A uno de ellos tuvieron que amputarle los dedos de los pies y las manos a consecuencia de la gangrena.<sup>74</sup> Tras analizar los resultados de este y otros ensayos clínicos, Attarwala concluyó que “[l]os fármacos que muestran seguridad y eficacia en modelos animales preclínicos pueden mostrar propiedades farmacológicas muy diferentes cuando se administran a los humanos”.<sup>75</sup>

Lo contrario también es cierto: los tratamientos que no han funcionado bien en animales han permanecido sin uso en las estanterías mientras los pacientes se han quedado sin un tratamiento que les salve la vida. Por ejemplo, la penicilina se probó por primera vez en conejos en 1929, pero al no tener efecto aparente en esta especie, se ignoró durante más de una década, lo que costó innumerables vidas humanas. Los primeros ensayos clínicos en humanos no se realizaron hasta la década de 1940.<sup>75,76</sup> Los investigadores comentaron posteriormente la suerte de que la penicilina no se probara primero en cobayos, para quienes este antibiótico es mortal. Es posible que la penicilina nunca se hubiera probado en humanos si los experimentadores hubieran visto este resultado.<sup>77,78</sup>

inglés), Scott Gottlieb, lamentó el elevado costo del desarrollo de fármacos y sus efectos sobre los pacientes y la economía estadounidense. Habló de la importancia de reducir los costos de I+D “para asegurarnos de proporcionar una vía eficiente para que la ciencia de vanguardia se traduzca en tratamientos prácticos que van a beneficiar a los pacientes” y “porque el creciente costo del desarrollo de fármacos es insostenible”.<sup>32</sup> Gottlieb afirmó que “[a] menos que encontremos la forma de modernizar el enfoque de nuestro trabajo y hacer un uso más eficiente de nuestros recursos, tendremos menos fármacos y los costos serán más elevados”, y añadió que “[e]n un momento en el que las personas están preocupadas por el aumento de los precios de los fármacos y el impacto en el acceso de los pacientes, también tenemos que pensar en los factores que contribuyen al elevado costo de producción de nuevos medicamentos”.<sup>32</sup>



## Revisión de fármacos que han fracasado

© iStock.com/NoSystem Images



Emulate y Janssen Pharmaceuticals han demostrado cómo un vaso sanguíneo en un chip fue capaz de predecir una trombosis humana causada por un tratamiento con anticuerpos. Anteriormente se había determinado que este tratamiento era seguro tras los ensayos preclínicos en animales, pero los ensayos

clínicos tuvieron que interrumpirse después de que las personas que recibieron el fármaco sufrieron coágulos que no se predijeron en los experimentos en animales.<sup>79</sup>

En un estudio publicado en 2021, investigadores de la Universidad Johns Hopkins, el Instituto Noruego de Salud Pública y la organización británica sin ánimo de lucro Safer Medicines Trust, cuyo foco es la seguridad de los pacientes, usaron métodos *in vitro* basados en la biología humana para reevaluar la Troglitazona, un fármaco para la diabetes.<sup>80</sup> La Troglitazona había sido retirada del mercado debido a su grave y letal toxicidad hepática que causó la muerte de al menos 63 personas. Las pruebas *in vitro* más recientes predijeron este peligro potencial, mientras que los estudios preclínicos en animales no lo hicieron. Uno de los autores del estudio señaló que “[l]os pacientes necesitan que se produzcan medicamentos más seguros y accesibles durante su vida. La industria farmacéutica está en crisis, sin productos en fase de desarrollo y con costos por las nubes. Centrarse en la biología humana es la vía para producir más rápido medicamentos más seguros y con menores costos totales de desarrollo”.<sup>81</sup>

Uno de los factores del elevado costo de la I+D es el importante riesgo asociado al desarrollo de un producto que no llegue a convertirse en un fármaco comercializable por no tener éxito en los ensayos clínicos en humanos. El 95 % de los fármacos que resultan seguros y eficaces en animales fracasa en los seres humanos<sup>3</sup> porque no son seguros o no son efectivos.<sup>29</sup> Por el contrario, fármacos que podrían ser efectivos en humanos pueden ser rechazados y no avanzar a ensayos clínicos porque no fueron efectivos o seguros en animales. Las científicas de la Universidad de Columbia Kacey Ronaldson-Bouchard y Gordana Vunjak-Novakovic también hacen la siguiente observación al abogar por el uso de tejidos humanos *in vitro* durante el desarrollo de fármacos:

Igual de perjudicial es la eliminación cautelosa de nuevos fármacos potencialmente curativos porque sus efectos adversos en animales no son necesariamente aplicables a los humanos. Estos falsos positivos y falsos negativos crean una enorme carga financiera, lo que da lugar a una toma de decisiones en la que la rentabilidad potencial de un fármaco se contrapone a los riesgos potenciales, en lugar de basarse en el potencial del fármaco para mejorar los efectos de la enfermedad.<sup>33</sup>

Tal Burt y sus coautores señalaron lo siguiente en la revista oficial de la Sociedad Estadounidense de Farmacología Clínica y Terapéutica:

Los crecientes costos del desarrollo de fármacos y las preocupaciones éticas sobre los riesgos de exponer a seres humanos y animales a nuevos agentes químicos favorecen los ensayos clínicos de exposición limitada, como las microdosis y otros ensayos de fase 0. Cada vez son más las investigaciones que respaldan la validez de la extrapolación de los enfoques de exposición limitada al fármaco de fase 0 a la exposición terapéutica completa. Un número cada vez mayor de aplicaciones y opciones de diseño demuestran la versatilidad y la flexibilidad que estos enfoques ofrecen a los desarrolladores de fármacos.<sup>34</sup>

Con el uso de tecnología relevante para los humanos en lugar de experimentos caros, lentos e imprecisos en animales, el costo del descubrimiento de fármacos puede disminuir drásticamente. Al reducir tanto los costos como el tiempo que tardan en llegar al mercado los tratamientos eficaces, los fabricantes podrán trasladar este ahorro a los pacientes.

### Crecimiento económico y laboral en el sector tecnológico

El mercado de la tecnología *in vitro* basada en células humanas para la investigación biomédica y las pruebas reglamentarias está creciendo rápidamente. Por ejemplo, la empresa Emulate Inc., con sede en Boston (EE. UU.), recaudó 36 millones de

dólares para ampliar su tecnología de órganos-en-chip humanos.<sup>35</sup> AstraZeneca, Roche, Merck, Johnson & Johnson y otras empresas usan esta tecnología actualmente para predecir con mayor exactitud la seguridad y eficacia de fármacos potenciales.<sup>35</sup>

Una importante empresa de estudios de mercado ha estimado que “[e]l mercado mundial de pruebas basadas en células debería alcanzar 47 300 millones [de dólares] en 2027 partiendo de los 29 200 millones [de dólares que alcanzó] en 2022”,<sup>36</sup> y el “mercado mundial de células madre pluripotentes inducidas crecerá de 2800 millones [de dólares] en 2021 a 4400 millones [de dólares] en 2026”.<sup>37</sup> La empresa también prevé que el mercado mundial de medicina regenerativa alcanzará un volumen de 89 500 millones de dólares en 2025.<sup>38</sup> Las nuevas tecnologías agilizarán el desarrollo de fármacos y harán que el proceso sea más seguro, menos costoso y más efectivo. El desarrollo de estas técnicas permite crear equipos de investigación interdisciplinarios que serán fundamentales para producir modelos personalizados de enfermedades para la medicina de precisión o desarrollar sistemas efectivos y precisos para la evaluación de riesgos toxicológicos.

## Oportunidades para la toxicología reglamentaria

En el último cuarto de siglo se ha producido una revolución en la forma de analizar las sustancias químicas. Los ensayos sin animales están sustituyendo rápidamente a las pruebas en animales. Esto es el resultado de una mejor comprensión de los procesos biológicos humanos y de la aparición de nuevas tecnologías que han permitido el desarrollo de métodos de prueba que pueden observar directamente los mecanismos celulares en lugar de los resultados burdos e inescrutables que se obtienen usando animales. También es el resultado

de la presión pública y, como se explica más adelante, del descontento de la comunidad científica con los resultados de las pruebas en animales. La información celular y genética sobre la toxicidad potencial de una sustancia química, como el potencial de unión a receptores o la activación de genes o vías, se obtiene más fácilmente con ensayos sin animales (usando células humanas *in vitro*) que con pruebas en animales.<sup>39</sup>

Los organismos reguladores y la comunidad regulada reconocen cada vez más que las pruebas en animales no protegen adecuadamente la salud humana. Esto afecta no solo la seguridad de los fármacos sino también las pruebas de las sustancias químicas a las que los humanos pueden estar expuestos en su entorno. Las Academias Nacionales de Ciencias, Ingeniería y Medicina de EE. UU. (NASEM, por sus siglas en inglés) coinciden en que “el enfoque actual requiere mucho tiempo y es costoso, lo que da lugar a un sistema sobrecargado que deja muchas sustancias químicas sin probar, a pesar de la posible exposición humana a ellas”.<sup>40</sup>

En 2007, NASEM publicó un informe contundente titulado *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy* [Pruebas de toxicidad en el siglo XXI: una visión y una estrategia]. El informe afirma que los avances en toxicogenómica, bioinformática, biología de sistemas, epigenética y toxicología computacional podrían transformar las pruebas de toxicidad, que pasarían de ser un sistema totalmente basado en pruebas en animales a uno basado principalmente en métodos *in vitro* que evalúen los cambios en los procesos biológicos usando células y líneas o componentes celulares, preferiblemente de origen humano. Los cambios propuestos generarán mejores datos sobre los riesgos potenciales a los que se enfrentan los humanos a causa de sustancias ambientales como los pesticidas, lo cual representará una base científica más sólida que puede mejorar las decisiones normativas para mitigar esos riesgos, mientras que se reduce el tiempo, el dinero y el número de animales necesarios para las pruebas. El comunicado de prensa de NASEM resume este enfoque:

El informe recomienda un enfoque que aproveche la rápida evolución de los conocimientos científicos sobre cómo los genes, las proteínas y las pequeñas moléculas interactúan para mantener la función normal de las células y cómo algunas de estas interacciones pueden verse alteradas de manera que podrían causar problemas de salud. Específicamente, el nuevo enfoque de las pruebas se centraría en las vías de toxicidad, es decir, en las vías celulares que, cuando se alteran lo suficiente, se espera que produzcan efectos adversos para la salud.<sup>41</sup>

**“La ciencia está demostrando cómo otros animales son como nosotros en aspectos moralmente relevantes, pero diferentes a nosotros en aspectos médicamente relevantes”.**<sup>48</sup>



© iStock.com/lushik

Pueden diseñarse pruebas confiables de toxicidad *in vitro* para evaluar los efectos de las sustancias químicas sobre eventos específicos de estas vías de toxicidad y, por lo tanto, ayudar a los investigadores a comprender cómo y a qué nivel de exposición puede ocurrir un resultado adverso.

Para seguir el rápido ritmo de la evolución del campo de los ensayos toxicológicos sin animales es esencial que se dediquen fondos de investigación a oportunidades de capacitación para instancias reguladoras e investigadores. También es fundamental mantener bases de datos sobre la cantidad de animales usados en cada tipo de experimento de manera que se pueda priorizar el trabajo para reemplazar las pruebas en animales y monitorear los avances en este sentido.

Al eliminar el uso de ensayos en animales con fines reglamentarios cuando existen sustitutos y al promover la aceptación y optimización de los métodos actualmente en desarrollo, los países y sus entes de control tienen la oportunidad de proteger mejor la salud humana y el ambiente. En los anexos de este informe se detallan las oportunidades para eliminar el uso de animales en pruebas reglamentarias de forma inmediata o en los próximos años. Entre otros, se incluyen ensayos de irritación ocular y cutánea, sensibilización cutánea, efectos sistémicos agudos, genotoxicidad, pirogenicidad, alteraciones endocrinas y carcinogenicidad, así como pruebas de seguridad y eficacia de vacunas y productos biológicos.

© iStock.com/f101cats



**Las agencias financiadoras deben invertir en métodos innovadores para la investigación biomédica y las pruebas reglamentarias.**

© iStock.com/lushik

## Opinión pública y sintiencia animal

La oposición pública al uso de animales en experimentos ha aumentado constantemente, desde el 8 % en 1948<sup>42</sup> al 52 % en 2018.<sup>2</sup> Como señalan Ormandy y Schuppli, el público aprueba menos los estudios en animales cuando los experimentos



Decir que la pandemia de COVID-19 ha cambiado la vida tal como la conocemos es quedarse corto. Sin embargo, la pandemia podría haber contribuido al comienzo de una era completamente nueva de investigación biomédica y desarrollo de vacunas. Con el fin de acelerar el desarrollo de las vacunas para el COVID-19, tanto la FDA como los NIH autorizaron ensayos clínicos de vacunas en humanos sin exigir primero pruebas exhaustivas en animales. En su lugar, se permitió que ambos procedieran a la vez.<sup>82</sup> A partir del éxito de las vacunas y con el apoyo de PETA y otras organizaciones, el Congreso de los Estados Unidos aprobó en diciembre de 2022 la Ley de Modernización de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA Modernization Act 2.0), la cual reconoció la capacidad de los métodos sin animales en el desarrollo de nuevos medicamentos.

Aunque el tiempo fue un factor evidente en esta decisión, es importante señalar que muchas otras especies no responden a la infección por SARS-CoV-2 de la misma forma que los humanos. Cuando se le preguntó por los resultados experimentales aparentemente prometedores en macacos

son invasivos, se consideran menos beneficiosos o necesarios para la salud humana –como en el caso de las pruebas de cosméticos– y cuando existen métodos sin animales.<sup>43</sup> Si el público fuera plenamente consciente de la enorme evidencia que indica que los estudios en animales pueden estar obstaculizando el desarrollo de tratamientos eficaces, la oposición probablemente aumentaría de forma sustancial.

La minoría del público que sigue apoyando los experimentos en animales suele basar su apoyo en la creencia errónea de que las instancias de supervisión solo permiten los

*Rhesus*, el Dr. Malcolm Martin, virólogo de los NIH, “advirtió que los monos son diferentes de los humanos en aspectos importantes”. El entrevistador señaló que “[l]os monos no vacunados en [el experimento de la vacuna] no presentaron ninguno de los síntomas graves que algunas personas sufren tras una infección por coronavirus” y citó a Martin, quien afirmó que “[p]arece que estuvieran resfriados”.<sup>83</sup> Los ratones –quienes deben ser modificados genéticamente para que sean susceptibles a la enfermedad– muestran también solo síntomas leves. El Dr. Stanley Perlman, coronavirólogo de la Universidad de Iowa, señala que infectar ratones con el nuevo coronavirus “realmente no dice mucho sobre cómo el virus causa la enfermedad”.<sup>84</sup>

Además de lastimar y matar animales para la investigación de vacunas y enfermedades causadas por COVID-19, los cierres de universidades y otras empresas causados por la pandemia condujeron al asesinato masivo de innumerables animales quienes habían sido seleccionados para ser usados en otros experimentos. La Universidad Johns Hopkins, la Universidad de Stanford, la Universidad de California-Berkeley, la Universidad de Washington y la Universidad de Michigan fueron algunas de las instituciones que pidieron al personal que practicara la eutanasia a “animales superfluos” en los laboratorios.<sup>85</sup>

Por otra parte, muchos científicos están usando métodos innovadores sin animales para estudiar el COVID-19 y el coronavirus que lo causa, incluidos organoides pulmonares e intestinales humanos, modelos de tejido respiratorio humano reconstruidos tridimensionalmente, muestras de tejido bucal humano de voluntarios sanos, simulación avanzada por computador y supercomputadores, análisis genéticos humanos, estudios de exposición humana, anticuerpos derivados de humanos y órganos-en-chip humanos que representan los pulmones, la boca, los ojos, la nariz y los intestinos de los humanos. Una lista actualizada ejemplos puede encontrarse aquí: <https://www.peta.org/blog/coronavirus-covid-19-vaccine-non-animal-tests/>.

experimentos si son esenciales para desarrollar tratamientos para enfermedades humanas y cuando el daño causado a los animales es compensado por los beneficios para los seres humanos. Aunque las instancias de supervisión encargadas de aprobar los protocolos experimentales afirman que cumplen las políticas de financiación del gobierno que exigen analizar los daños y beneficios,<sup>44,45</sup> un análisis retrospectivo realizado por Pandora Pound y Christine J. Nicol concluyó que “[l]os sistemas reglamentarios vigentes... no lograron salvaguardar a los animales del sufrimiento severo ni garantizar que solo se realizaran investigaciones beneficiosas y científicamente





rigurosas”.<sup>46</sup> Pound y Nicol compararon el daño infligido a los animales en estudios preclínicos de seis intervenciones terapéuticas con los beneficios que los estudios ofrecían a los humanos y concluyeron que menos del 7 % de los estudios debería haber sido autorizado y que todos los estudios eran de mala calidad.

El reconocimiento de la capacidad de sentir de los animales también ha influido en la creciente oposición del público a su uso en experimentos. Esto es especialmente cierto en el caso de las especies con las que los humanos comparten su hogar (por ejemplo, perros y gatos) y aquellas que se perciben como poseedoras de capacidades cognitivas superiores (por ejemplo, los primates no humanos). Sin embargo, también ha aumentado la preocupación pública por otras especies, como las ratas.<sup>47</sup>

En 2012, un destacado grupo internacional de neurocientíficos publicó la *Declaración de Cambridge sobre la Conciencia*, en la que se afirma de manera categórica que “los humanos no son los únicos que poseen los sustratos neurológicos que generan la conciencia” y que, al igual que los humanos, “los animales no humanos tienen... la capacidad de mostrar comportamientos intencionales”.<sup>26</sup> La *Declaración de Cambridge sobre la Conciencia* ilustra que el reconocimiento de la sintiencia animal también está creciendo dentro de

la comunidad científica. Las estadísticas dejan claro que los animales no son sustitutos humanos apropiados en la investigación biomédica, pero cuando se trata de su capacidad de sufrimiento, ¿cuánto tienen que parecerse a los humanos para que se considere obligatoria una revisión crítica de la investigación en animales? La neuróloga y especialista en salud pública Aysha Akhtar afirma que “[l]a ciencia está demostrando que otros animales son como nosotros en aspectos moralmente relevantes, pero diferentes a nosotros en aspectos médicamente relevantes”.<sup>48</sup>

Más de 150 académicos, intelectuales y escritores han respaldado también un informe del Oxford Centre for Animal Ethics [Centro Oxford para la Ética Animal] que condena los experimentos en animales por ser indefendibles tanto moral como científicamente. Los autores del informe señalan que “[e]l abuso deliberado y rutinario de animales inocentes y sintientes que implica daño, dolor, sufrimiento, confinamiento estresante, manipulación, comercio y muerte debería ser impensable. Sin embargo, la experimentación en animales es precisamente eso: la ‘normalización de lo impensable’”.<sup>49</sup> El reporte concluye que experimentar en animales contradice lo que ahora sabemos sobre la capacidad de los animales para experimentar no solo dolor, sino también conmoción, miedo, aprensión, trauma, ansiedad, estrés, angustia y terror.

## Liderazgo mundial

Existe un movimiento internacional en contra del uso de animales en experimentos, lo que refleja el creciente consenso en la comunidad científica de que el uso de animales en la investigación biomédica básica o para requisitos de evaluación reglamentaria no es ni ético ni eficaz. Australia, la Unión Europea, Japón, Nueva Zelanda y el Reino Unido han prohibido o limitado el uso de grandes simios (chimpancés, gorilas y orangutanes) en experimentación, y Estados Unidos ya no otorga fondos federales para experimentos en chimpancés.<sup>50</sup> En muchas partes del mundo, incluyendo países latinoamericanos, las pruebas de cosméticos en animales ya son ilegales. Además, India, Israel y el Reino Unido han puesto fin a las pruebas de productos para el hogar y sus ingredientes en animales.

En 2016, el gobierno holandés anunció su plan de convertirse en líder mundial en innovación sin el uso de animales para 2025. Poco después, el Comité Nacional de los Países Bajos para la protección de los animales usados con fines científicos (NCad) publicó un informe sobre la transición del país hacia la innovación sin animales en el que concluyó, entre otras cosas, que las pruebas de toxicidad en animales para productos químicos, ingredientes alimenticios, pesticidas, medicamentos veterinarios y vacunas podrían eliminarse progresivamente para 2025.<sup>51</sup> Posteriormente, se estableció el Programa de Transición para la Innovación sin el uso de animales (TPI, por sus siglas en inglés), cuyo objetivo es reunir a las partes interesadas y ofrecer una plataforma para identificar y desarrollar actividades para acelerar la transición hacia métodos innovadores sin animales.<sup>52</sup>

En diciembre de 2021, la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA, por sus siglas en inglés) publicó la primera actualización de su *New Approach Methods Work Plan* [Plan de trabajo de nuevos métodos de enfoque] para reducir el uso de animales en pruebas.<sup>53</sup> El plan incluye las siguientes medidas concretas para reducir las pruebas de pesticidas y productos químicos industriales en vertebrados: establecimiento de indicadores para supervisar los avances de la EPA en la sustitución del uso de animales; desarrollo de pruebas sin animales y trabajo para lograr su aceptación y la confianza en ellas; oferta de oportunidades educativas sobre el uso de métodos sin animales; e involucramiento de las partes interesadas. El plan de trabajo de la EPA destaca que los métodos sin animales tienen el potencial de aumentar el “rigor y la sofisticación” de la evaluación química por parte de esta instancia.<sup>53</sup> Esto se suma a la Ley Frank R. Lautenberg de Seguridad Química para el Siglo XXI (2016), que exige el uso de métodos confiables de prueba sin animales –cuando estos existan– para evaluar la seguridad de los productos químicos industriales.<sup>54</sup>

También en EE. UU., la Ley de Modernización 2.0 de la FDA modificó la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos para eliminar la obligatoriedad de probar todos los nuevos medicamentos en animales y permitir en su lugar el uso de “alternativas a las pruebas en animales”.<sup>55</sup>

En 2021, los miembros del Parlamento Europeo apoyaron casi por unanimidad una propuesta de resolución que pedía a la Comisión Europea que elaborara un plan de acción (con cronograma y metas) para eliminar gradualmente los experimentos en animales y acelerar la transición hacia métodos innovadores sin animales en investigación, pruebas reglamentarias y educación.<sup>56</sup>

Estos cambios son necesarios para mejorar la calidad de la investigación biomédica y la evaluación reglamentaria.

## Plan de acción: recomendaciones para modernizar la investigación biomédica

### 1. Poner fin al uso de animales en áreas de investigación en las que se ha demostrado que los animales son “modelos” deficientes de los humanos y su uso ha impedido el progreso científico y médico.

Múltiples reseñas científicas han documentado el abrumador fracaso del uso de animales en la protección de la salud humana en áreas específicas, como enfermedades neurodegenerativas, trastornos neuropsiquiátricos, enfermedades cardiovasculares, accidente cerebrovascular, cáncer, diabetes, obesidad, inflamación y respuestas inmunitarias, VIH/sida, adicción, traumatismo y entrenamiento médico, así como para pruebas reglamentarias. Por ello, los experimentos y las pruebas en animales en estas áreas de investigación deben terminar lo antes posible y sustituirse por métodos más eficaces y eficientes sin animales. En los apéndices encontrará más información y recomendaciones sobre estos temas.

### 2. Realizar reseñas científicas de la eficacia del uso de animales para identificar áreas adicionales en las que se dispone de métodos sin animales o en las que el uso de animales no ha logrado proteger la salud humana o ambiental y, por lo tanto, puede eliminarse.

En los ámbitos de investigación en los que todavía se cuestiona si el uso de animales es beneficioso se debe realizar una revisión sistemática exhaustiva para determinar



la eficacia de su uso. Las revisiones sistemáticas, que analizan críticamente múltiples estudios de investigación, son el primer paso para evaluar la eficacia del uso de animales. Dichas revisiones sistemáticas deben incluir información sobre el retorno de la inversión que recibe el público de los resultados de la investigación en animales financiada y/o realizada por agencias gubernamentales.

Algunos países recomiendan que se realicen revisiones sistemáticas antes de financiar los estudios. En este sentido, científicos del Centro Médico de la Universidad Radboud señalaron que “[h]acer de las revisiones sistemáticas de los estudios en animales una rutina es nuestra responsabilidad científica y social, al igual que ocurre con los estudios clínicos en humanos”.<sup>57</sup>

Varias entidades de financiamiento de EE. UU., entre ellas los NIH, el Departamento de Asuntos de los Veteranos y el Departamento de Defensa, son miembros del *Ensuring Value in Research Funders' Forum* [Foro de Financiación para Garantizar el Valor de la Investigación] (EViR, por sus siglas en inglés), un grupo de los más destacados organismos internacionales de financiamiento creado para abordar el despilfarro en la investigación clínica y preclínica. El segundo principio rector de este foro es que “[l]a investigación solo debe financiarse si se enmarca en el contexto de una o más revisiones sistemáticas existentes de lo que ya se sabe o de una demostración sólida de un vacío en la investigación”.<sup>58</sup> El grupo agrega que “esto es importante porque las nuevas investigaciones que no se enmarcan en el contexto de lo que ya se sabe dan lugar a duplicaciones innecesarias, estudios que no pueden cambiar la toma de decisiones (por ejemplo, no modifican el metaanálisis) o diseño inadecuado (por ejemplo, medidas inadecuadas de resultados, suposiciones incorrectas de prevalencia, falla en aprender de estudios anteriores)”.<sup>58</sup> Para aplicar este principio, el foro EViR afirma que los financiadores deben “evaluar rutinariamente si se ha llevado a cabo una revisión adecuada y si los resultados de dicha revisión respaldan la idea de futuras investigaciones clínicas o preclínicas”.<sup>59</sup>

La recomendación de realizar revisiones científicas de la eficacia de los procedimientos es, por lo tanto, algo que las agencias de financiación más grandes del mundo coinciden en considerar un principio necesario para promover investigación valiosa y reducir el despilfarro de recursos en aquella que no lo es.

La Academia Nacional de Medicina de los EE. UU., antes llamada Instituto de Medicina, analizó la necesidad científica de usar chimpancés en investigaciones biomédicas y conductuales.<sup>60</sup> Dicho análisis reveló que durante años se habían aprobado, financiado y realizado estudios perjudiciales en chimpancés, a pesar de que existían métodos

alternativos en prácticamente todas las áreas en las que estos animales se habían usado. Los organismos institucionales de supervisión y las agencias de financiamiento habían dado su visto bueno a estos protocolos. Sin embargo, como ahora sabemos, los procesos de revisión establecidos fueron inadecuados. Se deben realizar revisiones científicas exhaustivas y objetivas del uso de animales en diversas áreas de investigación en los casos en los que no se hayan llevado a cabo.

### **3. Redirigir los fondos previamente destinados a estudios en animales al uso y desarrollo de métodos confiables sin animales.**

La escasa predictibilidad de los experimentos preclínicos en animales en términos de toxicidad y eficacia en humanos ha provocado elevadas tasas de deserción en el desarrollo de nuevos tratamientos y es probablemente la causa de la escasa inversión en ciencias biológicas. El continuo uso de recursos públicos para financiar estudios en animales obstaculiza el desarrollo de tratamientos eficaces para las enfermedades humanas. Científicos visionarios están desarrollando e implementando métodos para estudiar y tratar enfermedades y probar productos que no implican el uso de animales y son relevantes para la salud humana. Los investigadores han creado modelos derivados de células humanas, “órganos en-chip”, modelos *in silico* y otros métodos que pueden replicar la fisiología humana, las enfermedades y las respuestas a los fármacos con más precisión que los experimentos en animales.

Varios estudios han demostrado repetidamente que estos nuevos métodos son mejores que los arcaicos experimentos en animales para modelar las enfermedades humanas. En



**Las agencias reguladoras y la comunidad regulada reconocen cada vez más que las pruebas en animales no protegen adecuadamente la salud humana ni el ambiente.**

efecto, en su plan estratégico 2016–2020, los NIH anunciaron que reducirían y reemplazarían los experimentos en animales:

A menudo, las placas de Petri y los modelos animales no permiten imitar la enfermedad ni predecir cómo funcionarán los fármacos en humanos, lo que se traduce en una gran pérdida de tiempo y dinero mientras los pacientes esperan las terapias. Para abordar este desafío, los NIH, la DARPA y la FDA trabajan en colaboración para desarrollar plataformas tridimensionales diseñadas para sostener células y tejidos humanos vivos, denominadas chips de tejidos u órganos-en-chip. Un cuerpo-en-chip integrado es el objetivo final.<sup>61</sup>

Los NIH y otras agencias gubernamentales deben dar ahora el siguiente paso y poner fin al financiamiento de experimentos en animales que no han proporcionado tratamientos ni curas eficaces. Así se liberarán inmensos recursos que, cuando se reinviertan en métodos, carreras e institutos atractivos e innovadores que no usen animales –además de políticas públicas novedosas– impulsarán el desarrollo de curas y tratamientos mucho más prometedores para los humanos. Esto también aliviará el sufrimiento casi inimaginable de millones de animales y ayudará a proteger la salud humana y el ambiente.

#### **4. Implementar, tal como se ha hecho en el Reino Unido, un sistema de análisis de daños y beneficios para la investigación en animales que incluya una perspectiva ética y la consideración de los daños permanentes que se infligen a los animales.**

En aras del bienestar de los animales y de la salud humana, los investigadores deberían enfocar su considerable talento, tiempo, dinero y energía en alejarse del arcaico uso de animales y priorizar áreas en las que el daño infligido a los animales involucrados es tan grande que ningún beneficio podría justificar el experimento. Algunos ejemplos de este tipo de estudios son: experimentos de privación materna, experimentos psicológicos que provocan miedo, ansiedad o depresión, y experimentos de adicción a las drogas, alcohol y

**Actualmente, el sistema no determina de manera adecuada el grado de sufrimiento de los animales en estos experimentos. Hasta que los investigadores hagan esta evaluación crítica, no podrán medir razonablemente si los resultados justifican o no el dolor y el sufrimiento.**

alimentos. Hasta que finalicen todos los estudios en animales, debe aplicarse un sistema de análisis del “umbral de riesgo” o “límite superior”, similar al empleado en la investigación en humanos. Se pueden encontrar ejemplos de marcos mediante los cuales realizar análisis de daño-beneficio de la experimentación en animales en los informes de *U.K. Animals in Science Committee Harm-Benefit Analysis Sub-Group* [Subgrupo de análisis de daños y beneficios del Comité de Animales en la Ciencia del Reino Unido],<sup>62</sup> el informe del *Working Group on the Use of Chimpanzees in NIH-Supported Research* [Grupo de trabajo sobre el uso de chimpancés en investigaciones respaldadas por los NIH]<sup>60</sup> y la investigación de Pandora Pound.<sup>46</sup>

El daño a los animales que se considera no debe limitarse al resultante de procedimientos específicos, sino que debe incluir también el daño inherente causado por el confinamiento en un laboratorio, donde a los animales se les niega la oportunidad de satisfacer las necesidades específicas de su especie. Actualmente, el sistema no determina de manera adecuada el grado de sufrimiento de los animales en estos experimentos. Hasta que los investigadores no hagan esta evaluación crítica, no podrán medir razonablemente si los resultados justifican o no el dolor y el sufrimiento de los animales.

#### **5. Trabajar con líderes mundiales para armonizar y promover la aceptación internacional de los métodos de experimentación sin animales para cumplir los requisitos reglamentarios en materia de pruebas de toxicidad.**

Como se ha descrito anteriormente, la aceptación reglamentaria de técnicas sin animales en una región o país es una puerta abierta a la modernización internacional de los requisitos en materia de pruebas. Por lo tanto, abogamos para que las instancias reguladoras nacionales e internacionales y las organizaciones de normalización colaboren con la industria, las agencias de investigación y las organizaciones no gubernamentales pertinentes de todo el mundo para establecer y promover rutas claras de validación y armonización de las técnicas sin animales para los requisitos reglamentarios en materia de pruebas.

Para implementar un enfoque más sofisticado en las pruebas de toxicidad que proporcione de forma más adecuada información sobre la seguridad de todas las sustancias químicas comercializadas, recomendamos además que tanto las agencias reguladoras y gubernamentales como la industria sean obligadas a usar en lugar de procedimientos en animales –y siempre que sea posible– una estrategia o método de prueba científicamente satisfactorio que no implique el uso de animales vivos (como se exige en la Unión

Europea<sup>63</sup>). Así mismo, recomendamos la creación de un centro público-privado de investigación y experimentación predictiva sin animales, similar al Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para los Métodos Alternativos a la Experimentación en Animales (EURL ECVAM, por sus siglas en inglés). Un centro de este tipo ayudaría a transformar la ciencia de la evaluación de la seguridad con nuevas herramientas para orientar a la industria, los gobiernos, los consumidores y los socios comerciales internacionales en la adopción de las mejores prácticas.

## **6. Educar y capacitar a los investigadores y a las agencias reguladoras sobre los beneficios de emplear métodos de experimentación sin animales y cómo usarlos.**

### **Informar a la comunidad científica**

A medida que se amplíen los campos de investigación y experimentación sin animales, más oportunidades de educación y capacitación práctica acelerarán la transición a estos métodos. Sin embargo, a la hora de implementar este tipo de iniciativas, es importante reconocer que pueden existir barreras para la adopción de nuevas tecnologías y que, por lo tanto, es necesario esforzarse por generar confianza. Por ejemplo, la agencia de innovación del Reino Unido, Innovate UK, ha reconocido que superar el escepticismo sobre la capacidad de los métodos sin animales para modelar procesos biológicos ayudará a eliminar una importante barrera para el uso de estos métodos. Además, el conservadurismo y la inercia que obstaculizan el abandono de los métodos basados en animales pueden superarse animando a los científicos “a pensar más allá de sus áreas de investigación inmediatas para ver cómo pueden aprovecharse y explotarse sus habilidades, tecnología y ‘know-how’ para acelerar el desarrollo y la adopción de” métodos avanzados sin animales.<sup>64</sup> Es vital que entre los futuros científicos y los profesionales ya establecidos se adopten este tipo de iniciativas educativas y que estas cuenten con un amplio apoyo financiero en todo el sector de la investigación y las pruebas reglamentarias, incluidas la academia, las comunidades científicas y de financiamiento, la industria y las agencias reguladoras.

### **Oportunidades de capacitación para investigadores que inician carrera**

Se necesita más educación y capacitación práctica en métodos sin animales. Los estudiantes y los científicos que inician su carrera deben tener la oportunidad de desarrollar las aptitudes necesarias para contribuir a este campo de investigación y permitir que sus países puedan competir con los avances internacionales. Dado que muchos programas de estudio carecen de cursos suficientes sobre

métodos sin animales, se han desarrollado programas de capacitación complementarios. Por ejemplo, el Centro Común de Investigación (JRC, por sus siglas en inglés) de la Comisión Europea organiza una escuela de verano sobre enfoques sin animales.<sup>65</sup> Programas similares podrían replicarse en América Latina. En Canadá, la Universidad de Columbia Británica ha aceptado un nuevo módulo de grado llamado *Non-Animal Methods in Biomedical Science* [Métodos sin animales en la ciencia biomédica], ofrecido por Society for Humane Science y enfocado en la formación de estudiantes en métodos de investigación y experimentación sin animales.<sup>66</sup> Además, existen muchos recursos en línea de expertos en la materia, incluidos los ofrecidos por el Consorcio Internacional de Ciencia de PETA<sup>67</sup> y el Comité de Médicos por una Medicina Responsable.<sup>68</sup> Por lo tanto, se dispone de información sobre investigación y experimentación sin animales y estas áreas deberían ser componentes de toda la educación biomédica.

La concientización de la comunidad científica sobre los métodos sin animales puede promoverse mediante la creación de un centro nacional de formación para la investigación y las pruebas sin animales, así como la creación de plazas de investigación centradas en métodos sin animales y de puestos de asesoría en investigación sin animales para orientar a docentes, estudiantes y personal en general. Las universidades y otras instituciones académicas podrían crear departamentos a cargo de liderar la transición a la investigación y las pruebas sin animales. Estos departamentos podrían ayudar a organizar programas de posgrado que utilicen exclusivamente métodos sin animales, así como talleres, seminarios y otros programas de capacitación sobre métodos *in vitro* e *in silico*.

### **Oportunidades de capacitación para la industria, las agencias financiadoras y las instancias reguladoras**

Dado que la ciencia y la tecnología sin animales evolucionan con rapidez, no solo se necesita educación y capacitación en las universidades. El plan de estudios de las profesiones registradas, como la de Toxicólogo Registrado, en Europa, también debe incluir cursos obligatorios sobre nuevos enfoques, extrapolación *in vitro* a *in vivo*, revisiones sistemáticas y vías de resultados adversos. Además, los investigadores y las instancias reguladoras que usan métodos basados en animales deben tener la oportunidad de volver a capacitarse y se les debe animar a que establezcan colaboraciones multidisciplinarias para fortalecer sus capacidades y crear formas innovadoras de plantear las preguntas de investigación y los métodos para responderlas. Por ejemplo, el TPI de los Países Bajos creó una serie de “helpathons”, o talleres orientados a la acción en torno a una pregunta concreta que guía a los investigadores, a través de un foro comunitario para pensar

de forma creativa y aprovechar el poder de la coincidencia en el descubrimiento de nuevas oportunidades con respecto a los enfoques sin animales.

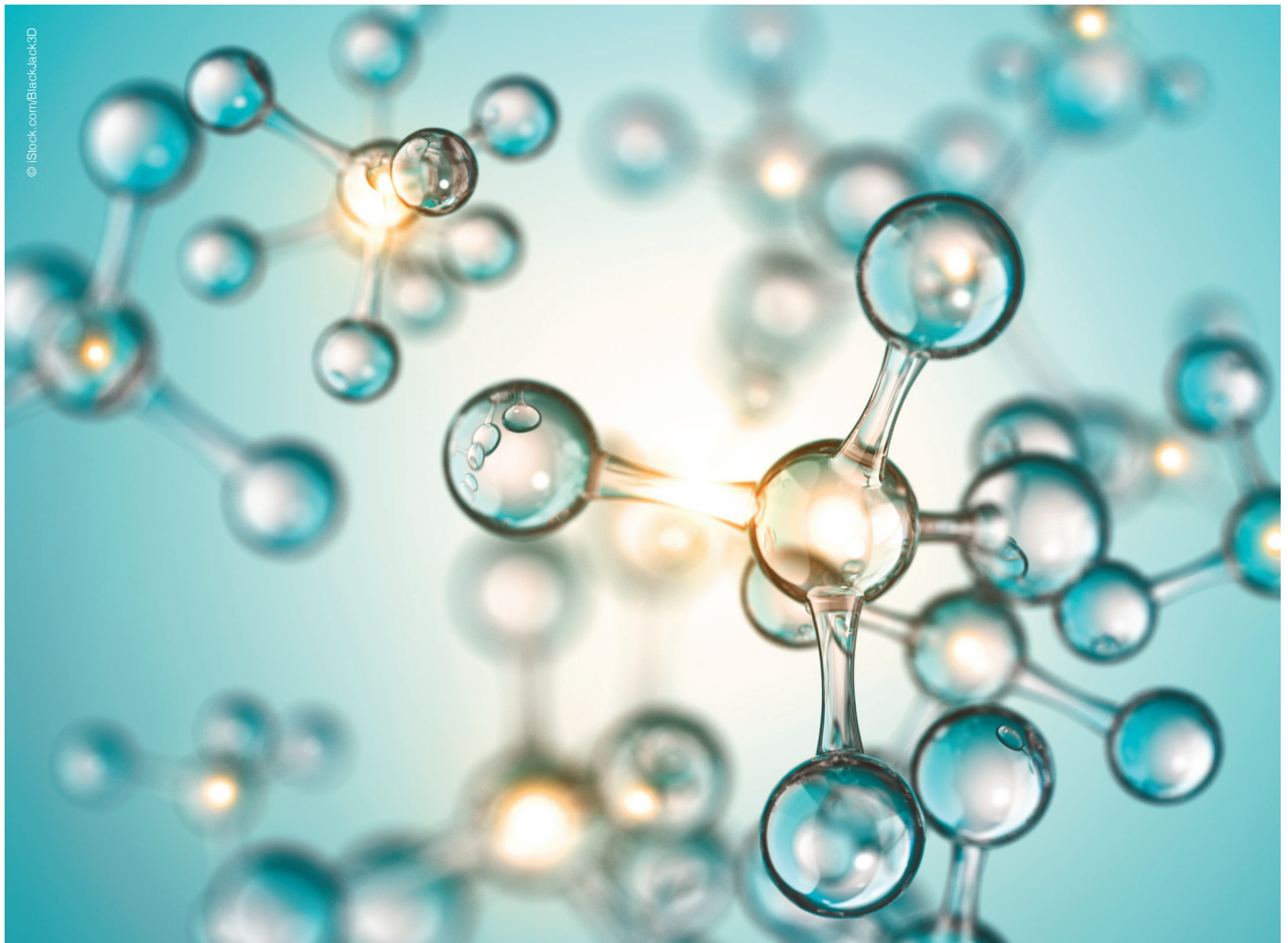
Las agencias financiadoras también requieren capacitaciones periódicas para identificar los métodos avanzados sin animales más prometedores que podrían tener potencial comercial. Del mismo modo, las instancias reguladoras responsables de autorizar experimentos en animales –y las que exigen datos de pruebas en animales para cumplir requisitos reglamentarios (por ejemplo, para productos medicinales y veterinarios, productos químicos, biocidas y pesticidas)– deberían recibir una capacitación obligatoria sobre los avances de la ciencia sin animales como parte de su continuo desarrollo profesional.

A medida que se amplía el campo de los métodos de experimentación sin animales, la comunidad científica y las agencias reguladoras deben seguir el ritmo de estos avances. Es urgente aumentar las iniciativas de educación y capacitación para generar confianza en los métodos eficaces y relevantes sin animales que puedan proteger mejor la salud humana y el ambiente.

## Conclusión

El actual despilfarro de recursos, tiempo y vidas de animales tiene un efecto directo y desastroso en la salud humana. Hasta que se implemente este plan, la investigación financiada con recursos públicos no resultará en la investigación básica y aplicada necesaria para desarrollar tratamientos eficaces contra las enfermedades humanas.

**En los apéndices se incluye información detallada sobre 29 áreas de investigación y el asombroso fracaso de los estudios en animales para conducir a tratamientos eficaces para los humanos.**





# Glosario

3R	reemplazo, reducción y refinamiento (del uso de animales)	NIH*	Institutos Nacionales de Salud de los EE. UU.
AE	alerta estructural	NOS*	óxido nítrico sintasa
AOP*	vía de resultado adverso	NRU*	captación de rojo neutro
ATLS*	soporte vital avanzado en trauma	NTP*	Programa Nacional de Toxicología
BCOP*	opacidad y permeabilidad corneal bovina	OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
CCRSM	Comité Científico de los Riesgos Sanitarios, Medioambientales y Emergentes de la Comisión Europea	PDAC*	adenocarcinoma ductal de páncreas
CCSC	Comité Científico de Seguridad de los Consumidores de la Unión Europea	PdE	peso de la evidencia
CTA*	ensayo de transformación celular	<i>Ph. Eur.</i>	Farmacopea Europea
DM2	diabetes mellitus tipo 2	REACH*	Registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias y preparados químicos
DPRA*	ensayo directo de reactividad peptídica	RhCE*	epitelio reconstruido similar a la córnea humana
EA	enfermedad de Alzheimer	RHE*	epidermis humana reconstruida
ECHA*	Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas	RPT*	prueba de pirógenos en conejos
EDQM*	Dirección Europea de Calidad de los Medicamentos y Servicios de Salud	RV	realidad virtual
EDSP*	Programa de detección de alteraciones endocrinas	SFB	suero fetal bovino
EH	Enfermedad de Huntington	SGA	Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos
ELA	esclerosis lateral amiotrófica	sida	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
EMA*	Agencia Europea de Medicamentos	STAIR*	Conferencia Académica y de la Industria para el Tratamiento del ACV
EP	Enfermedad de Parkinson	STE*	exposición breve
EPA*	Agencia de Protección Ambiental de los EE. UU.	TDAH	trastorno por déficit de atención e hiperactividad
EURL ECVAM*	Laboratorio de referencia de la Unión Europea para los métodos alternativos a la experimentación en animales	TER*	resistencia eléctrica transcutánea
EVIR*	Foro de financiadores para garantizar el valor de la investigación	TZD	Tiazolidinediona
GEMM*	modelo de ratón modificado genéticamente	VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
h-CLAT*	prueba de activación de la línea celular humana	VIS	virus de la inmunodeficiencia simia
hPL*	lisado plaquetario humano		
IATA*	Enfoque integrado de prueba y evaluación		
ICCVAM*	Comité de Coordinación Interinstitucional sobre la Validación de Métodos Alternativos		
IET*	Institución de Ingeniería y Tecnología		
IFV*	virus de la influenza		
ISO*	Organización Internacional de Normalización		
JaCVAM*	Centro Japonés para la Validación de Métodos Alternativos		
JRC*	Centro Común de Investigación de la Comisión Europea		
LAL	lisado de amebocitos de <i>Limulus</i>		
LM	lesión medular		
LTT*	entrenamiento en tejidos vivos		
MAT*	prueba de activación de monocitos		
NICEATM*	Centro Interinstitucional del Programa Nacional de Toxicología para la Evaluación de Métodos Toxicológicos Alternativos		

\*Sigla en inglés.

# APÉNDICES



A continuación, encontrará más detalles sobre las oportunidades para reemplazar a los animales en áreas de investigación y capacitación biomédica, ciencias forenses, evaluación de la toxicidad y métodos de producción en laboratorio. También se incluye información sobre las áreas en las que el equipo científico de PETA es experto. Los apéndices incluyen varios ejemplos de aplicación de métodos sin animales, pero no representan una recopilación exhaustiva de la literatura científica ni de las regulaciones a nivel mundial.

Toda mención de *PETA Science Consortium International e.V.* anterior a diciembre de 2020 se refiere al *PETA International Science Consortium Ltd.* [Consortio Internacional de Ciencia de PETA].

## Índice

### Investigación biomédica básica y aplicada

- Cáncer..... 23
- Enfermedades cardiovasculares ..... 24
- Diabetes..... 26
- Inflamación e inmunología..... 27
  - VIH/sida..... 27
  - Inmunología en ratones..... 28
  - Septicemia..... 29
- Regeneración nerviosa ..... 31
- Enfermedades neurodegenerativas ..... 33
- Trastornos neuropsiquiátricos y neurodivergencia .. 35
- ACV..... 37
- Abuso de sustancias..... 39
- Traumatismos..... 40

### Capacitación e investigación forense

- Ciencias forenses..... 41
- Formación médica..... 42
  - Formación en microcirugía ..... 42
  - Formación en traumatología..... 44

### Evaluación de la toxicidad

- Métodos de evaluación de la toxicidad..... 45
- Ecotoxicidad..... 45
  - Toxicidad acuática..... 46
  - Toxicidad en aves ..... 47
- Alteraciones endocrinas..... 47
- Irritación o corrosión ocular..... 49
- Genotoxicidad ..... 50
- Carcinogenicidad..... 51
- Fototoxicidad..... 51
- Pirogenicidad..... 53
- Toxicidad reproductiva y del desarrollo ..... 54
- Irritación y corrosión cutánea..... 55
- Sensibilización cutánea ..... 55
- Toxicidad sistémica ..... 56
  - Toxicidad sistémica aguda..... 56
  - Toxicidad sistémica por administración repetida de dosis ..... 56
  - Vía oral..... 57
  - Vía cutánea ..... 57
  - Vía inhalatoria ..... 57
- Pruebas de tabaco y cigarrillos electrónicos ..... 58

### Métodos de producción en laboratorio

- Producción de anticuerpos..... 59
- Medicamentos biológicos..... 60
- Suero fetal bovino..... 61

### Asesoría científica ofrecida por PETA..... 61



## Investigación biomédica básica y aplicada

### Cáncer

#### Recomendación: Poner fin al uso de animales.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el continente americano; 1,4 millones de defunciones por esta enfermedad se registraron en 2020 en toda la región.<sup>51,2</sup> Solo en EE. U.U., es la segunda causa de muerte y las autoridades estiman que aproximadamente 600 mil estadounidenses murieron de cáncer en 2020.<sup>86</sup> Incluso después de una importante inversión en investigación de tratamientos contra el cáncer, la tasa de éxito de los fármacos oncológicos es de solo el 3.4 %, <sup>70</sup> a pesar de que esos fármacos han tenido éxito en pruebas preclínicas en animales. El descenso de las tasas de cáncer en las dos últimas décadas se atribuye principalmente a medidas preventivas individuales, como abstenerse de fumar cigarrillos, comer más frutas y verduras y someterse a chequeos periódicos,<sup>87,88</sup> más que a los resultados de la investigación biomédica.

La comunidad científica es consciente de que el uso de animales, especialmente ratones, para la investigación del cáncer humano es problemático. Por un lado, los resultados publicados del *Reproducibility Project: Cancer Biology* [Proyecto de reproducibilidad: la biología del cáncer] muestran que los experimentos oncológicos en animales tienen efectos de menor magnitud y su replicación es menos probable que los experimentos oncológicos sin animales.<sup>89</sup> Aunque el diseño de los estudios y otros asuntos logísticos de la investigación pueden crear problemas, los oncólogos de la Universidad McMaster de Ontario afirman que “[I]a mayoría de... [los datos] inútiles se origina de hecho en los mecanismos moleculares de los fármacos probados... Las cruciales diferencias genéticas,

moleculares, inmunológicas y celulares entre humanos y ratones impiden que los modelos animales sirvan como medio eficaz para buscar una cura para el cáncer”.<sup>90</sup>

Existen diversos métodos de uso de roedores –principalmente ratones– en la experimentación básica y translacional del cáncer, como los xenotrasplantes, la ingeniería genética y, con menor frecuencia, la inducción ambiental, que consiste en exponer a los animales a sustancias cancerígenas conocidas.

En el modelado de xenoinjertos, las células cancerosas humanas o animales se trasplantan bajo la piel o en un órgano de roedores inmunodeprimidos, quienes luego pueden ser tratados con una sustancia química o de prueba de interés.<sup>91</sup> Tras un análisis de 1110 modelos tumorales de xenoinjerto de ratón, un equipo científico y médico con miembros de la Universidad de Harvard, el Instituto Tecnológico de Massachusetts, el Instituto Oncológico Dana-Farber y otras instituciones reconocidas cuestionó de manera contundente la capacidad de los modelos de xenoinjerto para predecir la respuesta de los pacientes humanos al tratamiento. Este equipo descubrió que el trasplante de células cancerosas humanas a estos ratones alteraba la composición genética de esas células de un modo que sería improbable que ocurriera en los humanos. Dicha alteración, a su vez, alteró las respuestas que las células tenían a los fármacos de quimioterapia.<sup>92</sup> Esencialmente, cuando las células tumorales humanas se trasplantan a ratones, desarrollan características de células de ratón, que no son relevantes para la biología humana.

Los experimentadores crean ratones modificados genéticamente (transgénicos) induciendo la expresión de oncogenes o inactivando genes supresores de tumores.<sup>93</sup> Sin embargo, con estos métodos, los investigadores suelen ser incapaces de controlar el nivel y el patrón de expresión o inactivación de los genes, por lo que no consiguen imitar la naturaleza esporádica y las múltiples etapas del crecimiento tumoral que se observa en el desarrollo natural del tumor. Además, la integración aleatoria de los oncogenes puede dar lugar a resultados inesperados que no se darían en pacientes humanos.<sup>93</sup> Así mismo, la creación de estos modelos lleva mucho tiempo, es costosa y usa una gran cantidad de animales debido a los exigentes requisitos de reproducción.<sup>94,95</sup>

Dadas las numerosas deficiencias de los modelos del cáncer en animales, así como la sorprendente baja tasa de éxito en la translación de dichos modelos, está claro que no son adecuados para la experimentación en cáncer humano. En vista de ello y del dolor y el sufrimiento que padecen los animales que se usan, debería ser prioritario abandonar los modelos animales y, en cambio, centrarse en métodos relevantes para el ser humano.

En agosto de 2021, el Centro Común de Investigación (JRC) de la Comisión Europea publicó un informe sobre inmunooncología y destacó importantes publicaciones que describen modelos avanzados y prometedores sin animales. Estos estudios emplearon métodos basados en la biología humana, sin animales, para desarrollar inmunoterapias, estudiar la iniciación y el desarrollo del cáncer, explorar tratamientos contra el cáncer, estudiar la inmunomodulación de la fisiología del cáncer o estrategias potencialmente eficaces para mejorar la respuesta inmunitaria antitumoral, determinar características moleculares que puedan representar biomarcadores en la patogénesis específica del cáncer, y explorar terapias celulares adoptivas y viroterapias, entre otros.<sup>96</sup>

Algunos ejemplos de investigaciones oncológicas recientes y relevantes para los humanos son los modelos vasculares de tumores humanos –creados mediante bioimpresión tridimensional– que imitan las etapas clave de las metástasis tumorales,<sup>97</sup> modelos de pulmón-en-chip humano específicos para cada paciente usados en medicina de precisión,<sup>98</sup> análisis sofisticados de organoides de tumores mamarios humanos<sup>99</sup> y líneas celulares de cáncer de mama,<sup>100</sup> genómica para mejorar la comprensión de los aspectos exclusivamente humanos del cáncer,<sup>101,102</sup> inteligencia artificial para diagnósticos más rápidos<sup>103</sup> y para predecir las respuestas individuales a los fármacos,<sup>104</sup> y chips biónicos portátiles para recopilar datos de pacientes en tiempo real.<sup>105</sup>

El Dr. Richard Klausner, exdirector del Instituto Nacional del Cáncer, señaló que “[l]a historia de la investigación del cáncer ha sido la historia de curar el cáncer en ratones. Llevamos décadas curando el cáncer en ratones y, sencillamente, no funcionó en humanos”.<sup>106</sup> El cáncer es una enfermedad muy variable e individualizada que requiere un tratamiento también individualizado para superarla.<sup>107</sup> Los científicos que utilizan métodos sin animales para la investigación oncológica se enfrentan a un obstáculo menor para la traslación, ya que pueden utilizar las propias células cancerosas de los pacientes y porque todos los métodos relevantes para los humanos se basan en la biología humana (no en la de los roedores).

## Enfermedades cardiovasculares

### Recomendación: Poner fin al uso de animales.

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en todo el mundo. Sin embargo, el desarrollo y la aprobación de nuevos fármacos con potencial terapéutico para tratarlas han disminuido en las dos últimas décadas.<sup>108</sup>

Las diferencias entre especies en cuanto a la frecuencia cardíaca en reposo, los potenciales de acción, las isoformas

de proteínas de miofilamentos, el acoplamiento excitación-contracción (acoplamiento E-C) y las relaciones fuerza-frecuencia limitan la traducibilidad a los humanos de muchos modelos animales de función cardiovascular.<sup>109,110</sup> Un metaanálisis de la medición de 11 parámetros funcionales del corazón que comparó roedores con humanos llegó a la conclusión de que solo uno (la presión sistólica) estaba dentro de un rango aceptable para la comparación entre las dos especies.<sup>111</sup> Las propiedades y la composición de las proteínas que manejan el calcio difieren en el corazón de ratas, ratones, conejos, perros y humanos; y los roedores y los humanos no tienen los mismos perfiles o funciones de proteínas contráctiles.<sup>112</sup> Esto hace que el perfil de repolarización ventricular y la susceptibilidad de la arritmia sean diferentes, lo que lleva a respuestas variadas a los fármacos. Los roedores también son resistentes a la aterosclerosis, una de las principales causas de muchas enfermedades cardiovasculares, debido a su falta de proteína de transferencia de éster de colesterol.<sup>113</sup> Los modelos de insuficiencia cardíaca en ratas y ratones no muestran los mismos perfiles de expresión de miARN que los pacientes con insuficiencia cardíaca aguda.<sup>113</sup> Además, la mayoría de los modelos animales no imita los complejos factores genéticos y ambientales asociados a la salud cardiovascular ni la naturaleza progresiva de la enfermedad cardiovascular humana.<sup>114</sup>

En el campo de la insuficiencia cardíaca, “las conclusiones extraídas de la investigación en animales han tenido una traslación deficiente a la hora de descifrar la insuficiencia cardíaca humana y desarrollar tratamientos eficaces” y “se ha reconocido que la falta de afinidad entre los modelos animales y el estado de la enfermedad humana es uno de los principales factores que contribuyen [a este fracaso traslacional]”.<sup>115</sup>

La continua dependencia de modelos animales inadecuados afecta no solo la investigación de las enfermedades cardiovasculares, sino también el desarrollo de fármacos para todas las demás enfermedades. En un artículo de revisión, científicos del Dartmouth College señalaron que “[l]a mayoría de los fracasos de fármacos en fase I y los retiros posteriores de fármacos tras su aprobación se atribuye a toxicidad cardiovascular. Casi la mitad de los medicamentos en el mercado farmacológico desde la década de los 90 han sido retirados debido a complicaciones cardiovasculares”.<sup>116</sup> Los expertos señalan la “falta de afinidad entre los efectos de los compuestos en animales (o tejidos derivados de animales) y aquellos [efectos] en los seres humanos”<sup>117</sup> y las numerosas diferencias conocidas entre las especies en la función contráctil cardíaca y el manejo del calcio, además de que las “diferencias sustanciales en la capacidad de respuesta a los fármacos entre especies pueden limitar la eficacia de predecir resultados clínicos a partir de pruebas de toxicidad en animales”.<sup>118</sup> En una revisión conjunta, científicos de la Universidad de Stanford, la Administración de Alimentos y



Medicamentos de EE. UU. (FDA) y la empresa farmacéutica AbbVie califican las pruebas de cardiotoxicidad en modelos animales como un enfoque de “caja negra”.<sup>117</sup> Está claro que los métodos *in vitro* e *in silico* relevantes para el ser humano son mucho más adecuados para las pruebas de cardiotoxicidad y la investigación cardiovascular en general.

La empresa global de biotecnología de células madre Novoheart usa la plataforma MyHeart™, compuesta de tejidos cardíacos humanos manipulados, que ha sido capaz de “detectar los devastadores riesgos arritmogénicos de ciertos fármacos ‘antiarrítmicos’ que anteriormente habían causado muertes en pacientes humanos a pesar de haber pasado por el defectuoso proceso de pruebas en animales para su aprobación por la FDA”.<sup>119</sup> Marsha Rolle, ingeniera de tejidos del Instituto Politécnico Worcester, ha creado vasos sanguíneos funcionales a partir de células humanas para “replicar lo que ocurre cuando [los vasos sanguíneos humanos] están enfermos”.<sup>120</sup> En un comunicado de prensa, Rolle señaló que el plazo promedio de 10 años para desarrollar nuevos medicamentos se ve “agravado por el hecho de que los ensayos en animales, que es la forma en que se prueban la mayoría de los nuevos fármacos, no siempre son un indicador preciso de cómo responderán los vasos sanguíneos humanos a los mismos fármacos”.<sup>120</sup> Investigadores de la Universidad de California–Los Ángeles y de la Universidad Tecnológica Sharif de Teherán diseñaron una plataforma de corazón-en-chip que incorpora microsurcos y estimulación eléctrica para recapitular la estructura bien alineada y el latido sincrónico de los cardiomiocitos, y

que puede usarse para pruebas de alto rendimiento de cardiotoxicidad.<sup>121</sup>

Otros avances recientes en la ingeniería de tejidos humanos para la investigación cardiovascular incluyen la capacidad de los científicos para controlar el ritmo eléctrico de las células cardíacas cultivadas en laboratorio usando luz,<sup>122</sup> el uso de una estructura de celulosa de origen vegetal como andamio para construir redes de venas humanas,<sup>123</sup> y la creación de un modelo tridimensional *in vitro* de desarrollo temprano del corazón en humanos que “podría servir como ensayo de detección de embriotoxicidad en el descubrimiento, la regulación y la prescripción de fármacos para un desarrollo fetal saludable”.<sup>124</sup> Este modelo tridimensional de “organogénesis-en-placa” podría proporcionar una forma de determinar la seguridad de los medicamentos en personas embarazadas.

Por medio de chips microfluídicos de tejido con múltiples tipos de células arteriales de pulmón de pacientes masculinos y femeninos, investigadores del Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Texas identificaron diferencias específicas de las células en respuesta a las hormonas, que pueden contribuir a las complejas disparidades de sexo de la hipertensión arterial pulmonar (HAP), una enfermedad progresiva y potencialmente mortal imposible de recapitular completamente en modelos animales.<sup>125</sup> Este diseño de chip de HAP específico para cada sexo se destacó por ser un “modelo útil para estudiar el mecanismo de la disparidad entre sexos con el fin de avanzar en el tratamiento



de los pacientes con HAP específico para cada sexo”.<sup>126</sup> Investigadores de la Universidad Médica de Carolina del Sur, la Universidad Clemson y de Investigación y Desarrollo de Janssen diseñaron un organoide cardíaco humano para modelar el estado postinfarto agudo de miocardio a nivel transcriptómico, estructural y funcional.<sup>127</sup>

El modelado por computador también está haciendo avanzar rápidamente la investigación cardiovascular y de cardiotoxicidad en humanos. Recientemente, un equipo internacional de investigadores desarrolló una herramienta basada en el aprendizaje automático para predecir la progresión de la miocardiopatía hipertrófica, una enfermedad que afecta a uno de cada 500 adultos jóvenes y puede causar muerte súbita.<sup>128</sup> Ethan Kung, profesor adjunto de la Universidad de Clemson, recibió una prestigiosa beca de la Fundación Nacional de Ciencias de EE. UU. por su trabajo “destinado a reducir las pruebas en humanos y animales y a abordar la preocupación de que el costo desorbitado del desarrollo de nuevos dispositivos y cirugías es insostenible”.<sup>129</sup> Su investigación fusiona modelos numéricos por computador con datos experimentales para crear modelos bioquímicos cardiovasculares modernos. Investigadores de la Universidad de Oxford han demostrado que los métodos *in silico* son más precisos que los modelos animales para predecir la cardiotoxicidad de ciertos fármacos.<sup>130</sup>

## Diabetes

### Recomendación: Poner fin al uso de animales.

Entre 1984 y 2014, se publicaron más de 50 artículos al mes que describían experimentos en modelos de roedores de diabetes mellitus tipo 2 (DM2).<sup>131</sup> Teniendo en cuenta estas cifras, ahora sabemos mucho sobre la diabetes, o las alteraciones metabólicas que se parecen a la diabetes en roedores, pero “muchos detalles de la patogénesis de la DM2 en humanos siguen sin estar claros, y los medios para prevenir la progresión de la enfermedad siguen sin alcanzarse”.<sup>131</sup> Los estudios en roedores se usaron para identificar las tiazolidinedionas (TZD) como posibles tratamientos para humanos con DM2 o disfunción de la insulina. Lamentablemente, los estudios no predijeron que las TZD aumentarían en un 64 % el riesgo de muerte cardiovascular en estos pacientes; en efecto, aportaron pruebas contradictorias.<sup>132</sup>

La DM2 es una enfermedad marcada por la desregulación de la glucosa, resultante de la alteración de la secreción de insulina y la disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas, que tiene amplios efectos fisiológicos. Los roedores difieren de los humanos en todos los niveles de la regulación de la glucosa, desde los ácidos nucleicos hasta las proteínas, las vías y células, y los tejidos y órganos. Las dos especies también difieren en cuanto a la progresión de la enfermedad a nivel del organismo y las diferencias en la exposición ambiental y

la autonomía del estilo de vida son dramáticas.<sup>131,132</sup> “Dado que la homeostasis de la glucosa en los ratones depende principalmente del hígado, mientras que en los humanos depende del músculo esquelético, donde los mecanismos de transporte y las vías bioquímicas son diferentes, no cabe esperar que los ratones sean análogos a los pacientes [con DM2] en cuanto a los mecanismos del metabolismo de la glucosa o su disfunción”.<sup>132</sup> Y, como señalan Joan Mir-Coll y sus colegas, “las células  $\beta$  de los ratones difieren de las células  $\beta$  humanas en parámetros como la respuesta a diferentes factores de estrés, la capacidad proliferativa con resistencia a la insulina, la captación de glucosa, la cinética de secreción de insulina, la composición y distribución celular, y el perfil transcripcional”.<sup>133</sup>

A pesar de estas claras discrepancias, la investigación sobre la diabetes en animales continúa, mientras que los métodos más relevantes, basados en la biología humana, a menudo se ignoran.

Muchos modelos genéticos de la DM2 se basan en la leptina o la deficiencia del receptor de leptina, a pesar de que ninguna de estas contribuye de forma importante a la DM2 en humanos.<sup>134</sup> Los ratones modificados genéticamente para carecer de determinados genes de señalización de la insulina también son modelos deficientes. Por ejemplo, los ratones con una eliminación completa del receptor de insulina mueren a los pocos días de nacer, mientras que los humanos con esta rara afección pueden sobrevivir hasta la edad de 2 años.<sup>132</sup> En general, los fenotipos observados en estos y otros modelos similares de diabetes en animales son solo “secundarios a mutaciones genéticas que no reflejan la etiología de la enfermedad en humanos”.<sup>134</sup>

En su publicación de 2018, Ali, Chandrasekera y Pippin analizaron una gran cantidad de métodos relevantes para estudiar la diabetes y enfatizaron la necesidad de centrarse en la biología humana para la investigación de la diabetes humana:

A medida que seguimos descubriendo importantes diferencias entre especies en factores que afectan a la biología de la glucosa, como la división celular, el acoplamiento estímulo-secreción y las interacciones autocrinas-paracrinas... se hace incuestionable que la **nueva información debe derivarse exclusivamente de células, tejidos y órganos primarios humanos**, obtenidos de controles no pacientes y de pacientes en las distintas fases progresivas de la DM2... Si el objetivo esencial de la comunidad que investiga la diabetes es comprender los mecanismos de la enfermedad que conduzcan a una mejor prevención de

la DM2 y a mejores resultados terapéuticos para los pacientes, entonces, la mejor forma de conseguirlo es priorizar la investigación centrada en el ser humano.<sup>135</sup> [Énfasis añadido]

Entre las alternativas al uso de animales que son relevantes para los humanos en la investigación de la diabetes se incluyen la obtención de imágenes humanas, la tecnología *in vitro* con líneas celulares heterólogas humanas, las células madre pluripotentes inducidas humanas, el cultivo celular tridimensional organotípico, el uso de órganos humanos *ex vivo*, el tejido humano *post mortem*, los estudios de imagen no invasivos, los estudios epidemiológicos y genéticos en humanos (incluidas la nutrigenómica y la nutrigenética), y modelos *in silico*.<sup>131,135</sup> Por ejemplo, científicos de la Universidad de Glasgow Caledonia usaron células humanas de un banco de tejidos para generar modelos de cicatrización de heridas para pacientes diabéticos, quienes tienen dificultades para cicatrizar y controlar las infecciones cutáneas.<sup>136</sup> Además, la FDA aprobó una bomba de insulina de circuito cerrado desarrollada mediante modelado *in silico* como sustituto de las pruebas en animales, lo que constituye solo un ejemplo de cómo “[l]a simulación realista por computador es capaz de proporcionar información invaluable sobre la seguridad y las limitaciones de los algoritmos de control de circuito cerrado, orientar los estudios clínicos y superar los escenarios de control ineficaces de forma rentable”.<sup>137</sup> Los modelos *in silico* se están usando para evaluar rápidamente posibles productos naturales y farmacéuticos para la DM2.<sup>138,139</sup> Numerosos investigadores están usando sistemas de microfluidos de “islote-en-chip” para estudiar los mecanismos de la enfermedad y probar agentes terapéuticos.<sup>140-142</sup>

## Inflamación e inmunología

### Recomendación: Poner fin al uso de animales.

El uso de animales en estudios de inflamación e inmunología humanas abarca una gran cantidad de investigación básica y relacionada con las enfermedades. Aquí analizaremos brevemente tres áreas principales: el uso de animales para la investigación del VIH/sida, el uso de ratones para la investigación inmunológica humana y el uso de animales para estudiar la sepsis humana.

### VIH/sida

El fracaso para traducir los experimentos en animales en una aplicación útil de vacunas contra el VIH/sida en humanos se reconoció hace cerca de 30 años. En 1995, los NIH establecieron una moratoria a la reproducción de chimpancés, el animal más usado en la investigación del VIH/sida en aquel momento, dado el fracaso de los estudios en esta especie para producir datos clínicamente útiles en este

campo. Tras el reconocimiento por parte de los NIH de que los chimpancés no son sustitutos humanos relevantes para esta investigación, los experimentadores empezaron a usar otras especies de primates no humanos, en particular macacos.

Dado que los humanos son los únicos primates que contraen el VIH y desarrollan sida, los experimentadores infectan a los monos con el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS), un virus exclusivo de los primates africanos. La homología genética entre el VIH y el VIS es solo del 55 %, y el VIS es menos diverso genéticamente que el VIH.<sup>143,144</sup> Debido a las diferencias en las proteínas de superficie y otros marcadores moleculares, los anticuerpos que neutralizan el VIS no tienen efecto sobre el VIH, y viceversa,<sup>145</sup> lo que los hace inútiles en la investigación del VIH. Es importante destacar que la dosis de VIS administrada a primates no humanos en experimentos suele ser mucho mayor que la cantidad típica de VIH-1 a la que se expone un ser humano durante la transmisión sexual.<sup>146</sup> A veces, los experimentadores usan una mezcla manipulada de VIS y VIH. Mark Girard, un investigador en sida, señaló que “[h]ay que darse cuenta de que todavía no sabemos cómo se compara el modelo del VIS o el VISH con la infección por VIH en humanos. Extrapolar los resultados de protección de la vacuna en estudios con primates no humanos a la eficacia en seres humanos puede ser engañoso”.<sup>147</sup>

En una revista científica, un experimentador en animales del Centro Nacional de Investigación de Primates de Washington admitió que los modelos de primates no humanos del VIH “no permiten probar directamente las vacunas contra el VIH” y que “debido a la complejidad y las limitaciones de los modelos de primates no humanos, sigue siendo difícil extrapolar datos de estos modelos para aportar al desarrollo de vacunas contra el VIH”.<sup>148</sup> Aunque se han desarrollado docenas de vacunas experimentales usando monos, solo cinco de estas han llegado hasta los ensayos en humanos, y todas han fracasado.<sup>149</sup> Una de estas vacunas incluso aumentó la probabilidad de infección por VIH en humanos.<sup>150</sup> Después de que uno de los ensayos de vacunas en humanos fracasara en 2018, Anthony Fauci, entonces director del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de EE. UU., reconoció que los resultados positivos originales de un estudio con macacos “podrían ser una casualidad”.<sup>151</sup>

Debido a los numerosos fracasos de la investigación sobre el VIH/sida en primates no humanos, los experimentadores se han centrado en los ratones, una especie aún más alejada genéticamente de los humanos. El modelo de ratón “humanizado” para la investigación del VIH/sida es un ratón parcialmente repoblado por células inmunitarias humanas, lo que permite infectar al animal con el VIH-1. Sin embargo, los ratones humanizados tienen una longevidad limitada con



la enfermedad y conservan parte de su sistema inmunitario murino, lo que “complica las interpretaciones de la respuesta inmunitaria”.<sup>145</sup> No es sorprendente que el uso de ratones humanizados tampoco haya generado resultados útiles para el tratamiento clínico del VIH/sida.

Teniendo en cuenta las diferencias entre las características de un laboratorio y la sociedad humana, es claro que los experimentos en animales nunca captarán la complejidad de esta enfermedad humana. Las ratas y los ratones usados en experimentos se mantienen en condiciones en las que los principales patógenos presentes son los de sus propias heces, y los cofactores que pueden estar presentes en pacientes humanos, como otras infecciones microbianas, están ausentes, lo que altera significativamente la adquisición y la evolución del virus.<sup>143</sup> Por otra parte, se ha descubierto que los primates no humanos usados en la investigación del VIH albergan otras infecciones, como la coccidioidomycosis aguda, que comprometen los resultados cuando estos animales se usan en estudios sobre el VIH.<sup>152</sup>

Investigadores de la Universidad Emory, en Atlanta, afirmaron que “la persistencia del VIH es un fenómeno virológico e inmunológico muy complejo, con infección de diversos tipos de células en una amplia gama de tejidos anatómicos que son regulados de forma diferente”,<sup>153</sup> y reconocieron que se necesitan modelos humanos *in vitro* para replicar esta enfermedad humana y desarrollar un tratamiento. Científicos del Reino Unido señalaron que “[l]os modelos animales existentes que predicen traslaciones clínicas son simplistas, altamente reduccionistas y, por lo tanto, no son adecuados para su propósito”, y agregaron que los datos de deserción clínica “vuelven a centrar la atención en la selección temprana de objetivos/prototipos moleculares, pero también cuestionan la idoneidad de los modelos animales actuales con respecto a la congruencia con los hallazgos para los huéspedes humanos y su extrapolación”.<sup>154</sup>

Los científicos admiten que, incluso después de experimentos costosos y poco confiables en animales, siguen haciendo falta datos en humanos para determinar si un fármaco es apto para el ámbito clínico. Rao y Alving, del Programa de Investigación Militar sobre el VIH de EE. UU., afirmaron que “los ensayos clínicos en humanos siguen siendo la única forma confiable de determinar si una vacuna experimental contra el VIH tendrá actividad o eficacia en humanos”.<sup>155</sup> Científicos de Australia, Francia, Italia y el Reino Unido han estado estudiando las células inmunitarias de individuos llamados “controladores del VIH”, quienes pueden infectarse con el VIH pero son capaces de controlar la propagación del virus sin ningún tratamiento.<sup>156</sup> La esperanza es que las células inmunitarias de los controladores del VIH puedan transferirse a personas infectadas con el VIH para ayudarlas a combatir el virus. Esta prometedora investigación es

específica para el ser humano y requiere métodos de ensayo basados en la biología humana.

Otros ejemplos recientes de investigación sobre el VIH sin animales incluyen el uso de simulaciones interactivas en realidad virtual de la dinámica molecular para predecir exactamente cómo se unen las moléculas de los fármacos a las proteínas del VIH,<sup>157</sup> técnicas innovadoras de imagen que abren la posibilidad de nuevos tratamientos al descubrir aspectos desconocidos de la estructura del VIH,<sup>158</sup> y análisis bioinformáticos de muestras de individuos con presencia del virus en la sangre y células de donantes sanos infectadas *in vitro* para construir un atlas de los fenotipos de las células susceptibles al VIH.<sup>159</sup>

Sydney Brenner, ganador del premio Nobel, señaló que “[y]a no tenemos que buscar organismos modelo porque nosotros somos el organismo modelo”.<sup>160</sup> Del mismo modo, en 2007, el editor asociado de *The BMJ* afirmó que “[c]uando se trata de probar vacunas contra el VIH, solo sirven los seres humanos”.<sup>161</sup>

## Immunología en ratones

Gracias al desarrollo de herramientas que permiten manipular el genoma del ratón, esta especie es la más usada en experimentación en todo el mundo. Sin embargo, no debería sorprender que este uso desenfadado venga acompañado de pruebas sustanciales de que los ratones no son iguales a los humanos y que hay áreas particulares en las que las diferencias abismales en la fisiología entre las dos especies descalifican el uso de ratones como sujetos de investigación. Uno de los campos más destacados en esta categoría es la inmunología.

*The Journal of Immunology* publicó en 2004 una revisión contundente sobre las numerosas diferencias entre el sistema inmunitario del ratón y el de los humanos, como la anatomía del tejido linfoide, las proporciones de los tipos de glóbulos blancos, los perfiles de péptidos antimicrobianos, los perfiles y funciones de las citocinas, los mecanismos de interacción entre los sistemas inmunitarios adaptativo e innato, los subtipos de anticuerpos, el desarrollo y la regulación de los linfocitos y la activación de los factores de coagulación.<sup>162</sup> Otros análisis se han publicado desde entonces en los que se detallan las numerosas diferencias entre los sistemas inmunitarios de ambas especies.

Un estudio publicado en 2014 halló diferencias fundamentales entre las especies en la respuesta inmunitaria innata y señaló que “mientras que en la sangre humana predominan los mecanismos de resistencia inmunitaria, en la sangre de ratón dominan los mecanismos de tolerancia en la defensa contra microorganismos patógenos”.<sup>163</sup> Lógicamente, estas diferencias tienen sentido: los seres humanos “no vivimos

con la cabeza a media pulgada del suelo”,<sup>164</sup> y tenemos una esperanza de vida considerablemente mayor y un tamaño corporal mayor que los ratones.<sup>162,163</sup> Como afirman de forma concisa Leist y Hartung, “los seres humanos no son ratones de 70 kg”.<sup>164</sup> A pesar del evidente contraste, se siguen usando ratones para la investigación inmunológica.

El uso de ratones como modelo de infección por influenza (IFV) ha sido fuertemente criticado: “Hay... una serie de inconvenientes en el modelo [de ratón] que lo hacen inadecuado para abordar ciertas preguntas virológicas y pueden dificultar la traslación de los datos obtenidos en ratones a la situación humana”.<sup>165</sup> La infección viral es particular a cada especie y los ratones no pueden contraer de forma natural el virus de la influenza humano. Para evitar este problema, los experimentadores han alterado la cepa de los ratones y la cepa de los virus usados. Por ejemplo, el ratón BALB/c es muy susceptible a la infección viral debido a la falta del gen MX1, que codifica la proteína Mx1 que puede inhibir selectivamente la replicación del IFV.<sup>166</sup> La dosis letal de una cepa mortal del IFV (H5N1) es alrededor de 100 veces menor en los ratones BALB/c que en los ratones silvestres.<sup>167</sup> Los ratones BALB/c no poseen heterogeneidad genética ni una función inmunitaria adecuada para la investigación virológica.

Los virus usados en estudios en animales suelen adaptarse mediante pases sucesivos en los huéspedes objetivo (ratones, en este caso) para facilitar la infección.<sup>165</sup> Esto se debe a que los receptores humanos del IFV (ácidos siálicos en enlace α2,6) no abundan en las vías respiratorias superiores de los ratones, quienes tienen un receptor diferente (ácidos siálicos en enlace α2,3).<sup>168</sup> Mediante los pases en serie, el virus puede adaptarse al nuevo huésped y diferenciarse del tipo que afecta predominantemente a los humanos.

Existen muchas más diferencias entre ratones y humanos en cuanto a la progresión del IFV. Por ejemplo, los ratones sufren hipotermia en lugar de fiebre después de la infección,<sup>169</sup> no tosen ni estornudan,<sup>165</sup> y no pueden transmitir el virus entre ellos.<sup>170</sup> Por otra parte, ahora sabemos que la microbiota intestinal está íntimamente ligada al sistema inmunitario<sup>171</sup> y diversos estudios han demostrado diferencias drásticas entre los microbiomas de humanos y ratones. Por ejemplo, el 85 % de las especies bacterianas de los ratones no existe en los seres humanos.<sup>172</sup> Toda esta evidencia respalda la inaplicabilidad de la inmunidad del ratón a la inmunidad humana.

Teniendo en cuenta el evidente fracaso de los ratones como sustitutos en el estudio del sistema inmunitario humano, es necesario invertir en modelos *in vitro* e *in silico* relevantes para los humanos. Los avances en la recopilación de datos y los análisis computarizados han permitido el desarrollo de modelos multiescala relevantes para los humanos que “pueden integrar consistentemente datos inmunológicos generados en

varias escalas y pueden usarse para describir y optimizar los tratamientos... de enfermedades inmunitarias complejas”.<sup>173</sup>

Para estudiar la respuesta de la barrera hematoencefálica humana a la neuroinflamación, investigadores de la Universidad Vanderbilt usaron un dispositivo microfluídico de barrera hematoencefálica de doble cámara llamado unidad neurovascular.<sup>174</sup> Científicos alemanes desarrollaron un modelo por computador que les permitió evaluar, por primera vez, el efecto electrofisiológico de la acidosis en las células inmunitarias humanas que acompaña a la mayoría de las formas de inflamación.<sup>175</sup> Además, una matemática de la Universidad de Tennessee-Knoxville y especialistas en cirugía e inmunología de la Universidad de Pittsburgh usaron un modelo matemático para caracterizar las respuestas inmunitarias humanas durante el trasplante de órganos.<sup>176</sup>

Una reseña que resume el desarrollo de los modelos inmunocompetentes de enfermedades cutáneas humanas reconoce que los fracasos de los estudios en animales para traducirse en tratamientos eficaces para enfermedades como la fibrosis, la psoriasis, el cáncer, la alergia de contacto y las enfermedades autoinmunes se debe, en parte, a la naturaleza inmunitaria de estas afecciones. Los autores describen cómo los cocultivos, los sistemas de organotipos tridimensionales y la tecnología de órganos-en-chip “permitirán crear modelos humanos de complejidad bien controlada, que arrojarán datos detallados y confiables, y así proporcionarán una solución adecuada para el proceso de desarrollo de fármacos”.<sup>177</sup>

## Septicemia

La septicemia es una condición potencialmente mortal causada por la respuesta del organismo a una infección. Los datos de incidencia mundial más recientes muestran que la septicemia afectó a unos 48.9 millones de personas en todo el mundo y causó 11 millones de muertes en 2017.<sup>178</sup> Es una de las principales causas de muerte en los hospitales de EE. UU. y es una de las afecciones más costosas de tratar.<sup>179,180</sup>

Los ratones son los animales más usados en la investigación de la septicemia, no porque sean buenos modelos de esta condición, sino porque son baratos, abundantes, pequeños y dóciles.<sup>181</sup> Se cree que la dificultad para aplicar de forma confiable los resultados de los ratones a los humanos es una de las principales causas del fracaso de prácticamente todos los ensayos de tratamientos de la septicemia en humanos.

En 2013, la revista *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* publicó un estudio crucial que tardó 10 años en realizarse y que contó con la colaboración de 39 investigadores de instituciones de toda Norteamérica, entre ellas la Universidad de Stanford y la Facultad de Medicina de Harvard. El Dr. Junhee Seok y

sus colegas compararon los datos obtenidos de cientos de pacientes humanos con los resultados de experimentos en animales para demostrar que, cuando se trata de afecciones inflamatorias graves como la septicemia, las quemaduras y los traumatismos, los humanos y los ratones no tienen respuestas genéticas similares.<sup>182</sup>

El Dr. Francis Collins, exdirector de los NIH, escribió un artículo sobre estos resultados en el que lamentaba el tiempo y los recursos invertidos en el desarrollo de 150 fármacos que habían tratado con éxito la septicemia en ratones, pero habían fracasado en los ensayos clínicos en humanos. Collins calificó este desastre como “una pérdida desgarradora de décadas de investigación y miles de millones de dólares”.<sup>183</sup> El artículo de *PNAS* revela que muchos de los mismos genes en los humanos están implicados en la recuperación de la septicemia, las quemaduras y los traumatismos, pero que era “casi al azar” que genes de ratón podrían coincidir con estos perfiles. Collins lo explica así:

Sin embargo, parece que los ratones usan distintos conjuntos de genes para hacer frente a los traumatismos, las quemaduras y las toxinas bacterianas. Cuando los autores compararon la actividad de los genes humanos de la septicemia, los traumatismos y las quemaduras con la de los genes de ratón equivalentes, se observó muy poca superposición. No es de extrañar que los fármacos diseñados para los ratones fracasaran en humanos: en efecto, ¡trataban condiciones diferentes!<sup>183</sup>

Incluso antes de este histórico estudio, las críticas a los modelos de ratón se habían documentado en más de 20 artículos científicos. Los ratones usados en los experimentos de septicemia son jóvenes, endogámicos y de la misma edad y peso, y viven en entornos que están, en su mayoría, libres de gérmenes. Por el contrario, son sobre todo los lactantes y los adultos mayores, quienes viven en una variedad de entornos impredecibles y no estériles, quienes desarrollan septicemia.<sup>184,185</sup> Cuando los experimentadores inducen la enfermedad en ratones, la aparición de los síntomas se produce en cuestión de horas o días, mientras que en los humanos tiene lugar en cuestión de días o semanas. A los ratones no se les suele proporcionar el tratamiento de apoyo que reciben los pacientes humanos, como fluidos, vasopresores y respiradores.<sup>186</sup> A diferencia de los humanos, a los ratones rara vez se les proporcionan medicamentos para aliviar el dolor,<sup>187</sup> otra diferencia que socava datos de valor ya cuestionable, pues el dolor afecta otros procesos fisiológicos.

El método de “referencia” para inducir la septicemia en ratones es la ligadura y punción cecal, un procedimiento en el que los experimentadores abren el abdomen de un ratón y perforan sus intestinos con una aguja antes de volver a coser al animal. Sin embargo, las respuestas de los ratones a este procedimiento varían en función de la edad, el sexo, la cepa, el laboratorio, el tamaño de la aguja usada y el tamaño de la incisión, lo que hace que los resultados sean incomparables entre laboratorios.<sup>188</sup> Además, el procedimiento causa la formación de un absceso, cuyos efectos pueden disimular o quedar disimulados por los efectos de la septicemia



misma.<sup>186</sup> Esto significa que una intervención que parece ser beneficiosa para la septicemia puede serlo en realidad solo por sus efectos sobre el absceso.

También se han usado ratas, perros, gatos, cerdos, ovejas, conejos, caballos y primates no humanos, incluidos babuinos y macacos, en experimentos de septicemia. Ninguna de estas especies reproduce todas las características fisiológicas de la septicemia humana. Las respuestas de la presión arterial pulmonar de cerdos y ovejas difieren de las de los humanos, por lo que este aspecto de la septicemia no puede compararse entre estas especies.<sup>189</sup> Además, los babuinos y los ratones son menos sensibles a una especie de bacteria comúnmente usada para inducir la septicemia en entornos experimentales.<sup>190</sup> Un estudio encontró que los macacos *Rhesus* y los babuinos difieren notablemente en su respuesta inmunitaria innata a los patógenos en comparación con los humanos.<sup>191</sup>

Un informe de 2019 del grupo de trabajo sobre septicemia del National Advisory General Medical Sciences Council (NAGMSC) señala que “[a] pesar de décadas de estudio intensivo de los mecanismos subyacentes de esta afección, no ha surgido ningún fármaco nuevo ni ninguna tecnología de diagnóstico significativamente nueva. Decenas de ensayos prospectivos de fármacos o estrategias dirigidos a la base inflamatoria de la septicemia han fracasado”.<sup>192</sup> El informe recomendó que el Instituto Nacional de Ciencias Médicas Generales (NIGMS), que depende de los NIH, “reequilibrara” su cartera de financiamiento de la investigación sobre la septicemia para “incluir un enfoque más clínico”.<sup>192</sup> Tras el informe del NAGMSC, el NIGMS indicó su intención de apoyar más investigaciones sobre la septicemia que “usen enfoques nuevos y emergentes, como la informática clínica, los análisis computarizados y los modelos predictivos en pacientes y nuevas aplicaciones de técnicas bioanalíticas de alta resolución y alto impacto a materiales obtenidos de pacientes con septicemia” y calificó de “baja prioridad” al apoyo de “estudios que usen modelos de septicemia en roedores”.<sup>193</sup> En otras palabras, el NIGMS pretende dar prioridad al financiamiento de la investigación de la septicemia relevante para los humanos en lugar de financiar experimentos en animales.

En 2015, un grupo de trabajo de expertos formado por veterinarios, tecnólogos animales y científicos publicó un informe sobre la aplicación de las 3R en la investigación de la septicemia.<sup>194</sup> El grupo señaló varios métodos que podrían usarse en lugar de los modelos animales, como los modelos de cultivo celular *in vitro* para estudiar los mecanismos de la septicemia, la biología de sistemas y computacional para exponer los procesos inflamatorios que tienen lugar durante la septicemia, los modelos de cultivo celular tridimensionales para explorar la progresión de la enfermedad humana y

los mecanismos de la enfermedad infecciosa, los modelos humanos sintéticos para recrear tipos de células y tejidos humanos relacionados con la enfermedad, y la información genómica humana para descubrir cómo afecta la septicemia a los individuos de manera diferente y qué grupos pueden tener mayor riesgo. Los autores afirman que la información genómica “complementará o incluso reemplazará la necesidad de modelos de ratón en el descubrimiento de enfermedades y el desarrollo de fármacos”.<sup>194</sup>

Los siguientes son ejemplos de avances recientes, relevantes para los humanos, en la investigación de la septicemia:

- Médicos intensivistas del Hospital Brigham and Women’s y de la Facultad de Medicina de Harvard se asociaron con ingenieros mecánicos de la República de Corea para crear una plataforma de análisis sofisticada que puede usarse para controlar cada hora la función de los glóbulos blancos de pacientes con septicemia junto a su cama, una “necesidad fundamental pero no cubierta para el manejo de muchos pacientes de cuidados intensivos”.<sup>195</sup>
- Investigadores de Jena, Alemania, usaron un modelo de hígado-en-chip humano para descubrir un nuevo biomarcador que desempeña una función en la fisiopatología de la septicemia y, potencialmente, en la disfunción hepática posterior.<sup>196</sup>
- Médicos del Hospital de Niños de Cincinnati apoyan el uso de dispositivos microfluídicos para estudiar la septicemia en bebés, cuyas células podrían capturarse a partir de una cantidad muy pequeña de sangre.<sup>197</sup>
- Dado que la detección precoz de la septicemia es probablemente el factor más importante para reducir la mortalidad por esta afección,<sup>198</sup> investigadores de todo el mundo están explorando diferentes herramientas de inteligencia artificial y aprendizaje automático para ayudar en la predicción y el diagnóstico precoz de la septicemia.<sup>199-201</sup>

## Regeneración nerviosa

### Recomendación: Poner fin al uso de animales.

Se han desarrollado muchos fármacos neuroprotectores que tienen éxito en el tratamiento de la lesión de la médula espinal (LME) en modelos animales, pero los ensayos clínicos han sido decepcionantes. La neuróloga Aysha Akhtar ha descrito tres razones principales de este fracaso: “diferencias en el tipo de lesión entre la LME inducida en laboratorio y la LME clínica, dificultades para interpretar el resultado funcional en animales y diferencias en la fisiopatología de la LME entre especies y cepas”.<sup>202</sup> En su revisión sistemática del uso de modelos animales para estudiar la regeneración nerviosa en andamios de tejido diseñado, Angius y sus colegas señalaron que “[l]a gran mayoría de los biomateriales



usados en modelos animales no ha recibido autorización para probarse en ensayos clínicos a pesar del beneficio casi uniforme descrito en los artículos experimentales”.<sup>203</sup> Los autores lamentaron la baja calidad de los experimentos en animales descritos, ya que se había omitido información fundamental y esto dificulta la comparación de los datos.

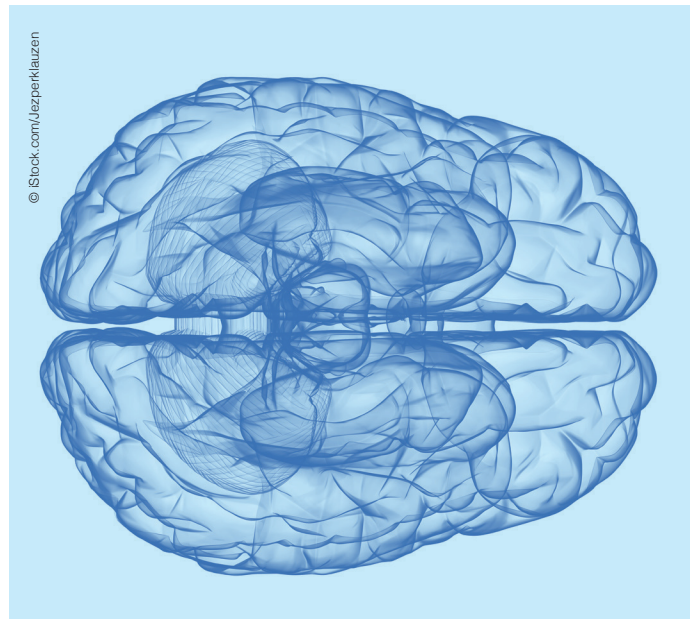
Por ejemplo, la metilprednisolona, un tratamiento de uso habitual para la LME aguda, ha generado resultados inconsistentes en modelos animales. Una revisión sistemática que examinó 62 estudios del fármaco en una amplia variedad de especies, desde roedores hasta monos, encontró que el 34 % de los estudios informaba de resultados beneficiosos, el 58 % de ningún efecto y el 8 % de resultados mixtos.<sup>204</sup> Los resultados eran inconsistentes entre especies, dentro de la misma especie e incluso dentro de la misma cepa. Además, la variabilidad de los resultados se mantuvo incluso cuando se controlaron muchas de las variables de diseño y procedimiento del estudio. Los autores señalaron numerosas diferencias intrínsecas y limitaciones de cada especie/modelo y sugirieron que, como resultado de estas diferencias inmutables entre e intraespecies, no se puede desarrollar ningún modelo animal relevante para los humanos. Así, concluyeron que “el énfasis de la investigación debe hacerse en el desarrollo y el uso de métodos validados basados en humanos”.<sup>204</sup>

Entre las especies, las ratas son especialmente inadecuadas para la investigación de la reparación o regeneración nerviosa. Los expertos han señalado tres grandes problemas con los modelos de ratas en este campo:

(1) En la actualidad, la mayoría de los datos sobre regeneración nerviosa se produce en ratas, lo que puede sesgar los resultados del tratamiento y llevar a una evaluación inadecuada de los riesgos y beneficios. (2) La rata es un modelo particularmente deficiente para la reparación de defectos de brecha críticos en humanos debido tanto a su pequeño tamaño como a su perfil neurobiológico regenerativo propio de la especie. (3) La traslación de la rata al ser humano ha demostrado ser poco confiable para la regeneración nerviosa, al igual que para muchas otras aplicaciones.<sup>205</sup>

En particular, las inconsistencias entre los modelos animales y el entorno clínico incluyen las siguientes:

(1) animales sanos frente a pacientes enfermos; (2) brechas cortas frente a largas (la necesidad clínica de reparaciones de brecha *grandes*, mientras que el 90 % de los estudios *in vivo* se realiza en ratas y conejos donde las longitudes de brecha suelen ser  $\leq 3$  cm); (3) modelos animales que casi siempre emplean autoinjertos *sensoriales-motores mixtos*



para reparar defectos mixtos, frente a reparaciones clínicas que casi siempre implican autoinjertos *sensoriales* (normalmente nervio sural) para reparar defectos mixtos; (4) zonas anatómicas protegidas en modelos animales, frente a reparaciones que a menudo deben atravesar articulaciones en humanos; y (5) cepas animales y edades altamente endogámicas y homogéneas, frente a poblaciones y edades diversas de pacientes: es bien sabido que los modelos animales no logran imitar la condición humana en términos de la *uniformidad* de los sujetos animales usados.<sup>205</sup>

Mobini y sus colegas ingenieros biomédicos de la Universidad de Florida, agregan que “[s]omos incapaces de imitar verdaderamente las lesiones neurales humanas en modelos animales debido a las grandes diferencias anatómicas, funcionales, moleculares, inmunitarias y patológicas entre los humanos y los animales con frecuencia estudiados”.<sup>206</sup> Los métodos relevantes para los humanos, como las células madre humanas y la investigación clínica, pueden superar estas limitaciones y deberían ser el foco de la investigación.

Diversos grupos de investigación han examinado métodos relevantes para los seres humanos para estudiar las lesiones y la regeneración nerviosas, que incluyen organoides humanos, dispositivos microfluídicos, andamios de tejidos humanos diseñados, bioimpresión y otros usos *in vitro* de células humanas. Los modelos *ex vivo*, como los que usan andamios tridimensionales diseñados, biorreactores, neuroesferas y organoides, permiten realizar estudios más controlados sobre parámetros específicos que los experimentos en animales.<sup>206</sup> La bioimpresión puede usar biotintas que contienen células y materiales humanos para construir modelos de tejidos heterogéneos en un solo paso y con gran consistencia,<sup>207</sup> un aspecto de la investigación sobre la regeneración nerviosa que



ha estado particularmente ausente en los modelos animales.<sup>203</sup>

Shrirao y sus colegas de la Universidad de Rutgers recomiendan los dispositivos microfluídicos, que son “adaptables para modelar una amplia gama de lesiones” y proporcionan ventajas sobre los experimentos tradicionales *in vivo* e *in vitro* al “permitir a los investigadores (1) examinar el efecto de la lesión en componentes neuronales específicos, (2) aislar mediante fluidos regiones neuronales para examinar efectos específicos en componentes subcelulares, y (3) crear de forma reproducible una variedad de lesiones para modelar LCT [lesiones cerebrales traumáticas] y LME”.<sup>208</sup> Por ejemplo, científicos de la empresa de biotecnología MIMETAS, en colaboración con científicos de la Universidad de Leiden y la Universidad de Utrecht, desarrollaron un modelo tridimensional de motoneurona usando motoneuronas derivadas de células madre pluripotentes inducidas que permite el crecimiento dirigido de axones y la separación de los axones del soma y las dendritas para avanzar en el estudio de la enfermedad de las neuronas motoras y los mecanismos de regeneración nerviosa.<sup>209</sup> Investigadores del Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas han desarrollado organoides cerebrales que pueden usarse para estudiar cambios patológicos específicos en humanos derivados de LCT. Su modelo se usa para simular los procedimientos de impacto cortical controlado que suelen emplearse para crear LCT en roedores y otros animales.<sup>210,211</sup> Mobini y sus colegas señalan que los microfluidos ofrecen

ventajas en cuanto a precisión, escalabilidad y rentabilidad en comparación con el cultivo celular tradicional o los experimentos en animales, y que dichos dispositivos están actualmente en el mercado y disponibles para la investigación en medicina regenerativa neural.<sup>206</sup>

## Enfermedades neurodegenerativas

### Recomendación: Poner fin al uso de animales.

Existen suficientes artículos científicos que documentan los fracasos de diversos modelos animales de enfermedades neurodegenerativas como para escribir un extenso apéndice sobre cada una de estas, incluyendo las enfermedades de Alzheimer (EA), Parkinson (EP) y Huntington (EH) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Sin embargo, dado que muchas de las mismas limitaciones de los modelos animales impiden la traslación entre estas afecciones, se discutirán brevemente en conjunto. Por un lado, todas estas enfermedades son específicas del ser humano, lo que significa que ninguna de ellas se da de forma natural en otros animales. No se ha desarrollado ningún modelo animal que recapitule todos los aspectos de una enfermedad neurodegenerativa particular.<sup>212</sup> Para la investigación de la EA, la tasa de fracaso clínico de los nuevos fármacos es del 99.6%.<sup>213</sup> Esto incluye el fracaso en 2018 del medicamento Lanabecestat, de AstraZeneca y Eli Lilly, que fue aclamado como extremadamente prometedor, pero resultó inútil.<sup>214</sup>

En un análisis bioinformático en el que se compararon las firmas transcripcionales de la EA, la EP, la EH y la ELA humanas con modelos en ratones de estas enfermedades, científicos de Stanford hicieron el siguiente hallazgo:

[L]a mayoría de los modelos de ratón disponibles de enfermedades neurodegenerativas no logra recapitular las alteraciones transcripcionales más destacadas de la neurodegeneración humana e... incluso los mejores modelos disponibles muestran diferencias significativas y reproducibles en comparación con la neurodegeneración humana. Aunque las razones del mal desempeño transcripcional de los modelos de ratón variaron, el tema unificador fue el fracaso de los modelos de ratón para exhibir la variedad y gravedad de los diversos defectos observados en la neurodegeneración humana.<sup>215</sup>

Estas discrepancias moleculares resaltan las formas artificiales en las que dichos modelos son creados. A menudo se causan lesiones físicas y químicas y se administran toxinas de forma sistémica, que son factores estresantes agudos y no procesos degenerativos a largo plazo. Por esta razón, estos procedimientos dan lugar a eventos en los modelos animales que no están presentes en los pacientes humanos. La naturaleza aguda e inmediata de determinados modelos de enfermedad, como los modelos 6-OHDA y MPTP de la EP y el modelo 3-NP de la EH, no consigue captar el carácter progresivo de los trastornos que pretenden imitar. Además, es habitual que los científicos usen animales jóvenes, tanto roedores como primates, para “modelar” enfermedades asociadas al envejecimiento,<sup>216</sup> lo que reduce aún más la probabilidad de que sus observaciones sean útiles para los humanos.

Los modelos de ratón genéticamente modificados de enfermedades neurodegenerativas muestran una gama inconsistente de fenotipos patológicos y conductuales, en parte debido a los transgenes usados, las inconsistencias en la inserción y expresión de los transgenes y las cepas originarias de los ratones.<sup>217</sup> El modelo genético de ratón de ELA más comúnmente usado (modelo SOD1), se basa en un gen que representa solo el 3 % de los casos de ELA en la población humana.<sup>217</sup> Las revisiones de los artículos científicos han concluido que los hallazgos de este modelo no se han traducido en ningún tratamiento efectivo para la ELA en humanos, que “una estimación sesgada de la eficacia del tratamiento en animales puede llevar a ensayos clínicos innecesarios (y posiblemente dañinos) en humanos”,<sup>218</sup> y que “los modelos animales no son un sistema ideal para estudiar la ELA o para desarrollar tratamientos farmacológicos”.<sup>219</sup> En la EP, incluso los estudios con primates no humanos no

“constituyen una modalidad científica válida para entender completamente la EP y desarrollar futuras estrategias terapéuticas de neuromodulación”.<sup>220</sup>

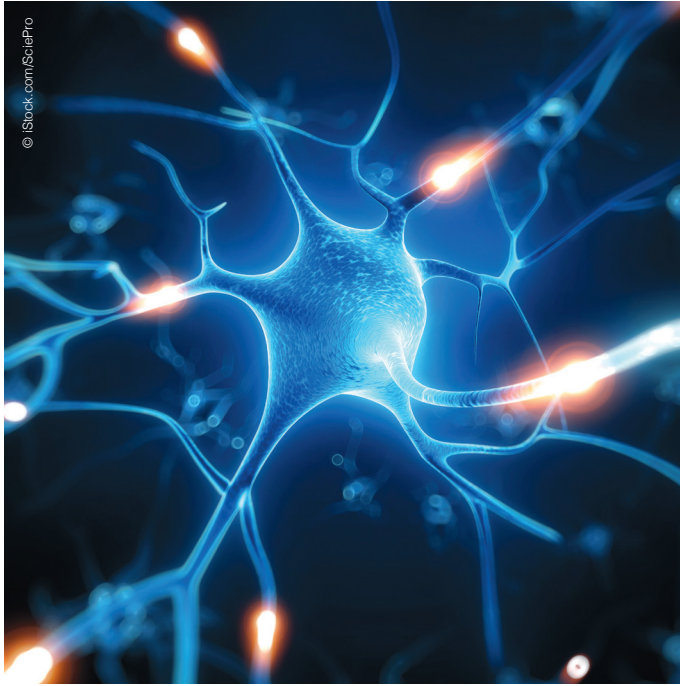
Como ocurre en gran parte de la investigación biomédica, los sujetos animales sufren mucho cuando se usan para imitar enfermedades neurodegenerativas. En un análisis de las investigaciones publicadas sobre modelos animales de la EH, 51 estudios hacían referencia a experimentos “en los que se esperaba que los animales presentaran déficits motores tan graves que tuvieran dificultades para comer y beber con normalidad”.<sup>221</sup> Sin embargo, solo tres de estos estudios reportaron haber adaptado el alojamiento de los animales para facilitar su ingesta de comida y agua. Los autores de este análisis llegaron a la conclusión de que los experimentadores no están siguiendo el principio de las 3R (reemplazo, reducción y refinamiento del uso de animales) y, al no hacerlo, están comprometiendo no solo el bienestar de los animales, sino también la relevancia de sus estudios para la EH.<sup>221</sup>

A medida que los estudios en animales han resultado deficientes, la comunidad científica y las personas responsables de las políticas públicas se han dado cuenta de que las estrategias de investigación deben ser más relevantes para los seres humanos. Tras una revisión de la investigación sobre la EA, un grupo interdisciplinario recomendó que los fondos empleados para financiar estudios en animales se redirijan hacia técnicas más prometedoras, como los modelos creados a partir de células madre pluripotentes inducidas derivadas de pacientes, la tecnología “ómica” (genómica, proteómica, etc.), los modelos *in silico*, la neuroimagen y los estudios epidemiológicos.<sup>222</sup> En la sección sobre accidente cerebrovascular encontrará información acerca de los avances en la investigación sobre la barrera hematoencefálica humana, que fomentarán el progreso científico en el desarrollo de tratamientos para las enfermedades neurodegenerativas humanas.

A continuación, se exponen los aspectos más destacados de la investigación de vanguardia y relevante para los humanos sobre la EA:

- Científicos del Centro Médico Southwestern de la Universidad de Texas identificaron la génesis de la patología de la proteína T en la EA, no mediante experimentos en animales, sino extrayendo proteínas de cerebros humanos y aislando moléculas individuales.<sup>223</sup>
- Usando recursos del Banco Nacional Chino de Cerebros Humanos para el Desarrollo y la Función, científicos de numerosas facultades de medicina de China analizaron los perfiles proteómicos de subcampos del hipocampo en tejidos cerebrales *post mortem* de individuos en distintas fases de deterioro cognoscitivo y neuropatológico. Su





investigación determinó que los cambios en la expresión de proteínas relacionadas con la mielina y los oligodendrocitos en algunos de estos subcampos pueden contribuir a la pérdida de mielina y al posterior deterioro cognoscitivo en la EA.<sup>224</sup>

- Gracias a los avances en la obtención de imágenes del cerebro humano, científicos de la Universidad de Cambridge pudieron detectar la proteína T en cerebros humanos.<sup>225</sup>
- Científicos húngaros y daneses usaron células madre derivadas de pacientes para comparar neuronas de cerebros de pacientes con EA esporádica con las de pacientes con la forma familiar de la enfermedad. Esta investigación descubrió similitudes y diferencias claves entre ambas patologías y concluyó que la tecnología de células madre es adecuada para modelar ambas formas de la enfermedad.<sup>226</sup>
- Investigadores del Instituto Karolinska de Suecia identificaron una huella molecular de la demencia presente en las sinapsis de cerebros de pacientes recolectados *post mortem* y sometidos a análisis proteómicos.<sup>227</sup>
- Un equipo de científicos de la Universidad de California–Los Ángeles y la Universidad de California–Irvine usó imágenes de TEP de 2-[18F]fluoro-3(2(S) azetidilmetoxi) piridina (2FA) para comparar la unión de receptores colinérgicos nicotínicos en regiones cerebrales de pacientes con EA, individuos con deterioro cognoscitivo leve y controles sanos de la misma edad e investigaron cómo las diferencias de unión se relacionaban con las capacidades cognoscitivas en estos grupos.<sup>228</sup>

La ingeniería biológica también está transformando la investigación de la ELA. Un equipo de investigadores del Laboratorio de Sistemas Híbridos Hickman de la Universidad de Florida Central (UCF) desarrolló una unión-neuromuscular-

en-chip humana, la primera de este tipo, que puede usarse para probar la toxicidad de fármacos diseñados para tratar enfermedades neuromusculares, como la ELA y la atrofia muscular espinal.<sup>229</sup> Cuando los investigadores probaron tres fármacos conocidos en este modelo, los resultados coincidieron con los datos de humanos vivos. Científicos de la Universidad de Harvard y del Laboratorio Nacional Lawrence Livermore también están usando la tecnología de cerebro-en-chip para estudiar cómo se comunican las neuronas y cómo la exposición a determinadas sustancias químicas puede afectar el cerebro humano a lo largo del tiempo.<sup>230,231</sup>

Las herramientas *in vitro* basadas en la biología humana también están haciendo avanzar significativamente la comprensión de la EP. Por ejemplo, investigadores de la Universidad Dongguk de Seúl y de la Universidad de Pensilvania han creado organoides tridimensionales del mesencéfalo de pacientes con EP asociada a LRRK2 que muestran un aumento de  $\alpha$ -sinucleína, un rasgo patológico de los pacientes con LRRK2 ausente en modelos animales.<sup>232</sup>

Durante muchos años, los experimentadores han atormentado a monos, ratones, perros y otros animales en un esfuerzo por crear fármacos para tratar estas devastadoras enfermedades. Sin embargo, dado que otros animales no contraen estas enfermedades humanas de forma natural, los experimentadores han manipulado sus genomas para forzar determinados síntomas. Los resultados, tras décadas de pruebas, incluyen más de 100 fármacos fallidos, un número incalculable de muertes de animales y el sufrimiento continuo de las víctimas humanas de la enfermedad. En el caso de estos pacientes, ya debería haberse producido un cambio a métodos relevantes para los seres humanos.

## Trastornos neuropsiquiátricos y neurodivergencia

### Recomendación: Poner fin al uso de animales.

Los modelos animales de trastornos neuropsiquiátricos y neurodivergencia carecen de los siguientes aspectos fundamentales de validez: (1) validez de constructo, es decir, que los fundamentos mecánicos que crean los síntomas observados en animales son diferentes de los que causan el trastorno en humanos; (2) validez aparente, es decir, que los animales carecen de la capacidad de “recapitular características anatómicas, bioquímicas, neuropatológicas o conductuales importantes de una enfermedad humana”;<sup>233</sup> y (3) validez predictiva, es decir, que los resultados de los experimentos en animales no se traducen de forma confiable en resultados similares en humanos. Ningún modelo animal es capaz de reproducir todos los aspectos de una condición particular y las características del comportamiento humano que representan el sello de identidad de estos trastornos no pueden producirse ni evaluarse adecuadamente en animales.



Por ejemplo, los trastornos depresivos humanos se caracterizan, en parte, por un sentimiento generalizado de tristeza, desesperanza y desesperación. En un esfuerzo por medir la “desesperanza” en roedores, la prueba de comportamiento más usada es la de nado forzado, en la que se arroja una rata o un ratón en un recipiente con agua sin posibilidad de escapar ni de descansar fuera del agua. Naturalmente, el animal pasará algún tiempo nadando y tratando de encontrar una salida a la situación de estrés, pero acabará inmovilizándose y flotando. El tiempo que pasa nadando puede prolongarse administrando al animal algunas formas de fármacos antidepresivos humanos, un hallazgo que llevó a algunos científicos a afirmar que pasar menos tiempo inmóviles era señal de que los animales estaban menos “deprimidos” y que pasar más tiempo inmóviles significaba que estaban más “deprimidos”, como si se hubieran “rendido” y hubiesen perdido la esperanza.

Sin embargo, como ya se ha discutido ampliamente en artículos científicos, la inmovilidad en la prueba de nado forzado puede ser solo una adaptación del animal a su situación y no debe usarse para determinar su estado de ánimo.<sup>234</sup> Los animales que se tardan menos en empezar a flotar ahorran energía y tienen menos probabilidad de hundirse, lo que significa que quienes se dan cuenta de esto antes y pasan menos tiempo luchando podrían simplemente estar aprendiendo este comportamiento adaptativo de una manera más fácil. El tiempo dedicado a nadar versus flotar también está influenciado por la fatiga del animal, así como por variaciones experimentales, como la profundidad y la temperatura del agua.<sup>235-237</sup>

En agosto de 2021, una neurocientífica de PETA y su colaboradora psicóloga publicaron un artículo que cuestiona el uso de la prueba de nado forzado para determinar las propiedades antidepresivas de fármacos. El estudio

examinó el uso de esta prueba por parte de las 15 empresas farmacéuticas más importantes del mundo y encontró que ninguno de 109 compuestos usados en experimentos de nado forzado, la mayoría de los cuales supuestamente mostraba “efectos similares a los antidepresivos”, había sido aprobado para su comercialización.<sup>238</sup>

Una serie de análisis de referencias bibliográficas ha demostrado que los artículos publicados en revistas de medicina humana en el campo del trastorno depresivo mayor rara vez citan resultados de experimentos en ratas o monos, dos de las especies más usadas en este campo, y con más frecuencia se basan en los resultados de investigaciones con células humanas y datos biológicos humanos.<sup>239-241</sup> Se ha observado un fracaso similar de los estudios en animales a la hora de contribuir al conocimiento clínico en la investigación de la depresión bipolar,<sup>242</sup> y se ha citado a los estudios en animales como la principal fuente de deserción (fracaso de los fármacos) en los ensayos clínicos neuroconductuales.<sup>243</sup> No obstante, miles de artículos publicados ignoran estas advertencias y usan la prueba de nado forzado para extraer conclusiones erróneas sobre el estado de ánimo de un animal<sup>234</sup> o los efectos potenciales de los compuestos en los trastornos depresivos humanos.

Las diferencias fisiológicas significativas entre los seres humanos y otros animales probablemente explican un gran porcentaje de los fracasos en la traslación. Por ejemplo, se descubrió que el gen que codifica la tirosina hidroxilasa, la enzima implicada en la formación de dopamina, está regulado de forma totalmente distinta en los humanos que en los ratones.<sup>244</sup> La mala regulación de la tirosina hidroxilasa se ha visto implicada en varias enfermedades psiquiátricas, como el trastorno bipolar y la esquizofrenia. En un estudio publicado en *Nature* en 2019, 64 investigadores analizaron los cerebros de ratones y humanos y encontraron diferencias sustanciales entre especies en los tipos de células cerebrales y las formas en que producen proteínas fundamentales para la función neuropsiquiátrica. Los autores observaron numerosos “fracasos en el uso [del] ratón para estudios preclínicos” debido a “tantas diferencias de [especies] en el patrón celular de los genes”.<sup>245</sup>

Además de la falta de aplicabilidad de los modelos neuropsiquiátricos animales a la condición humana, los animales usados en estos experimentos sufren enormemente. Para inducir “depresión”, los experimentadores someten a los animales a un dolor incontrolable mediante descargas eléctricas o factores de estrés crónico como inmovilizarlos durante periodos prolongados, privarlos de comida o agua, inclinar sus jaulas, obligarlos a vivir en lechos mojados, sacudirlos o alterar sus ritmos circadianos. A menudo se obliga a los animales a vivir aislados por completo de otros miembros de su especie, acosados y agredidos físicamente



por otros animales, privados de cuidados parentales y sometidos a manipulaciones genéticas o quirúrgicas para inducirles un estado mental depresivo o alterado. Como señalan los conductistas animales holandeses van der Staay, Arndt y Nordquist, “[s]i se acumula evidencia de que no se puede alcanzar el objetivo/propósito previsto, entonces se debería considerar el abandono de un desarrollo futuro del modelo”.<sup>246</sup> Este grupo también señala que, en todos los casos, “los beneficios deben superar los costos éticos para los animales. Estos costos incluyen dolor y sufrimiento, angustia y muerte”.<sup>246</sup>

Se deben asignar fondos a modelos experimentales relevantes y basados en la biología humana, como el modelado por computador usando biomarcadores que ya están bien definidos<sup>247</sup> y el uso de células madre específicas de pacientes para medicina personalizada, que “ofrece la posibilidad de generar modelos neuronales basados en células que recapitulan aspectos clave de la enfermedad humana”<sup>248</sup> y pueden usarse en el descubrimiento de fármacos. Las enfermedades complejas, como la esquizofrenia, son ideales “para modelar mediante el uso de células madre debido a su... genética heterogénea y compleja, difícil de recapitular en modelos animales”.<sup>249</sup>

Entre los avances recientes en el campo de la investigación neuropsiquiátrica humana están los siguientes:

- Un grupo de investigación de la Escuela de Medicina Bloomberg de la Universidad Johns Hopkins usó “minicerebros” derivados de células madre para estudiar los efectos de un fármaco antidepresivo en las neuronas del cerebro humano en desarrollo.<sup>250</sup>
- Para estudiar el desarrollo temprano del cerebro, científicos de la Universidad de California–San Diego crearon organoides a partir de células reprogramadas de pacientes con una mutación genética específica asociada al autismo.<sup>251</sup> Los autores observaron que los modelos de ratón de esta mutación genética presentan fenotipos opuestos a los observados en humanos y que un “modelo derivado de pacientes será más ideal y beneficioso que observar a un ratón”.<sup>252</sup>
- Neurocientíficos e ingenieros de la Universidad de Brown realizaron por primera vez un estudio, por un largo periodo de tiempo, de la actividad eléctrica del cerebro de personas con trastorno obsesivo-compulsivo mientras estas se encontraban en sus casas realizando sus actividades diarias.<sup>253</sup> Además de biomarcadores conductuales, el equipo usó aprendizaje automático para examinar las correlaciones entre las medidas conductuales en la vida real y las señales cerebrales. Esta investigación puede servir para orientar los tratamientos adaptativos de estimulación cerebral profunda para esta población.
- En Tokio, un grupo de científicos usó una combinación

de imágenes cerebrales y aprendizaje automático para crear un algoritmo basado en escáneres cerebrales para diagnosticar autismo, esquizofrenia y psicosis.<sup>254</sup>

- Un equipo de investigadores de India y Canadá usó inteligencia artificial y datos de resonancia magnética funcional para desarrollar una herramienta de diagnóstico que puede predecir esquizotipia con una precisión del 87 % en familiares de primer grado de consanguinidad de personas con esquizofrenia.<sup>255</sup>

Debido tanto a la angustia psicológica inherente en los animales inducidos para que exhiban tendencias de enfermedades neuropsiquiátricas como a la falta de aplicabilidad de los resultados en humanos, recomendamos que se ponga fin al uso de animales en estos estudios.

## ACV

### Recomendación: Poner fin al uso de animales.

De acuerdo con científicos del Instituto de Investigación del ACV y la Demencia de Múnich, “[s]e han probado más de 1000 compuestos neuroprotectores en modelos de roedores con el objetivo de mejorar las secuelas del ACV... En efecto, muchos fármacos redujeron el daño cerebral (en la mayoría de los casos medido como disminución del volumen del infarto) en modelos de roedores de ACV experimental. De estas moléculas experimentales, se probaron aproximadamente 50 fármacos neuroprotectores en más de 100 ensayos clínicos de ACV, pero ninguno ha mejorado el resultado en pacientes con ACV clínico.”<sup>256</sup>

Son muchos los factores que contribuyen a este fracaso, como las fallas en los diseños experimentales, el sesgo de publicación, las inconsistencias en el manejo de las enfermedades entre los modelos animales y las poblaciones clínicas, y las diferencias fisiológicas entre especies. Expertos en la materia admiten que “los modelos animales de ACV imitan, en el mejor de los casos, menos del 25 % de todos los ACV”.<sup>257</sup> La Conferencia Académica y de la Industria para el Tratamiento del ACV (STAIR) publicó sus primeras recomendaciones en 1999, pero la tasa de éxito de los ensayos clínicos no ha mejorado. Un fármaco, el NXY-059, que cumplía los criterios de STAIR, fracasó en los ensayos clínicos.<sup>257</sup> Estos hechos ilustran la necesidad de abandonar los modelos animales y enfocarse en métodos centrados en la biología humana.

En una reseña publicada en 2017,<sup>258</sup> el médico Clemens Sommer, de la Universidad Johannes Gutenberg de Maguncia, describe los siguientes aspectos de la experimentación animal que limitan la capacidad de extrapolar la investigación del ACV en animales al ámbito clínico:

- El cerebro de la mayoría de los animales usados en la investigación del ACV es lisencefálico o liso, a diferencia del cerebro girencefálico de los humanos.
- La expresión de determinadas moléculas de señalización difiere entre roedores y humanos en tres tipos de células cerebrales (neuronas, astrocitos y microglía) tanto en la línea de base como en la respuesta a la privación de oxígeno.
- El daño isquémico de la materia blanca del cerebro es importante en el pronóstico del ACV en humanos, pero el contenido de materia blanca en humanos es mucho mayor que en otros animales. “Mientras que en los seres humanos el porcentaje de sustancia blanca representa el 60 %, en los perros se reduce al 35 %, en los conejos al 20 %, en las ratas al 15 % y en los ratones es tan bajo como 10 %”,<sup>259</sup> lo que significa que un factor crucial en los resultados del ACV en los seres humanos no puede compararse con exactitud en los modelos animales.
- Los vasos sanguíneos del cerebro tienen una anatomía distinta en los humanos que en otros animales; incluso las cepas de roedores difieren en su estructura vascular. Estas “diferencias funcionales pueden tener implicaciones más profundas en relación con la fisiopatología de la cascada isquémica”.<sup>258</sup>
- En los humanos, el gen del neurotransmisor óxido nítrico sintasa 2 (NOS2) se regula de forma diferente que en los ratones. El gen NOS es importante, ya que el óxido nítrico podría ser una molécula esencial de señalización de gases durante el ACV.<sup>260</sup>
- Como se ha mencionado antes, las diferencias entre el sistema inmunitario de los humanos y el de otras especies son drásticas. Sommer las describe así:

[El] porcentaje de neutrófilos en ratones y ratas es de alrededor del 10-20 %, en comparación con 50-70 % en humanos, mientras que la situación opuesta se observa en los linfocitos, que representan alrededor del 50-100 % en roedores, frente al 20-40 % en humanos, respectivamente. Además, existe solo una mínima intersección de la expresión de ARNm y microARN en todo el genoma en los leucocitos de los roedores versus el de los humanos, tanto al comienzo como después del ACV, lo que plantea la pregunta de si los roedores son, en absoluto, modelos aceptables del sistema inmunitario humano después de un ACV.<sup>258</sup>

- El perfil de ARN del cerebro del ratón es más similar al de otros tejidos de su organismo, como los pulmones, el hígado y el corazón, que al de un cerebro humano.<sup>261</sup>
- El ACV isquémico suele producirse en pacientes heterogéneos de edad avanzada con afecciones concomitantes, mientras que los experimentos de ACV

en animales se llevan a cabo predominantemente en animales jóvenes, sanos, machos y endogámicos.

Por otro lado, los modelos humanos de ACV no sufren estas deficiencias inherentes a la especie. Científicos del Departamento de Fisiología Molecular y Celular de la Universidad Estatal de Luisiana han señalado que un “beneficio clave de los sistemas *in vitro* es la oportunidad de trabajar con células humanas, tal como [lo hicieron] Werth *et al.*, [quienes] usaron el método de corte cerebral en secciones de la corteza cerebral humana para proporcionar la primera evidencia directa de la participación del receptor de glutamato en la lesión isquémica en el cerebro humano”.<sup>262</sup>

Gracias a los avances tecnológicos, que incluyen representaciones tridimensionales precisas de múltiples tipos de células neuronales y estructuras del cerebro humano, los investigadores pueden superar algunos de los obstáculos que limitaban la investigación *in vitro* del cerebro humano. Por ejemplo, médicos y químicos de la Universidad de Duisburg-Essen, en Alemania, están cultivando seis tipos diferentes de células humanas para crear minicerebros destinados a la investigación del ACV y el descubrimiento de fármacos.<sup>263</sup> En el Instituto Wake Forest de Medicina Regenerativa ya se ha creado un organoide cerebral de este tipo, que fue validado en experimentos de ACV después de que el modelo mostrara respuestas clínicamente precisas a fármacos conocidos.<sup>264</sup> Neurocirujanos e ingenieros biomédicos de la Universidad de Stanford y de la Universidad Johns Hopkins crearon una unidad neurovascular en un chip microfluídico para evaluar el potencial restaurador de los tratamientos con células madre en la recuperación del ACV isquémico.<sup>265</sup> En los Países Bajos, la empresa MIMETAS también ha creado una unidad-neurovascular-en-chip que puede usarse para la investigación básica del ACV y el descubrimiento de fármacos<sup>266</sup> y científicos computacionales de la Universidad de Ámsterdam han desarrollado una plataforma de ensayos *in silico* que puede usarse para evaluar el tratamiento del ACV isquémico agudo usando parámetros clínicos de pacientes virtuales.<sup>267</sup> Los investigadores clínicos usan ahora la inteligencia artificial para mejorar la prevención, detección y atención del ACV.<sup>268-270</sup>

A partir de un taller sobre investigación traslacional en ACV, organizado por el Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares de EE. UU., 42 científicos elaboraron un reporte en el cual concluyeron que “[c]on el aumento de la disponibilidad de líneas/tejidos celulares humanos, organoides y tecnologías de células madre pluripotentes inducibles y ensayos de gran capacidad, las estrategias *in vitro*, combinadas con los datos de modelos animales, pueden tener cada vez mayor importancia en las futuras estrategias de desarrollo de fármacos”.<sup>271</sup> Los modelos animales nunca podrán recapitular la naturaleza del ACV humano ni la respuesta inflamatoria específica del ser

humano que le sigue. En EE. UU., alguien sufre un ACV cada 40 segundos y cada cuatro minutos muere una persona debido a esta causa.<sup>272</sup> Los limitados recursos para la investigación no pueden continuar desperdiándose en estudios deficientes basados en la biología animal no humana.

## Abuso de sustancias

### Recomendación: Poner fin al uso de animales.

Aspectos fundamentales de los animales no humanos los hacen inapropiados para el estudio de la adicción humana. En primer lugar, el consumo y la adicción a las drogas en humanos es una experiencia bastante compleja, que no es posible imitar usando animales en un entorno de laboratorio.<sup>273</sup> Se ha argumentado que los intentos de modelar trastornos humanos como la adicción en animales no humanos, especialmente en roedores, son “demasiado ambiciosos” y que la “validez” de dichos modelos suele limitarse a similitudes superficiales, denominadas ‘validez aparente’, que reflejan fenómenos y procesos biológicos subyacentes bastante diferentes de la situación clínica”.<sup>274</sup>

En segundo lugar, las acciones farmacocinéticas de las drogas difieren entre especies. Por ejemplo, “el metabolismo de la MDMA [también conocida como Éxtasis, E o Molly] y sus principales metabolitos es más lento en humanos que en ratas o monos, lo que podría permitir que los mecanismos neuroprotectores endógenos funcionen de forma particular para cada especie”.<sup>275</sup> Las diferencias farmacocinéticas entre los seres humanos y los animales “modelo” probablemente explican por qué la neurotoxicidad observada en roedores tras la administración de MDMA no se ha observado en el ámbito clínico.<sup>275</sup> Dado que la MDMA se está estudiando no solo por su uso ilegal como droga recreativa, sino también por su posible uso terapéutico, es fundamental conocer con exactitud su seguridad en seres humanos.

En tercer lugar, las graves fallas en el diseño experimental de los estudios sobre adicciones distorsionan en gran medida la interpretación de sus resultados. En la experiencia humana con las drogas, los individuos eligen consumir la sustancia adictiva en lugar de consumir otras sustancias o realizar otras actividades que podrían resultarles gratificantes. Los animales usados en experimentos no suelen tener esta opción. Cuando la tienen, la gran mayoría de ellos elegirá una recompensa alternativa, como el azúcar, en lugar de la droga.<sup>276</sup> Esto es válido tanto para los primates como para los ratones y las ratas. Incluso en animales con un intenso consumo previo de drogas, solo alrededor del 10 % seguiría autoadministrándose una droga cuando tuviera la oportunidad de elegir otra opción gratificante.<sup>276</sup> En una reseña sobre la “crisis de validación” de los modelos animales de drogadicción, el neurocientífico francés e

investigador de la adicción Serge Ahmed afirmó que el hecho de que los animales no puedan elegir en estos experimentos suscita “serias dudas” sobre “la interpretación del consumo de drogas en animales de experimentación”.<sup>276</sup>

El animal no humano ha sido calificado como el “colaborador más reacio” al estudiar la adicción al alcohol y se ha observado que tiene una “determinación a mantener la sobriedad” contra la que el experimentador debe luchar para superar “su fracaso constante a la hora de reproducir el consumo voluntario de etanol hasta el punto de la dependencia física”.<sup>277</sup> En este sentido, investigadores del Instituto Nacional de Salud Mental de EE. UU. señalaron que “es difícil argumentar que [la autoadministración de drogas en roedores] modela realmente la compulsión, cuando la alternativa a la autoadministración es la soledad en una jaula del tamaño de una caja de zapatos”.<sup>278</sup>

A pesar de la prevalencia de la investigación de la adicción realizada en animales, “aún no se han desarrollado fármacos que frenen eficazmente la adicción a opiáceos o psicoestimulantes al promover la abstinencia y prevenir las recaídas” y “actualmente hay muy poco desarrollo clínico en curso”.<sup>275</sup> Los datos de los estudios en animales fueron prometedores en ciertas clases de fármacos, pero estos no han resultado eficaces en los ensayos con humanos o no han sido bien tolerados por los participantes, un resultado negativo que no se predijo en los ensayos en animales.

Los métodos de investigación humana no invasiva pueden proporcionar respuestas a las preguntas que los animales no humanos, por su aversión a las drogas, son fundamentalmente incapaces de responder. Investigadores de la Facultad de Medicina Robert Wood Johnson de la Universidad Rutgers publicaron un artículo en el que describen cómo el uso de células madre pluripotentes inducidas (CMPI) puede ofrecer una “oportunidad única para modelar trastornos neuropsiquiátricos como [los trastornos por consumo de alcohol] de una forma... fiel a los complejos contextos genéticos humanos. Las células neuronales específicas de cada paciente derivadas de células [madre pluripotentes inducidas] pueden usarse para el descubrimiento de fármacos y la medicina de precisión”.<sup>279</sup>

Científicos de la Universidad de Connecticut usaron células madre donadas por sujetos con y sin el trastorno por consumo de alcohol para estudiar los efectos de esta sustancia en un receptor específico del cerebro sobre el que actúa el alcohol. Sus resultados contradijeron algunos de los hallazgos derivados de experimentos en animales.<sup>280</sup> Científicos de Rutgers usaron células de pacientes para generar tipos de células neuronales específicas de cada individuo en las que pudieran estudiar los efectos del alcohol sobre diversos aspectos de la fisiología celular. Sus



resultados demostraron el papel de la inflamación neuronal en la fisiopatología del trastorno por consumo de alcohol.<sup>281</sup> Investigadores del Instituto Nacional sobre el Abuso de Drogas de EE. UU. están usando organoides neocorticales tridimensionales para estudiar los efectos de la exposición prenatal a la cocaína en el cerebro humano en desarrollo.<sup>282</sup> Científicos de la Universidad Médica de Wisconsin están usando organoides humanos derivados de CMPI para estudiar los mecanismos de la desregulación génica inducida por el etanol en el desarrollo de los trastornos fetales del espectro alcohólico.<sup>283</sup> Otros investigadores están usando CMPI humanas para estudiar los efectos del alcohol en el hígado humano.<sup>284</sup>

Además, en lugar de desperdiciar recursos para financiar estudios ineficaces sobre el abuso de sustancias en animales, estos fondos podrían destinarse a programas efectivos de prevención, rehabilitación y salud mental, directamente relevantes para los humanos.

## Traumatismos

### Recomendación: Poner fin al uso de animales.

Después de los roedores, los cerdos son los animales más usados en experimentos en el área de traumatismos. Sin embargo, importantes diferencias entre los cerdos y los humanos hacen que los resultados de estos estudios sean inútiles. Por ejemplo, el proceso de coagulación en los cerdos difiere del de los humanos, lo que dificulta que se alcance en los cerdos un estado de coagulopatía o incapacidad para coagular. En casos de traumatismos humanos, la coagulopatía representa parte de la “tríada letal” para los pacientes y es una gran preocupación para investigadores y médicos.<sup>285</sup> Además, existen diferencias en la administración de ventilación mecánica y fármacos como la vasopresina y la heparina en la investigación.<sup>285,286</sup> Y, al igual que ocurre con los ratones y los humanos, las respuestas inmunitarias son diferentes entre cerdos y humanos.

Los traumatismos son extremadamente heterogéneos: los pacientes difieren en cuanto a edad, sexo, origen étnico, antecedentes médicos, consumo de alcohol y drogas y presencia de otras lesiones. Esta variación dificulta,<sup>287</sup> si no imposibilita, la creación de un modelo animal adecuado. En los estudios sobre lesiones cerebrales traumáticas, todas las opciones terapéuticas prometedoras identificadas en animales han fracasado en los ensayos clínicos en humanos.<sup>288</sup> Existe un amplio debate sobre las limitaciones de los modelos animales de traumatismo y choque hemorrágico. De acuerdo con Combes:

Los problemas científicos de los modelos animales incluyen el uso de métodos de

trauma rudimentarios, no controlados y no estandarizados, la incapacidad de modelar todos los mecanismos traumáticos clave y los complejos efectos moduladores de la anestesia general sobre la fisiología de los órganos blanco. Estos efectos dependen del anestésico e influyen en el sistema cardiovascular, la respiración, la hemodinámica cerebral, la neuroprotección y la integridad de la barrera hematoencefálica. Algunos anestésicos también se unen al receptor cerebral NMDA, con posibles consecuencias diferenciales en animales anestesiados y de control. También hay evidencia de efectos específicos según el género. A pesar de que estos problemas son ampliamente conocidos, hay poca información publicada sobre su potencial, en el mejor de los casos, para complicar la interpretación de los datos y, en el peor, para invalidar los modelos animales. También hay poca información sobre la anestesia usada en los estudios, lo que puede dificultar la correcta evaluación de los datos.<sup>289</sup>

Afortunadamente, se ha demostrado que la simulación por computador puede reproducir con precisión el traumatismo de la vida real y predecir los resultados para el paciente.<sup>290</sup> Por ejemplo, científicos de la Universidad de Pittsburgh usaron un modelo por computador para examinar la relación entre las lesiones de la médula espinal y las úlceras por presión en pacientes humanos, y descubrieron que un determinado tratamiento era eficaz para reducir la inflamación y el daño tisular.<sup>291</sup> Este grupo también usó modelos mecánicos basados en datos para descubrir que los pacientes que sobreviven a una lesión cerebral traumática presentan una respuesta inflamatoria diferente a la de las personas que no sobreviven, información que “puede apuntar tanto a nuevos conocimientos de los mecanismos como a aplicaciones clínicas traslacionales”.<sup>292</sup>

Además, la investigación clínica sigue teniendo un valor incalculable en este campo y aporta y se beneficia de los modelos matemáticos y computacionales. Un estudio realizado en el Instituto de Investigación Quirúrgica del Ejército de EE. UU. usó datos de más de 250 experimentos en humanos para modelar mecánicamente la fisiología que subyace a la pérdida de sangre y el choque en los seres humanos que sufren una hemorragia. Los autores describen el estudio de la siguiente manera:

A diferencia del modelo animal, introdujimos el uso de la presión negativa en la parte inferior del cuerpo como un modelo no invasivo que permite el estudio de reducciones

progresivas del volumen sanguíneo central, similares a las registradas durante una hemorragia real en humanos conscientes hasta el inicio de la descompensación hemodinámica (es decir, la fase temprana del choque descompensatorio) y es repetible en el mismo sujeto. Comprender la fisiología subyacente fundamental de la hemorragia humana ayuda a poner a prueba los paradigmas de la medicina de cuidados intensivos y a identificar y desarrollar prácticas y tecnologías clínicas novedosas para el diagnóstico y el tratamiento avanzados en pacientes con hemorragias potencialmente mortales.<sup>293</sup>

La inteligencia artificial se está usando para mejorar la atención a lo largo de un evento traumático, desde el triaje sobre el terreno hasta el tratamiento en urgencias y la intervención posterior para mejorar los resultados para los pacientes después de haber sido dados de alta.<sup>294-296</sup> En estudios moleculares realizados en la Universidad Estatal Wayne, el cirujano intensivista Dr. Lawrence Diebel y su equipo están usando modelos microfluídicos *in vitro* para estudiar la función endotelial humana durante el traumatismo y el choque.<sup>297,298</sup> Debido tanto a la heterogeneidad de las causas y los resultados de los traumatismos como a las diferencias fisiológicas e inmunitarias entre especies, solo los métodos relevantes para el ser humano son adecuados para guiar la investigación de los traumatismos humanos.

## Capacitación e investigación forense

### Ciencias forenses

#### Recomendación: Poner fin al uso de animales.

La ciencia forense es un área de investigación única y merece un serio escrutinio ético ya que su objetivo es comprender asuntos relacionados con la delincuencia, en lugar de mejorar la salud humana o las condiciones de vida, y los métodos experimentales son a menudo horribles y se llevan a cabo sin anestesia. Los científicos italianos Cattaneo y sus colegas señalan que existe una “obligación moral de asumir y respetar esta [responsabilidad de cuidar a otras especies animales], especialmente cuando la supervivencia real de la humanidad no está en riesgo”.<sup>299</sup>

El uso de animales en la investigación forense fue duramente criticado ya en 1992, cuando Bernard Knight afirmó que no se pueden justificar “experimentos dolorosos, que a veces implican mutilación, en animales conscientes” con el fin de obtener “un escaso beneficio potencial para algún problema médico-legal”, sobre todo si se tiene en cuenta que tales experimentos “no se usan regularmente en la práctica

forense rutinaria” y solo “acumulan polvo en las bibliotecas universitarias”.<sup>300</sup> Knight también señaló que “una gran cantidad de material publicado que usa la experimentación animal parece tener poca relevancia práctica, aparte de ampliar el *currículum vitae* y las perspectivas profesionales del investigador”.<sup>300</sup>

En 2015, Cattaneo y sus colegas publicaron un metaanálisis y una reseña en los que examinaron 404 artículos de ciencias forenses y descubrieron que el 69.1 % “se refería a estudios en animales asesinados exclusivamente para el experimento” y que “la muerte todavía incluye con frecuencia métodos dolorosos como el traumatismo contuso, la electrocución, la asfixia mecánica, la hipotermia e incluso el desangrado; de todos estos animales, aparentemente solo se anestesió al 60.8 %”.<sup>299</sup> En 2018, los investigadores sudafricanos Calvin Gerald Mole y Marise Heyns llevaron a cabo otro metaanálisis en el que examinaron 204 estudios científicos forenses originales realizados entre 2012 y 2018, en los que se usaron 5050 animales.<sup>301</sup> En dichos estudios, ratas, cerdos, ratones, conejos, ovejas y vacas, entre otros, fueron ahogados, electrocutados, cortados, golpeados y obligados a ingerir ácido, entre otros procedimientos crueles. Mole y Heyns concluyeron que no se está haciendo lo suficiente en la investigación científica forense para defender los principios éticos básicos de la investigación y cumplir con las 3R. Además, señalaron que “gran parte del uso de tejidos animales descrito en los artículos de investigación sobre traumatismos del presente estudio podría reducirse al mínimo usando tejidos humanos obtenidos en autopsias médico-legales”, mismas que “podrían estar siendo subutilizadas como especímenes de investigación científica”.<sup>301</sup>

Dejando a un lado la crueldad, Cattaneo y sus colegas enfatizan que “[l]a historia de las ciencias forenses nos ha proporcionado mucha evidencia de la inaplicabilidad de los datos obtenidos en estudios realizados con modelos animales”<sup>299</sup> dadas las diferencias anatómicas, fisiológicas y genéticas entre especies. Por ejemplo, una investigación reciente financiada por el Instituto Nacional de Justicia y realizada en el Centro de Antropología Forense de la Universidad de Tennessee indica que los datos de descomposición de animales no humanos varían considerablemente de los humanos y no se recomienda su uso en casos forenses.<sup>302</sup>

Además, existe un sinfín de métodos alternativos, como maniqués, simuladores, materiales artificiales y tecnología *in vitro* y se ha reconocido que “la aplicación de métodos alternativos en el ámbito forense, en lugar de usar animales, ha proporcionado resultados importantes y reproducibles”.<sup>299</sup> En conjunto, los problemas éticos, científicos y prácticos asociados a la experimentación en animales, así como la abundancia de métodos alternativos fácilmente disponibles,

significan que la investigación forense es un ámbito primordial para poner fin al uso de animales.

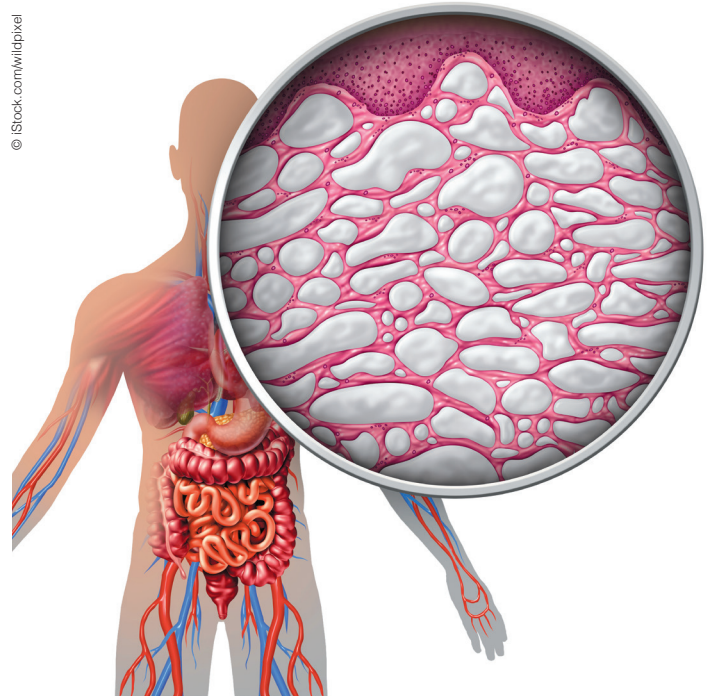
## Formación médica

### Recomendación: Poner fin al uso de animales.

Los animales se han usado tradicionalmente en la educación biomédica para enseñar fisiología humana y principios farmacéuticos, estudiar la forma y la función anatómicas humanas y practicar procedimientos quirúrgicos humanos. Sin embargo, numerosos avances han contribuido a un cambio de paradigma en este campo. Entre ellos se incluyen las mejoras en la simulación de pacientes humanos y la tecnología de aprendizaje asistido por computador que enseña estos temas tan bien o mejor que la disección y la experimentación en animales,<sup>303</sup> la creciente oposición pública al uso de animales en laboratorios,<sup>304</sup> el aumento del costo económico de los laboratorios de animales,<sup>305</sup> y un renovado interés de la comunidad médica por mejorar la seguridad de los pacientes y reducir los errores clínicos mediante la formación basada en simulación.<sup>306</sup>

La enseñanza basada en la simulación humana se ha convertido en el estándar de oro. Ahora, los estudiantes de medicina de Canadá, India y EE. UU. aprenden sin usar animales a lo largo de los planes de estudios de pregrado.<sup>307,308</sup> Los expertos en medicina han recomendado abandonar la pedagogía basada en animales y adoptar “un plan de estudios robusto compuesto por didáctica, sistemas de entrenamiento por tarea [con simuladores], realidad virtual, cadáveres, programas de computador, simuladores de pacientes de alta fidelidad y trabajo clínico supervisado”.<sup>309</sup> A diferencia de los métodos basados en animales, estos métodos de formación sin animales modelan con precisión la anatomía y la fisiología humanas, permiten a los estudiantes repetir procedimientos médicos hasta desarrollar las destrezas necesarias, mejoran la confianza del proveedor y la transferencia de las habilidades aprendidas a la práctica clínica y permiten a los educadores recibir retroalimentación objetiva sobre el desempeño en tiempo real.<sup>310</sup>

Los beneficios de los métodos de formación sin animales han quedado demostrados en diversas disciplinas y técnicas médicas. Por ejemplo, un metaanálisis sobre la eficacia de la formación en cirugía laparoscópica mediante realidad virtual (RV) llegó a la conclusión de que era tan eficaz como los sistemas de entrenamiento tradicionales (de video o de caja) o superior a estos en el desempeño durante el entrenamiento y en el quirófano.<sup>311</sup> En otro metaanálisis se observó que el ahorro de tiempo y las mejoras en el rendimiento técnico quirúrgico en simuladores de RV de cirugía asistida por robot eran transferibles al quirófano y que el desempeño en los simuladores era predictivo del desempeño en el quirófano.<sup>312</sup>



En un metaanálisis de estudios de simulación de RV obstétrica se observó una mejora de las habilidades técnicas, y los autores señalaron “que debería considerarse la posibilidad de integrar la formación con simulación en el plan de estudios clínicos”.<sup>313</sup> Otra evidencia respalda el uso de simulaciones para mejorar las habilidades y/o el desempeño clínico en punciones lumbares,<sup>314</sup> sutura,<sup>315</sup> timpanostomía,<sup>316</sup> y muchos otros procedimientos.

No existe justificación científica ni ética para seguir usando animales en la formación médica, por lo que recomendamos eliminar su uso para este fin.

### Formación en microcirugía

En la actualidad existe una serie de métodos de baja y alta fidelidad sin animales, aprobados como sustitutos del uso de animales vivos, que los investigadores han desarrollado para la enseñanza eficaz de una amplia variedad de habilidades microquirúrgicas básicas y avanzadas a médicos principiantes y expertos. Estos incluyen sistemas de entrenamiento con simuladores y cadáveres humanos perfundidos obtenidos éticamente que pueden usarse para enseñar procedimientos como anastomosis, resección de tumores artificiales, derivaciones [bypass] y creación, disección y clipado de aneurismas.

Por ejemplo, un estudio de la Universidad de Toronto en el que se comparaban las habilidades de residentes de cirugía para realizar anastomosis microquirúrgica entre aquellos formados con ratas vivas y residentes formados con un modelo de silicona encontró que, tras una formación inicial idéntica en modelos inanimados, este último grupo





era tan competente en la realización de anastomosis microquirúrgicas de una sola capa como los residentes formados con el uso de animales vivos. Los autores concluyeron que “[l]a formación con modelos de baja fidelidad es tan efectiva como el entrenamiento con modelos animales vivos de alta fidelidad para la adquisición de destrezas técnicas en los residentes de cirugía”.<sup>317</sup>

Una revisión sistemática de los métodos de formación en microcirugía corroboró estos resultados:

De la mejor evidencia disponible se desprende que la formación en microcirugía simulada con modelos de baja fidelidad puede ser tan eficaz como con modelos de alta fidelidad... En el Reino Unido y en otros lugares, el pilar de la formación microquirúrgica simulada ha sido históricamente la exposición a un curso de microcirugía *in vivo* con ratas, pero por lo general esto [se hace] en una fase demasiado temprana de la formación en la que no se puede hacer el puente con la exposición clínica práctica a casos relevantes y sin repetición.<sup>318</sup>

Un estudio realizado por un equipo de investigadores de Londres evaluó la validez de Surgitate, un modelo de silicona tres en uno, para reducir la dependencia del uso de animales en la formación en microcirugía y cumplir con las 3R. Los participantes realizaron anastomosis de extremo a extremo en arterias, venas y nervios y calificaron favorablemente el modelo para adquirir habilidades básicas en microcirugía. Los autores señalaron que el modelo Surgitate “podría ser especialmente útil para mejorar las habilidades de sutura como sustitución o reducción del uso de modelos de pollo”.<sup>319</sup> Dado que la cirugía plástica es una subespecialidad que a menudo usa técnicas microquirúrgicas,<sup>320</sup> una reseña exhaustiva concluyó que “los simuladores protésicos están llamados a desempeñar un papel más importante en el desarrollo de un plan de estudios de formación en microcirugía estandarizado, ético, accesible y objetivamente medible para el residente de cirugía plástica y reconstructiva de hoy en día”.<sup>321</sup>

Un simulador neuroquirúrgico tridimensional y sin animales desarrollado por un equipo suizo para la capacitación en microcirugía de aneurismas se calificó como “confiable y potencialmente útil para la formación de residentes de neurocirugía y neurocirujanos titulados”.<sup>322</sup> Además, la mayoría



de los participantes del estudio señaló que este simulador era superior a la formación neuroquirúrgica convencional con modelos animales.<sup>322</sup>

La tecnología de RV también es una prometedora herramienta de entrenamiento que evita el uso de animales en la formación en microcirugía. Un estudio que evaluó el impacto de la RV en el clipado microquirúrgico de la arteria cerebral media encontró que el entrenamiento con esta tecnología mejoró la eficiencia quirúrgica, la velocidad y la seguridad de los participantes, independientemente de la complejidad del procedimiento.<sup>323</sup>

Dada la multitud de métodos de formación sin animales y validados que ya están disponibles, recomendamos poner fin al uso de animales para la formación en microcirugía.

### Formación en traumatología

Un estudio publicado por un equipo de la Fuerza Aérea de EE. UU. comparó la autoeficacia reportada por reclutas a quienes les enseñaron procedimientos de emergencia en simuladores humanos versus aquella reportada por quienes fueron entrenados con animales vivos –práctica conocida como formación con tejidos vivos (LTT)– y encontró resultados equivalentes en ambos grupos. Los autores concluyeron que “la creencia en la superioridad de la formación con animales puede ser solo un sesgo” y que “si el objetivo de los entrenadores es formar individuos con alta autoeficacia, la simulación artificial es una modalidad adecuada en comparación con el estándar histórico de los modelos de animales vivos”.<sup>324</sup> En otra publicación en la misma revista médica, el autor principal del estudio afirmó que “[h]emos entrado en una era en la que los modelos de simuladores artificiales son al menos equivalentes, si no superiores, a los modelos animales... [L]as fuerzas armadas deberían abandonar toda simulación en animales cuando existan simuladores artificiales igualmente eficaces para una tarea específica. Para los procedimientos de emergencia, este día ha llegado”.<sup>325</sup>

Más del 70 % de los estados miembros de la OTAN usa exclusivamente métodos sin animales para la formación médica militar,<sup>326</sup> y la Guardia Costera de EE. UU. se ha convertido en la primera rama de las fuerzas armadas de dicho país en poner fin al uso de animales para esta práctica.<sup>327</sup> Estos avances confirman que el uso de animales para la formación en traumatología no es necesario ni está justificado.

Los esfuerzos por sustituir el uso de animales por simuladores humanos en la formación militar en traumatología han ganado muchos partidarios destacados, como el Consejo Editorial del *New York Times*<sup>328</sup> y numerosas organizaciones médicas y de veteranos que representan a más de 255 mil médicos y residentes, y cuentan entre sus líderes con directores

generales de sanidad pública de EE. UU.<sup>329</sup>

Un estudio publicado en 2018 concluyó que “[l]a simulación de alta fidelidad ofrece muchas ventajas, incluida una amplia exposición a los procedimientos, sus complicaciones y la oportunidad de un aprendizaje repetitivo en un entorno no clínico”.<sup>330</sup> Los autores señalaron que “[l]os modelos sintéticos pueden producir una respuesta al estrés equivalente a la del tejido vivo durante el entrenamiento de simulación” y “producen una experiencia suficientemente inmersiva y realista para los residentes”.<sup>330</sup>

Un estudio examinó el entrenamiento de los equipos de cirujanos de la Marina y el Ejército de EE. UU. con actores humanos vivos que llevaban puesto un simulador quirúrgico conocido como *Cut Suit* y usaron efectos especiales de la industria cinematográfica. Los autores observaron que la formación con simulación mejora el desempeño de los equipos y “los procedimientos y procesos quirúrgicos” y concluyeron que “[l]os equipos de simulación quirúrgica de alta fidelidad, como el... ‘*Cut Suit*’, combinados con entornos replicados altamente realistas, permitirán a los equipos de traumatología quirúrgica mejorar sus habilidades para salvar vidas y la comunicación en el trabajo en equipo para maximizar los resultados exitosos de los pacientes. La formación en traumatología quirúrgica de alta fidelidad, altamente realista, inmersiva y estresante es ahora una opción para mejorar la preparación y las capacidades de los equipos de traumatología”.<sup>331</sup>

Además, un estudio publicado en 2019 en el *Journal of Surgical Education* encontró que los supuestos beneficios del LTT para los resultados de los pacientes no están fundamentados. De acuerdo con el estudio, “no existe evidencia publicada de ensayos controlados prospectivos que sugieran que los cursos de formación en habilidades quirúrgicas cambien los resultados de los pacientes con traumatismo, o mejoren el desempeño de las habilidades enseñadas, cuando estas se ejecutan en un quirófano de verdad... No se identificó evidencia publicada del beneficio de la formación en muchos cursos establecidos, entre otros: técnicas quirúrgicas definitivas para traumatismos, tratamiento de urgencia de lesiones en el campo de batalla, técnicas endovasculares para traumatismos y cirugía de reanimación, curso de cirugía de guerra de urgencia (EWSC, por sus siglas en inglés), formación quirúrgica operativa militar, habilidades especializadas en cirugía de urgencia y traumatismos, formación quirúrgica para entornos austeros o técnicas quirúrgicas de respuesta ante traumatismos”, todos los cuales, según el estudio, “usaban tejido vivo (generalmente porcino)”.<sup>332</sup> Además, un estudio independiente publicado por científicos alemanes señaló que el uso de animales en el LTT es éticamente inaceptable. Los investigadores concluyeron que “[u]n análisis minucioso de

la base empírica de las supuestas ventajas del LTT demostró que no es superior a los métodos basados en simulación en términos de beneficio educativo. Dado que existen alternativas creíbles que no causan daño a los animales, llegamos a la conclusión de que el LTT en modelos animales está éticamente injustificado”.<sup>333</sup>

En el sector civil, el Colegio Estadounidense de Cirujanos ha afirmado que los simuladores humanos pueden sustituir el uso de animales en el marco del curso Soporte Vital Avanzado en Trauma (SVAT).<sup>334</sup> Además, los programas nacionales equivalentes de numerosos países han puesto fin al uso de animales para este propósito.<sup>335</sup>

Con base en la evidencia que respalda la eficacia de los métodos de formación sin animales, recomendamos poner fin al uso de animales para el entrenamiento militar y civil en traumatología.

## Evaluación de la toxicidad

A continuación, se detallan las oportunidades para poner fin o reducir significativamente el uso de animales para la evaluación de la toxicidad de las sustancias en el contexto de los requisitos reglamentarios en esta materia. También se describen áreas en las que se requiere un mayor apoyo para desarrollar métodos innovadores que sean relevantes para el análisis de criterios de valoración [*endpoints*] para la salud humana y el ambiente.

En caso de que las pruebas sean requeridas con fines reglamentarios, las fuentes directas (como los sitios web de la OCDE, el ICH y la EPA) deberán consultarse para obtener las versiones más recientes de las directrices de las pruebas y las guías correspondientes.

### Métodos de evaluación de la toxicidad

#### **Recomendación: Promover de inmediato el uso de enfoques integrados para las pruebas y la evaluación para reducir drásticamente el uso de animales.**

La toma de decisiones reglamentarias se facilita haciendo uso de toda la información pertinente disponible sobre una sustancia. Una forma de evaluar toda la evidencia es a través del uso de un enfoque integrado en materia de pruebas y evaluación (IATA)<sup>336</sup> que considera toda la información a partir del peso de la evidencia (PdE). La información que debe tenerse en cuenta incluye todos los datos existentes sobre la sustancia (por ejemplo, de estudios *in chemico*, *in vitro*, *in vivo* en humanos o *in vivo* en animales), las propiedades fisicoquímicas de la sustancia, los datos derivados de enfoques distintos a las pruebas (por ejemplo, QSAR y extrapolación o *read-across*), los datos

generados recientemente (de preferencia a partir de métodos confiables y relevantes sin animales) y los patrones de uso o las situaciones de exposición. Los datos que se consideran más confiables, pertinentes y/o útiles para el ámbito reglamentario tienen una mayor influencia en la conclusión de la evaluación. Al evaluar los datos disponibles en conjunto, se puede realizar una evaluación robusta del riesgo de la sustancia sin generar nuevos datos mediante estudios *in vivo* adicionales (en la sección de carcinogenicidad puede encontrar un ejemplo sobre esto). Además, una evaluación holística de los datos garantizará que los estudios *in vivo* existentes no se dupliquen.

Las evaluaciones IATA y PdE suelen requerir la opinión de expertos, por lo que estos enfoques no están al alcance de los solicitantes que aún no tienen la experiencia necesaria. Los enfoques definidos (ED) consisten en un procedimiento fijo de interpretación de datos (por ejemplo, un modelo matemático o un enfoque basado en reglas) aplicado a datos generados con un conjunto definido de fuentes de información para derivar una predicción sin necesidad de recurrir al juicio de expertos.<sup>337</sup> Para ver ejemplos del ED, consulte la sección sobre sensibilización cutánea.

A diferencia de los ensayos en animales, los métodos sin animales tienen la capacidad de reflejar la biología y los mecanismos de toxicidad relevantes para los humanos, por ejemplo, al evaluar los acontecimientos clave en las vías de resultados adversos (AOP, por sus siglas en inglés). Las AOP comprenden eventos clave causalmente vinculados que conectan la exposición química con un resultado adverso. Las pruebas sin animales que consultan eventos clave específicos en una AOP permiten una comprensión mecánica de si se producirá un resultado adverso tras la exposición química en humanos.

Como se mencionó anteriormente, la consideración de la exposición debe formar parte de un enfoque integrado. Cuando la exposición humana y ambiental a una sustancia es baja, o cuando las propiedades fisicoquímicas de una sustancia indican que las vías específicas de exposición no son relevantes, puede no estar científicamente justificado (o no ser posible) realizar pruebas de toxicidad para cumplir con ciertos requerimientos de datos. Cuando se considera la exposición, el enfoque de la toma de decisiones reglamentarias puede pasar de un modelo rígido basado en los peligros a otro centrado en los riesgos que permita reducir al mínimo las pruebas en animales.<sup>338</sup>

### Ecotoxicidad

#### **Recomendación: Teniendo en cuenta la existencia de métodos sin animales y enfoques PdE, el uso de animales en las pruebas de ecotoxicidad puede reducirse drásticamente.**



## Toxicidad acuática

Las pruebas de toxicidad acuática se realizan para medir los efectos de las sustancias químicas en el ambiente y la vida silvestre. En 2019, se usaron casi 100 mil peces para evaluaciones toxicológicas y otras evaluaciones de seguridad en la UE.<sup>339</sup> Dado que la evaluación de la toxicidad acuática es obligatoria en varios marcos reglamentarios, se necesitan urgentemente estrategias para reemplazar las pruebas en animales acuáticos.

Actualmente se dispone de varios métodos sin animales. En 2018, la OCDE adoptó dos pruebas *in vitro* para la evaluación del aclaramiento intrínseco que usan hepatocitos de trucha arco iris crio-preservados<sup>340</sup> y la fracción subcelular S9 de hígado de trucha arco iris<sup>341</sup> y una guía asociada.<sup>342</sup> Los valores de aclaramiento hepático intrínseco pueden usarse para modelos toxicocinéticos de base fisiológica de bioacumulación en peces o para la extrapolación a una tasa de biotransformación *in vivo*. Esta última puede usarse con modelos *in silico* para predecir factores de bioconcentración. Así, aunque estas directrices de prueba requieren el uso de peces para obtener células primarias, pueden contribuir a sustituir el uso de peces vivos en la Prueba N.º 305 de la OCDE sobre bioacumulación en peces.<sup>343</sup>

Para reducir el número de peces juveniles y adultos usados en las pruebas de toxicidad acuática aguda, la ECHA aceptará datos de la prueba de toxicidad aguda en embriones de peces<sup>345</sup> en un enfoque PdE<sup>345</sup> caso por caso.

Se ha desarrollado una prueba prometedora de citotoxicidad con la línea celular RTgill-W1 para la determinación de toxicidad acuática aguda,<sup>346</sup> y en 2021 se adoptó la directriz de la prueba correspondiente expedida por la OCDE.<sup>347</sup> Esta prueba *in vitro* tiene el potencial de reducir o incluso sustituir el uso de peces en la prueba de toxicidad aguda en estos animales.<sup>348</sup>

Para mejorar la predicción de la toxicidad aguda en los peces, un proyecto financiado por la Iniciativa de Investigación a Largo Plazo del Cefic, llamado *Strengthening Weight of evidence for FET data to replace acute Fish Toxicity* [Fortalecimiento del peso de la evidencia de los datos FET para reemplazar la toxicidad aguda de los peces] (SWiFT), se centra en un enfoque probabilístico de red bayesiana.<sup>349</sup> Los resultados de SWiFT se tendrán en cuenta en el proyecto 2.54 del plan de trabajo del Programa de Directrices de Prueba de la OCDE para elaborar una guía sobre los IATA para las pruebas de toxicidad aguda en peces. Este proyecto está codirigido por Austria y el Consejo Internacional para la Protección de los Animales en los Programas de la OCDE (ICAPO), al cual pertenece el Consorcio Internacional de Ciencia de PETA.

Además, cuando aún se requieran pruebas en animales, la cantidad de animales usados y la necesidad de repetir los estudios se pueden reducir aplicando cuidadosamente la guía 23 de la OCDE Pruebas de Toxicidad Acuática de Sustancias y Mezclas Difíciles,<sup>350</sup> que se actualizó en 2019. En esta guía se prestó especial atención a la actualización de los métodos disponibles para probar productos químicos poco solubles en agua, evitando al mismo tiempo el uso

de disolventes. Así, se elimina la necesidad de un grupo de control con disolvente y se reduce el número de animales usados para las pruebas. Además, EE. UU. e ICAPO (del cual es miembro el Consorcio Internacional de Ciencia de PETA) codirigen el proyecto 2.55 del plan de trabajo del Programa de Directrices de Prueba de la OCDE sobre el uso y análisis de peces de control en estudios de toxicidad. En este proyecto se están usando análisis estadísticos de los datos existentes y simulaciones estadísticas para investigar si es posible realizar estudios de toxicidad acuática con solo un control cuando se usa un disolvente y así reducir aún más el número de animales usados.

## Toxicidad en aves

En la actualidad, la mayoría de las instancias reguladoras exige ensayos de toxicidad aviar para evaluar los posibles efectos ecológicos de las sustancias químicas en las aves terrestres. Para cumplir los requisitos reglamentarios, suelen exigirse tres pruebas de toxicidad en aves que incluyen ensayos orales agudos, alimenticios y de reproducción. En las pruebas alimenticias y orales agudas se usan hasta 120 aves. En la prueba oral, se les administra a las aves un producto químico por sonda durante un día, seguido de un periodo de observación de 14 días. En la prueba alimenticia se les da el producto químico como alimento durante cinco días y se les observa por tres días. Para las pruebas de reproducción, se alimentan más de 120 aves adultas con el producto químico durante ocho a diez semanas y se matan entre varios cientos y miles de crías para examinar los posibles resultados reproductivos adversos.

La comunidad científica ha expresado su preocupación sobre la utilidad de las pruebas en aves para proteger a las especies terrestres. Los resultados de estas pruebas, que suelen realizarse en dos especies, se usan para extrapolar los efectos potenciales sobre miles de especies de aves regionales. Además, la evitación del alimento, la regurgitación y otros problemas causados por los métodos usados para dosificar a las aves han dado lugar a estimaciones de toxicidad inexactas.

Para abordar estos problemas, el Consorcio Internacional de Ciencia de PETA colaboró con la EPA de EE. UU. para evaluar retrospectivamente el uso de pruebas orales y alimenticias en aves en la toma de decisiones de gestión de riesgos.<sup>351</sup> La revisión retrospectiva examinó 20 años de datos de evaluación de riesgos y encontró que, en general, la prueba alimenticia no se usa para la gestión de riesgos. Este estudio se usó para apoyar la política de la EPA del año 2020 titulada *Final Guidance for Waiving Sub-Acute Avian Dietary Tests for Pesticide Registration and Supporting Retrospective Analysis* [Orientación final para eximir las pruebas alimenticias subagudas en aves para el registro de pesticidas y respaldar

el análisis retrospectivo], que tiene la capacidad de evitar más de 700 ensayos de toxicidad en aves cada año, así como de ahorrar recursos que pueden mejor emplearse en el desarrollo de métodos sin animales adecuados para las pruebas de toxicidad terrestre.<sup>352</sup>

El Consorcio Internacional de Ciencia de PETA está adelantando un trabajo similar para examinar el uso de dos especies en las pruebas de reproducción aviar. Esta revisión retrospectiva examinará cientos de ingredientes activos de pesticidas para analizar las tendencias en las diferencias entre especies usadas para apoyar la toma de decisiones. El objetivo de esta iniciativa es identificar cualquier información potencial que no se esté usando en la toma de decisiones reglamentarias.

Además de estos proyectos, iniciativas como *Sequence Alignment to Predict Across-Species Susceptibility* [Alineación de secuencias para predecir la susceptibilidad entre especies] (SeqAPASS) pretenden modernizar las pruebas ecológicas por medio de métodos computacionales predictivos que tienen el potencial de reducir las pruebas en animales terrestres a la vez que mejoran la protección ecológica.<sup>353</sup>

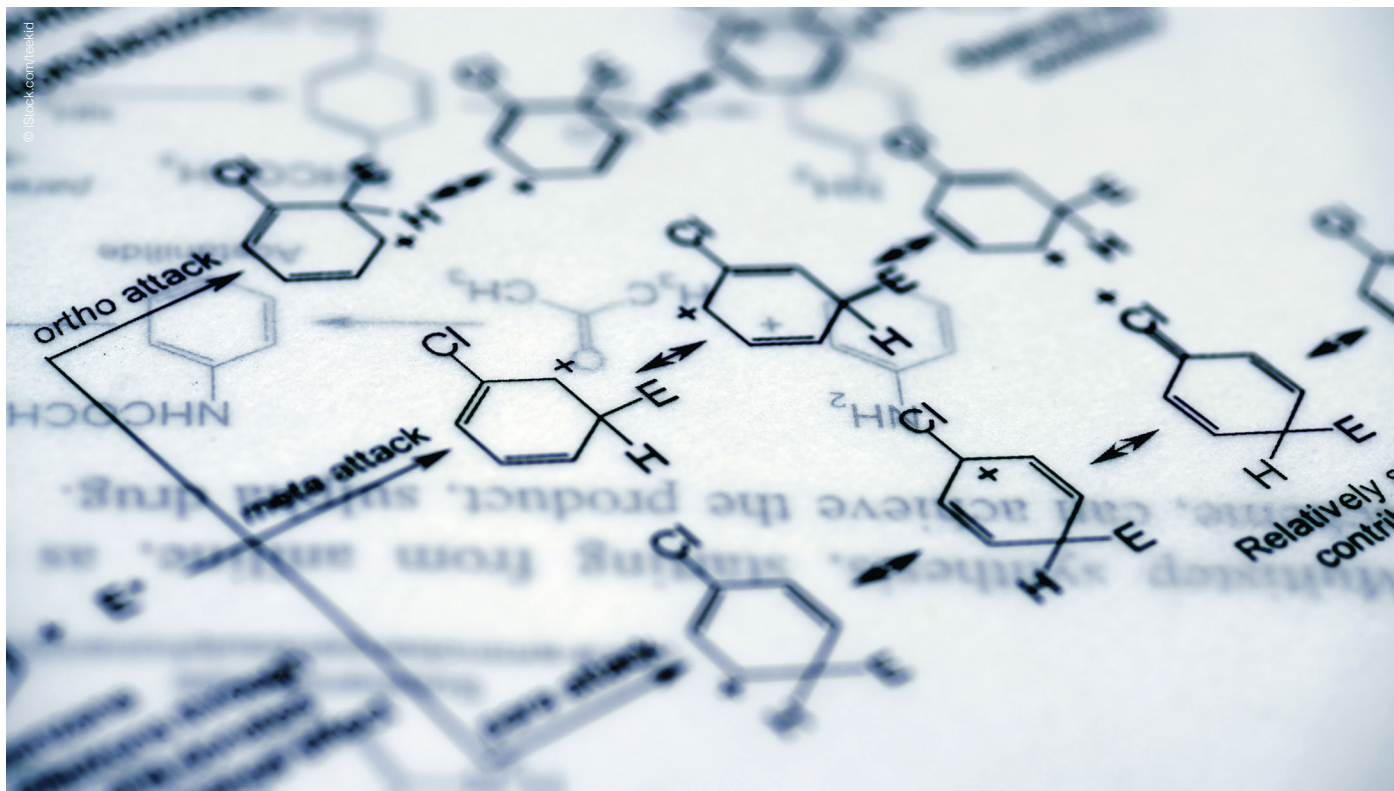
Se necesita una armonización mundial para poner fin a los requisitos de pruebas que no proporcionan información para mantener las protecciones ecológicas. Por ejemplo, la Comisión Europea y la Junta Central de Insecticidas y Comité de Registro (CIB&RC) de la India exigen el uso de una sola especie para la prueba de reproducción aviar, mientras que la EPA de EE. UU. y la Agencia Reguladora Canadiense de Manejo de Plagas exigen el uso de dos. Además, la EPA permite exenciones para la prueba alimenticia en aves y esta no es exigida por la Comisión Europea ni en Japón, pero sigue siendo requerida por la CIB&RC y en China. Por lo tanto, la armonización es necesaria para poner fin a nivel global al requisito de pruebas que, como se ha demostrado, no aportan información útil o están afectando la calidad del proceso de toma de decisiones reglamentarias.

## Alteraciones endocrinas

**Recomendación: Teniendo en cuenta la existencia de métodos sin animales y enfoques PdE, el uso de animales en las pruebas endocrinas puede reducirse drásticamente.**

Los alteradores endocrinos (también llamados disruptores endocrinos) son sustancias químicas naturales o sintéticas que interfieren en el sistema endocrino<sup>354</sup> al desencadenar una amplia gama de respuestas en las vías biológicas responsables de regular funciones fundamentales como el crecimiento, el desarrollo, la reproducción, el equilibrio energético, el metabolismo o la regulación del peso corporal.





Las vías endocrinas más investigadas desde el punto de vista de la seguridad química reglamentaria son los sistemas de estrógenos, andrógenos, tiroideos y esteroidogénesis (EATE) y, en menor medida, la vía de los retinoides.<sup>355</sup>

Se sabe mucho sobre los complejos mecanismos a través de los cuales las sustancias químicas pueden interferir con las vías endocrinas en los seres humanos<sup>356</sup> y la fauna silvestre.<sup>357,358</sup> En la AOP-Wiki se incluyen numerosas AOP relacionadas con las alteraciones endocrinas<sup>359</sup> y la OCDE ha publicado varios estudios de caso sobre los IATA.<sup>360</sup> Debido a la complejidad y la sensibilidad de los mecanismos endocrinos, las pruebas *in vivo* muestran una gran variabilidad (por ejemplo, el estrés experimentado por el animal puede influir significativamente en el resultado del estudio).<sup>361</sup> Los estudios clásicos de criterios de valoración no son apropiados en este ámbito y deben sustituirse por estudios *in vitro* en los que los múltiples factores que podrían afectar los resultados de las pruebas puedan controlarse de forma más eficaz.

Desde 2019, ocho proyectos del Grupo Europeo para Mejorar la Identificación de los Alteradores Endocrinos (EURION), con una financiación de 50 millones de euros de la Comisión Europea, se han centrado en el desarrollo de herramientas destinadas a mejorar la evaluación reglamentaria de los efectos endocrinos y reducir la dependencia de las pruebas en animales. Por ejemplo, el proyecto SCREENED<sup>362</sup> pretende desarrollar herramientas tridimensionales *in vitro* para detectar la influencia de los alteradores endocrinos en la glándula tiroidea.

La Oficina de Investigación y Desarrollo (ORD, por sus siglas en inglés) de la EPA de EE. UU. está desarrollando pruebas *in silico* e *in vitro*, así como AOP para apoyar una evaluación robusta de los efectos de las sustancias químicas en el sistema endocrino. Por ejemplo, el pronosticador de toxicidad (ToxCast) de la EPA clasifica y prioriza sustancias químicas usando más de 700 pruebas de detección de alta capacidad y toxicología computacional, que abarcan una variedad de respuestas celulares y vías de señalización relevantes.

Las pruebas ToxCast se están usando con éxito en EE. UU. y la UE. Tras un estudio comparativo de los resultados de la prueba ToxCast de la vía estrogénica y los resultados del ensayo uterotrófico,<sup>363</sup> la EPA anunció que aceptará los datos del Modelo de Bioactividad de los Receptores de Estrógeno de ToxCast como alternativa a al menos una prueba en animales<sup>360,364,365</sup> –el ensayo uterotrófico– que detecta efectos en la vía del estrógeno.<sup>366</sup> En la UE, el Modelo de Bioactividad de los Receptores de Estrógeno se acepta actualmente como fuente de información sobre el modo de acción del mecanismo *in vitro* necesario para identificar sustancias como alteradores endocrinos en el marco reglamentario vigente para biocidas y productos fitosanitarios. Su uso como alternativa para el ensayo uterotrófico está en discusión.

La vía tiroidea es más compleja que las vías de estrógenos y andrógenos. En colaboración con otras organizaciones, el Centro Común de Investigación de la UE y la ORD de la EPA están desarrollando y evaluando la validez de conjuntos de pruebas relevantes basadas en la AOP tiroidea.<sup>367</sup>

## Irritación o corrosión ocular

### Recomendación: Eliminar de inmediato el uso de animales para las pruebas de irritación o corrosión ocular.

Para evaluar la irritación y la corrosión ocular mediante la prueba de Draize, se aplica una sustancia química en los ojos de conejos y se monitorea el grado de daño durante un periodo de 14 días. Los conejos pueden sufrir inflamación ocular, secreciones, ulceración, hemorragia, opacidad o ceguera. La prueba de Draize se creó en 1944 y desde entonces se han desarrollado sustitutos avanzados que han demostrado ser tanto o más confiables y relevantes que esta prueba. Por ejemplo, un análisis de 491 sustancias químicas con al menos dos pruebas oculares en conejos demostró que había un 73 % de probabilidad de obtener la misma clasificación del SGA más de una vez para la categoría 1, un 32.9 % para la categoría 2A, un 15.5 % para la categoría 2B y un 93.9 % para las sustancias sin categoría.<sup>368</sup> Es importante destacar que estos resultados demostraron que había un 10.4 % de probabilidad de que una sustancia química identificada una vez como categoría 1, fuera identificada posteriormente como sin categoría.

Existen oportunidades de evitar las pruebas en animales según los criterios descritos en la guía 237 de la OCDE.<sup>369</sup> En 2017 se publicó una guía de la OCDE sobre un IATA de daño e irritación ocular grave.<sup>370</sup> A continuación se enumeran los métodos *in vitro* disponibles:

- **Prueba N.º 491 de la OCDE: Método de prueba *in vitro* de exposición breve (STE).** Se puede usar para identificar sustancias químicas que causan lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA) o que no requieren clasificación (sin categoría del SGA).
- **Prueba N.º 492 de la OCDE: Método de prueba del epitelio similar a la córnea humana reconstruida (RhCE).** Se puede usar para identificar sustancias químicas no clasificadas por causar irritación ocular o lesiones oculares graves (sin categoría del SGA).
- **Prueba N.º 492B de la OCDE: Método de prueba del epitelio similar a la córnea humana reconstruida (RhCE) para la identificación de peligros oculares.** Puede usarse para identificar las sustancias químicas que no requieren clasificación (sin categoría del SGA) o las que requieren clasificación de irritación ocular (categoría 2 del SGA) y clasificación de lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA).
- **Prueba N.º 494 de la OCDE: Método de prueba Vitrigel de irritación ocular.** Puede usarse para identificar sustancias químicas no clasificadas por causar irritación ocular o lesiones oculares graves (sin categoría del SGA).
- **Prueba N.º 496 de la OCDE: Método de prueba macromolecular *in vitro*.** Puede usarse para identificar

sustancias químicas que causan lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA) o que no requieren clasificación.

- **Prueba N.º 460 de la OCDE: Método de prueba de liberación de fluoresceína.** Puede usarse para identificar sustancias químicas que causan lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA). Se recomienda como paso inicial dentro de un enfoque descendente para identificar corrosivos o irritantes oculares graves.
- **Prueba N.º 437 de la OCDE: Método de prueba de opacidad y permeabilidad de la córnea bovina (BCOP).** Se puede usar para identificar sustancias químicas que causan lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA) o que no requieren clasificación.
- **Prueba N.º 438 de la OCDE: Método de prueba del ojo aislado de pollo.** Puede usarse para identificar sustancias químicas que causen lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA) o que no requieran clasificación. Se recomienda como primer paso dentro de una estrategia de pruebas descendente o ascendente.

Además, la **Prueba N.º 467 de la OCDE: Enfoques definidos para las lesiones oculares graves y la irritación ocular** describe enfoques basados tanto en propiedades fisicoquímicas y datos *in vitro* de las pruebas N.º 492 y 437 para líquidos puros no tensioactivos, como en datos *in vitro* de los ensayos N.º 491 y 437 para líquidos puros y/o diluidos no tensioactivos o sólidos disueltos en agua. Los enfoques definidos pueden usarse para identificar sustancias químicas que no requieren clasificación (sin categoría del SGA) y aquellas que requieren clasificación de irritación ocular (categoría 2 del SGA) y clasificación de lesión ocular grave (categoría 1 del SGA).

Estos métodos generalmente están validados para su uso con cosméticos y productos químicos industriales. Algunos métodos son más apropiados que otros en función de su ámbito de aplicabilidad, la finalidad de la prueba y el tipo de producto químico a probar (por ejemplo, tensioactivos o sólidos).

En la actualidad, la EPA acepta el uso de métodos *in vitro* y *ex vivo* para la determinación de la irritación y la corrosión ocular a la hora de clasificar los productos de limpieza antimicrobianos y, caso por caso, otros productos pesticidas, y ha publicado una guía que describe las pruebas que la industria puede usar para este criterio de valoración.<sup>371</sup> Así mismo, la EPA, en colaboración con el Consorcio Internacional de Ciencia de PETA, el Centro Interinstitucional para la Evaluación de Métodos Toxicológicos Alternativos del Programa Nacional de Toxicología (NTP) de EE. UU., e integrantes del sector, publicó un documento que demuestra que los métodos *in chemico*, *in vitro* y *ex vivo* son tan buenos o mejores que las pruebas en conejos cuando se considera la reproducibilidad y la relevancia para los humanos. El documento señala que estos métodos deberían usarse hoy en día para la evaluación de sustancias químicas, incluidas las formulaciones agroquímicas.<sup>372</sup>

## Genotoxicidad y carcinogenicidad

**Recomendación: Teniendo en cuenta la existencia de métodos sin animales y enfoques PdE, el uso de animales en pruebas de genotoxicidad y carcinogenicidad puede reducirse drásticamente.**

### Genotoxicidad

Los principales criterios de valoración de la genotoxicidad que se evalúan con fines reglamentarios son la mutación de genes, las aberraciones cromosómicas estructurales (clastogenicidad) y las aberraciones cromosómicas numéricas (aneuploidía). Las directrices de prueba de la OCDE para evaluar la genotoxicidad *in vitro* abarcan uno o dos criterios de valoración de manera simultánea:

- **Prueba N.º 471 de la OCDE: Prueba de mutación inversa bacteriana.** Esta prueba, conocida comúnmente como ensayo de Ames, usa *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, que requieren aminoácidos, para detectar mutaciones puntuales por sustituciones de bases o desplazamiento del marco de lectura.
- **Prueba N.º 487 de la OCDE: Prueba de micronúcleos *in vitro*.** Este ensayo puede usarse para detectar micronúcleos en el citoplasma de células en interfase que han sufrido división celular durante o después de la exposición a la sustancia bajo prueba. Este ensayo detecta aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas.
- **Prueba N.º 490 de la OCDE: Pruebas *in vitro* de mutación génica en células de mamífero usando el gen de la timidina cinasa.** Se pueden usar dos pruebas distintas para detectar mutaciones génicas inducidas por sustancias químicas.
- **Prueba N.º 473 de la OCDE: Prueba *in vitro* de aberración cromosómica en mamíferos.** Esta prueba identifica las sustancias químicas que causan aberraciones cromosómicas estructurales.
- **Prueba N.º 476 de la OCDE: Prueba *in vitro* de mutación génica en células de mamífero usando los genes *Hrpt* y *xrpt*.** Estas pruebas pueden detectar mutaciones genéticas inducidas por sustancias químicas.

La evaluación de la genotoxicidad con fines reglamentarios suele seguir un enfoque gradual que comienza con una batería básica de pruebas *in vitro*, por ejemplo, el ensayo de Ames, la prueba de micronúcleos y la prueba de aberración cromosómica. La necesidad de hacer seguimiento de las pruebas *in vitro* con pruebas *in vivo* depende de los resultados y de los requisitos reglamentarios. Por ejemplo, en el caso de las regulaciones sobre biocidas y productos químicos industriales de la UE, un resultado positivo en cualquiera de las pruebas *in vitro* requeridas debe ir seguido de una prueba *in vivo* adecuada.<sup>375,374</sup> Sin embargo, si una sustancia da resultados negativos en las pruebas *in vitro*, puede considerarse que no tiene potencial

genotóxico y no es necesario realizar más pruebas de genotoxicidad. Por el contrario, en el caso de algunas clases de sustancias químicas es necesario realizar pruebas *in vivo* independientemente de los resultados de las pruebas *in vitro* (por ejemplo, productos fitosanitarios y farmacéuticos).<sup>375,376</sup>

Los datos adecuados procedentes de estudios *in silico* (por ejemplo, QSAR y extrapolación) pueden ayudar a reducir la necesidad de realizar pruebas *in vivo*. Por ejemplo, la base de datos consolidada de genotoxicidad y carcinogenicidad del EURL ECVAM publicada por el Centro Común de Investigación (JRC) proporciona recursos sustanciales para la extrapolación.<sup>377</sup>

Además, los métodos *in vitro* avanzados pueden proporcionar opciones de seguimiento y reducción de riesgos para su uso en un enfoque PdE. Por ejemplo, el biomarcador transcriptómico *in vitro* que responde a las sustancias que causan daño en el ADN (DDI, por sus siglas en inglés), TGx-DDI,<sup>378,379</sup> y el ensayo ToxTracker<sup>380-382</sup> pueden proporcionar información sobre el modo de acción de genotóxicos potenciales y han sido sometidos a programas reglamentarios formales de “calificación”.<sup>383,384</sup> Los datos generados mediante el ensayo ToxTracker y la extrapolación se han usado en expedientes de REACH.<sup>385</sup>

Los ensayos cometa y los micronúcleos en piel reconstruida tridimensionalmente para el seguimiento de los resultados positivos obtenidos en pruebas de genotoxicidad *in vitro* estándar para compuestos aplicados por vía cutánea ofrecen métodos adicionales sin animales e importantes oportunidades para evitar el uso de animales en las pruebas de genotoxicidad.<sup>386,387</sup> Los requisitos de información para la evaluación de la genotoxicidad de los cosméticos<sup>388</sup> ya acogen el ensayo de micronúcleos en piel humana reconstruida tridimensionalmente o un ensayo cometa con células de mamífero o piel humana reconstruida tridimensionalmente. Los rápidos avances en el desarrollo de modelos tridimensionales de hígado y vías respiratorias ofrecen una posible evaluación sin animales de la genotoxicidad de los compuestos administrados por vía oral o por inhalación en un futuro próximo.<sup>389</sup>

Los métodos sin animales están ganando terreno a nivel internacional. La generación de datos exhaustivos basados en estos métodos y el desarrollo de estudios de caso, como el de la cumarina en productos cosméticos, es un componente importante para apoyar la adopción de métodos innovadores para la evaluación de riesgos.<sup>380,390</sup>

Los estudios de caso de genotoxicidad<sup>391</sup> y mutagenicidad<sup>392</sup> del IATA, realizados en el marco del proyecto correspondiente de la OCDE,<sup>393</sup> ilustran enfoques factibles para el desarrollo de directrices adecuadas para la evaluación del riesgo de genotoxicidad sistémica sin pruebas en animales.

## Carcinogenicidad

La evaluación de la carcinogenicidad suele requerir la realización de pruebas en ratas y/o ratones durante la mayor parte de su vida (hasta dos años). La prueba requiere un mínimo de 400 ratas y/o ratones por evaluación química (pruebas N.º 451 y N.º 453 de la OCDE).

Aunque los estudios de carcinogenicidad en animales se siguen realizando de forma rutinaria, la prueba ha estado bajo escrutinio científico desde principios de los años 70 por su falta de reproducibilidad<sup>394</sup> y su incapacidad para predecir resultados en humanos.<sup>395</sup> En concreto, hay dos supuestos erróneos que subyacen a estas pruebas: (1) los carcinógenos para los roedores son carcinógenos para los humanos, y (2) la exposición a dosis elevadas de sustancias químicas en roedores es indicativa de una dosis ambientalmente relevante. Los datos sobre carcinogenicidad producidos en los últimos 50 años han demostrado que ambos supuestos son incorrectos. Décadas de reseñas científicas destacan la falta general de confiabilidad de los bioensayos de cáncer en roedores para predecir el cáncer humano.<sup>395-400</sup>

Por ejemplo, un análisis de 202 evaluaciones de pesticidas del programa de revisión de la UE demostró que el estudio de carcinogenicidad en ratones contribuyó poco o nada a la determinación de la ingesta diaria aceptable para la evaluación del riesgo crónico para los humanos o a la clasificación del peligro a incluir en la etiqueta.<sup>401</sup> En cuanto a la aprobación de pesticidas, los autores demostraron que la prueba en ratones no influyó en ningún resultado. Un estudio adicional señaló que los datos recopilados de 182 sustancias químicas farmacéuticas muestran que se obtiene poco valor del estudio de carcinogenicidad cuando los compuestos carecen de ciertos factores de riesgo histopatológicos, alteración hormonal y resultados positivos de toxicidad genética.<sup>402</sup> Este estudio se usó para respaldar un grupo internacional que desarrolló un enfoque PdE para cumplir con algunos de los requisitos de ensayos de carcinogenicidad sin la prueba de dos años en ratas.<sup>403,404</sup> El trabajo de este grupo dio lugar a un anexo a la directriz para la evaluación de la carcinogenicidad de los productos farmacéuticos (ICH S1B) que ofrece la oportunidad de evitar el uso de 400 animales por evaluación farmacéutica reglamentaria.<sup>405</sup> Una iniciativa similar denominada *Rethinking chronic toxicity and Carcinogenicity Assessment for Agrochemicals Project* [Proyecto de replanteamiento de la toxicidad crónica y la evaluación de la carcinogenicidad de los productos agroquímicos] (ReCAAP), liderada por el Consorcio Internacional de Ciencia de PETA, desarrolló un marco para apoyar una evaluación de los productos agroquímicos basada en PdE sin ensayos de carcinogenicidad a largo plazo en ratas y ratones.<sup>406</sup>

Además, las pruebas de transformación celular *in vitro* (CTA,

por sus siglas en inglés) recapitulan un proceso de múltiples etapas que modela algunos aspectos de la carcinogénesis *in vivo* y tienen el potencial de detectar carcinógenos genotóxicos y no genotóxicos. En su recomendación sobre el CTA basado en la línea celular Bhas 42, el EURL ECVAM señala que la información sobre el potencial transformador de las sustancias generadas por los CTA puede ser suficiente para la toma de decisiones.<sup>407</sup>

Tras un estudio en el que se probó el CTA Bhas 42 con 98 sustancias, incluidos carcinógenos humanos conocidos, la OCDE recomendó que esta prueba se use como parte de una estrategia para ayudar a evaluar las sustancias potencialmente cancerígenas.<sup>408,409</sup> Cuando se combinan con otra información, como datos de genotoxicidad, análisis de estructura-actividad e información toxicocinética, los CTA en general, y el CTA Bhas 42 en particular, pueden contribuir a la evaluación de carcinogénicos potenciales y ofrecer una alternativa a las pruebas *in vivo*.<sup>410,411</sup>

Diversas herramientas y modelos computacionales ayudan además a evaluar el potencial carcinogénico. Alertas estructurales (AE) que señalan posibles carcinógenos no genotóxicos se han incorporado al conjunto de herramientas QSAR de la OCDE.<sup>412</sup> Además, la EPA ha publicado un modelo computacional, OncoLogic™, para evaluar el potencial carcinógeno de las sustancias químicas,<sup>413</sup> y también existen opciones comerciales, como las de Lhasa Limited, MultiCASE, UL Cheminformatics e Instem. En última instancia, la identificación de sustancias químicas reactivas al ADN con el ensayo de Ames o las AE genotóxicas podría combinarse con la identificación de carcinógenos no genotóxicos mediante AE, dejando que las CTA modelen la mayor parte de lo que queda sin explicar en un enfoque PdE. Un grupo de expertos de la OCDE está trabajando para generar un IATA para carcinógenos no genotóxicos.<sup>414</sup>

Dada la complejidad de la carcinogénesis, los expertos reconocen que es necesario integrar nuevos enfoques (por ejemplo, *in silico* o *in vitro*) para respaldar una evaluación adecuada de la seguridad basada en PdE.<sup>415</sup> Afortunadamente, existen iniciativas en curso que facilitan la integración de métodos para lograr, en última instancia, una evaluación de la carcinogenicidad sin animales, rápida y relevante para los humanos que cumpla con el marco reglamentario químico y farmacéutico.<sup>406,414,416,417</sup>

## Fototoxicidad

### **Recomendación: Eliminar de inmediato el uso de animales para las evaluaciones de fototoxicidad.**

Las sustancias que absorben la luz en el rango de radiación UV y visible (290 a 700 nm) y pueden llegar a la piel o los ojos podrían requerir pruebas de fototoxicidad potencial.





La fototoxicidad es la respuesta tóxica a una sustancia administrada por vía tópica o sistémica, que se produce tras la exposición a la luz. La fototoxicidad puede causar síntomas que van desde quemaduras de primer grado (enrojecimiento, comezón y dolor) hasta quemaduras de tercer grado. La fototoxicidad, también llamada fotosensibilidad, es un efecto adverso muy conocido de muchos fármacos, incluidos los antimicrobianos, los antiinflamatorios no esteroideos, los diuréticos y los agentes quimioterapéuticos.<sup>418</sup>

Se han realizado ensayos de fototoxicidad de compuestos administrados por vía sistémica o tópica en diversas especies, como cobayas, ratones y ratas. Sin embargo, no se ha establecido un diseño estandarizado de estudio *in vivo*.<sup>419</sup> Por el contrario, se han elaborado tres directrices de prueba de la OCDE que usan métodos *in chemico* e *in vitro* para evaluar la fototoxicidad:

- **Prueba N.º 495 de la OCDE: Ensayo de ERO (especies reactivas del oxígeno) para la fotorreactividad.** Se trata de un método *in chemico* que mide la capacidad de una sustancia para crear especies reactivas de oxígeno bajo exposición a la luz solar artificial.

- **Prueba N.º 432 de la OCDE: Prueba de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU.** Este ensayo mide la viabilidad de una línea celular de ratón incubada con un fototóxico potencial y expuesta a la luz.
- **Prueba N.º 498 de la OCDE: Método de prueba de fototoxicidad en epidermis humana reconstruida – Fototoxicidad *in vitro*.** Se incuba un modelo tridimensional de epidermis humana reconstruida con el fototóxico potencial y se expone a la luz.

**La prueba N.º 498 de la OCDE** se basa en un principio similar al de su **prueba N.º 432**, pero usa un modelo tridimensional de piel humana reconstruida en lugar de la línea celular de ratón, lo que amplía el ámbito de aplicabilidad a una mayor selección de sustancias, incluidas las formulaciones finales, las mezclas complejas o los parches dermatológicos.<sup>420</sup> Los modelos tridimensionales de piel también se pueden usar para probar sustancias con un pH extremo. En 2018, Francia y los Países Bajos fueron los únicos estados miembro de la UE que realizaron pruebas de fototoxicidad *in vivo*, lo que subraya la relevancia de la prueba N.º 432 de la OCDE.<sup>421</sup>

## Pirogenicidad

### Recomendación: Eliminar de inmediato el uso de animales para la evaluación de la pirogenicidad.

Previo a la comercialización de medicamentos y dispositivos médicos, las instancias reguladoras exigen pruebas para demostrar que estos no están contaminados con sustancias que desencadenen una respuesta febril. Estas sustancias, denominadas colectivamente pirógenos, son química y estructuralmente diversas, pero causan fiebre en los humanos mediante un mecanismo común: los monocitos y macrófagos de la sangre periférica detectan los pirógenos y liberan citocinas proinflamatorias que inducen un aumento de la temperatura corporal. Existen dos métodos *in vitro* para detectar pirógenos:

- **Prueba de activación de monocitos (MAT)**, definida en el capítulo general 2.6.30 de la Farmacopea Europea (*Ph. Eur.*).
- **Ensayo del factor C recombinante (rFC)**, definido en el capítulo general 2.6.32 de la *Ph. Eur.*

Aunque se conoce bien el mecanismo de la respuesta de la fiebre humana, casi todas las agencias reguladoras del mundo siguen exigiendo dos pruebas en animales para evaluar la contaminación por pirógenos. La prueba de pirógenos en conejos (RPT) requiere que se inyecte a estos animales la sustancia a probar y posteriormente se los inmovilice durante tres horas, período en el cual se monitorean los cambios de su temperatura corporal por vía rectal. Entre 2015 y 2019, se usaron más de 200 mil conejos en el RPT solo en Europa,<sup>422</sup> a pesar de que nunca se ha validado formalmente su relevancia para los humanos y de que sus resultados pueden variar en función del nivel de estrés del animal. También existen diferencias en la sensibilidad a los pirógenos entre especies y la prueba es incompatible con algunas clases de fármacos.<sup>423</sup>

La prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), también denominada prueba de endotoxinas bacterianas, requiere el uso de hemolinfa de cangrejos herradura capturados y solo detecta endotoxinas bacterianas y ningún otro pirógeno. Tras el proceso de desangrado, hasta el 30 % de los cangrejos muere. Aquellos que se recuperan tienen menos probabilidades de sobrevivir en la naturaleza.<sup>424</sup> Existe una versión sintética de la LAL para detectar endotoxinas bacterianas en la que la hemolinfa se sustituye por un reactivo recombinante (ensayo rFC). El ensayo rFC es una prueba muy confiable y respetuosa con los animales, con un desempeño igual o superior al de la prueba LAL.<sup>425</sup>

Desde 2010, la prueba *in vitro* de activación de monocitos (MAT), capaz de detectar, endotoxinas y no endotoxinas pirógenas, ha sido validada e incluida en la *Ph. Eur.* como

ensayo para evaluar la contaminación por pirógenos.<sup>426</sup> En la prueba MAT, los fármacos y dispositivos médicos se incuban con sangre humana entera o monocitos humanos aislados. Tras este periodo de exposición, las pruebas miden las citocinas proinflamatorias liberadas por los monocitos para determinar el grado de contaminación con sustancias pirógenas.<sup>427</sup> Esto evita los problemas antes mencionados con las pruebas RPT y LAL. Además, estudios de caso han documentado instancias en las que la prueba MAT detectó contaminación por pirógenos en productos que habían superado las pruebas RPT y LAL pero que causaron fiebre en pacientes humanos.<sup>428</sup>

Las agencias reguladoras de la UE, la India, el Reino Unido y EE. UU. aceptan la prueba MAT, y las farmacopeas usadas en estas regiones permiten su uso tras la validación específica del producto. No obstante, las pruebas en animales siguen usándose a pesar de sus bien documentadas limitaciones.<sup>429</sup> Para eliminar el uso de animales en las pruebas de pirógenos, las agencias reguladoras y las instancias de normalización deben hacer un mayor esfuerzo de integración y armonización que enfatice la preferencia por las pruebas sin animales en los requisitos reglamentarios internacionales, y deben alentar a los fabricantes de fármacos y dispositivos a usar y presentar datos de estas pruebas en los expedientes de sus productos. En septiembre de 2018, los participantes en un taller organizado por el Consorcio Internacional de Ciencia de PETA y NICEATM discutieron enfoques sin animales para las pruebas de pirógenos para dispositivos médicos y pidieron más oportunidades de capacitación y educación para aumentar el uso de la prueba MAT con fines reglamentarios.<sup>430</sup>

A raíz de una encuesta realizada a personas que usan la prueba de pirógenos, la Dirección Europea de Calidad de los Medicamentos y Asistencia Sanitaria (EDQM) revisó el capítulo general de la *Ph. Eur.* sobre la prueba MAT para facilitar el uso del método y enfatizar que se considera un sustituto de los ensayos de pirógenos en animales.<sup>431,432</sup> Este respaldo se repite en las declaraciones de la Agencia Europea de Medicamentos<sup>433,434</sup> y, en 2021, la Comisión de la *Ph. Eur.* anunció que pretende reemplazar completamente la prueba RPT en su guía antes de 2026. La Organización Internacional de Normalización (ISO) está revisando sus directrices para permitir el uso de la prueba MAT en la evaluación de contaminación por pirógenos de los dispositivos médicos, pero el proceso de revisión ha avanzado lentamente.<sup>427</sup> En la 8.ª edición de la Farmacopea India, la Comisión de Farmacopea India revisó el capítulo general de pruebas de pirógenos, introdujo la monografía sobre la prueba MAT y sustituyó la prueba RPT por el ensayo LAL.<sup>435</sup> Sin embargo, debido a una orientación poco clara y a la ambigüedad normativa sobre la aplicabilidad de la prueba MAT como ensayo de pirógenos independiente, se siguen usando las pruebas RPT y LAL.





## Toxicidad reproductiva y del desarrollo

### **Recomendación: Financiar y apoyar de inmediato el desarrollo de métodos innovadores sin animales para evaluar la toxicidad en la reproducción y el desarrollo.**

Los estudios de toxicidad reproductiva miden el efecto de una sustancia química sobre los órganos reproductivos y la fertilidad. Los estudios de toxicidad del desarrollo miden el efecto de una sustancia química sobre el desarrollo de la descendencia durante el embarazo.

Los estudios de toxicidad del desarrollo para la evaluación de la seguridad de los productos químicos y farmacéuticos para los humanos se realizan principalmente en ratas. Sin embargo, muchos marcos reglamentarios, incluidos los Reglamentos sobre Biocidas y Productos Fitosanitarios y, en algunas circunstancias, REACH en la UE, exigen que los solicitantes de registro presenten resultados de pruebas en

una segunda especie, normalmente conejos, bajo el supuesto de que existen diferencias entre especies en cuanto a la sensibilidad a los efectos sobre el desarrollo. Estos estudios usan una gran cantidad de animales. Por ejemplo, un estudio de toxicidad en el desarrollo prenatal realizado según la norma TG 414 de la OCDE usa aproximadamente 560 conejos o 784 ratas.<sup>436</sup>

Ninguno de los métodos *in vivo* usados para evaluar la toxicidad reproductiva y del desarrollo se ha validado formalmente para establecer su relevancia para los humanos.<sup>437</sup> Por lo tanto, se requiere una inversión significativa para desarrollar métodos sin animales relevantes para los humanos. EURL ECVAM ha investigado la validación de pruebas de toxicidad reproductiva *in vitro* y está liderando el desarrollo de una AOP para la activación de PPAR $\gamma$  que conduce a una alteración de la fertilidad, un aspecto de la toxicidad reproductiva.<sup>438,439</sup> El proyecto ReProTect del FP6 de la UE también ha investigado posibles estrategias para abarcar todo el ciclo reproductivo de los mamíferos, lo que ha dado lugar a

una serie de publicaciones.<sup>440</sup> Además, el proyecto ChemScreen del FP7 se diseñó para generar un sistema de detección rápida relativamente simple y económico.<sup>441</sup>

El proyecto EU-ToxRisk integra avances en biología celular, tecnología “ómica”, biología de sistemas y modelado por computador para definir las complejas cadenas de acontecimientos que vinculan la exposición a sustancias químicas con los resultados tóxicos. El proyecto se centra en la toxicidad sistémica derivada de dosis repetidas y en la toxicidad reproductiva y del desarrollo. El Centro Nacional de Toxicología Computacional de la EPA también está explorando el potencial de las sustancias químicas para alterar el desarrollo prenatal mediante el uso de su modelo de embrión virtual, v-Embryo™, que integra enfoques de modelado *in vitro* e *in silico*.<sup>442</sup> La OCDE, el JRC, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y la EPA están elaborando directrices para demostrar cómo puede usarse una batería integrada de pruebas *in vitro* para determinar el potencial de neurotoxicidad de las sustancias químicas en el desarrollo, y las agencias asociadas están trabajando en estudios de caso sobre diferentes clases de sustancias químicas.<sup>443</sup> En 2021, Health Canada<sup>444</sup> comparó los puntos de partida basados en la bioactividad *in vitro* (POD<sub>bioactividad</sub>) con los puntos de partida de los estudios de dosis orales repetidas, desarrollo y reproducción (POD<sub>tradicional</sub>) usados en la evaluación de riesgos. Para 43 de las 46 sustancias químicas examinadas, el POD<sub>bioactividad</sub> fue más conservador que el POD<sub>tradicional</sub> más bajo, lo que demuestra la confianza en el uso de la bioactividad *in vitro* como estimación sustitutiva del límite inferior de los niveles de efectos adversos *in vivo*, una fuerte indicación de que el uso del POD<sub>bioactividad</sub> sería igual o más protector que el uso del POD<sub>tradicional</sub>.<sup>444</sup>

Aunque el campo está avanzando gradualmente hacia una serie de estrategias integradoras que abarquen la mayoría de los mecanismos posibles, se requiere mucha más investigación.

## Irritación y corrosión cutánea

### **Recomendación: Eliminar de inmediato el uso de animales para las pruebas de irritación y corrosión cutánea.**

Diversas agencias reguladoras exigen o recomiendan pruebas de irritación y corrosión cutánea para las sustancias químicas. En la prueba en animales, se aplica la sustancia a evaluar en la piel rasurada de un conejo y se observa durante un máximo de 14 días para determinar el grado de daño cutáneo. Las pruebas pueden causar daños permanentes en la piel, úlceras, hemorragias, costras sanguinolentas y cicatrices.

A pesar de los años de uso, se ha demostrado que los

estudios de irritación cutánea que usan animales son, en general, malos predictores de las reacciones cutáneas humanas y muy variables.<sup>445</sup> Por ejemplo, un estudio que comparó los resultados de 65 sustancias obtenidos en ensayos en conejos y pruebas de cuatro horas en parches de piel humana reveló que el 45 % de las clasificaciones del potencial de irritación química basadas en pruebas en animales era incorrecto.<sup>446</sup>

Existen oportunidades de evitar los ensayos en animales basándose en los criterios descritos en la guía N.º 237 de la OCDE.<sup>369</sup> Además, la OCDE ha desarrollado un IATA con métodos *in vitro* de irritación y corrosión cutánea que evita o minimiza el uso de animales.<sup>447</sup>

- **Prueba N.º 439 de la OCDE: Método de prueba de irritación cutánea *in vitro* en epidermis humana reconstruida (RHE).** Puede usarse para la identificación del peligro asociado con sustancias y mezclas químicas irritantes, de conformidad con el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA) de las Naciones Unidas, como categoría 2, o productos químicos no clasificados. Puede usarse como prueba independiente o en una estrategia de ensayos por niveles.
- **Prueba N.º 431 de la OCDE: Método de prueba de corrosión cutánea *in vitro* en RHE.** Puede usarse para la identificación de sustancias y mezclas químicas corrosivas, y para distinguir entre corrosivos cutáneos graves y menos graves.
- **Prueba N.º 435 de la OCDE: Método de prueba *in vitro* de barrera de membrana para la corrosión cutánea.** Permite la clasificación de los productos químicos corrosivos en las tres subcategorías de corrosividad del SGA.

Recientemente, se validó el uso de la prueba TG 439 de la OCDE para evaluar la capacidad de los fragmentos de dispositivos médicos para causar irritación cutánea y se actualizó la guía ISO 10993 para incluirla.<sup>448</sup>

## Sensibilización cutánea

### **Recomendación: Eliminar de inmediato el uso de animales para las pruebas de sensibilización cutánea.**

La evaluación de la sensibilización cutánea consiste en medir la probabilidad de que una sustancia cause una reacción alérgica si se aplica sobre la piel. En animales, estas evaluaciones se han basado en la aplicación de la sustancia a probar ya sea en la piel rasurada de cobayas o en las orejas de ratones, prácticas correspondientes a las pruebas de maximización de cobayas y de ganglios linfáticos locales, respectivamente.

El requisito reglamentario de realizar pruebas de sensibilización cutánea puede cumplirse con un enfoque definido, tal como se describe en la **Prueba N.º 497 de la**



**OCDE: Enfoques definidos en sensibilización cutánea**, usando una combinación de ensayos *in chemico* e *in vitro* que abordan un evento clave diferente en la AOP cada uno.<sup>337</sup> El enfoque definido “2 de 3” proporciona información suficiente para la identificación del peligro, y las pruebas integradas (ITSv1 e ITSv2) recopilan la información de dos de los ensayos *in vitro* listados a continuación y predicciones *in silico* del peligro y la potencia.

- **Prueba N.º 442C de la OCDE – Directriz de pruebas de sensibilidad cutánea *in chemico* que abordan el evento clave de la vía de los resultados adversos en la unión covalente a proteínas.** Esta directriz aborda el evento molecular iniciador de la AOP de sensibilización cutánea.
- **Prueba N.º 442D de la OCDE – Ensayos de sensibilización cutánea *in vitro* que abordan el evento clave de la AOP en la activación de queratinocitos.** Esta directriz aborda el segundo evento clave de la AOP de sensibilización cutánea.
- **Prueba N.º 442E de la OCDE – Ensayos de sensibilización cutánea *in vitro* que abordan el evento clave de la activación de las células dendríticas.** Esta prueba aborda el tercer evento clave de la AOP de sensibilización cutánea.

Cuando se comparan con datos en humanos, los métodos sin animales para predecir la sensibilización cutánea son tan buenos o mejores que la prueba de los ganglios linfáticos locales.<sup>449</sup>

## Toxicidad sistémica

**Recomendación: Teniendo en cuenta la existencia de métodos sin animales y enfoques PdE, el uso de animales en las pruebas de toxicidad sistémica puede reducirse drásticamente.**

### Toxicidad sistémica aguda

Para determinar el peligro de exposición a un producto o sustancia química, se administra una sustancia a animales por vía oral, cutánea o por inhalación. La toxicidad aguda se refiere a los efectos adversos observados tras un nivel elevado de exposición a una sustancia durante un periodo de hasta 24 horas. En estas pruebas se determina la dosis a la que moriría la mitad de los animales, denominada dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ) o concentración letal 50 ( $CL_{50}$ ) para las pruebas por inhalación. La prueba  $DL_{50}$  y sus adaptaciones nunca han sido validadas científicamente, y su precisión para predecir los efectos químicos en humanos sigue siendo cuestionable. Un análisis de la variabilidad de la prueba de toxicidad oral aguda en animales demostró que existe solo un 60 % de probabilidad de obtener la misma clasificación cuando la misma sustancia química se prueba más de una vez.<sup>450</sup> Otro análisis de los datos existentes sobre la  $DL_{50}$  oral aguda demostró que la repetición de los estudios da como resultado la misma clasificación de peligro el 60 % de las veces en promedio.<sup>451</sup> Este segundo estudio

demostró que la variabilidad biológica o del protocolo inherente muy probablemente subyace a la variación de los resultados.

Cuando se aporta una justificación científica, las autoridades reguladoras pueden permitir la evaluación de la toxicidad aguda sin realizar pruebas en animales. La OCDE ha publicado directrices para eximir o complementar las pruebas de toxicidad aguda,<sup>369</sup> y la EPA ha publicado directrices similares para pesticidas y productos que contienen pesticidas.<sup>452</sup> Estas incluyen el uso de los datos existentes para la extrapolación y la consideración de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia a probar.

### Toxicidad sistémica por administración repetida de dosis

En los estudios de toxicidad con administración repetida de dosis, los animales se exponen repetidamente a sustancias durante un mes (subaguda), tres meses (subcrónica) o varios años (crónica) para medir los efectos de múltiples exposiciones químicas. Las sustancias químicas suelen administrarse a los animales por sonda oral, a menos que otra vía de exposición sea más probable. Al igual que otros criterios de valoración, existe evidencia de que los estudios reglamentarios que usan animales para evaluar la toxicidad con administración repetida no son adecuados y existe una clara necesidad de desarrollar nuevos métodos. En 2020, Pham y sus colegas evaluaron las fuentes de variabilidad en los valores usados para inferir niveles seguros de exposición a partir de una diversidad de estudios con administración repetida en roedores y encontraron que aproximadamente un tercio de la varianza total no podía explicarse a partir de las diferencias entre los estudios, por ejemplo, vía de administración o tipo de estudio.<sup>453,454</sup>

Aunque la evaluación de la toxicidad con administración repetida es un requisito estándar en la evaluación de la seguridad para los humanos, actualmente no se aceptan métodos sin animales con fines reglamentarios. Para abordar esta brecha en el uso de métodos sin animales, la Comisión Europea financió el proyecto DETECTIVE (*Detection of Endpoints and Biomarkers of Repeated Dose Toxicity Using In Vitro Systems* [Detección de criterios de valoración y biomarcadores de toxicidad con administración repetida mediante sistemas *in vitro*]), uno de los seis proyectos de investigación de la iniciativa SEURAT-1 (*Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing* [Evaluación de la seguridad para finalmente reemplazar las pruebas en animales]). El objetivo del proyecto fue establecer una línea de detección de alto contenido, alta capacidad y tecnología “ómica” para identificar e investigar biomarcadores humanos en modelos celulares para pruebas *in vitro* de administración repetida. Además, el proyecto EU-ToxRisk integra avances en biología celular, tecnología “ómica”, biología de sistemas y modelación por computador para definir las complejas cadenas de eventos que vinculan la exposición a sustancias químicas con los resultados tóxicos. El

proyecto se centra en la toxicidad sistémica con administración repetida y en la toxicidad reproductiva y del desarrollo.

Mientras se logran avances en el desarrollo y la aplicación reglamentaria de los métodos de prueba *in vitro* de toxicidad con administración repetida, la cantidad de animales usados para en estos ensayos bajo diversos marcos normativos puede reducirse de inmediato mediante la extrapolación de los puntos de partida de los estudios subcrónicos a los crónicos.<sup>454</sup> Una revisión reciente de los puntos de partida (NOAEL o LOAEL) determinados a partir de estudios de aditivos alimentarios *in vivo* demostró que los valores crónicos pueden extrapolarse con un alto grado de confianza a partir de estudios subcrónicos, lo que respalda análisis anteriores de otros tipos de sustancias, incluidos productos químicos industriales y pesticidas. La evaluación de riesgos y la derivación de valores guía basados en la salud pueden reforzarse aún más mediante la aplicación cautelosa de un factor de incertidumbre adicional de 2 para tener en cuenta cualquier valor atípico. Este es un enfoque recomendado por la EFSA y respaldado por los datos de una serie de estudios recientes.<sup>455</sup>

### Vía oral

El NICEATM y el ICCVAM desarrollaron un proyecto para construir modelos predictivos de toxicidad sistémica oral aguda.<sup>450</sup> El resultado fue la herramienta *Collaborative Acute Toxicity Modelling Suite* [Paquete colaborativo de modelación de la toxicidad aguda] (CATMoS) para predecir la toxicidad oral aguda y satisfacer así diversas necesidades normativas identificadas en un taller celebrado en abril de 2018.<sup>456</sup> CATMoS se implementa a través de *Open Structure-Activity/Property Relationship App* [Aplicación abierta de relaciones estructura-actividad/propiedad] (OPERA), una herramienta QSAR disponible gratuitamente y de código abierto.<sup>457</sup> Este modelo se optimiza de forma periódica y las actualizaciones están disponibles en los sitios web del *Integrated Chemical Environment* (ICE) de NICEATM y la EPA.<sup>458</sup> El Consorcio Internacional de Ciencia de PETA, el Comité de Médicos por una Medicina Responsable y la EPA organizaron seminarios en línea para ofrecer una visión general tanto de la herramienta CATMoS como de la base de datos ICE (<https://www.thepsci.eu/training-videos-webinars/>).

EURL ECVAM recomienda el uso de una prueba de citotoxicidad *in vitro* de captación de rojo neutro (NRU) 3T3, que puede usarse en un enfoque PdE para apoyar la identificación de sustancias no clasificadas.<sup>459</sup> Las pruebas *in vitro*, como la NRU 3T3 y los ensayos con queratinocitos humanos normales que miden la citotoxicidad basal, también pueden ser útiles para determinar las dosis iniciales en las pruebas en animales. El EURL ECVAM está trabajando para mejorar la confianza en la NRU 3T3 mediante el uso de QSAR y teniendo en cuenta la información del órgano blanco y la falta de metabolismo en las células 3T3.<sup>460-462</sup>

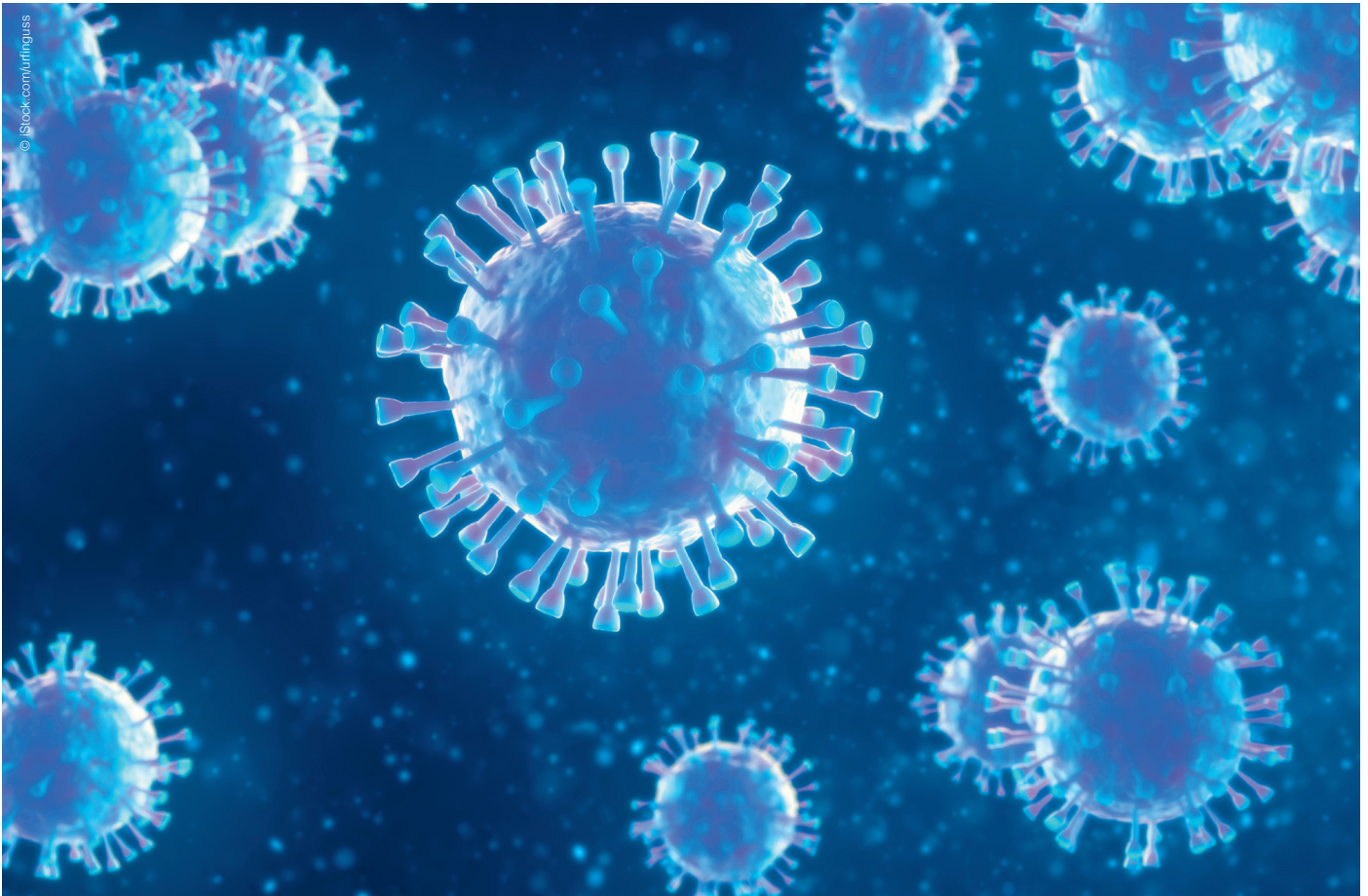
En su Guía sobre los requisitos de información y la evaluación de la seguridad química, la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA) sostiene que sería posible evitar el estudio de toxicidad oral aguda *in vivo* si quien solicita el registro dispone de los datos relevantes que son usados en el enfoque PdE.<sup>373</sup> En los casos en los que la adaptación de PdE lleve a suponer una toxicidad oral aguda baja o nula esperada (>2000 mg/kg peso corporal/día), el solicitante de registro podrá evitar las pruebas en animales de conformidad con los artículos 13, apartado 1, y 25, apartado 1, de REACH.<sup>463</sup> En <https://www.thepsci.eu/training-videos-webinars/> puede encontrar más información sobre las formas de reducir la cantidad de animales usados para evaluar la toxicidad oral aguda para REACH.

### Vía cutánea

La EPA y el NICEATM analizaron la contribución relativa de los datos de las pruebas de toxicidad aguda oral y cutánea a la clasificación y el etiquetado de los riesgos asociados con los pesticidas. Al considerar que los datos cutáneos proporcionaban poco o ningún valor agregado en la toma de decisiones reglamentarias, la EPA publicó una guía que permite a los solicitantes de registro presentar una justificación científicamente robusta de por qué los resultados de las pruebas orales agudas son protectores para los posibles efectos cutáneos agudos.<sup>464,465</sup> Además, los estudios cutáneos no son necesarios para las sustancias no clasificadas para la vía oral y que no se absorben por vía cutánea.<sup>369</sup> Así mismo, las sustancias no clasificadas para la vía oral no requieren datos cutáneos en virtud del anexo VIII de REACH.

### Vía inhalatoria

Las pruebas por vía inhalatoria pueden evitarse en función de parámetros fisicoquímicos (por ejemplo, baja volatilidad) o si la exposición por inhalación es improbable (por ejemplo, en los casos en que la sustancia no se vuelva aerosol ni se haga inhalable de otro modo en las condiciones de uso). Sin embargo, en los casos en que se requieran pruebas, pueden usarse métodos sin animales para cumplir con los requisitos de información. Por ejemplo, para satisfacer una necesidad informativa, la EPA aceptó el uso de una prueba de biosolubilidad *in chemico* que demostró que un polímero, clasificado inicialmente como sustancia poco soluble y de baja toxicidad, era soluble en fluido pulmonar epitelial simulado y, por tanto, no constituía un peligro en términos de sobrecarga pulmonar.<sup>466</sup> En otro ejemplo, para cumplir con los requisitos de renovación del registro de un pesticida, la EPA está considerando datos de modelación computacional dinámica de fluidos y ensayos *in vitro* con tejidos pulmonares humanos tridimensionales reconstruidos.<sup>467</sup> Además, se están llevando a cabo otras investigaciones prometedoras para desarrollar métodos sin animales para evaluar la toxicidad por inhalación.<sup>468</sup>



El Consorcio Internacional de Ciencia de PETA ha organizado numerosos seminarios web (<https://www.thepsci.eu/inhalation-webinars/>) y talleres que abordan varios métodos que podrían llegar a sustituir las pruebas en animales para este criterio de valoración.<sup>469,470</sup> Además, el Consorcio ha financiado el desarrollo de métodos e implementado varios premios para proporcionar a los investigadores equipos y tejidos respiratorios *in vitro* para realizar estudios de toxicidad por inhalación.<sup>471</sup> En <https://www.thepsci.eu/our-work/inhalation/> encontrará más información sobre los ensayos de toxicidad por inhalación.

### Pruebas de tabaco y cigarrillos electrónicos

#### **Recomendación: Eliminar de inmediato el uso de animales para el desarrollo y las pruebas de productos de tabaco y cigarrillos electrónicos.**

En todo el mundo se usan animales para realizar pruebas de productos de tabaco existentes y para el desarrollo de nuevos productos, como los sistemas electrónicos de suministro de nicotina (ENDS, o cigarrillos electrónicos) o los productos para calentar el tabaco. En estas pruebas, las ratas pueden ser confinadas en tubos estrechos y obligadas a inhalar sustancias tóxicas hasta seis horas diarias durante varios años.

El Comité Científico de Riesgos Sanitarios, Ambientales y

Emergentes (CCRSM) de la Comisión Europea afirma que, a la luz de la política de la UE que prohíbe los estudios en animales para las sustancias químicas que se vayan a usar en productos de uso voluntario como los cosméticos, los estudios en animales no están avalados para evaluar la seguridad de los aditivos del tabaco.<sup>472</sup> Además, en Bélgica, Estonia, Alemania, Eslovaquia y el Reino Unido está prohibido por motivos éticos el uso de animales para desarrollar y probar productos de tabaco.<sup>473-477</sup>

En la evaluación de los peligros de los productos de tabaco se emplean cada vez más métodos innovadores sin animales, como la exposición de cultivos de células y tejidos al humo de cigarrillo completo o al vapor de cigarrillos electrónicos en la interfaz aire-líquido, las pruebas de transformación celular (CTA) y los análisis genómicos.<sup>470,478,479</sup> Estas técnicas se han usado para evaluar citotoxicidad, genotoxicidad, inflamación y expresión génica y son más relevantes para la exposición humana real que las pruebas en animales, que históricamente han fallado en predecir los peligros reales del tabaco. Para facilitar la adopción y el uso de estas técnicas *in vitro* para evaluar los productos del tabaco y otras sustancias químicas inhaladas, el Consorcio Internacional de Ciencia de PETA ha donado los sistemas de exposición *in vitro* VITROCELL al Institute for In Vitro Sciences (IIVS) para que pueda ampliar sus pruebas de productos de tabaco. La mayor parte del extenso trabajo del Consorcio sobre ensayos de toxicidad por



inhalación (<https://www.thepsci.eu/our-work/inhalation/>) también es aplicable a las pruebas de tabaco y productos derivados.

## Métodos de producción en laboratorio

A continuación, se describen las oportunidades para poner fin al uso de productos de origen animal con fines científicos o médicos y reducir significativamente el uso de animales para la producción de fármacos y vacunas.

### Producción de anticuerpos

#### **Recomendación: Eliminar de inmediato la producción de anticuerpos de origen animal para aplicaciones científicas.**

Los reactivos de afinidad, como los anticuerpos, son herramientas esenciales usadas en investigación para unirse a una molécula con el fin de identificarla o influir en su actividad. Cada año, decenas de miles de animales son inyectados con virus, bacterias u otras sustancias extrañas y luego asesinados por los anticuerpos que su organismo produce como respuesta. Los animales usados en la producción de anticuerpos son sometidos a una serie de procedimientos invasivos y dolorosos, como la inyección de antígenos y repetidas extracciones de sangre o ascitis, antes de ser asesinados. Se ha reportado que animales usados en el método de producción de anticuerpos por ascitis no pueden comer, caminar o respirar correctamente. Varios países, entre ellos Australia, Canadá, Alemania, los Países Bajos, Suiza y el Reino Unido, restringieron o prohibieron la producción de anticuerpos obtenidos mediante el método de ascitis por su impacto negativo en el bienestar animal.<sup>480,481</sup>

La creciente preocupación por la falta de calidad y reproducibilidad de los anticuerpos de origen animal, que a menudo muestran especificidad deficiente o no reconocen sus blancos, también es evidente en la literatura. En un comentario publicado en 2015 en *Nature*, 111 científicos académicos y de la industria abogaron por un cambio internacional hacia el uso de anticuerpos recombinantes por su mayor confiabilidad y menor variabilidad entre lotes de reactivos de afinidad, entre otras razones.<sup>482</sup> En el mismo año, una publicación en *Nature* señaló que los anticuerpos pueden ser la herramienta de laboratorio que más contribuye a la “crisis de reproducibilidad”.<sup>483</sup> En efecto, los autores de un análisis de estudios preclínicos que encontró que los resultados de 47 de 53 estudios considerados no podían replicarse señalaron que los anticuerpos mal caracterizados y mal definidos son una de las principales causas de la falla de reproducibilidad de la investigación.<sup>511</sup> Además, un análisis sistemático de 185 anticuerpos monoclonales de hibridoma disponibles en el mercado encontró que 59 de estos (el 31.9 %)

no eran mono-específicos, como se esperaría en términos de confiabilidad, y los autores recomendaron sustituir el uso de anticuerpos monoclonales de origen animal por anticuerpos recombinantes definidos por secuencia como una solución sencilla y económica a este grave problema.<sup>484</sup> Esta falla no se limita a los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos policlonales, que dependen del animal usado para producirlos y varían en su composición por definición, no pueden reproducirse de forma consistente, lo que ha llevado a la comunidad científica a pedir que se eliminen completamente de la investigación.<sup>482</sup>

Además de la falta de confiabilidad científica y el impacto negativo en el bienestar de los animales, el uso de anticuerpos de origen animal plantea importantes problemas económicos. Se calcula que en todo el mundo se desperdician anualmente 800 millones de dólares en anticuerpos poco confiables.<sup>482</sup> Así pues, el uso de reactivos de afinidad que son de mayor calidad podría resultar en una disminución de costos asociada a una investigación más reproducible.

Los reactivos de afinidad no derivados de animales, como los anticuerpos recombinantes y los aptámeros, pueden usarse en todas las aplicaciones en las que se emplean los anticuerpos tradicionales, incluidas la investigación básica, las pruebas reglamentarias y las aplicaciones clínicas. Estos reactivos están disponibles en el mercado y, con los recursos adecuados, pueden ser desarrollados por los investigadores en sus propios laboratorios.<sup>480,485</sup> Las numerosas ventajas científicas de los reactivos de afinidad no derivados de animales frente a los anticuerpos de origen animal incluyen alta afinidad y alta especificidad, tiempo de generación más corto, inmunogenicidad reducida, capacidad de controlar las condiciones de selección y posibilidad de generarlos frente a antígenos inestables, tóxicos, inmunosupresores y no inmunogénicos.<sup>485</sup>

En el ámbito internacional se ha enfatizado la importancia de hacer una transición a gran escala de los anticuerpos de origen animal a los reactivos de afinidad sin animales. En EE. UU., expertos y organizaciones como NICEATM y el Consorcio Internacional de Ciencia de PETA trabajan para aumentar el acceso a reactivos de afinidad sin animales. En diciembre de 2019, ambas organizaciones convocaron a una reunión para esbozar un plan para mejorar la calidad y la reproducibilidad de la investigación y las pruebas reglamentarias al acelerar la producción y el uso de dichos reactivos. Como resultado de esta reunión, el artículo *Increasing the Use of Animal-free Recombinant Antibodies* [Cómo aumentar el uso de anticuerpos recombinantes sin animales] describe los pasos para superar los obstáculos que impiden un cambio completo de los reactivos de afinidad derivados de animales a aquellos sin animales y definidos por secuencia.<sup>486</sup> En [ThePSCI.eu/our-work/antibodies](https://www.thepsci.eu/our-work/antibodies) puede



encontrar más información sobre fuentes de reactivos de afinidad sin animales, seminarios web, publicaciones y las ventajas científicas, económicas y éticas de sustituir los anticuerpos de origen animal por opciones sin animales.

En la Recomendación sobre anticuerpos de origen no animal de 2020 de EURL ECVAM se sostiene lo siguiente:

La EURL ECVAM recomienda que no se sigan usando animales para el desarrollo y la producción de anticuerpos para aplicaciones de investigación, reglamentarias, diagnósticas y terapéuticas... Los países de la UE no deben seguir autorizando el desarrollo y la producción de anticuerpos mediante inmunización animal, donde se carece de una justificación científica robusta y legítima.<sup>487</sup>

Por lo tanto, el desarrollo, la producción y la importación de anticuerpos de origen animal, especialmente los anticuerpos monoclonales que usan el método de la ascitis, deben prohibirse en todo el mundo. En 2022, el Consorcio Internacional de Ciencia de PETA, el Comité de Médicos por una Medicina Responsable (PCRM) y Alternatives Research and Development Foundation (ARDF) lanzaron el Desafío de Anticuerpos Recombinantes, el cual ofreció apoyo financiero para el uso de anticuerpos recombinantes de catálogo gratuito en investigación y ensayos (ThePSCI.eu/funding/recombinant-antibody-challenge). Para acelerar aún más el reemplazo de anticuerpos de origen animal, recomendamos que se ofrezcan más oportunidades de apoyo financiero para la generación y el uso de reactivos de afinidad no derivados de animales.

## Medicamentos biológicos

### **Recomendación: Teniendo en cuenta la existencia de métodos sin animales y enfoques PdE, el uso de animales puede reducirse drásticamente en la producción y evaluación de medicamentos biológicos.**

Muchas vacunas y otros medicamentos biológicos son producidos y su calidad, identidad, seguridad y eficacia son evaluadas en experimentos que requieren el uso de una gran cantidad de animales. Estos procedimientos suelen causar un grave sufrimiento antes de que los animales mueran o sean asesinados. Las nuevas tecnologías han permitido desarrollar y probar productos biológicos sin animales, pero la experiencia ha demostrado que la validación y la aceptación reglamentaria de estos métodos no han garantizado su uso.<sup>488-492</sup> Las actividades destinadas a eliminar gradualmente el uso de animales en este contexto deben garantizar que las instancias reguladoras y la industria se comprometan a (1) realizar la transición a plataformas de producción biológica

sin animales, (2) garantizar que los métodos sin animales disponibles se usen consistentemente en lugar de las pruebas en animales, y (3) desarrollar métodos sin animales para las pruebas de calidad, identidad, seguridad y eficacia de todos los productos biológicos.

Existen plataformas de producción que sustituyen las sustancias de origen animal por equivalentes recombinantes de origen celular. Las antitoxinas, por ejemplo, se han producido históricamente hiperinmunizando caballos y otros grandes mamíferos y aislando las inmunoglobulinas resultantes de su sangre. Estas inmunoglobulinas de origen animal presentan desventajas intrínsecas a dicho origen, como el riesgo de respuesta inmunitaria humana adversa, la elevada variabilidad entre lotes y la posibilidad de transmisión de virus y otras fuentes de enfermedad entre especies. Las antitoxinas de origen animal pueden sustituirse por antitoxinas humanas recombinantes expresadas en cultivo celular. Se ha autorizado la comercialización de varios anticuerpos recombinantes<sup>493,494</sup> y hay más en desarrollo,<sup>495</sup> incluida una antitoxina experimental contra la difteria basada en anticuerpos recombinantes humanos y creada con financiación del Consorcio Internacional de Ciencia de PETA.<sup>496</sup>

Con la financiación adecuada y el apoyo de las agencias reguladoras, todos los productos biológicos de origen animal, incluidos los anticuerpos descritos anteriormente, pueden y deben sustituirse de forma similar para resolver los problemas inherentes al uso de anticuerpos de origen animal.

Se dispone de pruebas de calidad sin animales, pero no existe ningún mecanismo formal que garantice que los obstáculos a su aplicación se resuelvan pronto.<sup>488</sup> En algunos casos, los fabricantes han señalado la dificultad de cumplir con los criterios técnicos para usar métodos validados sin animales (como con las pruebas de potencia *in vitro* de la vacuna contra la leptospira).<sup>497</sup> En otros casos, las instancias reguladoras internacionales aún no se han puesto de acuerdo sobre los criterios técnicos para el uso de métodos sin animales (como en el caso de la prueba de potencia de la vacuna antirrábica *in vitro*).<sup>498</sup> Sin una supervisión formal del proceso de implementación, estos obstáculos se resuelven de manera informal mediante talleres y la resolución descentralizada de problemas por consorcios de partes interesadas, pero este enfoque es supremamente costoso y lento para las empresas que desean usar métodos validados sin animales. En consecuencia, la adopción de métodos sin animales por parte de la industria sigue siendo limitada, a pesar de la reducción documentada del uso de animales cuando dichos métodos se aplican con éxito.<sup>499</sup> Otros obstáculos a la aplicación de las pruebas alternativas disponibles en la actualidad para una amplia gama de hormonas terapéuticas humanas y veterinarias, vacunas y otros medicamentos biológicos han sido discutidos

ampliamente en talleres y en la literatura.<sup>500-502</sup> Es crucial acelerar y estandarizar los procesos que facilitan el uso de estos métodos de reemplazo existentes.

El liderazgo en el ámbito regulatorio garantizará la coordinación entre las instancias normativas y la industria a nivel internacional sobre las mejores prácticas para eliminar estas barreras. Las entidades reguladoras deben establecer requisitos armonizados de consistencia en la producción, ya que las políticas de producción consistente estrictamente controladas son la base de muchas estrategias de reemplazo de animales.<sup>503,504</sup>

## Suero fetal bovino

### **Recomendación: Eliminar de inmediato el uso de suero fetal bovino en aplicaciones científicas.**

El suero fetal bovino (SFB) es un suplemento para los medios de cultivo celular que proporciona una mezcla indefinida de macromoléculas cuya función es mantener la viabilidad celular y facilitar el metabolismo, el crecimiento, la proliferación y la diseminación de las células en cultivo. Cuando se asesinan vacas embarazadas se usa una aguja de gran calibre para extraer la sangre del corazón palpitante del feto.<sup>505,506</sup> Debido a que los terneros no nacidos no están anestesiados en el momento de la extracción de la sangre, es probable que sufran dolor. Se calcula que cada año se producen en el mundo 600 mil litros de SFB, lo que se traduce en el uso de hasta 1.8 millones de fetos bovinos para este fin.<sup>507</sup>

Además, el uso de SFB plantea una serie de problemas científicos, como la variación de los lotes, que causa dificultades en la reproducibilidad en los estudios *in vitro* que usan SFB, la composición desconocida del suero y el riesgo de contaminación por proteínas animales o patógenos, lo que es especialmente problemático en la fabricación de productos biológicos para tratamientos humanos. Organizaciones holandesas lideraron talleres en 2003 y 2009 en los que se pidió la transición del uso de SFB al de suplementos de suero de origen no animal en el cultivo celular.<sup>508,509</sup> En 2016, la Fundación SET y la Deutscher Tierschutzbund (Federación Alemana de Bienestar Animal) organizaron un tercer taller sobre SFB y sus alternativas,<sup>506</sup> el cual recomendó un mayor financiamiento y el desarrollo continuo de modelos de cultivo sin suero así como el uso de medios sin suero al establecer nuevas líneas celulares. Dado que aún no se dispone de un medio de cultivo universal sin suero y químicamente definido y que existe una gran demanda de diferentes tipos celulares, en el informe de este taller se recomienda el uso de lisado de plaquetas humanas (hPL) como sustituto del SFB cuando no se disponga de un medio sin suero.

Para algunos tipos celulares se dispone de medios sin

componentes animales y medios sin suero químicamente definidos. Para otros, los investigadores aún necesitan optimizar la concentración de cada suplemento para reemplazar el SFB. Para estos tipos celulares, el hPL, que se obtiene de plaquetas humanas donadas, contiene factores de crecimiento esenciales para el desarrollo y la proliferación celular y es superior al SFB para el cultivo de células.

Los listados de productos disponibles en el mercado pueden consultarse en el sitio web del Consorcio Internacional de Ciencia de PETA (<https://www.thepsci.eu/>) y en la base de datos Fetal Calf Serum-Free (<https://fcs-free.org/>). Las presentaciones de expertos sobre la sustitución del SFB en los medios de cultivo celular manteniendo una proliferación y unas funciones celulares robustas también están disponibles en <https://www.thepsci.eu/our-work/fbs/>. El Consorcio Internacional de Ciencia de PETA ha financiado además la transición de una línea celular pulmonar de uso común a medios de cultivo celular sin productos de origen animal.<sup>510</sup>

El gobierno y las agencias reguladoras deben actuar con rapidez para restringir la producción y el uso de SFB cuando se disponga de medios o suplementos sin animales. Cuando sea necesario, estas instancias también deben proporcionar el financiamiento para la transición de las células a los medios de origen no animal disponibles y para el desarrollo y la optimización de medios sin animales y sin suero. Para los tipos celulares en los que las concentraciones de suplementos sin animales aún no se hayan optimizado y no se pueda usar el hPL, deberán exigir la obtención de exenciones antes de poder producir o usar SFB. Para obtener exenciones, se deben tomar medidas para buscar alternativas sin animales y se debe implementar un plan para hacer la transición a medios o suplementos sin animales.

## **Asesoría científica ofrecida por PETA**

El Comité Nacional de los Países Bajos para la Protección de los Animales Usados con Fines Científicos (NCad) consultó al equipo científico de PETA antes de publicar su informe para el gobierno sobre la transición hacia la innovación sin animales. El equipo científico de PETA está dispuesto a ofrecer asistencia en cualquier capacidad que sea necesaria.

El Consorcio Internacional de Ciencia de PETA promueve y financia métodos de investigación sin animales y adelanta labores de coordinación con los expertos en temas científicos y regulatorios en las entidades de PETA en todo el mundo. Con miras a fomentar los mejores métodos sin animales y reducir las pruebas en animales, el Consorcio y sus miembros participan activamente en el desarrollo, la validación, la implementación global y la armonización de los métodos de ensayo sin animales. El Consorcio es un participante acreditado de la ECHA e integra el Foro de Partes Interesadas de EURL

ECVAM, de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y del Foro de Partes Interesadas de Productos Químicos del Reino Unido, y con frecuencia hace comentarios a las directrices de pruebas de la OCDE como miembro del Consejo Internacional para la Protección de los Animales en los Programas de la OCDE (ICAPO). Puede encontrar más información sobre el trabajo del Consorcio en <https://www.thepsci.eu/>.

El equipo científico que trabaja para las entidades de PETA tiene un historial comprobado de ayudar de manera productiva a muchas empresas de la lista *Fortune 100*, así como a agencias reguladoras y gubernamentales. Este apoyo incluye la emisión de dictámenes periciales, asesoría reglamentaria y apoyo técnico en una amplia gama de campos. Dada la amplitud y la profundidad de nuestra experiencia, podemos hacer una valiosa contribución al desarrollo y la implementación de un plan estratégico para el futuro de la investigación biomédica y las pruebas reglamentarias.

# BIBLIOGRAFÍA



1. Harris R. *Rigor Mortis: How Sloppy Science Creates Worthless Cures, Crushes Hope, and Wastes Billions*. New York: Basic Books; 2017.
2. Strauss M. Americans are divided over the use of animals in scientific research. Pew Research Center. Published August 16, 2018. Accessed October 26, 2022. <https://www.pewresearch.org/fact-tank/2018/08/16/americans-are-divided-over-the-use-of-animals-in-scientific-research>.
3. National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS). About New Therapeutic Uses. Accessed October 31, 2023. <https://ncats.nih.gov/research/research-activities/ntu>.
4. Pound P, Bracken MB. Is animal research sufficiently evidence-based to be a cornerstone of biomedical research? *The BMJ*. 2014;348:g3387.
5. Hirst JA, Howick J, Aronson JK, et al. The need for randomization in animal trials: An overview of systematic reviews. *PLoS One*. 2014;9(6):e98856.
6. Freedman LP, Cockburn IM, Simcoe TS. The economics of reproducibility in preclinical research. *PLoS Biol*. 2015;13(6):e1002165.
7. Collins FS, Tabak LA. Policy: NIH plans to enhance reproducibility. *Nature*. 2014;505(7485):612-613.
8. Pound P, Ritskes-Hoitinga M. Is it possible to overcome issues of external validity in preclinical animal research? Why most animal models are bound to fail. *J Transl Med*. 2018;16:304.
9. Wall RJ, Shani M. Are animal models as good as we think? *Theriogenology*. 2008;69(1):2-9.
10. van der Worp HB, Howells DW, Sena ES, et al. Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med*. 2010;7(3):e1000245.
11. Bailoo JD, Reichlin TS, Würbel H. Refinement of experimental design and conduct in laboratory animal research. *ILAR J*. 2014;55(3):383-391.
12. BioIndustry Association, Medicines Discovery Catapult. State of the discovery nation 2018 and the role of the Medicines Discovery Catapult. Published January 2018. Accessed October 26, 2022. <https://md.catapult.org.uk/FlipBuilder/mobile/index.html>.
13. Lahvis GP. Unbridle biomedical research from the laboratory cage. *Elife*. 2017;6:e27438.
14. Latham N, Mason G. From house mouse to mouse house: The behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory. *Appl Anim Behav Sci*. 2004;86(3-4):261-289.
15. Garner JP. Stereotypies and other abnormal repetitive behaviors: Potential impact on validity, reliability, and replicability of scientific outcomes. *ILAR J*. 2005;46(2):106-117.
16. Bayne K, Würbel H. The impact of environmental enrichment on the outcome variability and scientific validity of laboratory animal studies. *Rev Sci Tech*. 2014;33(1):273-280.
17. Wolfer DP, Litvin O, Morf S, Nitsch RM, Lipp HP, Würbel H. Laboratory animal welfare: Cage enrichment and mouse behaviour. *Nature*. 2004;432(7019):821-822.
18. Gross AN, Richter SH, Engel AK, Würbel H. Cage-induced stereotypies, perseveration and the effects of environmental enrichment in laboratory mice. *Behav Brain Res*. 2012;234(1):61-68.
19. Balcombe JP. Laboratory environments and rodents' behavioural needs: A review. *Lab Anim*. 2006;40(3):217-235.
20. Cait J, Cait A, Scott RW, Winder CB, Mason GJ. Conventional laboratory housing increases morbidity and mortality in research rodents: Results of a meta-analysis. *BMC Biol*. 2022;20(1):15.
21. Institute of Medicine and National Research Council. International Animal Research Regulations. Impact on Neuroscience Research: Workshop Summary. Washington: The National Academies Press; 2012.
22. Lauer M. FY 2020 by the numbers: Extramural investments in research. National Institutes of Health Office of Extramural Research. Published April 21, 2021. Accessed October 26, 2022. <https://nexus.od.nih.gov/all/2021/04/21/fy-2020-by-the-numbers-extramural-investments-in-research>.
23. Lauer M. NIH's commitment to basic science. National Institutes of Health Office of Extramural Research. Published March 25, 2016. Accessed October 26, 2022. <https://nexus.od.nih.gov/all/2016/03/25/nihs-commitment-to-basic-science/>.
24. Contopoulos-Ioannidis DG, Ntzani E, Ioannidis JP. Translation of highly promising basic science research into clinical applications. *Am J Med*. 2003;114(6):477-484.
25. Pulley JM, Jerome N, Zaleski NM, et al. When enough is enough: Decision criteria for moving a known drug into clinical testing for a new indication in the absence of preclinical efficacy data. *Assay Drug Dev Technol*. 2017;15(8):354-361.
26. Low P. The Cambridge Declaration on Consciousness. Published July 7, 2012. Accessed October 26, 2022. <http://fcmconference.org/img/CambridgeDeclarationOnConsciousness.pdf>.
27. Şentürk H. Moving beyond animal models. *Türk J Gastroenterol*. 2015;26:A-IX.
28. Meigs L, Smirnova L, Ravidá C, Leist M, Hartung T. Animal testing and its alternatives—the most important omics is economics. *ALTEX*. 2018;35(3):275-305.
29. Kramer LA, Greek R. Human stakeholders and the use of animals in drug development. *Bus Soc Rev*. 2018;123(1):3-58.
30. Piesing M. How tech could spell the end of animals in drug testing. *The Guardian*. Published August 23, 2014. Accessed October 26, 2022. <https://www.theguardian.com/science/2014/aug/23/tech-end-animals-drugs-testing>.
31. Siddiqui M, Rajkumar SV. The high cost of cancer drugs and what we can do about it. *Mayo Clin Proc*. 2012;87(10):935-943.
32. Adams B. FDA commissioner: We need to talk about drug development costs. FierceBiotech. Published September 12, 2017. Accessed October 26, 2022. <https://www.fiercebiotech.com/biotech/fda-commish-we-need-to-talk-about-drug-development-costs>.
33. Ronaldson-Bouchard K, Vanjak-Novakovic G. Organs-on-a-chip: A fast track for engineered human tissues in drug development. *Cell Stem Cell*. 2018;22(3):310-324.
34. Burt T, Yoshida K, Lappin G, et al. Microdosing and other phase 0 clinical trials: Facilitating translation in drug development. *Clin Transl Sci*. 2016;9(2):74-88.
35. Emulate, Inc. Founders fund leads \$36 million financing round in Emulate, Inc. Published July 24, 2018. Accessed October 26, 2022. <https://www.emulatebio.com/press/founders-fund-leads-36-million-financing-round-in-emulate-inc>.
36. BCC Research. Cell-based assays: Technologies and global markets. Published August 2022. Accessed October 26, 2022. <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/cell-based-assays-technologies-markets-report.html>.
37. BCC Research. Induced pluripotent stem cells: Global markets. Published June 2021. Accessed October 26, 2022. <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/induced-pluripotent-stem-cells-report.html>.
38. BCC Research. Global regenerative medicine market. Published December 2018. Accessed October 26, 2022. <https://www.bccresearch.com/partners/verified-marketresearch/global-regenerative-medicine-market.html>.
39. Hartung T, FitzGerald RE, Jennings P, et al. Systems toxicology: Real world applications and opportunities. *Chem Res Toxicol*. 2017;30(4):870-882.
40. Frueh S, Morocco S. Report calls for new directions, innovative approaches in testing chemicals for toxicity to humans. nationalacademies.org. Published June 12, 2007. Accessed December 13, 2022. [http://www8.nationalacademies.org/onpinews/newsitem.aspx?recordid=119706\\_ga-2.61861292.1042876253.1531170001-1191304391.1531170001](http://www8.nationalacademies.org/onpinews/newsitem.aspx?recordid=119706_ga-2.61861292.1042876253.1531170001-1191304391.1531170001).
41. NASEM. Report calls for new directions, innovative approaches in testing chemicals for toxicity to humans. Published June 12, 2007. Accessed April 11, 2022. <https://www8.nationalacademies.org/onpinews/newsitem.aspx?RecordID=119706>.
42. Herzog HA, Dorr LB. Electronically available surveys of attitudes toward animals. *Soc Anim*. 2000;8(2):1-8.
43. Ormandy EH, Schuppli CA. Public attitudes toward animal research: A review. *Animals (Basel)*. 2014;4(3):391-408.
44. National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition*. Washington: The National Academies Press; 2011.
45. AAALAC International. Frequently asked questions. AAALAC International. Updated June 2022. Accessed October 26, 2022. <https://www.aaalac.org/accreditation-program/faqs>.
46. Pound P, Nicol CJ. Retrospective harm benefit analysis of pre-clinical animal research for six treatment interventions. *PLoS One*. 2018;13(3):e0193758.
47. George KA, Slagle KM, Wilson RS, Moeller SJ, Bruskotter JT. Changes in attitudes toward animals in the United States from 1978 to 2014. *Biol Conserv*. 2016;201:237-242.
48. Akhtar A. Suffering for science and how science supports the end of animal experiments. In: Linzey A, Linzey C, eds. *The Palgrave Handbook of Practical Animal Ethics*. Basingstoke, UK: Palgrave Macmillan; 2018:475-491.
49. Working Group of the Oxford Centre for Animal Ethics. Normalising the unthinkable: The ethics of using animals in research. 2015.
50. Project RGR: A Campaign of NEAVS. International bans. Accessed October 26, 2022. <https://www.releasechimps.org/laws/international-bans>.
51. Netherlands National Committee for the protection of animals used for scientific purposes. Transition to non-animal research: On opportunities for the phasing out of animal procedures and the stimulation of innovation without laboratory animals. Published December 2016. Accessed March 14, 2022. <https://www.ncadierproevenbeleid.nl/binaries/ncadierproevenbeleid/documenten/rapport/2016/12/15/ncad-opinion-transition-to-non-animal-research/NCad-Opinion-Transition-to-non-animal-research.pdf>.
52. Health Holland. Transition Programme for Innovation without the use of animals (TPI). Accessed October 26, 2022. <https://www.health-holland.com/public-private-partnerships/tpi>.
53. U.S. Environmental Protection Agency. EPA New Approach Methods Work Plan. Published December 2021. Accessed March 15, 2022. [https://www.epa.gov/system/files/documents/2021-11/nams-work-plan\\_11\\_15\\_21\\_508-tagged.pdf](https://www.epa.gov/system/files/documents/2021-11/nams-work-plan_11_15_21_508-tagged.pdf).
54. Frank R. Lautenberg Chemical Safety for the 21<sup>st</sup> Century Act, HR 2576, 114<sup>th</sup> Cong [2016]. Pub L No. 114-182. Accessed March 15, 2022. <https://www.congress.gov/114/plaws/pub182/PLAW-114pub182.pdf>.
55. FDA Modernization Act 2.0, S5002, 117<sup>th</sup> Cong [2021-2022]. Accessed October 26, 2022. <https://www.congress.gov/bills/117/congress/117th-congress/senate/bills/5002/s-10r-1>.
56. European Parliament. Plans and actions to accelerate a transition to innovation without the use of animals in research, regulatory testing and education. Updated September 16, 2021. Accessed March 15, 2022. [https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/TA-9-2021-0387\\_EN.html](https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/TA-9-2021-0387_EN.html).
57. Hoijmans CR, Ritskes-Hoitinga M. Progress in using systematic reviews of animal studies to improve translational research. *PLoS Med*. 2013;10(7):e1001482.
58. EViR. Guiding principles. Published 2021. Accessed October 26, 2022. <https://evir.org/our-principles/>.
59. EViR. Applying the principles. Published 2021. Accessed October 26, 2022. <https://evir.org/our-principles/applying-the-principles>.
60. Institute of Medicine. Use of chimpanzees in NIH-supported research. Published 2013. Accessed October 26, 2022. [https://dpppsi.nih.gov/council/chimpanzee\\_research](https://dpppsi.nih.gov/council/chimpanzee_research).
61. NIH. NIH-wide strategic plan, fiscal years 2016-2020. Turning discovery into health. Washington: National Institutes of Health, 2015.
62. The Animals in Science Committee. Review of harm-benefit analysis in the use of animals in research. [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/675002/Review\\_of\\_harm\\_benefit\\_analysis\\_in\\_use\\_of\\_animals\\_18Jan18.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/675002/Review_of_harm_benefit_analysis_in_use_of_animals_18Jan18.pdf).
63. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union. L 276/33. Article 4.
64. Innovate U.K. A non-animal technologies roadmap for the U.K. ukri.org. Published November 10, 2015. Accessed March 18, 2022. <https://www.ukri.org/wp-content/uploads/2015/11/UK-071221-RoadmapNonAnimalTech.pdf>.
65. EU Science Hub. JRC Virtual Summer School on "Non-animal approaches in science: The three r...evolution". joint-research-centre.ec.europa.eu. Accessed March 18, 2022. [https://joint-research-centre.ec.europa.eu/events/jrc-summer-school-non-animal-approaches-science-3\\_en](https://joint-research-centre.ec.europa.eu/events/jrc-summer-school-non-animal-approaches-science-3_en).

66. The Society for Humane Science. University education. [forhumanescience.org](http://forhumanescience.org). Accessed March 18, 2022. <https://www.forhumanescience.org/influencing-science-culture/university-education>.
67. PETA Science Consortium International e.V. Training opportunities. [ThePSCI.eu](http://ThePSCI.eu). Accessed March 18, 2022. <https://www.thepsci.eu/our-work/training>.
68. Physicians Committee for Responsible Medicine. NAM use for regulatory application. [pcrm.org](http://pcrm.org). Updated 2022. Accessed March 17, 2022. <https://www.pcrm.org/ethical-science/animal-testing-and-alternatives/nura>.
69. Roth S, Liesz A. Stroke research at the crossroads—where are we heading? *Swiss Med Wkly*. 2016;146:w14329.
70. Wong CH, Siah KW, Lo AW. Estimation of clinical trial success rates and related parameters. *Biostatistics*. 2018;kxx069.
71. Cummings JL, Morstorf T, Zhong K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: Few candidates, frequent failures. *Alzheimers Res Ther*. 2014;6(4):37.
72. AFP in Paris. Man who died in French drug trial had "unprecedented" reaction, say experts. *The Guardian*. Published March 7, 2016. Accessed October 27, 2022. <https://www.theguardian.com/science/2016/mar/07/french-drug-trial-man-dead-expert-report-unprecedented-reaction>.
73. Attarwala H. TGN1412: From discovery to disaster. *J Young Pharm*. 2010;2(3):332-336.
74. Ferguson PR. The TGN1412 drug disaster. *American Bar Association*. 2009;5(4):12-13.
75. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B.influenzæ*. *Br J Exp Pathol*. 1929;10(3):226-236.
76. Greek R, Hansen LA. The strengths and limits of animal models as illustrated by the discovery and development of antibacterials. *Biol Syst*. 2013;2(2):109.
77. Florey H. The advance of chemotherapy by animal experiment. *Conquest*. 1953;4:12.
78. Koppányi T, Avery MA. Species differences and the clinical trial of new drugs: A review. *Clin Pharmacol Ther*. 1966;7:250-270.
79. Barrile R, van der Meer AD, Park H, et al. Organ-on-chip recapitulates thrombosis induced by an anti-CD154 monoclonal antibody: Translation potential of advanced microengineered systems. *Clin Pharmacol Ther*. 2018;104(6):1240-1248.
80. Dirven H, Vist GE, Bandhakavi S, et al. Performance of preclinical models in predicting drug-induced liver injury in humans: A systematic review. *Sci Rep*. 2021;11(1):6403.
81. Safer Medicines Trust. Tests on human cells and tissues predict dangerous drug side effects where animal tests and even human trials fail. [safermedicines.org](http://safermedicines.org). Published March 18, 2021. Accessed March 8, 2022. <https://safermedicines.org/for-immediate-release-tests-on-human-cells-and-tissues-predict-dangerous-drug-side-effects-where-animal-tests-and-even-human-trials-fail>.
82. Boodman E. Researchers rush to test coronavirus vaccine in people without knowing how well it works in animals. *STAT News*. Published March 11, 2020. Accessed February 14, 2022. <https://www.statnews.com/2020/03/11/researchers-rush-to-start-moderna-coronavirus-vaccine-trial-without-usual-animal-testing>.
83. Zimmer C. Prototype vaccine protects monkeys from coronavirus. *The New York Times*. Updated May 25, 2020. Accessed February 14, 2022. <https://www.nytimes.com/2020/05/20/health/coronavirus-vaccine-harvard.html>.
84. Callaway E. Labs rush to study coronavirus in transgenic animals—some are in short supply. *Nature*. Published March 9, 2020. Accessed February 14, 2022. <https://www.nature.com/articles/d41586-020-00698-x>.
85. PETA. Killing sprees at college labs during COVID-19 shutdown. [PETA.org](http://PETA.org). Updated November 18, 2021. Accessed February 14, 2022. <https://www.peta.org/blog/coronavirus-animal-killing-spre-college-labs>.
86. Ahmad FB, Anderson RN. The leading causes of death in the U.S. for 2020. *JAMA*. 2021;325(18):1829-1830.
87. Centers for Disease Control and Prevention. An update on cancer deaths in the United States. [cdc.gov](http://cdc.gov). Updated February 23, 2021. Accessed February 24, 2022. <https://www.cdc.gov/cancer/dccp/research/update-on-cancer-deaths/index.htm>.
88. Anand P, Kunnammakara AB, Sundaram C, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res*. 2008;25(9):2037.
89. Errington TM, Mathur M, Soderberg CK, et al. Investigating the replicability of preclinical cancer biology. *Elife*. 2021;10:e71601.
90. Mak IW, Evaniew N, Ghert M. Last in translation: Animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res*. 2014;6(2):114-118.
91. Cekanova M, Rathore K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: Utility and limitations. *Drug Des Devel Ther*. 2014;8:1911-1922.
92. Ben-David U, Ho G, Tseng YY, et al. Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution. *Nat Genet*. 2017;49(11):1567-1575.
93. Cheon DJ, Orsulic S. Mouse models of cancer. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:95-119.
94. Dennis MB. Welfare issues of genetically modified animals. *ILAR J*. 2002;43(2):100-109.
95. Ormandy EH, Dale J, Griffin G. Genetic engineering of animals: Ethical issues, including welfare concerns. *Can Vet J*. 2011;52(5):544-550.
96. Romania P, Falgiero V, Nic M, et al. *Advanced Non-Animal Models in Biomedical Research: Immuno-Oncology*. Publications Office of the European Union; 2021.
97. Meng F, Meyer CM, Joung D, Vallera DA, McAlpine MC, Panoskaltzis-Mortari A. 3D bioprinted *in vitro* metastatic models via reconstruction of tumor microenvironments. *Adv Mater*. 2019;31(10):1806889.
98. Zamprogna P, Wüthrich S, Achenback S, et al. Second-generation lung-on-a-chip with an array of stretchable alveoli made with a biological membrane. *Commun Biol*. 2021;4(1):168.
99. Rosenbluth JM, Schackmann RCJ, Gray GK, et al. Organoid cultures from normal and cancer-prone human breast tissues preserve complex epithelial lineages. *Nat Commun*. 2020;11(1):1711.
100. Ethier SP, Guest ST, Garrett-Mayer E, et al. Development and implementation of the SUM breast cancer cell line functional genomics knowledge base. *NPJ Breast Cancer*. 2020;6:30.
101. ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium. Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature*. 2020;578(7793):82-93.
102. Siddiqui SS, Vaill M, Do R, et al. Human-specific polymorphic pseudogenization of SIGLEC12 protects against advanced cancer progression. *FASEB BioAdv*. 2020;3(2):69-82.
103. Pantanowitz L, Quiroga-Garza GM, Bien L, et al. An artificial intelligence algorithm for prostate cancer diagnosis in whole slide images of core needle biopsies: A blinded clinical validation and deployment study. *Lancet Digit Health*. 2020;2(8):e407-e416.
104. Landhuis E. Deep learning takes on tumours. *Nature*. 2020;580(7804):551-553.
105. Cohen A, Ioannidis K, Ehrlich A, et al. Mechanism and reversal of drug-induced nephrotoxicity on a chip. *Sci Transl Med*. 2021;13(582):eabd6299.
106. Cimonis M, Getlin J, Maugh II TH. Cancer drugs face long road from mice to men. *Los Angeles Times*. Published May 6, 1998. Accessed July 11, 2018. <http://articles.latimes.com/1998/may/06/news/mn-46795>.
107. Verma M. Personalized medicine and cancer. *J Pers Med*. 2012;2(1):1-14.
108. Hanig P, Terzic A. Affairs of the heart: Innovation in cardiovascular research and development. *Clin Pharmacol Ther*. 2017;102(2):162-168.
109. Liao J, Huang W, Liu G. Animal models of coronary heart disease. *J Biomed Res*. 2015;30(1):3-10.
110. Janssen PML, Elnakish MT. Modeling heart failure in animal models for novel drug discovery and development. *Expert Opin Drug Discov*. 2019;14(4):355-363.
111. Milani-Nejad N, Janssen PM. Small and large animal models in cardiac contraction research: Advantages and disadvantages. *Pharmacol Ther*. 2014;141(3):235-249.
112. Barter P, Rye KA. Cholesteryl ester transfer protein inhibition to reduce cardiovascular risk: Where are we now? *Trends Pharmacol Sci*. 2011;32(12):694-699.
113. Vegter EL, Ovchinnikova ES, Silljé HHW, et al. Rodent heart failure models do not reflect the human circulating microRNA signature in heart failure. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177242.
114. Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, et al. Animal models of cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:497841.
115. Chandrasekera PC, Pippin JJ. The human subject: An integrative animal model for 21<sup>st</sup> century heart failure research. *Am J Transl Res*. 2015;7(9):1636-1647.
116. Park J, Wu Z, Steiner PR, Zhu B, Zhang JXJ. Heart-on-chip for combined cellular dynamics measurements and computational modeling towards clinical applications. *Ann Biomed Eng*. 2022;50(2):111-137.
117. Gitant G, Sager PT, Stockbridge N. Evolution of strategies to improve preclinical cardiac safety testing. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(7):457-471.
118. del Álamo JC, Lemons D, Serrano R, et al. High throughput physiological screening of iPSC-derived cardiomyocytes for drug development. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1836(7B):1717-1727.
119. Novoheart Holdings Inc. Novoheart strengthens North American presence opening new R&D location at the world-class Cove Facility, UC Irvine, California. Published October 25, 2017. Accessed October 27, 2022. <https://www.globenewswire.com/en/news-release/2017/10/25/1209725/0/en/Novoheart-Strengthens-North-American-Presence-Opening-New-R-D-Location-at-the-World-class-Cove-Facility-UC-Irvine-California.html>.
120. Gaudin S. Engineering diseased blood vessels to more accurately test new medications. Worcester Polytechnic Institute. Published June 7, 2018. Accessed October 27, 2022. <https://www.wpi.edu/news/engineering-diseased-blood-vessels-more-accurately-test-new-medications>.
121. Ren L, Zhou X, Nasiri R, et al. Combined effects of electric stimulation and microgrooves in cardiac tissue-on-a-chip for drug screening. *Small Methods*. 2020;4(10):2000438.
122. Savchenko A, Cherkas V, Liu C, et al. Graphene biointerfaces for optical stimulation of cells. *Sci Adv*. 2018;4(5):eaat0351.
123. Gershlag JR, Hernandez S, Fontana G, et al. Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2017;125:13-22.
124. Hoang P, Wang J, Conklin BR, Healy KE, Ma Z. Generation of spatial-patterned early-developing cardiac organoids using human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2018;13(4):723-737.
125. Al-Hilal TA, Keshavarz A, Kadry H, et al. Pulmonary-arterial-hypertension (PAH)-on-a-chip: Fabrication, validation and application. *Lab Chip*. 2020;20(18):3334-3345.
126. Ho L, Hossen N, Nguyen T, Vo A, Ahsan F. Epigenetic mechanisms as emerging therapeutic targets and microfluidic chips application in pulmonary arterial hypertension. *Biomedicines*. 2022;10(1):170.
127. Richards DJ, Li Y, Kerr CM, et al. Human cardiac organoids for the modelling of myocardial infarction and drug cardiotoxicity. *Nat Biomed Eng*. 2020;4(4):446-462.
128. Pičulin M, Smole T, Žunković B, et al. Disease progression of hypertrophic cardiomyopathy: Modeling using machine learning. *JMIR Med Inform*. 2022;10(2):e30483.
129. ScienMag. Cardiovascular treatments could reach patients faster with new Clemson University research. Published April 30, 2018. Accessed October 27, 2022. <https://scienmag.com/cardiovascular-treatments-could-reach-patients-faster-with-new-clemson-university-research>.
130. Passini E, Britton OJ, Lu HR, et al. Human *in silico* drug trials demonstrate higher accuracy than animal models in predicting clinical pro-arrhythmic cardiotoxicity. *Front Physiol*. 2017;8:668.
131. Chandrasekera PC, Pippin JJ. Of rodents and men: Species-specific glucose regulation and type 2 diabetes research. *ALTEX*. 2014;31(2):157-176.
132. Bunner AE, Chandrasekera PC, Barnard ND. Knockout mouse models of insulin signaling: Relevance past and future. *World J Diabetes*. 2014;5(2):146-159.
133. Mir-Coll J, Moede T, Paschen M, et al. Human islet microtissues as an *in vitro* and an *in vivo* model system for diabetes. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):1813.
134. Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ. Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: Relevance for human type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2014;10(2):131-145.

135. Ali Z, Chandrasekera PC, Pippin JJ. Animal research for type 2 diabetes mellitus, its limited translation for clinical benefit, and the way forward. *Altern Lab Anim*. 2018;46(1):1-10.
136. Physicians Committee for Responsible Medicine. Using skin cells to model diabetes in humans. Published November 20, 2017. Accessed October 28, 2022. <https://www.pcrm.org/news/ethical-science/using-skin-cells-model-diabetes-humans>.
137. Kovatchev BP, Bretan M, Man CD, Cobelli C. *In silico* preclinical trials: A proof of concept in closed-loop control of type 1 diabetes. *J Diabetes Sci Technol*. 2009;3(1):44-55.
138. Riyaphan J, Pham DC, Leong MK, Weng CF. *In silico* approaches to identify polyphenol compounds as  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitors against type-II diabetes. *Biomolecules*. 2021;11(12):1877.
139. Mainul M, Amin SA, Kumar P, et al. Exploring sodium glucose cotransporter (SGLT2) inhibitors with machine learning approach: A novel hope in anti-diabetes drug discovery. *J Mol Graph Model*. 2022;111:108106.
140. Gliberman AL, Pope BD, Zimmerman JF, et al. Synchronized stimulation and continuous insulin sensing in a microfluidic human islet on a chip designed for scalable manufacturing. *Lab Chip*. 2019;19(18):2993-3010.
141. Tso T, Wang Y, Chen W, et al. Engineering human islet organoids from iPSCs using an organ-on-chip platform. *Lab Chip*. 2019;19(6):948-958.
142. Sokolowska P, Zukowski K, Janikiewicz J, Jastrzebska E, Dobrzyn A, Brzozka Z. Islet-on-a-chip: Biomimetic micropillar-based microfluidic system for three-dimensional pancreatic islet cell culture. *Biosens Bioelectron*. 2021;183:113215.
143. Antony JM, MacDonald KS. A critical analysis of the cynomolgus macaque, *Macaca fascicularis*, as a model to test HIV-1/SIV vaccine efficacy. *Vaccine*. 2015;33(27):3073-3083.
144. Centlivre M, Combadière B. New challenges in modern vaccinology. *BMC Immunol*. 2015;16:18.
145. Haigwood NL. Update on animal models for HIV research. *Eur J Immunol*. 2009;39(8):1994-1999.
146. Jülg B, Barouch DH. Novel immunological strategies for HIV-1 eradication. *J Virus Erad*. 2015;1(4):232-236.
147. Girard M, Habel A, Chanel C. New prospects for the development of a vaccine against human immunodeficiency virus type 1. An overview. *C R Acad Sci III*. 1999;322(11):959-966.
148. Hu SL. Non-human primate models for AIDS vaccine research. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2005;5(2):193-201.
149. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. History of HIV vaccine research. Updated October 22, 2018. Accessed February 8, 2022. <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-vaccine-research-history>.
150. Sekaly RP. The failed HIV Merck vaccine study: A step back or a launching point for future vaccine development? *J Exp Med*. 2008;205(1):7-12.
151. Cohen J. "It's sobering": A once-exciting HIV cure strategy fails its test in people. Published July 25, 2018. Accessed February 7, 2022. <https://www.science.org/content/article/it-s-sobering-once-exciting-hiv-cure-strategy-fails-its-test-people>.
152. O'Dell R. Sickness and death at Mesa-area monkey farm threaten primate center viability. *azcentral.com*. Published October 5, 2021. Accessed March 2, 2022. <https://www.peta.org/wp-content/uploads/2021/10/2021-10-04-Sickness-and-death-at-Mesa-area-monkey-farm-threaten-primate-center-viability.pdf>.
153. Kumar N, Chahroudi A, Silvestri G. Animal models to achieve an HIV cure. *Curr Opin HIV AIDS*. 2016;11(4):432-441.
154. Matthews H, Hanison J, Nirmalan N. "Omics"-informed drug and biomarker discovery: Opportunities, challenges and future perspectives. *Proteomes*. 2016;4(3):28.
155. Rao M, Alving CR. Adjuvants for HIV vaccines. *Curr Opin HIV AIDS*. 2016;11(6):585-592.
156. Galperin M, Farenc C, Mukhopadhyay M, et al. CD4+ T cell-mediated HLA class II cross-restriction in HIV controllers. *Sci Immunol*. 2018;3(24):ea00687.
157. Deeks HM, Walters RK, Hare SR, O'Connor MB, Mulholland AJ, Glowacki DR. Interactive molecular dynamics in virtual reality for accurate flexible protein-ligand docking. *PLoS One*. 2020;15(3):e0228461.
158. Saha I, Saffarian S. Dynamics of the HIV gag lattice detected by localization correlation analysis and time-lapse iPALM. *Biophys J*. 2020;119(3):581-592.
159. Xie G, Luo X, Ma T, et al. Characterization of HIV-induced remodeling reveals differences in infection susceptibility of memory CD4+ T cell subsets *in vivo*. *Cell Rep*. 2021;35(4):109038.
160. Ledford H. Translational research: The full cycle. *Nature*. 2008;453(7197):843-845.
161. Tonks A. Quest for the AIDS vaccine. *The BMJ*. 2007;334:1346-1348.
162. Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology. *J Immunol*. 2004;172(5):2731-2738.
163. Zschaler J, Schlorke D, Arhbold J. Difference in innate immune response between man and mouse. *Crit Rev Immunol*. 2014;34(5):433-454.
164. Leist M, Hartung T. Inflammatory findings on species extrapolations: Humans are definitely no 70-kg mice. *Arch Toxicol*. 2013;87(4):563-567.
165. Bouvier NM, Lowen AC. Animal models for influenza virus pathogenesis and transmission. *Viruses*. 2010;2(8):1530-1563.
166. Staeheli P, Grab R, Meier E, Sutcliffe JG, Haller O. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Mol Cell Biol*. 1988;8(10):4518-4523.
167. Tumpey TM, Szretter KJ, Van Hoven N, et al. The Mx1 gene protects mice against the pandemic 1918 and highly lethal human H5N1 influenza viruses. *J Virol*. 2007;81(19):10818-10821.
168. Ibricevic A, Pekosz A, Walter MJ, et al. Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells. *J Virol*. 2006;80(15):7469-7480.
169. Majde JA, Bohnet SG, Ellis GA, et al. Detection of mouse-adapted human influenza virus in the olfactory bulbs of mice within hours after intranasal infection. *J Neurovirol*. 2007;13(5):399-409.
170. Lowen AC, Mubareka S, Tumpey TM, Garcia-Sastre A, Palese P. The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(26):9988-9992.
171. Wu HJ, Wu E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes*. 2012;3(1):4-14.
172. Nguyen TLA, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis Model Mech*. 2015;8(1):1-16.
173. Cappuccino A, Trier P, Castiglione F. Multiscale modeling in immunology: A review. *Brief Bioinform*. 2016;17(3):408-418.
174. Brown JA, Coedreanu SG, Shi M, et al. Metabolic consequences of inflammatory disruption of the blood-brain barrier in an organ-on-chip model of the human neurovascular unit. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):306.
175. Ehling P, Meuth P, Eichinger P, et al. Human T cells *in silico*: Modelling their electrophysiological behaviour in health and disease. *J Theor Biol*. 2016;404:236-250.
176. Day JD, Metes DM, Vodovotz Y. Mathematical modeling of early cellular innate and adaptive immune responses to ischemia/reperfusion injury and solid organ allotransplantation. *Front Immunol*. 2015;6:484.
177. Bergers LIJC, Reijnders CMA, van den Broek LJ, et al. Immune-competent human skin disease models. *Drug Discov Today*. 2016;21(9):1479-1488.
178. Rudd KE, Johnson SC, Ageas KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: Analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020;395(10219):200-211.
179. Liu V, Escobar GJ, Greene JD, et al. Hospital deaths in patients with sepsis from 2 independent cohorts. *JAMA*. 2014;312(1):90-92.
180. Torio CM, Moore BJ. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2013. In: *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs*. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); May 2016.
181. Verma S. Laboratory animal models to mimic human sepsis: A review. *JZS*. 2016;4(2):34-39.
182. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(9):3507-3512.
183. Collins F. Of mice, men, and medicine. NIH. Published February 19, 2013. Accessed October 31, 2022. <https://directorsblog.nih.gov/2013/02/19/of-mice-men-and-medicine>.
184. Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med*. 2004;32(5):S219-S222.
185. Rittirsch D, Hoelsch LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol*. 2007;81(1):137-143.
186. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: Setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(10):854-865.
187. Nemzek JA, Huginin KM, Opp MR. Modeling sepsis in the laboratory: Merging sound science with animal wellbeing. *Comp Med*. 2008;58(2):120-128.
188. Ruiz S, Vardon-Bouines F, Merlet-Dupuy V, et al. Sepsis modeling in mice: Ligation length is a major severity factor in cecal ligation and puncture. *Intensive Care Med Exp*. 2016;4(1):22.
189. Redl H, Bahrami S. Large animal models: Baboons for trauma, shock, and sepsis studies. *Shock*. 2005;24(5):88-93.
190. Fink MP. Animal models of sepsis. *Virulence*. 2014;5(1):143-153.
191. Hawash MBF, Sanz-Remón J, Grenier JC, et al. Primate innate immune responses to bacterial and viral pathogens reveals an evolutionary trade-off between strength and specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(13):e2015855118.
192. NAGMSC. NAGMSC Working Group on Sepsis final report. Published May 17, 2019. Accessed February 9, 2022. <https://www.nigms.nih.gov/News/reports/Documents/nagmsc-working-group-on-sepsis-final-report.pdf>.
193. National Institute of General Medical Sciences. Notice of information: NIGMS priorities for sepsis research. Published July 29, 2019. Accessed February 9, 2022. <https://grants.nih.gov/grants/guide/notice-files/NOT-GM-19-054.html>.
194. Lilley E, Armstrong R, Clark N, et al. Refinement of animal models of sepsis and septic shock. *Shock*. 2015;43(4):304-316.
195. Jeon H, Lee DH, Jundi B, et al. Fully automated, sample-to-answer leukocyte functional assessment platform for continuous sepsis monitoring via microliters of blood. *ACS Sens*. 2021;6(7):2747-2756.
196. Blaurack-Müller N, Gröger M, Siwczak F, et al. CAAP48, a new sepsis biomarker, induces hepatic dysfunction in an *in vitro* liver-on-chip model. *Front Immunol*. 2019;10:273.
197. Allen A, Deshmukh H. All on "CHIP": Using microfluidics to study neutrophil ontogeny. *Transl Res*. 2017;190:1-3.
198. Marik PE, Farkas JD. The changing paradigm of sepsis: Early diagnosis, early antibiotics, early pressors, and early adjuvant treatment. *Crit Care Med*. 2018;46(10):1690-1692.
199. Goh KH, Wang L, Yeow AYK, et al. Artificial intelligence in sepsis early prediction and diagnosis using unstructured data in healthcare. *Nat Commun*. 2021;12(1):711.
200. Giacobbe DR, Signori A, Del Puente F, et al. Early detection of sepsis with machine learning techniques: A brief clinical perspective. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:617486.
201. Rasnati M, Fortuin V. MGP-AttTCN: An interpretable machine learning model for the prediction of sepsis. *PLoS One*. 2021;16(5):e0251248.
202. Akhtar AZ, Pippin JJ, Sandusky CB. Animal models in spinal cord injury: A review. *Rev Neurosci*. 2008;19(1):47-60.
203. Angius D, Wang H, Spinner RJ, Gutierrez-Cotto Y, Yaszemski MJ, Windebank AJ. A systematic review of animal models used to study nerve regeneration in tissue-engineered scaffolds. *Biomaterials*. 2012;33(32):8034-8039.
204. Akhtar AZ, Pippin JJ, Sandusky CB. Animal studies in spinal cord injury: A systematic review of methylprednisolone. *Altern Lab Anim*. 2009;37(1):43-62.
205. Kaplan HM, Mishra P, Kohn J. The overwhelming use of rat models in nerve regeneration research may compromise designs of nerve guidance conduits for humans. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26(8):226.
206. Mobini S, Song YH, McClary MW, Schmidt CE. Advances in *ex vivo* models and lab-on-a-chip devices for neural tissue engineering. *Biomaterials*. 2019;198:146-166.

207. Zhuang P, Sun AX, An J, Chua CK, Chew SY. 3D neural tissue models: From spheroids to bioprinting. *Biomaterials*. 2018;154:113-133.
208. Shrirao AB, Kung FH, Omelchenko A, et al. Microfluidic platforms for the study of neuronal injury *in vitro*. *Biotechnol Bioeng*. 2018;115(4):815-830.
209. Spijkers XM, Pasterkamp-Vuhman S, Dorleijn JC, Vulto P, Wevers NR, Pasterkamp RJ. A directional 3D neurite outgrowth model for studying motor axon biology and disease. *Sci Rep*. 2021;11(1):2080.
210. Ramirez S, Mukherjee A, Sepulveda S, et al. Modeling traumatic brain injury in human cerebral organoids. *Cells*. 2021;10(10):2683.
211. Ramirez S, Mukherjee A, Sepulveda SE, et al. Protocol for controlled cortical impact in human cerebral organoids to model traumatic brain injury. *STAR Protoc*. 2021;2(4):100987.
212. Potashkin JA, Blume SR, Runkle NK. Limitations of animal models of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*. 2010;2011:1-7.
213. Cummings JL, Morstorf T, Zhong K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: Few candidates, frequent failures. *Alzheimers Res Ther*. 2014;6(4):37.
214. AstraZeneca. Update on Phase III clinical trials of Ixabecestat for Alzheimer's disease. Published June 12, 2018. Accessed November 2, 2022. <https://www.astrazeneca.com/media-centre/press-releases/2018/update-on-phase-iii-clinical-trials-of-ixabecestat-for-alzheimers-disease-12062018.html#>.
215. Burns TC, Li MD, Mehta S, Awad AJ, Morgan AA. Mouse models rarely mimic the transcriptome of human neurodegenerative diseases: A systematic bioinformatics-based critique of preclinical models. *Eur J Pharmacol*. 2015;759:101-117.
216. Lane E, Dunnett S. Animal models of Parkinson's disease and L-dopa induced dyskinesia: How close are we to the clinic? *Psychopharmacology (Berl)*. 2008;199(3):303-312.
217. Ehrhaefer DE, Butland SL, Pouladi MA, Hayden MR. Mouse models of Huntington disease: Variations on a theme. *Dis Model Mech*. 2009;2(3-4):123-129.
218. Benatar M. Lost in translation: Treatment trials in the SOD1 mouse and in human ALS. *Neurobiol Dis*. 2007;26(1):1-13.
219. Clerc P, Lipnick S, Willett C. A look into the future of ALS research. *Drug Discov Today*. 2016;21(6):939-949.
220. Menache A, Beuter A. Commentary: Lessons from the analysis of non-human primates for understanding human aging and neurodegenerative diseases. *Front Hum Neurosci*. 2016;10:33.
221. Olsson IA, Hansen AK, Sandoe P. Animal welfare and the refinement of neuroscience research methods—a case study of Huntington's disease models. *Lab Anim*. 2008;42(3):277-283.
222. Pistollato F, Dhayan EL, Lam A, et al. Alzheimer disease research in the 21<sup>st</sup> century: Past and current failures, new perspectives and funding opportunities. *Oncotarget*. 2016;7(26):38999-39016.
223. Mirbaha H, Chen D, Morozova OA, et al. Inert and seed-competent tau monomers suggest structural origins of aggregation. *Elife*. 2018;7:e36584.
224. Gao Y, Liu J, Wang J, et al. Proteomic analysis of human hippocampal subfields provides new insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease and the role of glial cells. *Brain Pathol*. 2022;e13047.
225. Cope TE, Rittman T, Borchert RJ, et al. Tau burden and the functional connectome in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy. *Brain*. 2018;141(2):550-567.
226. Ochalek A, Mihalik B, Avci HX, et al. Neurons derived from sporadic Alzheimer's disease iPSCs reveal elevated TAU hyperphosphorylation, increased amyloid levels, and GSK3B activation. *Alzheimers Res Ther*. 2017;9(1):90.
227. Bereczki E, Bronca RM, Francis PT, et al. Synaptic markers of cognitive decline in neurodegenerative diseases: A proteomic approach. *Brain*. 2018;141(2):582-595.
228. Sultzer DL, Lim AC, Gordon HL, Yarns BC, Melrose RJ. Cholinergic receptor binding in unimpaired older adults, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease dementia. *Alzheimers Res Ther*. 2022;14(1):25.
229. Santhanam N, Kumanchik L, Guo X, et al. Stem cell derived phenotypic human neuromuscular junction model for dose response evaluation of therapeutics. *Biomaterials*. 2018;166:64-78.
230. Dauth S, Maoz BM, Sheehy SP, et al. Neurons derived from different brain regions are inherently different *in vitro*: A novel multiregional brain-on-a-chip. *J Neurophysiol*. 2017;117(3):1320-1341.
231. Sossia D, Belle A, Fischer N, et al. Controlled placement of multiple CNS cell populations to create complex neuronal cultures. *PLoS One*. 2017;12(11):e0188146.
232. Kim H, Park HJ, Choi H, et al. Modeling G2019S-LRRK2 Sporadic Parkinson's Disease in 3D Midbrain Organoids. *Stem Cell Reports*. 2019;12(3):518-531.
233. Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disease. *Nat Neurosci*. 2010;13(10):1161-1169.
234. Molendijk ML, de Kloet ER. Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. *Psychoneuroendocrinology*. 2015;62:389-391.
235. De Pablo JM, Parra A, Segovia S, Guillamón A. Learned immobility explains the behavior of rats in the forced swimming test. *Physiol Behav*. 1989;46(2):229-237.
236. Jefferys D, Funder J. The effect of water temperature on immobility in the forced swimming test in rats. *Eur J Pharmacol*. 1994;253(1-2):91-94.
237. Lucki I, Dalvi A, Mayorga AJ. Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001;155(3):315-322.
238. Trunell ER, Carvalho C. The forced swim test has poor accuracy for identifying novel antidepressants. *Drug Discov Today*. 2021;26(12):2898-2904.
239. Carvalho C, Varela SAM, Marques TA, Knight A, Vicente L. *Are in vitro and in silico approaches used appropriately for animal-based major depressive disorder research?* *PLoS One*. 2020;15(6):e0233954.
240. Carvalho C, Peste F, Marques TA, Knight A, Vicente LM. The contribution of rat studies to current knowledge of major depressive disorder: Results from citation analysis. *Front Psychol*. 2020;11:1486.
241. Carvalho C, Herrmann K, Marques TA, Knight A. Time to abolish the forced swim test in rats for depression research? *J Appl Anim Ethics Res*. 2021;1-9.
242. Kato T, Kasahara T, Kubota-Sakashita M, Kato TM, Nakajima K. Animal models of recurrent or bipolar depression. *Neuroscience*. 2016;321:189-196.
243. Garner JP. The significance of meaning: Why do over 90% of behavioral neuroscience results fail to translate to humans, and what can we do to fix it? *ILAR J*. 2014;55(3):438-456.
244. Jin H, Romano G, Marshall C, Donaldson AE, Suon S, Iacovitti L. Tyrosine hydroxylase gene regulation in human neuronal progenitor cells does not depend on Nurr1 as in the murine and rat systems. *J Cell Physiol*. 2006;207(1):49-57.
245. Hodge RD, Bakken TE, Miller JA, et al. Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature*. 2019;573(7772):61-68.
246. van der Staay FJ, Arndt SS, Nordquist RE. Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behav Brain Funct*. 2009;5:11.
247. Siekmeier PJ. Computational modeling of psychiatric illnesses via well-defined neurophysiological and neurocognitive biomarkers. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015;57:365-380.
248. Haggarty SJ, Silva MC, Cross A, Brandon NJ, Perlis RH. Advancing drug discovery for neuropsychiatric disorders using patient-specific stem cell models. *Mol Cell Neurosci*. 2016;73:104-115.
249. Adegbola A, Bury LA, Fu C, Zhang M, Wynshaw-Boris A. Concise review: Induced pluripotent stem cell models for neuropsychiatric diseases. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(12):2062-2070.
250. Zhong X, Harris G, Smirnova L, et al. Antidepressant paroxetine exerts developmental neurotoxicity in an iPSC-derived 3D human brain model. *Front Cell Neurosci*. 2020;14:25.
251. Urresti J, Zhang P, Moran-Losada P, et al. Correction: Cortical organoids model early brain development disrupted by 16p11.2 copy number variants in autism. *Mol Psychiatry*. 2021;26(12):7581.
252. Dattaro L. Protein inhibitor normalizes neuronal migration in organoid model of autism. SpectrumNews.org. Published September 1, 2021. Accessed February 8, 2022. <https://www.spectrumnews.org/news/protein-inhibitor-normalizes-neuronal-migration-in-organoid-model-of-autism>.
253. Provenza NR, Sheth SA, Dastin-van Rijn EM, et al. Long-term ecological assessment of intracranial electrophysiology synchronized to behavioral markers in obsessive-compulsive disorder. *Nat Med*. 2021;27(12):2154-2164.
254. Yassin W, Nakatani H, Zhu Y, et al. Machine-learning classification using neuroimaging data in schizophrenia, autism, ultra-high risk and first-episode psychosis. *Transl Psychiatry*. 2020;10(1):278.
255. Kalmady SV, Paul AK, Greiner R, et al. Extending schizophrenia diagnostic model to predict schizotypy in first-degree relatives. *NPJ Schizophr*. 2020;6(1):30.
256. Roth S, Liesz A. Stroke research at the crossroads—where are we heading? *Swiss Med Wkly*. 2016;146:w14329.
257. Sutherland BA, Minnerup J, Balami JS, Arba F, Buchan AM, Kleinschütz C. Neuroprotection for ischemic stroke: Translation from the bench to the bedside. *Int J Stroke*. 2012;7(5):407-418.
258. Sammer CJ. Ischemic stroke: Experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017;133(2):245-261.
259. Chen Z, Mou R, Feng D, Wang Z, Chen G. The role of nitric oxide in stroke. *Med Gas Res*. 2017;7(3):194-203.
260. Lin S, Lin Y, Nery JR, et al. Comparison of the transcriptional landscapes between human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(48):17224-17229.
261. Holloway PM, Gavins FN. Modeling ischemic stroke *in vitro*: The status quo and future perspectives. *Stroke*. 2016;47(2):561-569.
262. Werth JL, Park TS, Silbergeld DL, Rothman SM. Excitotoxic swelling occurs in oxygen and glucose deprived human cortical slices. *Brain Res*. 1998;782(1-2):248-254.
263. Wiesmayer P. "Mini-brains" to replace mouse model in stroke research. InnovationOrigins.com. Published July 21, 2021. Accessed February 9, 2022. <https://innovationorigins.com/en/mini-brains-to-replace-mouse-model-in-stroke-research>.
264. Nzou G, Wicks RT, VanOstrand NR, et al. Author Correction: Multicellular 3D neurovascular unit model for assessing hypoxia and neuroinflammation induced blood-brain barrier dysfunction. *Sci Rep*. 2020;10(1):20384.
265. Lyu Z, Park J, Kim KM, et al. A neurovascular-unit-on-a-chip for the evaluation of the restorative potential of stem cell therapies for ischaemic stroke. *Nat Biomed Eng*. 2021;5(8):847-863.
266. Wevers NR, Nair AL, Fowke TM, et al. Modeling ischemic stroke in a triculture neurovascular unit on-a-chip. *Fluids Barriers CNS*. 2021;18(1):59.
267. Miller C, Padmos RM, van der Kolk M, et al. *In silico* trials for treatment of acute ischemic stroke: Design and implementation. *Comput Biol Med*. 2021;137:104802.
268. Guo Y. A new paradigm of "real-time" stroke risk prediction and integrated care management in the digital health era: Innovations using machine learning and artificial intelligence approaches. *Thromb Haemost*. 2022;122(1):5-7.
269. Matsoukas S, Morey J, Lock G, et al. AI software detection of large vessel occlusion stroke on CT angiography: A real-world prospective diagnostic test accuracy study. *J Neurointerv Surg*. 2022;neurintsurg-2021-018391.
270. Gundo B, Neuhaus A, Sipos I, et al. Improved stroke care in a primary stroke centre using AI-decision support. *Cerebrovasc Dis Extra*. 2022;10.1159/000522423.
271. Bosetti F, Koenig JJ, Ayata C, et al. Translational stroke research: Visions and opportunities. *Stroke*. 2017;48(9):2632-2637.
272. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics—2016 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133(4):e38-e360.
273. Tzschentke TM. Where do we stand in the field of anti-abuse drug discovery? *Expert Opin Drug Dis*. 2014;9(11):1255-1258.
274. Stephens DN, Crombag HS, Duka T. The challenge of studying parallel behaviors in humans and animal models. *Curr Top Behav Neurosci*. 2013;13:611-45.



275. Green AR, King MV, Shortall SE, Fane KC. Lost in translation: Preclinical studies on 3,4-methylenedioxyamphetamine provide information on mechanisms of action, but do not allow accurate prediction of adverse events in humans. *Br J Pharmacol*. 2012;166(5):1523-1536.
276. Ahmed SH. Validation crisis in animal models of drug addiction: Beyond non-disordered drug use toward drug addiction. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010;35(2):172-184.
277. Ramsden E. Making animals alcoholic: Shifting laboratory models of addiction. *J Hist Behav Sci*. 2015;51(2):164-194.
278. Hyman SE, Malenka RC. Addiction and the brain: The neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(10):695-703.
279. Scarnati MS, Halikere A, Pang ZP. Using human stem cells as a model system to understand the neural mechanisms of alcohol use disorders: Current status and outlook. *Alcohol*. 2019;74:83-93.
280. Lieberman R, Kranzler HR, Levine ES, Covault J. Examining the effects of alcohol on GABA<sub>A</sub> receptor mRNA expression and function in neural cultures generated from control and alcohol dependent donor induced pluripotent stem cells. *Alcohol*. 2018;66:45-53.
281. De Filippis L, Halikere A, McGowan H, et al. Ethanol-mediated activation of the NLRP3 inflammasome in iPSC cells and iPSC cells-derived neural progenitor cells. *Mol Brain*. 2016;9(1):51.
282. Lee CT, Chen J, Kindberg AA, et al. CYP3A5 mediates effects of cocaine on human neocorticalogenesis: Studies using an *in vitro* 3D self-organized hPSC model with a single cortex-like unit. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42(3):774-784.
283. Arzuo T, Yan Y, Jiang C, et al. Modeling alcohol-induced neurotoxicity using human induced pluripotent stem cell-derived three-dimensional cerebral organoids. *Transl Psychiatry*. 2020;10(1):347.
284. Tian L, Prasad N, Jang YY. *In vitro* modeling of alcohol-induced liver injury using human-induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol*. 2016;1353:271-283.
285. Hildebrand F, Andruszkow H, Huber-Lang M, Pape HC, van Griensven M. Combined hemorrhage/trauma models in pigs—current state and future perspectives. *Shock*. 2013;40(4):247-273.
286. Staudbauer KH, Wagner-Berger HG, Raedler C, et al. Vasopressin, but not fluid resuscitation, enhances survival in a liver trauma model with uncontrolled and otherwise lethal hemorrhagic shock in pigs. *Anesthesiology*. 2003;98(3):699-704.
287. Tsukamoto T, Pape HC. Animal models for trauma research: What are the options? *Shock*. 2009;31(1):3-10.
288. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(2):128-142.
289. Combes RD. A critical review of anaesthetised animal models and alternatives for military research, testing and training, with a focus on blast damage, haemorrhage, and resuscitation. *Altern Lab Anim*. 2013;41(5):385-415.
290. Brown D, Namas RA, Almahmoud K, et al. Trauma *in silico*: Individual-specific mathematical models and virtual clinical populations. *Sci Transl Med*. 2015;7(285):285ra61.
291. Ziraldo C, Saloveyev A, Allegretti A, et al. A computational, tissue-realistic model of pressure ulcer formation in individuals with spinal cord injury. *PLoS Comput Biol*. 2015;11(6):e1004309.
292. Abboud A, Mi Q, Puccio A, et al. Inflammation following traumatic brain injury in humans: Insights from data-driven and mechanistic models into survival and death. *Front Pharmacol*. 2016;7:342.
293. Schiller AM, Howard JT, Convertino VA. The physiology of blood loss and shock: New insights from a human laboratory model of hemorrhage. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2017;242(8):874-883.
294. Ehrlich H, McKenney M, Elkbuli A. The niche of artificial intelligence in trauma and emergency medicine. *Am J Emerg Med*. 2021;45:669-670.
295. Laur O, Wang B. Musculoskeletal trauma and artificial intelligence: Current trends and projections. *Skeletal Radiol*. 2022;51(2):257-269.
296. Niggli C, Pape HC, Niggli P, Mica L. Validation of a visual-based analytics tool for outcome prediction in polytrauma patients (WATSON Trauma Pathway Explorer) and comparison with the predictive values of TRISS. *J Clin Med*. 2021;10(10):2115.
297. Diebel LN, Marinica AL, Edelman D, Liberati D. The effect of perturbations of the glycocalyx on microvascular perfusion in the obese trauma population: An *in vitro* study. *Trauma Surg Acute Care Open*. 2021;6(1):e000711.
298. Diebel LN, Wheaton M, Liberati DM. The protective role of estrogen on endothelial and glycocalyx barriers after shock conditions: A microfluidic study. *Surgery*. 2021;169(3):678-685.
299. Cattaneo C, Maderna E, Rendinelli A, Gibelli D. Animal experimentation in forensic sciences: How far have we come? *Forensic Sci Int*. 2015;254:e29-e35.
300. Knight B. Forensic science and animal rights. *Forensic Sci Int*. 1992;57(1):1-3.
301. Mole CG, Heyns M. Animal models in forensic science research: Justified use or ethical exploitation? *Sci Eng Ethics*. 2019;25(4):1095-1110.
302. Steadman DW. Multidisciplinary validation study of nonhuman animal models for forensic decomposition research. National Institute of Justice. Published March 2018. Accessed February 18, 2022. <https://nij.ojp.gov/library/publications/multidisciplinary-validation-study-nonhuman-animal-models-forensic>.
303. Patronek GJ, Rauch A. Systematic review of comparative studies examining alternatives to the harmful use of animals in biomedical education. *J Am Vet Med Assoc*. 2007;230(1):37-43.
304. Goodman JR, Borch CA, Cherry E. Mounting opposition to vivisection. *Contexts*. 2012;11(2):68-69.
305. Reznick RK, MacRae H. Teaching surgical skills—changes in the wind. *N Engl J Med*. 2006;355(25):2664-2669.
306. Institute of Medicine. *To Err Is Human: Building a Safer Health System*. Washington, DC: The National Academies Press; 2000.
307. Fears D. One last U.S. medical school still killed animals to teach surgery. But no more. *The Washington Post*. Published June 30, 2016. Accessed August 16, 2018. <https://www.washingtonpost.com/news/animalia/wp/2016/06/30/one-last-u-s-medical-school-still-killed-animals-to-teach-surgery-but-no-more>.
308. Herrmann K, Pawlowski J, Feinstein D, Crandall M, Gala S. Modernizing biomedical training: Replacing live animal laboratories with human simulation. In: Herrmann K, Jayne K, eds. *Animal Experimentation: Working Towards a Paradigm Change*. Brill; 2019:551-566.
309. Hansen LA. Animal laboratories are not needed to train medical students. *J Surg Educ*. 2014;71(4):454.
310. Duo A. Letters to the editor. *Mil Med*. 2014;179(7):vii.
311. Jin C, Dai L, Wang T. The application of virtual reality in the training of laparoscopic surgery: A systematic review and meta-analysis. *Int J Surg*. 2021;87:105859.
312. Schmidt MW, Köppinger KF, Fan C, et al. Virtual reality simulation in robot-assisted surgery: Meta-analysis of skill transfer and predictability of skill. *BJS Open*. 2021;5(2):zraa066.
313. Dramey BP, Peebles DM, Stoyanov DV. A systematic review and meta-analysis of the use of high-fidelity simulation in obstetric ultrasound. *Simul Healthc*. 2020;16(1):52-59.
314. Gaubert S, Blet A, Dib F, et al. Positive effects of lumbar puncture simulation training for medical students in clinical practice. *BMC Med Educ*. 2021;21(1):18.
315. Hanada K, Hoshina K, Tsuyuki S, et al. Ten-hour simulation training improved the suturing performance of medical students. *Ann Vasc Surg*. 2022;S0890-5096(21)01054-2.
316. Sparks D, Kavanagh KR, Vargas JA, Valdez TA. 3D printed myringotomy and tube simulation as an introduction to otolaryngology for medical students. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2020;128:109730.
317. Grober ED, Hamstra SJ, Wanzel KR, et al. The educational impact of bench model fidelity on the acquisition of technical skill: The use of clinically relevant outcome measures. *Ann Surg*. 2004;240(2):374-381.
318. Ghanem AM, Hachach-Haram N, Leung CC, Myers SR. A systematic review of evidence for education and training interventions in microsurgery. *Arch Plast Surg*. 2013;40(4):312-319.
319. Alier O, Youssef G, Myers S, Ghanem A. A novel three-in-one silicone model for basic microsurgery training. *Eur J Plast Surg*. 2020;43(5):621-626.
320. SIU Medicine. Microsurgery. Siuemed.org. Accessed March 1, 2022. <https://www.siuemed.org/treatment/microsurgery.html>.
321. Abi-Rafeh J, Zammit D, Majahteh Jaberi M, Al-Halabi B, Thibaudeau S. Nonbiological microsurgery simulators in plastic surgery training: A systematic review. *Plast Reconstr Surg*. 2019;144(3):496e-507e.
322. Joseph FJ, Weber S, Raabe A, Bervini D. Neurosurgical simulator for training aneurysm microsurgery—a user suitability study involving neurosurgeons and residents. *Acta Neurochir (Wien)*. 2020;162(10):2313-2321.
323. Steineke TC, Barbary D. Microsurgical clipping of middle cerebral artery aneurysms: Preoperative planning using virtual reality to reduce procedure time. *Neurosurg Focus*. 2021;51(2):E12.
324. Hall A, Riojos R, Sharon D. Comparison of self-efficacy and its improvement after artificial simulator or live animal model emergency procedure training. *Mil Med*. 2014;179(3):320-323.
325. Hall A. Letters to the editor. *Mil Med*. 2014;179(7).
326. Gala SG, Goodman JR, Murphy MP, Balsam MJ. Use of animals by NATO countries in military medical training exercises: An international survey. *Mil Med*. 2012;177(8):907-910.
327. Seck H. Coast Guard puts permanent end to wounding animals for training. Military.com. Published March 20, 2018. Accessed November 3, 2022. <https://www.military.com/daily-news/2018/03/20/coast-guard-puts-permanent-end-wounding-animals-training.html>.
328. The New York Times Editorial Board. Ban animal use in military medical training. *The New York Times*. Published June 25, 2016. Accessed November 3, 2022. <https://www.nytimes.com/2016/06/26/opinion/ban-animal-use-in-military-medical-training.html>.
329. Rep. Hank Johnson. Leading medical groups endorse Johnson's military modernization bill. Published June 27, 2016. Accessed November 3, 2022. <https://web.archive.org/web/20160907033912/https://hankjohnson.house.gov/media-center/press-releases/leading-medical-groups-endorse-johnson-s-military-modernization-bill>.
330. Keller J, Hart D, Rule G, Bonnett T, Sweet R. The physiologic stress response of learners during critical care procedures: Live tissue vs. synthetic models. *Chest*. 2018;154(4):229A.
331. Hoang TN, LaPorta AJ, Malone JD, et al. Hyper-realistic and immersive surgical simulation training environment will improve team performance. *Trauma Surg Acute Care Open*. 2020;5(1):e000393.
332. Mackenzie CF, Tisherman SA, Shackelford S, Sevdalis N, Elster E, Bowyer MW. Efficacy of trauma surgery technical skills training courses. *J Surg Educ*. 2019;76(3):832-843.
333. Rubeis G, Steger F. Is live-tissue training ethically justified? An evidence-based ethical analysis. *Altern Lab Anim*. 2018;46(2):65-71.
334. American College of Surgeons. Alternative models for the ATLS surgical skills practicum. Published November 7, 2001. Accessed February 14, 2022. <https://www.peta.org/wp-content/uploads/2022/02/ACS-ATLS-2001-alternatives-endorsement.pdf>.
335. Belisomo R. 'TraumaMan' helps doctors save humans, spares animals. *Reuters*. Published September 25, 2015. Accessed December 13, 2022. <https://www.reuters.com/article/us-health-surgeons-traumaman/traumaman-helps-doctors-save-humans-spare-animals-idUSKCNORP10620150925>.
336. OECD. Integrated approaches to testing and assessment (IATA). Published 2021. Accessed October 15, 2021. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm>.
337. OECD. Guideline No. 497: Defined approaches for skin sensitisation. Published June 14, 2021. Accessed August 25, 2022. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/b92879a4-en.pdf?expires=1623947885&id=id&accname=guest&checksum=8C4837C649125C05005B006E220193BD>.
338. Ball N. Developing the scientific basis for Exposure Based Adaptations (EBA)—technical report no. 137. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals. Published October 2, 2020. Accessed January 28, 2022. <https://policycommons.net/artifacts/1662801/developing-the-scientific-basis-for-exposure-based-adaptations-eba-technical-report-no/2394251>.

339. European Commission. Summary report on the statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the member states of the European Union. Published July 14, 2021. Accessed August 25, 2022. [https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/pdf/SWD\\_220part\\_A\\_and\\_B.pdf](https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/SWD_220part_A_and_B.pdf).
340. OECD. Test No. 319A: Determination of *in vitro* intrinsic clearance using cryopreserved rainbow trout hepatocytes (RT-HEP). Published June 27, 2018. Accessed August 25, 2022. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264303218-en.pdf>.
341. OECD. Test No. 319B: Determination of *in vitro* intrinsic clearance using rainbow trout liver S9 sub-cellular fraction (RT-S9). Published June 25, 2018. Accessed August 25, 2022. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264303232-en.pdf>.
342. OECD. Guidance document on the determination of *in vitro* intrinsic clearance using cryopreserved hepatocytes (RT-HEP) or liver S9 sub-cellular fractions (RT-S9) from rainbow trout and extrapolation to *in vivo* intrinsic clearance. Series on Testing & Assessment No. 280. Published July 6, 2018. Accessed August 25, 2022. <https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO/282018/2912&doclanguage=en>.
343. OECD. Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure. Published October 2, 2012. Accessed August 25, 2022. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264185296-en.pdf>.
344. OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Published July 26, 2013. Accessed August 25, 2022. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264203709-en.pdf>.
345. ECHA. Joint Report ECHA and UBA. Expert workshop on the potential regulatory application of the Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test under REACH, CLP and the BPR. May 3–4, 2017, Helsinki. Accessed November 5, 2022. [https://echa.europa.eu/documents/10162/13630/fet\\_workshop\\_proceedings\\_en.pdf/a987ccab-5d4a-a226-2a73-994be484ca8d](https://echa.europa.eu/documents/10162/13630/fet_workshop_proceedings_en.pdf/a987ccab-5d4a-a226-2a73-994be484ca8d).
346. Tonneberger K, Knäbel M, Busser FJM, Sinnige TL, Hermens JLM, Schirmer K. Predicting fish acute toxicity using a fish gill cell line-based toxicity assay. *Environ Sci Technol*. 2013;47(2):1110–1119.
347. OECD. Test No. 249: Fish cell line acute toxicity: The RTgill-W1 cell line assay. Published June 14, 2021. Accessed August 25, 2022. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/test-no-249-fish-cell-line-acute-toxicity-the-rtgill-w1-cell-line-assay-c66d5190-en.htm>
348. OECD. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. Updated June 18, 2019. Accessed August 25, 2022. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264069961-en.pdf>.
349. HUGIN SWIFT. Published 2020. Accessed August 25, 2022. <https://swift.hugin.com>.
350. OECD. Guidance document on aqueous-phase aquatic toxicity testing of difficult test chemicals. Series on Testing & Assessment No. 23. 2<sup>nd</sup> ed. Published February 8, 2019. Accessed August 25, 2022. <https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO/282007/296/REV1&docLanguage=En>.
351. Hilton GM, Odenkirchen E, Panger M, Waleko G, Lowit A, Clippinger AJ. Evaluation of the avian acute oral and sub-acute dietary toxicity test for pesticide registration. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2019;105:30–35.
352. EPA Office of Pesticide Programs (OPP). Final guidance for waiving sub-acute avian dietary tests for pesticide registration and supporting retrospective analysis. Published February 2020. Accessed August 25, 2022. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2020-02/documents/final-waiver-guidance-avian-sub-acute-dietary.pdf>.
353. LaLone CA, Villeneuve DL, Lyons D, et al. Editor's highlight: Sequence alignment to predict across species susceptibility (SeqAPASS): A web-based tool for addressing the challenges of cross-species extrapolation of chemical toxicity. *Toxicol Sci*. 2016;153(2):228–245.
354. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, et al. EDC-2: The Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr Rev*. 2015;36(6):1–150.
355. La Merrill MA, Vandenberg LN, Smith MT, et al. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16(1):45–57.
356. Kahn LG, Philippat C, Nakayama SF, Slama R, Trasande L. Endocrine-disrupting chemicals: Implications for human health. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020;8(8):703–718.
357. Iwanowicz LR, Blazer VS, Pinkney AE, et al. Evidence of estrogenic endocrine disruption in smallmouth and largemouth bass inhabiting Northeast U.S. national wildlife refuge waters: A reconnaissance study. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2016;124:50–59.
358. Bókány V, Úveges B, Ujhegyi N, et al. Endocrine disruptors in breeding ponds and reproductive health of toads in agricultural, urban and natural landscapes. *Sci Total Environ*. 2018;634:1335–1345.
359. AOP Wiki. Published 2021. Accessed October 15, 2021. <https://aopwiki.org>.
360. OECD. Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA). 2021.
361. Vandenberg LN, Welshons WV, Vam Saal FS, Toutain PL, Myers JP. Should oral gavage be abandoned in toxicity testing of endocrine disruptors? *Environ Health*. 2014;13(1):46.
362. Moroni L, Barbaro F, Caiment F, et al. SCREENED: A multistage model of thyroid gland function for screening endocrine-disrupting chemicals in a biologically sex-specific manner. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10):1–23.
363. Browne P, Judson RS, Casey WM, Kleinstreuer NC, Thomas RS. Screening chemicals for estrogen receptor bioactivity using a computational model. *Environ Sci Technol*. 2015;49(14):8804–8814.
364. Kleinstreuer NC, Ceger PC, Allen DG, et al. A curated database of rodent uterotrophic bioactivity. *Environ Health Perspect*. 2016;124(5):556–562.
365. Judson RS, Magpantay FM, Chickarmone V, et al. Integrated model of chemical perturbations of a biological pathway using 18 *in vitro* high-throughput screening assays for the estrogen receptor. *Toxicol Sci*. 2015;148(1):137–154.
366. EPA. Use of high throughput assays and computational tools in the Endocrine Disruptor Screening Program. Updated March 7, 2022. Accessed August 25, 2022. <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/use-high-throughput-assays-and-computational-tools-endocrine-disruptor>.
367. Noyes PD, Friedman KP, Browne P, et al. Evaluating chemicals for thyroid disruption: Opportunities and challenges with *in vitro* testing and adverse outcome pathway approaches. *Environ Health Perspect*. 2019;127(9).
368. Luechtefeld T, Maertens A, Russo DP, Roviada C, Zhu H, Hartung T. Analysis of Draize eye irritation testing and its prediction by mining publicly available 2008–2014 REACH data. *ALTEX*. 2016;33(2):123–134.
369. OECD. Guidance document on considerations for waiving or bridging of mammalian acute toxicity tests. Series on Testing & Assessment No. 237. Published February 8, 2019. Accessed August 25, 2022. <https://www.oecd.org/env/guidance-document-on-considerations-for-waiving-or-bridging-of-mammalian-acute-toxicity-tests-9789264274754-en.htm>.
370. OECD. Guidance document on an integrated approach on testing and assessment (IATA) for serious eye damage and eye irritation. Series on Testing & Assessment No. 263. 2<sup>nd</sup> ed. Published July 25, 2019. Accessed August 25, 2022. [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/second-edition-guidance-document-on-integrated-approaches-to-testing-and-assessment-iata-for-serious-eye-damage-and-eye-irritation\\_B4b83321-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/second-edition-guidance-document-on-integrated-approaches-to-testing-and-assessment-iata-for-serious-eye-damage-and-eye-irritation_B4b83321-en).
371. EPA. Alternate testing framework for classification of eye irritation potential of EPA-regulated pesticide products. Updated June 1, 2022. Accessed August 25, 2022. <https://www.epa.gov/pesticide-registration/alternate-testing-framework-classification-eye-irritationpotential-epa>.
372. Clippinger AJ, Raabe HA, Allen DG, et al. Human-relevant approaches to assess eye corrosion/irritation potential of agrochemical formulations. *Cutan Ocul Toxicol*. 2021;40(2):145–167.
373. ECHA. Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Chapter R.7a: Endpoint specific guidance. Version 6. Published July 2017. doi:10.2823/337352.
374. ECHA. Guidance on the Biocidal Products Regulation. Volume III: Human health, Part A: Information requirements. Version 1.2. Published May 2018. doi:10.2823/443383.
375. Regulation (EC) no. 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. Published November 24, 2009. Accessed August 25, 2022. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1107/oj>.
376. ICH. ICH guideline S2 (R1) on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. Updated February 2013. Accessed August 25, 2022. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-s2-r1-genotoxicity-testing-data-interpretation-pharmaceuticals-intended-human-use>.
377. Carvi R, Madia F. EURL ECVAM Genotoxicity and Carcinogenicity Consolidated Database of Ames Positive Chemicals. European Commission Joint Research Centre. Updated December 20, 2018. Accessed August 25, 2022. <http://data.europa.eu/89h/jrc-eurl-ecvam-genotoxicity-carcinogenicity-ames>.
378. Buick JK, Williams A, Gagné R, et al. Flow cytometric micronucleus assay and TGx-DDI transcriptomic biomarker analysis of ten genotoxic and non-genotoxic chemicals in human HepaRGTM cells. *Genes Environ*. 2020;42(1):5.
379. Li H-H, Youk CL, Chen R, et al. TGx-DDI, a Transcriptomic Biomarker for Genotoxicity Hazard Assessment of Pharmaceutical and Environmental Chemicals. *Front Big Data*. 2019;2:36.
380. Baltazar MT, Cable S, Carmichael PL, et al. A next-generation risk assessment case study for coumarin in cosmetic products. *Toxicol Sci*. 2020;176(1).
381. Hendriks G, Derr RS, Misovic B, Maralli B, Calleja FMGR, Vrieling H. The extended TaxTracker assay discriminates between induction of DNA damage, oxidative stress, and protein misfolding. *Toxicol Sci*. 2016;150(1):190–203.
382. Hendriks G, Atallah M, Maralli B, et al. The TaxTracker assay: Novel GFP reporter systems that provide mechanistic insight into the genotoxic properties of chemicals. *Toxicol Sci*. 2012;125(1):285–298.
383. U.S. Food and Drug Administration (FDA) Center for Drug Evaluation and Research. Letter to HESI Committee on Genomics. Subject: Biomarker Letter of Support. October 24, 2017. Accessed March 4, 2022. <https://www.fda.gov/media/112682/download>.
384. OECD. Work plan for the Test Guidelines Programme (TGP). July 2021. Accessed August 25, 2022. <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/work-plan-test-guidelines-programme-july-2021.pdf>.
385. ECHA. N,N,4-trimethylpiperazine-1-ethylamine. Registration Dossier. Accessed January 26, 2022. <https://echa.europa.eu/nl/registration-dossier/-/registered-dossier/27533/7/711>.
386. Pfuhrer S, Pirow R, Downs TR, et al. Validation of the 3D reconstructed human skin Comet assay, an animal-free alternative for following-up positive results from standard *in vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*. 2021;36(1):19–35.
387. Pfuhrer S, Downs TR, Hewitt NJ, et al. Validation of the 3D reconstructed human skin micronucleus (RSMN) assay: An animal-free alternative for following-up positive results from standard *in vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*. 2021;36(1):1–17.
388. Bernauer U, Bodin L, Choudhry Q, et al. The SCCS Notes of Guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation, 11<sup>th</sup> revision, March 30–31, 2021, SCCS/1628/21. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2021;127:105052.
389. Pfuhrer S, van Benenthem J, Curren R, et al. Use of *in vitro* 3D tissue models in genotoxicity testing: Strategic fit, validation status and way forward. Report of the working group from the 7<sup>th</sup> International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2020;850–851:503135.
390. Maxon TE, Li H, Lee MY, et al. Application of physiologically based kinetic (PBK) modelling in the next generation risk assessment of dermally applied consumer products. *Toxicol Vitro*. 2020;63:104746.
391. OECD. Case study on grouping and read-across for nanomaterials—genotoxicity of nano-TiO<sub>2</sub>. Series on Testing & Assessment No. 292. Published September 21, 2018. Accessed August 25, 2022. [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2018\)28&docLanguage=En](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2018)28&docLanguage=En).
392. OECD. Case study on the use of integrated approaches for testing and assessment for *in vitro* mutagenicity of 3,3' dimethoxybenzidine (DMOB) based direct dyes. Series on Testing & Assessment No. 251. Published September 12, 2016. Accessed August 25, 2022. [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2016\)49&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2016)49&doclanguage=en).
393. OECD. Report on considerations from case study on integrated approaches for testing and assessment (IATA). Series on Testing & Assessment No. 350. Published October 27, 2021. Accessed August 25, 2022. [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/cbc/mono\(2021\)36&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/cbc/mono(2021)36&doclanguage=en).

394. Gottmann E, Kramer S, Pfahringer B, Helma C. Data quality in predictive toxicology: Reproducibility of rodent carcinogenicity experiments. *Environ Health Perspect*. 2001;109(5):509-514.
395. Boobis AR, Cohen SM, Dellarcio VL, et al. Classification schemes for carcinogenicity based on hazard-identification have become outmoded and serve neither science nor society. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016;82:158-166.
396. Cohen SM, Klauing J, Meek ME, et al. Evaluating the human relevance of chemically induced animal tumors. *Toxicol Sci*. 2004;78(2):181-186.
397. Gori GB. Regulatory forum opinion piece: Long-term animal bioassays: Is the end near? *Toxicol Pathol*. 2013;41(5):805-807.
398. Osimitz TG, Draege W, Boobis AR, Lake BG. Evaluation of the utility of the lifetime mouse bioassay in the identification of cancer hazards for humans. *Food Chem Toxicol*. 2013;60:550-562.
399. Bourcier T, McGovern T, Stavitskaya L, Kruhlik N, Jacobson-Kram D. Improving prediction of carcinogenicity to reduce, refine, and replace the use of experimental animals. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015;54(2):163-169.
400. Cohen SM. The relevance of experimental carcinogenicity studies to human safety. *Curr Opin Toxicol*. 2017;3:6-11.
401. Billington R, Lewis RW, Mehta JM, Dewhurst I. The mouse carcinogenicity study is no longer a scientifically justifiable core data requirement for the safety assessment of pesticides. *Crit Rev Toxicol*. 2010;40(1):35-49.
402. Sistare FD, Morton D, Alden C, et al. An analysis of pharmaceutical experience with decades of rat carcinogenicity testing: Support for a proposal to modify current regulatory guidelines. *Toxicol Pathol*. 2011;39(4):716-744.
403. ICH. The ICHS1 regulatory testing paradigm of carcinogenicity in rats: Status report. Published March 2, 2016. Accessed August 25, 2022. [https://database.ich.org/sites/default/files/S1t28R1t29EWG\\_StatusReport\\_Mar2016.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/S1t28R1t29EWG_StatusReport_Mar2016.pdf).
404. ICH. The ICHS1 regulatory testing paradigm of carcinogenicity in rats: Status report 2019. Accessed August 25, 2022. [https://database.ich.org/sites/default/files/S1t28R1t29EWG\\_StatusReport\\_2019\\_0802.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/S1t28R1t29EWG_StatusReport_2019_0802.pdf).
405. ICH. Addendum to the guideline on testing for carcinogenicity of pharmaceuticals S1B(R1). Draft version. Endorsed on 10 May 2021. Accessed August 25, 2022. [https://database.ich.org/sites/default/files/ICH\\_S1BR1\\_Step2\\_DraftGuideline\\_2021\\_0510.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_S1BR1_Step2_DraftGuideline_2021_0510.pdf).
406. Hilton GM, Adcock C, Akerman G, et al. Rethinking chronic toxicity and carcinogenicity assessment for agrochemicals project (ReCAAP): A reporting framework to support a weight of evidence safety assessment without long-term rodent bioassays. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2022;131:105160.
407. JRC, Institute for Health and Consumer Protection. EURL ECVAM recommendation on the cell transformation assay based on the Bhas 42 cell line. Publications Office of the European Union; 2013. Accessed August 25, 2022. <http://dx.doi.org/10.2788/42908>.
408. Stokes W, Jacobs A. Bhas 42 cell transformation assay validation study report. OECD. Published July 30, 2012. Accessed August 25, 2022. [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/Text\\_Bhas\\_Validation\\_Study\\_Report.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/Text_Bhas_Validation_Study_Report.pdf).
409. Sakai A, Sasaki K, Hayashi K, et al. An international validation study of a Bhas 42 cell transformation assay for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat Res*. 2011;725(1-2):57-77.
410. Benigni R, Bossa C. Alternative strategies for carcinogenicity assessment: An efficient and simplified approach based on *in vitro* mutagenicity and cell transformation assays. *Mutagenesis*. 2011;26(3):455-460.
411. OECD. Guidance document on the *in vitro* Bhas 42 cell transformation assay. Series on Testing & Assessment No. 231. Published January 8, 2016. Accessed August 25, 2022. [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/ENV\\_JM\\_MONO\(2016\)1.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/ENV_JM_MONO(2016)1.pdf).
412. OECD. The OECD QSAR toolbox. 2020. Accessed August 25, 2022. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/oecd-qsar-toolbox.htm>.
413. EPA. OncoLogic™—an expert system to evaluate the carcinogenic potential of chemicals. Updated February 16, 2022. Accessed August 25, 2022. <https://www.epa.gov/tsc-screening-tools/oncologicm-computer-system-evaluate-carcinogenic-potential-chemicals>.
414. Jacobs MN, Colacci A, Corvi R, et al. Chemical carcinogen safety testing: OECD expert group international consensus on the development of an integrated approach for the testing and assessment of chemical non-genotoxic carcinogens. *Arch Toxicol*. 2020;94:2899-2923.
415. Felter SP, Bhat VS, Botham PA, et al. Assessing chemical carcinogenicity: Hazard identification, classification, and risk assessment. Insight from a Toxicology Forum state-of-the-science workshop. *Crit Rev Toxicol*. 2022;51(8):653-694.
416. Luijten M, Corvi R, Mehta J, et al. A comprehensive view on mechanistic approaches for cancer risk assessment of non-genotoxic agrochemicals. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2020;118:104789.
417. Stalford SA, Cayley AN, de Oliveira AAF. Employing an adverse outcome pathway framework for weight-of-evidence assessment with application to the ICH S1B guidance addendum. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2021;127:105071.
418. Pharmacy Times. Drug-induced photosensitivity: Focus on antibiotics. *Pharmacy Times*. Published August 24, 2016. Accessed August 25, 2022. <https://www.pharmacytimes.com/view/drug-induced-photosensitivity-focus-on-antibiotics>.
419. European Medicines Agency (EMA). ICH Guidance S10 on photosafety evaluation of pharmaceuticals. Published August 25, 2015. Accessed August 25, 2022. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ich-guideline-s10-photosafety-evaluation-pharmaceuticals-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ich-guideline-s10-photosafety-evaluation-pharmaceuticals-step-5_en.pdf).
420. OECD. Test No. 498: *In vitro* phototoxicity: Reconstructed human epidermis phototoxicity test method. Published June 14, 2021. Accessed August 25, 2022. <https://doi.org/10.1787/7b2f9ea0-en>.
421. 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 2018.
422. Daneshian M, Akbarsha MA, Blaauboer B, et al. A framework program for the teaching of alternative methods (replacement, reduction, refinement) to animal experimentation. *ALTEX*. 2011;28(4):341-352.
423. Hartung T, Borel A, Schmitz G. Detecting the broad spectrum of pyrogens with the human whole-blood monocyte activation test. *Bioprocess Int*. 2016;14(3):38-56.
424. Anderson RL, Watson WH, Chobot CC. Sublethal behavioral and physiological effects of the biomedical bleeding process on the American horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Biol Bull*. 2013;225(3):137-151.
425. Piehler M, Roeder R, Blessing S, Reich J. Comparison of LAL and rFC assays—participation in a proficiency test program between 2014 and 2019. *Microorganisms*. 2020;8(3):418.
426. EDQM. Monocyte-activation test. *European Pharmacopoeia* 6.7, Chapter 2.6.30. Strasbourg, France: Council of Europe; 2010.
427. Fennrich S, Hennig U, Taliashvili L, Schlensak C, Wendel HP, Stappelpkamp S. More than 70 years of pyrogen detection: Current state and future perspectives. *Altern Lab Anim*. 2016;44(3):239-253.
428. Hasiwa N, Daneshian M, Bruegger P, et al. Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test. *ALTEX*. 2013;30(2):169-208.
429. FDA. Guidance for industry: Pyrogen and endotoxins testing: Questions and answers. Published June 2012. Accessed August 25, 2022. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM310098.pdf>.
430. Brown J, Clippinger AJ, Fritz Briglia, et al. Using the monocyte activation test as a stand-alone release test for medical devices. *ALTEX*. 2021;38(1):151-156.
431. EDQM. Monocyte-activation test. *Pharmeuropa*. 2016;27(4):15-26.
432. EDQM. European Pharmacopoeia Commission adopts revised general chapter on Monocyte-activation test to facilitate reduction in testing on laboratory animals. June 23, 2016.
433. EMA Committee for Medicinal Products for Veterinary Use. Reflection paper providing an overview of the current regulatory testing requirements for veterinary medicinal products and opportunities for implementation of the 3Rs. 2016. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2016/04/WC500205609.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/04/WC500205609.pdf).
434. EDQM. *European Pharmacopoeia* to put an end to the rabbit pyrogen test. Published June 28, 2021. Accessed August 25, 2022. <https://www.edqm.eu/en/news/european-pharmacopoeia-put-end-rabbit-pyrogen-test>.
435. Indian Pharmacopoeia Commission. Monocyte activation test. *Indian Pharmacopoeia*. 8<sup>th</sup> ed. General Chapter Monograph 2.2.25.
436. Ravidia C, Hartung T. Re-evaluation of animal numbers and costs for *in vivo* tests to accomplish REACH legislation requirements for chemicals—a report by the transatlantic think tank for toxicology (t4). *ALTEX*. 2009;26(3):187-208.
437. Ravidia C, Longo F, Rabbit RR. How are reproductive toxicity and developmental toxicity addressed in REACH dossiers? *ALTEX*. 2011;28(4):273-294.
438. Rolaki A, Nepelska M, Bremer S, Graepel R, Price A, Worth A. Reproductive toxicity—effects on fertility and developmental toxicity. In: Worth A, Barros J, Bremer S, et al, eds. *JRC Science and Policy Reports: Alternative Methods for Regulatory Toxicology: A State-of-the-Art Review*. 2014. <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC91361>.
439. AOP Wiki. Aromatase (Cyp19a1) reduction leading to impaired fertility in adult female. Updated June 4, 2021. Accessed August 25, 2022. <https://aopwiki.org/aops/7>.
440. ReProTect. Development of a novel approach in hazard and risk assessment or reproductive toxicity by a combination and application of *in vitro*, tissue and sensor technologies. Cordis. Updated December 15, 2010. Accessed August 25, 2022. [https://cordis.europa.eu/project/rcn/75291\\_en.html](https://cordis.europa.eu/project/rcn/75291_en.html).
441. van der Burg B, Wedebe EB, Dietrich DR, et al. The ChemScreen project to design a pragmatic alternative approach to predict reproductive toxicity of chemicals. *Reprod Toxicol*. 2015;55:114-123.
442. EPA. Virtual tissue modeling: Types of virtual tissue models. Updated August 3, 2022. Accessed August 25, 2022. <https://www.epa.gov/chemical-research/virtual-tissue-modeling-0>.
443. Sachana M, Shafer TJ, Terron A. Toward a better testing paradigm for developmental neurotoxicity: OECD efforts and regulatory considerations. *Biology (Basel)*. 2021;10(2):86.
444. Health Canada. Science Approach Document—Bioactivity Exposure Ratio: Application in Priority Setting and Risk Assessment. Published March 2021. Accessed January 28, 2022. <https://www.canada.ca/en/environment-climate-change/services/evaluating-existing-substances/science-approach-document-bioactivity-exposure-ratio-application-priority-setting-risk-assessment.html>.
445. Rooney JP, Choksi NY, Ceger P, et al. Analysis of variability in the rabbit skin irritation assay. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2021;122:104920.
446. Robinson MK, Cohen C, de Fraissinette AB, Ponc M, Whittle E, Fentem JH. Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(5):573-592.
447. OECD. New guidance document on an integrated approach on testing and assessment (IATA) for skin corrosion and irritation. Series on Testing & Assessment No. 203. Published July 11, 2014. Accessed January 25, 2022. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2014\)19&doLanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2014)19&doLanguage=en).
448. ISO. ISO 10993-23:2021 Biological Evaluation of Medical Devices—Part 23: Tests for Irritation. 2021. <https://www.iso.org/standard/74151.html>.
449. Hoffmann S, Kleinstreuer N, Alépée N, et al. Non-animal methods to predict skin sensitization (I). The Cosmetics Europe database. *Crit Rev Toxicol*. 2018;48(5):344-358.
450. Kleinstreuer NC, Karmous AL, Mansouri K, Allen DG, Fitzpatrick JM, Patlewicz G. Predictive models for acute oral systemic toxicity: A workshop to bridge the gap from research to regulation. *Comput Toxicol*. 2018;8:21-24.
451. Karmous AL, Mansouri K, To KT, et al. Evaluation of variability across rat acute oral systemic toxicity studies. *Toxicol Sci*. 2022;188(1):34-47.

452. EPA OPP. Guidance for waiving or bridging of mammalian acute toxicity tests for pesticides and pesticide products (acute oral, acute dermal, acute inhalation, primary eye, primary dermal, and dermal sensitization). Published March 1, 2012. Accessed August 25, 2022. <https://www.epa.gov/sites/default/files/documents/acute-data-waiver-guidance.pdf>.
453. Pham LL, Watford SM, Pradeep P, et al. Variability in *in vivo* studies: Defining the upper limit of performance for predictions of systemic effect levels. *Comput Toxicol*. 2020;15:100126.
454. Guth S, Roth A, Engeli B, et al. Comparison of points of departure between subchronic and chronic toxicity studies on food additives, food contaminants and natural food constituents. *Food Chem Toxicol*. 2020;146:111784.
455. EFSA Scientific Committee. Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. *EFSA J*. 2012;10(3):1-32.
456. NICEATM. Predictive Models for Acute Oral Systemic Toxicity. 2018. [https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/test-method-evaluations/acute-systemic-tox/models/index.html?utm\\_source=direct&utm\\_medium=prod&utm\\_campaign=ntpgolinks&utm\\_term=tax-models](https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/test-method-evaluations/acute-systemic-tox/models/index.html?utm_source=direct&utm_medium=prod&utm_campaign=ntpgolinks&utm_term=tax-models).
457. Mansouri K, Grulke CM, Judson RS, Williams AJ. OPERA models for predicting physicochemical properties and environmental fate endpoints. *J Cheminform*. 2018;10(1):10.
458. National Toxicology Program. Integrated Chemical Environment (ICE). Accessed February 7, 2022. <https://ice.ntp.niehs.nih.gov>.
459. Prieto P, Burton J, Graepel R, Price A, Whelan M, Worth A. EURL ECVAM Strategy to Replace, Reduce and Refine the Use of Animals in the Assessment of Acute Mammalian Systemic Toxicity. Publications Office of the European Union; 2014.
460. Hamm J, Sullivan K, Clippinger AJ, et al. Alternative approaches for identifying acute systemic toxicity: Moving from research to regulatory testing. *Toxicol In Vitro*. 2017;41:245-259.
461. Prieto P, Kinsner-Ovaskainen A, Stanzel S, et al. The value of selected *in vitro* and *in silico* methods to predict acute oral toxicity in a regulatory context: Results from the European Project ACuteTox. *Toxicol In Vitro*. 2013;27(4):1357-1376.
462. Prieto P, Graepel R, Gerloff K, et al. Investigating cell type specific mechanisms contributing to acute oral toxicity. *ALTEX*. 2019;36(1):39-64.
463. Commission Regulation (EU) 2016/863 of 31 May 2016 amending Annexes VII and VIII to Regulation (EC) No. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards skin corrosion/irritation, serious eye damage/eye irritation and acute toxicity. <http://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2016/863/oj>.
464. EPA OPP. Guidance for waiving acute dermal toxicity tests for pesticide formulations and supporting retrospective analysis. Published November 9, 2016. Accessed August 25, 2022. [https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-11/documents/acute-dermal-toxicity-pesticide-formulations\\_0.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-11/documents/acute-dermal-toxicity-pesticide-formulations_0.pdf).
465. EPA OPP. Guidance for waiving acute dermal toxicity tests for pesticide technical chemicals and supporting retrospective analysis. Published December 31, 2020. Accessed August 25, 2022. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2021-01/documents/guidance-for-waiving-acute-dermal-toxicity.pdf>.
466. EPA. Revocation of Significant New Use Rule for a Certain Chemical Substance (P-16-581), 85 FR 52274. August 25, 2020 (to be codified at 40 CFR 721).
467. EPA. Chloroethanol: Revised Human Health Draft Risk Assessment for Registration Review. Published May 21, 2021. Accessed August 25, 2022. <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2011-0840-0080>.
468. Clippinger AJ, Allen D, Behrsing H, et al. Nonanimal approaches to assessing the toxicity of inhaled substances: Current progress and future promise. *Appl In Vitro Toxicol*. 2018;4(2):82-88.
469. Clippinger AJ, Allen D, Jarabek AM, et al. Alternative approaches for acute inhalation toxicity testing to address global regulatory and non-regulatory data requirements: An international workshop report. *Toxicol In Vitro*. 2018;48:53-70.
470. Clippinger AJ, Allen D, Behrsing H, et al. Pathway-based predictive approaches for non-animal assessment of acute inhalation toxicity. *Toxicol In Vitro*. 2018;52:131-145.
471. Borosova H, Maione AG, Septiadi D, et al. Use of EpilAlveolar Lung model to predict fibrotic potential of multiwalled carbon nanotubes. *ACS Nano*. 2020;14(4):3941-3956.
472. SCHEER. Opinion on additives used in tobacco products (Opinion 2). Tobacco additives II. European Union. [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific\\_committees/scheer/docs/scheer\\_o\\_001.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/scheer/docs/scheer_o_001.pdf).
473. Service public de Wallonie. Le bien-être animal en Wallonie. Article D.66. 7. Accessed December 22, 2021. <http://bienetreanimal.wallonie.be/home/legislation/legislationliste-de-legislations-bea/bienetre067-W.html>.
474. Parve V. National Regulations on Ethics and Research in Estonia. European Commission; 2004. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/4510a49f-3151-4e1b-8dad-91c0672620b5>.
475. German Federal Ministry of Justice. German Animal Welfare Act. § 7 | 4 TierSchG. Accessed February 7, 2022. <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html>.
476. Glaso J. Slovak Republic—Regulations on Ethics and Research. European Commission; 2004. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/bccce559-870b-4591-9c7b-c14b62ddbda7>.
477. U.K. Home Office. Guidance on the operation of the Animals (Scientific Procedures) Act 1986. Section 5.23.
478. Moore MM, Clements J, Desai P, et al. Workshop series to identify, discuss, and develop recommendations for the optimal generation and use of *in vitro* assay data for tobacco product evaluation: Phase 1 genotoxicity assays. *Appl In Vitro Toxicol*. 2020;6(2):49-63.
479. Manuppello JR, Sullivan KM. Toxicity assessment of tobacco products *in vitro*. *Altern Lab Anim*. 2015;43(1):39-67.
480. Groff K, Brown J, Clippinger AJ. Modern affinity reagents: Recombinant antibodies and aptamers. *Biotechnol Adv*. 2015;33(8):1787-1798.
481. Research Councils U.K. National Centre for Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research. Animal welfare standards expected of suppliers of antibodies to Research Council establishments. NC3Rs. Accessed 25 January 2022. <https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Funding/Antibody%20supplier%20policy%20-%20will%20be%20updated.pdf>.
482. Bradbury A, Plückthun A. Reproducibility. Standardize antibodies used in research. *Nature*. 2015;518(7537):27-29.
483. Baker M. Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. *Nature*. 2015;521(7552):274-276.
484. Bradbury ARM, Trinklein ND, Thie H, et al. When monoclonal antibodies are not monospecific: Hybridomas frequently express additional functional variable regions. *MAbs*. 2018;10(4):539-546.
485. Gray AC, Sidhu SS, Chandrasekera PC, Hendriksen CFM, Borrebaeck CAK. Animal-friendly affinity reagents: Replacing the needless in the haystack. *Trends Biotechnol*. 2016;34(12):960-969.
486. Groff K, Allen D, Casey W, Clippinger A. Increasing the use of animal-free recombinant antibodies. *ALTEX*. 2020;37(2):309-311.
487. Viegas Barroso JF, Halder ME, Whelan M. EURL ECVAM Recommendation on Non-Animal-Derived Antibodies. EUR 30185 EN. Publications Office of the European Union; 2020. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/3f74f5ea-94c1-11ea-aac4-01aa75ed71a1/language-en>.
488. Dozier S, Brown J, Currie A. Bridging the gap between validation and implementation of non-animal veterinary vaccine potency testing methods. *Animals*. 2011;1(4):414-432.
489. Draayer H. Overview of currently approved veterinary vaccine potency testing methods and methods in development that do not require animal use. *Procedia Vaccinol*. 2011;5:171-174.
490. Bristow A, Schulster D, Jeffcoate S. Report of an international workshop on assays, standardization and labelling requirements of somatropin. *Pharmeuropa*. 1994;6:60-67.
491. EQDM. Harmonisation with VICH Guidelines 41 and 44 and deletion of the TABST, adopted at the 142<sup>nd</sup> session of the European Pharmacopoeia Commission. *Pharmeuropa*. 2012;57:1-5.
492. Winsnes R, Sesardic D, Daas A, Terao E, Behr-Gross ME. Collaborative study on a guinea pig serological method for the assay of acellular pertussis vaccines. *Pharmeu Bio Sci Notes*. 2009;1:27-40.
493. FDA. FDA authorizes REGEN-COV monoclonal antibody therapy for post-exposure prophylaxis (prevention) for COVID-19. Published August 10, 2021. Accessed February 2, 2022. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-authorizes-regen-cov-mono-clonal-antibody-therapy-post-exposure-prophylaxis-prevention-covid-19>.
494. FDA. FDA authorizes bamlanivimab and etesevimab monoclonal antibody therapy for post-exposure prophylaxis (prevention) for COVID-19. Published September 16, 2021. Accessed February 2, 2022. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-authorizes-bamlanivimab-and-etesevimab-mono-clonal-antibody-therapy-post-exposure-prophylaxis>.
495. Alfaleh MA, Alsaob HO, Mahmoud AB, et al. Phage display derived monoclonal antibodies: From bench to bedside. *Front Immunol*. 2020;11(1986):1-37.
496. Wenzel EV, Bosnak M, Tierney R, et al. Human antibodies neutralizing diphtheria toxin *in vitro* and *in vivo*. *Sci Rep*. 2020;10(571):1-21.
497. Stokes W, Srinivas G, McFarland R, et al. Report on the international workshop on alternative methods for Leptospira vaccine potency testing: State of the science and the way forward. *Biologicals*. 2013;41(5):279-294.
498. Stokes W, McFarland R, Kulpa-Eddy J, et al. Report on the international workshop on alternative methods for human and veterinary rabies vaccine testing: State of the science and planning the way forward. *Biologicals*. 2012;40(5):369-381.
499. Veterinary Medicines Directorate. Animal usage in quality control tests for the batch release of Immunological Veterinary Medicinal Products (IVMPs) via the U.K. from 2007 to 2012. London: VMD; 2016. Published 2016. Accessed August 25, 2022. [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/438916/\\_518852-v8-Animal\\_Usage\\_for\\_QC\\_Batch\\_Release\\_of\\_IVMPs\\_2007-2012.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/438916/_518852-v8-Animal_Usage_for_QC_Batch_Release_of_IVMPs_2007-2012.pdf).
500. Jungbäck C, ed. *Potency Testing for Veterinary Vaccines for Animals: The Way From In Vivo to In Vitro*. Langen, Germany: International Alliance for Biological Standardization; 2012. <http://www.eppsjiocruz.br/upload/d/silviovalle/VaccineforAnimals.pdf>.
501. van den Biggelaar RHGA, Hoefnagel MHN, Vandebriel RJ, et al. Overcoming scientific barriers in the transition from *in vivo* to non-animal batch testing of human and veterinary vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2021;20(10):1221-1233.
502. Akkermans A, Chapsal JM, Caccia EM, et al. Animal testing for vaccines. Implementing replacement, reduction and refinement: Challenges and priorities. *Biologicals*. 2020;68:92-107.
503. De Mattia F, Chapsal JM, Descamps J, et al. The consistency approach for quality control of vaccines—a strategy to improve quality control and implement 3Rs. *Biologicals*. 2011;39(1):59-65.
504. De Mattia F, Hendriksen C, Buchheit KH, et al. The vaccines consistency approach project: An EPAA initiative. *Pharmeu Bio Sci Notes*. 2015;2015:30-56.
505. Jachems CEA, Van der Valk JBF, Stafleu FR, et al. The use of fetal bovine serum: Ethical or scientific problem? *ATLA*. 2002;30(2):219-227.
506. van der Valk J, Bieback K, Buta C, et al. Fetal bovine serum (FBS): Past—present—future. *ALTEX*. 2018;35(1):99-118.
507. Brindley DA, Davie NL, Culme-Seymour EJ, Mason C, Smith DW, Rowley JA. Peak serum: Implications of serum supply for cell therapy manufacturing. *Regen Med*. 2012;7(1):7-13.
508. van der Valk J, Mellor D, Brands R, et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol In Vitro*. 2004;18(1):1-12.
509. van der Valk J, Brunner D, De Smet K, et al. Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicol In Vitro*. 2010;24(4):1053-1063.
510. Chary A, Groff K, Stucki AQ, et al. Maximizing the relevance and reproducibility of A549 cell culture using FBS-free media. *Toxicol In Vitro*. 2022;83:105423.



511. Begley CG, Ellis LM. Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. *Nature*. 2012;483(7391):531-533.
512. Organización Panamericana de la Salud. Cáncer. Accessed December 14, 2023. <https://www.paho.org/es/temas/cancer>.

“ [S]i la investigación en animales sigue siendo incapaz de predecir razonablemente lo que puede esperarse en los seres humanos, que el público siga respaldando y financiando la investigación preclínica en animales parece equivocado”.<sup>4</sup>





501 Front St.  
Norfolk, VA 23510  
757-622-PETA  
757-622-0457 (fax)  
PETA.org