

INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

**DE LOS HOMBRES, LOS ANIMALES,
LOS ENSAYOS Y LAS LEYES:
REFLEXIONES**

DISCURSO LEÍDO EN LA SOLEMNE SESIÓN INAUGURAL
DEL CURSO ACADÉMICO CELEBRADA EL 13 DE ENERO DE 2022
POR EL

EXCMO. SR. DON FIDEL ORTEGA ORTIZ DE APODACA
ACADÉMICO DE NÚMERO



Madrid, 2022

ISBN: 978-84-122587-8-3
Depósito Legal:
M-35623-2021

Excmo. Sr. Presidente
Excmos. e Ilmos. Sras. y Sres. Académicos
Autoridades
Señoras y Señores:

Quiero en primer lugar agradecer a la Junta de Gobierno mi designación para dar lectura a este primer discurso del año en su solemne acto de inauguración del nuevo curso académico, y especialmente al Sr. Presidente de la sección 1ª de Física y Química, el Excmo. Sr. Don José Carlos Menéndez Ramos, por elevar la propuesta para su consideración.

He escogido un tema sin la pretensión de profundizar en su contenido científico, pero que desde la ciencia nos puede invitar a la reflexión.

Los últimos meses del recientemente finalizado año 2021, se han caracterizado por una llamada al activismo militante contra el cambio climático, y en especial en aquellas alteraciones en el que factor humano tiene una relevancia tangible. En la cumbre climática de Glasgow celebrada el pasado mes de noviembre, hemos podido presenciar una especie de lucha de unos contra otros echándose la culpa de los desastres venideros en el planeta, como consecuencia de la irresponsabilidad de los gobernantes en la toma de decisiones neutralizadoras de los efectos letales de las actividades contaminantes.

Incluso hemos podido ver en un video en un formato de realidad virtual, cuya visualización se hizo viral durante la cumbre del clima, la bronca monumental de un dinosaurio en la sede de la ONU, anunciando la inevitable extinción de la especie humana sino se tomaban medidas urgentes.

A modo de fábula, sería interesante poder oír a otras especies de animales extinguidas y valorar su opinión sobre qué proporción de los sucesivos cambios climáticos acaecidos en el planeta han precipitado su extinción y en qué medida el hombre ha podido contribuir a las mismas. Y por qué no, también, poder conocer la opinión de los animales empleados en los ensayos de experimentación animal, como seres sintientes. Aunque, hasta cierto punto, ya nos hablan a través de la paleogenética.

Como ocurre con una reacción química de óxido reducción entre dos especies, en la que siempre hay una de las dos que gana electrones y la otra los pierde, desde su aparición en la tierra la interacción entre el hombre y los animales ha seguido una estequiometría compleja en la que como producto de la reacción los animales siempre han salido perdiendo.

En su libro best seller *Sapiens de animales a dioses*, el profesor de historia de la universidad de Jerusalén, Yuval Noah Harari, advierte “que poseemos la dudosa distinción de ser la especie más mortífera en los anales de la biología”. Lo argumenta relacionando la extinción en el continente australiano de numerosas especies de animales grandes, como el diprodonte gigante, que resistió al menos 10 glaciaciones durante 1 millón de años, pero no sobrevivió a la llegada del ser humano al continente, como le ocurrió, también, al 90 por ciento de la megafauna australiana, a los mamuts en la isla de Wrangel, o más recientemente, hace sólo 800 años en Nueva Zelanda, en donde un par de siglos después de la llegada del hombre a las islas se había extinguido la mayoría de la megafauna local y el 60 por ciento de las aves, escribe Harari. Indica también, que la primera oleada de extinción que acompañó a la expansión de los cazadores-recolectores, fue seguida por la segunda oleada que acompañó la expansión de los agricultores, y nos proporciona una importante perspectiva sobre la tercera oleada de extinción, que la actividad industrial está causando en la actualidad. Y escribe también “No crea el lector a los ecologistas sentimentales que afirman que nuestros antepasados vivían en armonía con la naturaleza. Mucho antes de la revolución industrial, Homo sapiens ostentaba el record entre todos los organismos por provocar la extinción del mayor número de especies de plantas y animales”.

¿Y en qué medida pueden influir en este extremo las actividades relacionadas con el uso de medicamentos?

En la década de los 80, tres especies de buitres eran endémicas en los países del Asia meridional y constituían la reserva más abundante de grandes aves rapaces en todo el mundo. Sin embargo, en los años 90 estas especies se enfrentaron prácticamente a su extinción en países como la India, Paquistán o el Nepal, como consecuencia directa del efecto letal que en estas aves produjo el medicamento antiinflamatorio diclofenaco, ampliamente utilizado en el tratamiento veterinario del ganado, y cuyo residuo se

encontraba en los cadáveres de los animales de los que, a su vez, se alimentaban estos buitres. El medicamento desencadenaba en las aves un proceso de fallo renal y muerte. Se observó que una contaminación del 0,3 al 0,7% del total de los cadáveres devorados bastaba para que una de las especies de estos buitres se redujera un 50% anual. En esta década, la población del buitre dorsiblanco bengalí disminuyó en un 99%. Sólo en la India, su registro pasó de 10 millones de ejemplares a sólo 6.000. El problema no se identificó hasta el año 2004, cuando unos científicos paquistaníes descubrieron que algunas especies de buitres no podían metabolizar el medicamento generando cristales en sus riñones.

El impacto que este tipo de sucesos tiene en el medioambiente es determinante. Los buitres proporcionan un servicio muy importante en la conservación de los ecosistemas de su entorno, ya que ayudan al control de enfermedades, plagas y al reciclaje de nutrientes. Si consideramos que una partida de buitres puede reducir a huesos el cadáver de una res en menos de una hora, se evitará así su descomposición y las consecuencias de la misma, incluyendo su contribución a la liberación de gases de efecto invernadero.

Sólo en España, se estima que los buitres existentes en su geografía eliminan más de 8.000 toneladas de cadáveres al año, proporcionando un ahorro económico que se aproxima a los 2 millones de euros (Margalida et al., 2014).

Esto es sólo un ejemplo de la contribución de los medicamentos a la contaminación ambiental y de las consecuencias que ésta puede producir en los animales que la padecen.

Otro ejemplo bien conocido corresponde a los disruptores o activadores endocrinos. Estas sustancias se encuentran en numerosos materiales fabricados por el hombre entre los que se encuentran ciertos medicamentos o sus metabolitos y se caracterizan porque afectan al sistema endocrino interfiriendo en el desarrollo normal, en el sistema inmunitario y en la reproducción, produciendo efectos nocivos a nivel neurológico, que pueden afectar al crecimiento general retrasando el neurodesarrollo en niños (Monneret, 2017), y pueden, también, modificar la actividad transcripcional de los genes relacionados con hormonas y receptores. Además, los efectos potenciales de estos compuestos pueden manifestarse a largo plazo después de la exposición a los mismos e incluso afectar a la descendencia

con un efecto epigenético transgeneracional (Anway et al., 2005). Medicamentos como el dietilestilbestrol (DES) utilizado como el primer estrógeno no esteroide de origen sintético, se prescribió durante 30 años (1940-1971) a mujeres embarazadas con la idea equivocada de que evitaba complicaciones en el embarazo y partos prematuros. En el año 1971 se descubrió que producía tumores vaginales (Herbst et al., 1971). Estudios posteriores demostraron una relación potencial causal del uso del DES con una significativa variedad de efectos adversos del medicamento, como el aumento de riesgos de complicaciones reproductivas e infertilidad en las hijas de las mujeres tratadas, expuestas también al medicamento durante el embarazo, así como tendencias a la obesidad con un efecto obesógeno. Y en los hijos varones, expuestos también en la etapa prenatal, se ha observado un aumento del riesgo de padecer cáncer testicular, infertilidad y anomalías urogenitales en el desarrollo, tales como criptorquidia e hipospadias (Goodman et al., 2011).

El problema fundamental es que por lo general el efecto de los disruptores endocrinos sobre el organismo es acumulativo e irreversible y se puede transmitir de una generación a otra sin que se haya manifestado patológicamente.

Los disruptores endocrinos pueden imitar el comportamiento de las hormonas endógenas como estrógenos, andrógenos y hormonas tiroideas, bloqueando la interacción de las mismas con sus receptores naturales alterando su metabolismo, o favoreciendo la aparición de desórdenes del espectro autista, en el caso de las hormonas tiroideas. Sus efectos no sólo afectan al hombre sino también al conjunto de la vida terrestre.

Sirva también de ejemplo el curioso caso ocurrido en Costa Rica en el parque nacional de Palo Verde en el año 2017, donde después de analizarse los genitales de cerca de 500 cocodrilos, encontraron que la proporción de cocodrilos macho con respecto al número de hembras en los recién nacidos superaba en cuatro veces la proporción estadística normal del 50% teórico, registrando 4 machos por cada hembra. Paralelamente encontraron que los tejidos de los animales se encontraban contaminados con la hormona, 17α -metiltestosterona (MT), un esteroide sintético, que suele prescribirse para combatir la deficiencia de testosterona en varones y es también de consumo habitual en los gimnasios para aumentar la masa muscular. Ante la pregunta cómo pudo llegar el medicamento al parque natural, la respuesta es confusa, pero apunta a la contaminación provocada por el acuicultura

de peces en piscifactorías del pez tilapia en la zona y en las que utilizan la hormona anabolizante para rentabilizar la producción con peces machos de mayor tamaño, aunque también se barajó la posibilidad de que pudiera deberse a una contaminación en la red de desagües iniciada en núcleos urbanos (Leslie, 2017).

A veces también el comportamiento de estos disruptores endocrinos es caprichoso, por lo que puede pasar inadvertido a los controles pertinentes, como el caso de los denominados disruptores “zombie”. Compuestos androgénicos sintéticos como el acetato de trembolona poseen la característica de que sus productos de degradación pueden revertir su capacidad disruptora por la noche en ausencia de luz, transformándose en metabolitos activos, perdiéndose esa propiedad en presencia de la luz durante el día, en un ciclo fotoquímico. De ahí el apelativo tipo zombie (Stokstad, 2013).

Estos compuestos suponen un enorme riesgo ambiental ya que los animales, como el ganado tratado con este producto engordante apenas posee trazas del mismo después de su sacrificio para el consumo, pero sus metabolitos pueden llegar al medioambiente a través de los orines y el abono que los animales generan. Bastan concentraciones de 10 partes por trillón para reducir significativamente la fecundidad de peces y la relación de sexos en su población, cuando estos metabolitos acaban en ríos y lagos.

No sólo este tipo de medicamentos tiene efectos disruptores, sino que existe una amplia variedad de sustancias, bien de fuentes naturales, como la hormona genisteína de origen vegetal con efecto fitoestrogénico, o micotoxinas de origen fúngico como la Zearalenona, o productos derivados de la actividad antropogénica como el uso de pesticidas (DDT), dioxinas, plastificantes como, el bisphenol o los bifenilos policlorados (BPCs).

En cualquier caso, no cabe duda de que la contaminación procedente de sustancias químicas sintéticas en general constituye una amenaza creciente para la salud pública y el medio ambiente, que puesto en cifras, la principal causa de muerte relacionada con el trabajo es el cáncer vinculado con la exposición a sustancias químicas peligrosas, que cada año conlleva en la Unión Europea 120.000 cánceres profesionales como consecuencia de la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo, lo que supone aproximadamente 80.000 muertes al año. (<https://osha.europa.eu/en/themes/work-related-diseases/work-related-cancer>)

¿Cómo se evita que se produzcan este tipo de sucesos?

Lógicamente, además de una buena legislación medioambiental y de gestión de residuos, la comercialización de un nuevo medicamento debe afrontar este tema durante su etapa de investigación y desarrollo. De hecho, las directivas de la UE 2001/83/CE y 2009/9/CE por las que se establece el código comunitario sobre medicamentos para uso humano y veterinario respectivamente, establecen la necesidad de realizar una evaluación de riesgo ambiental para la comercialización de nuevos medicamentos, que deberá presentarse con el resto de la documentación necesaria para su estudio y aprobación por parte de las autoridades sanitarias. Por ejemplo, en el caso de los medicamentos de uso veterinario, en el Título II, parte 3 de la directiva, sobre estudios de seguridad, se establece explícitamente que se evaluará el riesgo medioambiental en busca de los posibles efectos dañinos del uso del medicamento veterinario y para determinar el riesgo de tales efectos, en la evaluación se identificará cualquier medida preventiva que pueda ser necesaria para reducir tal riesgo.

La evaluación se realizará normalmente en dos fases. La primera fase de la evaluación se realizará en todos los casos y los detalles de la evaluación se presentarán según las directrices establecidas. Se indicará la posible exposición del medio ambiente al medicamento y el riesgo asociado con tal exposición, teniendo especialmente en cuenta los puntos siguientes: las especies animales de destino y la utilización propuesta, el modo de administración y, en particular, el grado probable de incorporación directa del producto al ecosistema, la posibilidad de que el medicamento, sus principios activos o sus metabolitos pasen de los animales tratados al medio ambiente y su persistencia en las excretas, y la eliminación de medicamentos veterinarios no utilizados u otros residuos.

En la segunda fase se investigará de manera específica el destino y los efectos del medicamento en ecosistemas particulares, según las directrices establecidas. Se tendrá en cuenta la amplitud y duración de la exposición del medio ambiente al medicamento y la información disponible sobre las propiedades fisicoquímicas, farmacológicas o toxicológicas de las sustancias en cuestión que se haya obtenido durante la realización de las demás pruebas exigidas en virtud de la propia Directiva.

Los estudios de impacto medioambiental se desarrollarán conforme las directrices GL6 y GL38 de la VICH, en el caso de los medicamentos veterinarios y la directriz de la Agencia Europea de Medicamentos EMEA 4447/00, actualmente en revisión, para los medicamentos de uso humano.

Ambas directrices son coincidentes, si bien la correspondiente a los medicamentos veterinarios es más completa y compleja que su homóloga en los medicamentos de uso humano. Basta indicar que la primera contiene 77 páginas y la segunda sólo 12, si bien en la propuesta de revisión pasa a 48.

En la fase I, la estimación debe basarse únicamente en el principio activo, independientemente de su vía de administración, forma farmacéutica, metabolismo y excreción, calculándose su concentración esperable en el medio ambiente (PEC) y restringido al compartimento acuático. Esta se calculará a partir de la dosis máxima consumida por habitante, la proporción de la población tratada diariamente y la cantidad de agua residual generada por persona. Si la PEC del medicamento es inferior a 0,01 µg/L, se considera improbable que pueda haber riesgo medioambiental. Si fuera superior, existiría riesgo y se acometerá la fase II. No obstante, algunas sustancias (como medicamentos con actividad endocrina y antiparasitaria) deben entrar directamente en la fase II independientemente de su valor PEC, dado que pueden afectar a organismos en el medio ambiente a concentraciones < 0,01 µg/L.

En la fase II se realiza una valoración extensiva evaluando la relación entre la concentración esperable en el medio ambiente y la concentración más alta que no causa efectos negativos en los organismos más sensibles estudiados (PEC)/PNEC. Esta fase se divide en 2 niveles de evaluación A y B. Se evalúa el comportamiento ambiental y los efectos del medicamento y sus metabolitos de un modo más detallado que en la fase I, así como la determinación de la vida media de degradación del principio activo y sus metabolitos en el compartimento ambiental de interés. Los ensayos se realizarán conforme a los procedimientos dictados por la Comisión Europea, la OCDE y la ISO, y se llevarán a cabo conforme a las buenas prácticas de laboratorio (BPLs-GLPs) (Tabla 1).

TABLA 1
ESTUDIOS FÍSICOQUÍMICOS, DE EFECTO Y DESTINO EN EL MEDIOAMBIENTE RECOMENDADOS EN LA FASE II, NIVELES A Y B, DE ACUERDO CON LA DIRECTRIZ EMEA/4447/00, PARA LA EVALUACIÓN DE RIESGO AMBIENTAL EN LOS MEDICAMENTOS DE USO HUMANO.

TIPO DE ESTUDIO	PROCEDIMIENTO RECOMENDADO
Adsorption - Desorption Using a Batch Equilibrium Method	OECD 106/ OECD 121 /OPPTS 835.1110
Ready Biodegradability Test	OECD 301
Aerobic and Anaerobic Transformation in Aquatic Sediment Systems	OECD 308
Algae, Growth Inhibition Test	OECD 201
Daphnia sp. Reproduction Test	OECD 211
Fish, Early Life Stage Toxicity Test	OECD 210
Activated Sludge, Respiration Inhibition Test	OECD 209
Aerobic and anaerobic transformation in soil	OECD 307
Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test	OECD 216
Terrestrial Plants, Growth Test	OECD 208
Earthworm, Acute Toxicity Tests	OECD 207
Collembola, Reproduction Test	ISO 11267

Se considerarán todos los datos pertinentes necesarios, como, por ejemplo, las propiedades físicoquímicas, la fármaco-dinámica primaria y secundaria, la toxicología, el metabolismo, la excreción, la degradabilidad y la persistencia del medicamento y de los metabolitos correspondientes.

En cuanto a los animales de experimentación, veamos en cifras los últimos datos de su utilización en pruebas de investigación y en los ensayos analíticos en los países de la Unión Europea. De acuerdo con el último INFORME disponible del año 2021 DE LA COMISIÓN AL PARLAMENTO EUROPEO Y AL CONSEJO sobre las estadísticas relativas al uso de animales con fines científicos en los Es-

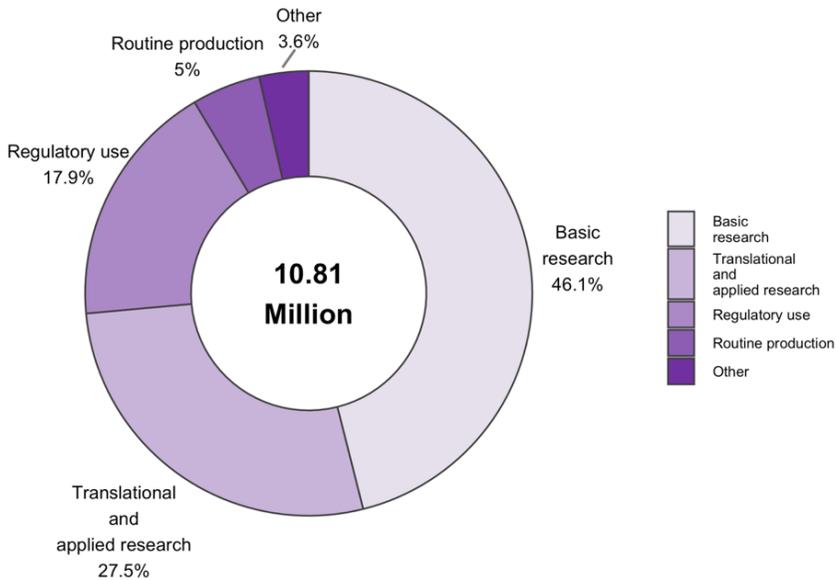


Figura 1. Uso de animales en investigación y en los ensayos analíticos en la Unión Europea. Imagen tomada del “Summary Report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union and Norway in 2018”.

tados miembros y Noruega en 2018, bajo la directiva 2010/63/EU, el número de animales empleados fue de 10,8 millones (Figura 1) y como en años anteriores, el objetivo principal de su utilización fue la investigación en un 74%, del que a su vez el 46% de los animales se utilizó en investigación básica y que comprende desde ensayos de etología y comportamiento animal, oncología, o estudios del sistema nervioso e inmunitario y el 28% en investigación traslacional y aplicada, incluyendo cáncer humano, diagnóstico de enfermedades o enfermedades infecciosas humanas. Otro 18% de los usos lo constituye la utilización reglamentaria de animales para cumplir exigencias legales, como los ensayos de potencia de los lotes de medicamentos, los estudios de toxicidad y otros ensayos de control de calidad, y un 5%, la producción rutinaria, como productos sanguíneos, o la obtención de anticuerpos monoclonales por el método de la ascitis del ratón. El 4% restante se utilizó en la enseñanza superior, la protección del medio ambiente natural, la preservación de especies y las investigaciones forenses (Figura 2).

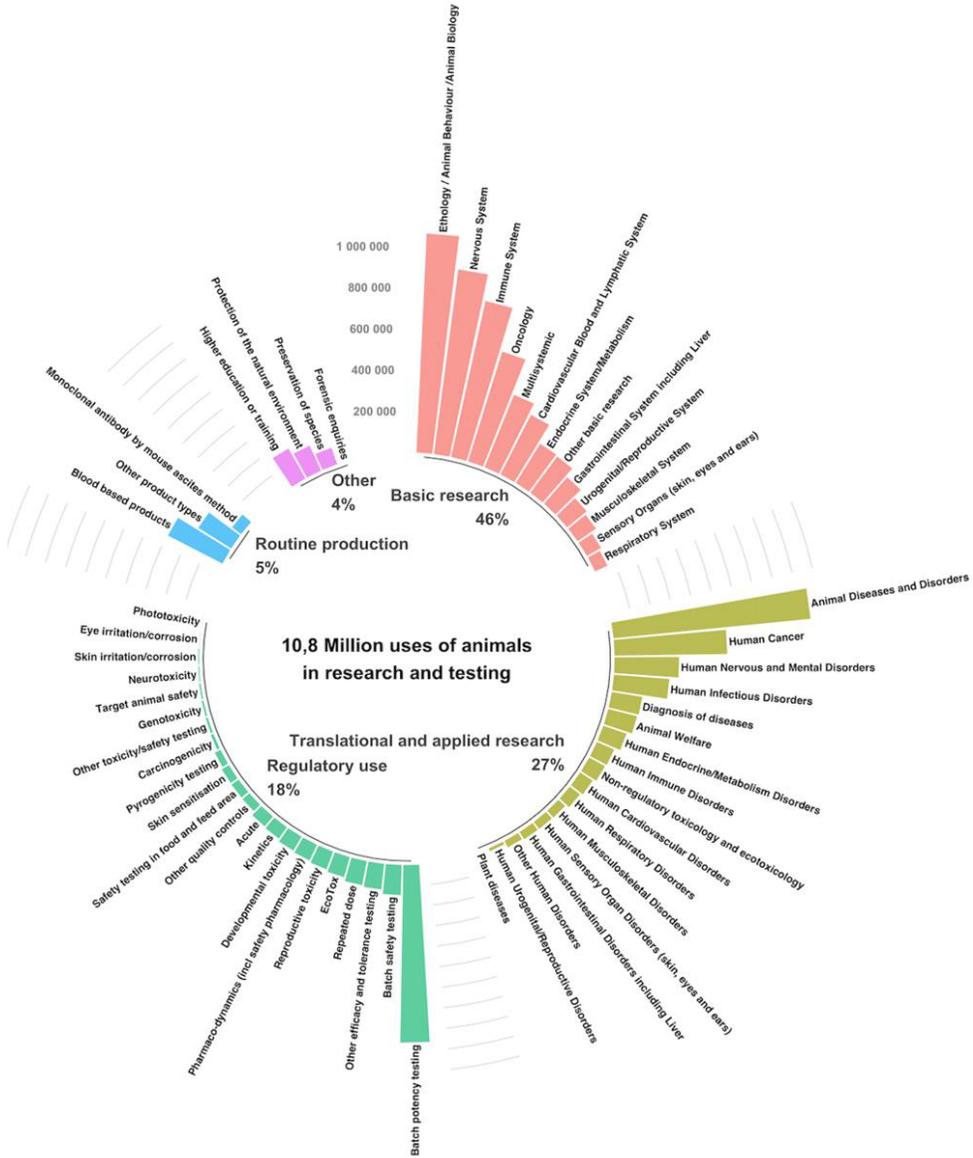


Figura 2. Uso de animales en investigación y en los ensayos analíticos en la Unión Europea. Imagen tomada del “Summary Report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union and Norway in 2018”.

En 2018, las principales especies de animales utilizados por primera vez (Tabla 2) con fines de investigación y ensayo fueron los ratones, los peces, las ratas y las aves, que en conjunto representaron el 93% del número total de animales, mientras que las especies de especial interés público (perros, gatos y primates no humanos) representaron sólo el 0,3%, si bien en términos absolutos superaron los 31.000 ejemplares. En la UE no se utilizan grandes simios con fines científicos, aunque a pesar de ello el uso de primates no humanos supero los 8.500.

TABLA 2.
NÚMERO DE ANIMALES UTILIZADOS POR PRIMERA VEZ, POR ESPECIES

	2015	2016	2017	2018
Ratones	5.711.612	5.989.413	5.707.471	5.505.169
Ratas	1.201.189	1.173.135	1.146.299	999.246
Cobayas	149.328	150.985	144.824	129.931
Hámsteres (sirios).	20.195	18.614	12.700	10.813
Hámsteres.enanos (chinos)	30	519	187	20
Jerbos.de.Mongolia	6.199	5.645	5.239	4.761
Otros.roedores	26.088	13.712	25.172	20.373
Conejos.	346.052	350.405	351.961	342.788
Gatos	1.975	1.951	1.879	1.554
Perros	14.501	15.691	13.688	17.711
Hurones	2.212	1.530	2.016	1.507
Otros.carnívoros	3.648	1.444	2.386	4.575
Caballos, burros y sus cruces	3.217	3.474	2.414	1.712
Cerdos	73.895	80.029	71.522	83.997
Caprinos	2.233	1.365	1.563	1.501
Ovinos	20.106	21.240	18.812	22.371
Ganado bovino	26.763	22.782	30.643	27.653
Prosimios	169	44	98	170
Titíes y tamarinos	429	285	465	381
Saimiris	13	8	8	25
Otras especies de monos del Nuevo Mundo (Ceboidea)	0	0	3	0
Macaco.cangrejero.	6.221	6.503	7.227	7.619
Macaco Rhesus	211	318	353	320

Monos verdes (Chlorocebus spp)	56	19	33	16
Babuinos	37	62	25	30
Otras.especies de monos del Viejo Mundo (Cercopithecoidea)	0	0	23	22
Otros.mamíferos	9.535	3.637	26.335	5.944
Gallinas	515.834	500.920	464.553	481.812
Otras.aves	119.377	94.804	99.410	101.034
Reptiles	2.414	3.240	2.937	1.648
Ranas	4.884	4.482	3.485	4.238
Xenopus	10.837	18.511	13.539	15.816
Otros.anfibios	20.190	19.558	10.683	7.543
Peces cebra	338.815	513.011	499.763	461.521
Otros peces	936.252	791.726	719.932	2.304.216
Cefalópodos	15.862	8.884	514	4.268
Total	9.590.379	9.817.946	9.388.162	10,572.305*
*Descontando los datos de Noruega, la cifra total del año 2018 sería de 8.921.758, lo que supondría un descenso del 5% con respecto a los datos del año 2017.				

La Directiva exige, también, la comunicación de la severidad real que experimente un animal cuando se utilice en un procedimiento, estableciéndose tres niveles: leve, moderada y severa. Por ejemplo, en una severidad leve un animal recibe un medicamento y se le extrae sangre para su evaluación, sería moderada si este medicamento provocara en el animal un efecto secundario y será severa si este efecto secundario le provoca la muerte.

Algo más de la mitad de los usos se consideró de severidad «leve» (como máximo), el 34% de severidad «moderada», el 10%, «severa» y el 6%, «sin recuperación». Entendiendo por sin recuperación, en animales que, tras someterse a un procedimiento desarrollado íntegramente con anestesia general, no recobran la conciencia. En cifras absolutas, por tanto, el número de usos severos de animales en investigación y experimentación fue de 1,06 millones de animales (Tabla 3).

TABLA 3.
SEVERIDAD DE TODOS LOS USOS EN INVESTIGACIÓN Y ENSAYO

	2017	2018 (EU)	2018 (EU-28)*
Sin recuperación	6% (621.054)	6% (534.999)	6% (612.094)
Leve (como máximo)	51% (4.865.721)	49% (4.522.747)	50% (5.469.214)
Moderada	32% (3.071.828)	34% (3.096.460)	34% (3.658.621)
Severa	11% (1.023.138)	11% (983.237)	10% (1.064.925)
Total	100% (9.581.741)	100% (9.137.443)	100% (10.804.854)
* Incluyendo los datos de Noruega			

La utilización con fines reglamentarios representó 1,94 millones de usos, en el que el 79,6% estuvo relacionada con los ensayos de seguridad, eficacia y toxicidad de los lotes de los medicamentos de uso humano y veterinario y el 8% con los productos químicos industriales.

En 2018, se registraron 2,53 millones de utilizaciones con fines de investigación de animales genéticamente modificados, el 16% de los cuales presentaba un fenotipo patológico. El pez cebra y el ratón fueron las especies alteradas más utilizadas con un 60 y un 39% de uso respectivamente, representando una reducción en su uso de 4% con respecto a los datos anteriores del 2017.

Los datos que quedan fuera del ámbito de las comunicaciones estadísticas anuales, a pesar de estar incluidos en el ámbito de aplicación de la Directiva, son los relativos a:

- a) las formas fetales de mamíferos;
- b) los animales que se sacrifiquen por sus órganos y tejidos, así como los animales centinelas, salvo cuando el sacrificio tenga lugar en el marco de una autorización de proyecto que utilice un método no incluido en el anexo IV de la Directiva 2010/63/UE;
- c) los animales criados y sacrificados, pero no utilizados, aparte de los animales genéticamente alterados que presenten un fenotipo patológico deliberado y expresado, y los que hayan sido genotipados con un método invasivo antes de ser sacrificados.

En comparación con 2017, los cambios más significativos observados como resultado de la inclusión de los datos de Noruega son un aumento en el número de usos en la investigación básica (+14%), traslacional y aplicada (+35%), protección del medio ambiente natural en interés de la salud o el bienestar de los seres humanos o los animales (+7%) y la conservación de las especies (+7%).

De acuerdo con el informe, los ensayos de toxicidad y otros ensayos de seguridad, incluyendo los farmacológicos, representaron el uso de más de 731.000 animales en 2018, lo que se corresponde con el 7% de la totalidad de los animales utilizados en el año.

La mayoría de los usos en esta área se relacionan con las medidas de la toxicidad de dosis repetidas, ecotoxicidad, toxicidad sobre la reproducción, ensayos de farmacodinamia y de toxicidad para el desarrollo, correspondiendo los mayores niveles de severidad, por subcategorías, a los estudios de ecotoxicidad (25%) ensayos de seguridad en el área de los alimentos (19%), estudios de toxicidad subaguda (19%) y ensayos de neurotoxicidad (18%). Proporcionalmente, los niveles de severidad más bajos, se reportaron en los ensayos de sensibilización cutánea, cinéticos, carcinogénicos, de genotoxicidad y de toxicidad reproductiva.

Por primera vez este informe permite obtener una visión global de todos los animales necesarios para facilitar la investigación y los ensayos en la UE.

La Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, establece en su artículo 4º el principio de reemplazo, reducción y refinamiento, conocido como el principio de “las tres erres” (3Rs). El reemplazo por otras opciones en las que los animales no se utilicen, la reducción del número gracias a la aplicación de estudios estadísticos que permitan establecer cuál es la cantidad mínima de individuos que permitan obtener resultados científicos satisfactorios, o la elección de las especies de animales más adecuadas al estudio a realizar y el refinamiento de las actuaciones sobre los animales y la mejora de sus condiciones de vida, impulsando conceptos como la clasificación de la severidad de los procedimientos o el establecimiento de criterios de punto final tempranos, como puede leerse en la página web del ministerio de Agricultura, pesca y alimentación relativa al bienestar animal.

Este proceder en los ensayos, se justifica dentro del marco del bienestar animal y de la adopción por parte de los gobiernos y de la Agencia Europea de Medicamentos de este principio 3Rs.

Este principio no es nuevo ya que se formuló por primera vez en 1959 en la publicación titulada *The Principles of Humane Experimental Technique*, por Russell y Burch. Los autores proponían aplicar los principios de reemplazo, reducción y refinamiento como estrategia clave para alcanzar el objetivo de utilizar técnicas de experimentación humanitarias. Consideraban que el reemplazo era el objetivo final en la investigación, en la enseñanza y en los ensayos que utilizan animales de laboratorio. La reducción y el refinamiento los consideraban más fáciles de aplicar a corto plazo.

La reducción y el refinamiento se viene produciendo de manera progresiva en numerosos ensayos con animales, sirva de ejemplo los ensayos toxicidad aguda en la determinación de la dosis letal 50 (LD50), que desde su suspensión en el año 2002 y su retirada en diferentes protocolos y guías como las ICH o EMA, se ha implementado con nuevos métodos alternativos que han supuesto que el uso de animales se reduzca dentro de una horquilla de 2 a 15, como puede observarse en el método “up and down” UDP nº 425 de la OCDE, aceptado con carácter normativo. La reducción es importante si consideramos que el denominado método clásico desarrollado por primera vez en el año 1920 utilizaba hasta 100 animales (Erhirhie et al., 2018).

La Directiva establece que los Estados miembros velarán, cuando sea posible, por que se utilice un método o estrategia de ensayo científicamente satisfactorio que no conlleve la utilización de animales vivos, velarán por que el número de animales utilizados en proyectos se reduzca al mínimo sin comprometer los objetivos del proyecto y velarán por el refinamiento de la cría, el alojamiento y los cuidados, así como de los métodos utilizados en procedimientos, eliminando o reduciendo al mínimo cualquier posible dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero a los animales.

Lo impone como requisito jurídico firme en todos los aspectos del cuidado y uso de animales en ese ámbito, yendo más allá de la interpretación inicial y regulando también el cuidado de los animales, garantizándolo incluso aunque el animal no sea objeto de ningún procedimiento científico.

En el artículo 48 de la Directiva 2010/63/UE se determina el denominado Laboratorio de Referencia de la Unión Europea (EURL), que es el Centro Común de Investigación de la Comisión, así como sus funciones y cometidos, que serán los establecidos en el Anexo VII de la misma.

Entre sus competencias y funciones se encuentran: coordinar y promover el desarrollo del uso de alternativas a los procedimientos, incluso en los sectores de investigación básica y aplicada y en los ensayos reglamentarios, coordinar la validación de los planteamientos alternativos al nivel de la Unión y fijar, mantener y gestionar las bases de datos públicas y los sistemas de información sobre los planteamientos alternativos y su estado de desarrollo.

Integrado en el Centro Común de Investigación de la Comisión, se encuentra el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (EURL-ECVAM).

El ECVAM “coordina a nivel europeo la evaluación independiente sobre la relevancia y fiabilidad de los experimentos para fines específicos, con el objetivo de que los productos químicos de varias clases, incluyendo los medicamentos, vacunas y cosméticos, puedan ser fabricados, transportados y utilizados de forma más segura, al tiempo que se reduce progresivamente la actual dependencia de los procedimientos que incluyen la experimentación con animales.”

Considerando que en el mercado existen más de 100.000 productos químicos y que del 90% de ellos existe poca información sobre sus posibles propiedades dañinas, es necesaria una innovación más eficiente en la generación de ensayos alternativos que permitan una evaluación de riesgos y de su seguridad, que no dependa del uso de animales de experimentación.

En la Resolución del Parlamento Europeo, de 10 de julio de 2020, sobre la estrategia en el ámbito de las sustancias químicas con vistas a la sostenibilidad (2020/2531(RSP), se solicita a la Comisión que garantice que se acelere la validación y la introducción de métodos de ensayo sin animales y que estudie el potencial de las tecnologías digitales y de la inteligencia artificial para acelerar el desarrollo de herramientas de toxicología predictiva que apoyen la innovación.

La aceptación de la propuesta de nuevos métodos de análisis de la toxicidad y de otros métodos que sustituyan la utilización de animales de experimenta-

ción, no es un proceso fácil, y requiere 5 pasos: la presentación de la propuesta del nuevo método alternativo, la validación de dicho método, una revisión por pares que se pronunciará sobre la validez de la propuesta del método y la recomendación de su uso, y el último paso sería la aceptación por parte de la autoridad competente para utilizarlo como un método oficial de aplicación y uso estandarizado, y que sustituiría al método que emplea animales de experimentación.

Con carácter consultivo, se puede hacer un seguimiento de las diferentes propuestas a través del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (EURL-ECVAM). En la última visita a su página web, realizada recientemente, pude contar en el apartado Sistema de Seguimiento del progreso hacia la aceptación normativa de los métodos alternativos (TSAR– Tracking System for Alternative methods towards Regulatory acceptance), 137 propuestas: de las cuales 52 han alcanzado el último paso de aceptación, otros se encuentran pendientes de validación y algunos han sido retirados antes de su aceptación por diferentes motivos. (EURL ECVAM - TSAR / Tracking System for Alternative methods towards Regulatory acceptance (TSAR) (europa.eu))

Como ejemplo de haber alcanzado el ciclo de aceptación completo está el test de los micronúcleos, como ensayo de genotoxicidad (OCDE 487), que emplea células de linfocitos humanos, sustituyendo al método convencional que utiliza células de la médula ósea extraídas del fémur o tibias de los animales sacrificados y tratados con el producto objeto del ensayo (OCDE 474).

Otro ejemplo es el ensayo de pirógenos in vitro utilizando sangre entera que se basa en la capacidad que tienen los pirógenos y las endotoxinas de liberar interleuquina 6 en células monocitoides de sangre humana. Método aceptado por la comisión de la farmacopea europea en el año 2009 y alternativo al método tradicional que utiliza conejos.

Desde hace algunos años, la toxicología ha ido evolucionando desde el concepto de una ciencia predominantemente observacional, basada en modelos específicos de enfermedad, hacia una ciencia más predictiva centralizada en una observación más amplia que combina el uso de dianas específicas, mecanismos de acción y observaciones biológicas complejas. Esta evolución ha propiciado el uso de nuevas herramientas de caracterización química que incluye una variedad

de métodos empíricos y computacionales, que pueden utilizarse para calcular tanto propiedades fisicoquímicas, como modelos para predecir el metabolismo de compuestos y los productos del mismo, modelos cuantitativos de cálculo de la relación estructura/actividad (QSAR) que predicen la actividad biológica a partir de su estructura química, así como modelos que predicen interacciones moleculares específicas, como la unión proteína-ligando, enlace a los tejidos y su solubilidad en los mismos. El desarrollo de estas herramientas ha dado origen a lo que se conoce como “Toxicología *in silico*” o “Toxicología computacional” llamada también, en conjunto con los métodos *in vitro* e *in vivo*, a conseguir reducir el empleo de animales de experimentación y a mejorar las predicciones de toxicidad y seguridad de nuevos productos, con la ventaja adicional de poder estimarlas incluso antes de ser sintetizadas, sólo a partir de su estructura química (Raies et al., 2016).

La sustitución de los animales de experimentación, no es el único motivo de la búsqueda de métodos alternativos para el análisis de la toxicología de compuestos. Es bien conocido que una de las causas principales por la que aproximadamente el 30% de los medicamentos ensayados en las diferentes etapas de su desarrollo no alcanzan la aprobación para su comercialización, se debe a la toxicidad observada en los animales de experimentación (Waring et al., 2015). Aunque los ensayos utilizados tienen un carácter predictivo elevado, cada vez se observan más evidencias de que la respuesta toxicológica que experimentan los seres humanos con respecto a la observada en los animales no sigue una correlación directa. Incluso, entre los propios seres humanos existe también una variabilidad interindividual. Son varias las causas que justifican esta falta de correlación, si bien una de las principales es la dificultad de las especies animales de reproducir el metabolismo humano con exactitud (Lin, 1995, Seok et al., 2013).

La utilización de ensayos basados en el empleo de células humanas en cultivo ya forma parte de la rutina analítica en numerosos experimentos, incluidos los ensayos de toxicidad *in vitro* y la respuesta terapéutica al contacto con medicamentos o sus metabolitos. No obstante, por lo general, las líneas celulares cultivadas *in vitro* experimentan, en gran medida, una inactivación parcial y carecen de funciones fisiológicas (Rodríguez-Antona et al., 2002). Este fenómeno sucede también en los cultivos de células primarias, siendo muy difícil poder mantener las funciones celulares de éstas durante períodos prolongados.

En la metodología convencional, que prácticamente no ha cambiado en 5 décadas, las células se cultivan en un entorno semiestático y plano, en el que el acceso de los compuestos objeto de experimentación a las células en cultivo depende sólo de procesos de transferencia de masa por difusión. En la exposición in vivo, las células obtienen oxígeno y nutrientes a través del flujo sanguíneo, así como cualquier estímulo de naturaleza química o física del entorno circundante, como tensiones de estiramiento o cizalladura, además de la falta de gradientes de concentración propios de una estructura tridimensional, así como la interacción con otras células próximas de naturaleza diferente. Estas diferencias entre los sistemas in vivo e in vitro, tanto en su morfología como en su efecto ambiental, podrían ser la causa de la pérdida o desactivación de las funciones celulares en los cultivos.

Es evidente que la heterogeneidad celular exige la investigación en células individuales que permitan analizar su comportamiento básico. No obstante, las condiciones conformacionales con la ausencia de una tercera dimensión y, por lo tanto, la ausencia de gradientes dentro de la población de células en un entorno bidimensional, han impulsado una creciente transición hacia los modelos 3D in vitro. También los cocultivos con diferentes tipos de células permiten modelar algunas interacciones básicas entre las células empleadas. Sin embargo, todavía hay una gran brecha entre los sistemas clásicos de cultivo celular 2D/3D y las unidades funcionales en el cuerpo humano.

¿Está el futuro y la solución en la microfluídica?

Los dispositivos basados en la microfluídica permiten una manipulación precisa del comportamiento de los fluidos a microescala utilizando canales con un inter-valor de tamaños ente 10 y 100 micrómetros y utilizando volúmenes que oscilan en el intervalo entre el nano y el ato litro (10^{-9} L y 10^{-18} L). Aunque los canales son muy pequeños el área superficial y la transferencia de masa en su conjunto son muy elevadas, permitiendo el control de volumen de los reactivos, una elevada velocidad de mezcla de los mismos, una rápida respuesta y un control preciso de las propiedades fisicoquímicas.

Los microcanales y microestructuras de estos dispositivos se fabrican utilizando la tecnología de microfabricación de semiconductores, tales como la fotolitografía, por lo que unido a su uso en la tecnología de sensores químicos y en Química Analítica realizando procesos analíticos complejos en un espacio

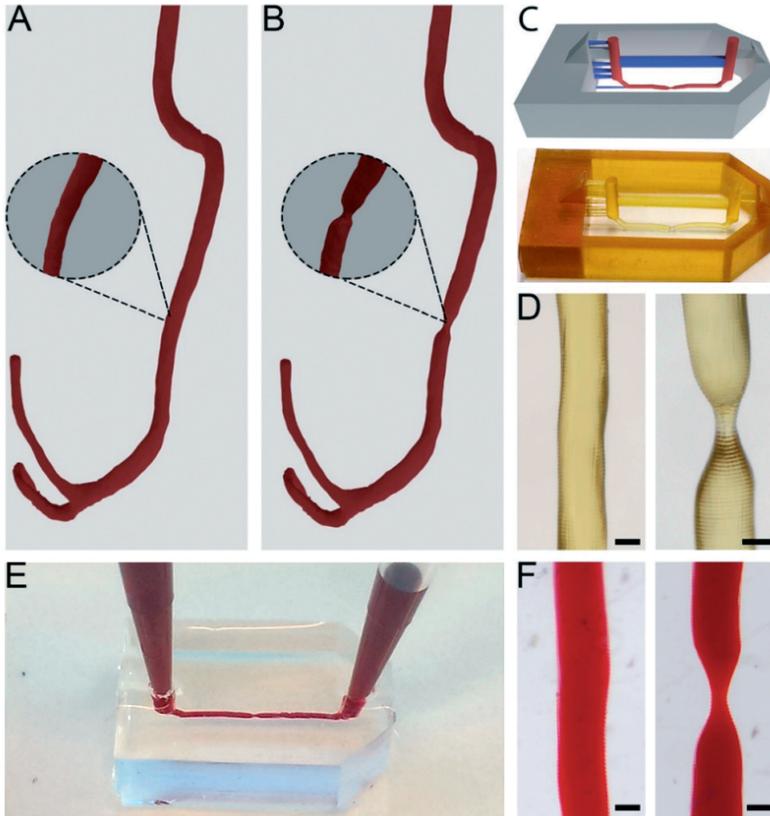


Figura 3. Modelo tridimensional de vasos sanguíneos normales (A) y estenosados (B) fabricado en un chip (C). El tamaño del modelo es de 1,2 cm de anchura. El diámetro del vaso sano es de 370 μm y el estenosado de 120 μm . Adaptado de Costa et al., 2017 publicado bajo licencia CC BY 3.0. <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.

reducido, es por lo que se les conoce como “lab on a chip” o laboratorio en un chip. Entre sus aplicaciones se encuentra la posibilidad de incorporar cultivos celulares de células humanas en condiciones controladas y dinámicas que emulan directamente el microambiente físico-químico de tejidos del cuerpo humano, conservando los aspectos esenciales de la geometría de los mismos, así como reproducir modelos fisiológicos a escala verdadera que permita comparar comportamientos fisiológicos de estructuras dañadas con estructuras enteras, como por ejemplo los modelos tridimensionales de vasos sanguíneos estenosados frente a vasos normales. Figura 3 (Costa et al., 2017). Estas configuraciones permiten que este tipo de chips posea funciones a nivel del órgano o del tejido que no se dan en los modelos de cultivos celulares in vitro

más sencillos, por lo que a estos nuevos dispositivos se les conoce como “Organ on a chip” u órgano en un chip. Para ello se puede disponer bien de células primarias obtenidas a partir de pacientes sanos o enfermos, líneas celulares comercialmente disponibles o bien células madre pluripotentes inducidas (iPS) (Low et al., 2021).

En el diseño de un órgano en un chip se requiere controlar numerosas variables. Por un lado, el sistema de cultivo celular requiere el control de los parámetros del microambiente, tanto internos como externos, que reproduzcan fielmente las condiciones fisiológicas. Las fuerzas de naturaleza mecánica y dinámica, la viscosidad de los fluidos y los gradientes de concentración son fundamentales en el funcionamiento del chip (Wu et al., 2020).

En relación con las fuerzas de fricción, la microfluídica posibilita un cultivo dinámico de las células a través de bombas de perfusión que facilita la administración programada de nutrientes al cultivo y su drenaje posterior. El ambiente dinámico en el que se encuentran las células es más comparable a las condiciones fisiológicas en vivo que las que se corresponden con un cultivo en condiciones estáticas, induciendo también la polarización del órgano asociado. Es muy importante que el órgano reciba una presión física adecuada que permita que se produzcan las funciones biológicas de las células del endotelio mediante la activación de las moléculas de la superficie celular y la cascada de señalización asociada a las mismas.

A microescala, el fluido fluye principalmente de acuerdo con las características de un flujo laminar, lo que se traduce en un gradiente estable de las moléculas bioquímicas controlado en el espacio y el tiempo. No obstante, varios procesos biológicos se producen mediante señales bioquímicas impulsadas por gradientes de concentración, como la angiogénesis, la invasión y la migración (Nguyen et al., 2013). La microfluídica puede simular estos procesos biológicos complejos que se producen en el cuerpo humano, modificando la velocidad de flujo y la geometría de los canales a través de microválvulas y microbombas para conseguir gradientes tridimensionales estables de concentraciones bioquímicas.

Cualquier órgano funcional, está sometido en el día a día a una presión que incluye la tensión arterial, la tensión pulmonar o la tensión ósea. Estas presiones juegan un papel determinante en el mantenimiento de los tejidos mediante estrés mecánico, como el tejido musculo esquelético, huesos, cartílagos y vasos sanguíneos.

La microfluídica posibilita el uso de membranas porosas elásticas para crear tensiones mecánicas de manera periódica, que se considera determinante en numerosos procesos fisiológicos (Jang et al., 2011, Maggiorani et al., 2015)

La organización del cuerpo humano, con sus aproximadamente 10^{14} células, requiere una arquitectura compleja y ordenada de agrupación multicelular, necesaria para que se produzcan interacciones funcionales a nivel general. La microfluídica permite diseñar patrones celulares para la construcción in vitro de modelos fisiológicos con geometrías diversas, mediante el empleo de moldes adecuados, modificación selectiva de superficies e impresión 3D (Xue et al., 2018). La impresión 3D permite el diseño de patrones celulares con diferentes escalas a través de la formación de matrices de hidrogel, con la ventaja de poder definir diseños digitales adaptables por el propio usuario, proporcionando versatilidad en las características del patrón celular, lo que se considera vital para la reconstrucción del microambiente de las células en las condiciones in vitro (Jung et al., 2016).

Los ejemplos de este tipo de dispositivos incluyen un pulmón “respirando” en un chip, células tumorales metastásicas circulantes en redes de vasos sanguíneos en chips, un intestino en un chip con actividad peristáltica y microorganismos que fluyen a modo de microbiota intestinal, un chip multiórgano con esferoides hepáticos y pancreáticos cultivados dinámicamente que mantienen la homeostasis de la glucosa, o tejidos musculares contraíbles con uniones neuromusculares (Van den Berg et al., 2019). Estos dispositivos se pueden también personalizar utilizando muestras primarias de pacientes como biopsias, residuo de tejido de una cirugía y muestras de sangre, orina o heces.

Por ejemplo, el epitelio de las vías respiratorias obtenido de tejido bronquiolar de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) e individuos sanos, conectado a un sistema de respiración automatizado que permite aspirar el humo de cigarrillos, se ha utilizado para configurar modelos personalizados con los que puede demostrarse como los pacientes con EPOC tienen un perfil de liberación de citocinas diferente, en términos de liberación de la interleucina 8, como respuesta a un estímulo de naturaleza inflamatoria y al humo del tabaco, en comparación con controles de tejido sano. (Benam et al., 2016).

Se ha demostrado, también, la posibilidad de monitorizar procesos de agregación plaquetaria y trombosis como respuesta a una activación endotelial

utilizando muestras de sangre humana, de individuos seleccionados, perfundida a través de redes de vasos sanguíneos en chips fabricados con tejido vascular. Curiosamente, la sangre de individuos que toman medicamentos antiplaquetarios como la aspirina o el clopidogrel muestran patrones significativamente menores de trombosis, en los vasos sanguíneos activados en chips, en comparación con muestras de sujetos control, lo que demuestra el potencial para evaluar la respuesta farmaco-lógica personalizada de pacientes tratados con este tipo de medicamentos (Jain et al., 2016).

El pulmón en un chip es quizás una de las propuestas que consiguió mayor repercusión en el momento de su publicación (Matthews et al., 2010). Este dispositivo, desarrollado por el grupo de Ingber en la universidad de Harvard, posee dos capas en canales separados verticalmente por una membrana microporosa de silicona deformable y polidimetilsiloxano (PDMS). En la parte superior de la membrana se cultivan células del epitelio alveolar y en la parte inferior células vasculares del endotelio, alimentando ambas capas con aire y el medio de cultivo adecuado respectivamente. De este modo, se consigue reproducir la estructura pulmonar en un dispositivo microfluídico. Los movimientos de expansión y contracción fisiológica de los alvéolos que se producen en una respiración convencional se consiguen cambiando la presión interna a ambos lados del canal principal, en un ciclo específico que permite extender y contraer la membrana porosa.

El dispositivo permite reproducir reacciones inflamatorias en las que las células endoteliales vasculares expresan de modo abundante el ligando de integrina (ICAM-1) después de la exposición de las células al factor de necrosis tumoral (TNF- α) y a las bacterias. Además, los neutrófilos que fluyen en el canal lateral vascular unido a las células endoteliales vasculares siguen la expresión del ligando, migrando hacia la superficie de las células de la cara del epitelio alveolar, a través de los poros de la membrana, fagocitando a los microorganismos (Kimura et al., 2017).

Otro de los órganos objetivo de estos dispositivos es el hígado. Dado que se trata del órgano principal relacionado con el metabolismo de los fármacos, es muy importante poder predecir con anticipación en el proceso de descubrimiento de nuevos medicamentos cuales son las transformaciones metabólicas y la toxicidad del medicamento objeto de ensayo, en las que interviene. Los hepatocitos utilizados para el cribado in vitro presentan el

inconveniente de que pierden muchas de sus funciones y actividades originales rápidamente (Kimura et al., 2017). Para superar este inconveniente, Powers propuso un dispositivo microfluídico que permite la morfogénesis de estructuras de tejido 3D bajo perfusión continua (Powers et al., 2002). Para ello una serie de matrices tridimensionales se combinaron con un filtro de retención celular y un soporte estructural en una cámara de cultivo, para permitir la introducción del medio de cultivo apropiado en la parte superior de la matriz y su filtrado hacia la parte inferior a través de los agregados celulares 3D en cada canal. El diseño de la cámara de cultivo se ajusta para que los niveles de flujo cumplan con los valores estimados de consumo de oxígeno celular a la vez que proporcionan la tensión de cizalladura de los fluidos apropiada dentro del rango fisiológico. Los autores demostraron que este dispositivo permite la formación de agregados hepatocelulares que se parecen a las estructuras observadas en los acinos hepáticos, y que mantiene su estructura y viabilidad hasta 2 semanas.

Para investigar las respuestas a los fármacos, también es importante mantener la capacidad de transporte polarizado del hepatocito. La bilis, que contiene productos metabólicos biosintetizados en las células hepáticas, se excreta a través de los canaliculos biliares. Estos canaliculos se forman entre los hepatocitos desde la vena central en los lóbulos hepáticos. Por lo tanto, los canaliculos son también un objetivo importante en los estudios de metabolismo de fármacos in vitro (Kimura et al., 2017). En este sentido, Nakao y colaboradores consiguieron reproducir, en un modelo in vitro, la microestructura de células hepáticas alineadas a modo de cordón y que representa la unidad más pequeña del lóbulo hepático, a partir de la cual se forman los canaliculos biliares (Nakao et al., 2002). El área de cultivo celular en el dispositivo se diseñó para conseguir alinear los hepatocitos en dos líneas similares a la estructura en cordón observada en las células hepáticas. Se demostró que los hepatocitos alineados de este modo conseguían un elevado grado de organización gradual que permite la formación de canaliculos biliares a lo largo de la estructura del cordón hepático. Mediante este dispositivo demostraron su capacidad metabólica, utilizando como modelo la metabolización del diacetato de carboxidiclorofluoresceína (CDFDA) al producto fluorescente carboxidicloro-fluoresceína (CDF), a través de las esterasas del hepatocito y excretada en los canaliculos biliares de manera continua, cuando el CDFDA era adicionado al medio de cultivo a través del canal de flujo. Este resultado muestra un buen ejemplo de cómo pueden reproducirse las funciones in vivo imitando microestructuras que mantienen la forma y polaridad de los tejidos, y estudiar su capacidad metabólica frente a medicamentos y tóxicos (Kimura et al., 2017).

En otro estudio, Jang y colaboradores utilizan un hígado en un chip utilizando cultivos de células hepáticas, bien humanas, de rata o de perro, cultivadas en condiciones fisiológicas. El chip les permite comparar diferencias en la toxicidad hepática en las especies animales en los tres modelos, utilizando medicamentos de hepatotoxicidad conocida, con la capacidad de detectar diversos fenotipos como daño hepático, esteatosis, colestasis y fibrosis, así como la toxicidad específica en cada especie. Observan, por ejemplo, como un determinado compuesto induce fibrosis en el chip de hígado de rata sin observarse ninguna alteración en la función hepática en el chip de hígado humano. Los resultados ponen de manifiesto la importancia de utilizar células humanas en determinados ensayos de toxicidad, así como confirman la validez de los resultados utilizando células no humanas en otros (Jang et al., 2019).

Como ocurre con otros muchos órganos corporales, la evaluación de la eficacia y toxicidad en el riñón de nuevos medicamentos candidatos, se lleva a cabo mediante experimentación con animales, ya que no hay modelos *in vitro* adecuados para ello. El riñón es un órgano determinante en el metabolismo y excreción de los medicamentos y en muchos casos ciertos medicamentos se descartan en su etapa preclínica al no superar los ensayos, sin considerarse posibles diferencias, entre los seres humanos y los animales de experimentación, relacionadas con la metabolización de la molécula candidata.

Una correcta identificación de los compuestos nefrotóxicos en esta etapa se traduce en una reducción significativa de los costes del desarrollo del fármaco evitando, también, que estos puedan llegar al mercado. Por ello, poder disponer de un modelo preciso para el análisis de la enfermedad renal *in vitro* serviría no sólo para profundizar en la elucidación de los mecanismos de la enfermedad, sino también permitiría que éste también se pudiera utilizar como un sistema de detección de fármacos para nuevos tratamientos.

Existen varias propuestas de riñón en un chip, que reproducen la función renal imitando la reabsorción en los túbulos renales, en una estructura de dos capas con una membrana porosa entre ambas y que soportan células tubuloepiteliales renales. Este modelo permite reproducir la respuesta fisiológica del riñón, como la variación de la concentración de iones sodio y los cambios en la presión osmótica del canal apical, al introducir hormonas como la vasopresina y la aldosterona en el canal basal. Utilizando dispositivos similares se ha podido comprobar como las fuerzas de fricción no solo alteran la orientación de las células del cultivo,

sino que también afectan a la expresión de glicoproteína P, la polaridad celular, el crecimiento de cilios en las células en cultivo, así como el cociente de absorción albúmina/glucosa en las células. Por lo tanto, a pesar de la extrema complejidad de la estructura del riñón, es factible modelar de manera efectiva este órgano, mediante la tecnología en un chip, consiguiendo un enfoque eficaz para reproducir la función y características propias del tejido renal in vivo (Kimura et al., 2017).

El sistema digestivo es el órgano responsable de la digestión y absorción de los alimentos y de la mayor parte de los medicamentos, si bien el intestino delgado funciona, también, como una barrera de los medicamentos administrados por vía oral. Por ello, se considera muy importante predecir su función específica durante la etapa de descubrimiento de fármacos. Una opción para llevar a cabo esta determinación podría ser el intestino delgado en un chip. Kim e Ingber propusieron un dispositivo de intestino en un chip en el que células Caco-2 se someten continuamente a la mecánica fisiológica mediante estímulos como las fuerzas de fricción y tensiones mecánicas cíclicas que imitan movimientos similares al peristaltismo in vivo. Los autores demostraron que las células cultivadas con el dispositivo se reprograman experimentando una morfogénesis espontánea del vello intestinal 3D, así como una diferenciación de las células intestinales en estas condiciones fisiológicas. Este dispositivo permite también el cocultivo de múltiples microbios comensales en contacto con células epiteliales intestinales, replicando así las condiciones fisiológicas de un modo más preciso (Kim et al., 2016). Los autores demostraron que este dispositivo in vitro reproduce los mismos resultados que los modelos animales utilizados in vivo, incluyendo la demostración de que las terapias con probióticos y antibióticos pueden evitar el daño en la vellosidad intestinal producido por bacterias patógenas (Kim e Ingber, 2013), por lo que concluyeron que el dispositivo gut-on-chip puede ser utilizado para analizar la fisiopatología intestinal e investigar los mecanismos de la enfermedad in vitro.

Jalili-Firoozinezhad y colaboradores utilizando un intestino en un chip anaeróbico en el que reproducían el complejo sistema de gradientes de oxígeno que se produce en condiciones fisiológicas, consiguió incrementar las funciones de la barrera intestinal observadas en condiciones aerobias y cocultivar y conservar una microbiota con un balance de bacterias aerobias y anaerobias similar a la observada en las heces humanas. Este dispositivo se perfila como una herramienta útil para el desarrollo de terapias relacionadas con el microbioma, los probióticos y nutracéuticos (Jalili-Firoozinezhad, et al., 2019).

Los dispositivos microfluídicos más complejos pueden incorporar las funciones de múltiples órganos, conectando mediante canales en el mismo dispositivo diferentes compartimentos que incorporen los tejidos correspondientes a cada uno de los órganos. Estos dispositivos conocidos como “cuerpo en un chip” o también “Human on a chip” permiten observar procesos farmacocinéticos en continuo, relacionados con las diferentes rutas de administración de fármacos y aplicar, a partir de los datos obtenidos, modelos matemáticos que permitan, a su vez, predecir la eficacia de los mismos (Kimura et al., 2017).

El grupo de Shuler, pionero de la investigación en ingeniería bioquímica, desarrollaron un dispositivo con múltiples órganos en compartimentos separados en los que cocultivan diferentes células correspondientes a los órganos del dispositivo. Con este dispositivo demostraron que los ensayos realizados con el medicamento contra el cáncer, Tegafur, reproducía la complejidad de las interacciones entre los órganos relacionadas con la administración del medicamento tanto por vía oral como intravenosa, previamente establecidas con animales de experimentación (Sung y Shuler, 2009).

Imura y colaboradores desarrollaron un modelo de cuerpo en un chip que integra las funciones del intestino delgado responsable de la absorción, un hígado con funciones metabólicas y un compartimento utilizado para las células diana. Utilizan para ello células Caco-2 correspondientes al intestino, células HepG2 para el compartimento hepático y células de carcinoma de mama MCF-7, en el compartimento diana (Imura et al., 2010). Mediante este dispositivo, pudieron demostrar diferencias en la actividad anticancerígena utilizando fármacos con distintos mecanismos de acción y diferentes velocidades de absorción intestinal. Consiguieron, también, integrar las funciones de excreción renal mediante la incorporación de una membrana de diálisis en el dispositivo (Imura et al., 2013). Este dispositivo se utilizó para determinar la eficacia de medicamentos anticancerígenos, a la vez que se pudo comprobar la reproducibilidad de estos dispositivos microfluídicos en los fenómenos de inhibición de la absorción a nivel de la barrera intestinal, así como los beneficios a nivel fisiológico de los fármacos asociados al metabolismo hepático.

Oleaga y colaboradores desarrollaron un dispositivo microfluídico multiórgano, con cuatro módulos, para evaluar la toxicidad de 5 fármacos con efectos secundarios conocidos, que incorpora las actividades funcionales cardíaca, muscular, neuronal y hepática, demostrando su viabilidad durante 14

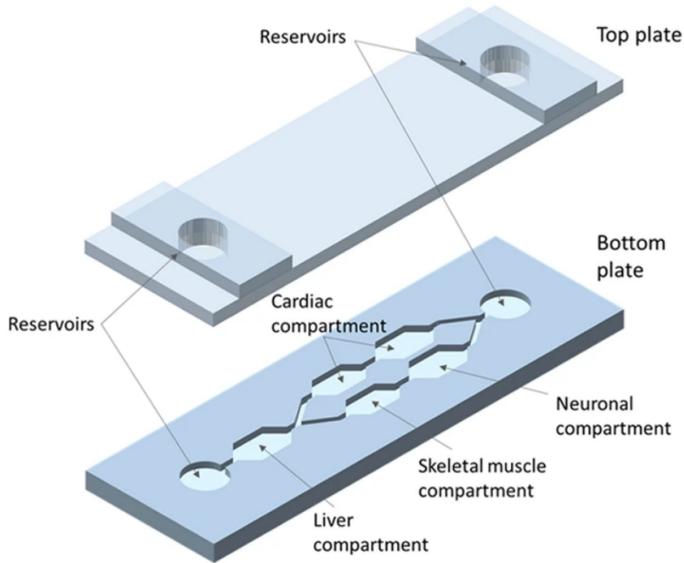


Figura 4. Representación esquemática de una plataforma microfluídica que incorpora diferentes compartimentos celulares. El Sistema consta de dos soportes que separan los cultivos celulares. El volumen del fluido es de aproximadamente 4 mL y el tamaño de compartimentos celulares oscila entre $35.8 \times 18.4 \times 0.3$ y $29.8 \times 15.4 \times 0.7$ mm. Las dimensiones de los canales de conexión es de $5.7 \times 1 \times 0.3$ mm. Adaptado de Oleaga et al., 2016, publicado bajo licencia CC BY.4.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

días, tras evaluar la respuesta farmacológica del modelo integrado durante siete días después de un régimen de tratamiento de 48 horas (Figura 4). Los medicamentos utilizados fueron Doxorubicina (DOX, 5 μ M), Atorvastatina (ATR, 100 μ M), ácido Val-proico (VPA, 2 mM), paracetamol (APAP, 5 mM) y N-Acetil-m-aminofenol (AMAP, 5 mM), utilizado este último como compuesto control. En general, los resultados de todos los tratamientos farmacológicos son consistentes con los resultados de su toxicidad publicados tanto para seres humanos como animales, lo que demuestra la viabilidad para la evaluación de la toxicidad sistémica *in vitro* de una nueva generación de dispositivos conocidos como “humanos en un chip” (Oleaga, et al., 2020).

Skardal y colaboradores fabricaron un dispositivo que incorporaba un pulmón, un hígado y un corazón, perfundidos con el mismo medio mediante un bucle ce-

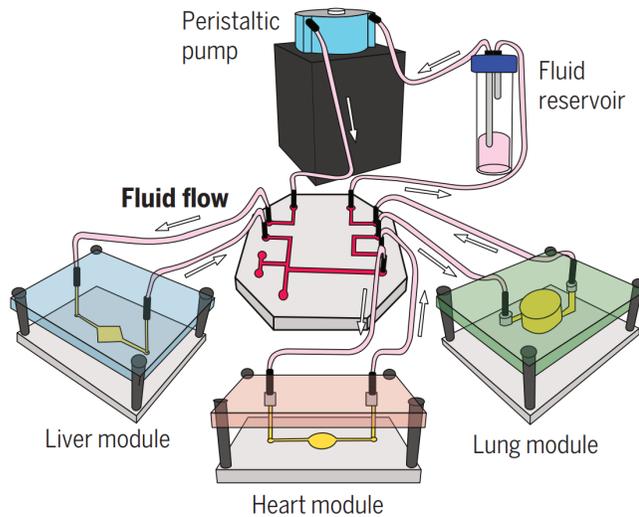


Figura 5. Modelo de multiórgano que incorpora cultivos celulares de corazón, hígado y pulmón, compartiendo el mismo fluido a través de canales conectados e impulsado mediante una bomba peristáltica. Adaptado de Skardal et al., 2017, publicado bajo licencia CC BY 4.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

rrado (Figura 5). Con este dispositivo, lograron demostrar la cardiotoxicidad del medicamento citostático Bleomicina, desconocida hasta ese momento, y debida a la interacción mediada por citoquinas entre las células de pulmón y de corazón. Esta respuesta no era observable en el dispositivo que solo incorpora las células del corazón (Skardal et al., 2017).

Se debe considerar, no obstante, que estos dispositivos “cuerpo en un chip” no son capaces de reproducir todas las respuestas biológicas de manera exacta y no se trata tampoco de crear simplemente sofisticados cuerpos humanos en miniatura. Su principal objetivo en el ámbito de la farmacología es identificar respuestas a medicamentos no observables mediante otros métodos y que sólo se pueden originar mediante la contribución de interacciones en tiempo real entre órganos, en combinación con modelos farmacocinéticos apropiados, que permitan pre-

decir mecanismos o fenómenos desconocidos. A su vez los datos obtenidos con estos dispositivos deberían contribuir a incrementar la exactitud de los modelos matemáticos utilizados para ello, actualmente disponibles. Abaci y Shuler proponen, a modo de guía para el diseño de estas plataformas, diferentes estrategias para incorporar en estos dispositivos los modelos de comportamiento farmacocinético/farmacodinámico actuales, empleados en el desarrollo de medicamentos. Utilizan para ello una serie de ecuaciones matemáticas que les permiten determinar sus dimensiones y condiciones operativas, así como los parámetros críticos requeridos para satisfacer los criterios del diseño y las posibles limitaciones para su estimación (Abaci y Shuler, 2015).

A pesar de los buenos resultados, la combinación de sistemas multiórgano no es una cuestión trivial. Existen, todavía, muchos desafíos que requieren una solución antes de convertirse en una alternativa real. Como, por ejemplo, los aspectos relacionados con el desarrollo alométrico de los tejidos empleados, la conservación del ambiente estéril necesario al conectar los diferentes módulos, el empleo de un medio común compatible entre los diferentes órganos, a modo de sangre mimética, trampas estratégicas para la captación de burbujas, así como el control de las variaciones de flujo de los fluidos. Además, incluso en las configuraciones más complejas, siempre habrá tejidos u órganos que no formarán parte del chip pero que sus funciones tendrán que tenerse en cuenta, como por ejemplo las plataformas en las que las fluctuaciones circadianas y endocrinas jueguen un papel importante en el metabolismo de un medicamento.

La tecnología de los órganos en un chip representa una alternativa futura a los ensayos que en la actualidad requieren animales y a partir de cuya respuesta se consigue verificar la eficacia y la seguridad de medicamentos y de otros compuestos relacionados con el consumo o simplemente con actividades cotidianas. Se espera que este año 2022, sólo en EEUU, la industria de estos dispositivos alcance una inversión de 117 millones de dólares, con un potencial de crecimiento que en los próximos años superará los mil millones, y que en el desarrollo de nuevos medicamentos supondrá un ahorro del 26% (Low et al., 2021), además de contribuir a hacer realidad el tan codiciado principio de las 3Rs.

En el año 2015, la ONU aprobó la Agenda 2030 sobre el Desarrollo Sostenible, con 17 objetivos (ODS) para transformar nuestro mundo, marcándose como objetivo 12.4 conseguir en el año 2020 una gestión ecológicamente racional de los

productos químicos y de todos los desechos a lo largo de su ciclo de vida, y una reducción significativa de su liberación a la atmósfera, el agua y el suelo a fin de minimizar sus efectos adversos en la salud humana y el medio ambiente. Es evidente que la Unión y sus Estados miembros no lo han conseguido, y es también evidente que se necesitan esfuerzos adicionales importantes para alcanzar el objetivo n° 3.9 de los ODS y reducir sustancialmente el número de muertes y enfermedades producidas por productos químicos peligrosos y la contaminación del aire, el agua y el suelo para 2030.

Se requiere, por tanto, profundizar en el desarrollo analítico de nuevas metodologías de control que explote el enorme esfuerzo que hasta la fecha se ha venido haciendo en la investigación de sistemas experimentales alternativos, que permitan reducir el número de animales empleados en los ensayos y velar por que estos se utilicen. En los informes sobre las estadísticas relativas al uso de animales con fines científicos, llama la atención que se sigan empleando animales en experimentos, como los ensayos de irritación/corrosión cutánea, de lesiones oculares/irritación ocular graves y de pirogenicidad, cuando existen métodos alternativos que han sido normativamente aceptados. Las autoridades deberían prestar mayor atención a estos datos.

Como decía Ortega, *“lo que diferencia al hombre del animal es que el hombre es heredero y no un mero descendiente”*. Este hecho nos confiere una responsabilidad que va más allá de un deber colectivo y que nos obliga a garantizar como especie dominante la continuidad del entorno que nos rodea y que nos permite sobrevivir. Hagámoslo por nosotros por nuestros hijos y por los hijos de nuestros hijos.

He dicho.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abaci, H.E. y Shuler, M.L. Human-on-a-chip design strategies and principles for physiologically based pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling. *Integr Biol Quantitative Biosci Nano macro.* (2015);7(4):383-91). <https://doi.org/10.1039/c4ib00292j>.

Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, M., Skinner, M.K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science.* (2005); Jun 3;308(5727):1466-1469. DOI: 10.1126/science.1108190. Erratum in: *Science.* 2010 May 7;328(5979):690.

Benam, K. H. Novak, R. Nawroth, J. Hirano-Kobayashi, M. Ferrante, T. C. Choe, Y. Prantil-Baun, R. Weaver, J. C. Bahinski, A. Parker K. K. and. Ingber, D. E. Matched-Comparative Modeling of Normal and Diseased Human Airway Responses Using a Microengineered Breathing Lung Chip. *Cell Syst.* (2016); 3(5): 456–466. DOI: 10.1016/j.cels.2016.10.003.

Costa, P. F., Albers, H. J., Linssen, J. E. A., Middelkamp, H. H. T., van der Hout, L. Passier, R., van den Berg, A., Malda J., van der Meer, A. D. Mimicking arterial thrombosis in a 3D-printed microfluidic in vitro vascular model based on computed tomography angiography data. *Lab Chip,* (2017); 17, 2785–2792. DOI: 10.1039/c7lc00202e.

De la Casa-Resino, I., Empl, M.T., Villa, S. et al. Environmental risk assessment of veterinary medicinal products intended for use in aquaculture in Europe: the need for developing a harmonised approach. *Environ Sci Eur.* (2021); 33, 84. <https://doi.org/10.1186/s12302-021-00509-8>.

Erhirhie, E.O., Ihekwereme, C.P., Ilodigwe, E.E. Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptance. *Interdiscip Toxicol.* (2018); 11(1): 5–12. DOI: <https://doi.org/10.2478/intox-2018-0001>.

Goodman, A., Schorge, J., Greene, M.F. The Long-Term Effects of In Utero Exposures -The DES Story. *Engl J Med.* (2011); 364:2083-2084. DOI: 10.1056/NEJMp1104409.

Harari, Y. N. *Sapiens de animales a dioses, Breve historia de la humanidad.* (2013) Ed. Debate.

Herbst, A.L., Ulfelder, H., Poskanzer, D.C., Longo L.D. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women, *N. Engl. J. Med.* (1971); 181 (6) 1574–1575. DOI: 10.1016/s0002-9378(99)70411-4.

Huh, D., Matthews, B.D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H.Y., Ingber, D.E. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science.* (2010); 328 (5986): 1662-8. DOI: 10.1126/science.1188302.

Imura, Y. Sato, K. Yoshimura, E. Micro total bioassay system for ingested substances: assessment of intestinal absorption, hepatic metabolism, and bioactivity. *Anal Chem.* (2010); 82(24):9983-8. DOI: 10.1021/ac100806x.

Imura, Y. Yoshimura, E. Sato, K. Microcirculation system with a dialysis part for bioassays evaluating anticancer activity and retention. *Anal Chem.* (2013); 85(3): 1683-8). DOI: 10.1021/ac302938q.

Jain, A. van der Meer, A. D. Papa, A.-L. Barrile, R. Lai, A. Schlechter, B. L. Otieno, M. A. Loudon, C. S. Hamilton, G. A. Michelson, A. D. Frelinger A. L. and Ingber, D. E. Assessment of whole blood thrombosis in a microfluidic device lined by fixed human endothelium. *Biomed.Microdevices.* (2016); 18, 73. DOI: 10.1007/s10544-016-0095-6.

Jalili-Firoozinezhad, S., Francesca, S., Gazzaniga, F.S., Calamari, E.L., et al. A complex human gut microbiome cultured in an anaerobic intestine-on-a-chip. *Nat Biomed Eng.* (2019); JUL 3(7): 520–531. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0397-0>.

Jang, K.J., Cho, H.S., Kang, D.H., Bae, W.G., Kwon, T.H., Suh, K.Y. Fluid-shear-stress-induced translocation of aquaporin-2 and reorganization of actin cytoskeleton in renal tubular epithelial cells. *Integr Biol.* (2011); Feb;3(2):134–41. DOI: 10.1039/c0ib00018c.

Jang, K.J., Monicah, A., Otieno, M.A., Ronxhi, J., et al. Reproducing human and cross- species drug toxicities using a Liver- Chip. *Sci. Transl. Med.* (2019); 6;11(517):eaax5516. DOI: 10.1126/scitranslmed.aax5516.

Kim, H.J., Ingber, D.E. Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation. *Integr Biol Quantitative Biosci Nano Macro* (2013); 5(9):1130-40. DOI: 10.1039/c3ib40126j.

Kim, H.J., Li, H., Collins, J.J., Ingber, D.E. Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2016); 113(1):E7-15. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522193112>.

Kimura, H., Sakai, Y., Fujii, T. Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* (2018); 33(1):43-48. DOI: 10.1016/j.dmpk.2017.11.003.

Krewski, D., Acosta Jr. D., Andersen, M., Anderson, H., et al. TOXICITY TESTING IN THE 21ST CENTURY: A VISION AND A STRATEGY. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* (2010); Feb; 13(0): 51–138. DOI: 10.1080/10937404.2010.483176.

Leslie, M. The case of the macho crocs. *Science.* (2017); Sep 1;357(6354):859-861. DOI: 10.1126/science.357.6354.859.

Lin, J.H. Species similarities and differences in pharmacokinetics. *Drug Metab Dispos.* (1995);23(10):1008-21.

Low, L.A., Mummery, C., Berridge, B.R. et al. Organs-on-chips: into the next decade. *Nat Rev Drug Discov.* (2021); 20, 345–361. <https://doi.org/10.1038/41573-020-0079-3>.

Maggiorani, D., Dissard, R., Belloy, M., Saulnier-Blache, J.S., Casemayou, A., Ducasse, L., Grès, S., Bellière, J., Caubet, C., Bascands, J.L., Schanstra, J.P., Buffin-Meyer, B. Shear Stress-Induced Alteration of Epithelial Organization in Human Renal Tubular Cells. *PLoS One.* (2015); Jul 6;10(7):e0131416. DOI: 10.1371/journal.pone.0131416.

Margalida, A., Bogliani, G., Bowden, C. G. R., Donázar, J. A. et al. One Health approach to use of veterinary pharmaceuticals, *Science*. (2014); 12 Dec Vol 346, Issue 6215 1296-1298. DOI: 10.1126/science.1260260.

Monneret, C. What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus Biologies*. (2017); Volume 340, Issues 9–10,. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.004>.

Nakao, Y., Kimura, H., Sakai, Y., Fujii, T. Bile canaliculi formation by aligning rat primary hepatocytes in a microfluidic device. *Biomicrofluidics*. (2011);5(2): 22212. <https://doi.org/10.1063/1.3580753>.

Nguyen, D.H.T., Stapleton, S.C., Yang M.T., Cha, S.S., Choi, C.K., Galie, P.A., Chen, C.S. Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2013);110(17):6712–7. DOI:10.1073/pnas.1221526110.

Oleaga, C., Bernabini, C., Smith, A. et al. Multi-Organ toxicity demonstration in a functional human in vitro system composed of four organs. *Sci Rep*. (2016); 6, 20030. <https://doi.org/10.1038/srep20030>.

OECD (2001), Test No. 121: Estimation of the Adsorption Coefficient (K_{oc}) on Soil and on Sewage Sludge using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069909-en>.

OECD (1984), Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070042-en>.

OECD (2006), Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070066-en>.

OECD (2010), Test No. 209: Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070080-en>.

OECD (2018), “Fish, Early-Life Stage (FELS) Toxicity Test (OECD TG 210)”, in Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264304741-13-en>.

OECD (2018), “Daphnia magna Reproduction Test (OECD TG 211)”, in Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264304741-12-en>.

OECD (2000), Test No. 216: Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070226-en>.

OECD (1992), Test No. 301: Ready Biodegradability, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070349-en>.

OECD (2002), Test No. 307: Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070509-en>.

OECD (2002), Test No. 308: Aerobic and Anaerobic Transformation in Aquatic Sediment Systems, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070523-en>.

OECD (2016), Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264762-en>.

OECD (2018), Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264304741-en>.

Powers, M.J., Domansky K, Kaazempur-Mofrad MR, Kalezi A, Capitano A, Upadhyaya A, et al. A microfabricated array bioreactor for perfused 3D liver culture. *Biotechnol Bioeng* (2002); 78(3): 257-69. DOI: 10.1002/bit.10143.

Raies A. B., Bajic V. B. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity WIREs. *Comput Mol Sci.* (2016); 6:147–172. DOI: 0.1002/wcms.1240.

Rodriguez-Antona C, Donato MT, Boobis A, Edwards RJ, Watts PS, Castell JV, et al. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica.* (2002);32(6):505-20. DOI: 10.1080/00498250210128675.

Russell, W. M. S, & Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique.* London: Methuen.

Seok, J. Warren, S. Cuenca, A. G. Mindrinos, M. N. Baker, H.V. et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* (2013); 110, 3507–3512. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222878110>.

Skardal, A., Murphy, S.V., Devarasetty, M. et al. Multi-tissue interactions in an integrated three-tissue organ-on-a-chip platform. *Sci Rep* (2017); 7, 8837. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08879-x>.

Snyder, S.A., Benotti, M.J. Endocrine disruptors and pharmaceuticals: implications for water sustainability. *Water Sci Technol.* (2010); 61(1):145-54. DOI: 10.2166/wst.2010.791.

Stokstad, E. Ecology. Zombie endocrine disruptors may threaten aquatic life. *Science.* (2013); 341 (6153). DOI: 10.1126/science.341.6153.1441.

Sung, J.H. Shuler, M.L. A micro cell culture analog (microCCA) with 3-D hydrogel culture of multiple cell lines to assess metabolism-dependent cytotoxicity of anti-cancer drugs. *Lab Chip.* (2009); 9(10):1385-94. DOI: 10.1039/b901377f.

Van den Berg, A., Mummery, C. L., Passiera, R., van der Meer, A.D. Personalised organs-on-chips: functional testing for precision medicine. *Lab Chip* (2019); 19, 198. DOI: 10.1039/c8lc00827b.

Waring, M. J. Arrowsmith, J. Leach, A. R. et al. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nat. Rev. Drug Discov.* (2015); 14, 475. <https://doi.org/10.1038/nrd4609>.

Wolfe, D.B., Qin, D., Whitesides, G.M. Rapid prototyping of microstructures by softlithography for biotechnology. *Methods Mol Biol Clift NJ.* (2010);583:81-107. DOI: 10.1007/978-1-60327-106-6_3.

Wu, Q., Liu, J., Wang, X., et al. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. *BioMed Eng OnLine* (2020); 19:9. <https://doi.org/10.1186/s12938-020-0752-0>.

Xue, D., Wang, Y., Zhang, J., Mei, D., Wang, Y., Chen, S. Projection-based 3D printing of cell patterning Scaffolds with multiscale channels. *ACS Appl Mater Interfaces.* (2018); jun 13;10(23):19428–19435. DOI: 10.1021/acsami.8b03867.