

Il modello animale alla luce delle nuove conoscenze: necessità di metodi scientifici human based

The animal model in light of new knowledge: the need for scientific human-based research methods

GIANNI TAMINO

Biologo, già docente presso l'Università di Padova

Per corrispondenza:
gtamin@tin.it

Riassunto

L'utilizzo di modelli animali per conoscere la fisiologia o la tossicologia a livello umano o per studiare farmaci e terapie da utilizzare sull'uomo risale a molto tempo fa, ma si è sviluppato soprattutto nell'ottocento. Da allora la ricerca è cambiata e sono diventati sempre più evidenti i limiti del modello animale per ottenere dati estrapolabili all'uomo.

Oggi è necessario cambiare paradigma ed utilizzare metodi di ricerca veramente scientifici human based.

Parole chiave: sperimentazione animale, metodo scientifico, tossicologia, ricerca human based

Abstract

The use of animal models to learn about human physiology or toxicology or to study drugs and therapies for use on humans dates back a long time, but it developed mainly in the nineteenth century. Since then, the research have changed and the limits of the animal model for obtaining data that can be extrapolated to humans have become increasingly evident.

Today it is necessary to change the paradigm and use truly scientific human based research methods.

Keywords: animal testing, scientific method, toxicology, human based research

Introduzione

E' da oltre un secolo che si discute sull'opportunità e sulla validità della sperimentazione sugli animali, soprattutto da quando vennero messi in discussione i metodi con cui realizzava la vivisezione Claude Bernard, metodi criticati in primo luogo da familiari e da alcuni suoi collaboratori.

Il problema riguarda due distinti aspetti: quello etico e quello scientifico. Non è mia intenzione trattare in questo articolo l'aspetto della liceità morale della pratica della vivisezione, non perché trascurabile, ma perché intendo rivolgere la mia attenzione agli aspetti scientifici o meglio al metodo scientifico alla base della sperimentazione animale; con una considerazione, però: se la sperimentazione animale è inattendibile, allora è anche eticamente inaccettabile, perché in tal caso il sacrificio di animali non avrebbe alcuna giustificazione.

La sperimentazione animale trae origine da una visione meccanicista e riduzionista della natura, che assimila uomini ed animali a macchine, di cui si pensa di poter conoscere il funzionamento attraverso una relazione meccanica tra le parti. In quest'ottica, l'animale-macchina diviene un modello per l'uomo-macchina. Ma ogni biologo sa che gli animali sono, come tutti gli organismi viventi, sistemi complessi e non macchine: nei sistemi complessi le proprietà emergono dalla relazione tra le parti e non sono solo il risultato di una semplice somma di proprietà.

Pertanto animali diversi possono presentare alcune caratteristiche anatomiche e fisiologiche simili o uguali, ma molte altre in parte o del tutto diverse. La corrispondenza tra risultati sull'animale e sull'uomo è dunque aleatoria. Qualunque dato ottenuto su un animale può risultare identico, simile o completamente diverso a livello umano e, anche se "a posteriori" verificiamo una certa percentuale di coincidenza dei dati, tuttavia "a priori" non sapremo se un farmaco o una sostanza saranno utili, innocui o tossici per l'uomo. E' dunque l'uomo, su cui comunque è obbligatorio provare qualunque farmaco o terapia, la vera "cavia", e la prova sull'animale è

solo l'alibi per rendere accettabile una sperimentazione sull'uomo, spesso eticamente discutibile.

A conferma di queste affermazioni vale la pena di prendere in esame un elenco ormai storico, anche se limitato e parziale, di errori e non corrispondenze non solo tra animali e uomo, ma anzitutto tra animali diversi. Per verificare l'azione tossica di sostanze naturali e farmaci si è utilizzata la cosiddetta "DL 50", cioè la "Dose Letale per il 50% degli animali impiegati", che consiste nel somministrare a forza la sostanza a un gruppo di animali, sino alla morte della metà di tale gruppo. Se consideriamo ad esempio la digitossina (farmaco per l'insufficienza cardiaca, estratto dalla digitale), questa sostanza presenta nei ratti una "DL50" 670 volte superiore rispetto ai gatti: come possiamo sapere quale valore possa avere un significato per l'uomo?

Analogamente la diossina che è altamente tossica per gli esseri umani, lo è anche per il porcellino d'India, ma la tossicità del composto per il criceto risulta alcune migliaia di volte inferiore¹. La DL50 quindi permette di dimostrare tutto e il contrario di tutto: basta scegliere la specie giusta. Anche il glicole etilenico, usato nei liquidi antigelo, ma anche in alcuni farmaci e cosmetici, risulta più tossico nell'uomo che in altre specie animali: la dose letale per l'uomo ha un valore di 1,4; per ratto, cavia e topo varia da 5,5 a 14. E' quindi chiaro che la conoscenza della dose letale di una sostanza per vari animali, non è predittiva per la tossicità della stessa sostanza su un altro animale, uomo compreso, come avevano già affermato Zbinden e Flury-Roversi².

Animali anche molto simili possiedono piccole differenze genetiche che producono enzimi, leggermente diversi, ma tali differenze sono sufficienti a modificare le condizioni chimico-fisiche alle quali tali enzimi esplicano la loro azione. Inoltre i processi metabolici sono ben diversi tra specie e specie e ad esempio diversa è la detossificazione a disposizione, cioè la modalità per eliminare, dopo averla modificata una sostanza tossica, farmaci compresi. Così la digitossina ha una vita media nel plasma di 18 ore nel ratto, ma di 216 nell'uomo; una cosa analoga si verifica con il fenilbutazone (72 ore nell'uomo e 6 nel ratto), ma in questo caso, si badi bene, un primate come l'uomo, una scimmia del genere Rhesus, ha un tempo di metabolizzazione simile a quello del ratto, cioè 8 ore³. Le diverse vie metaboliche che caratterizzano i diversi animali dipendono da adattamenti evolutivi alle diverse condizioni di vita.

Un'altra considerazione da fare riguarda la regolazione dell'espressione genetica e le modifiche di natura epigenetica (cioè modifiche che non alterano la sequenza del DNA): la scoperta che l'informazione contenuta nel DNA possa subire modificazioni post-trascrizionali ha minato la certezza della corrispondenza univoca e incontrovertibile tra DNA e proteina (dogma centrale). L'espressione genica non è soltanto regolata quantitativamente, ma lo è anche qualitativamente, attraverso ad esempio a) segnali interni o esterni che regolano quale parte di un cromosoma possa essere trascritta, b) lo *splicing* alternativo (cioè il processo che consente di ottenere molecole di mRNA maturo differenti, par-

tendo dallo stesso trascritto primario), c) la 'lettura del gene' che può iniziare e finire in punti diversi del DNA, d) combinazioni diverse delle tante catene polipeptidiche che possono essere sintetizzate sulla base della informazione contenuta nel DNA, e) l'unione o meno delle catene con altre molecole spesso piccole che modificano la funzione ecc. Pertanto i nostri circa 2300 geni sono in grado di generare centinaia di migliaia di proteine diverse che vengono formate su segnali e modificazioni epigenetiche, che non hanno a che fare con la sequenza del DNA. Quindi in specie diverse anche la stessa sequenza genica può dare risultati diversi.

■ La critica alla sperimentazione animale nel tempo

Come già visto, la critica scientifica alla sperimentazione animale si è sviluppata durante tutto il secolo scorso, ma è divenuta particolarmente rilevante negli ultimi decenni.

Molte delle considerazioni riportate in precedenza hanno trovato spazio, già vari anni fa, in un articolo della rivista 'Scientific American', pubblicato in Italia da 'Le Scienze' (Aprile 1997). Scrivono, infatti, N. D. Barnard e S. R. Kaufman⁴: *"Gli animali vengono prevalentemente utilizzati in laboratorio come 'modelli': mediante manipolazione genetica, interventi chirurgici o iniezione di sostanze estranee, i ricercatori producono in essi patologie che costituiscono un modello delle condizioni umane. Questo paradigma della ricerca è però irto di difficoltà. Le pressioni evolutive hanno prodotto sottili, ma significative, differenze tra le specie. Ogni specie ha molteplici sistemi di organi che hanno interazioni complesse. Uno stimolo applicato a un particolare sistema di organi perturba l'insieme delle funzioni organiche secondo modalità spesso imprevedibili. Questa incertezza mina gravemente la possibilità di estrapolare i dati ottenuti con un animale ad altre specie animali, uomo compreso ..."*

I 'modelli' animali sono, nel migliore dei casi, una buona imitazione delle condizioni umane, ma nessuna teoria può essere approvata o respinta sulla base di un'analogia... E, utilizzando differenti tipi di animali in differenti protocolli, gli sperimentatori possono trovare prove a sostegno di qualunque teoria. Per esempio, si sono utilizzati esperimenti sugli animali sia per provare sia per negare il ruolo cancerogeno del fumo."

In effetti utilizzando ceppi murini diversi si possono ottenere risultati contraddittori, data la diversa suscettibilità ai tumori dei diversi ceppi, per cui utilizzando ceppi ad alto sviluppo di tumori spontanei si può mascherare l'azione cancerogena di alcune sostanze⁵. Ad esempio il ceppo B6C3F1, particolarmente incline allo sviluppo di tumori, è usato spesso per la valutazione del potenziale cancerogeno, ma ha un'alta incidenza (fino al 58%) di tumori spontanei al fegato⁶.

Anche tra topi e ratti, molto più simili tra loro di quanto lo siano all'uomo, vi sono forti diversità; infatti il 46% dei prodotti chimici cancerogeni per i ratti non lo sono per i topi⁷.

Anche per quanto riguarda i farmaci, la non preditti-

vità di dati ottenuti su animali è ben nota da tempo al mondo scientifico. Si pensi, ad esempio all'ischemia cerebrale: David Wiebers e collaboratori della "Mayo Clinic"⁸, descrissero nel 1990 uno studio in cui si dimostrava che 25 composti in grado di ridurre i danni di tale malattia in vari roditori, gatti e altri animali non risultavano efficaci sull'uomo.

Più recentemente, nel 2004, alcuni scienziati del gruppo di Pandora Pound hanno scritto sul *British Medical Journal* (BMJ)⁹: "E' opinione diffusa, sia tra il pubblico che in ambiente medico, che la ricerca sugli animali contribuisca a curare le malattie nell'uomo, tuttavia, tale ipotesi non è suffragata da sufficienti prove Prove non sostanziali e affermazioni infondate sono spesso addotte come giustificazione della ricerca sugli animali, come quando si dichiara che la sua necessità "è ovvia", o che "la sperimentazione sugli animali è un valido metodo di ricerca che si è dimostrato tale negli anni". Simili asserzioni sono inadeguate come prove in un ambito di ricerca tanto controverso".

La stessa Pandora Pound è tornata sull'argomento 10 anni dopo, sempre sul BMJ¹⁰, affermando che, nonostante la cultura della ricerca stia cambiando e la ricerca sugli animali non sia più immune da sfide o critiche come una volta, si continua a fare studi sugli animali con risultati inaffidabili, dato che: "in pratica può essere difficile ottenere un cambiamento perché le parti interessate (governi, finanziatori, università, industrie di ricerca e ricercatori) possono tutti avere interessi, non di rado finanziari, a continuare a fare le cose come sono sempre state fatte".

A conferma di ciò, in Italia sono quasi 600 mila gli animali usati in laboratorio, oltre 12 milioni nell'Unione Europea, per testare farmaci, prodotti chimici, pesticidi, detersivi e non solo (dati forniti in base alla direttiva 2010/63/UE).

Un'importante critica alla sperimentazione sugli animali è venuta da uno studio sulle malattie infiammatorie realizzato nel 2013 dal gruppo dello *Stanford Genome Technology Center*¹¹. La ricerca, durata 10 anni, è iniziata studiando i globuli bianchi di centinaia di pazienti con gravi ustioni, traumi o sepsi, per vedere quali geni venivano usati dai globuli bianchi nel rispondere a questi segnali di pericolo. "I ricercatori hanno trovato informazioni interessanti e accumulato un grande numero di dati, rigorosamente raccolti, che dovrebbero contribuire a far progredire il settore", ha detto Ronald W. Davis, esperto di genomica presso la stessa Stanford University e co-autore del nuovo studio.

Il gruppo aveva cercato di pubblicare le sue scoperte in diversi giornali, ma l'obiezione era stata che i ricercatori non avevano dimostrato come i topi fornissero la stessa risposta genica.

"Erano così abituati a fare studi sui topi che per loro era quello il solo modo di convalidare le cose", ha detto Davis. "Questo ci ha fatto pensare: Lo stesso avviene nei topi, oppure no?" Il gruppo decise di indagare, aspettandosi di trovare alcune somiglianze. Ma quando i dati furono analizzati, non ve ne era alcuna. I fallimenti dei farmaci divennero chiari. Ad esempio, un gene poteva essere at-

tivato spesso nei topi, mentre il gene equivalente veniva soppresso negli esseri umani. Una sostanza che agiva nei topi disattivando un gene poteva avere una risposta letale nell'uomo". Un chiaro esempio dell'importanza delle differenze epigenetiche nell'espressione genica.

Poiché infiammazioni e sistema immunitario sono coinvolti in gran parte delle malattie, ciò fa crollare di riflesso anche la predittività dei modelli animali di tumori, allergie, infezioni, ecc.

■ Lo sviluppo di metodi sostitutivi: un cambiamento epocale alla nostra portata

Già oltre trent'anni fa l'Unione Europea si è posta il problema della sostituzione dei metodi che impiegano animali, per rispondere sia a richieste provenienti dalla società civile che dal mondo scientifico, con particolare riguardo all'abolizione di test su animali nel campo della cosmetica. Così nel 1991 la Commissione europea ha istituito l'ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) per trovare alternative all'impiego degli animali a fini sperimentali o ad altri scopi scientifici. L'ECVAM ha coordinato a livello europeo la valutazione di sostanze chimiche e prodotti di vario genere, tra cui farmaci, vaccini, dispositivi medici, cosmetici, prodotti per usi domestici e prodotti agricoli, ecc. A partire dal 2011 le attività dell'ECVAM sono state trasferite all'EURL ECVAM (European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing).

Ma il più importante documento a favore di metodi alternativi (o meglio sostitutivi) alla sperimentazione animale è arrivato dall'US National Research Council, che, nel 2007, ha pubblicato *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*, in cui viene annunciata una rivoluzione nella valutazione di tossicità: "questa si allontanerà dal modello animale - inaffidabile e non predittivo per l'uomo - per fare ricorso al potenziale di una ricerca assai più moderna. Tale cambiamento viene definito un "cambiamento epocale [...] di quelli che danno un nuovo corso alla storia della scienza, come è avvenuto con la scoperta della penicillina, della doppia elica del DNA, del primo computer ..."¹².

Come ha dichiarato Herman Koeter, già direttore dell'EFSA (Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare) nel comunicato stampa di chiusura del "7° Congresso Mondiale sulla Sperimentazione Animale e i Metodi Alternativi" (Roma, 2009), cui hanno partecipato centinaia di scienziati da tutto il mondo, "Le nuove tecnologie sono capaci di raccogliere una quantità mai raggiunta prima di informazioni sui possibili effetti avversi recati da una sostanza ai sistemi biologici. Sono anche in grado di generare una quantità di conoscenza di gran lunga maggiore di quella che fino ad oggi abbiamo saputo individuare e capire. Esse ci faranno considerare, in un futuro assai vicino, l'uso degli animali a fini sperimentali estremamente obsoleto".

Successivamente Thomas Hartung, farmacologo dell'Università di Costanza, in un articolo, pubblicato nel 2009 su *Nature*¹³, affermava: "Solo un radicale rinnovamento della sperimentazione tossicologica ci consentirà

di affrontare le prossime sfide per la tutela della salute e dell'ambiente.”

Hartung in questo articolo mette sotto accusa la capacità predittiva dei test effettuati su animali, affermando che la stessa sostanza chimica ha una corrispondenza tra animali diversi tra il 53 e il 60 per cento: ma ciò significa che otterremmo un risultato simile anche lanciando una moneta.

D'altra parte, considerando che, come ricorda l'Agenzia Europea per l'ambiente, le sostanze chimiche esistenti sono oltre centomila, anche se i dati di tossicità ottenuti sugli animali fornissero una leggera corrispondenza con quelli umani, utilizzando tutti i laboratori del mondo che fanno test sugli animali, servirebbero secoli per conoscere gli effetti di ogni singola sostanza, ma ignorando l'effetto cocktail.

■ Una nuova tossicologia basata sulla tecnologia avanzata

Nel corso degli ultimi anni il programma “*Toxicity Testing in the 21st Century*” ha avuto ulteriori sviluppi, come la ricerca computazionale di Tox21, che raggruppa le risorse federali e le competenze dell'EPA, del *National Institutes of Environmental Health Sciences* (Programma Tossicologico Nazionale), del *National Institutes of Health e della Food and Drug Administration*, per utilizzare la tecnologia robotica per lo screening di migliaia di sostanze chimiche. La creazione di nuovi metodi per studiare la tossicità, può migliorare la valutazione delle sostanze chimiche immesse nell'ambiente e lo sviluppo di nuovi farmaci.

Come si legge nel sito del *National Institutes of Health*, la maggior parte delle persone sono esposte a molte sostanze chimiche, nel corso della loro vita, attraverso varie fonti, tra cui cibo, prodotti per la pulizia e medicine. In alcuni casi, queste sostanze possono essere tossiche: oltre il 30 per cento dei farmaci dimostratisi promettenti hanno fallito nel corso degli studi clinici sull'uomo, perché sono risultati tossici, nonostante promettenti studi preclinici in modelli animali.

In uno studio del 2011, pubblicato su *Scientific American*¹⁴, viene illustrato un metodo robotizzato, che non usa animali, è veloce, affidabile e decisamente meno costoso. L'articolo, intitolato “Un robot permette test ad alta velocità delle sostanze chimiche”, spiega che delle oltre 80.000 sostanze chimiche utilizzate negli USA, solo 300 circa sono state sottoposte finora a test di tossicità, e solo 5 sono state vietate o sono state in qualche modo limitate nell'uso. L'apparecchiatura descritta è formata da lastre in plastica su cui si trovano 1536 minuscoli fori in cui il robot lascia cadere quantità variabili delle diverse sostanze chimiche, che vanno a reagire con cellule umane e proteine umane. In pratica, su ogni lastra si fanno 1536 sperimentazioni contemporaneamente, testando vari composti a varie concentrazioni e miscele di composti diversi.

Come pubblicato a marzo del 2015 nel sito nel *National Institutes of Health*¹⁵, i ricercatori hanno testato in breve tempo 179 sostanze chimiche, utilizzando cellule pro-

venienti da più di mille persone diverse, per studiare la vasta gamma di sensibilità umana alle diverse sostanze.

■ Come sostituire i test sugli animali per garantire la salute umana

Come è solito ricordare il già citato prof. Thomas Hartung, l'uomo non è un ratto di 70 Kg, e quindi l'unico modello dell'uomo è l'uomo stesso. Quindi il principio scientifico fondamentale dei metodi sostitutivi è quello di utilizzare dati ottenuti su sistemi riferibili alla specie umana (*human based*), come cellule, tessuti, organi, processi metabolici, ecc., valutando eventualmente i risultati all'interno di sistemi computerizzati che simulino il comportamento dell'organismo umano in toto, (come ad esempio il progetto *Virtual Physiological Human – VPH*). Secondo Sarah Adler e coll.¹⁶, particolarmente interessante è la possibilità di utilizzare cellule staminali embrionali umane, considerate dagli autori “*il metodo più promettente per valutare la tossicità in vitro*”.

In questa direzione vanno anche nuovi metodi, quali le nuove colture in vitro in tre dimensioni, che riproducono l'ambiente umano “in vivo”; le colture integrate multiorgano, in cui più organi, fisicamente separati, sono interconnessi dalla circolazione sistemica; i bioreattori multicompartimentali, che permettono di simulare le interazioni tra organi dell'organismo intero e la reazione a farmaci e sostanze, gli “*organs on chip*”, che sfruttano una nuova tecnologia, la microfluidica, per simulare il funzionamento degli organi, ma anche i virtual organs, gli organi bioartificiali, ed altro ancora.

Come spiegano Anna Loewa, James J. Feng e Sarah Hedtrich¹⁷, la ricerca biomedica sta subendo un cambio di paradigma a causa dei notoriamente alti tassi di fallimento dell'attuale processo di sviluppo dei farmaci. I principali fattori di questa transizione sono i limiti dei modelli animali, che soffrono di differenze interspecifiche e di scarsa previsione delle condizioni fisiologiche e patologiche umane. Per colmare questa lacuna, sono in fase di sviluppo modelli di malattie umane bioingegnerizzate; nuovi studi preclinici e clinici possono beneficiare di questi modelli, concentrandosi su organoidi, modelli di tessuti bioingegnerizzati e organi *on chip*.

Negli ultimi anni sono stati predisposti, tra gli altri, organoidi di reni, anche vascolarizzati, mini placente, organoidi di parti del cervello e così via. Queste tecniche possono dunque essere impiegate per la ricerca tossicologica e di nuovi farmaci, nello studio dei tumori e di loro terapie, ma anche di malattie virali come il Covid e di specifici vaccini, oppure di malattie neurodegenerative come il Parkinson o della biologia e delle patologie dello sviluppo, per citare solo alcuni filoni di ricerca possibili.

■ Conclusioni

Attualmente, secondo l'ECVAM, sono disponibili molte centinaia di metodi senza animali, di cui molti già validati¹⁸, tuttavia questi metodi sono raramente utilizzati e di solito, anche se meno efficaci, vengono preferiti i test sugli animali.

A questo proposito è utile ricordare il test di pirogenicità, basato sull'utilizzo di sangue umano intero, descritto per la prima volta da Thomas Hartung nel 1995 e già in commercio, oltre che accettato da enti regolatori europei ed americani, fondamentale per lo studio, tra l'altro, dei vaccini, che permetterebbe di risparmiare ogni anno nel mondo la vita di 400.000 conigli. Questo test, che evita i limiti di quello che utilizza animali, non è praticamente utilizzato, mentre l'impiego di conigli per test di pirogenicità è aumentato.

Come si può spiegare questa situazione? Anzitutto la mancanza di conoscenza da parte di molti ricercatori dei nuovi metodi e l'abitudine a continuare con la vecchia strada: "si è sempre fatto così". Tuttavia anche altre possono essere le cause, ad esempio molte riviste per pubblicare le ricerche pretendono dati ottenuti sugli animali oppure sono i finanziatori della ricerca che pongono tali condizioni. In altri casi, come per l'approvazione di nuovi farmaci o di nuove terapie, sono spesso le norme ad imporre l'uso di animali.

Per queste ragioni è di grande rilievo quanto avvenuto recentemente negli Stati Uniti: alla fine di dicembre del 2022 è stata approvata una legge, chiamata "FDA Modernization. Act 2.0", che elimina l'obbligo di testare l'efficacia e la sicurezza dei farmaci sugli animali, prima di effettuare test sugli esseri umani. In pratica la *Food and Drug Administration*, l'agenzia federale statunitense che si occupa di regolamentare i prodotti alimentari e farmaceutici, potrà approvare farmaci testati con metodi alternativi alla sperimentazione animale: i test sugli animali non sono dunque più obbligatori, anche se non sono stati proibiti.

E' fondamentale, però, che anche in Europa si arrivi allo stesso risultato ed in questo senso va la risoluzione approvata il 15 settembre 2021 dal Parlamento Europeo che invita la Commissione Europea a realizzare un piano di azione per superare fattivamente la sperimentazione animale, come richiesto da molti ricercatori e da milioni di cittadini europei (si veda l'iniziativa "Stop Vivisection" che ha ottenuto oltre un milione di firme). Ma finora la Commissione Europea non ha mai dato seguito a queste richieste e sollecitazioni.

Rimane dunque ancora necessario che il mondo della ricerca e la pubblica opinione continuino a chiedere con insistenza un cambio di paradigma, per garantire la salute dei cittadini, passando dagli obsoleti test sugli animali a metodi *human based*. A tale proposito servono fondi adeguati per la ricerca senza animali e iniziative, anche a livello internazionale, per favorire la validazione e l'obbligatorietà, quando disponibili, di metodi scientifici *human based* validati.

Bibliografia

1. Tettamanti M. Chimica e Ambiente, ed. Cosmopolis. 2003.
2. Zbinden G and Flury-Roversi M. Significance of the LD50-test for the toxicological evaluation of chemical substances. Arch Toxicol, 1981; 47:77-99
3. Levine R. Pharmacology: drug actions and reactions. Little Brown and Co. 1978.
4. Barnard ND e Kaufman SR. Dispendiosa e inattendibile. Le Scienze 1997; 344: 82-4.

5. Knight A, Bailey J and Balcombe J. Animal Carcinogenicity Studies: 2. Obstacles to Extrapolation of Data to Humans. Alternatives to Laboratory Animals 2006; 34:29-38 (<https://doi.org/10.1177/026119290603400118>).
6. Meijers JM, Swaen GM and Bloemen LJ. The predictive value of animal data in human cancer risk assessment. Regulatory Toxicology and Pharmacology 1997; 25: 94-102.
7. Di Carlo FJ. Carcinogenesis bioassay data: correlation by species and sex. Drug Met. Rev. 1984; 15: 409- 13.
8. Wiebers DO, Adams HP Jr, Whisnant JP. Animal models of stroke: Are they relevant to human disease? Editorial. Stroke 1990; 21:1-3.
9. Pound P, Ebrahim S, Sandercock P, Bracken MB, Roberts I (Reviewing Animal Trials Systematically (RATS) Group). Where is the evidence that animal research benefits humans? BMJ 2004; 328:514-7
10. Pound P, Bracken MB. Is animal research sufficiently evidence based to be a cornerstone of biomedical research? BMJ 2014; 348:g3387.
11. Seok J, Warren S, Cuenca A, Mindrinos M, Baker H, Xu W, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. Proc Natl Acad Sci 2013;110:350712.
12. National Research Council. Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. Washington, DC: The National Academies Press. 2007 (<https://doi.org/10.17226/11970>).
13. Hartung T. Toxicology for the twenty-first century. Nature 2009; 460: 208-12.
14. Biello D. Robot Allows High-Speed Testing of Chemicals. Scientific American 2011, (<http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=robot-allows-high-speed-chemical-testing>).
15. <http://www.ncats.nih.gov/pubs/features/chem-tox> .
16. Adler S, Pellizzer C, Hareng L, Hartung T, Bremer S. First steps in establishing a developmental toxicity test method based on human embryonic stem cells. Toxicology in vitro 2008; 22: 200-11.
17. Loewa A, Feng JJ and Hedtrich S. Human disease models in drug development - Nature Reviews Bioengineering 2023; 1:545-59 (<https://doi.org/10.1038/s44222-023-00063-3>).
18. EURL ECVAM STATUS REPORT, 2020. Non-animal Methods in Science and Regulation . (<https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC123531/jrc123531online.pdf>).