



**Somos calidad,
somos USC**

Métodos alternativos a la experimentación animal: una revisión sistemática de sus avances y limitaciones

Autor

**Isabella Vivas Páez
Natalia Gaviria Escamilla**

Químico farmacéutico

Director

Luis Alberto Illicachi Romero

**Grupo de Investigación
QUIBIO**

**Línea de Investigación
Desarrollos tecnológicos y biotecnológicos**

**Facultad de Ciencias Básicas
Química farmacéutica
Universidad Santiago de Cali
Santiago de Cali - Colombia
2026**

Grupo de Investigación: QUIBIO

Línea de Investigación: Desarrollos tecnológicos y biotecnológicos

Nombrar ODS en el que se enmarca el trabajo de grado :

- Industria, innovación e infraestructura.
- Producción y consumo responsable.

Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Química Farmacéutica
Cali, Colombia
2026

IMPACTOS

Relacione el (los) impacto(s) que presentó el Trabajo de Grado Según los siguientes criterios:

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico	Revisión sistemática donde se abordan métodos alternativos de menor costo a comparación de ensayos en animales.	Industria cosmética, farmacéutica y laboratorios de investigación.
Responsabilidad social	Promover prácticas científicas más humanas y responsables; siendo éticos en la experimentación animal.	Organizaciones del bienestar animal.
Científico	Revisión sistemática sobre el estado actual, avances y limitaciones de los nuevos métodos alternativos.	Estudiantes e investigadores.
Indicadores de Gestión	Recopilación de información sobre métodos alternativos que existen, listos para usarse y qué obstáculos presentan; con la posibilidad de ser guía para la toma de decisiones en instituciones, sobre cómo avanzar hacia una ciencia sin animales.	Agencias reguladoras, universidades, empresas farmacéuticas y cosméticas.
Tecnológico	Identificación de nuevas tecnologías como, órganos en chip, impresión 3D y modelos in silico aplicada a la toxicología.	Centros de investigación y desarrollo.
Técnico	Implementación de criterios de inclusión y exclusión para el análisis de diversas fuentes científicas sobre métodos alternativos.	Estudiantes y profesionales de química farmacéutica.
Ambiental	Generar conciencia sobre el uso de animales en laboratorio, contribuyendo con conocimientos que vayan relacionados con principios de la ciencia sostenible.	Ecosistemas y comunidad científica.
Social	Entendimiento y apropiación del término cruelty free y su relación con el bienestar animal y la ética.	Consumidores, movimientos animalistas y estudiantes.
Cultural	Fortalecer la cultura científica basada en las 3 R (reemplazar, reducir, refinar) dentro de la formación universitaria.	Comunidad educativa.

MÉTODOS ALTERNATIVOS A LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL: UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA DE SUS AVANCES Y LIMITACIONES

Isabella Vivas Páez (isabella.vivas00@usc.edu.co) Natalia Gaviria
Escamilla (natalia.gaviria01@usc.edu.co)

Grupo de investigación QUIBIO

RESUMEN

La experimentación animal ha sido una práctica ampliamente utilizada en la investigación biomédica, farmacéutica y cosmética; sin embargo, en los últimos años ha sido cuestionada por sus implicaciones éticas y por las limitaciones que presenta para predecir con precisión la respuesta humana. La presente revisión se basó en ensayos con el mismo tópico, priorizando que hayan sido publicados en los últimos 5 años en bases de datos como PubMed, Scopus, SciELO, Springer, Nature, Science Direct, British Journal of Nutrition, Taylor & Francis, Redalyc y MDPI. Entre los trabajos se hallaron algunos muy relevantes como (Park et al., 2024), (Silva & Tamburic, 2022) (Raies y Bajic, 2016). Esta revisión aborda el desarrollo de métodos alternativos frente a la experimentación animal, con énfasis en estrategias como los modelos *in vitro*, *in silico*, organoides, órganos en chip, bioimpresión 3D y modelos cutáneos reconstruidos. Los hallazgos muestran que estas herramientas ofrecen ventajas importantes en términos de relevancia biológica, reproducibilidad, reducción del uso de animales y aplicación en áreas como toxicología, evaluación de seguridad y cosmética. No obstante, también se identificaron limitaciones asociadas con la estandarización, la validación regulatoria y la implementación amplia de estas metodologías en distintos contextos científicos e industriales. En conclusión, los métodos alternativos constituyen una vía prometedora para avanzar hacia una ciencia más ética, moderna y humanamente relevante, aunque su consolidación requiere mayor fortalecimiento técnico e institucional.

Palabras clave: *Métodos alternativos; experimentación animal; organoides; órganos en chip; toxicología*

ALTERNATIVE METHODS TO ANIMAL EXPERIMENTATION: A SYSTEMATIC REVIEW OF ITS ADVANCES AND LIMITATIONS

ABSTRACT

Animal experimentation has been a widely used practice in biomedical, pharmaceutical, and cosmetic research; however, in recent years it has been questioned due to its ethical implications and its limitations in accurately predicting human responses. This review was based on studies with the same topic, prioritizing those published in the last 5 years in databases such as PubMed, Scopus, SciELO, and Springer. Among the studies were some highly relevant ones, such as (Park et al., 2024), (Silva & Tamburic, 2022), and (Raies & Bajic, 2016). This review addresses the development of alternative methods to animal experimentation, with an emphasis on strategies such as *in vitro* and *in silico* models, organoids, organs-on-a-chip, 3D bioprinting, and reconstructed

skin models. The findings show that these tools offer significant advantages in terms of biological relevance, reproducibility, reduced animal use, and application in areas such as toxicology, safety assessment, and cosmetics. However, limitations were also identified related to standardization, regulatory validation, and the widespread implementation of these methodologies in different scientific and industrial contexts. In conclusion, alternative methods represent a promising path toward a more ethical, modern, and humanly relevant science, although their consolidation requires greater technical and institutional strengthening.

Keywords: *Alternative methods; animal testing; organoids; organs-on-a-chip; toxicology*

HIGHLIGHTS

- Los avances de los métodos alternativos a la experimentación animal, como los organoides, órganos en chip, modelos *in vitro* e *in silico* y la bioimpresión 3D, han permitido reemplazar ciertas metodologías; logrando imitar los procesos biológicos humanos, superando en relevancia y precisión a muchos modelos animales convencionales, particularmente en áreas como toxicología, biomedicina y evaluación cosmética.
- En la industria cosmética se ha posicionado como uno de los sectores más comprometidos con la eliminación de pruebas en animales, gracias a las restricciones regulatorias implementadas en la Unión Europea y en más de diez países, lo que ha impulsado el desarrollo de modelos cutáneos alternativos como piel reconstruida, explantes *ex vivo* y plataformas skin-on-a-chip, consolidándose como herramientas con respaldo científico cada vez más sólido.
- El desarrollo tecnológico de los métodos alternativos ha sido notable en los últimos años, sin embargo su implementación sigue enfrentando obstáculos relacionados con la estandarización entre laboratorios, la validación regulatoria internacional y las limitaciones económicas e institucionales, lo que demuestra que avanzar hacia una ciencia libre de experimentación animal exige no solo innovación técnica, sino también cambios normativos y transformación en la cultura científica.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años han surgido diversos debates sobre el uso de animales en investigaciones biomédicas y tecnológicas, dudando de la validez científica, ya que algunos investigadores afirman que no siempre el efecto evidenciado en animales ocurre en un ser humano de la misma forma; por otro lado, está la ética, que hoy en día es cuestionada por el fuerte pensamiento de protección animal, considerándose a los animales seres vivos capaces de sufrir y sentir dolor (Contreras et al., 2018). La experimentación en animales ha existido por décadas, se consideran indispensables para garantizar la seguridad de ciertos productos. Pero ahora con el gran avance tecnológico y la moralidad, se puede buscar alternativas que ayuden a reducir o incluso eliminar el uso de animales. Entre ellas se encuentran los ensayos *in vitro*, los cuales utilizan cultivos celulares animales y humanos con el fin de crear datos con mayor precisión y socialmente aceptados (Lee et al., 2022). Estos métodos han mostrado resultados positivos en pruebas de toxicidad y genotoxicidad, algunos de estos son, el test de Ames, en los cuales se evalúan compuestos químicos sin la necesidad de utilizar animales (Abdollahi et al., 2024).

La forma en que la sociedad percibe la experimentación animal no depende únicamente de los avances científicos que esta práctica genera, sino también de cómo dicha información es presentada y difundida a través de los medios de comunicación. Investigaciones recientes han demostrado que los tipos de comunicados generan reacciones dependiendo de su percepción, las noticias negativas muestran un alto índice de rechazo y frustración, mientras que los sucesos positivos como avances tecnológicos y médicos provocan sensaciones

esperanzadoras; sea cual sea el suceso este va a influir de manera significativa en las actitudes, percepciones y juicios morales de las personas frente al uso de animales en la ciencia. Este aspecto resulta fundamental para abordar el tema, pues evidencia que la opinión pública, moldeada en gran medida por la comunicación mediática, tiene incidencia directa en la formulación de políticas y normativas relacionadas con la investigación científica (Camargo et al., 2025).

Por otro lado, la biotecnología ha ayudado al desarrollo de diferentes sistemas entre los cuales están los órganos en chip y modelos computacionales que pueden predecir muy bien las respuestas humanas y ser muy precisos (Madden et al., 2020) (Hartung, 2022). Sin embargo, estas ventajas han sido contrarrestadas debido a los desafíos que se presentan en la actualidad. Entre ellos se encuentran los requerimientos para validar la viabilidad frente a métodos tradicionales. Se evidencian dificultades para tener acuerdos globales para la internalización de estos métodos, debido a que se requiere un consenso entre las instituciones científicas, los organismos reguladores y la industria para comenzar la transición (Silva & Tamburic, 2022) (Contreras et al., 2018).

Además, es necesario mencionar que, en países como Inglaterra, Escocia, Gales e Irlanda del Norte han fortalecido la legislación a favor de las "3 R" que son reemplazar, reducir y refinar para evitar la crueldad animal en sus investigaciones y buscando métodos alternativos. Las empresas aún no buscan adoptar estos métodos y no tienen un gran impacto internacional (Díaz et al., 2020) (Clark, 2017). Es por eso que el estudio de estos se centra en dos parámetros, el primero es demostrar la eficacia y el segundo es superar problemas prácticos como la falta de infraestructura y la necesidad de capacitación laboral especializada para que funcionen (Learman, 2021).

La estandarización de estos métodos alternativos es complicada y requiere de tiempo, de tal manera es necesario que todos los laboratorios a nivel mundial lleguen a un acuerdo para la validación internacional (Gruber, 2004). Aún se muestran diversos obstáculos que impiden la prohibición del uso de animales en los procesos de experimentación. Métodos como *in vitro*, *in silico*, chips microfluídicos y organoides han sido relevantes en su capacidad para demostrar su eficacia y así reducir la necesidad de usar animales (Vinardell, 2021) (Nelson et al., 2024). Es importante mencionar que la industria cosmética ha sido una de las áreas con más llamados de atención por parte de la sociedad debido a sus pruebas en seres vivos. Gracias a esta problemática, ha incrementado las ventas de productos con "cruelty free" que busca utilizar métodos alternativos que son considerados éticos. (Bustos & Valenzuela, 2018).

En el sector de la toxicología se utilizan métodos tradicionales para diversos procesos como irritaciones oculares, toxicidades agudas o sensibilidades cutáneas, aunque se ha demostrado que los métodos alternativos, tanto *in silico* como *in vitro*, son éticos y pueden tener resultados igual de rápidos y precisos (de Lapuente et al., 2014) (Nuwer, 2024). De manera similar, cada vez se desarrollan más avances tecnológicos para ofrecer una nueva forma de pensar sobre el uso de animales en la experimentación. Por ejemplo, las estructuras tridimensionales de tejidos humanos han demostrado una eficacia significativa en el desarrollo de modelos de piel, vasos sanguíneos y otros tejidos, reduciendo así la necesidad de animales en la investigación (Movia et al., 2020) (Bédard et al., 2020). También debemos considerar enfoques ambientales que garanticen el bienestar al tener en cuenta las formas en que los animales aceptan los métodos diseñados por humanos (Maia et al., 2019).

El desarrollo de nuevos modelos alternativos a la experimentación animal no solo ha ganado impulso en los últimos años debido a las preocupaciones éticas planteadas por la sociedad, sino también debido a su capacidad para proporcionar una mayor precisión en la ejecución de un protocolo y un mejor cuidado no solo para los animales, sino también para los humanos, quienes usarán artículos creados desde un laboratorio. Estos modelos conectan los resultados medibles con las sensaciones de los seres vivos, evitando su sufrimiento y mejorando los procesos de investigación (Kiani et al., 2022) (Mushtaq et al., 2018). Sin embargo, las barreras regulatorias económicas y culturales que se imponen internacionalmente son un atraso a la implementación de estas alternativas. El derrumbe de estas barreras se ha vuelto una necesidad de la sociedad para seguir mejorando los modelos de experimentación en productos farmacológicos y la continuidad hacia el respeto por la vida animal (Rivero et al., 2019).

En términos generales, la presente revisión sistemática tiene como objetivo describir experiencias exitosas de adopción de métodos alternativos a la experimentación animal, explicar las ventajas y limitaciones de dichos métodos en comparación con los modelos animales tradicionales, y analizar los desafíos éticos, regulatorios, económicos y culturales que dificultan su adopción global.

2. METODOLOGÍA

En el presente trabajo se implementó la herramienta de Rayyan para filtrar y seleccionar los artículos más relevantes para la revisión sistemática. Se priorizó el uso de fuentes actuales y confiables que enriquecieran el tema. La búsqueda se realizó en bases de datos científicas como PubMed, Scopus, SciELO, Springer, Nature, Science Direct, British Journal of Nutrition, Taylor & Francis, Redalyc y MDPI. Una vez reunida la información, se organizó en categorías como avances tecnológicos, barreras regulatorias, aspectos éticos y aplicaciones en biomedicina y toxicología. Finalmente, se llevó a cabo un análisis crítico orientado a mostrar no solo el estado actual de los métodos alternativos, sino también los retos que enfrentan y las oportunidades que ofrecen para avanzar hacia una ciencia más ética, rigurosa y responsable.

2.1. Búsqueda bibliográfica y criterios de inclusión y exclusión.

Para la selección de artículos se emplearon directrices que permiten garantizar la calidad de los artículos incluidos y evaluar el riesgo de sesgo, el proceso de selección se llevó a cabo siguiendo los lineamientos PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis). La evaluación fue realizada de forma independiente, donde se analizaron los títulos, resúmenes y posteriormente el texto completo de los artículos preseleccionados. En los casos en que existían discrepancias respecto a la inclusión o exclusión de un artículo, estas se resolvieron mediante un consenso entre los revisores.

Se realizaron búsquedas bibliográficas en la base de datos de la Universidad Santiago de Cali utilizando las palabras clave *in vitro methods*, *animal testing*, *cosmetics testing*, *synthetic leathers*, *organoids*, *alternatives to animal experimentation*. Combinando conectores como “And”, “Or” y “Not”.

La búsqueda bibliográfica permitió identificar un total de 350 artículos en las bases de datos consultadas. Tras aplicar el cribado por título y resumen, se excluyeron 180 artículos por no cumplir con los criterios de inclusión establecidos, quedando 170 artículos para evaluación a texto completo. De estos, 70 fueron excluidos por no tener relación directa con el tema a tratar. Finalmente, 100 artículos cumplieron la totalidad de los criterios y fueron incluidos en la presente revisión sistemática.

Se dio prioridad a los artículos publicados en los últimos 5 años. Estos estudios se centraron en el desarrollo de métodos alternativos a la experimentación animal para la prueba de fármacos y cosméticos. Se consultaron todas las bases de datos mencionadas para localizar estudios relevantes. Se excluyeron los artículos que no pertenecían a publicaciones científicas (como los publicados en blogs y opiniones sin respaldo académico), así como los estudios que no estaban directamente relacionados con el tema de estudio. Los datos se extrajeron de cada artículo según los detalles más relevantes, incluido el objetivo del estudio, la metodología empleada, los hallazgos principales del estudio, los aspectos relevantes del estudio, las limitaciones del estudio y la relación del estudio con nuestro trabajo.

3. DESARROLLO Y DISCUSIÓN

3.1 Circunstancia actual de la experimentación animal y fundamento del cambio metodológico

Durante décadas, la experimentación animal fue considerada como una vía necesaria para identificar reacciones adversas, evaluar seguridad y explorar mecanismos fisiopatológicos de interés farmacéutico, toxicológico y cosmético. Este enfoque era aceptado debido a la similitud biológica entre determinadas especies y el ser humano, lo que favoreció su uso en protocolos de investigación básica y aplicada. Sin embargo, el panorama contemporáneo muestra una transformación profunda, impulsada tanto por objeciones éticas como por cuestionamientos relacionados con la reproducibilidad, la predictibilidad y el costo de estos modelos. En el caso de los cosméticos, esta transición ha sido especialmente visible. La Unión Europea marcó un punto de inflexión al prohibir la comercialización de productos y componentes evaluados en animales, medida que posteriormente fue seguida por países como India, Nueva Zelanda, Israel, Noruega, Brasil (São Paulo), Corea del Sur, Taiwán, Guatemala y Turquía. Aun así, la permanencia de estas prácticas en algunos contextos nacionales demuestra que la sustitución total todavía no es homogénea a escala global (Doke & Dhawale, 2015; Lee et al., 2022).

A las consideraciones éticas se suman cuestionamientos científicos relacionados con la capacidad predictiva de los modelos animales. Aunque el uso de ratones, ratas, conejos, perros, primates y otras especies permitió construir una base experimental fundamental para la investigación biomédica, diversos estudios han evidenciado que la extrapolación entre especies no siempre reproduce de manera confiable la respuesta humana. Como consecuencia, una proporción importante de los fármacos que muestran resultados favorables en etapas preclínicas fracasan posteriormente durante los ensayos clínicos debido a problemas de eficacia, toxicidad o comportamiento farmacocinético. Asimismo, se han señalado limitaciones prácticas asociadas con los elevados costos, los tiempos de ejecución y los requerimientos técnicos de estos modelos (Doke & Dhawale, 2015; Lee et al., 2022).

Frente a estas limitaciones, comenzó a consolidarse una agenda científica orientada al reemplazo, la reducción y el refinamiento del uso de animales, en concordancia con los principios de las 3R. En este contexto, los métodos alternativos dejaron de considerarse herramientas complementarias para convertirse en componentes centrales de la investigación preclínica. Modelos *in vitro*, *in silico*, *in chemico*, *ex vivo*, microfisiológicos y otras nuevas metodologías de aproximación (NAM) han sido desarrollados no solo como respuesta a preocupaciones éticas, sino también por su potencial para ofrecer una mayor relevancia biológica y una mejor capacidad predictiva para la evaluación de seguridad y eficacia (Hill, 2011; Lee et al., 2022).

No obstante, la adopción generalizada de estas metodologías continúa enfrentando importantes desafíos. Diversos autores coinciden en que la implementación de los NAM (Metodologías de nuevo enfoque) depende de la disponibilidad de procedimientos de validación robustos, criterios regulatorios armonizados y mecanismos que faciliten su aceptación por parte de las autoridades competentes. Además, se ha destacado la necesidad de incorporar estas herramientas dentro de estrategias integradas de evaluación de seguridad, donde cada método sea utilizado de acuerdo con su pertinencia biológica y grado de validación. En consecuencia, la transición hacia una investigación menos dependiente de animales requiere no solo innovación científica, sino también coordinación entre organismos reguladores, industria y comunidad académica (Isbrucker et al., 2011; Nelson et al., 2024; Drauschke & Paštěka, 2024).

3.2 Consolidación de los nuevos métodos alternativos y diversificación de las plataformas experimentales

El desarrollo de los nuevos métodos alternativos ha dado lugar a un ecosistema metodológico amplio, en el que convergen biotecnología, ingeniería, ciencias computacionales e inteligencia artificial. Más que una tecnología única, los NAM constituyen un conjunto de aproximaciones orientadas a disminuir la dependencia de animales, aumentar la precisión de los resultados y reducir tiempos y costos experimentales. Su importancia radica en que

permiten elegir el modelo según el problema biológico de interés, evitando el uso indiscriminado de sistemas animales cuando existen estrategias más específicas (Nelson et al., 2024).

A continuación se tiene la siguiente clasificación: modelos *in vitro*, modelos en vertebrados no mamíferos y modelos *in silico* (Vashishat et al., 2024). Los primeros incluyen desde cultivos celulares bidimensionales hasta organoides, esferoides, tejidos reconstruidos y órganos en chip. Los segundos incorporan, entre otros, pez cebra, *Xenopus laevis* y *Caenorhabditis elegans*, útiles en estudios de desarrollo y toxicidad por su accesibilidad experimental. Los terceros abarcan herramientas computacionales como QSAR, modelos PBPK, acoplamiento molecular, minería de datos e inteligencia artificial, que permiten formular predicciones a partir de información fisicoquímica, biológica y clínica (Vashishat et al., 2024). Dentro de este panorama, los cultivos bidimensionales constituyen la forma más simple de trabajo *in vitro*. Aunque han sido útiles por su bajo costo y facilidad de manejo, su principal limitación es la incapacidad para reproducir la organización espacial, la matriz extracelular y las interacciones tridimensionales propias de los tejidos humanos. Por ello, los sistemas 3D han ganado terreno, ya que ofrecen entornos más cercanos a la microfisiología humana y permiten evaluar difusión de compuestos, gradientes de oxígeno, respuestas inflamatorias y comportamientos celulares más realistas (Lee et al., 2022).

Precisamente, los modelos 3D de tejidos humanos han sido descritos como alternativas científicamente respaldadas frente a la experimentación animal, sobre todo en toxicología, evaluación de seguridad y biomedicina avanzada. Estas plataformas pueden generar estructuras multicelulares complejas que imitan piel, mucosa, vasos sanguíneos o tejidos urogenitales, y por ello ofrecen una mayor capacidad de extrapolación al contexto humano. Pese a sus ventajas, todavía enfrentan desafíos relacionados con costos de producción, infraestructura especializada y falta de estandarización, factores que limitan su aprobación regulatoria inmediata (Bédard et al., 2020). Más allá de los modelos 3D clásicos, la literatura reciente ha descrito una expansión sostenida hacia organoides, sistemas microfisiológicos y plataformas híbridas. En conjunto, estas tecnologías indican que la investigación preclínica está dejando atrás un paradigma centrado casi exclusivamente en el animal de laboratorio y se orienta hacia una combinación de modelos más específicos, reproducibles y éticamente responsables (Vashishat et al., 2024).

Beurdeley-Fehlbaum y colaboradores refuerzan esta idea al mostrar que los modelos humanos avanzados, especialmente los tridimensionales, permiten reproducir con mayor fidelidad las interacciones célula-matriz, la distribución de nutrientes y los gradientes de oxígeno, lo que mejora su valor en farmacología, toxicología y medicina personalizada (Beurdeley-Fehlbaum et al., 2023). Así mismo, Husain y colaboradores sostienen que la convergencia entre organoides, bioimpresión, inteligencia artificial y simulaciones computacionales está redefiniendo los ensayos biológicos, al hacerlos más rápidos, precisos y cercanos a la fisiología humana (Husain et al., 2023). Jarman y colaboradores, además, contextualizan este cambio dentro de la evolución histórica de los sistemas libres de animales y destacan que la elevada tasa de fracaso clínico de los compuestos probados en modelos animales explica, en buena medida, el impulso actual de estas tecnologías (Jarman et al., 2026).

Singh y colaboradores, mencionan que a partir de una discusión internacional sobre métodos alternativos, muestran que el interés por estos sistemas no se restringe a un área puntual, sino que atraviesa toxicología, neurociencias, respiratorio, cáncer, piel, hueso, envejecimiento y endocrinología. Su análisis enfatiza que el reemplazo animal ya no es una propuesta marginal, sino una prioridad científica global que requiere validación, educación y cooperación entre industria, academia y reguladores (Singh et al., 2021).

Debido a la diversidad de enfoques identificados en la literatura, los métodos alternativos a la experimentación animal pueden entenderse como un sistema integrado de plataformas biológicas, computacionales y tecnológicas. Esta clasificación permite diferenciar los modelos *in vitro*, *ex vivo*, microfisiológicos, computacionales y biofabricados, así como relacionarlos con sus principales campos de aplicación en toxicología, biomedicina, cosmética, medicina personalizada y evaluación de seguridad. En la **Figura 1** se presenta una síntesis visual de esta organización metodológica.



Figura 1. Clasificación e integración de los métodos alternativos a la experimentación animal según su aplicación en investigación biomédica, toxicológica y cosmética.

3.3. Organoides, esferoides, iPSC y órganos en chip como ejes de la investigación preclínica moderna

Uno de los desarrollos más importantes dentro de los métodos alternativos corresponde a los organoides. Estas estructuras tridimensionales, generadas a partir de células madre o de tejidos, son capaces de autoorganizarse y reproducir, al menos de manera parcial, la arquitectura y función de órganos reales. Su valor reside en que permiten estudiar procesos fisiopatológicos humanos con una cercanía difícil de alcanzar mediante cultivos 2D o modelos animales convencionales (Park et al., 2024).

La literatura describe organoides de estómago, pulmón, hígado, riñón, cerebro y tiroides, así como organoides tumorales obtenidos a partir de secciones finas de tumores. Estos sistemas se han utilizado para estudiar infecciones, patologías hereditarias, enfermedades poco frecuentes, respuestas tóxicas y alternativas terapéuticas personalizadas. En particular, los organoides cerebrales han mostrado utilidad para modelar lesiones traumáticas y procesos neurodegenerativos, mientras que los tumorales han permitido reproducir mejor el microambiente del cáncer y evaluar respuestas farmacológicas de forma más humanamente relevante. No obstante, los organoides también presentan limitaciones que impiden considerarlos sustitutos universales. Entre ellas se encuentran la ausencia de una vascularización completa, la reproducción incompleta de sistemas altamente complejos como el nervioso o el inmunitario, la variabilidad entre cultivos y la necesidad de periodos prolongados de crecimiento. En algunos casos, el cultivo puede extenderse durante semanas o meses, y aun así

no generar un número suficiente de estructuras funcionales bien establecidas para ensayos robustos (Park et al., 2024).

Así mismo, los modelos tridimensionales como organoides y esferoides han transformado la investigación preclínica al reproducir con mayor cercanía la organización celular, las interacciones entre células y la dinámica del microambiente tisular. Su valor es particularmente evidente en oncología y neurociencias. En el primer caso, los esferoides tumorales derivados de biopsias permiten estudiar gradientes de oxígeno, difusión de nutrientes y respuesta a fármacos de una manera más realista que muchos modelos animales. En el segundo, los organoides cerebrales amplían las posibilidades de estudiar procesos asociados al desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso central, así como la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y la penetración de compuestos en enfermedades neurológicas o neoplásicas (Herron et al., 2025).

El crecimiento de estas plataformas ha dado lugar, además, a la propuesta de ensayos clínicos en placa con organoides. Este enfoque plantea el uso simultáneo de múltiples organoides para comparar la respuesta a diferentes tratamientos, con especial valor en enfermedades hereditarias y medicina personalizada. En patologías cardíacas asociadas a mutaciones específicas, por ejemplo, esta estrategia permite adaptar terapias a perfiles biológicos concretos y generar datos útiles para el entrenamiento de herramientas de inteligencia artificial orientadas al desarrollo de nuevos fármacos (Herron et al., 2025).

Park y colaboradores sintetizan gran parte de este avance al revisar tres tecnologías basadas en células madre con alto potencial de reemplazo: organoides, órganos en chip e iPSC (Células madres pluripotentes inducidas). En su análisis, los organoides se presentan como modelos capaces de correlacionarse con respuestas reales de pacientes y de aplicarse en Alzheimer, cáncer e hipotiroidismo. Los órganos en chip, por su parte, se describen como dispositivos microfluídicos que combinan biología y microtecnología para recrear entornos celulares fisiológicamente activos, desde pulmón o hígado hasta sistemas multiorgánicos. Finalmente, las iPSC se destacan por su capacidad para reprogramar células del propio paciente y generar modelos personalizados de Parkinson, cardiopatías, Alzheimer, cáncer e insuficiencia orgánica. A pesar de estas ventajas, Park y colaboradores advierten que dichas tecnologías todavía atraviesan etapas tempranas de consolidación. Los organoides requieren mejoras en vascularización y estandarización; los órganos en chip implican configuraciones técnicas complejas y validación aún insuficiente; y las iPSC presentan desafíos asociados con tumorigenicidad, variabilidad clonal y adaptación incompleta al entorno tridimensional. En consecuencia, el reemplazo total de animales no siempre es viable en enfermedades multifactoriales complejas, por lo que estos autores proponen una transición progresiva y cuidadosamente validada (Park et al., 2024).

3.3.1. Bioimpresión 3D, piel en chip y organoides cutáneos

Una de las tecnologías más recientes son los modelos cutáneos alternativos. Lee y colaboradores resaltan que la piel en chip, la piel bioimpresa en 3D y los organoides cutáneos se están posicionando como plataformas clave para reducir y eventualmente reemplazar el uso de animales, además de articularse con varias guías regulatorias de la OCDE para corrosión, irritación y seguridad ocular (Lee et al., 2026).

Dentro de estas innovaciones está la bioimpresión 3D, la cual permite depositar capa por capa biomateriales cargados con células vivas, lo que hace posible recrear la estructura y función de tejidos complejos. Sharma y colaboradores subrayan que esta tecnología no solo facilita la generación de tejidos en tres dimensiones, sino que también ofrece una herramienta valiosa para estudiar procesos de cicatrización y remodelación cutánea (Sharma et al., 2020). La calidad de las biotintas es un factor decisivo para que estos modelos sean funcionales. Wang y colaboradores señalan que las biotintas deben ser biocompatibles, imprimibles y mecánicamente estables, además de permitir difusión adecuada de nutrientes y degradación controlada. Estas propiedades condicionan tanto la viabilidad celular como la precisión estructural del tejido impreso (Wang et al., 2023).

Entre los materiales más estudiados se encuentran colágeno, alginato, ácido hialurónico, gelatina, fibrina y PEG

(Polietilenglicol). El colágeno y el alginato son especialmente útiles para formar estructuras tipo gel e incorporar queratinocitos y fibroblastos, mientras que el ácido hialurónico y la gelatina favorecen a la hidratación y al desarrollo dérmico (Karakaya et al., 2022). Por otra parte, el PEG y sus derivados permiten modular con mayor precisión las propiedades mecánicas y la degradación del material, lo que resulta crucial para la estabilidad del modelo y para aplicaciones de cicatrización y regeneración (Sekar et al., 2023). Jorgensen y colaboradores destacan que la bioimpresión 3D ha mejorado notablemente la construcción de modelos de piel humana al permitir una deposición precisa de queratinocitos, fibroblastos y otros componentes relevantes. A diferencia de los modelos reconstruidos más sencillos, los bioimpresos ofrecen mayor control sobre la estructura y posibilitan recrear epidermis, dermis e incluso hipodermis, así como una unión más definida entre las capas (Jorgensen et al., 2023). Esta visión es consistente con los aportes de Olejnik y colaboradores, quienes enfatizan la importancia del control arquitectónico en la calidad de la piel biofabricada (Olejnik et al., 2022), y con los de Zhang y colaboradores, quienes destacan que una mejor unión entre capas favorece la organización celular y el desarrollo adecuado de la barrera cutánea (Zhang et al., 2022).

Por otro lado, los organoides cutáneos son de gran interés. Corró y colaboradores los describen como estructuras tridimensionales formadas por diferentes tipos celulares capaces de imitar forma y función de la piel humana, lo que los convierte en herramientas valiosas para estudiar enfermedades, probar compuestos y avanzar en medicina regenerativa (Corró et al., 2020). Zambuto y colaboradores señalan que estos organoides han captado la atención de organismos regulatorios como la OCDE y la FDA, debido a su potencial para evaluar seguridad de productos, alergias e irritaciones de forma más precisa y ética. Sin embargo, también advierten que la variabilidad estructural y la reproducción incompleta de vasos sanguíneos y células inmunes aún dificultan su estandarización y su uso regulatorio decisivo (Zambuto et al., 2024).

3.4. Sistemas microfisiológicos, matrices humanizadas y validación experimental

La sofisticación de los métodos alternativos no se limita a la generación de organoides o chips aislados. También involucra el diseño de matrices, hidrogeles y biomateriales más definidos, reproducibles y libres de componentes animales. Un ejemplo relevante es el estudio de organoides vasculares derivados de hiPSC cultivados bajo diferentes condiciones de matriz, en el que se compararon gel de fibrina 3D y sistemas basados en Matrigel/colágeno (Giles et al., 2025).

Los organoides cultivados en fibrina mostraron un patrón de diferenciación semejante al observado en Matrigel/colágeno, con formación vascular en tiempos comparables y expresión de marcadores característicos de células endoteliales y murales. Aunque se detectó una ligera variación en VE-cadherina (cadherina endotelial vascular), no se encontraron diferencias significativas en la composición celular total ni en la superficie de los organoides. Estos resultados sugieren que los hidrogeles libres de componentes animales pueden ofrecer una alternativa viable para el modelado vascular y el cribado terapéutico. Se debe considerar este hallazgo, ya que Matrigel presenta desventajas importantes derivadas de su origen murino, de la variabilidad entre lotes y de la presencia de factores derivados de tumores. En cambio, sistemas basados en fibrina y vitronectina, al ser de origen humano o recombinante y poseer una composición más definida, mejoran la reproducibilidad y reducen barreras para la aplicación translacional (Giles et al., 2025).

Es importante destacar que la humanización de las matrices no depende únicamente del tipo de células utilizadas, sino también del material que sostiene y organiza su crecimiento. En este sentido, Stengelin y colaboradores señalan que las propiedades de los hidrogeles y otros biomateriales son fundamentales para el desarrollo de microtejidos in vitro funcionales. Estos materiales deben combinar características como procesabilidad, estabilidad, biocompatibilidad y capacidad de adaptación a diferentes diseños experimentales para reproducir de manera más fiel el entorno fisiológico (Stengelin et al., 2022). Asimismo, Laschke y colaboradores demostraron que procesos biológicos complejos, como la angiogénesis, pueden estudiarse mediante una amplia variedad de métodos alternativos libres de animales. Estos incluyen ensayos de viabilidad

celular, migración, formación de estructuras tubulares, modelos de brotación vascular, sistemas microfluídicos y herramientas de modelado matemático, lo que evidencia el gran potencial de estas estrategias para reemplazar la experimentación animal (Laschke et al., 2022).

La necesidad de plataformas mejor definidas también ha sido abordada desde la ingeniería de tejidos. De Vries y colaboradores revisaron el papel de la ingeniería tisular como alternativa al uso de animales y concluyeron que los avances en epidermis reconstruidas, tejidos sintéticos y constructos humanos ya han contribuido de manera importante a la reducción del uso animal, especialmente en piel, aunque su potencial aún no se ha agotado. Siguiendo con los estudios De Wever y colaboradores defendieron un enfoque abierto en ingeniería de tejidos, argumentando que la dependencia de tecnologías propias puede obstaculizar la estandarización y difusión de modelos alternativos, mientras que los protocolos abiertos podrían acelerar su implementación y aceptación (De Wever et al., 2015).

También desde el ámbito preclínico se han formulado propuestas para racionalizar el uso de modelos biológicos. Zeiter y colaboradores, al analizar modelos utilizados en ingeniería de tejido óseo, mostraron una gran heterogeneidad en especie, edad, sexo, localización y diseño experimental, lo que compromete la comparabilidad de resultados. En lugar de promover una multiplicación indiscriminada de sistemas, estos autores proponen un conjunto más limitado de modelos mejor definidos y con mayor relevancia translacional (Zeiter et al., 2020).

Otra demostración de validación práctica proviene del estudio *in ovo* de Perkash y colaboradores, quienes exploraron huevos fecundados de emú como alternativa para investigación de imagen preclínica. Su trabajo evidenció que este modelo puede sostener estudios PET/CT (Tomografía por Emisión de Positrones combinada con Tomografía Computarizada) con correlación significativa entre hallazgos *in ovo* y *ex vivo*, lo que sugiere que ciertos sistemas alternativos pueden aportar información funcional real y complementar o reemplazar algunos usos tradicionales de animales en medicina nuclear (Perkash et al., 2025). Con base en lo anterior se presenta la revisión de validación aplicada de Harrison, quien enfatiza que los órganos en chip permiten replicar el flujo de fluidos, la exposición a fármacos y estímulos mecánicos como presión o estiramiento, generando condiciones más próximas a las del organismo humano que muchos modelos animales tradicionales (Harrison, 2025). Por ello, los sistemas microfluídicos no deben entenderse únicamente como innovaciones técnicas, sino como plataformas con potencial real para reemplazar etapas específicas de la experimentación convencional.

3.5 Toxicología, evaluación de seguridad y estrategias integradas de validación

La toxicología es uno de los campos en los que la sustitución animal ha mostrado mayor desarrollo. En este contexto, la meta no consiste solo en eliminar animales, sino en construir estrategias integradas capaces de predecir con fiabilidad efectos adversos, mecanismos de daño y perfiles de riesgo. Desde esta perspectiva, los métodos alternativos deben articularse según su pertinencia y complementariedad, y no como soluciones aisladas (Isbrucker et al., 2011).

Por otro lado, un ejemplo representativo de esta situación fue descrito por Vinardell y Mitjans en el ámbito de la regulación cosmética europea. Al analizar los expedientes evaluados por el Scientific Committee on Consumer Safety, los autores encontraron que, tras la prohibición de los ensayos en animales, aumentó el uso de datos obtenidos mediante métodos *in vitro*. Sin embargo, una parte significativa de las evaluaciones continuaba basándose en información histórica derivada de estudios *in vivo*. Este hallazgo evidencia que los cambios normativos no garantizan por sí solos una sustitución metodológica completa, ya que persisten limitaciones técnicas y prácticas regulatorias que dificultan la adopción plena de métodos alternativos (Vinardell & Mitjans, 2017).

En nanotoxicología, Huang y colaboradores concluyen que la combinación de estrategias *in vitro* e *in silico*

representa actualmente una de las rutas más sólidas para disminuir el uso animal. Su revisión muestra que los cultivos celulares, las plataformas con células madre, la ingeniería de tejidos, los modelos computacionales y los enfoques QSAR pueden contribuir significativamente a la predicción de efectos tóxicos, aunque todavía existen límites importantes relacionados con la complejidad de las nanopartículas y con la heterogeneidad de sus mecanismos de acción (Huang et al., 2021). Banerjee y Ulker también demostraron el potencial de las aproximaciones integradas al combinar datos *ex vivo* con modelado computacional para estudiar sensibilización cutánea. Sus resultados mostraron una relación entre predicciones computacionales y observaciones experimentales, lo que sugiere que estas herramientas pueden utilizarse como etapas tempranas de cribado antes de recurrir a ensayos más complejos (Banerjee & Ulker, 2022).

Li y colaboradores, desde otra perspectiva, revisaron el uso de cortes intestinales de precisión como modelos alternativos para estudios ADME-Tox. Estos sistemas conservan arquitectura tisular y múltiples tipos celulares, por lo que funcionan como un puente entre cultivos simplificados y la complejidad del tejido vivo. Según los autores, su valor radica en que permiten explorar transporte, metabolismo y toxicidad intestinal con una relevancia biológica superior a la de muchos cultivos convencionales, sin requerir necesariamente experimentación animal extensa (Li et al., 2016). En el campo del modelado toxicológico computacional, Banerjee y colaboradores desarrollaron ProTox 3.0, una plataforma que integra 61 endpoints toxicológicos y amplía de manera importante la predicción *in silico* de toxicidad aguda, orgánica, clínica y molecular. Herramientas de este tipo son particularmente valiosas en fases tempranas del diseño de compuestos, ya que permiten priorizar candidatos y reducir etapas experimentales innecesarias (Banerjee et al., 2024).

Sachot y Vitale, al revisar la evaluación biológica de dispositivos médicos, señalan que la dependencia histórica de ensayos animales en este sector debe ser sustituida por marcos modernos basados en tecnologías ómicas, células madre, piel reconstruida, modelado computacional y órganos en chip. Su análisis muestra que la transformación regulatoria es factible, pero requiere un cambio coordinado en normas, criterios de aceptación y cultura científica (Sachot & Vitale, 2019). De igual manera, Idrees y colaboradores muestran que, incluso en regiones donde la legislación es relativamente avanzada, persisten vacíos relacionados con la validación, la armonización y la adopción de nuevas herramientas. Su revisión enfatiza que la eficacia real de las políticas de reemplazo depende tanto de la existencia de métodos alternativos como de su integración formal dentro de los sistemas regulatorios (Idrees et al., 2021).

La validación aplicada también se observa en el campo vacunal. Se evaluó una prueba *in vitro* para una vacuna iraní contra la enterotoxemia causada por *Clostridium perfringens* tipo D, con el objetivo de reemplazar ensayos tradicionales *in vivo* por un método basado en cultivo celular para medir anticuerpos neutralizantes. Los resultados mostraron diferencias en la duración y magnitud de la respuesta inmune entre ovejas y cabras, pero, sobre todo, respaldaron la búsqueda de procedimientos más modernos, éticos y eficientes para el control de calidad. (Emadi et al., 2025)

Con base en ello, Lilley y colaboradores demostraron que un método de cultivo celular para evaluar la neutralización de la toxina épsilon puede alcanzar alta correlación con las pruebas tradicionales, además de buena sensibilidad, precisión y reproducibilidad. Este tipo de evidencia es especialmente valiosa porque muestra que el reemplazo animal no es solo una aspiración teórica, sino una posibilidad verificable para contextos regulatorios e industriales concretos (Lilley et al., 2023).

Un aspecto importante a mencionar es la inteligencia artificial, la cual está transformando la toxicología y la evaluación de seguridad al integrar datos químicos, biológicos y ómicos en algoritmos capaces de predecir múltiples endpoints con alto nivel de precisión. Su análisis confirma que el reemplazo animal no solo pasa por tejidos y biomateriales, sino también por la construcción de sistemas de decisión asistidos por aprendizaje automático (Diogo Gonçalves et al., 2025).

La literatura revisada demuestra que los métodos alternativos a la experimentación animal no corresponden a una única tecnología, sino a un conjunto integrado de aproximaciones biológicas, computacionales y regulatorias. Estas incluyen modelos *in vitro* tridimensionales, organoides, órganos en chip, células madre pluripotentes inducidas, cortes tisulares *ex vivo*, matrices libres de componentes animales, herramientas in

silico, modelos de inteligencia artificial y estrategias de toxicología predictiva. **La Tabla 1** resume los principales métodos reportados en los estudios incluidos, destacando su área de aplicación, avance principal, limitaciones y nivel de aplicabilidad actual.

Tabla 1. Síntesis de los principales métodos alternativos a la experimentación animal: aplicaciones, ventajas y limitaciones

Autor / año	Método alternativo	Área de aplicación	Avance principal	Limitación principal	Nivel de aplicabilidad
Vashishat et al., 2024	Modelos in vitro, vertebrados alternativos, in silico e inteligencia artificial	Biomedicina, toxicología y desarrollo de fármacos	Organiza los métodos alternativos modernos y resalta su utilidad para estudiar procesos celulares, toxicidad, interacción farmacológica y mecanismos moleculares con menor uso animal.	No reproducen completamente la complejidad sistémica del organismo, los efectos acumulativos ni las interacciones celulares dinámicas.	Prometedor / integrador
Lee et al., 2022	Modelos in vitro, invertebrados, órganos en chip e in silico	Biomedicina, toxicología y cribado preclínico	Permiten evaluar digestibilidad, toxicidad, farmacocinética, respuesta a fármacos y enfermedades humanas, reduciendo el uso de animales.	No reproducen completamente la complejidad fisiológica humana y requieren mayor validación frente a modelos in vivo.	Prometedor / complementario
Bédard et al., 2020	Modelos humanos 3D de ingeniería de tejidos	Biomedicina, farmacología, toxicología y modelos de enfermedad	Reproducen mejor la microarquitectura tisular humana que los cultivos 2D y permiten usar células humanas para estudios más predictivos y éticos.	Alto costo, complejidad técnica, variabilidad, falta de vascularización, ausencia de sistema inmune completo y uso de algunos componentes animales.	Prometedor / en consolidación
Park et al., 2024	Organoides, órganos en chip e iPSC	Toxicología, seguridad preclínica, enfermedades humanas y medicina personalizada	Permiten generar modelos humanos específicos de órgano o paciente para evaluar seguridad, eficacia, toxicidad y respuesta farmacológica, reduciendo el uso animal.	Falta de vascularización, maduración incompleta, baja interacción sistémica, variabilidad de protocolos y necesidad de validación.	Prometedor / en validación

Giles et al., 2025	Matrices animal-free: vitronectina y fibrina para organoides vasculares derivados de hiPSC	Organoides vasculares, medicina regenerativa y cribado terapéutico	Sustituyen Matrigel por vitronectina y fibrina, manteniendo pluripotencia de hiPSC y diferenciación de organoides vasculares con formación de redes y brotación endotelial comparable.	Requiere optimización, estandarización y validación en otras líneas celulares, organoides y contextos regulatorios.	Prometedor / especializado
Stengelin et al., 2022	Microtejidos in vitro con hidrogeles, bioimpresión, microfluídica y órganos en chip	Toxicología, farmacología e ingeniería de tejidos	Resalta que la funcionalidad de los materiales procesabilidad, adaptabilidad, biocompatibilidad y degradabilidad permite crear modelos in vitro más fisiológicos y reproducibles.	Persisten desafíos de vascularización, difusión de nutrientes, estabilidad, degradación, adhesión celular y complejidad tisular.	Prometedor / tecnológico
Li et al., 2016	Cortes intestinales de precisión	ADME-Tox intestinal, transporte, metabolismo y toxicidad	Mantienen estructura 3D, multicelularidad, transportadores y enzimas intestinales, permitiendo estudiar metabolismo, transporte, toxicidad y diferencias regionales/especie.	No evalúan transporte vectorial completo; tienen viabilidad limitada, cambios de expresión durante cultivo y disponibilidad restringida de tejido humano.	Complementario / traslacional
Huang et al., 2021	Métodos in vitro e in silico: cultivos celulares, iPSC, 3D, docking, QSAR y dinámica molecular	Nanotoxicología y seguridad de nanomateriales	Permiten evaluar toxicidad de nanopartículas mediante pruebas celulares, tejidos 3D y predicción computacional de interacciones y mecanismos moleculares.	No reproducen por completo la exposición sistémica ni efectos crónicos; dependen de datos fisicoquímicos precisos y pueden presentar interferencias en ensayos ópticos.	Complementario / en validación

Banerjee & Ulker, 2022	Métodos ex vivo e in silico: LLNA-BrdU, ProTox-II y SuperCYPsPred	Toxicología cosmética y sensibilización cutánea	Las predicciones computacionales concordaron con datos ex vivo y permitieron estimar toxicidad, AOPs e inhibición de CYP en ingredientes cosméticos.	No sustituyen completamente la evaluación experimental; dependen del dominio de aplicabilidad, calidad de datos y complejidad de mecanismos toxicológicos.	Complementario / cribado inicial
Banerjee et al., 2024	ProTox 3.0: plataforma in silico con machine learning	Toxicología química, fármacos, cosméticos, alimentos, metabolismo y ecotoxicidad	Predice 61 endpoints toxicológicos, incluyendo toxicidad aguda, órganos, vías Tox21, MIEs, metabolismo CYP y dianas toxicológicas, apoyando el cribado temprano y la reducción de animales.	Depende de la calidad de datos, dominio de aplicabilidad, estructura química de entrada y validación experimental posterior.	Complementario / avanzado
Sachot & Vitale, 2019	Piel humana 3D/ex vivo, órganos en chip, células madre, ómicas e in silico	Seguridad biológica y toxicología de dispositivos médicos	Reúne alternativas animal-free para evaluar biocompatibilidad, irritación, toxicidad y riesgos asociados a dispositivos médicos, apoyando las 3R.	La adopción está limitada por validación, estandarización, aceptación regulatoria y adaptación a endpoints complejos.	Complementario / regulatorio
Herron et al., 2025	NAMs y “clinical trials in a dish”	Desarrollo de fármacos, toxicología y medicina personalizada	Propone usar organoides, esferoides, iPSC, modelos in silico e in chemico para probar terapias en sistemas humanos tempranos y mejorar la predicción clínica.	Persisten barreras de aceptación, presión por validación animal, falta de estandarización y necesidad de mayor financiación.	Prometedor / en expansión

3.6. Modelos cutáneos alternativos y evaluación cosmética sin crueldad

La piel es uno de los tejidos en los que más se ha avanzado en el desarrollo de métodos alternativos a la experimentación animal. Esto se debe a su relevancia en cosmética, dermatología, formulación tópica, irritación, corrosión, fotoseguridad, permeación y reparación tisular. A diferencia de otros sistemas biológicos, la piel ha

permitido construir un abanico particularmente amplio de modelos alternativos, desde explantes *ex vivo* hasta equivalentes cutáneos, sistemas microfluídicos y organoides (Savoji et al., 2018).

Abd y colaboradores describen que, aunque la piel humana *in vivo* sigue siendo el referente ideal para estudiar permeación percutánea, en la práctica su uso se encuentra limitado por razones éticas y logísticas. Por ello, analizan alternativas como piel humana *ex vivo*, piel animal *ex vivo*, membranas artificiales, epidermis reconstruida y sustitutos bioingenierizados, concluyendo que la selección del modelo debe basarse en el objetivo experimental y en su correlación con la situación clínica real. Savoji y colaboradores amplían esta discusión desde la perspectiva de los sustitutos cutáneos avanzados. Según estos autores, un modelo exitoso no debe limitarse a cubrir una superficie, sino que debe favorecer integración, vascularización, modulación inmune y cicatrización. No obstante, reconocen que muchos sistemas actuales todavía no logran reproducir de manera adecuada redes vasculares, neurales y linfáticas, ni anexos cutáneos como folículos pilosos y glándulas, lo que evidencia que el biomimetismo completo sigue siendo un desafío (Savoji et al., 2018).

Biondo y colaboradores comparan modelos biológicos y sintéticos para estudios de transporte de fármacos a través de la piel. Aunque reconocen que los modelos reconstruidos y sintéticos ofrecen homogeneidad y reproducibilidad útiles para etapas tempranas, concluyen que todavía no reproducen de manera completa la función barrera y el metabolismo de la piel humana, por lo que su uso debe evaluarse críticamente según la finalidad del ensayo (Biondo et al., 2023). Suhail y colaboradores, al revisar equivalentes tisulares de piel, sostienen que estos sistemas son herramientas esenciales para estudiar irritación, corrosión, absorción, hidratación y genotoxicidad. Sin embargo, enfatizan que aún se requieren mejoras en biomimetismo estructural, función barrera, integración dinámica y reproducibilidad para que estos modelos sustituyan más ampliamente a los animales en evaluación cosmética y farmacológica (Suhail et al., 2019).

Desde la biofabricación, Yun y colaboradores clasifican los modelos artificiales de piel según técnicas como liofilización, electrospinning, bioimpresión 3D y sistemas microfluídicos. Su análisis demuestra que la calidad del modelo depende no solo del tipo de células, sino de la arquitectura del andamio y de la fidelidad estructural alcanzada, lo que refuerza la importancia de la ingeniería de materiales en el reemplazo animal (Yun et al., 2018). Brohem y colaboradores ya habían mostrado que la complejidad estructural y funcional de la piel humana no puede ser capturada adecuadamente por monocapas celulares. En consecuencia, defienden el uso de equivalentes cutáneos humanos para estudiar melanogénesis, cicatrización, fotoenvejecimiento y seguridad de compuestos tópicos, con una cercanía mayor a la fisiología humana (Brohem et al., 2011).

La evolución tecnológica del área también puede observarse en el análisis de patentes realizado por Cedrola y colaboradores. Sus resultados muestran un crecimiento sostenido de desarrollos vinculados con piel reconstruida 3D, modelos *ex vivo*, cultivos 2D, plataformas skin-on-a-chip y ensayos *in chemico*, lo que evidencia que el reemplazo animal en cosmética también se está consolidando como un campo industrial y tecnológico en expansión (Cedrola et al., 2026). Eberlin y colaboradores aportan otra perspectiva relevante al destacar el valor de los explantes humanos *ex vivo* obtenidos de cirugías plásticas. Estos modelos conservan arquitectura y composición tisular nativas, incluidos queratinocitos, fibroblastos, melanocitos, matriz dérmica, glándulas y folículos, lo que los vuelve particularmente útiles para estudiar fotoenvejecimiento, dermatitis atópica, barrera cutánea y fisiología folicular con una relevancia muy alta para la evaluación cosmética (Eberlin et al., 2020).

Pandey y Poojan señalan que los modelos cutáneos 3D han cobrado una importancia creciente desde el fortalecimiento de las políticas europeas contra la experimentación animal. Su revisión destaca su utilidad en citotoxicidad, pigmentación, crecimiento capilar y antienvjecimiento, al tiempo que advierte la necesidad de perfeccionar modelos de espesor completo y de largo mantenimiento (Pandey & Poojan, 2023). Aldieri y colaboradores complementan esta idea desde la evaluación biomecánica. En su estudio, la caracterización *in vitro* e *in silico* de sustitutos cutáneos demostró que es posible seleccionar materiales con comportamiento mecánico favorable sin depender de modelos animales, lo que amplía el concepto de seguridad y funcionalidad más allá de la simple compatibilidad biológica (Aldieri et al., 2020).

3.7. Sustitución de componentes animales en medios, matrices y biomateriales

La construcción de una ciencia sin crueldad no puede limitarse al reemplazo del organismo experimental; también exige sustituir los insumos de origen animal utilizados en medios, matrices y biomateriales. Esta dimensión es crucial porque muchos sistemas supuestamente alternativos continúan dependiendo de sueros, extractos o componentes derivados de animales, lo que compromete su coherencia ética y su reproducibilidad experimental.

Weigel y colaboradores tuvieron un gran avance, puesto que desarrollaron andamios fibrosos 3D completamente sintéticos para generar piel multicapa sin componentes animales. Su trabajo mostró que estos andamios permiten adhesión, proliferación y diferenciación celular, además de una remodelación activa comparable a la observada en matrices tradicionales, lo que los convierte en una alternativa prometedora para ingeniería cutánea (Weigel et al., 2022). Nessar y colaboradores abordaron el problema desde la formación universitaria, demostrando que es posible diseñar un curso práctico de biología molecular y celular completamente libre de componentes animales. El uso de medios definidos, enzimas recombinantes y reactivos alternativos permitió realizar cultivo celular, transfección, RNAi, qRT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa cuantitativa), ensayo luciferasa y Western blot, mostrando que la transición hacia prácticas animal-free también puede comenzar en el ámbito educativo (Nessar et al., 2025).

Mediante la optimización de medios de cultivo, Mogilever propuso un medio libre de componentes animales para cultivos mamíferos 2D y 3D, mostrando resultados comparables o superiores a los obtenidos con FBS (Suero fetal bovino) en distintas líneas celulares. Este tipo de desarrollos es muy importante porque reduce variabilidad y facilita la transición hacia sistemas más estandarizados y compatibles con exigencias regulatorias modernas (Mogilever, 2024). De manera coherente, Scarlat y colaboradores evaluaron matrices libres de animales para organoides hepáticos y tubuloides renales, identificando alternativas viables aunque todavía no plenamente equivalentes a Matrigel o extracto de membrana basal (BME). Dicho estudio demuestra la transición hacia matrices más éticas y definidas es posible, pero requiere optimización cuidadosa para mantener crecimiento y funcionalidad (Scarlat et al., 2023).

Golshan y colaboradores realizaron una revisión extensa sobre productos libres de origen animal para medios de cultivo y mostraron que las alternativas AOF (libre de origen animal) y ACF (libre de componentes animales) reducen variabilidad, disminuyen riesgos biológicos y mejoran la aceptabilidad regulatoria, aunque requieren ajustes específicos según tipo celular y aplicación experimental (Golshan et al., 2024). Frese y colaboradores también contribuyen a este campo al optimizar hojas de queratinocitos autólogos para quemaduras graves bajo condiciones prácticamente xeno-free. Sus resultados sugieren que la sustitución de componentes animales no solo responde a razones éticas, sino que también puede mejorar la homogeneidad, expansión y diferenciación celular en aplicaciones clínicas (Frese et al., 2022).

Fan y colaboradores revisan la relevancia de los hidrolizados libres de origen animal en cultivos celulares y muestran que estos pueden actuar como un puente entre el uso de suero fetal bovino (FBS) y los medios completamente definidos, con ventajas relacionadas con estabilidad, costo y escalabilidad industrial (Fan et al., 2024). Finalmente, Bramwell y colaboradores proponen guías para reemplazar biomateriales derivados de animales en cultivos primarios humanos, destacando que esta transición es indispensable para una verdadera humanización de los sistemas experimentales (Bramwell et al., 2024).

3.8. Métodos *in silico* y análisis estadístico aplicado a investigación cosmética

La reducción del uso animal no depende únicamente de modelos biológicos alternativos; también exige herramientas analíticas y computacionales capaces de interpretar, predecir y optimizar resultados. En el campo de la cosmética y la farmacia, esta dimensión es esencial porque permite priorizar compuestos, seleccionar formulaciones y analizar datos de eficacia o seguridad con mayor precisión.

Vasiljev y colaboradores destacan que la industria del cuidado de la piel se orienta cada vez más hacia productos sostenibles, de origen vegetal y libres de pruebas en animales, y que esta transición está acompañada por una mayor dependencia de evaluaciones instrumentales, estudios en voluntarios y análisis estadísticos sólidos para sustentar afirmaciones de eficacia y seguridad (Vasiljev et al., 2025).

De este modo, la correcta selección de la prueba estadística depende del tipo de variable y del diseño experimental. Un ejemplo claro es la concentración inhibitoria media (IC50), empleada como variable continua para medir la cantidad de sustancia necesaria para producir una respuesta específica en el ensayo evaluado, como en el trabajo de (Maciel et al., 2019). En cambio, cuando se analiza el índice PIF según categorías interpretativas establecidas por la guía correspondiente, la variable adquiere un carácter ordinal, como se describe en (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, 2019).

También existen variables binarias, como la sensibilización cutánea clasificada en presencia o ausencia de respuesta, tal como se observa en (Silveira et al., 2016). Asimismo, el diseño del estudio condiciona el tipo de contraste estadístico: en mediciones repetidas sobre los mismos individuos, como niveles de fotoprotección antes y después del uso de un protector solar, resulta adecuada una prueba t pareada, como reportan (Shyr y Ou-Yang, 2016); mientras que en comparaciones entre grupos independientes puede utilizarse la prueba t para muestras no pareadas, como en el estudio de eficacia antiacné descrito por (Golembó et al., 2022).

Cuando el objetivo no es solo comparar, sino también predecir, los modelos de regresión adquieren gran valor. Así, (Silva et al., 2019) emplearon regresión lineal para estimar el factor de protección solar a partir del porcentaje de ingredientes activos, mientras que (Liu et al., 2020) subrayan la importancia de evaluar sensibilidad, precisión y confiabilidad del modelo, además de resaltar el papel de métodos no paramétricos para predecir irritación cutánea. En este mismo sentido, (Luechtefeld et al., 2018) remarcan que la calidad y cantidad de datos son determinantes para la utilidad real de cualquier modelo *in silico*. Los modelos QSAR ocupan un lugar central dentro de estas herramientas. Su fundamento es que la estructura química de una sustancia guarda relación con sus efectos toxicológicos, lo que permite construir modelos predictivos mediante descriptores moleculares y datos experimentales. Entre sus principales ventajas se encuentran la posibilidad de clasificar sustancias según riesgo, estimar toxicidad y priorizar compuestos sin recurrir inmediatamente a ensayos más costosos o invasivos (Gleeson et al., 2012).

No obstante, sus limitaciones también deben considerarse: (Raies y Bajic, 2016) advierten que estos modelos pueden omitir variables biológicamente relevantes como dosis, tiempo de exposición o formación de metabolitos, además de no siempre ofrecer una interpretación mecanística suficiente.

A estos enfoques se suman los modelos basados en reglas y los modelos híbridos. La herramienta QSAR (relación cuantitativa estructura-actividad) de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), descrita por (Wilm et al., 2018), ejemplifica el uso de reglas estructurales y criterios computacionales para apoyar decisiones regulatorias. A su vez, CADRE-SS (descubrimiento y rediseño asistido por computador para sensibilización cutánea) ilustra cómo la combinación de diferentes enfoques mejora la predicción de sensibilización cutánea, integrando similitud química, reglas toxicológicas y evidencia previa, como explican (Kostal & Voutchkova-Kostal, 2016).

El acoplamiento molecular también ha adquirido un lugar relevante en cosmética y farmacia. Esta técnica permite predecir cómo interactúan ingredientes activos con proteínas específicas, facilitando la selección de compuestos con potencial despigmentante, antienviejecimiento o reparador. En estudios como los de (Ledwoń et al., 2023), donde se evaluaron inhibidores enzimáticos vinculados con pigmentación; en el artículo de (Masjedi y Solhjo, 2022), orientado a interacción molecular de ingredientes funcionales; también el de (Nurkolis et al., 2023), son ejemplos que se enfocan en compuestos bioactivos con interés cosmético; y en el trabajo de (Nutho y Tungmunthum, 2024), relacionado con el diseño racional de ingredientes naturales mediante simulación molecular.

3.9. Barreras éticas, institucionales y regulatorias para una implementación plena

A pesar del crecimiento sostenido de las alternativas, la desaparición de la experimentación animal no es automática. Persisten barreras éticas, institucionales y regulatorias que explican por qué muchos modelos alternativos, aun siendo técnicamente sólidos, tardan en convertirse en estándares. La discusión ya no gira únicamente en torno a si existen otras opciones, sino a cómo se valida su uso, quién decide su aceptación y qué estructuras sostienen la permanencia del modelo animal. Un ejemplo de ello se observa en las dinámicas de los comités de ética y supervisión. El análisis de (Pippin et al., 2025) muestra que los comités institucionales para el cuidado y uso de animales (IACUC) no siempre garantizan una evaluación profunda de las alternativas ni una revisión ética verdaderamente independiente. Se documentan limitaciones asociadas con formación insuficiente en métodos sin animales, conflictos de interés y escasa discusión de estrategias de reemplazo, lo que debilita la capacidad transformadora de estos comités (Pippin et al., 2025).

El autor Müller sostiene que la política de protección animal no puede centrarse únicamente en reducir el número de animales ya utilizados, sino que también debe intervenir en los mecanismos que continúan generando nuevos modelos animales. Según este autor, la elección de dichos modelos no responde solo a criterios científicos, sino también a factores de infraestructura, financiamiento y prácticas arraigadas dentro de la comunidad investigadora. Por ello, una reducción real del uso animal exige no solo promover alternativas, sino limitar activamente la producción de nuevos modelos convencionales (Müller, 2026).

En términos regulatorios, Idrees y colaboradores muestran que la existencia de legislación favorable no siempre asegura adopción rápida, mientras que Vinardell y Mitjans evidencian que incluso con prohibiciones formales los expedientes pueden seguir dependiendo de datos históricos obtenidos *in vivo* (Idrees et al., 2021; Vinardell & Mitjans, 2017). Estas observaciones revelan que la transición hacia una ciencia sin crueldad no es un simple relevo técnico, sino una reconfiguración profunda de normas, incentivos, prácticas y culturas institucionales.

1. CONCLUSIONES

La revisión realizada permite concluir que los métodos alternativos frente a la experimentación animal han dejado de ser propuestas emergentes para consolidarse como un campo científico en expansión, con aplicaciones relevantes en toxicología, biomedicina, desarrollo farmacéutico y evaluación cosmética. La literatura analizada evidencia que el impulso hacia una ciencia sin crueldad no responde únicamente a preocupaciones éticas, sino también a las limitaciones científicas de los modelos animales, especialmente en cuanto a su capacidad para predecir con precisión la respuesta humana. En este sentido los modelos *in vitro* avanzados, organoides, iPSC, órganos en chip, sistemas *ex vivo*, herramientas *in silico*, inteligencia artificial, modelos cutáneos reconstruidos, explantes humanos, bioimpresión 3D y plataformas *skin-on-a-chip* han demostrado un potencial creciente para reproducir procesos biológicos humanos, mejorar la relevancia experimental y reducir el uso de animales en etapas de investigación, eficacia y seguridad. No obstante, ningún método alternativo reproduce por sí solo la complejidad integral de un organismo vivo, ya que persisten limitaciones relacionadas con vascularización, integración multicelular, reproducibilidad, estandarización y validación regulatoria. Por ello, el reemplazo total de la experimentación animal debe entenderse como un proceso progresivo, basado en la integración de diferentes metodologías y en el fortalecimiento técnico, institucional y normativo. En

consecuencia, avanzar hacia una ciencia sin crueldad exige una transformación tecnológica, ética, regulatoria y académica, sustentada en la armonización internacional, el apoyo de agencias reguladoras, revistas científicas e instituciones financiadoras, y el reconocimiento de que una investigación más humana también puede ser más robusta, predictiva y útil para la salud y la innovación biomédica.

2. DECLARACIÓN DEL USO DE INTELIGENCIA ARTIFICIAL

Los autores declaran que se utilizó inteligencia artificial (IA) para la creación de la figura 1.

3. CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Lee, S. Y., Lee, D. Y., Kang, J. H., Jeong, J. W., Kim, J. H., Kim, H. W., Oh, D. H., Kim, J.-M., Rhim, S.-J., Kim, G.-D., Kim, H. S., Jang, Y. D., Park, Y., & Hur, S. J. (2022). Alternative experimental approaches to reduce animal use in biomedical studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 68, 103131. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103131>
- [2] Abdollahi, M., Gad, S., Greim, H., Gulumian, M., Iatrou, E., Miguez, D., ... & Weigand, D. (2024) Prueba de Ames. *Enciclopedia de Toxicología*. (pp. 377-399). Academic Press.
- [3] Madden, J. C., Enoch, S. J., Paini, A., & Cronin, M. T. D. (2020). A review of in silico tools as alternatives to animal testing: Principles, resources and applications. *Alternatives to Laboratory Animals*, 48(4), 146–172. <https://doi.org/10.1177/0261192920965977>
- [4] Hartung, T. (2022). Replacing animal testing: How and when? *Frontiers for Young Minds*, 10, Article 959496. <https://doi.org/10.3389/frym.2022.959496>
- [5] Park, G., Rim, Y.A., Sohn, Y. et al. Replacing Animal Testing with Stem Cell-Organoids : Advantages and Limitations. *Stem Cell Rev and Rep* 20, 1375–1386 (2024). <https://doi.org/10.1007/s12015-024-10723-5>
- [6] Silva, R. J., & Tamburic, S. (2022). A State-of-the-Art Review on the Alternatives to Animal Testing for the Safety Assessment of Cosmetics. *Cosmetics*, 9(5), 90. <https://doi.org/10.3390/cosmetics9050090>
- [7] Contreras, L., Linares, P., Acosta, C., & Fraile, B. (2018). Bioética y experimentación en animales. Una revisión de la praxis científica en México. *Revista Colombiana de Bioética*. Tomado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/bioetica/rcb-2018/rcb182c.pdf>
- [8] Díaz, L., Zambrano-González, E., Flores, M. E., Contreras, M., Crispín, J. C., Alemán, G., Bravo, C., Armenta-Espinosa, A., Valdés, V. J., Tovar, A., Gamba, G., Barrios-Payán, J., & Bobadilla, N. A. (2020). Ethical Considerations in Animal Research: The Principle of 3R's. *Revista de Investigación Clínica*, 73(4). <https://doi.org/10.24875/ric.20000380>
- [9] Clark, J. M. (2017). The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *British Journal Of Nutrition*, 120(s1), S1-S7. <https://doi.org/10.1017/s0007114517002227>.
- [10] Learman, L. (2021). Alternative to Animals. *The Member Magazine of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. Tomado de: <https://www.asbmb.org/asbmb-today/science/071421/alternatives-to-animals>

- [11] Gruber, F. (2004). Alternatives to animal experimentation in basic research. *ALTEx*, 21, 3-31. <https://doi.org/10.14573/altex.2004.suppl.3>
- [12] Taylor, K. (2019). Recent Developments in Alternatives to Animal Testing. *WBI Studies Repository*. Tomado de: <https://www.wellbeingintlstudiesrepository.org/cgi/viewcontent.cgi?article=1005&context=appamet>
- [13] Vinardell, M. (2021). ¿Existen alternativas a los experimentos con animales? *Revista de Bioética y Derecho*. Tomado de: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1886-58872021000100006
- [14] Nelson, C. P., Brown, P., Fitzpatrick, S., Ford, K. A., Howard, P. C., MacGill, T., Margerrison, E. E. C., O'Shaughnessy, J., Patterson, T. A., Raghuwanshi, R., Rouse, R., Stromgren, S., Sung, K. E., Valerio, L. G., Ward, J. L., & Bumpus, N. N. (2024). Advancing alternative methods to reduce animal testing. *Science*, 386(6723), 724-726. <https://doi.org/10.1126/science.adg6228>
- [15] Bustos, R. A., & Valenzuela, F. (2018b, abril 24). Evolución de aspectos bioéticos de la experimentación en animales: el origen del concepto "Cruelty free". *Bustos | Revista Chilena de Dermatología*. <https://rcderm.org/index.php/rcderm/article/view/136/102>
- [16] de Lapuente, J., Borrás, M., González-Linares, J., Llanas, H., Mitjans, M., Ramos-López, D., Vinardell, P. Los métodos alternativos en el estudio de la seguridad de cosméticos. *Revista de Toxicología*, vol. 31, núm. 2, julio-diciembre, 2014, pp. 140-148. Tomado de: <https://www.redalyc.org/pdf/919/91932969012.pdf>
- [17] Nuwer, R. (2024, 23 agosto). Next-Generation biotech is rendering some lab animals obsolete. *Scientific American*. <https://www.scientificamerican.com/article/next-generation-biotech-is-rendering-some-lab-animals-obsolete/>
- [18] Movia, D., Bruni-Favier, S., & Prina-Mello, A. (2020). In vitro Alternatives to Acute Inhalation Toxicity Studies in Animal Models—A Perspective. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00549>
- [19] Bédard, P., Gauvin, S., Ferland, K., Caneparo, C., Pellerin, E., Chabaud, S., Bolduc, S. (2020). Innovative Human Three-Dimensional Tissue-Engineered Models as an Alternative to Animal Testing. *Bioengineering Journal*. Tomado de: <https://www.mdpi.com/2306-5354/7/3/115>
- [20] Maia, A., Moura, A., Green, A., Silva, W., Sarubbi, J., Massari, L., Soares, L. (2019). Design and testing of a novel environmental preference chamber. *Computers and Electronics in Agriculture*. Tomado de: https://nebulosa.icesi.edu.co:2138/science/article/pii/S016816991730340X?ref=cra_js_challenge&fr=RR-1
- [21] Kiani, A. K., Pheby, D., Henahan, G., Brown, R., Sieving, P., Sykora, P., Marks, R., Falsini, B., Capodicasa, N., Miertus, S., Lorusso, L., Dondossola, D., Tartaglia, G. M., Ergoren, M. C., Dundar, M., Michelini, S., Malacarne, D., Bonetti, G., Dautaj, A., . . . Bertelli, M. (2022). Ethical considerations regarding animal experimentation. *HAL (Le Centre Pour la Communication Scientifique Directe)*, 63(2 Suppl 3), E255-E266. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2022.63.2s3.2768>
- [22] Mushtaq, S., Daş, Y. K., & Aksoy, A. (2018). Alternative Methods to Animal Experiments. *Türkiye Klinikleri Journal Of Laboratory Animals*. <https://doi.org/10.5336/medsci.2018-59993>
- [23] Rivero, M. N., Lenze, M., Izaguirre, M., Wikinski, S. I., & Gutiérrez, M. L. (2019). Tendencia al reemplazo de animales de experimentación. *Question*, 1(64). <https://doi.org/10.24215/16696581e239>
- [24] Da Silva, T. T., & Corrêa, M. C. D. V. (2020). Inovação biomédica e ética: técnicas substitutivas na experimentação animal. *Revista Bioética*, 28(4), 674-682. <https://doi.org/10.1590/1983-8042202028443>
- [25] Herron, T. J., Brüning-Richardson, A., Gough, J. E., Miller, A. F., Pilkington, G. J., Greenman, J., Speirs, V., & Wu, J. C. (2025). Alternatives to animal testing are the future — it's time that journals, funders and scientists embrace them. *Nature*, 646(8086), 799-801. <https://doi.org/10.1038/d41586-025-03344-6>

- [26] Giles, R., Meijer, E. M., Maas, R. G. C., van Dijk, C. G. M., Verhaar, M. C., & Cheng, C. (2025). Animal-free alternatives for Matrigel in human iPSC-derived blood vessel organoid culture. *Scientific Reports*, 15, 36042. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-20091-w>
- [27] Vashishat, A., Patel, P., Gupta, G. D., & Kurmi, B. D. (2024). Alternatives of animal models for biomedical research: A comprehensive review of modern approaches. *Stem Cell Reviews and Reports*, 20(4), 881–899. <https://doi.org/10.1007/s12015-024-10701-x>
- [28] Park, G., Rim, Y. A., Sohn, Y., Nam, Y., & Ju, J. H. (2024). Replacing animal testing with stem cell-organoids: Advantages and limitations. *Stem Cell Reviews and Reports*, 20(6), 1375–1386. <https://doi.org/10.1007/s12015-024-10723-5>
- [29] Pippin, J. J., Bailey, J., Kennedy, M., Press, D. D., McCarthy, J., Baron, R., Farghali, S., Baker, E., & Barnard, N. D. (2025). Institutional animal care and use committees and the challenges of evaluating animal research proposals. *Research Integrity and Peer Review*, 10(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s41073-025-00169-9>
- [30] Vasiljev, T. G., Salvioni, L., Colombo, M., Galli, P., & Greselin, F. (2025). From animal testing to *in silico* models: a systematic review and practical guide to cosmetic assessment. *Statistical Methods & Applications*, 34, 895–937. <https://doi.org/10.1007/s10260-025-00794-0>
- [31] Maciel, B., Moreira, P., Carmo, H., Gonalo, M., Sousa Lobo, J. M., & Almeida, I. F. (2019). Implementation of an *in vitro* methodology for phototoxicity evaluation in a human keratinocyte cell line. *Toxicology in Vitro*, 61, 104618. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104618>
- [32] Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos. (2019). *Test No. 432: In vitro 3T3 NRU phototoxicity test*. En *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264071162-en>
- [33] Silveira, J. E. P. S., Pereda, M. C. V., Nogueira, C., Dieamant, G., Cesar, C. K. M., Assanome, K. M., Silva, M. S., Torello, C. O., Queiroz, M. L. S., & Eberlin, S. (2016). Preliminary safety assessment of C-8 xylitol monoester and xylitol phosphate esters. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(1), 41–51. <https://doi.org/10.1111/ics.12262>
- [34] Shyr, T., & Ou-Yang, H. (2016). Sunscreen formulations may serve as additional water barrier on skin surface: A clinical assessment. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(2), 164–169. <https://doi.org/10.1111/ics.12271>
- [35] Golembo, M., Puttagunta, S., Rappo, U., Weinstock, E., Engelstein, R., Gahali-Sass, I., Moses, A., Kario, E., Ben-Dor Cohen, E., Nicenboim, J., Ben David, H., Sudakov, K., Cohen, A., Bassan, M., & Zak, N. B. (2022). Development of a topical bacteriophage gel targeting *Cutibacterium acnes* for acne-prone skin and results of a phase 1 cosmetic randomized clinical trial. *Skin Health and Disease*, 2(2), e93. <https://doi.org/10.1002/ski2.93>
- [36] Liu, Y., Li, N., Chen, L., Alépée, N., & Cai, Z. (2020). A ready-to-use integrated *in vitro* skin corrosion and irritation testing strategy using EpiSkin™ model in China. *Toxicology in Vitro*, 65, 104778. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104778>
- [37] Luechtefeld, T., Rowlands, C., & Hartung, T. (2018). Big-data and machine learning to revamp computational toxicology and its use in risk assessment. *Toxicology Research*, 7(5), 732–744. <https://doi.org/10.1039/c8tx00051d>
- [38] Gleeson, M. P., Modi, S., Bender, A., Marchese Robinson, R. L., Kirchmair, J., Promkatkaew, M., Hannongbua, S., & Glen, R. C. (2012). The challenges involved in modeling toxicity data in silico: A review. *Current Pharmaceutical Design*, 18(9), 1266–1291. <https://doi.org/10.2174/138920012799362819>

- [39] Raies, A. B., & Bajic, V. B. (2016). *In silico toxicology: Computational methods for the prediction of chemical toxicity*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 6(2), 147–172. <https://doi.org/10.1002/wcms.1240>
- [40] Wilm, A., Kühnl, J., & Kirchmair, J. (2018). *Computational approaches for skin sensitization prediction*. *Critical Reviews in Toxicology*, 48(9), 738–760. <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1528207>
- [41] Kostal, J., & Voutchkova-Kostal, A. (2016). *CADRE-SS, an in silico tool for predicting skin sensitization potential based on modeling of molecular interactions*. *Chemical Research in Toxicology*, 29(1), 58–64. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00392>
- [42] Ledwoń, P., Sieńczyk, M., & Oleksyszyn, J. (2023). *Thiosemicarbazone–peptide conjugates as potential inhibitors of skin pigmentation enzymes: Design, synthesis and biological evaluation*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 38(1), 219367. <https://doi.org/10.1080/14756366.2023.219367>
- [43] Matsumoto, M., Todo, H., Akiyama, T., Hirata-Koizumi, M., Sugibayashi, K., Ikarashi, Y., Ono, A., Hirose, A., & Yokoyama, K. (2016). *Risk assessment of skin lightening cosmetics containing hydroquinone*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 81, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.08.005>
- [44] Nurkolis, F., Purnomo, A. F., Alisaputra, D., Gunawan, W. B., Qhabibi, F. R., Park, W., Moon, M., Taslim, N. A., Park, M. N., & Kim, B. (2023). *In silico and in vitro studies reveal a synergistic potential source of novel anti-ageing from two Indonesian green algae*. *Journal of Functional Foods*, 104, 105555. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105555>
- [45] Nutho, B., & Tungmunthum, D. (2024). *Anti-aging potential of the two major flavonoids occurring in Asian water lily using in vitro and in silico molecular modeling assessments*. *Antioxidants*, 13(5), 601. <https://doi.org/10.3390/antiox13050601>
- [46] Harrison, C. (2025). *New approach methodologies gain momentum, providing human-relevant alternatives to animal models*. *Lab Animal*, 54(10), 250–253. <https://doi.org/10.1038/s41684-025-01619-z>
- [47] Müller, N. D. (2026). *Lane-Petter's pipeline: Why reliably decreasing animal research takes more than replacements*. *European Journal for Philosophy of Science*, 16(1), 10. <https://doi.org/10.1007/s13194-025-00715-8>
- [48] Emadi, A., Abdolmohammadi Khiav, L., Soleimani, S., Lotfi, M., Abnaroodheleh, F., & Dadar, M. (2025). *Non-animal testing of Iranian enterotoxemia vaccine: cell culture assay for Clostridium perfringens epsilon toxin*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 61(7), 862–870. <https://doi.org/10.1007/s11626-025-01069-4>
- [49] Lilley, E., Coppens, E., Das, P., Galaway, F., Isbrucker, R., Sheridan, S., Stickings, P., & Holmes, A. (2023). *Integrating 3Rs approaches in WHO guidelines for the batch release testing of biologicals: Responses from a survey of vaccines and biological therapeutics manufacturers*. *Biologicals*, 81, 101660. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2022.11.002>
- [50] Lee, T., Kyung, S. Y., Kwon, M., Park, B., & Ko, J. (2026). *Innovations in skin microphysiological systems for nonclinical testing and FDA modernization*. *Microsystems & Nanoengineering*, 12, 44. <https://doi.org/10.1038/s41378-025-01149-1>
- [51] Sharma, R., et al. (2020). *3D bioprinting of neural tissues derived from pluripotent stem cells using a novel fibrin-based bioink containing drug-releasing microspheres*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 57. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00057>
- [52] Wang, J., Cui, Z., & Maniruzzaman, M. (2023). *Bioprinting: A focus on improving bioink printability and cell performance based on different process parameters*. *International Journal of Pharmaceutics*, 640, 123020. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123020>

- [53] Karakaya, E., et al. (2022). *Cell-directed printing: Evaluation of ADA-PEG bioinks for drop-on-demand approaches*. *Gels*, 8(4), 206. <https://doi.org/10.3390/gels8040206>
- [54] Sekar, M. P., et al. (2023). *Hyaluronic acid as a bioink and hydrogel scaffold for tissue engineering applications*. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 9(6), 3134–3159. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c01525>
- [55] Jorgensen, A. M., et al. (2023). *Multicellular bioprinted skin facilitates human-like cutaneous architecture in vivo*. *Science Translational Medicine*, 15(697), eadf7547. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adf7547>
- [56] Olejnik, A., et al. (2022). *3D bioprinting in skin-related research: Recent achievements and application perspectives*. *ACS Synthetic Biology*, 11(1), 26–38. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00472>
- [57] Zhang, M., Zhang, C., Li, Z., Fu, X., & Huang, S. (2023). *Advances in 3D skin bioprinting for wound healing and disease modeling*. *Regenerative Biomaterials*, 10, rbac105. <https://doi.org/10.1093/rb/rbac105>
- [58] Corrà, C., Novellasmunt, L., & Li, V. S. W. (2020). *A brief history of organoids*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 319(1), C151–C165. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2020>
- [59] Zambuto, S. G., Scott, A. K., & Oyen, M. L. (2024). *FDA Modernization Act 2.0 and reproductive research*. *Nature Reviews Bioengineering*, 2(12), 984–986. <https://doi.org/10.1038/s44222-024-00252-8>
- [60] Abd, E., Yousef, S. A., Pastore, M. N., Telaprolu, K., Mohammed, Y. H., Namjoshi, S., Grice, J. E., & Roberts, M. S. (2016). Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 8, 163–176. <https://doi.org/10.2147/CPAA.S64788>
- [61] Aldieri, A., Aldieri, A., Terzini, M., Massai, D., Bignardi, C., & Audenino, A. (2020). Development of an animal-free methodology for mechanical performance assessment of engineered skin substitutes. *Biomedical Science and Engineering*, 1(1). <https://doi.org/10.4081/bse.2019.103>
- [62] Banerjee, P., Kemmler, E., Dunkel, M., & Preissner, R. (2024). ProTox 3.0: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W513–W520. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae303>
- [63] Banerjee, P., & Ulker, O. C. (2022). Combinative ex vivo studies and in silico models ProTox-II for investigating the toxicity of chemicals used mainly in cosmetic products. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 32(7), 542–548. <https://doi.org/10.1080/15376516.2022.2053623>
- [64] Beurdeley-Fehlbaum, P., Pennington, M., Hégerlé, N., Albert, M., Bennett, A., Cheval, J., Clark, A., Cruveiller, S., Desbrousses, C., Frederick, J., Gros, E., Hunter, K., Jaber, T., Gaiser, M., Jouffroy, O., Lamamy, A., Melkowski, M., Moro, J., Niksa, P., ... Ruppach, H. (2023). Evaluation of a viral transcriptome Next Generation Sequencing assay as an alternative to animal assays for viral safety testing of cell substrates. *Vaccine*, 41(37), 5383–5391. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.07.019>
- [65] Biondo, N. E., Argenta, D. F., & Caon, T. (2023). A Comparative Analysis of Biological and Synthetic Skin Models for Drug Transport Studies. *Pharmaceutical Research* 2023 40:5, 40(5), 1209–1221. <https://doi.org/10.1007/s11095-023-03499-9>
- [66] Bramwell, L. R., Gould, S. J., Davies, M., McMullan, C., Trusler, E. C., & Harries, L. W. (2024). An Evaluation of the Replacement of Animal-derived Biomaterials in Human Primary Cell Culture. *Alternatives to Laboratory Animals*, 52(5), 247–260. <https://doi.org/10.1177/02611929241269004>
- [67] Brohem, C. A., Da Silva Cardeal, L. B., Tiago, M., Soengas, M. S., De Moraes Barros, S. B., & Maria-Engler, S. S. (2011). Artificial skin in perspective: Concepts and applications. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 24(1), 35–50. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00786.x>
- [68] Cedrola, C. C., Cedrola, C. C., de Paula, A. C. C., da Costa, J. de C., & Vilela, F. M. P. (2026). Alternatives to animal testing in cosmetic products: A patent applications review and future perspectives. *Toxicology in Vitro*, 112, 106187. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2025.106187>

- [69] de Vries, R. B. M., Leenaars, M., Tra, J., Huijbregtse, R., Bongers, E., Jansen, J. A., Gordijn, B., & Ritskes-Hoitinga, M. (2015). The potential of tissue engineering for developing alternatives to animal experiments: A systematic review. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(7), 771–778. <https://doi.org/10.1002/term.1703>
- [70] De Wever, B., Goldberg, A., Eskes, C., Roggen, E., Vanparys, P., Schröder, K., Le Varlet, B., Maibach, H., Beken, S., De Wilde, B., Turchina, C., Bogaert, G., & Bogaert, J.-P. (2015). “Open Source”-Based Engineered Human Tissue Models: A New Gold Standard for Nonanimal Testing Through Openness, Transparency, and Collaboration, Promoted by the ALEXANDRA Association. *Applied In Vitro Toxicology*, 1(1), 5–9. <https://doi.org/10.1089/aivt.2014.0011>
- [71] Diogo Gonçalves, S., Rodrigues, M., Avidos, M., Morais, A. B., & Caramelo, A. (2025). Use of artificial intelligence in animal experimentation: A review. *Toxicology Letters*, 411(1), 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2025.07.1417>
- [72] Doke, S. K., & Dhawale, S. C. (2015). Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>
- [73] Drauschke, A., & Paštěka, R. (2024). Overview of current technical adaptations to the electro-mechanical lung simulator xPULM for use as an alternative method to animal testing. *IFAC-PapersOnLine*, 58(9), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2024.07.390>
- [74] Eberlin, S., Silva, M. S. da, Facchini, G., Silva, G. H. da, Pinheiro, A. L. T. A., Eberlin, S., & Pinheiro, A. da S. (2020). The Ex Vivo Skin Model as an Alternative Tool for the Efficacy and Safety Evaluation of Topical Products. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 48(1), 10–22. <https://doi.org/10.1177/0261192920914193>
- [75] Fan, G., Li, Y., Ye, Q., Niu, Q., Zhao, X., Chen, L., Gu, Q., Zhang, Y., Wei, X., Wu, S., Wu, Q., & Wu, Y. (2024). Animal-derived free hydrolysate in animal cell culture: Current research and application advances. *Journal of Tissue Engineering*, 15. <https://doi.org/10.1177/20417314241300388>
- [76] Frese, L., Darwiche, S. E., Gunning, M. E., Hoerstrup, S. P., von Rechenberg, B., Giovanoli, P., & Calcagni, M. (2022). Optimizing large-scale autologous human keratinocyte sheets for major burns—Toward an animal-free production and a more accessible clinical application. *Health Science Reports*, 5(1), e449. <https://doi.org/10.1002/hsr2.449>
- [77] Golshan, M., Dortaj, H., Rajabi, M., Omid, Z., Golshan, M., Pourmentazari, M., & Rajabi, A. (2024). Animal origins free products in cell culture media: a new frontier. *Cytotechnology* 2024 77:1, 77(1), 12-. <https://doi.org/10.1007/s10616-024-00666-7>
- [78] Hill, R. E. (2011). Alternative Methods to Reduce, Refine, and Replace the Use of Animals In the Development and Testing of Veterinary Biologics in The United States; a Strategic Priority. *Procedia in Vaccinology*, 5, 141–145. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2011.10.011>
- [79] Huang, H. J., Lee, Y. H., Hsu, Y. H., Liao, C. Te, Lin, Y. F., & Chiu, H. W. (2021). Current Strategies in Assessment of Nanotoxicity: Alternatives to In Vivo Animal Testing. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 4216, 22(8), 4216. <https://doi.org/10.3390/ijms22084216>
- [80] Husain, A., Meenakshi, D. U., Ahmad, A., Shrivastava, N., & Khan, S. A. (2023). A Review on Alternative Methods to Experimental Animals in Biological Testing: Recent Advancement and Current Strategies. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 15(4), 165–171. https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_380_23
- [81] Idrees, A., Schmitz, I., Zoso, A., Gruhn, D., Pacharra, S., Shah, S., Ciardelli, G., Viebahn, R., Chiono, V., & Salber, J. (2021). Fundamental in vitro 3D human skin equivalent tool development for assessing biological safety and biocompatibility – towards alternative for animal experiments. *4open*, 4, 1. <https://doi.org/10.1051/fopen/2021001>
- [82] Isbrucker, R., Levis, R., Casey, W., McFarland, R., Schmitt, M., Arciniega, J., Descamps, J., Finn, T., Hendriksen, C., Horiuchi, Y., Keller, J., Kojima, H., Sesardic, D., Stickings, P., Johnson, N. W., & Allen, D. (2011). Alternative methods and strategies to reduce, refine, and replace animal use for human vaccine post-licensing safety testing: state of the science and future directions. *Procedia in Vaccinology*, 5, 47–59.

<https://doi.org/10.1016/j.provac.2011.10.004>

[83] Jarman, E., Tufarelli, C., & Brown, K. (2026). The evolution and application of animal-free models in drug discovery and disease mechanism research. *Mutagenesis*. <https://doi.org/10.1093/mutage/geag003>

[84] Laschke, M. W., Gu, Y., & Menger, M. D. (2022). Replacement in angiogenesis research: Studying mechanisms of blood vessel development by animal-free in vitro, in vivo and in silico approaches. *Frontiers in Physiology*, 13, 981161. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.981161>

[85] Li, M., De Graaf, I. A. M., & Groothuis, G. M. M. (2016). Precision-cut intestinal slices: Alternative model for drug transport, metabolism, and toxicology research. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 12(2), 175–190. <https://doi.org/10.1517/17425255.2016.1125882>

[86] Mogilever, N. B. (2024). *The Creation of an Animal Component-Free Medium for Mammalian Cells in 2D and 3D Microenvironments*. <https://doi.org/10.20381/RUOR-30720>

[87] Nessar, A., Röhrs, V., Ziersch, M., Ali, A. S. M., Moradi, J., Kurreck, A., Berg, J., & Kurreck, J. (2025). Promoting ethical and reproducible cell culture: implementing animal-free alternatives to teaching in molecular and cell biology. *Frontiers in Toxicology*, 7, 1670513. <https://doi.org/10.3389/ftox.2025.1670513>

[88] Pandey, R., & Poojan, S. (2023). Artificial skin models for animal-free testing: 3D skin reconstruct approach, a journey in the past two decades. *Skin 3-D Models and Cosmetics Toxicity*, 1–17. https://doi.org/10.1007/978-981-99-2804-0_1

[89] Perkas, O., Pomraenke, M., Porwoll, V., Kühnel, C., Wiegand, S., Herrmann, K. H., Winkens, T., & Freesmeyer, M. (2025). In ovo model with emu eggs as novel alternative to animal testing in preclinical imaging research. *EJNMMI Research* 2025 15:1, 15(1), 118-. <https://doi.org/10.1186/s13550-025-01314-7>

[90] Sachot, N., & Vitale, A. (2019). Medical Devices Biological Safety Assessment : towards Animal-free Testing. *Derecho Animal*, 10(1), 0091–0130. <https://doi.org/10.5565/rev/da.392>

[91] Savoji, H., Godau, B., Hassani, M. S., & Akbari, M. (2018). Skin Tissue Substitutes and Biomaterial Risk Assessment and Testing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 373419. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00086>

[92] Scarlat, A. I., Bas Van Balkom, A., Joost, A., & Management, B. (2023). *Animal-free matrix for organoids culturing*. <https://studenttheses.uu.nl/handle/20.500.12932/43842>

[93] Singh, B., Abdelgawad, M. E., Ali, Z., Bailey, J., Budyn, E., Civita, P., Clift, M. J. D., Connelly, J. T., Constant, S., Hittinger, M., Kandarova, H., Kearns, V. R., Kiuru, T., Kostrzewski, T., Kress, S., Durban, V. M., Lehr, C. M., McMillan, H., Metz, J. K., ... Wilkinson, J. M. (2021). Towards more predictive, physiological and animal-free in vitro models: Advances in cell and tissue culture 2020 conference proceedings. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 49(3), 93–110. <https://doi.org/10.1177/02611929211025006>

[94] Stengelin, E., Thiele, J., & Seiffert, S. (2022). Multiparametric Material Functionality of Microtissue-Based In Vitro Models as Alternatives to Animal Testing. *Advanced Science*, 9(10), 2105319. <https://doi.org/10.1002/advs.202105319>

[95] Suhail, S., Sardashti, N., Jaiswal, D., Rudraiah, S., Misra, M., & Kumbar, S. G. (2019). Engineered Skin Tissue Equivalents for Product Evaluation and Therapeutic Applications. *Biotechnology Journal*, 14(7), 1900022. <https://doi.org/10.1002/biot.201900022>

[96] Vinardell, M. P., & Mitjans, M. (2017). Alternative Methods to Animal Testing for the Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients: An Overview. *Cosmetics* 2017, Vol. 4, Page 30, 4(3), 30. <https://doi.org/10.3390/cosmetics4030030>

[97] Weigel, T., Malkmus, C., Weigel, V., Wußmann, M., Berger, C., Brennecke, J., Groeber-Becker, F., & Hansmann, J. (2022). Fully Synthetic 3D Fibrous Scaffolds for Stromal Tissues—Replacement of Animal-Derived Scaffold Materials Demonstrated by Multilayered Skin. *Advanced Materials*, 34(10), 2106780. <https://doi.org/10.1002/adma.202106780>

[98] Yun, Y. E., Jung, Y. J., Choi, Y. J., Choi, J. S., & Cho, Y. W. (2018). Artificial skin models for animal-free testing. *Journal of Pharmaceutical Investigation* 2018 48:2, 48(2), 215–223. <https://doi.org/10.1007/s40005-018-0389-1>

[99] Zeiter, S., Koschitzki, K., Alini, M., Jakob, F., Rudert, M., & Herrmann, M. (2020). Evaluation of Preclinical Models for the Testing of Bone Tissue-Engineered Constructs. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 26(2), 107–117. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2019.0213>

[100] Camargo Patiño, M. J., Gil Orejarena, A. S., & Suárez Rodríguez, X. M. (2025). La experimentación con animales desde una perspectiva moral: entre la necesidad científica y el valor de la vida animal. <https://repository.ucc.edu.co/server/api/core/bitstreams/e27ad6fd-6fc7-4d65-9b0c-be1b4cb98130/content>