

Ensayos preclínicos y criterios *go/no-go* en el desarrollo temprano de fármacos

María C Ramos

Fundación MEDINA, Av. Conocimiento 34, Parque Tecnológico de la Salud, 18016 Granada, Spain.

Palabras clave: preclínica no regulatoria, ADME-tox, non-GLP.

RESUMEN

El desarrollo de nuevos fármacos requiere una evaluación rigurosa en etapas tempranas para garantizar su seguridad, eficacia y viabilidad. Los ensayos preclínicos constituyen una fase crítica en la que se aplican criterios de decisión conocidos como *go/no-go*, que determinan si un candidato debe avanzar a estudios clínicos. Este artículo revisa los objetivos de los ensayos preclínicos, las metodologías empleadas y los principales criterios utilizados para tomar decisiones estratégicas en el desarrollo farmacéutico.

INTRODUCCIÓN

El proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos implica múltiples etapas, desde la identificación de compuestos bioactivos hasta su aprobación para uso clínico. Los ensayos preclínicos constituyen una fase esencial para caracterizar el perfil de seguridad, efectividad y otros parámetros esenciales de los candidatos antes de su evaluación en humanos. Dentro de esta etapa, los ensayos ADME-tox, que abarcan estudios de Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad, permiten caracterizar el perfil farmacocinético y toxicológico de las moléculas candidatas. Dentro del desarrollo de fármacos hay una serie de estudios exigidos por las agencias reguladoras, tales como la *European Medicines Agency* (EMA)¹ y la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA)², que están totalmente reglamentados, pero existe una fase previa, igualmente crucial pero menos regulada que es la investigación preclínica no regulatoria o también denominada en inglés non-GLP (*Good Laboratory Practice preclinical studies*). Esta investigación, que precede o complementa los ensayos preclínicos formales o regulados, se enfoca en generar conocimiento exploratorio sobre el comportamiento biológico de los compuestos, identificar efectos tóxicos, genotóxicos, potenciales interacciones medicamentosas, posibles metabolitos reactivos, optimizar rutas de administración y seleccionar

modelos experimentales adecuados. Su valor radica en elegir el mejor candidato, anticipar riesgos, reducir costes, refinar hipótesis y reducir la probabilidad de fracaso en etapas posteriores. En este contexto, los estudios no regulatorios de ADME-tox permiten una aproximación más flexible al análisis de la seguridad y biodisponibilidad, facilitando decisiones estratégicas en la selección de los mejores candidatos.

En esta etapa se aplican criterios *go/no-go* que permiten elaborar un flujo de trabajo para tomar decisiones sobre la continuidad del desarrollo, optimizando recursos y reduciendo riesgos. Los ensayos de esta etapa bien pueden llevarse a cabo internamente o pueden ser contratados a una compañía externa. Al no existir el requerimiento de realizarlos bajo buenas prácticas de laboratorio, son ensayos mucho más asequibles por lo que se pueden analizar varios candidatos con la idea de elegir el mejor -o cabeza de serie- para llevarlo a etapas posteriores o para pasar a una fase de optimización, donde se realizan las modificaciones químicas necesarias para mejorar sus características *drug-like*, o de similitud con un fármaco, a través de campañas de Química Médica³.

Este artículo examina los ensayos preclínicos no regulatorios, haciendo especial mención a los ensayos de ADME-tox más relevantes, que anticipan riesgos de fases más avanzadas, priorizando los ensayos *in vitro* frente a los *in vivo* para disminuir el número de animales de experimentación usados, tal como recomienda el RD 53/2013, con el seguimiento de la filosofía de las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento). También se abordará cómo esta fase interactúa con los requisitos regulatorios y cómo puede integrarse en un enfoque más eficiente y predictivo del desarrollo farmacéutico. Por último, se añadirán consejos basados en la experiencia desarrollada en el Área de Preclínica de la Fundación MEDINA⁴ y también se incluirán referencias a compañías que ofrecen ciertos modelos listos para ensayar y otras que ofrecen diferentes estudios bajo demanda.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

La investigación preclínica no regulatoria, por lo tanto, permite caracterizar tempranamente el perfil de efectividad, farmacocinética y toxicología de los candidatos, optimizando su desarrollo antes de entrar en fases regulatorias.

ENSAYOS PRECLÍNICOS NO REGULATORIOS

En general, los objetivos de los ensayos preclínicos son evaluar la toxicidad, determinar los parámetros farmacocinéticos, estudiar la farmacodinámica y el mecanismo de acción, identificar efectos adversos en órganos diana y establecer la dosis segura inicial para estudios clínicos de los fármacos.

Para abordar estos objetivos se realizan ensayos *in vitro* e *in vivo* siguiendo normativas internacionales como las de la EMA¹ o la FDA² y también siguiendo guías publicadas de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE)³ o las de *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH)⁶, entre otras.

Los estudios no regulatorios tienen más flexibilidad en cuanto a su abordaje, pero en aras de anticipar los resultados de los ensayos preclínicos regulatorios, el realizarlos siguiendo las guías normalizadas asegura una mejor traslación de los resultados. A continuación, se pasa a describir los principales ensayos preclínicos a tener en cuenta en esta fase preclínica.

Evaluar la toxicidad

La evaluación de la toxicidad en el desarrollo preclínico es esencial para garantizar la seguridad de los fármacos antes de su administración en humanos. Estos estudios permiten identificar efectos adversos, establecer dosis seguras y definir parámetros para los ensayos clínicos.

Los modelos utilizados para los ensayos de toxicidad en orden de menor a mayor complejidad y traslación a la clínica se resumen en la Figura 1.

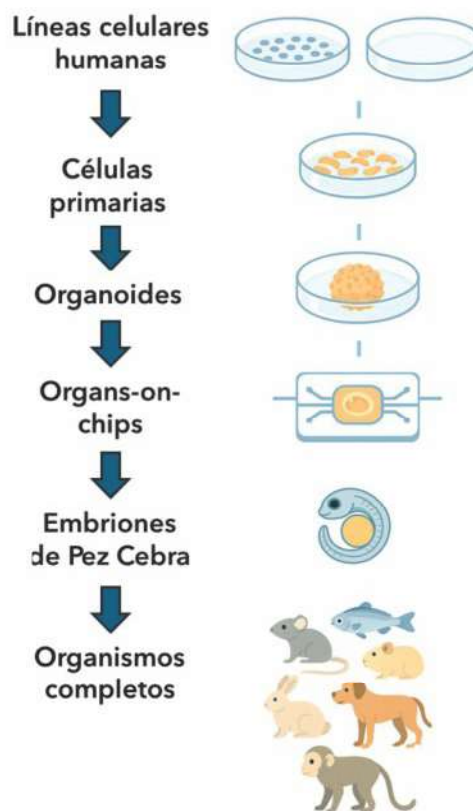


Imagen suministrada por la autoría

Figura 1.- Modelos utilizados para los ensayos de toxicidad en orden de menor a mayor complejidad.

Los más básicos serían ensayos *in vitro* de toxicidad en líneas establecidas humanas, seguidos por líneas primarias, organoides y dispositivos *organ-on-chips*. Se aumentaría en complejidad y en potencial de traslación con ensayos en embriones de pez cebra y en organismos completos: pez cebra, ratón, rata, cobaya, conejo, perro y mono (en este último caso hay una regulación muy estricta sobre su utilización). Por lo tanto, tras los estudios de toxicidad *in vitro*, los estudios tempranos en animales se suelen realizar en pez cebra y/o ratón. En cuanto a lo requerido por las agencias reguladoras, los ensayos regulatorios deben realizarse en dos especies (organismos completos): una roedor (rata o ratón) y en otra que no sea roedor (conejo o perro).

Consejo: un buen planteamiento de los ensayos para evaluar la toxicidad en estas primeras fases ahorra muchos quebraderos de cabeza en fases posteriores. Mención especial es el ensayo en embriones de pez cebra denominado FET (Fish Embryo Toxicity), cuya realización está perfectamente detallada en la guía de la OCDE TG236^{7,8} y que al estar el embrión del pez cebra durante los 5 primeros días tras la fertilización fuera del amparo del Real Decreto de experimentación animal (RD53/2013), no necesita de la aprobación por el Órgano Habilitado y la Autoridad Competente, con lo que se facilita su utilización. Hay diversas compañías que ofrecen estudios bajo demanda en pez cebra tales como ZeClinic⁹ y Biobide¹⁰ y de otros modelos superiores, como Charles River Laboratories¹¹ o Vivotecnía¹².

Determinar parámetros farmacocinéticos y de ADME.

La farmacocinética hace referencia a los efectos del organismo sobre el fármaco y explica los cambios de concentración del fármaco conforme va pasando el tiempo tras su administración. El ensayo por excelencia para medir la farmacocinética de un compuesto se basa en la administración de este en un modelo animal, ratón o rata, por vía oral, intravenosa o intraperitoneal; tras lo que se extrae la sangre y los órganos a diferentes tiempos para determinar la concentración plasmática del compuesto en función del tiempo y su llegada y permanencia en los diferentes órganos y tejidos¹³. El análisis del compuesto se suele realizar empleando equipos de cromatografía líquida con detección por espectroscopía de masas (HPLC/MS). De esta manera se calculan varios parámetros de interés entre los que destaca la C_{max} (concentración máxima que alcanza el fármaco en la sangre), T_{max} (el tiempo tras el suministro del fármaco), t_{1/2} (vida media del fármaco en la sangre), CL (aclaramiento del fármaco) y F (biodisponibilidad).

Pero antes de medir la farmacocinética *in vivo*, se pueden realizar experimentos *in vitro* para predecir la estabilidad metabólica, el potencial de permeabilidad celular, la unión a proteínas y los potenciales de interacción fármaco-fármaco. Estos estudios se engloban dentro del llamado ADME y pueden utilizarse para descartar compuestos con efectos metabólicos indeseables, mala absorción, incapacidad para alcanzar la diana terapéutica o con alto potencial de interacciones metabólicas con otros fármacos o xenobióticos en el organismo. Los ensayos ADME más orientativos y generalizados se resumen en la figura 2.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 2.- Ensayos ADME más relevantes.

Consejo: la mejor forma de realizar los ensayos de ADME es siguiendo una estrategia lógica de mayor a menor relevancia y de menor a mayor coste, atendiendo a los criterios *go/no-go*, que se expondrán en la siguiente sección. Lo ideal es no realizar todos los ensayos en paralelo, sino ir peldaño a peldaño, para poder decidir en cualquier momento si continuar con el desarrollo o parar si se encuentran resultados no deseados. Diferentes compañías ofrecen la posibilidad de realizar estos ensayos bajo demanda: Eurofins Corporation¹⁴, Evotec¹⁵, Fundación MEDINA⁴, etc. Otras suministran modelos listos para ensayar como MedTech Barcelona¹⁶.

Estudiar la farmacodinámica y el mecanismo de acción.

La farmacodinámica es el estudio de lo que le sucede al organismo por la acción de un fármaco, por lo que tiene que ver con el mecanismo de acción de este. Se deben realizar ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* para determinar su mecanismo de acción, caracterizar a qué diana se une y los diferentes parámetros de su interacción. También es necesario demostrar la actividad biológica del fármaco sobre su diana terapéutica, analizar los efectos moleculares y biológicos que se producen como consecuencia de la acción del fármaco sobre la diana, determinar la dosis mínima de fármaco que produce el máximo efecto biológico, y explorar la eficacia de distintas pautas de administración en función de su efecto biológico.

Destacan los siguientes ensayos *in vitro* para estudiar la farmacodinámica de un candidato:

- **Unión a receptores:** usando ensayos de unión de radioligando o, más recientemente, de ligando marcado con un fluoróforo¹⁷, para determinar si el fármaco se une a un receptor específico.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

- *Activación/represión de vías de señalización:* mediante técnicas como ELISA, *western blot* o PCR para detectar proteínas o genes activados en las células tras la exposición al fármaco.
- *Cambios funcionales a nivel celular:* si el compuesto modula fenómenos como la proliferación, apoptosis, necrosis, migración... Pueden ser evaluados con ensayos como el test MTT, la medida de activación de caspasas, cambios morfológicos celulares o subcelulares mediante imagen o ensayos más específicos tales como el *wound healing* para analizar la migración celular en el contexto de un fármaco antitumoral¹⁸.

Para estudiar el **mecanismo de acción**, o cómo el fármaco produce su efecto, destacan los siguientes ensayos *in vitro*:

- *Modelos celulares específicos:* se usan líneas celulares que expresan la diana del fármaco de forma endógena o generada exógenamente mediante edición génica. Cada vez se utilizan modelos celulares avanzados más fisiológicos, hablamos de cultivos 3D, tumoroides, organoides, organs-on-chips, pero también células madre pluripotenciales inducibles (iPSC) tanto de pacientes como de controles sanos, que pueden ser utilizadas para ser diferenciadas a diferentes tipos celulares y también para realizar edición génica mediante CRISPR e introducir modificaciones génicas que mimeticen más fielmente una determinada enfermedad^{19,20}.
- *Ensayos bioquímicos:* para inhibidores o activadores de enzimas, se mide la actividad en presencia del fármaco. Una aproximación muy útil en muchos casos son los ensayos de interacción proteína-proteína (PPI), que permiten estudiar cómo interactúan físicamente dos o más proteínas, lo cual es clave para entender el mecanismo de acción de ciertos fármacos. Dentro de los ensayos PPI merecen ser nombrados los ensayos basados en transferencia de energía tales como FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), que detecta proximidad entre proteínas marcadas con fluoróforos; BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer), similar a FRET, pero que usa luciferasa como donador de energía y, por último NanoBRET™ y NanoBiT® (Promega Corporation), que son tecnologías avanzadas que permiten estudiar interacciones en células vivas con alta sensibilidad²¹.
- *Técnicas de imagen:* destacan los sistemas de imagen de alto contenido (HCI) que son sistemas de microscopía automatizada tanto de campo claro como de fluorescencia y que se puede utilizar para observar cambios morfológicos, con técnicas como la de la pintura celular o *cell painting*²², o para determinar localización subcelular de proteínas²³.

- *Estudios de expresión génica:* usando transcriptómica (RNA-seq) para ver qué genes se regulan, cuales se sobreexpresan y cuales se reprimen, tras el tratamiento.

Consejo: antes de pasar a los ensayos en animales, hay que caracterizar muy bien el efecto del candidato sobre la diana y determinar, si es posible, la especificidad de este.

Identificar efectos adversos en órganos y tejidos

Antes de pasar al estudio directo de los órganos a nivel macro y microscópico en un modelo animal, es necesario realizar una serie de ensayos *in vitro* muy específicos y relevantes, como los que se muestran en la figura 3.



Imagen suministrada por la autoría

Figura 3.- Ensayos de toxicidad órgano y tejido dependientes.

- *Citotoxicidad general:* se aplicaría lo comentado respecto a la toxicidad en el primer punto. Se pueden utilizar modelos celulares más simples como líneas celulares humanas o más complejos como organs-on-chips²⁴. Hay muchos tipos de ensayos para medir la citotoxicidad, entre los más habituales está el test MTT, LDH o la medida de ATP.
- *Genotoxicidad:* se refiere a la capacidad de un compuesto o agente para dañar el material genético, lo que puede causar mutaciones, cáncer y otras enfermedades. Una manera de medir si un compuesto es genotóxico es mediante el test de Ames, que utiliza bacterias para determinar si una sustancia química es mutagénica y que está detallado en la guía *TG471-Bacterial Reverse Mutation Test*, de la OCDE²⁵, y mediante el test de micronúcleos, que mide el porcentaje de células hijas durante la división celular que no incorporan correctamente el material genético, por la exposición a agentes genotóxicos, detallado en el *TG487-In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*, de la OCDE²⁶.

- **Hepatotoxicidad:** es una medida crucial porque el hígado es el principal órgano encargado de metabolizar los medicamentos, y su daño puede provocar efectos adversos graves, incluso fallo hepático agudo. No hay ningún modelo *in vitro* que sea un buen predictor de la hepatotoxicidad; esto es debido a que las células en cultivo suelen perder buena parte de las enzimas del metabolismo de los fármacos, el reto es encontrar un modelo que exprese todas estas enzimas. Aunque de forma habitual se utilizan líneas celulares establecidas de hígado como HepG2, es más recomendable el uso de hepatocitos primarios o modelos celulares crecidos en matrices extracelulares²⁷.
- **Cardiotoxicidad:** en particular la medida de la inhibición del canal de potasio hERG es uno de los estudios preclínicos exigidos por la FDA y la EMA y obligatorio para pasar a fases posteriores del desarrollo. hERG (*human Ether-à-go-go-Related Gene*) codifica un canal de potasio (Kv11.1) esencial para la repolarización del corazón, su inhibición puede causar prolongación del intervalo QT (medida del tiempo entre el comienzo de la onda Q y el final de la onda T en un electrocardiograma), que pueden desembocar en arritmias potencialmente mortales. La ICH ha desarrollado una guía fundamental para abordar el estudio *in vitro* de este canal, la ICH S7B²⁸. Los principales modelos *in vitro* para realizar esta medida son los que incluyen células modificadas para expresar heterológicamente el canal hERG y más recientemente células cardíacas derivadas de iPSC²⁹. En cuanto a las tecnologías de medida pasan del clásico ensayo electrofisiológico *patch-clamp*, a medidas de fluorescencia sensibles al talio y a las más actuales tecnologías de bioluminiscencia.
- **Neurotoxicidad *in vitro*:** se puede estudiar en cultivos neuronales, tanto líneas establecidas como PC12 o SH-SH5Y, células primarias de roedores, o células iPS diferenciadas a neuronas humanas para una mayor relevancia fisiológica, en las que detectar efectos citotóxicos. Además de la muerte celular es de interés el estudio del estrés oxidativo, la función mitocondrial, la actividad sináptica y la neuroinflamación, para realizar un perfilado completo.

Consejo: antes de pasar a los ensayos en animales, hay que hacer una buena caracterización *in vitro*, del potencial efecto tóxico del candidato sobre el órgano diana y también sobre los

órganos más sensibles a los químicos, como son el hígado, el corazón y el cerebro.

Establecer la dosis inicial segura para estudios clínicos

La predicción de la dosis inicial segura para los estudios clínicos se realiza en modelos animales en los que se calcula el NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*), pero ensayos *in vitro* previos pueden ayudar significativamente mediante la aplicación de MABEL (*Minimal Anticipated Biological Effect Level*), recomendado por la FDA y la EMA. El MABEL se calcula integrando los resultados preclínicos de: la afinidad *in vitro* del fármaco a su diana, potencia farmacológica, biodisponibilidad estimada y datos de toxicidad celular³⁰.

CRITERIOS GO/NO-GO EN EL DESARROLLO TEMPRANO DE FÁRMACOS

En la actualidad un 90% de los candidatos que llegan a fase clínica fracasan y no alcanzan el mercado, para intentar mejorar este dato los ensayos preclínicos deben ser realizados de forma muy precisa y los modelos predictivos *in vitro* empleados deberían ser cada vez más fiables, a lo que pueden ayudar los avances técnicos surgidos en los últimos años y ya mencionados anteriormente (iPSC, organoides, organs-on-chips, nuevas técnicas de imagen, IA, predicción *in silico*, etc...).

Los criterios *go/no-go* son indicadores clave que determinan si un compuesto debe avanzar a la fase siguiente. Se basan fundamentalmente en la evidencia experimental, aunque pueden anticipar consideraciones técnicas, operacionales y económicas que pudieran surgir posteriormente. Un buen planteamiento en la fase preclínica puede ahorrar pérdidas de tiempo y dinero a la hora de llegar a la fase preclínica regulatoria con un buen candidato que tenga mayor probabilidad de éxito. Es cierto que para cada tipología de fármaco y enfermedad a la que van dirigidos, estos criterios pueden tener variaciones y necesitan ser adaptados, pero en general, se deben ir cumpliendo paso a paso todos ellos.

A continuación, en la figura 4, se muestra un diagrama de flujo con los criterios *go/no-go* que proponemos dentro de esta primera fase del desarrollo de un fármaco, organizados en base a su mayor relevancia y menor coste de realización.

MÉTODOS ALTERNATIVOS



Figura 4.- Diagrama de flujo con los criterios *go/no-go* para una fase temprana del desarrollo de un fármaco.

Los primeros pasos deberían eliminar los candidatos que dieran toxicidad tanto general como órgano-específica y aquellos potencialmente mutagénicos. También en los primeros pasos se deberían eliminar aquellos que pueden dar interacciones medicamentosas por interferir en la metabolización de los fármacos (inhibidores de CYP450) y aquellos que pueden alterar su excreción, por unirse a transportadores renales.

Los siguientes pasos deben contemplar su potencial biodisponibilidad en el organismo, para lo que se debe medir su estabilidad en diferentes condiciones y su probabilidad de llegar al órgano diana atravesando las diferentes barreras del organismo. Si un compuesto no muestra unos buenos resultados en este punto puede ser sometido a una optimización por Química Médica, que modifique la parte de su estructura química responsable de estos resultados negativos pero que conserve el *core* de la molécula que es responsable de su eficacia y de su seguridad. En algunos casos en los que ciertas propiedades pueden ser mejoradas con una buena galénica posterior, no es necesario hacer ninguna modificación de la molécula, aunque siempre va a requerir de esta mejora galénica cuando llegue a fases posteriores.

Una vez todos estos pasos han sido cumplimentados, las moléculas aprobadas deberían a pasar a los ensayos *in vivo*, primero ensayos de toxicidad y después para determinar su perfil farmacocinético. Por lo que, para pasar al siguiente nivel de ensayos, los resultados deben ser claros y cumplir los criterios. Hay resultados que claramente suponen una parada o bien la necesidad de modificar el compuesto químicamente para mejorar sus propiedades *drug-like* o requerirían de un buen desarrollo galénico posterior para poder ser administrados.

CONCLUSIONES

Los ensayos preclínicos y los criterios *go/no-go* son fundamentales para garantizar la seguridad y eficacia de los fármacos en desarrollo. Una evaluación rigurosa en esta etapa mejora la probabilidad de éxito clínico y optimiza el uso de recursos. La implementación de criterios claros y herramientas de apoyo robustas es esencial para avanzar con confianza hacia la fase clínica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Guía de documentos de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA). <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/research-development/scientific-guidelines/clinical-efficacy-safety-guidelines>

2. Guía de documentos de U.S. Food and Drug Administration (FDA). <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents>
3. Rácz A, Mihalovits M, Beckers M, et al. *The changing landscape of medicinal chemistry optimization*. Nat. Rev. Drug Discov. 2025, 24: 870-887. <https://www.nature.com/articles/s41573-025-01225-1>
4. Fundación MEDINA Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía. Desarrollo preclínico. https://www.medinadiscovery.com/services_groups/preclinical-development/
5. Guías de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). <https://www.oecd.org/en/topics/sub-issues/testing-of-chemicals/test-guidelines.html>.
6. Guías de la International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). <https://www.ich.org/>.
7. Guía de la OCDE TG236-FET (Fish Embryo Toxicity). https://www.oecd.org/en/publications/2013/07/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_g1g34036.html.
8. Belanger, S. E., Rawlings, J. M. & Carr, G. J. *Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals*. Environ. Toxicol. Chem. 2013, 32: 1768-1783. <https://doi.org/10.1002/etc.2244>
9. Zeclinics. Estudios en pez cebra. <https://www.zeclinics.com/services-and-solutions/fast-acute-toxicity/>
10. Biobide. Estudios de toxicología en pez cebra. <https://biobide.com/>
11. Charles River. Estudios de toxicología Non-GLP. <https://www.criver.com/products-services/safety-assessment/toxicology-services/non-glp-toxicology?region=3696>
12. Vivotecnia. Estudios toxicológicos in vivo. https://www.vivotecnia.com/general-toxicology/?Toxicity&gad_source=1&gad_campaignid=1017156439&gclid=EAlaQobChMI5acke-8kAMVua2DBx2BEjcAEAMYASAAEgl8QvD_BwE.
13. Navarro, JA, Díaz C, Decara J, et al. *Pharmacokinetics and Endocrine Effects of an Oral Dose of D-Pinitol in Human Fasting Healthy Volunteers*. Nutrients. 2022, 14: 4094. <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/19/4094>
14. Eurofins. Servicios de ADME. <https://www.eurofins.com/biopharma-services/adme/services/pre-clinical/>.
15. Evotec. Servicios de ADME. <https://www.evotec.com/solutions/drug-discovery-preclinical-development/cyprotex-adme-tox-solutions>.
16. MedTech Barcelona. Ensayos de permeabilidad. <https://medtechbcn.com/readycell/permeability-tools/>.
17. Celtarys-Ligandos fluorescentes. <https://www.celtarys.com/celtarys-products/fluorescent-ligands>.
18. Martinotti, S. & Ranzato, E. *Scratch Wound Healing Assay*. Methods Mol. Biol. 2020, 2109:225-229. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31414347/>
19. Fundación MEDINA Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía. Edición génica. https://www.medinadiscovery.com/services_groups/11/crispr-based-gene-editing/
20. Getachew, H., Chinchilla, B. & Fernandez-Godino, R. *Genome Editing of Induced Pluripotent Stem Cells Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complexes to Model Genetic Ocular Diseases*. Methods Mol Biol. 2022, 2549: 321-334. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34128206/>
21. Castillo F, Mackenzie TA, Domingo E, et al. *Identification of novel inflammasome inhibitors via cellular NLRP3 target engagement assays*. SLAS Discov. 2025, 35, 100258. <https://doi.org/10.1016/j.slasd.2025.100258>
22. Wolff C, Neuenschwander M, Beese CJ, et al. *Morphological profiling data resource enables prediction of chemical compound properties*. iScience. 2025, 28(5):112445. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2025.112445>
23. Castillo, F., Mackenzie, T. A. & Cautain, B. *Immunofluorescence Analysis by Confocal Microscopy for Detecting Endogenous FOXO*. Methods Mol. Biol. 2019, 1890: 143-149. https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-8900-3_12
24. Ingber, D. E. *Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine*. Nat. Rev. Genet. 2022, 23: 467-491. <https://www.nature.com/articles/s41576-022-00466-9>
25. Guía de la OCDE. TG471-Bacterial Reverse Mutation Test. https://www.oecd.org/en/publications/2020/06/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test_g1gh295b.html.
26. Guía de la OCDE. TG487- In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. https://www.oecd.org/en/publications/2023/07/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_g1g6fb2a.html
27. Park, S. Y., Koh, W.-G. & Lee, H. J. *Enhanced hepatotoxicity assessment through encapsulated HepG2 spheroids in gelatin hydrogel matrices: Bridging the gap from 2D to 3D culture*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2024, 202: 114417. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641124002431?via%3Dihub>
28. Guía ICH S7B. Cardiotoxicidad. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-guideline-e14-s7b-clinical-nonclinical-evaluation-qt-qtc-interval-prolongation-proarrhythmic-potential-questions-answers-scientific-guideline>.
29. Gintant, G., Sager, P. T. & Stockbridge, N. *Evolution of strategies to improve preclinical cardiac safety testing*. Nat. Rev. Drug Discov. 2016, 15:457-471. <https://www.nature.com/articles/nrd.2015.34>
30. EUPATI. Herramienta desarrollada a través de Innovative Medicines Initiative (IMI). <https://toolbox.eupati.eu/resources/setting-the-first-in-human-dose/>.