

Descubrimiento de fármacos basado en imagenología de células vivas

Camilo Eduardo Hernández-Cuellar^{1,2}, Esteban Castrillón-Martínez², Juan Carlos Gallego-Gómez^{1,2*}.

¹Grupo de Medicina Molecular y de Translación, Carrera 51d No 62-29, edificio MUA, oficina 303.

²Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Teléfono: (574) 219 6924,

*Autor para correspondencia, correo electrónico: carlos.gallego@udea.edu.co

Recibido para evaluación: 24 de enero de 2018

Aceptado para publicación: 10 de abril de 2020

RESUMEN

El diseño eficiente de compuestos aprovechando las características estructurales de las moléculas y la búsqueda eficiente de dianas terapéuticas, ha proporcionado herramientas efectivas en la investigación de nuevos tratamientos cuando esta se enfoca en mecanismos celulares de la enfermedad. Los cambios fenotípicos producidos por la interacción *in vitro* entre molécula-diana, pueden controlarse cuantitativamente mediante imagenología de células vivas. Para garantizar una interacción adecuada, es necesario considerar diferentes elementos cruciales: 1. Las características estructurales y la dinámica molecular del compuesto a evaluar. 2. La relevancia del blanco para la fisiopatología de interés. Sin embargo, el desconocimiento del panorama general en el descubrimiento de fármacos, desde problemáticas estructurales y celulares, ha enlentecido la búsqueda de nuevos tratamientos. Esta revisión descriptiva de tema presenta algunos aspectos estructurales importantes para la caracterización de compuestos como candidatos terapéuticos, y aproximaciones experimentales para desarrollo de sistemas celulares. Los tópicos discutidos se enfocan en la monitorización por imagenología de células vivas y así mismo proporcionamos ejemplos relevantes. La monitorización de efectos fenotípicos producidos por interacciones entre candidato químico y blanco terapéutico en un sistema celular puede favorecer la búsqueda eficiente de moléculas potencialmente terapéuticas.

Palabras clave: Descubrimiento de fármacos, microscopía confocal, técnicas *in vitro*, estructura molecular, biomarcadores, sondas moleculares.

SUMMARY

Drug discovery based on live cell imaging

The efficient compounds' design taking advantage of the molecule's structural characteristics and efficient search for therapeutic targets has provided effective tools for the research of new treatments when this is focused on disease cellular mechanisms. Phenotypic changes produced by *in vitro* interaction between molecules and targets can be monitored quantitatively by live cell imaging. To guarantee adequate interaction, it is necessary to consider different crucial elements: 1. Structural characteristics and molecular dynamics of the evaluated compound. 2. Target relevance for the concern physiopathology. However, overview's ignorance of the drug discovery, from structural and cellular problems, has slowed the new treatments research. This literature review presents some important structural aspects for compounds' characterization as therapeutic candidates and experimental approaches for cellular systems development. Subjects discussed are focused on live cell imaging and we also provide relevant examples. Phenotypic monitoring of interactions' produced effects between the chemical candidate and therapeutic target in a cellular system can favor the efficient search of potentially therapeutic molecules.

Key words: Drug discovery, confocal microscopy, *in vitro* techniques, molecular structure, biomarkers, molecular probes.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de candidatos químicos es la fase primaria del desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos. Consiste en la búsqueda de nuevas moléculas capaces de generar respuesta diferenciada en la actividad de un modulador de enfermedad (elemento diana capaz de regular una red biomolecular importante en la progresión de una enfermedad) [1]. Este proceso de búsqueda es denominado investigación básica y comprende el inicio de la fase de descubrimiento de fármacos.

Durante la investigación básica pueden ser descritas y caracterizadas dianas terapéuticas clave en la generación de un estado de equilibrio entre un estado normal y un estado de preenfermedad, sensible a estímulos externos. Estos comprenden dos de los tres estados de progresión de la enfermedad, donde en el último estado (estado de enfermedad) existe un deterioro grave [2]. Por lo tanto, es importante garantizar que la diana sea modulable (*druggable*) [3], lo cual significa que, al interactuar con un compuesto químico o una proteína, logrará disparar una respuesta biológica que altera el curso de la enfermedad retornando al estado normal.

Algunos estudios logran este cometido gracias a su enfoque en la regulación fenotípica de ese estado de equilibrio y posterior validación de sus resultados [4]. Estos últimos establecen la base de trabajo para las subfases del descubrimiento de fármacos (chequeo primario, secundario y ensayos farmacocinéticos). El chequeo primario o (*Primary screening*) evalúa la capacidad de una librería de compuestos para afectar o modular la función de la diana terapéutica. Posteriormente se determina la relación cantidad-respuesta de estos compuestos y los mecanismos moleculares responsables de su actividad; esto se denomina chequeo secundario o (*Secondary screening*). Los resultados originados en este punto permiten el rediseño de la estructura molecular del compuesto con el fin de optimizar su respuesta. Posterior a estas subfases, se evalúa la farmacocinética de la molécula (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) en modelos fisiológicos [5]. De este modo se asegura la idoneidad de la molécula antes de proseguir con la fase de desarrollo de fármacos (Investigación preclínica, ensayos clínicos, eficacia a pequeña escala; eficacia a gran escala y aplicación clínica) [6-8].

La fase de descubrimiento gira entorno a la interacción entre una molécula y una diana modulable. Para que una molécula sea seleccionada como compuesto candidato, deben ser caracterizadas sus diferentes propiedades derivadas de la interacción molécula-entorno [9]. Estas interacciones pueden depender de la estructura molecular; por lo cual, la diana terapéutica debe afectar de manera significativa y específica el sistema de equilibrio entre estados de la enfermedad, permitiendo así dirigir adecuadamente el diseño o rediseño de la estructura molecular.

La estructura molecular determina las propiedades fisicoquímicas, bioquímicas, farmacocinéticas y toxicológicas de un compuesto. Así, cuando una molécula interactúa con su entorno, observamos interacciones determinadas por sus propiedades estructurales (capacidad de donar o aceptar electrones, capacidad de interacción por puentes de hidrógeno, lipofilidad, peso o tamaño molecular, polaridad, etcétera) [10]. Estas interacciones se denominan propiedades fisicoquímicas (área de superficie polar, lipofilidad, permeabilidad, reactividad, solubilidad, etcétera) cuando la naturaleza de su entorno es física [11]. Propiedades bioquímicas cuando la naturaleza de su entorno es biológica (absorción, metabolismo, unión a proteínas y tejidos, etcétera) [12]. La interacción entre estas últimas y sistemas vivos, determinan las propiedades farmacocinéticas y toxicológicas (eliminación, biodisponibilidad, dosis letal 50, toxicidad idiosincrásica, vida media, etcétera) [13]. Por lo tanto, la estructura de una molécula es un factor determinante en el descubrimiento de nuevos candidatos químicos.

METODOLOGÍA

Búsqueda bibliográfica y fuentes de información

Se realizó una búsqueda de información relacionada con investigación biomédica y el descubrimiento de fármacos. Los estudios se identificaron a través del motor de búsqueda de Google, Google Scholar, el cual indexa editoriales, bibliotecas, repositorios, bases de datos bibliográficas, entre otros. Se tuvieron en cuenta listas de referencias de artículos y consulta con un experto para la realización de la búsqueda de información.

La estrategia de búsqueda se compuso de términos claves y operadores booleanos (AND) para optimizar la búsqueda. Los términos utilizados fueron:

Biomedical Research.

Complex diseases AND Biomolecular networks.

Drug discovery AND Drug development.

Live cells AND Drug development.

Live cells AND Click chemistry.

Live cells AND Proteomics.

CRISPR Cas9 *author: Mojica.*

Chemical ecology AND Network.

Molecular structure AND Drug development AND Live cell.

Drug discovery AND Computational mapping.

Drug discovery AND Molecular dynamic.

Drug discovery AND High throughput assay AND Live cell imaging.

High throughput assay AND Live cell imaging AND Ex vivo.

Criterios de elegibilidad y selección

1. Palabras claves: *click chemistry*, CRISPR-Cas9, *chemical ecology*, *molecular structure*, *ex vivo*, live cell imaging.
2. Ventana de búsqueda: 5 años.

3. Estado de publicación: solo artículos publicados en revistas especializadas.
4. Idioma: se seleccionaron las publicaciones realizadas en idioma inglés.

Selección de los estudios

Mediante una lectura crítica y detallada de los títulos y resúmenes de los artículos, el investigador principal verificó que los términos claves, objetivos, metodología, resultados y conclusiones fueran relevantes, o que describieron el fenómeno de interés, para el cumplimiento de los objetivos de la presente revisión, al igual que fueran publicados en revistas reconocidas del tema.

Resultados de la selección de los estudios

La estrategia de búsqueda identificó 289 artículos, los cuales fueron revisados que cumplieran con todos los criterios de elegibilidad. Posteriormente, se hizo la selección para evaluar si el contenido desarrollado era pertinente, obteniéndose así un total de 51 artículos que fueron sometidos a un análisis profundo de su información, de los cuales un total de 36 son artículos de revisión y 15 son artículos originales. El investigador principal extrajo la información de los estudios incluidos, que posteriormente fue revisada por otro investigador. Además, se incluyeron 3 libros y 4 artículos fuera de la ventana de búsqueda para explicar conceptos y ampliar la información del tema. Por recomendación de un experto, se incluyó un video conferencia y 3 artículos originales para complementar la revisión (figura 1).

La brecha entre el descubrimiento y desarrollo de fármacos

El conocimiento sobre dianas terapéuticas obtenido de la investigación básica debe permitir superar la estrecha brecha de translación que separa el descubrimiento de fármacos del inicio del desarrollo preclínico [14]. Esta brecha puede presentar diferentes problemáticas limitantes, posiblemente relacionadas con la interacción entre candidato químico y diana en un entorno celular. Esas problemáticas se denominan bloqueo de la innovación [15, 16]. De este modo, consideramos necesario integrar la identificación de potenciales dianas con una adecuada caracterización de compuestos teniendo los mecanismos patogénicos de la enfermedad; para posteriormente observar y monitorear una respuesta en el comportamiento celular.

El bloqueo de la innovación entre las fases de descubrimiento y desarrollo de fármacos debe ser resuelto. Más adelante describiremos cómo la interacción candidato químico-diana terapéutica, evaluada durante los procesos de caracterización e identificación, puede ser abordada desde la captura de imágenes de células vivas permitiendo solucionar esa problemática de translación.

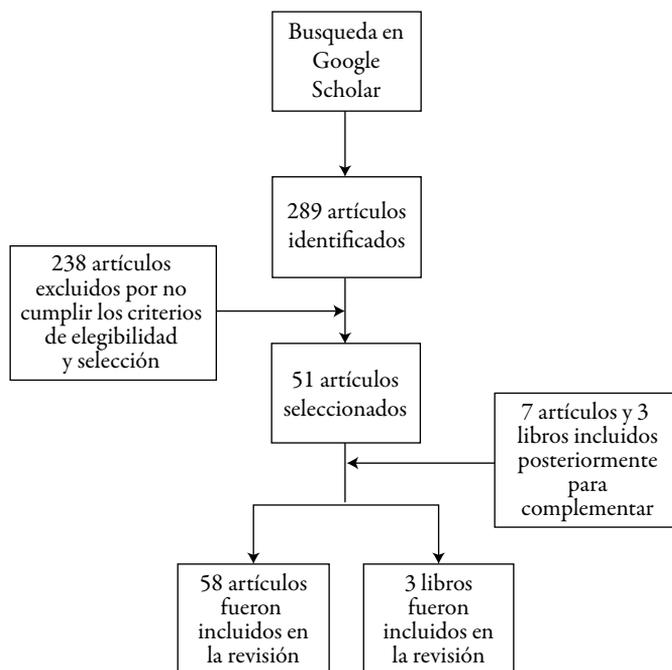


Figura 1. Proceso de búsqueda y selección de los artículos.

La estructura molecular y su importancia en el descubrimiento de fármacos

Ante la diversidad estructural de las moléculas existentes en la naturaleza y sintetizadas por el hombre [17-19], se observa una limitada disponibilidad de compuestos a evaluar frente al creciente panorama de dianas terapéuticas. Esto se debe a procesos naturales de interacción metabólica entre especies de organismos estudiada por la ecología química (como por ejemplo la facilitación, mutualismo, relación huésped-parásito, alelopatía y relación presa-predador) [20-22]. Esto ofrece un panorama más reducido en la búsqueda de nuevos fármacos; por lo cual, las librerías de compuestos no proporcionan alta diversidad estructural comparada con los productos naturales. Los pocos resultados destacables en el descubrimiento de fármacos son su evidencia [23]. En este sentido, la búsqueda de nuevas moléculas debe realizarse desde fuentes naturales y teniendo en cuenta su relevancia en sistemas biológicos.

Los complejos mecanismos celulares pueden ser aproximados a diferentes aspectos de la biología de las enfermedades [24]. Partiendo de este patrón, es posible optimizar eficientemente la caracterización de moléculas como posibles candidatos químicos, teniendo en cuenta los cambios fenotípicos en líneas celulares específicas [9]. Además, las interacciones de los compuestos con un entorno celular podrían dirigir la búsqueda

hacia una diana concreta; evitando así actividad indeseada en otros receptores distintos a la diana terapéutica [25]. Aquí proponemos la imagenología de células vivas y la modelación matemática de redes de regulación de genes y vías de señalización como herramienta de monitorización cuantitativa del comportamiento celular ante un compuesto [26].

Caracterizar una molécula como posible compuesto candidato capaz de generar cambios fenotípicos en un sistema biológico, involucra consideraciones estructurales adecuadas a partir de los diferentes factores que definen las propiedades de interacción molécula-entorno. Estas interacciones son fundamentales para otorgar actividad y selectividad al compuesto [27]. Garantizar un equilibrio específico entre propiedades fisicoquímicas y bioquímicas proporciona cierto nivel de interacción con el blanco terapéutico, tal que se logre la modulación requerida. Además, el compuesto de presentar buena solubilidad acuosa, estabilidad metabólica y permeabilidad [28].

Es posible implementar el diseño estructural computacional de compuestos como herramienta para determinar dicho equilibrio de interacción [23, 29]. Esta herramienta predice la energía libre de unión a partir de la flexibilidad estructural entre el compuesto candidato y su diana cuando se da una interacción entre ambos. Esta predicción resulta de simulaciones, basadas en la dinámica molecular clásica, donde se identifican trayectorias espaciotemporales (posición y velocidad) de los átomos involucrados en la interacción [23, 30]. De este modo, la selección o diseño estructural puede ser enfocado en una interacción específica; siempre y cuando se tenga en cuenta parámetros estructurales generales adecuados para el equilibrio de interacción.

Dentro de las consideraciones estructurales se encuentra que el *tamaño molecular* puede determinar el grado de interacción entre el candidato y el blanco [31]. Compuestos pequeños, con peso molecular <500 Da o menos de 20 átomos sin contar átomos de hidrógeno [32], presentan *enlaces C-H* que aportan significativamente a la energía libre de unión [30]; siempre y cuando estos enlaces pertenezcan a los grupos funcionales más próximos a la superficie del blanco terapéutico [29]; por lo tanto, a mayor energía libre de unión, mayor afinidad de unión entre candidato-blanco.

El *área de superficie polar*, medida en Å^2 , es importante para la predicción de permeabilidad y solubilidad a partir de la polaridad; esta es asociada a la formación de *puentes de hidrógeno* para valores entre 50 y 100 Å^2 , los cuales también contribuyen a la energía libre de unión [29, 31]. Sin embargo, esta propiedad fisicoquímica no considera átomos electronegativos diferentes a oxígeno y nitrógeno; los cuales también aportan a la *polaridad* global del compuesto [33]. Una estrategia útil para predecir la polaridad de manera más acertada es combinar el cálculo del área de superficie polar con

descriptores numéricos cuantitativos como VolSurf. Estos descriptores son extraídos de mapas de campos moleculares (calculados a partir de la configuración espacial de la molécula) [33, 34].

La *lipofilidad*, expresada como logaritmo del coeficiente de partición entre fases inmiscibles (P), está asociada a baja *solubilidad* acuosa (baja absorción) y aumento de carga metabólica para ser eliminado de circulación sistémica cuando presenta valores de $\log P > 2$ [35], generando toxicidad y por tanto fracaso del compuesto como candidato. El aumento de la carga metabólica puede generar metabolitos potencialmente *reactivos*, los cuales pueden presentar unión covalente a proteínas del metabolismo hepático (toxicidad idiosincrásica) [36-38]. También pueden considerarse los puentes de hidrógeno como predictores de coeficientes de partición alcano/agua (específico según la lipofilidad del compuesto) [39]. Esto se debe a que donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, presentes en la estructura de una molécula, favorecen la solvatación acuosa haciendo el soluto menos lipofílico.

Una vez caracterizados los posibles candidatos, éstos pueden ser evaluados por análisis de relación estructura actividad para identificar o validar los grupos funcionales que aumentan la interacción con el blanco [29]. Este esquema de estudio está arrojando información relevante en para el descubrimiento de fármacos [40]. Lo anterior demuestra que realizar modificaciones estructurales favoreciendo el equilibrio de interacción, aumenta la afinidad de un candidato por un blanco terapéutico. Sin embargo, para lograr modificar el curso de la enfermedad es necesario identificar correctamente el blanco terapéutico.

La complejidad biológica de las enfermedades en la identificación de dianas terapéuticas

La identificación de blancos relevantes para regular un proceso biológico es un paso indispensable en el descubrimiento de candidatos químicos. Actualmente se desarrollan e implementan estrategias que direccionan la búsqueda de dianas hacia enfoques basados en mecanismos específicos de procesos patológicos a partir de sistemas celulares [9, 24, 25]. Estas estrategias se agrupan en:

Enfoques basados en afinidad. Identifican proteínas capaces de interaccionar con un compuesto específico, para después clasificar sus interacciones según su funcionalidad [41]. Por ejemplo, la quimioproteómica utiliza sondas de afinidad, por enlace covalente, desarrolladas a partir del compuesto evaluado frente a líneas celulares específicas posteriormente lisadas para análisis proteómico (figura 2) [42-44]. La sonda está constituida por el compuesto de interés conjugado con un grupo reactivo y un grupo identificador de afinidad (figura 2A) [42]. En la sonda, el grupo reactivo interacciona de manera irreversible por oxidación directa o unión covalente con una región del sitio

activo de la proteína (figura 2C). Un ejemplo de interacción irreversible es el caso de la sulfonación de la cisteína [45, 46] o el fluoruro de sulfonilo con lisina en el sitio de unión a ATP en pretinas tipo quinasas [47]. El grupo identificador de afinidad permite la diferenciación y cuantificación de proteínas interactuantes por captura de imágenes de células vivas. Generalmente son usados grupos alquilo para realizar química de “clic” con etiquetas fluorescentes [48].

Es importante identificar las regiones adecuadas del compuesto de interés donde pueda adicionarse el grupo reactivo y el grupo identificador de afinidad sin interferir con la actividad biológica de la molécula [28]. La síntesis de una sonda de afinidad puede ser llevada a cabo usando (*Late stage functionalization*) (LSF) como estrategia. Esta herramienta de síntesis considera la manipulación de enlaces Carbono-Hidrógeno del compuesto [28, 49]. Para esto, hace uso de reacciones químicas específicas según las características de la región molecular a modificar [50-53]. La implementación de LSF consiste en: 1. Identificar los enlaces carbono-hidrógeno a intervenir (facilitado por estudios de relación estructura actividad o modelamiento molecular computarizado) [49]. 2. Establecer las posibles reacciones realizables sobre los enlaces identificados, teniendo en cuenta patrones de selectividad por densidad electrónica. 3. Definir cuáles serán los grupos funcionales por insertar. 4. Prever el equilibrio entre propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de las nuevas moléculas [28].

Este tipo de enfoque puede revelar una serie de dianas clave y garantizar el panorama proteómico específico de una enfermedad siempre y cuando se implemente en sistemas celulares definidos para el estudio de esa patología. Aquellas dianas identificadas presentarían cierto grado de interacción con la molécula usada en la sonda. Posteriormente, la molécula continuaría con el (*Secondary screening*) y estudios *in vitro*.

Enfoques basados en sistemas ex vivo. Estos sistemas son células o tejidos obtenidos directamente de un individuo. Son cultivados para representar un panorama clínico real, el contexto tisular normal o enfermo, el perfil genómico una enfermedad, el metaboloma específico del tejido, entre otras características [54]. Las líneas celulares convencionales no representan con precisión el comportamiento celular *ex vivo* de las enfermedades ante el tratamiento con algún compuesto [55]. Además, las líneas celulares convencionales pueden no representar genotípicamente o fenotípicamente una enfermedad debido su variabilidad genética respecto al tejido origen y a la influencia de condiciones de cultivo distintas a condiciones fisiológicas [54]. Lo anterior justificaría este enfoque como alternativa.

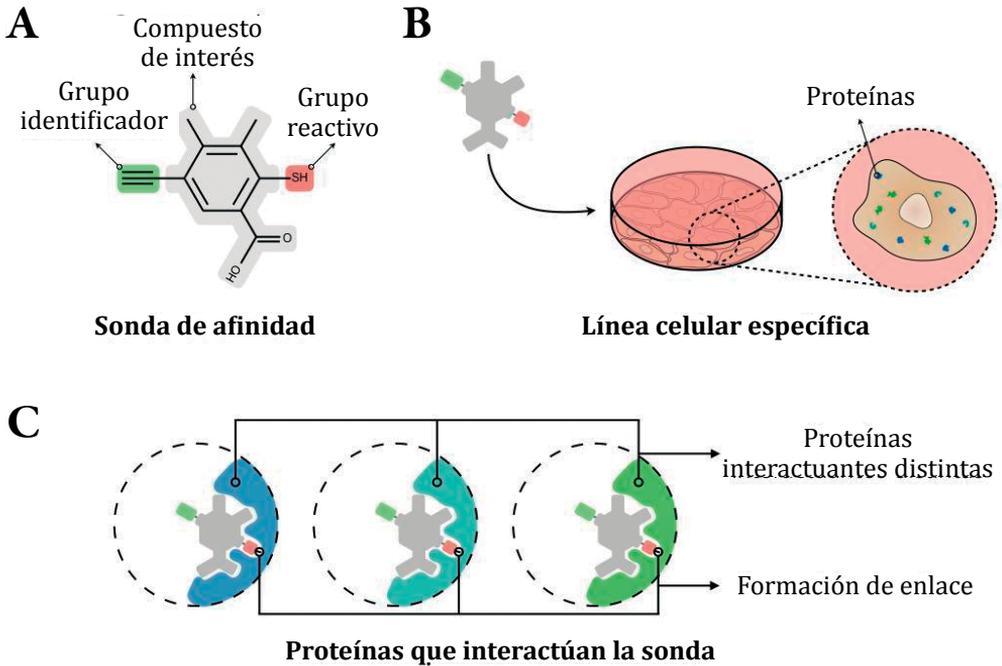


Figura 2. Proceso de interacción entre proteínas de interés y sonda de afinidad. A. Estructura general de la sonda de afinidad. Compuesta por un grupo identificador (verde), compuesto de interés (gris) y un grupo reactivo (rojo). B-C. Evaluación de la sonda en una línea celular específica. La sonda puede interactuar covalentemente con varias proteínas. Posterior análisis proteómico permite la identificación del perfil proteómico específico para dicha interacción.

El aislamiento del material cultivable como sistema *ex vivo* se realiza a partir de tejido relevante según la enfermedad o fenómeno que será estudiado. Este material es sometido a un proceso de mantenimiento (protocolos definidos según el tipo de tejido), el cual debe garantizar su viabilidad [56,-,58]. Este tipo de enfoque ha permitido:

1. Llevar a cabo ensayos de alto rendimiento utilizando hepatocitos primarios de ratones moduladores de esteatosis hepática; dando como resultado una tasa de éxito del 3,3% en el cribado de compuestos candidatos, así como la identificación de la Aurora quinasa C como blanco de inhibición [56]. Este enfoque también ha permitido la identificación de respuesta a tratamiento anticancerígeno para carcinoma de pulmón, utilizando cultivos de explantes del carcinoma [57]. Así como la predicción de la toxicidad asociada a moléculas específicas, como es el caso de la predicción de hepatotoxicidad del acetaminofeno usando cultivos *ex vivo* de tejido hepático humano [58].

Utilizar este tipo de enfoque ofrece ventajas referentes a la manera de intervenir moduladores capaces de alterar el equilibrio entre un estado normal y un estado pre-enfermedad. Sin embargo, puede ser difícil establecer un protocolo que garantice la viabilidad del cultivo en un tiempo adecuado para la captura de imágenes en células vivas. Esto, debido a los altos requerimientos de suplementos y medios. A raíz de esta dificultad, ha surgido la edición del genoma como un enfoque alternativo que busca simular las distintas rutas moleculares que intervienen en el equilibrio de estados de la enfermedad.

Enfoques basados en la edición del genoma. Este tipo de enfoque ha sido potenciado debido a la implementación de la tecnología CRISPR-Cas9. Esta metodología, ha permitido la edición precisa del genoma [54], gracias al desarrollo biotecnológico de sus componentes moleculares [59]. El sistema CRISPR-Cas9 ofrece una alternativa para el desarrollo eficiente de líneas celulares. Para lograr este propósito, se llevan a cabo modificación de genes específicos usando una secuencia guía de ARN (gARN) y una endonucleasa asociada a CRISPR tipo II (Cas9) [60]. El complejo riboproteico formado entre estos dos componentes se une a la secuencia ADN específica para el gARN, cortando la doble cadena de ADN para dicha secuencia guía [61]. Posteriormente se introduce una nueva secuencia usando los mecanismos endógenos de reparación de ADN [54], como son el mecanismo de unión de extremos no homólogos (*Non Homologous End-Joining*) y el mecanismo de recombinación homólogo (*Homologous Recombination*) [61, 62].

La edición del genoma utilizando la tecnología CRISPR-Cas9 está siendo implementada para generar mutaciones específicas, y así simular enfermedades en células madre pluripotentes inducidas (iPSC) [63]; permitiendo estudiar diferentes tipos de células que simulan comportamientos fenotípicos de enfermedades como resultado del desequilibrio entre estados de enfermedad. Un ejemplo de esta implementación es el desarrollo de cardiomiocitos derivados de iPSC obtenidas a partir de pacientes que presentaron mutaciones específicas para enfermedades cardíacas [61]. Es posible que, en un futuro, este tipo de enfoque permita la obtención de sistemas celulares, que representen fenotípicamente algunas enfermedades, y así usar estos sistemas en imagenología de células vivas para la evaluación de compuestos.

Imagenología de células vivas para la monitorización de respuestas fenotípicas desencadenadas por interacción entre compuesto candidato y diana terapéutica

Una vez definidos los compuestos que serán evaluados, el sistema celular que será utilizado, la o las dianas con las cuales se espera interacción y los cambios fenotípicos relevantes para observar respuesta de interacción, se realiza el *rastreo primario* (*primary*

screening). Este permite determinar el grado de interacción de los compuestos con la o las dianas terapéuticas.

Las técnicas de microscopía de fluorescencia de alto rendimiento en plataformas para imagenología de células vivas, ha facilitado la identificación, cuantificación y monitorización de procesos celulares [64-66]. Por lo cual, es una herramienta útil en el cribado de compuestos candidato. Ofrece alta resolución espacial y temporal de procesos celulares relevantes, siempre y cuando el sistema celular simule uno o varios fenotipos característicos, o aborde ciertos factores moleculares determinantes del desequilibrio de estados de enfermedad. Por ejemplo: Durante la infección del *virus Dengue* (DENV), los compartimentos celulares alterados pueden ser monitorizados y analizados individualmente (caracterizados por segmentación y cuantificación de imágenes) [67]. El compuesto evaluado dirigido a blancos celulares, en este caso denominado antiviral, debería impedir la progresión del patrón alterado o contribuir a la recuperación del fenotipo normal.

Para poder monitorear la respuesta de interacción, es necesario seleccionar un marcador fenotípico (sustancia cuantificable a partir de fenómenos físicos como la absorción o emisión de fotones a ciertas longitudes de ondas electromagnéticas). Las sondas y las etiquetas fluorescentes codificadas genéticamente son los más utilizados [68]. El máximo número de marcadores utilizados de manera simultánea, por sistema celular, depende de la capacidad técnica de los equipos de microscopía y del nivel de exposición según la duración de la formación de la imagen (esto evita fototoxicidad) [26, 68].

La utilización de sondas fluorescentes ha permitido, por ejemplo, el estudio de la dinámica del glutatión [69], que es decisiva en alteraciones celulares que conllevan al desarrollo de enfermedades, puesto que mantiene y modula la homeostasis redox [70]. Estas sondas, que son de respuesta rápida y reversible a glutatión intracelular, se basan en mecanismos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) [69]. Este mecanismo consiste en la transferencia de energía, entre un marcador molecular donador inicialmente excitado y un marcador aceptor. La transferencia de energía que origina la señal a detectar depende de la distancia entre los marcadores y su orientación relativa en el espacio [71].

El uso de etiquetas fluorescentes codificadas genéticamente está dirigido al marcaje de proteínas decisivas en el fenotipo estudiado. Estas etiquetas son insertadas en la célula mediante un proceso de transfección (figura 3A). Esta estrategia de marcaje ha permitido observar, por ejemplo, la interacción coordinada y simultánea de diferentes orgánulos de sistemas celulares (como el aparato de Golgi, gotas lipídicas, lisosomas,

mitocondrias, peroxisomas y retículo endoplásmico), en respuesta a diferentes fenómenos desencadenados por interacciones compuesto-diana (figura 3C) [72].

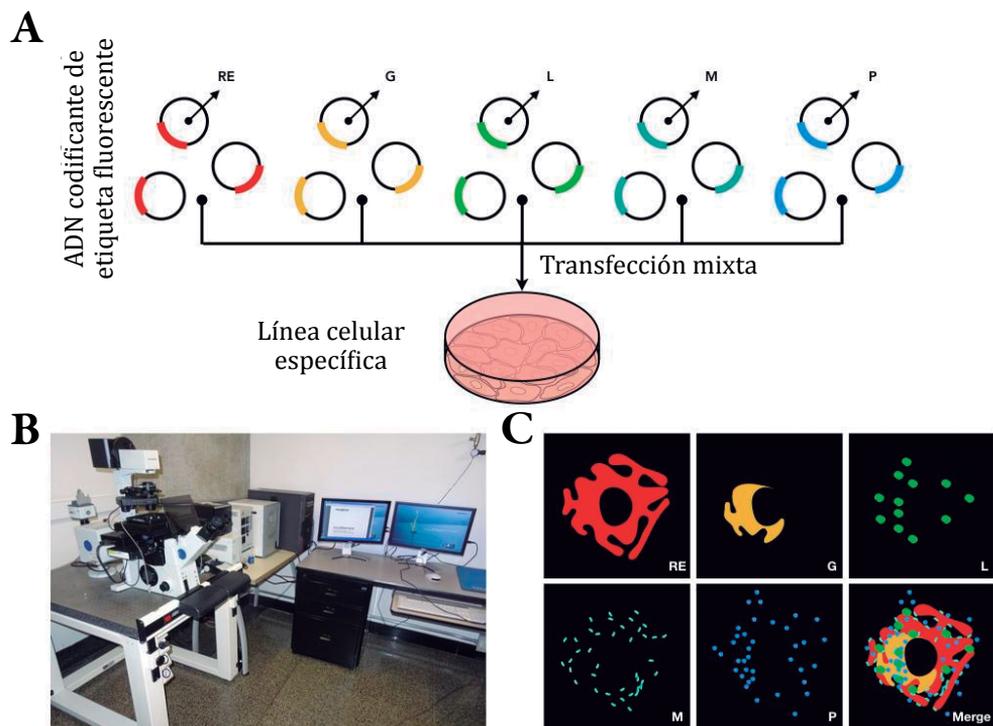


Figura 3. Proceso de transfección y monitorización del interactoma. A. Transfección mixta de ADN codificante de etiqueta fluorescente. Retículo endoplásmico (RE); golgi (G), lisosoma (L), mitocondria (M), peroxisomas (P). B. Microscopio confocal de disco giratorio. Permite la monitorización de células vivas. c. imágenes y videos obtenidos como producto de la monitorización.

Durante la monitorización, cada compuesto evaluado tendrá una respuesta fenotípica distinta como reflejo del grado de interacción. Si lo que se evalúa es una colección de compuestos, es posible agrupar las respectivas respuestas en grupos de imágenes según el cambio fenotípico generado por cada compuesto [68]. Por ejemplo, es posible agrupar respuestas como la dinámica de distribución subcelular de orgánulos [67], nivel de expresión de proteína blanco según la intensidad fluorescencia [73], eventos apoptóticos [74] o comportamiento del interactoma entre orgánulos [72]. Posteriormente se transforman las imágenes en datos numéricos usando algoritmos de análisis cuantitativo, para luego transformar cada colección de datos en vectores de perfil fenotípico [26, 68]. Estos últimos son sometidos a su respectivo análisis estadístico para determinar la tasa de éxito en el cribado de los compuestos al afectar o modular el blanco terapéutico y dar paso al rastreo secundario (*Secondary screening*).

Un ejemplo útil de este proceso sería la monitorización de la distribución mitocondrial alrededor de los núcleos de células infectadas con DENV, generada por el efecto de antivirales candidatos. Es posible desarrollar dicho experimento gracias a la información obtenida en nuestro estudio cualitativo de la distribución mitocondrial en células vivas infectadas con DENV y un control con simulacro de infección [75]. Esta investigación ha logrado desarrollar una metodología automatizada para la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de una proteína mitocondrial en células con y sin infección [67]. Demostrando un comportamiento diferenciado entre ambos grupos de células (figura 4). Los videos de las mitocondrias tomados de las células vivas aportaron información cuantitativa, así como evidencia visual, con la cual se concluye que durante la infección con DENV la distribución mitocondrial es diferenciada respecto a células sin infección [75].

Este tipo de investigaciones permitirán el cribado de compuestos antivirales con efectos en algunas funciones vitales de las células infectadas con DENV. Es ampliamente conocido que el DENV hace una parte de su ensamblaje en las membranas del retículo endoplásmico rugoso [76]. Resulta pues clave evaluar cómo potenciales antivirales alteran la distribución subcelular de este organelo y la dinámica de las vesículas, monitorizado en un curso temporal de células infectadas en comparación con células no infectadas. La capacidad de resolución de los equipos actuales permitirá tales avances investigativos.

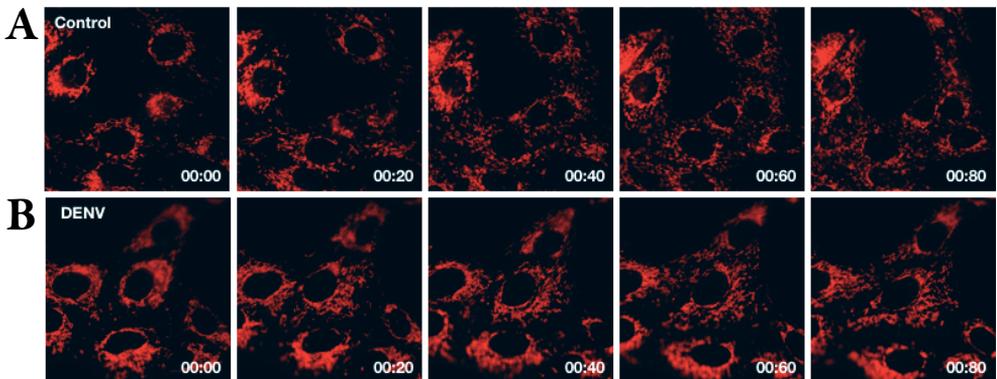


Figura 4. Distribución mitocondrial perinuclear diferencial en células infectadas con DENV y células sin infección. A. Dinámica mitocondrial de células sin infección (Mock). B. Dinámica mitocondrial de células infectadas con virus dengue (DENV).

CONCLUSIONES

El descubrimiento de fármacos implica varias subfases, incluida la evaluación de uno o más compuestos, durante la cual un sistema biológico simula un estado de pre-enfermedad reversible por modulación de dianas terapéuticas, y el rediseño estructural del compuesto, cuando se modifica la estructura para mejorar el grado de interacción con la diana. Sin embargo, la obtención de resultados prometedores está mediado por la estructura molecular del o de los compuestos a evaluar y por la representación adecuada de procesos patológicos a partir de dianas terapéuticas modulables en sistemas celulares. Las propiedades que determinan el grado de interacción compuesto-diana deben ser tenidas en cuenta antes de iniciar cada subfase del descubrimiento. La metodología experimental subyacente a esta fase implica un alto rendimiento para su monitorización, la cual puede ser proporcionada por la imagenología de células vivas. Después de la interacción compuesto-diana, la modulación puede resultar en el desencadenamiento de un fenotipo como respuesta. El cambio fenotípico del sistema celular, que media el equilibrio entre estados de enfermedad, proporciona los datos necesarios para realizar seguimiento por captura de imágenes. Por lo tanto, la monitorización por imagenología de células vivas se fundamenta en la adecuada selección de un fenotipo resultante a la modulación generada por el compuesto evaluado.

Aunque el descubrimiento de fármacos enfrenta diferentes retos relacionados con la caracterización de compuestos candidato, la identificación de dianas y con la monitorización de su interacción; cada uno de estos avanza en simultáneo al desarrollo de:

1. Tecnologías computacionales para el diseño estructural de compuestos.
2. Tecnologías para captura de imagen en células vivas.
3. Estrategias para la generación de sistemas celulares capaces de ofrecer información relevante para las enfermedades. Por lo tanto, es posible implementar estrategias, como la aquí propuesta, que integren el estudio racional de compuestos, la fisiopatología celular y la monitorización eficiente de la respuesta entre compuestos y dianas. Quizá solo así sea posible avanzar en la búsqueda nuevos tratamientos farmacológicos sin fracasar en ello.

AGRADECIMIENTOS

Los investigadores agradecen a Colciencias y a Sostenibilidad CODI de la Universidad de Antioquia por su financiación. Esta revisión fue apoyada por la subvención Colciencias código 111577757700, CT 614-2018 del Gobierno colombiano

concedido al Grupo de Sustancias Bioactivas de la Universidad de Antioquia, y por Sostenibilidad CODI 2018-20 de la Universidad de Antioquia para el Grupo de Medicina Molecular y de Translación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los investigadores declaran que no tienen conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. T. Gareth, An introduction to drug discovery, en: *Fundamentals of medicinal chemistry*, T. Gareth, Ed., Wiley, New York, 2003, Vol. 2, pp. 57-70.
2. R. Liu, M. Li, Z Liu, J. Wu, L. Chen, K. Aihara, Identifying critical transitions and their leading biomolecular networks in complex diseases, *Scientific Reports*, **2**, 813 (2012).
3. J. Trosset, N. Vodovar, Structure-based target druggability assessment, *Methods and Protocols*, **986**, 141 (2013).
4. C. Vockley, A. Barrera, T. Reddy, Decoding the role of regulatory element polymorphisms in complex disease, *Current Opinion in Genetics and Development*, **43**, 38 (2017).
5. T. Lavé, A. Caruso, N. Parrott, A. Walz, Translational PK/PD modeling to increase probability of success in drug discovery and early development, *Drug Discov. Today Technol.*, **21-22**, 27 (2016).
6. P. Bonate, P. Vicini, Preclinical pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and simulation in drug development, en: *Preclinical drug development*, M. Rogge, D. Taft, Eds., Informa HealthCare, New York, 2016, Vol. 187, pp. 141-160.
7. G. Steel, Preformulation as an aid to product design in early drug development, en: *Pharmaceutical preformulation and formulation: A practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form*, M. Gibson, Ed., Informa HealthCare, New York, 2016, Vol. 2, pp. 188-246.
8. M. Gibson, Product optimization, en: *Pharmaceutical preformulation and formulation: A practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form*, M. Gibson, Ed., Informa HealthCare, New York, 2016, Vol. 2, pp. 289-324.

9. T. McCann, Live cell imaging: An industrial perspective, en: *Live cell imaging: Methods and protocols*, D. Papkovsky, Ed., Springer Protocols, Switzerland, 2010, Vol. 591, pp. 47-66.
10. E. Kerns, L. Di, Advantages of good drug-like properties, en: Drug-like properties: Concepts, structure design and methods. From ADME to toxicity optimization, E. Kerns, L. Di, Eds., Elsevier, London, 2008, Vol. 1, p. 6-15.
11. E. Kerns, L. Di, Physicochemical properties, en: *Drug-like properties: Concepts, structure design and methods. From ADME to toxicity optimization*, E. Kerns, L. Di, Ed., Elsevier, London, 2008, Vol. 1, pp. 37-96.
12. E. Kerns, L. Di, Disposition, metabolism, and safety, en: *Drug-like properties: Concepts, structure design and methods. From ADME to toxicity optimization*, E. Kerns, L. Di, Ed., Elsevier, London, 2008, Vol. 1, pp. 137-124.
13. E. Kerns, L. Di, Disposition, Metabolism, and Safety-Pharmacokinetics. en: *Drug-like properties: concepts, structure design and methods. From ADME to toxicity optimization*, E. Kerns, L. Di, Ed., Elsevier, London, 2008, Vol. 1, pp. 228-235.
14. A. Van der Laan, M. Boenink, Beyond bench and bedside: Disentangling the concept of translational research, *Health Care Anal.*, **23**(1), 32-49 (2015).
15. J. Gallego-Gómez, Video: jueves 2:00-4:30 p. m. XXVII Congreso Nacional de Medicina General y Social 8/10/2015, *Enfoque en Medicina de Translación*, Minuto 36:23-1:05, YouTube: https://www.youtube.com/watch?v=t6R2XCh6_6g, consultado en septiembre de 2018
16. F.W. Crowley, J.F. Gusella, Changing models of biomedical research, *Translational Research*, **1**(1), 1-6 (2009).
17. R. Santos, O. Ursu, A. Gaulton, R. Donadi, C. Bologa, A. Karlsson, B. Al-Lazikani, A. Hersey, T.I. Oprea, J.P. Overington, A comprehensive map of molecular drug targets, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **16**(1), 19-34 (2016).
18. E. Barnes, R. Kumar, R. Davis, The use of isolated natural products as scaffolds for the generation of chemically diverse screening libraries for drug discovery, *Nat. Prod. Rep.*, **33**(3), 372-381 (2016).
19. G. Cragg, D. Newman, Natural products: A continuing source of novel drug leads, *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**(6), 3670-3695 (2013).

20. E. Schwartz, R. Poulin, N. Mojib, J. Kubanek, Chemical ecology of marine plankton, *Nat. Prod. Rep.*, **33**(7), 843-860 (2016).
21. A. van der Meij, S. Worsley, M. Hutchings, G. van Wezel, Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes, *FEMS Microbiol. Rev.*, **41**(3), 392-416 (2017).
22. C. Pye, M. Bertin, R. Lokey, W. Gerwick, Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **114**(22), 5601-5606 (2017).
23. A. Ganesan, M. Coote, K. Barakat, Molecular dynamics-driven drug discovery: Leaping forward with confidence, *Drug Discov. Today*, **22**(2), 249-269 (2017).
24. P. Lang, K. Yeow, A. Nichols, A. Scheer, Cellular imaging in drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**(4), 343-356 (2006).
25. M. Robers, T. Machleidt, K. Wood, High throughput screening compatible methods for quantifying protein interactions in living cells, en: *High throughput screening methods: Evolution and refinement*, J.A. Bittker, N.T. Ross, Eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2017, Vol. 1, pp. 396.
26. M. Sung, A checklist for successful quantitative live cell imaging in systems biology, *Cells*, **2**(2), 284-293 (2013).
27. O. Méndez-Lucio, J. Medina-Franco, The many roles of molecular complexity in drug discovery, *Drug Discov. Today*, **22**(1), 120-126 (2017).
28. T. Cernak, K. Dykstra, S. Tyagarajan, P. Vachal, S. Krska, The medicinal chemist's toolbox for late stage functionalization of drug-like molecules, *Chem. Soc. Rev.*, **45**(3), 546-576 (2016).
29. O. Guvench, Computational functional group mapping for drug discovery, *Drug Discov. Today*, **21**(12), 1928-1931 (2016).
30. M. De Vivo, M. Masetti, G. Bottegoni, A. Cavalli, Role of molecular dynamics and related methods in drug discovery, *J. Med. Chem.*, **59**(9), 4035-4061 (2016).
31. G. Williams, G. Ferenczy, J. Ulander, G. Keseru, Binding thermodynamics discriminates fragments from druglike compounds: A thermodynamic description of fragment-based drug discovery, *Drug Discov. Today*, **22**(4), 681-689 (2016).

32. D. Erlanson, S. Fesik, R. Hubbard, W. Jahnke, H. Jhoti, Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **15**(9), 605-619 (2016).
33. A. Kar, Molecular descriptors for polarity: the need of going beyond polar surface area, *Future Medicinal Chemistry*, **8**(17), 1-4 (2016).
34. J. Christensen, H. Meng-Lund, H. Grohganz, A. Poso, T. Laitinen, O. Korhonen, L. Jørgensen, J. Pajander, Surface area, volume and shape descriptors as a novel tool for polymer lead design and discovery, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **102**, 188-195 (2017).
35. C. Bergström, M. Yazdanian, Lipophilicity in drug development: Too much or not enough?, *AAPS J.*, **18**(5), 1095-1100 (2016).
36. R. Thompson, E. Isin, M. Ogese, J. Mettetal, D. Williams, Reactive metabolites: Current and emerging risk and hazard assessments, *Chem. Res. Toxicol.*, **29**(4), 505-533 (2016).
37. Y. Hong, Y. Mei, F. Chia, R. Yeo, G. Venkatesan, S.K. Koh, C.L. Chai, L. Zhou, P Kojodjojo, E.C. Chan, Inactivation of human cytochrome P450 3A4 and 3A5 by dronedarone and N-desbutyl dronedarone, *Mol. Pharmacol.*, **89**(1), 1-13 (2016).
38. A. Brink, A. Pahler, C. Funk, F. Schuler, S. Schadt, Minimizing the risk of chemically reactive metabolite formation of new drug candidates: Implications for preclinical drug design, *Drug Discov. Today*, **22**(5), 751-756 (2016).
39. N. Borges, P. Kenny, C. Montanari, I. Prokopczyk, J. Ribeiro, J. Rocha, J.R. Rocha, G. Rodrigues, The influence of hydrogen bonding on partition coefficients, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **31**(2), 163-181 (2017).
40. M. Matos, S. Vilar, S. Kachler, S. Vazquez-Rodriguez, C. Varela, G. Delogu, G. Hripcsak, L. Santana, E. Uriarte, K.N. Klotz, F. Borges, Progress in the development of small molecules as new human A₃ adenosine receptor ligands based on the 3-thiophenylcoumarin core, *Med. Chem. Commun.*, **7**(5), 845-852 (2016).
41. J. Wang, L. Gao, Y. Lee, K. Kalesh, Y. Ong, J. Lim, J.E. Jee, H. Sun, S.S. Lee, Z.C. Hua, Q. Lin, Target identification of natural and traditional medicines with quantitative chemical proteomics approaches, *Pharmacol. Ther.*, **162**, 10-22 (2016).

42. M. Schirle, J. Jenkins, Identifying compound efficacy targets in phenotypic drug discovery, *Drug Discov. Today*, **21**(1), 82-89 (2016).
43. J. Wang, C.J. Zhang, J. Zhang, Y. He, Y. Lee, S. Chen, T.K. Lim, S. Ng, H.M. Shen, Q. Lin, Mapping sites of aspirin-induced acetylations in live cells by quantitative acid-cleavable activity-based protein profiling (QA-ABPP), *Sci. Rep.*, **5**, 7896 (2015).
44. A. Roberts, C. Ward, D. Nomura, Activity-based protein profiling for mapping and pharmacologically interrogating proteome-wide ligandable hotspots, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **43**, 25-33 (2017).
45. M. Matthews, L. He, B. Horning, E. Olson, B. Correia, J. Yates, P.E. Dawson, B.F. Cravatt, Chemoproteomic profiling and discovery of protein electrophiles in human cells, *Nat. Chem.*, **9**(3), 234-243 (2016).
46. V. Gupta, K. Carroll, Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime, *Biochim. Biophys. Acta-Gen Subj.*, **1840**(2), 847-875 (2014).
47. Q. Zhao, X. Ouyang, X. Wan, K. Gajiwala, J. Kath, L.H. Jones, A.L. Burlingame, J. Taunton, Broad-spectrum kinase profiling in live cells with lysine-targeted sulfonyl fluoride probes, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**(2), 680-685 (2017).
48. J. Baskin, J. Prescher, S. Laughlin, N. Agard, P. Chang, I. Miller, A. Lo, J.A. Codeilli, C.R. Bertozzi, Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104**(43), 16793-16797 (2007).
49. M. Shang, M. Wang, T. Saint-Denis, M. Li, H. Dai, J. Yu, Copper-mediated late-stage functionalization of heterocycle-containing molecules, *Angew. Chemie-Int.*, **56**(19), 5317-5321 (2017).
50. J. Hartwig, Catalyst-controlled site-selective bond activation, *Acc. Chem. Res.*, **50**(3), 549-555 (2017).
51. Á. Fuentes de Arriba, E. Lenci, M. Sonawane, O. Formery, D. Dixon, Iridium-catalyzed reductive strecker reaction for late-stage amide and lactam cyanation, *Angew. Chemie-Int.*, **56**(13), 3655-3659 (2017).
52. W. Ma, H. Dong, D. Wang, L. Ackermann. Late-stage diversification of non-steroidal anti-inflammatory drugs by transition metal-catalyzed C-H alkenylations, thiolations and selenylations, *Adv. Synth. Catal.*, **359**(6), 966-973 (2017).

53. R. Griffiths, G. Burley, E. Talbot, Transition-metal-free amine oxidation: A chemoselective strategy for the late-stage formation of lactams, *Org. Lett.*, **19**(4), 870-873 (2017).
54. P. Horvath, N. Aulner, M. Bickle, A. Davies, E. Nery, D. Ebner, M.C. Montoya, P. Ostling, V. Pietiainen, L.S. Price, S.L. Shorte, G. Turcatti, C. von Schantz, N.O. Carragher, Screening out irrelevant cell-based models of disease, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **15**(11), 751-769 (2016).
55. S. Totti, S. Vernardis, L. Meira, P. Pérez-Mancera, E. Costello, W. Greenhalf, D. Palmer, J. Neoptolemos, A. Mantalaris, E.G. Velliou, Designing a bio-inspired biomimetic *in vitro* system for the optimization of *ex vivo* studies of pancreatic cancer, *Drug Discov. Today*, **22**(4), 690-701 (2017).
56. S. Yu, E. Chen, L. Sherwood, M. Hull, A. Woods, M. Tremblay, *Ex vivo* cell-based screening platform for modulators of hepatosteatosis *ex vivo* cell-based screening platform for modulators of hepatosteatosis, *ACS Chem. Biol.*, **12**(7), 1937-1946 (2017).
57. E. Karekla, W. Liao, B. Sharp, J. Pugh, H. Reid, J.L. Quesne, D. Moore, C. Pritchard, M. MacFarlane, J.H. Pringle, *Ex vivo* explant cultures of non-small cell lung carcinoma enable evaluation of primary tumor responses to anticancer therapy, *Cancer Res.*, **77**(8), 2029-2039 (2017).
58. T. Schreiter, J. Sowa, M. Schlattjan, J. Treckmann, A. Paul, K. Strucksberg, H.A. Baba, M. Odenthal, R.K. Gieseler, G. Gerken, G.E. Arteel, A. Canbay, Human *ex-vivo* liver model for acetaminophen-induced liver damage, *Scientific Reports*, **6**, 1-10 (2016).
59. K.S. Makarova, Y.I. Wolf, O.S. Alkhnbashi, F. Costa, S.A. Shah, S.J. Saunders, R. Barrangou, S.J. Brouns, E. Charpentier, D.H. Haft, P. Horvath, S. Moineau, F.J.M. Mojica, R.M. Terns, M.P. Terns, M.F. White, A.F. Yakunin, R.A. Garrett, J. van der Oost, R. Backofen, E.V. Koonin, An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems, *Nature Reviews Microbiology*, **13**(11), 722-736 (2015).
60. K.S. Makarova, D.H. Haft, R. Barrangou, S.J. Brouns, E. Charpentier, P. Horvath, S. Moineau, F.J.M. Mojica, Y.I. Wolf, A.F. Yakunin, J. van der Oost, E.V. Koonin, Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems, *Nature Reviews Microbiology*, **9**(6), 467-477 (2011).
61. T. Seeger, M. Porteus, J. Wu, Genome editing in cardiovascular biology, *Circulation Research*, **120**, 778-781 (2017).

62. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, ADN replication, repair and recombination: Double-strand breaks are efficiently repaired and homologous recombination, en: *Molecular biology of the cell*, B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Taylor & Francis Group, Eds. New York, 2015, Vol. 6, pp. 273-286.
63. A. Bassett, Editing the genome of hiPSC with CRISPR / Cas9: disease models, *Mamm. Genome*, **28**(7-8), 1-17 (2017).
64. G. Nierode, P. Kwon, J. Dordick, S. Kwon, Cell-based assay design for high-content screening of drug candidates, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **26**(2), 213-225 (2016).
65. J.C. Gallego-Gómez, Búsqueda de fármacos antivirales por imagenología de células vivas, *Actual Biol.*, **34**(96), 113-132 (2012).
66. G. Pegoraro, T. Misteli, High-throughput imaging for the discovery of cellular mechanisms of disease, *Trends in Genetics*, **33**(9), 604-615 (2017).
67. J.C. Cardona-Gomez, L. Ariza-Jimenez, J.C. Gallego-Gómez, A proposal for a machine learning classifier for viral infection in living cells based on mitochondrial distribution, en: *Genetics and molecular biology*, N. Stevo, Ed., Cell Biology-New Insights - InTech, London, 2016, Vol. 1, pp. 3-25.
68. J. Kang, C. Hsu, Q. Wu, S. Liu, A. Coster, B. Posner, S.J. Altschuler, L.F Wu, Improving drug discovery with high-content phenotypic screens by systematic selection of reporter cell lines, *Nature Biotechnology*, **34**(1), 70-77 (2016).
69. K. Umezawa, M. Yoshida, M. Kamiya, T. Yamasoba, Y. Urano, Rational design of reversible fluorescent probes for live-cell imaging and quantification of fast glutathione dynamics, *Nature Chemistry*, **9**(3), 279-286 (2016).
70. N. Couto, J. Wood, J. Barber, The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network, *Free Radical Biology and Medicine*, **95**, 27-42 (2016).
71. G. Hummer, A. Szabo, Dynamics of the orientational factor in fluorescence resonance energy transfer, *J. Phys. Chem.*, **121**(15), 3331-3339 (2016).
72. Valm A, Cohen S, Legant W, Melunis J, Hershberg U, Wait E, A.E. Cohen, M.W. Davidson, E. Betzig, J. Lippincott-Schwartz, Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome, *Nature Letters*, **546**(7656), 162-167 (2017).

73. H. Shuai, Y. Xu, Q. Yu, E. Gylfe, A. Tengholm, Fluorescent protein vectors for pancreatic islet cell identification in live-cell imaging, *European Journal of Physiology*, **468**(10), 1765-1777 (2016).
74. J. Gelles, J. Chipuk, Robust high-throughput kinetic analysis of apoptosis with real-time high-content live-cell imaging, *Cell Death and Disease*, **7**(12), e2493-9 (2016).
75. J. Cardona, J.C. Gallego-Gómez, Quantitative study of the differences in mitochondrium distribution between DENV infected and mock cells, *AIP Conference Proceedings*, **1747**(90005), 48-53 (2016).
76. G. Gerold, J. Bruening, B. Weigel, T. Pietschmann, Protein interactions during the flavivirus and hepacivirus life cycle, *Molecular and Cellular Proteomics*, **6**, 75-89 (2007).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

C.E. Hernández-Cuellar, E. Castrillón-Martínez, J.C. Gallego-Gómez, Descubrimiento de fármacos basado en imagenología de células vivas, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **49**(1), 114-136 (2020).