

Empleo de ensayos de High Throughput Screening (HTS) aplicado al estudio de canales iónicos y otras dianas terapéuticas.

Javier Arranz Nicolás^{1,2*}, Ana Isabel Sanz Fraile²

1 Departamento de Biología de Sistemas, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **2** GlaxoSmithKline R&D Pharmaceuticals, Screening and Compound Profiling. Centro de Investigación Básica (C.I.B.). Santiago Grisolia 4. 28760 Tres Cantos (Madrid).

Resumen

Una de las primeras fases determinantes en el proceso de descubrimiento de fármacos es el HTS, en el que se enfrenta una colección de 1,7 millones de compuestos a una diana terapéutica específica. El HTS (High Throughput Screening) o Cribado de Alta Capacidad es, por tanto, una de las fases más tempranas en la industria farmacéutica, donde constituye un proceso fundamental. Es, por ello, importante conocer las distintas aplicaciones que tiene este tipo de ensayos y las distintas etapas que forman parte del proceso. Asimismo, es importante destacar la aplicación de este tipo de experimentos a distintos tipos de dianas de interés terapéutico, como canales iónicos, enzimas o receptores de membrana implicados en diferentes vías de señalización celular. En la presente memoria se presenta el trabajo experimental realizado a nivel de distintos pasos dentro del proceso de HTS aplicado a diferentes dianas farmacológicas.

Palabras clave: canales iónicos dependientes de pH; HTS; FLIPR; set up; GPCRs; enzimas.

Cita: Javier Arranz, Ana Isabel Sanz (2014) Empleo de ensayos de High Throughput Screening (HTS) aplicado al estudio de canales iónicos. *Dianas* 3(1): e20140910. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20140910 URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 27 de junio de 2014

Copyright: © 2014 Javier Arranz Nicolás et al.

Este es un artículo open-access distribuido bajo licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

*E-mail: javierarranz02@hotmail.com



Introducción

Canales iónicos dependientes de pH

Los canales iónicos de estudio constituyen una especie de sensor primario de pH pertenecientes a una superfamilia de canales transportadores de cationes (sodio y calcio) voltaje-dependientes que, al activarse, dan lugar a una serie de corrientes que generan una transmisión despolarizante.

Presentan una distribución predominantemente neuronal a nivel de los sistemas nervioso central y periférico, concretamente en el hipocampo, la corteza cerebral, el cerebelo y la amígdala, encontrándose, sobre todo, en la región post-sináptica de dichas neuronas, tal y como se ha comprobado por medio de estudios de hibridación in situ e inmunofluorescencia, los cuales también se han utilizado para comprobar la presencia de estos canales en las terminaciones pre-sinápticas, aunque todavía no se ha encontrado evidencia de ello.

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que no sólo se encuentran en el sistema nervioso, sino también en células no neuronales, como células dendríticas, condrocitos, osteoblastos, osteoclastos, células del cuerpo pulposo, células del cuerpo carotídeo y sinoviocitos, sugiriendo roles más diversos para estos canales iónicos en procesos fisiológicos y patogénicos.

Su unidad funcional está constituida por una estructura altamente conservada resultante de la conjunción de varias subunidades codificadas por distintos genes y variantes de splicing que forman homo y heterotrimeros al juntarse, teniendo cada una de ellas una sensibilidad al pH y una cinética de permeabilidad y selectividad diferentes, dentro de un rango fisiológico. Los estudios de electrofisiología realizados anteriormente han permitido conocer los distintos estadios de actividad de cada uno de los tipos de canales en función de las condiciones de pH en las que estén presentes.

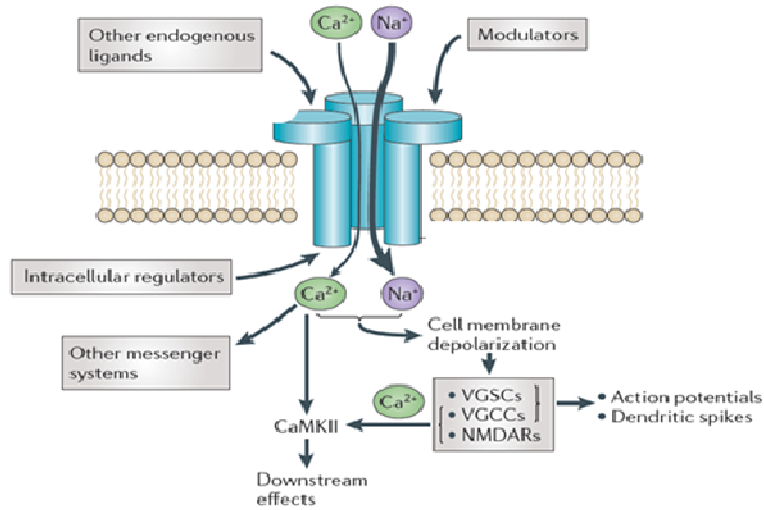


Figura 1.- Representación gráfica del tipo de canal iónico de estudio. Se observa el trímico que se forma como consecuencia de la conjunción de varias subunidades y la susceptibilidad que tiene de ser regulado por distintos tipos de moduladores para dar lugar a una actividad de mayor o menor potencia.

Estos canales están implicados en funciones fisiológicas, como la nocicepción, la plasticidad neuronal, el aprendizaje o la memoria, así como en condiciones patológicas, como el daño isquémico cerebral, los terrores, la epilepsia o incluso la depresión. Por ello, cuando se elimina su expresión se producen pérdidas en la memoria espacial y en el aprendizaje del miedo, sugiriendo una contribución de estos canales a nivel de funciones cerebrales elevadas. Sin embargo, estas funciones fisio-patológicas todavía no se conocen del todo.

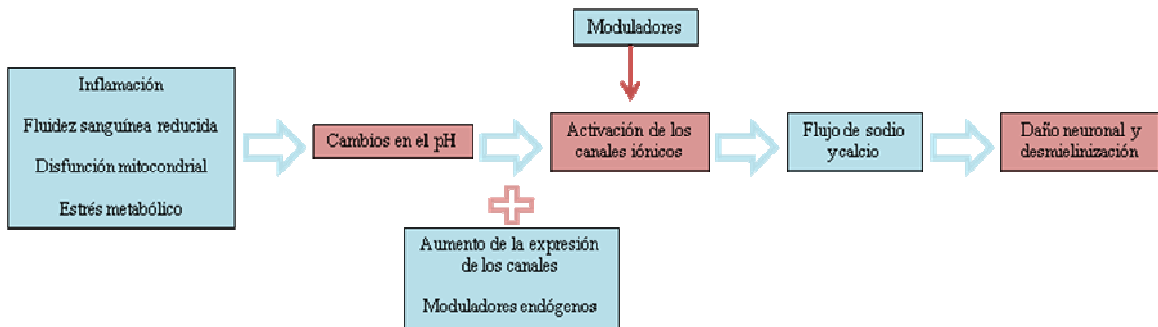


Figura 2.- Mecanismo de activación de los canales iónicos y efectos que produce la generación de corrientes a través de ellos.

Utilizando estos canales como dianas se podrían obtener nuevas y efectivas aproximaciones terapéuticas para un gran número de enfermedades del sistema nervioso central. Se podría pensar en moléculas pequeñas que actuaran como moduladores y que pudieran fácilmente pasar a través de la barrera hematoencefálica, así como en estrategias alternativas basadas en moduladores endógenos de estos canales.

Estudios futuros podrían explorar a través de sus funciones fisiológicas adicionales en el sistema nervioso central y determinar los mecanismos detallados que subyacen a la intervención de los canales en enfermedades neurológicas.

Asimismo, se podría realizar una validación *in silico* para evaluar el sitio de modulación de estos canales con el objetivo de recapitular resultados funcionales. Con el mismo objetivo, se podrían realizar estudios de electrofisiología para validar experimentalmente la actividad del canal por sí solo y/o dentro del entorno de una célula entera.

Así, juntando esta información se podrán generar modelos para crear estructuras que pudieran emplearse para realizar un screening virtual de nuevos inhibidores o de compuestos péptidomiméticos.

Actualmente existen moduladores de la acción de este canal para los que se ha comprobado que los efectos perjudiciales de la activación del canal se ven disminuidos cuando estos compuestos se administran. Sin embargo, las moléculas pequeñas que se han identificado como moduladores de estos canales han mostrado tener una acción débil y poco selectiva en la mayoría de los casos.

Esto hace necesario el entendimiento de las bases moleculares de la interacción de estos compuestos con el canal, a través de lo cual podría facilitarse el desarrollo de una mayor cantidad de moduladores que fueran útiles desde el punto de vista terapéutico.

La búsqueda de moduladores que regulen la activación de los canales se podría llevar a cabo por medio del estudio de compuestos de distinta estructura química mediante ensayos de HTS para la identificación de potenciales hits [1-11].

High Throughput Screening (HTS)

El cribado de alta capacidad o HTS (High Throughput Screening) es una fase temprana que se encuentra en el núcleo del proceso de descubrimiento de fármacos, debido a lo cual es crítico su diseño e implementación mediante la implicación de científicos procedentes de las disciplinas de biología, farmacia, química, ingeniería e informática. Esto requiere el análisis exhaustivo de muchas variables, empezando por la elección de una diana terapéutica para el ensayo y terminando con el descubrimiento de compuestos cabeza de serie (leads).

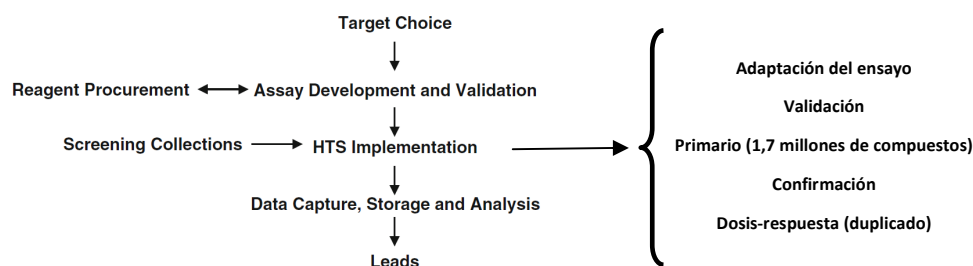


Figura 3.- Seguimiento de las distintas fases de un ensayo de HTS, en el que quedan representadas las distintas etapas críticas en las que se podría ver comprometido, hasta el punto en el que, dependiendo de la decisión tomada en cada una de ellas, se produce un gran impacto que puede hacer que se obtenga un éxito o un fracaso.

En HTS se usan distintos formatos de ensayo: ensayos *in vitro* usando proteínas recombinantes, como ensayos de enzimas o ensayos de competición de ligandos, así como ensayos de segundos mensajeros celulares basados en la fisiología de la célula. También se utilizan métodos basados en afinidad, que han ganado popularidad en los últimos años del descubrimiento de fármacos.

Por esta razón, este tipo de ensayos se ha convertido en un pilar fundamental dentro de la investigación farmacéutica. A través de una combinación de avances en el desarrollo de ensayos, la instrumentación robótica, el crecimiento de librerías de compuestos y las tecnologías de manejo de líquidos, cada organización farmacéutica investigadora se ha vuelto dependiente de los métodos del HTS como un mecanismo primario para descubrir compuestos lead que interactúen con dianas farmacológicas específicas.

Esta fase que constituye el HTS dentro del proceso de descubrimiento de fármacos tiene a su vez una serie de etapas importantes: validación de la diana, desarrollo del ensayo y set-up (adaptación) o puesta a punto del ensayo a gran escala.

Validación de la diana

Una de las premisas principales para poder llevar a cabo un buen ensayo de HTS es conocer a fondo la diana a ensayar, apoyándose en la bibliografía existente y en trabajos de investigación realizados anteriormente.

Es muy importante que se alinee la elección de la diana con el método de ensayo que va a ser utilizado para asegurar que éste sea biológicamente relevante y que esté configurado de una manera robusta, de manera que si los compuestos con el efecto biológico deseado se encuentran dentro de la colección, se descubran durante el ensayo.

Desarrollo del ensayo

Una vez validada la diana se pasa al diseño del ensayo en poyata de laboratorio, donde hay que tener clara la naturaleza de la diana y de la respuesta que se va a medir, para hacer así una buena elección de la tecnología que dé lugar a ensayos robustos y de alta calidad para poder ser capaces de detectar compuestos activos.

A partir de aquí se genera toda la información necesaria para la continuación de los estudios: diana, área terapéutica en la que está involucrada, reactivos, volúmenes, tiempos de incubación, etc.

Set up o puesta a punto del ensayo a gran escala.

En esta fase se lleva a cabo la adaptación y optimización de los ensayos realizados anteriormente a una experimentación a gran escala mediante el uso de plataformas robotizadas, siempre bajo unas buenas condiciones de calidad y asegurando la reproducibilidad de las características biológicas.

El ensayo debe demostrar baja variabilidad y alta señal con respecto al ruido de fondo, de manera que se minimicen los falsos positivos y los falsos negativos. Además, debe ser lo suficientemente de alta capacidad y de bajo coste como para permitir realizar el screening de una gran cantidad de compuestos procedentes de una colección.

Por ello, se deben utilizar distintos parámetros estadísticos que son indicadores de la capacidad de los ensayos definidos para identificar hits con precisión. Gracias a las herramientas informáticas existentes se pueden analizar estadísticamente estos datos y obtener representaciones gráficas donde se aprecian con claridad los resultados de los ensayos y se pueden sacar conclusiones a partir de ellos [12-15].

Fluorescent Imaging Plate Reader (FLIPR, Molecular Devices)

Se trata de una herramienta que ejerce las funciones de un lector de fluorescencia, razón por la cual fue desarrollada para realizar procesos de screening óptico de alto rendimiento. El FLIPR permite la realización de experimentos duales en los que se estudia la presencia de un antagonista y de un agonista dentro del mismo pocillo, generando dos archivos distintos que sirvan para realizar análisis de datos de estudios de agonistas y antagonistas a la vez. En este caso, el FLIPR se utiliza para realizar el screening de dianas basadas en canales iónicos dependientes de pH mediante el uso de trazadores fluorescentes permeables a la membrana que permiten medir cambios en el potencial de membrana.

Se caracteriza por una elevada sensibilidad, lo cual permite el estudio de la señal procedente de una monocapa de células. Esto es importante en los ensayos en los que puede haber ruido de fondo, como aquellos en los que la fluorescencia puede proceder de los marcadores que se encuentren en una posición extracelular.

Este instrumento incluye una pipeta de 384 puntas capaz de aspirar y dispensar líquido de dos placas distintas hacia una tercera placa, que será analizada ópticamente. Este instrumento también proporciona información sobre la temperatura, permitiendo que el ensayo pueda realizarse a temperatura fisiológica si es requerido.

Mediante una fuente de excitación constituida por un láser de argón o una lámpara de xenón, se genera una señal que es recibida por el sistema, que toma una fotografía del fondo de la microplaca, grabando la señal de todos los pocillos de manera simultánea gracias a su sistema de imagen basado en una cámara CCD, que está integrado en él. El sistema entero es controlado vía ordenador por medio de una interfaz basada en Windows, que proporciona herramientas flexibles para el desarrollo del ensayo, el control de la calidad o el manejo de datos.

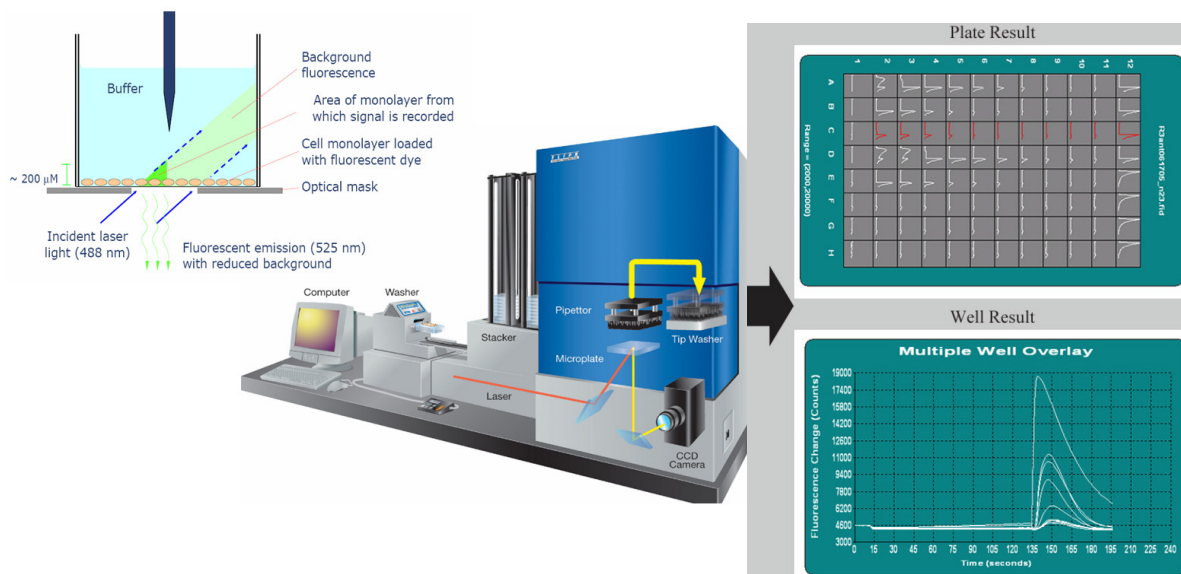


Figura 4.- Mecanismo de funcionamiento del FLIPR y representación gráfica del tipo de resultados que se obtienen con él, tanto a nivel de placa como a nivel de pocillo [16-17].

Trabajo experimental realizado

Aunque el estudio realizado se corresponde mayoritariamente con el proyecto de canales iónicos, debido a la colaboración realizada en el departamento de Screening and Compound Profiling de la compañía, los materiales y métodos empleados no se limitan sólo a dicho proyecto en particular, sino que se aplican a distintas fases de un ensayo de HTS aplicado a distintas dianas terapéuticas.

Estudio de canales iónicos: Set up o puesta a punto del ensayo en condiciones de pH

A petición del personal encargado de la validación de los ensayos realizados en HTS, se realizó una valoración del pH que se presenta a lo largo de todo el ensayo antes de lanzar las placas. La idea en la que se basó este estudio consistía en hacer una medición del pH cada día para ver si todo iba bien en relación al pH a la hora de lanzar los ensayos en FLIPR.

Para ello había que tener en cuenta que el ensayo se hacía a tiempos de cultivo celular de 24, 48 y 72 horas, lo que se traducía en un distinto comportamiento metabólico de las células y en cambios de pH asociados a ello.

Para ello se utilizó una sonda para medir el pH denominada BCECF (PM: 520.45, Life Technologies), que tiene un pH determinado y conocido, lo cual es muy importante porque se puede utilizar para ver si el pH no varía por circunstancias del cultivo celular. Esto es importante, puesto que el pH debe mantenerse entre ciertos valores, siendo válidos todos los valores comprendidos en esta ventana para realizar el ensayo a gran escala y que los resultados derivados de ello sean de buena calidad.

En el ensayo se utilizaron distintos componentes que presentaban diferentes pH, por lo que este set up se caracterizó por la utilización de los mismos componentes en las mismas circunstancias que en el momento del ensayo para poder simular las mismas condiciones y que así la medición de pH realizada fuera la misma que tenía el resto de las placas que se lanzaron en cada ensayo.

- Células en medio de cultivo: se sustituyeron por medio de cultivo solo para obtener una curva de calibrado o patrón.
- Marcaje, con un pH de 8.25.
- Compuestos, con un pH de 8.25.
- Buffer de segunda secuencia, con un pH de 4.75.

El BCECF se diluyó en Pluronic al 10 % (detergente para que se disuelva mejor, Life Technologies) a partir del stock y luego se diluyó en buffer para que tuviera un pH determinado. Para ello se utilizó una mezcla proporcional igual a la que se hacía en el ensayo en la que se mezclaban los dos pH (8.25 y 4.75) para obtener una mezcla de pH intermedio en la que diluir la sonda.

Para hacer un estudio en el que la señal fuera equiparable, se hizo una curva patrón con medio ajustado a distintos pH. Después se midió la fluorescencia y se eligieron dos valores de pH que nos dieran una ventana dentro de la cual se encontrarán los pH que eran deseables.

El instrumento utilizado fue el EnVision (PerkinElmer), medidor de fluorescencia que, mediante la utilización de cuatro filtros de excitación y emisión, realizaba dos lecturas: una sensible al pH y otra no sensible al pH. Con ambas lecturas se generó un ratio que dio los resultados de la placa en términos de cuentas de fluorescencia equiparables a la medición del pH.

Una vez realizada la curva patrón, se hizo el mismo proceso con células para ver cómo se comportaban respecto al pH. Para ello hubo que elegir una concentración y unos pH determinados que servirían como controles (columnas 6 y 18), con respecto al resto de los pocillos de una microplaca de 384 pocillos, de una capacidad de 80 μ L/pocillo. En esas columnas se retiraron las células y se dispensaron con un Multidrop (Thermoscientific) dos soluciones de pH conocido que sirvieran como referencias a la hora de medir el pH del resto de la placa.



Figura 5.- Plataformas empleadas en los ensayos de set up respecto a las condiciones de pH. A la izquierda, el lector de fluorescencia EnVision Multilabel Reader y a la derecha, el dispensador Multidrop Combi Reagent Dispenser.

Asimismo se realizó un ensayo con una placa en la que se dispensaron de manera aleatoria sobre pocillos conocidos tres compuestos estándares concentrados, a partir de los cuales se realizó una dilución 1:3 en DMSO. Estos compuestos, conocidos como tool compounds, se utilizan normalmente para calibrar los distintos aspectos de un ensayo, en este caso, en términos de pH. La idea es utilizarlos para ver lo que ocurre con el pH en circunstancias de presencia de un compuesto activo.

Estudio de canales iónicos: Ensayos realizados en la plataforma dual con FLIPR

Como parte del HTS y siguiendo una rutina diaria, se lanzaron ensayos en dos plataformas duales con FLIPR, para lo cual se tuvo que llevar a cabo la preparación de distintos tipos de buffer y marcadores, además de unas placas control que se lanzaron al principio de cada ensayo, dispensando sobre ellas solamente DMSO.

La preparación de los buffer de pH 4.75 y 8.25 se realizó ajustando el pH con NaOH o HCl a partir de un buffer basal formado por los siguientes componentes en las proporciones detalladas en la tabla 1.

Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	140
KCl	2.5
CaCl ₂ y MgCl ₂	1
Glucosa y HEPES	10
MES	20

Tabla 1.- Composición de los buffer empleados en los ensayos con FLIPR para el estudio de canales iónicos.

El marcador utilizado fue un trazador de fluorescencia específico para calcio, denominado Fluo-4 Direct™ Calcium Assays Kits (Invitrogen), el cual fue preparado siguiendo las instrucciones del fabricante. Este indicador, sensible a calcio, es llevado hasta el citoplasma de las células, para lo cual se necesita un periodo de incubación. Durante este tiempo, la tecnología enmascaradora del propio kit permanece fuera de la célula y bloquea el ruido de fondo. En el interior celular, el trazador se une al calcio citoplasmático y emite fluorescencia. Dependiendo del tipo de efecto que se busque en los compuestos testados, esta emisión tendrá que verse disminuida o aumentada en función de que los compuestos ejerzan una acción antagonista o agonista, respectivamente [18].

Básicamente, el ciclo que realiza de forma repetida la plataforma con FLIPR consiste en los siguientes pasos:

1. Sobre la placa de células se dispensan 10 μ L del marcador Fluo 4 y se dejan incubando 1 hora a 37° C en el incubador.
2. Mientras que las células ya marcadas llegan al dispensador Multimek (Beckman-Coulter), se dispensan sobre los compuestos 25 μ L de un buffer de pH 8.25 en un Multidrop.
3. Las células y los compuestos se encuentran en el Multimek, dispensador que permite tomar líquido de la placa de compuestos y añadirlo a la placa de células.

Este paso se considera como la 1ª secuencia y podría realizarse en otras plataformas como el FLIPR en sí mismo o la Cybi-Well (Cybio).

Antes de añadir los compuestos, los dispensadores homogenizan el compuesto (1 μ L) con el buffer de pH 8.25 (25 μ L), de manera que así se obtiene una solución de la que se añadirán 10 μ L sobre la placa de células.

4. Se dejan incubar las placas a temperatura ambiente durante 30 minutos, mientras que la placa de compuestos es desechada.
5. Ya dentro del FLIPR se realiza lo que se considera como la 2ª secuencia, en la que, por medio de un sistema de reservorio recirculante, se añade un buffer de pH 4.75 en todos los pocillos excepto los correspondientes a la columna 18, a los que se añade un buffer de 8.25, utilizado como control.
6. Finalmente, el FLIPR realiza la lectura. Los datos generados en este paso se adquieren con otro software distinto en el que se analizan (Activity Base). Este programa da una serie de parámetros en base a los cuales se hace una revisión para ver cómo va el proceso en tiempo real y saber si

hay que rechazar alguna placa en función de factores como el número de activos o la robustez estudiada a partir de la Z' .



Figura 6.- Componentes integrantes de la plataforma dual con FLIPR. De izquierda a derecha, los dispensadores Multimek y Cy-bi y el ORCA Robotic System (Beckman-Coulter)

Estudio de GPCRs: Análisis de dosis-respuesta

Se trata de la última fase que se realiza normalmente dentro de una campaña de HTS. En este experimento se toman todos aquellos compuestos activos que se consideran mejores de la fase anterior. Para ello se utilizaron microplacas de 1536 pocillos con los 128 compuestos que iban a ser testados a distintas dosis por medio de su dilución 1:3 en DMSO.

Lo primero que se hizo fue dispensar las células (4 μ L) en todos los pocillos con los compuestos con el Multidrop. Estas células proceden del departamento de cultivos celulares, donde están en cultivo en Flasks durante una semana para ser recuperadas justo después de haberlas descongelado. Después se dejaron incubando durante media hora a 37° C y en unas condiciones de CO₂ de un 5 %.

En este tiempo se fue preparando el buffer (control negativo) y el agonista endógeno, el cual se dispensó en todos los pocillos, excepto en dos columnas correspondientes al control negativo. Tras esta dispensación se dejaron incubar las placas en el incubador, en las mismas condiciones anteriores, durante 2 horas.

Mientras tanto se fue preparando el revelador que iba a ser utilizado posteriormente. Este revelador se prepara a partir de tres reactivos diferentes que tienen que descongelarse previamente y que se añaden al volumen en una cantidad que hay que calcular en base a una proporción fija.

Terminado el tiempo de incubación, se dispensa el revelador en todas las placas y se deja 2-2.5 horas a temperatura ambiente, para finalmente leer en una plataforma ViewLux (PerkinElmer), medidor de luminiscencia.

Estudio de enzimas: Set up (ensayos de robustez y validación)

Este set up se realizó sobre un ensayo basado en un estudio de fluorescencia fundamentado en la presencia o ausencia de una señal en función de la polarización o despolarización de la luz como resultado de la unión o separación de dos moléculas, respectivamente.

A partir de esto se realizaron dos test distintos: uno de robustez y otro de validación. En estos estudios se utilizaron un número de compuestos reducidos (1.200 en robustez y 10.000 en validación) que son representativos de la colección, tanto por sus efectos como por su estructura química.

Para ello se tuvo que preparar un buffer que es la base del ensayo, compuesto por cloruro sódico, plurónico y DMSO, además de DTT, que se añade el mismo día del ensayo. Sobre este buffer se añaden las dos moléculas que son susceptibles de unirse (enzima y sustrato), excepto en aquel buffer utilizado para los controles, en el que sólo se dispensó una de las moléculas (sustrato).

El test de robustez se hizo por medio un ensayo de tipo High and Low, en el que se dispensó media placa con buffer y las dos moléculas (High) y otra media placa sin una de ellas (Low). En el caso de la validación se añadieron las dos moléculas en todos los pocillos excepto en las dos columnas que se utilizaron como control.

Después de haber dispensado estos dos ensayos, se llevaron a leer en el EnVision para calcular a partir de los resultados distintos parámetros que definieran la robustez y la variabilidad del ensayo (B/S y Z')

Estudio de enzimas: Ensayos de estabilidad de señal y de reactivos

Para estos estudios se utilizaron dos placas en las que se dispensaron todos los reactivos a una hora fijada y se leyeron en el EnVision a distintos intervalos para ver cómo de estable era la señal y establecer el tiempo durante el cual se podían realizar lecturas válidas.

Por otro lado se utilizaron otras placas agrupadas por pares en las que se dispensaron los reactivos a distintos tiempos y se leyeron directamente para ver si se obtenía una señal válida y así estudiar la estabilidad de los reactivos y el tiempo durante el cual estos podían ser utilizados.

Estos estudios se realizaron sobre microplacas de 1536 pocillos con DMSO, sin compuestos, sobre los que se añadió el buffer basal y las dos moléculas susceptibles de unirse.

Resultados y discusión

Por cuestiones de duración y plazos relacionados con la campaña de HTS realizada no se obtuvieron resultados que pudieran ser mostrados a fecha de la realización de la presente memoria.

Agradecimientos

El autor desea agradecer toda la ayuda prestada por el personal de GSK, especialmente a la tutora Ana Isabel Sanz, a M^a Ángeles Vivas, a M^a Eugenia Cruz, a Carmen Magán y a Sergio Senar, además de a todos los integrantes del grupo encargado de realizar los ensayos de HTS.

Referencias

- 1-11. Referencias confidenciales de la compañía.
12. Macarrón, R. and R.P. Hertzberg. 2011. Design and Implementation of High Throughput Screening Assays. *Mol Biotechnol*, 47:270-285.
13. Copeland, R.A. 2003. Mechanistic considerations in high-throughput screening. *Analytical Biochemistry*, 320:1-12.
14. Zhengrong, Z. and J. Cuzzo. 2009. High-Throughput Affinity-Based Technologies for Small-Molecule Drug Discovery. *Journal of Biomolecular Screening*, 14:1157-1164.
15. González, I. and A.I. Sanz. 2013. Parámetros estadísticos que respaldan la calidad de un ensayo HTS a lo largo de sus etapas: GPCR orexigénico como diana. *Dianas*, 2(2): e20130908.
16. Schroeder, K.S. and B.D. Neagle. 1996. FLIPR: A New Instrument for Accurate, High Throughput Optical Screening. *J Biomol Screen*, 1(2):75-80.
17. Arkin, M.R., P.R. Connor et al. FLIPR Assays for GPCR and Ion Channel Targets. *Assay Guidance Manual*. 1:1-36
18. Bejarano, A. 2013. Cell-Based High-Throughput Screening Assay for Identification of G-Protein-Coupled Receptors Agonists and Antagonists. *Dianas* 2(1):e20130302.