

6. La citómica como estrategia alternativa en farmacología y toxicología *in vitro*

JOSÉ ENRIQUE O'CONNOR, ALBERTO ÁLVAREZ-BARRIENTOS,
ROBERT C. CALLAGHAN GUADALUPE HERRERA y
ALICIA MARTÍNEZ-ROMERO

Always look on the bright side of life...

Monty Python

1. CITÓMICA EN INVESTIGACIÓN FÁRMACO-TOXICOLÓGICA

El análisis citómico se integra en las estrategias esenciales en el análisis de la interacción xenobiótico-célula en investigación básica, el desarrollo industrial y la evaluación de efectos terapéuticos y tóxicos de productos químicos y biológicos. Desde el punto de vista de las estrategias citómicas aplicables a la investigación farmaco-toxicológica, éstas reflejan en algunos aspectos las estrategias seguidas en la mayoría de las aplicaciones de la citómica, mientras que en otros, proporcionan información que es exclusivamente relevante a la detección y caracterización mecanística de los efectos de xenobióticos sobre células vivas. Así, de forma general, se pueden sistematizar los objetivos de la aplicación de la citómica en Farmacología y Toxicología como sigue:

a) Identificación y selección de subpoblaciones celulares específicas: Mediante la detección y cuantificación de marcadores de superficie, actividades funcionales intracelulares, características morfológicas o, más frecuentemente, una combinación de los anteriores parámetros, es posible identificar una subpoblación celular de interés en un contexto heterogéneo (1). Mediante las técnicas citómicas de análisis multiparamétrico se pueden acotar las células de dicha población para restringir el análisis a las mismas o, mediante las técnicas

de separación celular, obtener preparaciones de células individuales purificadas de interés (2).

b) Identificación de células diana específicas o susceptibles a fármacos o xenobióticos: En una extensión del concepto anterior, la capacidad multiparamétrica de las metodologías citómicas permite identificar la expresión de receptores específicos para un fármaco o la presencia de dianas estructurales y/o funcionales para un fármaco o xenobiótico en una población celular (3). En otras ocasiones, los parámetros de interés se refieren a la capacidad de transporte, retención intracelular y metabolización de un fármaco o xenobiótico, a partir de los cuales se puede inferir a priori la susceptibilidad o sensibilidad de un determinado tipo celular (4). Por último, el análisis citómico permite revelar, en la población celular general de partida, o en las subpoblaciones definidas por criterios citómicos, los efectos (o la falta de ellos) producidos por la exposición al agente farmacológico o xenobiótico, aportando la prueba más directa de una susceptibilidad o resistencia celular al mismo (5).

c) Análisis multiplexado de analitos solubles: Aunque, por definición, las técnicas analíticas de la citómica se aplican a la célula individual funcional, en ocasiones la información de relevancia farmaco-toxicológica radica en compartimentos de moléculas libres, cuya producción por parte de las células es inducida, modulada o suprimida por la exposición a un agente xenobiótico. Clásicamente, tal tipo de información se aborda por las técnicas bioquímicas de la metabolómica o las técnicas moleculares de la proteómica. Sin embargo, recientes desarrollos metodológicos de la citometría de flujo han conducido al diseño de ensayos multiplexados, mediante los cuales se produce la captura y revelado específicos de un analito (generalmente una proteína o una secuencia de ácido nucleico) sobre una microesfera fluorescente de propiedades definidas. La naturaleza de estos ensayos permite la cuantificación simultánea de numerosos analitos en reducidos volúmenes de muestra biológica, lo que los convierte en alternativas ventajosas a técnicas bioquímicas, moleculares e inmunológicas convencionales (6-8).

d) Detección y cuantificación de toxicidad: Las técnicas citómicas, de flujo o imagen, se encuentran ciertamente entre las más utilizadas para el estudio cualitativo y cuantitativo de la citotoxicidad. Las ventajas de la aproximación citómica derivan, en primer lugar de su capacidad multiparamétrica que proporciona múltiples puntos finales para evaluar la lesión y muerte celular en poblaciones seleccionadas, pudiendo ser tales parámetros marcadores precoces o tardíos del fenómeno citotóxico en estudio, lo que confiere a la estrategia citó-

mica una capacidad operativa de resolución temporal de la que carecen otras metodologías (9, 10). Por otra parte, el elevado rendimiento de muchas de las técnicas citómicas permite el análisis secuencial de un gran número de células en escaso tiempo y, por lo tanto, la posibilidad de detectar fenómenos tóxicos minoritarios o incipientes, que pasarían desapercibidos a otras metodologías que analizan simultáneamente un gran número de células y proporcionan valores promedios como resultado (11). Esta sensibilidad y rapidez del análisis citómico incrementa su valor práctico incluso cuando se aplica a la determinación de marcadores sencillos de citotoxicidad, como puede ser la determinación de la viabilidad por exclusión de colorantes fluorescentes, como el yoduro de propidio. Se puede, por tanto, concluir que las técnicas citómicas ofrecen un extraordinario abanico de posibilidades, desde el análisis más sencillo de cuantificación de muerte celular, a los más específicos estudios multiparamétricos en tiempo real (12).

e) Caracterización de mecanismos de acción de fármacos/xenobióticos:

Como corolario a su potencia analítica multiparamétrica, su capacidad de resolución temporal (citometría de flujo) y topológica (citometría de imagen) y su fácil interacción con otras tecnologías «-ómicas», las estrategias citómicas encuentran una de sus aplicaciones hoy en día más requeridas, en la exploración de los mecanismos de acción de fármacos y tóxicos, en modelos celulares humanos, animales y microbianos, en contextos biomédicos, biotecnológicos y ambientales. La amplia disponibilidad de marcadores fluorescentes para estructuras y funciones intracelulares y extracelulares, la posibilidad de examinar varios de estos marcadores simultáneamente en la misma célula y la capacidad de restringir el análisis a células individuales definidas por sus características biológicas han convertido a la citómica en la aproximación más poderosa al campo de la Farmacología y Toxicología celular.

f) Análisis (screening) de alto rendimiento y de alto contenido:

El desarrollo de los actuales sistemas de detección ultrasensible de fluorescencia, tanto en flujo como estáticos, así como la velocidad de adquisición de datos gracias a la potencia de los sistemas informáticos asociados a los instrumentos citómicos modernos ha permitido su aplicación a procedimientos robotizados de análisis de alto rendimiento basados en la detección de fluorescencia y la captación de muestras depositadas en placas de múltiples pocillos (13). La naturaleza intrínsecamente multiparamétrica de las técnicas citómicas, le confiere una capacidad única de integración de datos o análisis de alto contenido,

de la que carecen el resto de técnicas inmunológicas y bioquímicas que se aplican al análisis de gran número de moléculas en los contextos del descubrimiento de fármacos o de investigación farmacológica preclínica.

En el área de la citometría de flujo, algunos de los sistemas de citometría de flujo comerciales están ya dotados de capacidades técnicas que los aproximan a la filosofía de la automatización. Sin llegar todavía a la posibilidad de robotizar el análisis de muestras y la adquisición de datos, sí permiten su funcionamiento con mínimos requisitos de atención por parte del operador y garantizan la calibración, normalización y control de calidad de las determinaciones, generando datos fiables, reproducibles y transferibles a otros laboratorios o instrumentos.

Entre los avances destacables en la automatización de los análisis rutinarios, se encuentran los sistemas automáticos de preparación de muestras sanguíneas, los citómetros de flujo de óptica pre-alineada, los cargadores automatizados en forma de carrusel o de lector de placas de multipocillos y los programas capaces de generar automáticamente informes y transferir datos a hojas de cálculo o bases de datos compatibles con paquetes informáticos convencionales.

Los avances en automatización se han acompañado por la implementación de algoritmos de calibración y autoajuste, que utilizan procedimientos iterativos para optimizar el funcionamiento automático de los citómetros y normalizar la expresión de los resultados, mediante el uso de microesferas fluorescentes altamente homogéneas y de propiedades ópticas definidas. Dichos algoritmos están asociados a programas internos de control de calidad que aseguran la reproducibilidad de los resultados y permiten el diagnóstico de errores o desviaciones del correcto funcionamiento.

Por último, hay que destacar la utilidad de algoritmos que se aplican al análisis en tiempo real de muestras celulares con fines diagnósticos (típicamente en determinaciones clínicas basadas en la inmunofluorescencia multicolor de leucocitos de sangre periférica), previo análisis de material celular especial de control (suspensiones de sangre estabilizada, suspensiones de linfocitos reconstituidos a partir de liofilizados, etc.).

Si bien los anteriores sistemas de automatización se aplican fundamentalmente al diagnóstico inmunohematológico, principal área de interés actual de la citometría de flujo, pueden perfectamente implementarse para su aplicación al estudio de medio rendimiento y alto contenido en el contexto farmaco-toxicológico. En el descubrimiento de fármacos, una de las actividades primordiales

es la del cribado de bibliotecas de compuestos que pueden alterar o imitar las interacciones ligando-receptor. Por su naturaleza, la citometría de flujo está capacitada para determinar de forma sensible tales interacciones. Si las muestras pueden ser manipuladas rápidamente y los receptores expuestos en un formato adecuado, la citometría de flujo llegaría a ser competitiva para el análisis de alto rendimiento. En la actualidad, los desarrollos pioneros del grupo de Sklar (14) están conduciendo a aproximaciones innovadoras en el aspecto de la velocidad de manipulación de muestras y del diseño de bioensayos aptos para el análisis de alto rendimiento de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). En este contexto, el grupo de Sklar ha aprovechado el concepto de análisis multiplexado basado en el uso de matrices de microesferas fluorescentes, para lograr unir de forma estable y funcional a microesferas, bien una serie de GPCRs solubilizados o bien una serie de ligandos de dichos GPCRs. Así han conseguido llegar hasta una sensibilidad de attomoles en la detección de agonistas y antagonistas de GPCRs, demostrando claramente que, en condiciones técnicas adecuadas, los nuevos sistemas citométricos de flujo tienen un papel importante en el proceso del descubrimiento de fármacos (14).

2. ESTUDIO DE LAS ETAPAS DE LA INTERACCION FARMACO/CELULA

Por su naturaleza multiparamétrica y escasamente invasiva, las herramientas metodológicas de la citómica pueden ser aplicadas en todas las etapas de la interacción entre un fármaco/xenobiótico y sus células diana, específicas o inespecíficas, como se muestra en la Figura 1.

2.1. Análisis de la expresión de receptores

Gracias a la disponibilidad de anticuerpos fluorescentes específicos contra epitopos externos de receptores de la superficie celular se puede demostrar su presencia en poblaciones celulares determinadas, tanto de tipo salvaje (expresión natural del receptor, ref. 15) como transfectantes (expresión ectópica de un receptor, 16). Igualmente, en poblaciones celulares en las que se ha inactivado o silenciado el gen de un determinado receptor, la mencionada estrategia serviría para demostrar su ausencia (17).

Esta aplicación inmunofenotípica inicial puede permitir aspectos tan sencillos como identificar y cuantificar subpoblaciones celulares específicas (18) o, en apro-

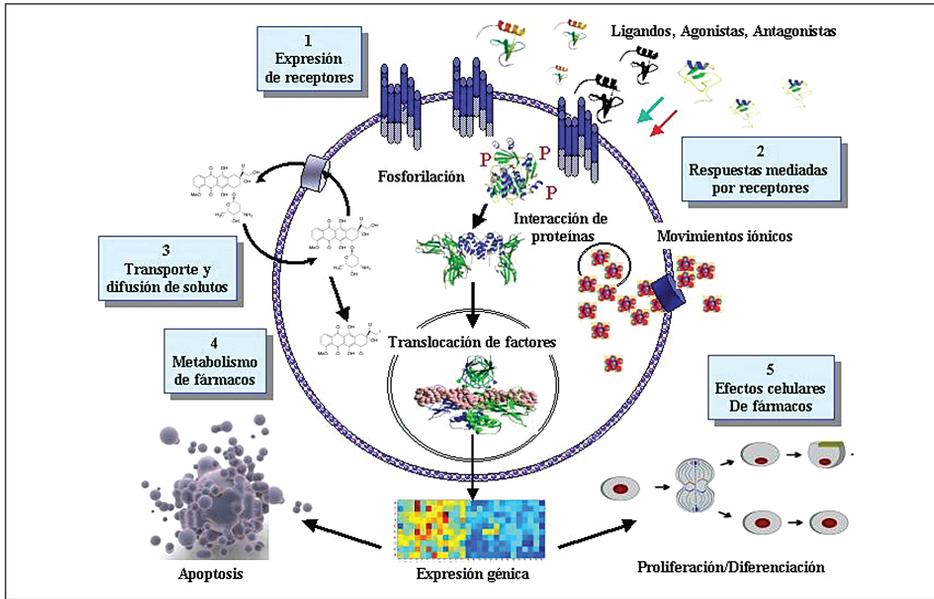


FIGURA 1. Resumen de los principales fenómenos susceptibles de ser analizados por técnicas citómicas en la investigación de la interacción entre fármacos y células. En el texto del capítulo se describe con más extensión cada uno de los procesos y los aspectos metodológicos.

ximaciones más complejas, cuantificar la densidad de expresión de un determinado receptor (19) y seguir sus variaciones de expresión u ocupación, relacionadas con su modulación fisiológica, farmacológica o patológica (20); usar un receptor adecuado como indicador de la cinética de reciclaje de membrana en ciertas condiciones (21) o estudiar los fenómenos de agrupamiento de receptores en balsas de membrana o la interacción funcional entre distintos receptores (22).

Es posible, además, combinar la expresión de un receptor con el análisis de otros parámetros citómicos, funcionales o estructurales, que puedan estar relacionados con la biología del receptor de interés (1). Con esta estrategia multiparamétrica, se extienden las posibilidades al estudio de otros fenómenos, como respuestas tempranas de activación (movimientos iónicos), cambios a medio plazo (actividades enzimáticas) o a largo plazo (expresión génica, diferenciación, proliferación o muerte celular). Un aspecto de interés, que está siendo abordado ampliamente en los últimos años por técnicas citómicas de alto rendimiento de análisis de imagen o por novedosas técnicas mixtas flujo/imagen es el seguimiento de la translocación de receptores como parámetro indicador de sus respuestas de activación (23). Este tipo de estrategias multiparamétricas serán abordadas más adelante en este mismo capítulo.

Por otra parte, se puede abordar el estudio citómico de receptores mediante el uso de ligandos fluorescentes naturales o análogos de los mismos que permiten, además de la identificación de la presencia de un receptor en un tipo celular determinado, realizar estudios farmacocinéticos sobre la interacción ligando-receptor (24).

Las aplicaciones prácticas de los estudios citométricos aquí resumidos se dirigen, sobre todo a la identificación de dianas potenciales para la acción de fármacos que actúan a través de receptores de superficie o para la selección de poblaciones modelo adecuadas para estudios de interacción fármaco-receptor o de seguimiento de los fenómenos de unión e internalización de complejos ligando-receptor.

Además de al estudio de receptores de superficie, las técnicas citómicas, sobre todo las de análisis de imagen como la microscopía confocal, se aplican con éxito a la caracterización de receptores intracelulares. La relevancia práctica, sobre todo, se plasma en el estudio de receptores nucleares y mitocondriales de esteroides y de receptores PAR en los peroxisomas (25-26).

Hay un interés creciente en el desarrollo de hormonas esteroides fluorescentes (estrógenos, progestágenos, corticosteroides) que pueden aplicarse a técnicas de citometría de flujo, microscopía de fluorescencia u otras técnicas dinámicas basadas en la fluorescencia para determinar el contenido en receptores hormonales en células individuales (27). El objetivo de tal desarrollo es el de permitir la caracterización de células de tumores, por ejemplo de mama, con respecto a su capacidad de respuesta a la terapia hormonal, para poder predecir de forma más definitiva el resultado del tratamiento establecido. El principal problema que se debe afrontar es la baja concentración de tales receptores en células individuales. Por ello, se están desarrollando ligandos que presentan una elevada afinidad por el receptor y una afinidad baja por sitios de unión inespecífica, junto con un rendimiento óptimo de fluorescencia. Por otra parte, una nueva aproximación se basa en la unión estable de receptores nucleares solubilizados a microesferas fluorescentes, para desarrollar ensayos multiplexados de unión de ligandos a los mismos, que permiten su aplicación ventajosa en citometría de flujo (28).

2.2. Detección de respuestas mediadas por receptores

Las técnicas multiparamétricas de la citómica, tanto de flujo como de imagen, se aplican con gran éxito al análisis de las diferentes etapas ordenadas que conducen a respuestas funcionales. Además de permitir caracterizar la expresión

de receptores específicos, como se ha resaltado en el apartado anterior, con respecto a la secuencia temporal de los eventos dependientes de la estimulación de los mismos, las técnicas citómicas proporcionan información relevante a:

a) *Unión de ligandos, agonistas y antagonistas:*

Mediante el uso de ligandos fisiológicos o farmacológicos de naturaleza fluorescente y la aplicación de análisis cinético es posible caracterizar la interacción ligando-receptor y, como se ha indicado anteriormente, llevarlo a cabo en un contexto de alto rendimiento.

b) *Fosforilación de proteínas:*

En los últimos años se han desarrollado notablemente las técnicas citómicas de inmunofluorescencia que permiten detectar con sensibilidad el estado de fosforilación de dominios específicos relacionados con receptores, kinasas, adaptadores u otras proteínas implicadas en la transducción de señales (29, 30).

c) *Interacción de proteínas:*

Mediante el uso de técnicas de imagen capaces de co-localizar proteínas fluorescentes o conjugadas a fluorocromos adecuados, así como a través del análisis por citometría de flujo de la transferencia de energía resonante de fluorescencia (FRET), es posible determinar la existencia de interacciones físicas entre distintas proteínas implicadas en la transducción de señales o en la regulación de la expresión génica (22, 31).

d) *Movimientos iónicos intracelulares:*

El uso de fluorocromos quelantes de iones, sobre todo de Ca^{2+} , se aplica a la detección de fenómenos de liberación de este mensajero secundario desde depósitos intracelulares o su entrada a la célula a través de canales iónicos de la membrana plasmática (32). Los ensayos cinéticos por citometría de flujo proporcionan información sobre movimientos rápidos y/o transitorios de este ión y son la base de ensayos citómicos de alto rendimiento para el descubrimiento de agonistas y antagonistas de GPCRs (33).

e) *Translocación de receptores o de factores de transcripción:*

Las técnicas citómicas de imagen permiten seguir con precisión los fenómenos de transporte de un receptor de superficie hacia el interior de la célula o de un receptor citosólico o un factor de transcripción desde el citosol hasta el núcleo, donde va a ejercer su función reguladora de la expresión génica asociada al objetivo biológico de la vía de señalización inducida por el ligando considerado. Los procesos de translocación pueden seguirse en tiempo real con el uso de proteínas dotadas de fluorescencia o, en células fijadas, mediante técnicas de inmunofluorescencia multicolor (23, 34). En algunos casos, el seguimiento de la translocación de proteínas es la base técnica de ensayos citómicos de imagen para el análisis de alto rendimiento de la funcionalidad de receptores (35).

Desde el punto de vista de la aplicación práctica, hay que destacar que una gran parte de los ensayos funcionales mencionados en este punto, están implicados en el análisis de alto rendimiento de GPCRs, ya que estos receptores son las dianas moleculares del 50% de los fármacos recetados en la actualidad. Se conocen al menos 600 GPCRs humanos que reconocen un amplio espectro de estímulos incluyendo luz, olores, sabores, hormonas, etc.

Nuestro laboratorio está interesado en el diseño de ensayos cinéticos por citometría de flujo para la caracterización de GPCRs en plaquetas y leucocitos, en muestras de sangre entera mínimamente manipuladas, con el fin de poder evaluar las respuestas de estos receptores en pacientes individuales y generar datos predictivos en cuanto a patologías relacionadas con GPCRs y su tratamiento (36).

f) *Regulación de la expresión génica y diferenciación celular:*

Para evaluar las consecuencias a corto y medio plazo de la activación de receptores, las técnicas citómicas multiparamétricas, tanto de flujo como de imagen, son probablemente las que ofrecen un mayor nivel de información primaria acerca de los procesos celulares de diferenciación fenotípica inducida por regulación génica, puesto que el número de parámetros biométricos disponibles (estructurales o funcionales) y sus combinaciones son amplísimos (1, 11). Un aspecto importante a destacar es la capacidad de seguir con sencillez los procesos de regulación génica en células vivas a través de la expresión de proteínas fluorescentes, cada vez de mayor utilización en las metodologías de flujo o imagen (37, 38).

g) *Regulación de la proliferación celular y la apoptosis:*

En muchos casos, la consecuencia a medio y largo plazo de la activación de un receptor es la inducción de la proliferación de las células diana. Las técnicas citómicas, sobre todo la citometría de flujo, se aplican con mucha frecuencia a la evaluación de la proliferación de poblaciones celulares, mediante técnicas simples que permiten, sin embargo, determinar la distribución del ciclo celular o mediante aproximaciones multiparamétricas que proporcionan, además, información acerca de los procesos reguladores del mismo (39).

Por otra parte, la detección y estudio de la apoptosis, como contrapartida de la proliferación o, incluso, como punto final de la activación celular dependiente de un receptor, es una de las aplicaciones más importantes y frecuentes de las técnicas citómicas en la actualidad, como se ha mencionado en apartados anteriores de este capítulo (9, 40, 41).

2.3. Análisis del transporte y difusión de solutos a través de membrana

En el contexto de la investigación farmaco-toxicológica es de gran interés la caracterización de fármacos o xenobióticos de bajo peso molecular o de proteínas bioactivas que no actúan a través de receptores específicos y son transportadas o internalizadas a través de la membrana plasmática. Una de las áreas citómicas de creciente expansión, por sus implicaciones biotecnológicas y de monitorización de tratamientos quimioterápicos, es la que aborda el estudio de los fenómenos de extrusión o difusión pasiva de solutos, fundamentalmente a través de la caracterización funcional de las diferentes bombas de expulsión de fármacos y de la determinación de los fenómenos de resistencia a múltiples fármacos por parte de células cancerosas o microorganismos patógenos (detección del fenotipo MDR) en la terapia antitumoral o antiinfecciosa (42, 43).

Entre estos fenómenos el que más extensivamente se ha estudiado es el fenotipo MDR-1, caracterizado por la expresión de la glicoproteína P (P-Gp), un miembro de la superfamilia de los transportadores ABC (ATP-Binding Cassette). El fenotipo MDR-1 produce una menor susceptibilidad a distintos fármacos, al provocar su extrusión y la disminución de la concentración intracelular efectiva de los mismos (44).

El análisis citométrico de la función de la P-Gp implica el seguimiento cinético de los niveles intracelulares de fármacos fluorescentes (por ejemplo, antraquinonas) o de diversos fluorocromos (rhodamina 123, Hoechst 3342, etc.) y la

detección de células resistentes, cuyos niveles de fluorescencia disminuyen rápidamente, o sensibles, que retienen el marcador fluorescente de forma prolongada. En nuestro laboratorio hemos aplicado la citometría de flujo a la caracterización de los modelos experimentales de análisis del fenotipo MDR-1 (45), así como a la obtención por separación celular (“cell sorting”) de clones de células de hepatoma sobre la base de la expresión y la actividad de la P-Gp (2).

2.4. Análisis del metabolismo intracelular de xenobióticos

Las técnicas de la citómica, fundamentalmente la citometría de flujo y la microscopía confocal se utilizan en diferentes aplicaciones relacionadas con el estudio de la expresión y función del citocromo P450 y sus diferentes isoformas. Las primeras aplicaciones en este sentido se encuentran integradas en la cuantificación de la actividad general del P450 o de sus distintas isoformas en células individuales mediante el uso de sustratos fluorogénicos (46). En este sentido, es pionero el trabajo de Miller (47), que aplicó los primeros derivados etilados de la fluoresceína para caracterizar la actividad del P450 en homogenados de hígado de ratón y en células de hepatoma murino. Otros sustratos fluorogénicos se han incorporado a los estudios citómicos, siendo importante el destacar que, por las características de la fuente de iluminación más común en las mencionadas técnicas (el láser de ión argón, sintonizado a 488 nm), los sustratos de preferencia son los que presentan absorción en la banda del azul (48). Los derivados de la fluoresceína presentan emisión verde (45), mientras que los derivados de la resorufina presentan emisión en longitudes de onda cercanas al rojo (49). Los sustratos fluorogénicos derivados de la cumarina son excitables por la luz ultravioleta (48), lo que limita su aplicación por ser menos frecuentes los sistemas citométricos dotados de dicha fuente de iluminación, aunque esta estrategia ha permitido, por ejemplo, detectar subpoblaciones de hepatocitos con diferente actividad de P450 (49).

La capacidad multiparamétrica de la CMF y de la microscopía confocal puede permitir, incluso, el análisis simultáneo de la actividad de isoformas del P450 utilizando mezclas de sustratos fluorogénicos que sean excitables por la misma longitud de onda y generen emisiones de fluorescencia diferenciadas. Un ejemplo de esta aproximación, desarrollada en nuestro laboratorio, se muestra en la Figura 2. En ella se ilustra cómo la incubación de células en monocapa con una mezcla de sustratos (“Cyp Mix”) de excitación en el azul y emisión en el verde (dibencilfluoresceína, sustrato de CYP 2A8, CYP 2A9 y CYP 3A4) y en el rojo (benzoxiresorufina, sustrato de CYP 3A4 y CYP 2B6), seguida de la dis-

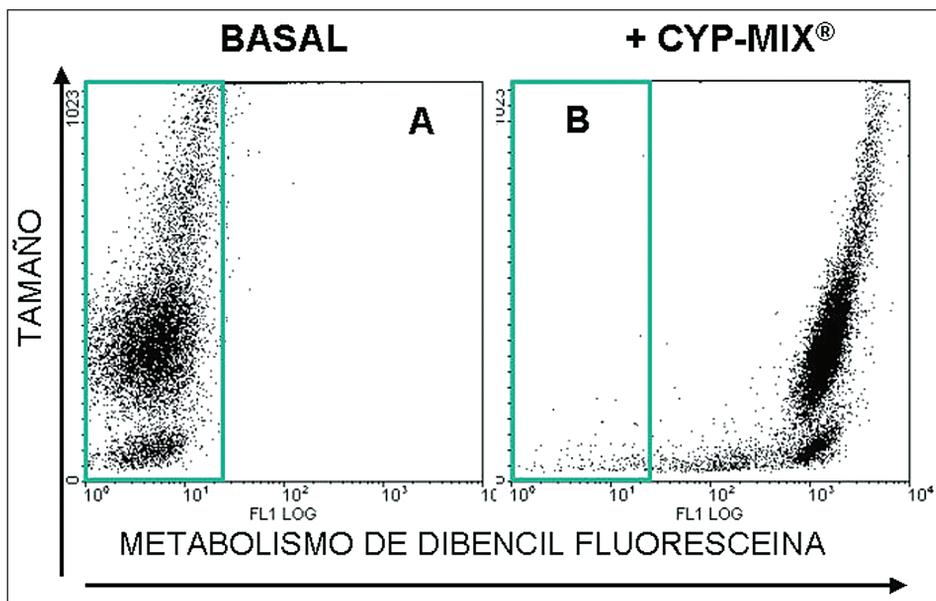


FIGURA 2. Ejemplo de la utilización de sustratos fluorogénicos para evaluar la actividad de biotransformación de fármacos dependiente del citocromo CYP450. (A) Autofluorescencia verde de la suspensión celular en condiciones basales. (B) Fluorescencia verde (transformación de dibencilfluoresceína en fluoresceína) en una suspensión celular incubada durante 30 minutos con una mezcla de sustratos fluorogénicos del citocromo CYP 450 (Cyp-Mix).

persión de las células y su análisis por CMF en suspensión, permite evaluar de forma rápida la presencia de actividades P450 en cultivos celulares de interés.

Una estrategia citométrica relacionada es la que permite cuantificar la cantidad de P450 expresada por una población celular de interés y su presencia en la membrana plasmática, mediante el uso de anticuerpos conjugados con fluorocromos, específicos de una isoforma del P450 (46).

Otra aproximación de relevancia en la aplicación de la citómica al estudio funcional de P450 en células intactas consiste en analizar los efectos de moléculas relacionadas con el papel metabólico del citocromo en situaciones experimentales controladas. Entre las estrategias desarrolladas en este contexto, es frecuente el tratamiento de líneas celulares que expresan de forma natural o artificial isoformas de P450, con sustratos específicos generadores de metabolitos tóxicos. La CMF se suele aplicar para detectar indicadores de anomalía metabólica, lesión celular o muerte, tanto por apoptosis como por necrosis (51).

2.5. Análisis de los efectos intracelulares de fármacos y xenobióticos

La citometría de flujo multiparamétrica es, probablemente, la disciplina analítica potencialmente más poderosa para el estudio de los efectos biológicos inducidos por fármacos y xenobióticos en células diana o, en general, en poblaciones celulares susceptibles.

La sensibilidad y resolución temporal de la citometría, y el elevado número de parámetros, proporcionan una visión integradora (análisis de alto contenido) de la función celular (1).

2.6. Detección y cuantificación de alteración metabólica y muerte celular

Uno de los puntos finales más evidentes de la acción de muchos fármacos y de xenobióticos tóxicos es la muerte celular. Clásicamente, la cuantificación citómica de la potencia citotóxica de un xenobiótico se ha llevado a cabo mediante el cálculo de la muerte celular, evaluada por parámetros muy simples, como la pérdida de la capacidad de exclusión de ciertos fluorocromos, como el yoduro de propidio. Sin embargo, desde hace algunos años, la fuerte irrupción en Biología Celular del concepto de apoptosis como mecanismo de muerte fisiológico, ordenado y regulado, distinto de la muerte accidental o necrosis, junto con el descubrimiento de que, en determinadas condiciones, la muerte celular inducida por agentes xenobióticos sigue el patrón apoptótico y no el necrótico, han desterrado prácticamente aquellos métodos simples para el análisis de la muerte celular inducida por xenobióticos.

Las técnicas citómicas, y muy especialmente, la citometría de flujo han alcanzado un lugar preeminente entre las diferentes metodologías que se aplican al estudio de la muerte celular, fundamentalmente, en relación con el proceso de la apoptosis. En los últimos años, los progresos en la instrumentación citómica y en la disponibilidad de marcadores fluorescentes aplicables a la práctica totalidad de los procesos estructurales y funcionales que participan en la señalización, inducción, ejecución o inhibición de la apoptosis, han seguido de cerca o precedido a los avances en el conocimiento de este crucial fenómeno biológico.

Las técnicas citómicas no sólo permiten la detección y cuantificación de las células en apoptosis en un modelo experimental o natural determinado, distinguiéndolas de las vivas y las necróticas, sino que, por su naturaleza multiparamétrica, se utilizan para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en aquella (9-

11). Un aspecto que se debe destacar es la resolución temporal que permiten las técnicas citómicas multiparamétricas en el estudio de la secuencia de eventos celulares y moleculares de la apoptosis, especialmente cuando se aplican a poblaciones heterogéneas, en las que el transcurso de la apoptosis se produce de forma asincrónica. La capacidad de identificar, mediante parámetros citómicos estructurales o funcionales específicos, células vivas, células en fases tempranas o tardías de la apoptosis y células en necrosis o apoptosis secundaria, posibilita analizar al mismo tiempo células individuales en momentos distintos del proceso apoptótico. La combinación de los parámetros indicadores del estadio apoptótico, con otros parámetros indicadores de procesos funcionales, permite establecer un orden secuencial en éstos últimos: aquellos que ocurren en células que aún no expresan marcadores de apoptosis serían procesos tempranos de la apoptosis, casi siempre relacionados con su señalización o inducción, mientras que los fenómenos que ocurren en las células que ya expresan marcadores claros de apoptosis, serían procesos tardíos, relacionados con la ejecución de la apoptosis o consecuencia de la misma. Inversamente, en los ensayos de citotoxicidad, la capacidad de restringir el análisis funcional citómico a las células que no presentan signos de apoptosis o, en general, muerte celular, supone que la citómica permite revelar procesos tóxicos muy precoces, que podrían incluso ser reversibles o transitorios, incrementando notablemente la detección de fenómenos de citotoxicidad *in vitro* con respecto a la simple cuantificación de la letalidad inducida por la exposición a un xenobiótico (Figura 3).

3. LAS TÉCNICAS CITÓMICAS COMO MÉTODOS ALTERNATIVOS EN TOXICOLOGÍA *IN VITRO*

Por las razones de sensibilidad y capacidad de resolución expuestas en los anteriores apartados, se entiende que las técnicas citómicas se muestren como alternativas de gran interés en el campo de la Toxicología *in vitro*. Además de las razones intrínsecas a los sistemas de detección y cuantificación de parámetros de fluorescencia asociados a las metodologías citómicas, hay una serie de ventajas, desde el punto de vista de su aplicabilidad a modelos biológicos, que explican el valor de la citómica en el área:

a) No invasibilidad:

En la mayoría de aplicaciones, las técnicas citómicas no son invasivas de la integridad celular, o lo son minimamente, por lo que las poblaciones celulares examinadas pueden encontrarse en condiciones cuasi-fisiológicas en el momento de su análisis.

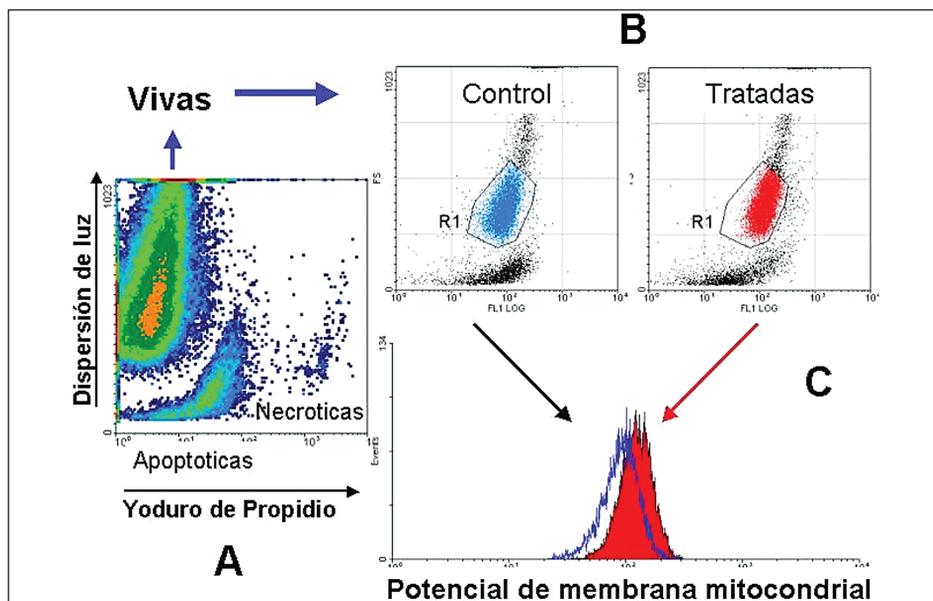


FIGURA 3. Ejemplo de la estrategia por citometría de flujo para la detección de efectos precoces o subletales y letales de tóxicos *in vitro*. (A) La tinción con yoduro de propidio y la medida de la morfología celular (dispersión de luz) permite diferenciar las células vivas, apoptóticas y necróticas. La suma de las poblaciones apoptótica y necrótica proporciona el porcentaje de muerte celular inducida por un tratamiento, por lo que se utiliza como indicador clásico de citotoxicidad. (B) La citometría multiparamétrica permite restringir el análisis del parámetro de interés (en este ejemplo, potencial de membrana mitocondrial medido con Rhodamina 123) a la población de células vivas (R1) por lo que los efectos detectados ocurren antes de la muerte celular o no están relacionados con la misma. (C) El análisis de las células vivas, en los cultivos control o tratados con un determinado compuesto, muestra en este ejemplo, que el potencial de membrana mitocondrial aumenta en las células vivas por efecto del tratamiento.

b) Fácil accesibilidad a tipos celulares de relevancia:

El escaso volumen de muestras celulares en suspensión y el pequeño contenido en biomasa total requerido para la mayoría de los estudios citómicos facilita el acceso a poblaciones celulares extraídas del donante humano o del animal entero (análisis *ex vivo*), a poblaciones experimentales, eucarióticas o procarióticas, en cultivo (análisis *in vitro*) e, incluso a poblaciones de microorganismos procedentes de productos manufacturados o de entornos medioambientales.

Entre las poblaciones celulares obtenidas para el análisis toxicológico *ex vivo* destacan los leucocitos de sangre periférica o de tejidos linfoides, huma-

nos y animales, utilizados como base de ensayos citómicos de inmunotoxicidad o hematotoxicidad (52). El compartimento de células reproductoras masculinas se ha utilizado con mucha frecuencia para la detección de efectos tóxicos *in vivo* y su recuperación en modelos animales de exposición a diversos agentes xenobióticos (53). De esta forma, las técnicas citómicas, sobre todo la citometría de flujo, se aplican a la monitorización fenotípica de los efectos de fármacos y xenobióticos sobre el organismo entero, proporcionando múltiples parámetros que pueden ser considerados como biomarcadores de exposición y de efecto.

El análisis toxicológico mediante citometría de flujo de poblaciones naturales de microalgas y otros microorganismos en su entorno natural o tras exposición *in vitro* a xenobióticos de relevancia medioambiental, se ha convertido en una herramienta usada con mucha frecuencia en Ecotoxicología (54). La cuantificación simultánea de marcadores fluorescentes de parámetros citométricos funcionales y de pigmentos fluorescentes importantes en el metabolismo energético, como la clorofila, o de la respuesta al estrés, como astaxantina y otros carotenoides, proporciona indicadores sensibles de la exposición y el efecto de toxinas ambientales (55). En nuestro laboratorio, por ejemplo, hemos innovado las técnicas de detección de toxicidad del Cu^{+2} mediante el diseño de ensayos cinéticos rápidos sobre el alga unicelular dinoflagelada *Amphidinium carterae* que han identificado una nueva diana de la acción oxidativa de este metal contaminante sobre el sistema de intercambio Na/H de la membrana plasmática, además de proporcionar un ensayo por citometría de flujo para estimar el movimiento fototrópico negativo en tiempo real del dinoflagelado (56). En otros casos, la citometría de flujo se ha aplicado para diseñar nuevas versiones alternativas para ensayos normativos validados, como el test de *Daphnia* (57).

c) *Elevado nivel de información biológica generada:*

Las técnicas citómicas por su naturaleza semicuantitativa o cuantitativa y por su capacidad multiparamétrica producen una gran cantidad y calidad de información biológica, como ya se resumió previamente en este libro. La información primaria, generada de forma directa por el uso de una técnica citómica concreta, se potencia por la información secundaria generada por la interacción, simultánea o secuencial, de distintas aproximaciones citómicas, que poseen un similar fundamento biológico pero generan información complementaria: la citometría de flujo proporciona una descripción poblacional con correlación de parámetros, mientras que las técnicas citómicas de imagen aportan la descripción a nivel celular y topológico (1, 11, 58).

Nuestros laboratorios se interesan desde hace varios años en el desarrollo y aplicación de técnicas citómicas, sobre todo la citometría de flujo, al estudio *in vitro* de citotoxicidad en diferentes contextos experimentales. Nuestra experiencia se ha plasmado recientemente en un estudio sistemático de prevalidación de la citometría de flujo y la microscopía confocal como métodos alternativos para la detección de citotoxicidad *in vitro*, al obtener un contrato convocado públicamente por el Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos (ECVAM), del Centro Común de Investigación de la Comisión Europea en Ispra, Italia. (59). El análisis preliminar de los resultados obtenidos en el proyecto, demuestra que hay una serie de parámetros citómicos que se comportan como indicadores biológicos de toxicidad, pues las variaciones detectadas son dependientes de la concentración y dependientes del tiempo de exposición. Así, una de las conclusiones de nuestro estudio es la recomendación de un conjunto de determinaciones funcionales por citometría de flujo, el denominado por nosotros “Panel Citométrico Primario de Toxicidad” (Primary Toxicity Cytometry Panel, PTCP) que sería aplicado a cultivos celulares de relevancia al fenómeno tóxico a evaluar y que estaría compuesto por las siguientes determinaciones citométricas:

- a) Análisis de Viabilidad: Cuantificación de apoptosis y distinción de necrosis con los marcadores fluorescentes Annexina-V- FITC y yoduro de propidio (PI).
- b) Análisis de los potenciales de membrana : Cuantificación del potencial de membrana mitocondrial (PMM) con rodamina 123 (RH123) y del potencial de membrana plasmática (PMP) con bis-oxonol (DiBAC).
- c) Análisis de la homeostasis intracelular de Ca^{2+} : Cuantificación de los niveles intracelulares con los fluorocromos específicos Fluo-4 y Fura Red.
- d) Generación intracelular de especies reactivas de oxígeno: Cuantificación de los niveles intracelulares de peróxidos con dihidroclorofluoresceína (DCDHF) y de ión radical superóxido con hidroetidina (HE).
- e) Perfil de lípidos polares y apolares : Con el fluorocromo metacromático Rojo Nilo cuya emisión verde es proporcional al contenido en lípidos apolares (triglicéridos sobre todo) y cuya fluorescencia naranja-roja es proporcional al contenido en lípidos polares (fosfolípidos sobre todo).

El PTCP se puede aplicar a diferentes modelos de exposición *in vitro* a xenobióticos. En nuestro estudio, el diseño experimental de aplicación del PTCP a la evaluación de un xenobiótico implica el establecimiento inicial de la letalidad mediante la exposición a dosis logarítmicas del compuesto y, a partir de dicha fase, por la especial sensibilidad del análisis citométrico, se procede al

tratamiento de los cultivos celulares con concentraciones sub-letales del xenobiótico en tres regímenes de exposición:

- a) Toxicidad aguda: Exposición de 5 horas, retirada del xenobiótico y procesamiento de las muestras.
- b) Toxicidad retardada: Exposición de 5 horas (pulso), retirada del xenobiótico, mantenimiento del cultivo en medio libre de xenobiótico durante 48 horas (caza) y procesamiento de las muestras.
- c) Toxicidad sostenida: Exposición de 48 horas, retirada del xenobiótico y procesamiento de las muestras.

En todos los regímenes de toxicidad *in vitro* descritos, se realizan controles positivos, consistentes en la exposición de los cultivos a compuestos que producen efectos conocidos en los diferentes parámetros citométricos utilizados en la evaluación de citotoxicidad (60-61).

4. INTRODUCCIÓN DE LA CITÓMICA EN LAS ESTRATEGIAS GENERALES DE DETECCIÓN DE TOXICIDAD AGUDA EN HUMANOS: EL PROYECTO INTEGRADO EUROPEO «A-CUTE-TOX»

La toxicidad aguda se define según la OCDE como el efecto adverso que se produce a corto plazo tras la administración de una dosis única de una sustancia o de múltiples dosis en un plazo de 24 horas. En el caso de la toxicidad humana, la definición se aplica a situaciones de gravedad, como la ingestión accidental y sobredosis de sustancias, o los intentos de suicidio.

Desde el punto de vista de la salud humana, los estudios sobre toxicidad aguda tienen como objetivos:

- a) Determinar si la exposición única a una sustancia puede producir un efecto adverso sobre la salud humana.
- b) Proporcionar información para el diseño experimental y la selección de dosis en estudios de toxicidad repetida y crónica sobre animales.
- c) Proporcionar a los clínicos información útil para el diagnóstico y tratamiento de intoxicaciones. En los últimos años, además, los ensayos de toxicidad aguda han adquirido relevancia en el contexto de la legislación europea, puesto que se requieren para clasificar los productos químicos según su toxicidad intrínseca, de acuerdo con una directiva de la

Comunidad Económica Europea sobre clasificación, embalaje y etiquetado de productos peligrosos (Directiva CEE 67/548 y sus sucesivas enmiendas).

Tradicionalmente, la toxicidad aguda de las sustancias se ha cuantificado a través de su dosis letal media (DL50), definida como aquella dosis única, calculada estadísticamente, que produciría la muerte del 50% de los animales en un grupo experimental. Desde su introducción, el concepto de DL50 ha sido ampliamente criticado por el elevado consumo de animales y el sufrimiento a los mismos que supone. Los esfuerzos de científicos y organizaciones que preconizan el principio de las 3R (Reducción, Reemplazo y Refinamiento) en el uso de animales de experimentación, ha conducido a modificaciones de los métodos para calcular la DL50 y a la supresión normativa de su diseño inicial.

En contextos normativos cercanos al de la toxicidad aguda, como por ejemplo, el de los efectos adversos de cosméticos y sus componentes, otros ensayos *in vivo* de toxicidad tópica han sido ya reemplazados en la normativa internacional por ensayos *in vitro*, lo que muestra, por una parte, el valor de las aproximaciones *in vitro* a los estudios toxicológicos y, por otra, plantea la necesidad de la búsqueda inmediata de métodos alternativos al animal entero en la evaluación de toxicidad aguda sistémica. La nueva política de la Unión Europea, de inminente entrada en vigor, sobre toxicidad de productos químicos (propuesta REACH: Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de productos Químicos) y de cosméticos (7.^a enmienda de la Directiva de Cosméticos) demanda el reemplazo a corto plazo de los experimentos animales. Por ejemplo, la implementación de la política REACH obligará a una evaluación toxicológica exhaustiva de más de 30.000 sustancias químicas existentes que, en la actualidad, se producen y/o comercializan por encima de 1 Tm al año. Para ello, en las condiciones normativas actuales, serían necesarios de 10 a 14 millones de animales de laboratorio, por no mencionar el enorme aumento de los costes de los ensayos de toxicidad y de los productos en sí.

Con el propósito de desarrollar una estrategia sencilla y robusta de ensayos para la predicción de toxicidad aguda sistémica en humanos, capaz de reemplazar los actuales ensayos normativos sobre animal entero, el VI Programa Marco de la Unión Europea ha financiado el Proyecto Integrado «A-Cute-Tox» (62). El consorcio de A-Cute-Tox está formado por treinta y siete socios de trece países de la Unión Europea: Alemania, Bélgica, República Checa, Dinamarca, España, Finlandia, Francia, Holanda, Italia, Polonia, Suecia, Reino Unido y Suiza. Los objetivos científicos del proyecto son:

1. Compilar, evaluar de forma crítica y producir datos *in vivo* e *in vitro* de calidad para el análisis comparativo.
2. Identificar los factores (cinética, metabolismo y organo-especificidad) que modifican la correlación entre la toxicidad *in vitro* e *in vivo* y definir un algoritmo capaz de explicarlos.
3. Explorar herramientas y sistemas celulares innovadores para identificar nuevos puntos finales y estrategias que anticipen mejor la toxicidad animal y humana.
4. Diseñar una estrategia sencilla, robusta y fiable de ensayos *in vitro*, susceptible de robotización y asociada con el modelo predictivo de toxicidad aguda.

La incorporación de la citómica en este proyecto tiene como objetivo el aportar su potencia multiparamétrica y sensibilidad de detección a la definición de nuevos puntos finales de citotoxicidad *in vitro* de utilidad para incorporar al modelo predictivo o para aportar nuevos parámetros de alerta y correctores de toxicidad, como se muestra en el esquema de la estructura del Proyecto Integrado Europeo A-Cute-Tox (Figura 4).

El aporte fundamental de la citómica se produce en el subproyecto n.º 4 (WorkPackage 4, WP4) denominado «Nuevos Sistemas Celulares, Nuevos Puntos Finales», coordinado por el grupo del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia y en el que están incluidos, además de este Departamento y el Laboratorio de Citometría del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), el Proyecto de Hematopoyesis del Centro de Investigaciones Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), el Laboratorio de Toxicología Bioquímica del Instituto de Salud Pública de Bruselas y el Departamento de Farmacología de la Universidad Libre de Bruselas.

El objetivo general de WP4 en el contexto de A-Cute-Tox es el de proporcionar una vía alternativa para mejorar la capacidad predictiva de los ensayos de citotoxicidad basados en análisis de células, al incorporar parámetros más específicos de punto final y/o sistemas celulares más apropiados. Para lograr este objetivo, se explorarán nuevos modelos celulares que abarcan niveles de complejidad creciente, desde la célula individual a sistemas pluricelulares (citomas). Mediante esta aproximación, se podrán definir de forma integrada la citotoxicidad, a partir de datos genómicos, proteómicos y citómicos, en un continuo desde las moléculas a las células y los tejidos. Revelar de forma sensible y precisa la citotoxicidad en tales sistemas biológicos requiere el desarrollo de

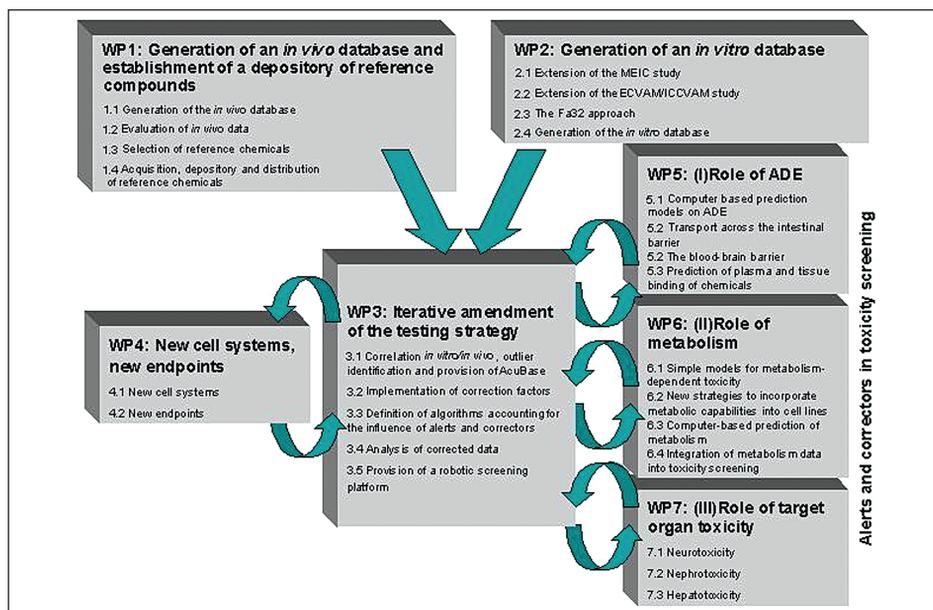


FIGURA 4. Estructura del Proyecto Integrado Europeo “A-Cute-Tox”. El esquema ha sido realizado por el Steering Committee del proyecto y en él se muestra el papel específico del subproyecto WP4 “New cell systems, new endpoints” en el que la citómica se encuentra representada ampliamente.

estrategias técnicas que incorporen nuevos puntos finales. Para ello, se prevé implementar técnicas moleculares, bioquímicas, de imagen y citométricas, representativas del estado del arte y más allá del mismo. De especial relevancia será el uso extensivo de la citometría de flujo para definir nuevos puntos finales de citotoxicidad y para proporcionar apoyo tecnológico a otras aproximaciones moleculares y celulares de la WP4.

De acuerdo con las anteriores consideraciones, los objetivos técnicos de WP4 son:

- a) Evaluar el valor predictivo de una serie de ensayos biológicos nuevos o más refinados que se implementarán y probarán bajo condiciones controladas de toxicidad aguda y retrasada.
- b) Desarrollar y evaluar nuevas estrategias de ensayo enfocadas hacia funciones celulares importantes.
- c) Establecer y divulgar Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) para todos los ensayos desarrollados.

- d) Miniaturizar los ensayos biológicos para hacerlos susceptibles de interacción con los nuevos sistemas basados en multiplacas.
- e) Evaluar la posibilidad de establecer procedimientos robotizados para los ensayos celulares basados en la fluorescencia que se van a establecer.

Los objetivos de WP4 se plasmarán en una serie de procedimientos normalizados de trabajo y documentos que se harán públicos en diferentes fases del desarrollo del proyecto, como parte del proceso global de prevalidación, validación e instauración de métodos alternativos al uso de animales de laboratorio en la evaluación normativa del riesgo de toxicidad humana de productos químicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el patrocinio del VI Programa Marco de la Comunidad Europea (Proyecto Integrado A-Cute-Tox, LSHB-CT-2004-512051).

BIBLIOGRAFÍA

1. O'Connor, J.E., Callaghan, R.C., Escudero, M., Herrera, G., Martínez, A., Monteiro, M.C., Montolíu, H. (2001) The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. *IUBMB Life* 51: 231-239.
2. O'Connor, J.E., Martínez-Romero, A., Castell, J.V., Gómez-Lechón, M.J. (2005) Multiparametric characterization by flow cytometry of flow-sorted subpopulations of a human hepatoma cell line useful for drug research. *Cytometry part A* 63: 48-58.
3. Gametchu, B., Chen, F., Sackey, F., Powell, C., Watson, C.S. (1999) Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids*. 4:107-119.
4. Petriz, J., Sanchez, J., Bertran, J., Garcia-Lopez, J. (1997) Comparative effect of verapamil, cyclosporin A and SDZ PSC 833 on rhodamine 123 transport and cell cycle in vinblastine-resistant Chinese hamster ovary cells overexpressing P-glycoprotein. *Anticancer Drugs*. 8:869-875.
5. Alvarez-Barrientos, A., O'Connor, J.E., Nieto-Castillo, R., Moreno-Moreno, A.B., Prieto, P. (2001) Use of flow cytometry and confocal microscopy techniques to investigate early CdCl₂-induced nephrotoxicity in vitro. *Toxicol. In Vitro* 15: 407-412.

6. Kellar, K.L., Iannone, M.A. (2002) Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays. *Exp Hematol.* 30:1227-1237.
7. Waller, A., Simons, P.C., Biggs, S.M., Edwards, B.S., Prossnitz, E.R., Sklar, L.A. (2004) Techniques: GPCR assembly, pharmacology and screening by flow cytometry. *Trends Pharmacol Sci.* 25:663-669.
8. Morgan, E., Varro, R., Sepulveda, H., Ember, J.A., Apgar, J., Wilson, J., Lowe, L., Chen, R., Shivraj, L., Agadir, A., Campos, R., Ernst, D., Gaur, A. (2004) Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin. Immunol.* 110:252-266.
9. Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., Traganos, F. (1997) Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27:1-20.
10. Ormerod, M.G. (2001) Using flow cytometry to follow the apoptotic cascade. *Redox Rep.* 6:275-287.
11. O'Connor, J.E., Herrera, G., Corrochano, V. (1998) Flow versus Flux: Functional Assays by Flow Cytometry. En: *Fluorescence and Fluorescent Probes II* (Slavík, J., Ed.) Plenum Press, New York, pp 47-54.
12. Steensma, D.P., Timm, M., Witzig, T.E. (2003) Flow cytometric methods for detection and quantification of apoptosis. *Methods Mol. Med.* 85:323-332.
13. Edwards, B.S., Oprea, T., Prossnitz, E.R., Sklar, L.A. (2004) Flow cytometry for high-throughput, high-content screening. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8:392-398.
14. Waller, A., Simons, P.C., Biggs, S.M., Edwards, B.S., Prossnitz, E.R., Sklar, L.A. (2004) Techniques: GPCR assembly, pharmacology and screening by flow cytometry. *Trends Pharmacol. Sci.* 25:663-669.
15. Nihei, O.K., Savino, W., Alves, L.A. (2000) Procedures to characterize and study P2Z/P2X7 purinoceptor: flow cytometry as a promising practical, reliable tool. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 95:415-428.
16. Miyagawa, S., Nakai, R., Matsunami, K., Kusama, T., Shirakura, R. (2003) Co-effect of HLA-G1 and glycosyltransferases in reducing NK cell-mediated pig endothelial cell lysis. *Transpl. Immunol.* 11:147-153.
17. Pizzato, N., Garmy-Susini, B., Le Bouteiller, P., Lenfant, F. (2004) Differential down-modulation of HLA-G and HLA-A2 or -A3 cell surface expression following human cytomegalovirus infection. *J. Reprod. Immunol.* 62:3-15.
18. Strunk, D., Rohde, E., Lanzer, G., Linkesch, W. (2005) Phenotypic characterization and preclinical production of human lineage-negative cells for regenerative stem cell therapy. *Transfusion.* 45:315-326.

19. Matzdorff, A.C., Kuhnel, G., Kemkes-Matthes, B., Voss, R. (2001) Comparison of GP IIB/IIIa inhibitors and their activity as measured by aggregometry, flow cytometry, single platelet counting, and the rapid platelet function analyzer. *J Thromb Thrombolysis* 12:129-139.
20. Stumm, S., Meyer, A., Lindner, M., Bastert, G., Wallwiener, D., Guckel, B. (2004) Paclitaxel treatment of breast cancer cell lines modulates Fas/Fas ligand expression and induces apoptosis which can be inhibited through the CD40 receptor. *Oncology*. 66:101-111.
21. Báguena-Cervellera, R., Renau-Piqueras, J., O'Connor, J.E., Grisolia, S. (1987) Effects of prolonged exposure to ammonia on fluid phase, receptor-mediated and absorptive (non-specific) endocytosis in cultured neuroblastoma cells. *Histochemistry* 87: 445-455.
22. Thomas, S., Preda-Pais, A., Casares, S., Brumeanu, T.D. (2004) Analysis of lipid rafts in T cells. *Mol. Immunol.* 41:399-409.
23. Ferguson, S.S., Caron, M.G. (2004) Green fluorescent protein-tagged beta-arrestin translocation as a measure of G protein-coupled receptor activation. *Methods Mol Biol.* 237:121-126.
24. Smith, P.J., Wiltshire, M. (2001) Cytometry of antitumor drug-intracellular target interactions. *Methods Cell Biol.* 64:173-191.
25. Masood, S. (1994) Prognostic and diagnostic implications of estrogen and progesterone receptor assays in cytology. *Diagn. Cytopathol.* 10:263-267.
26. Platica, M., Ivan, E., Ionescu, A., Holland, J.F., Mora, G., Tindall, D.J., Mandeli, J., Unger, P.D., Platica, O. (2004) Transformation of NIH 3T3 cells by enhanced PAR expression. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 314:891-896.
27. Gritzapis, A.D., Baxevanis, C.N., Missitzis, I., Katsanou, E.S., Alexis, M.N., Yotis, J., Papamichail, M. (2003) Quantitative fluorescence cytometric measurement of estrogen and progesterone receptors: correlation with the hormone binding assay. *Breast Cancer Res. Treat.* 80:1-13.
28. Sklar, L.A., Edwards, B.S., Graves, S.W., Nolan, J.P., Prossnitz, E.R. (2002) Flow cytometric analysis of ligand-receptor interactions and molecular assemblies. *Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31:97-119.
29. Bleesing, J.J., Fleisher, T.A. (2001) Cell function-based flow cytometry. *Semin Hematol.* 38:169-178.
30. Krutzik, P.O., Irish, J.M., Nolan, G.P., Perez, O.D. (2004) Analysis of protein phosphorylation and cellular signaling events by flow cytometry: techniques and clinical applications. *Clin. Immunol.* 110:206-221.

31. Chan, F.K. (2004) Monitoring molecular interactions in living cells using flow cytometric analysis of fluorescence resonance energy transfer. *Methods Mol Biol.* 261:371-382.
32. Monteiro, M.C., Sansonetty, F., Gonçalves, M.J., O'Connor, J.E. (1999) A flow cytometric kinetic assay of platelet activation in whole blood using Fluo-3 and CD41. *Cytometry* 35: 302-310.
33. Princen, K., Hatse, S., Vermeire, K., De Clercq, E., Schols, D. (2003) Evaluation of SDF-1/CXCR4-induced Ca²⁺ signaling by fluorometric imaging plate reader (FLIPR) and flow cytometry. *Cytometry A.* 51:35-45.
34. Mackem, S., Baumann, C.T., Hager, G.L. (2001) A glucocorticoid/retinoic acid receptor chimera that displays cytoplasmic/nuclear translocation in response to retinoic acid. A real time sensing assay for nuclear receptor ligands. *J Biol Chem.* 276:45501-45504.
35. Eggeling, C., Brand, L., Ullmann, D., Jager, S. (2003) Highly sensitive fluorescence detection technology currently available for HTS. *Drug Discov Today* 8:632-641.
36. Valero, C., Benahmed, D., León, P., Mir, A., O'Connor, J.E. (2004) Nuevos métodos para la detección por citometría de flujo de respuestas funcionales en poblaciones leucocitarias relevantes a la alergia e inflamación. XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC), Marbella.
37. Galbraith, D.W., Anderson, M.T., Herzenberg, L.A. (1999) Flow cytometric analysis and FACS sorting of cells based on GFP accumulation. *Methods Cell Biol.* 58:315-341.
38. Hawley, T.S., Telford, W.G., Hawley, R.G. (2001) «Rainbow» reporters for multispectral marking and lineage analysis of hematopoietic stem cells. *Stem Cells.* 19:118-124.
39. Darzynkiewicz, Z., Crissman, H., Jacobberger, J.W. (2004) Cytometry of the cell cycle: cycling through history. *Cytometry A.* 58:21-32.
40. Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., Smolewski, P. (2001) Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin. Hematol.* 38:179-193.
41. Gómez-Lechón, M.J., O'Connor, J.E., Castell, J.V., Jover, R. (2002) Sensitive markers used to identify compounds that trigger apoptosis in cultured hepatocytes. *Toxicol. Sci.* 65:299-308.
42. Kappelmayer, J., Simon, A., Kiss, F., Hevessy, Z. (2004) Progress in defining multidrug resistance in leukemia. *Expert Rev Mol Diagn.* 4:209-217.

43. Yang, H.C., Mikami, Y., Imai, T., Taguchi, H., Nishimura, K., Miyaji, M., Branchini, M.L. (2001) Extrusion of fluorescein diacetate by multidrug-resistant *Candida albicans*. *Mycoses* 44:368-374.
44. Ieiri, I., Takane, H., Otsubo, K. (2004) The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 43:553-576.
45. Petriz, J., O'Connor, J.E., Garcia-Lopez, J. (1996) Rhodamine 123 efflux in drug resistance assays. *Leukemia*. 10:748-749.
46. Donato, T., O'Connor, J.E. (2004) Métodos de evaluación del citocromo P450 y su papel en el metabolismo de fármacos. En: *Citocromo P450* (M. Cascales, M.J. Gómez-Lechón y eds.). Real Academia Nacional de Farmacia/Instituto de España, Madrid, pp. 313-360.
47. Miller, A.D. (1983) Ethylated fluoresceins: Assay of cytochrome P-450 activity and application to measurement in single cells by flow cytometry. *Anal. Biochem.* 133: 46-57.
48. Miller, A.D. (1990) Flow cytometric techniques for measurement of cytochrome P-450 activity in viable cells. *Methods Cell Biol.* 33: 71-79.
49. Heinonen, J.T., Sidhu, J.S., Reilly, M.T., Farin, F.M., Omiecinski, C.J., Eaton, D.L., Kavanagh, T.J. (1996) Assessment of regional cytochrome P-450 activity in rat liver slices using resorufin substrates and fluorescence confocal laser cytometry. *Environ. Health Perspect* 104:536-543.
50. Wilson, R.A., Liem, H.H., Miyai, K., Muller-Eberhard, U. (1985) Heterogeneous distribution of drug metabolism in elutriated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 34:1463-1470.
51. Alvarez-Barrientos, A., Callaghan, R.C., Huerta, E., Coecke, S., Martínez, A., Nieto, R., O'Connor, J.E., Prieto, P., Torralbo, P. (2003) Drug-metabolism dependent cytotoxicity of mianserin in vitro: Application of a primary toxicity cytotoxic panel. VIII Congreso de la Sociedad Ibérica de Citometría, Madrid.
52. Burchiel, S.W., Lauer, F.T., Gurule, D., Mounho, B.J., Salas, V.M. (1999) Uses and future applications of flow cytometry in immunotoxicity testing. *Methods.* 19:28-35.
53. Erenpreiss, J., Jepson, K., Giwerzman, A., Tsarev, I., Erenpreisa, J., Spano, M. (2004) Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum. Reprod.* 19:2277-2282.
54. Legendre, L., Courties, C., Troussellier, M. (2001) Flow cytometry in oceanography 1989-1999: environmental challenges and research trends. *Cytometry* 44:164-172.

55. Franqueira, D., Orosa, M., Torres, E., Herrero, C., Cid, A. (2000) Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. *Sci Total Environ.* 247:119-126.
56. Lage, O.M., Sansonetty, F., O'Connor, J.E., Parente, A.M. (2001) Flow cytometric analysis of chronic and acute toxicity of copper(II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Cytometry* 44: 226-235.
57. Gomez, M., Mayo, I., Torres, S. (2001) Flow cytometry of cell proliferation through the incorporation of bromodeoxyuridine as an index of growth rate in the water flea, *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). *Cytometry* 44:264-271.
58. O'Connor, J.E. (1996) Flow Cytometry versus Fluorescence Microscopy. En: *Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes* (Slavik, J., Ed.), Plenum Press, New York. pp. 61-66.
59. An evaluation of the reproducibility and transferability of flow cytometric and confocal microscopic endpoints in an in vitro nephrotoxicity and in vitro metabolism models. European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), Institute for Health and Consumer Protection, Joint Research Center, Commission of the European Communities (15348-1999-10FIED ISP ES).
60. Alvarez-Barrientos, A., O'Connor, J.E., Prieto, P., Moreno, A.B., Nieto, R., Montolú, H., Callaghan, R.C. (2001) Alternative methods to detect nephrotoxicity in vitro: A comparative study of acute, chronic and delayed models of cytotoxicity in tubular renal cells. VII Congresso da Sociedade Ibérica de Citometria, Coimbra (Portugal).
61. Alvarez-Barrientos, A., Callaghan, R.C., Huerta, E., Coecke, S., Martínez, A., Nieto, R., O'Connor, J.E., Prieto, P., Torralbo, P. (2003) Drug-metabolism dependent cytotoxicity of mianserin in vitro: Application of a primary toxicity cytomic panel. VIII Congreso de la Sociedad Ibérica de Citometría, Madrid.
62. A-Cute-Tox: Optimization and pre-validation of an in vitro test strategy for predicting acute human toxicity. Integrated Project. VI Frame Program (LifeSciHealth priority: LSH-2002-1.2.3-2), The European Commission.