

7. La citometría de flujo en el análisis citómico: *in vivo, in vitro, ¿in fluxo?*

JOSÉ ENRIQUE O'CONNOR, GUADALUPE HERRERA,
ALICIA MARTÍNEZ-ROMERO, CRISTINA BODI, CARLA VALERO,
ROBERT C. CALLAGHAN y MARIA-DO-CÉU MONTEIRO

Πάντα Ρεῖ

(Todo fluye)

Heráclito, siglo VI a.C.

1. CITÓMICA EN EL ANÁLISIS BIOLÓGICO

Las técnicas citómicas están llamadas a convertirse en las más avanzadas (y, sin embargo, en continua evolución) de las metodologías relacionadas con el uso biológico de la fluorescencia. Como se ha describe en otros capítulos de esta obra, las estrategias citómicas presentan clara ventaja sobre otros métodos de fluorescencia puesto que permiten analizar simultáneamente varios parámetros biológicos en una célula individual. Como consecuencia, los citomas complejos pueden ser descritos sobre la base de las propiedades de fluorescencia de sus componentes individuales y clasificados de acuerdo a criterios métricos tales como la intensidad de expresión de uno o más parámetros, el cociente intracelular o intercelular de diferentes parámetros o los cambios cinéticos en tales parámetros (1).

El significado biológico de los ensayos citómicos depende fundamentalmente de la especificidad de los marcadores fluorescentes utilizados, aunque un grado no despreciable de información se obtiene de las medidas de la interacción física de la luz con las partículas. Desde un punto de vista muy general, los métodos citómicos proporcionan información sobre dos tipos de parámetros biológicos (2):

a) Parámetros estructurales: se entienden por tales los componentes bioquímicos estables de la célula, desde las macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas) a metabolitos de medio y bajo peso molecular, que habitualmente se determinan mediante marcadores fluorescentes dotados de reactividad química o afinidad estructural. Igualmente, propiedades físicas y topográficas de las células, como el tamaño y la granularidad, se pueden estimar por métodos citómicos.

b) Parámetros funcionales: son aquellas propiedades dinámicas de las células que pueden modificarse rápidamente y que se cuantifican gracias a marcadores fluorescentes cuyas propiedades ópticas o de distribución cambian en respuesta al fenómeno de interés. También se incluyen en este concepto aquellas operaciones celulares que provocan cambios rápidos en la concentración de componentes bioquímicos celulares susceptibles de cuantificación por técnicas citómicas (3).

De acuerdo con las definiciones anteriores, el concepto de ensayo citómico funcional puede relacionarse con términos frecuentes de la literatura del área, como son «Bioquímica Celular», «Fisiología Celular», «Activación Celular» u otros descriptores del comportamiento dinámico de las células individuales a lo largo de un período de tiempo dado (2).

Con independencia de la aproximación metodológica que se siga, los ensayos citométricos funcionales intentan responder cuestiones importantes que permitan interpretar la complejidad de los sistemas celulares en estudio:

a) Qué funciones tienen lugar en células específicas:

Mediante la identificación de subpoblaciones celulares determinadas por sus propiedades particulares y analizando sus elementos y rutas funcionales (4).

b) En qué compartimento celular se localizan las funciones de interés:

Mediante la aplicación de marcadores fluorescentes selectivos para un orgánulo o microambiente celular (5), que permite el análisis de imagen en técnicas citómicas de carácter óptico (6), o mediante el análisis por citometría de flujo de orgánulos o vesículas subcelulares aisladas (7, 8).

c) Cómo se ejecutan, se regulan o se perturban las funciones celulares:

Mediante la capacidad multiparamétrica de las técnicas citómicas es posible determinar simultáneamente sobre la misma célula individual diversas fun-

ciones y correlacionarlas con procesos de expresión génica, transducción de señales, activación celular, proliferación, diferenciación, interacción con otras células y muerte celular (1). Así, es posible seguir un amplio número de fenómenos relacionados con el comportamiento de células y sistemas en condiciones basales (9) o en respuestas inducidas por la manipulación experimental o las situaciones fisio-patológicas (10).

Los principales problemas en la realización de ensayos citómicos funcionales, especialmente aquellos que se llevan a cabo mediante citometría de flujo surgen, por lo general, de las dificultades en superar una o varias de las siguientes cuestiones críticas:

- a) Obtención de suspensiones de células individuales a partir de poblaciones celulares adherentes.
- b) Mantenimiento de la viabilidad celular y la capacidad metabólica durante el período experimental.
- c) Aislamiento de elementos subcelulares a partir de células y tejidos.
- d) Distinción de partículas y células pequeñas del ruido de fondo.
- e) Accesibilidad adecuada de los marcadores fluorescentes a los sitios intracelulares y a los procesos funcionales de interés.
- f) No interferencia de los marcadores fluorescentes con las funciones celulares.
- g) Selección adecuada de las ventanas temporales para los ensayos funcionales cinéticos.
- h) Calibración del ensayo para la expresión en valor absoluto de las medidas efectuadas.

2. NIVELES DE ANÁLISIS BIOLÓGICO EN TIEMPO REAL

La investigación biológica se ha dividido, clásicamente, en dos niveles principales, que difieren en cuanto al grado de complejidad del modelo biológico en estudio, las técnicas de análisis aplicables y la información generada. Los estudios *in vivo* son aquellos que se desarrollan en un organismo vivo o en un cuerpo, mientras que los ensayos *in vitro* tienen lugar en un ambiente artificial, fuera de un organismo o cuerpo, y suelen implicar cultivos celulares o secciones de tejidos que han sido mantenidos o cultivados en el laboratorio.

En la mayoría de los casos, el análisis *in vivo* en tiempo real implica metodologías u observaciones macroscópicas escasamente relacionadas con la citómica y los puntos finales analizados suelen ser inespecíficos o generales, incluyendo la muerte, como en ciertos ensayos de toxicidad que se efectúan sobre animales, como ratas o ratones. Por el contrario, los estudios *in vitro* son los principales beneficiarios de las técnicas citómicas, tanto de imagen como de flujo que permiten el seguimiento dinámico de los fenómenos biológicos de interés.

En los últimos años, la dicotomía *in vivo/in vitro* se ha visto difuminada por la aparición de nuevas formas de investigación biológica, que no han sido ajenas al desarrollo de las metodologías “ómicas” y del impacto de la Biología de Sistemas. Así, por una parte, el desarrollo de métodos de obtención y análisis de células a partir del organismo entero, manteniendo sustancialmente sus propiedades biológicas, permite los estudios *ex vivo*, que reflejan adecuadamente la funcionalidad celular *in vivo* en condiciones basales o en diversas situaciones fisiopatológicas (11). En otros contextos, los estudios *ex vivo* se dirigen a caracterizar y manipular células que son reintroducidas en el organismo entero (12). El conocimiento de las relaciones estructura-función de las biomoléculas y de las características cinéticas y de regulación en las rutas metabólicas en las que éstas participan ha conducido al denominado análisis *in silico*, entendido como aquél que se realiza por medio de una simulación por ordenador, y posibilitado por el extraordinario avance en la potencia computacional aplicable a la Biología (13). Mediante esta estrategia totalmente exenta de uso de material biológico, la complejidad molecular y celular se aborda a través de modelos matemáticos que permiten predecir respuestas celulares a modificaciones de su entorno y su metabolismo, identificar dianas moleculares de relevancia o diseñar racionalmente fármacos dirigidos contra ellas.

3. EL ANÁLISIS «IN FLUXO»: UNA NUEVA DEFINICIÓN PARA LOS ESTUDIOS CINÉTICOS PROPIOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

Una de las características importantes de las técnicas citómicas es la de proporcionar datos cinéticos, obtenidos mediante determinaciones secuenciales de las propiedades de fluorescencia o de otros parámetros ópticos de la población celular en estudio. A diferencia de otras metodologías basadas en la detección de fluorescencia (por ejemplo, la espectrofluorescencia en cubeta) o de la absorción/dispersión de luz (por ejemplo, la agregometría), las técnicas citómicas se basan en el análisis de células individuales, permitiendo la detección y análisis, cualitativo y cuantitativo, de subpoblaciones distintas en el seno de citomas heterogéneos (Figura 1).

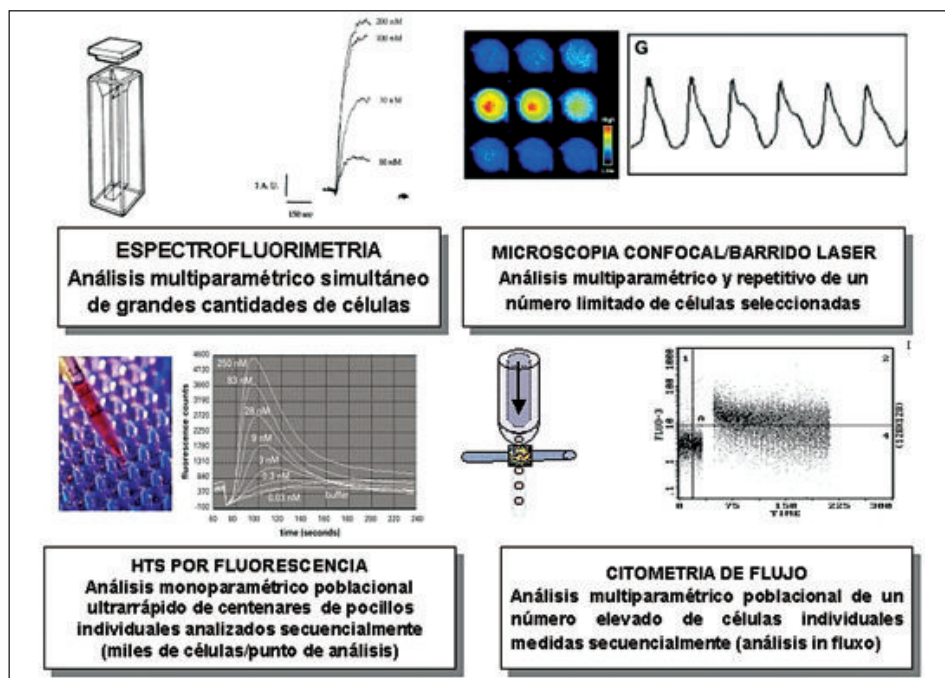


FIGURA 1. Resumen comparativo de las características metodológicas esenciales de las diferentes metodologías “-ómicas” que generan datos cinéticos basados en la emisión de fluorescencia.

Por las bases técnicas de los sistemas instrumentales, el análisis funcional cinético por citometría de flujo reviste unas propiedades especiales de adquisición de datos y generación de resultados, que justifican que propongamos el término «*In Fluxo*» para definir el análisis cinético por citometría de flujo. La característica diferencial del análisis *in fluxo* sería que el análisis cinético del fenómeno biológico en estudio se realiza de forma secuencial, pero analizando en cada punto temporal una célula (o partícula biológica) individual diferente. Por la elevada velocidad de paso de muestra en un citómetro de flujo (hasta miles de células por segundo), la resolución temporal teórica del análisis *in fluxo* puede llegar a ser cercana al milisegundo, la duración de los períodos de tiempo de análisis puede ir desde pocos segundos a varios minutos y el número total de células analizado puede ser muy elevado. En el análisis *in fluxo*, el fenómeno biológico de interés sucede y evoluciona mientras las células individuales son examinadas en tiempo real en el citómetro de flujo.

Cuando se compara un fenómeno dinámico concreto, por ejemplo, el movimiento de Ca^{2+} intracelular tras la activación de un tipo celular adecuadamente marcado, los trazados cinéticos generados por una suspensión celular en un espectrofluorímetro, por una monocapa celular en un microscopio confocal o de barrido láser y por una suspensión celular en un citómetro de flujo son similares, pero la información generada puede diferir sustancialmente (1).

Aunque el concepto de análisis *in fluxo* se puede aproximar al de la denominada «Citoenzimología de Flujo» (1, 3), no son dos procesos totalmente superponibles. Así, mientras que en la citoenzimología de flujo, basada en el uso de sustratos fluorogénicos de enzimas, el análisis *in fluxo* suele estar presente, en muchos casos el análisis citoenzimológico se hace a través de medidas de punto final. Por otra parte, el análisis *in fluxo* puede dirigirse a fenómenos de fluorescencia no asociados con la determinación de actividades enzimáticas y, además, puede evaluar cambios cinéticos en parámetros no fluorescentes.

El análisis *in fluxo* es claramente ventajoso cuando se abordan fenómenos dinámicos muy rápidos y/o transitorios, especialmente cuando se desea restringir el análisis de forma selectiva a una subpoblación, identificable por sus características citométricas diferenciales.

Desde el punto de vista de su diseño práctico, se pueden distinguir tres tipos fundamentales de análisis *in fluxo*, de los que se presentaran ejemplos individuales o mixtos en el apartado siguiente de este capítulo:

a) Análisis *in fluxo* de la captación de fluorocromo extracelular: las suspensiones celulares de control o sometidas a diversos tratamientos, son introducidas en el citómetro de flujo para registrar durante unos segundos la(s) autofluorescencia(s) basales y, a continuación, se adiciona el marcador fluorescente o sustrato fluorogénico apropiado (14-16). La cinética de captación del mismo refleja los efectos del tratamiento sobre fenómenos específicos, tales como el transporte a través de la membrana, la generación intracelular de fluorescencia por una actividad enzimática o la capacidad de retención intracelular de la especie fluorescente.

b) Análisis *in fluxo* de la variación de fluorescencia intracelular: las suspensiones celulares de control o sometidas a diversos tratamientos, son preincubadas con el marcador fluorescente o sustrato fluorogénico indicado, antes de ser introducidas en el citómetro de flujo para registrar durante unos segundos la(s) fluorescencia(s) basales. A continuación, se adiciona el estímulo apropiado (4, 17). La cinética de variación de la fluorescencia intracelular refleja los

efectos del estímulo sobre fenómenos específicos, tales como la aparición (o accesibilidad) o desaparición (o inaccesibilidad) de un ligando del marcador fluorescente, la generación intracelular de fluorescencia por una actividad enzimática, la variación del microentorno iónico y molecular o la capacidad de retención intracelular de la especie fluorescente.

c) Análisis *in fluxo* de la variación de la morfología celular: las suspensiones celulares de control o sometidas a diversos tratamientos son introducidas en el citómetro de flujo para registrar durante unos segundos las propiedades basales de dispersión frontal (estimación del tamaño celular) y lateral (estimación de la granularidad intracelular) de luz láser. A continuación, se adiciona el estímulo apropiado (1, 11). La cinética de variación de las propiedades de dispersión de luz refleja los efectos del estímulo sobre fenómenos específicos, tales como la desgranulación asociada a la secreción, la hinchazón celular por captación de líquidos o la pérdida de la integridad celular.

4. LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN LOS NIVELES DEL ANÁLISIS CITÓMICO: IN VIVO, EX VIVO, IN VITRO, IN FLUXO

Entre las metodologías de la citómica, la citometría de flujo es, sin duda, la que ha alcanzado una mayor expansión, en cuanto al número de usuarios y de aplicaciones. Sin embargo, en razón de su intensa implicación en el diagnóstico y pronóstico inmuno-hematológico, las aplicaciones funcionales básicas y biotecnológicas de la citometría de flujo son minoritarias si se comparan con sus aplicaciones clínicas rutinarias o especializadas (18). Aún así, la creciente implantación de los sistemas citométricos de flujo en laboratorios básicos y el interés que ciertos ensayos funcionales pueden tener para el laboratorio clínico, han contribuido a potenciar la difusión de los procedimientos de análisis funcional por citometría de flujo (19-21).

Entre los factores que han contribuido a que la citometría de flujo funcional se pueda aplicar en todos los niveles del análisis biológico se incluyen los avances en el diseño de marcadores fluorescentes vitales (22), la disponibilidad de técnicas mínimamente invasivas para la obtención de suspensiones de células o partículas biológicas a partir de organismos o tejidos (19), la capacidad multiparamétrica y la sensibilidad de detección de los citómetros modernos (1, 3, 23) y el desarrollo de procedimientos informáticos que facilitan el análisis de datos en poblaciones complejas y con gran número de células analizadas (24).

A continuación se ilustra la aplicabilidad de la citometría de flujo en los diferentes niveles de la investigación biológica, mediante ejemplos de nuestro laboratorio.

1. In vivo

En la actualidad, sólo algunas técnicas citómicas permiten el análisis *in vivo*, cuando el organismo en estudio es multicelular y macroscópico. Entre ellas se encuentran metodologías complejas y poco extendidas, como los sistemas de análisis de imagen de fluorescencia *in vivo* (25), que se pueden aplicar a pequeños animales, mediante la introducción en su cuerpo de una pequeña lente objetivo guiada o mediante sistemas de alta sensibilidad que permiten la observación exterior de la señal de fluorescencia interna. Otros sistemas menos sofisticados, pero más invasivos para el animal, como la microscopía de fluorescencia intravital permiten el estudio *in vivo* de células teñidas con marcadores fluorescentes (26).

Cuando el organismo en estudio es unicelular, la citometría de flujo se convierte en una tecnología de elección que permite el análisis funcional en condiciones que perturban mínimamente el hábitat y estado fisiológico del organismo unicelular. En este contexto, los estudios citométricos más relevantes se realizan sobre poblaciones de microorganismos del plankton (microalgas, cianobacterias, virus), en los que la presencia de pigmentos fluorescentes naturales (clorofilas y ficobiliproteínas, sobre todo) permite realizar estudios relacionados con la taxonomía, abundancia de biomasa, ciclo vital y capacidad metabólica de las poblaciones en estudio (27).

2. Ex vivo

Los mínimos requerimientos de volumen y de cantidad absoluta de biomasa para los ensayos por citometría de flujo, así como la disponibilidad de métodos que permiten el análisis citométrico sin apenas manipular la muestra, han convertido a la citometría de flujo en una metodología escasamente invasiva, muy útil para estudiar suspensiones celulares obtenidas a partir de organismos superiores en condiciones que reproducen las originales.

El análisis citométrico *ex vivo* tiene su mayor uso práctico en el contexto del diagnóstico y pronóstico inmuno-hematológico, con el estudio de poblaciones leucocitarias de sangre periférica. Habitualmente, el análisis implica la ex-

tracción cuidadosa de unos pocos mililitros de sangre venosa en presencia de inhibidores de la coagulación, el alicuotado en volúmenes de 50-100 μL y el marcado de cada alícuota con uno o varios anticuerpos fluorescentes. Tras unos minutos de incubación, se somete a un proceso de hemólisis y fijación con paraformaldehído y se introduce la suspensión de leucocitos en el citómetro de flujo para su lectura. Esta técnica de preparación se conoce como «lisis y fijación sin lavado» («lyse-fix-no wash») y permite eliminar la interferencia de los hematíes en el análisis. A pesar de ser la metodología citométrica más usada, las células se encuentran fijadas en el momento del paso de muestra, lo que excluye la posibilidad de un análisis funcional dinámico en tiempo real (28).

El desarrollo de métodos citométricos basados en el análisis de muestras de sangre entera sin apenas manipulación, ha hecho posible el estudio *ex vivo* de parámetros funcionales en leucocitos y plaquetas que eran poco susceptibles de ser abordados con las técnicas anteriores, que requerían un procesado extensivo de la muestra (lisis de eritrocitos y/o centrifugaciones sucesivas), con un alto grado de activación artefactual de aquellas células. Las Figuras 2 y 3 muestran ejemplos de la aplicación en nuestro laboratorio del análisis citométrico *ex vivo* para cuantificar la actividad oxidativa intracelular en leucocitos de sangre periférica (29) y a la detección de plaquetas activadas circulantes en el contexto de la evaluación de efectos del tratamiento de pacientes humanos con distintos fármacos (11, 17, 30), y del análisis de la estabilidad de preparados de plaquetas (11, 31). Los estudios ejemplificados se basan en el uso de reducidos volúmenes de sangre entera y la identificación de la población de interés (leucocitos o plaquetas) mediante el marcaje específico con anticuerpos monoclonales fluorescentes y las propiedades de dispersión de luz. De esta forma se evita la etapa química de lisis de eritrocitos, que siguen presentes en la muestra pero son excluidos del análisis por la selección fenotípica y morfológica indicada. El estado oxidativo de los leucocitos se evalúa con sustratos fluorogénicos que se convierten en fluorescentes por la acción de especies reactivas de oxígeno (32), mientras que el grado de activación plaquetaria se cuantifica por la expresión en superficie de la molécula de adhesión P-Selectina (CD62-P), una proteína acumulada en los gránulos α de la plaqueta en reposo y exportada a la membrana plasmática tras la estimulación de la plaqueta por agonistas pro-trombóticos (33). Estudios similares se pueden dirigir a la detección *ex vivo* de fenómenos tóxicos, farmacológicos o fisiopatológicos inducidos *in vivo*.

Un aspecto importante, aunque poco explotado por su mayor complejidad metodológica, de la citometría de flujo *ex vivo* en relación con la investigación animal es el estudio funcional en orgánulos subcelulares aislados a partir de te-

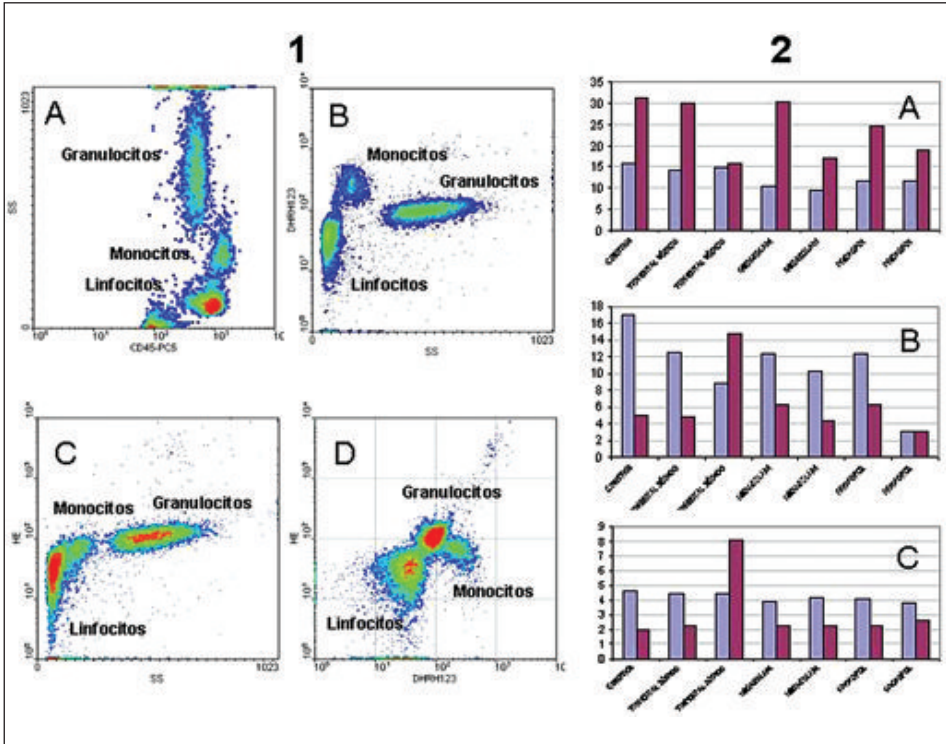


FIGURA 2. Ejemplo del análisis *ex vivo* por citometría de flujo de actividad oxidativa en leucocitos y su aplicación *in vitro*. Panel 1: (A) Estrategia citométrica para la identificación de las poblaciones leucocitarias en sangre entera, determinando la expresión del antígeno pan-leucocitario CD45 (eje X) y la granularidad celular (eje Y). (B) Determinación de la actividad peroxidativa basal intracelular con dihidrorhodamina 123: nótese la mayor actividad en los monocitos. (C) Determinación de la generación basal intracelular de ión radical superóxido con dihidroetidina: nótese la mayor actividad en los granulocitos. (D) Determinación simultánea de la actividad peroxidativa y la generación intracelular de ión radical superóxido en leucocitos. Panel 2: Detección de la actividad peroxidativa intracelular en leucocitos de pacientes quirúrgicos incubados *in vitro* con diferentes anestésicos. (A) linfocitos, (B) monocitos y (C) granulocitos.

jididos de animales de laboratorio bajo diversas condiciones experimentales. Nuestro laboratorio ha sido pionero en el análisis citométrico de la función mitocondrial en mitocondrias aisladas de hígado de rata en condiciones de control (7, 34), en dieta hiperproteica (35) o tras envejecimiento (36). En otro contexto, hemos desarrollado la metodología citométrica para determinar patrones de glicosilación diferencial en vesículas *cis* y *trans* aisladas del aparato de Golgi de ratas normales (8) e intoxicadas crónicamente con etanol (37).

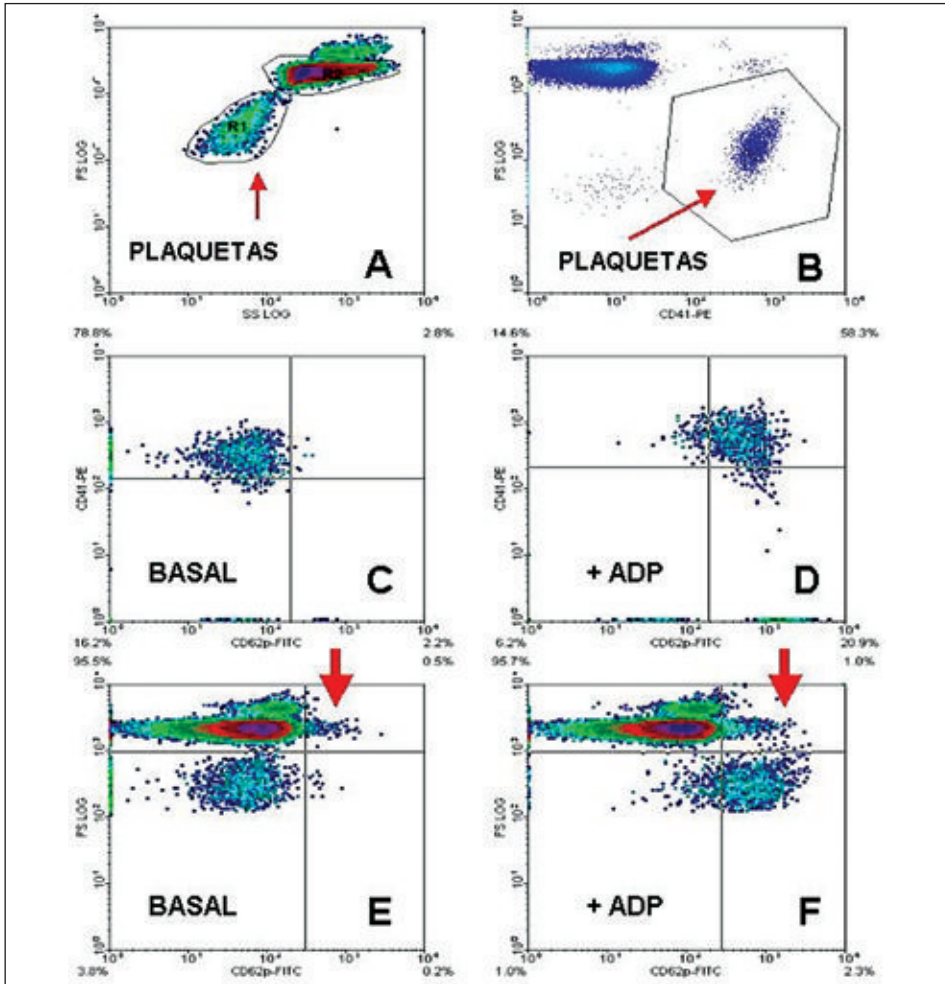


FIGURA 3. Ejemplo del análisis ex vivo por citometría de flujo de la activación de plaquetas y su aplicación in vitro. (A) Identificación citométrica de la población de plaquetas en sangre entera por parámetros morfológicos (granularidad: eje X y tamaño: eje Y). (B) Confirmación de la especificidad de la selección de plaquetas mediante la expresión del antígeno específico de plaquetas CD41 (glicoproteína gpIIb/IIIa). La población señalada corresponde a las plaquetas individuales, no agregadas. (C) Detección ex vivo de plaquetas activadas circulantes en un donante sano mediante el doble marcaje con CD41 (identificación plaquetaria) y CD62P (marcador de activación, P-Selectina): en condiciones basales no hay apenas plaquetas activadas, positivas para CD62P (derecha del cursor). El control de reactividad in vitro muestra que tras la adición del agonista ADP, la práctica totalidad de la población plaquetaria se activa y expresa CD62P con gran intensidad. (E) Detección ex vivo de plaquetas activadas circulantes en un donante con riesgo protrombótico mediante el marcaje con CD62P y morfología: en condiciones basales se detectan plaquetas individuales activadas, positivas para CD62P (derecha del cursor) y una subpoblación que está en interacción con eritrocitos y leucocitos (cuadrante superior derecho), indicadora de riesgo. El control de reactividad in vitro muestra que tras la adición del agonista ADP, la práctica totalidad de la población plaquetaria se activa y expresa CD62P, aumentando apreciablemente la población de plaquetas en interacción con otras células de la sangre.

3. In vitro

La caracterización funcional de preparaciones celulares en experimentos *in vitro* es el campo de aplicación más frecuente de la citometría de flujo en la investigación básica y biotecnológica. El elevado número de parámetros que se pueden determinar simultáneamente en cada célula individual, la capacidad de detección de subpoblaciones minoritarias de interés y la posibilidad de aplicar la separación celular para extender con otras técnicas “-ómicas” el análisis citométrico son los principales puntos positivos que hacen de la citometría de flujo una tecnología de elección en las innumerables vertientes de la Biología Celular, como ha sido expuesto en los capítulos anteriores de este libro y en diferentes revisiones generales (1-3, 23, 38, 39, 40).

Nuestro laboratorio tiene experiencia en la aplicación de la citometría de flujo a la caracterización funcional multiparamétrica en modelos *in vitro* de células eucarióticas y procarióticas, fundamentalmente en el contexto de la Toxicología Bioquímica *in vitro* (19).

La investigación experimental en modelos eucarióticos *in vitro* se ha extendido en nuestro laboratorio desde el inicial estudio de la neurotoxicidad del amonio (41) al de la hepatotoxicidad (42), la nefrotoxicidad (10) y la toxicidad metabólica (43) de diferentes compuestos modelo. Los dos últimos aspectos han sido el objeto de un proyecto de investigación patrocinado por el European Center for the Validation of Alternative Methods (44) y para ello, hemos desarrollado un panel de ensayos citométricos de toxicidad que se han aplicado al estudio de nefrotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares de túbulos renales proximales o distales y de toxicidad dependiente del metabolismo *in vitro* en una línea celular que expresa de forma estable el citocromo P450 2D6 y su control de tipo salvaje. La experiencia alcanzada en este proyecto, a su vez, es la base metodológica para la participación de nuestro laboratorio aplicando la citometría de flujo en dos proyectos europeos del VI Programa Marco relacionados con modelos *in vitro* para la predicción de toxicidad aguda (45) y crónica (46) *in vivo* en humanos.

Otro aspecto importante de la aplicación de la citometría de flujo y la separación celular es la caracterización de las propiedades citométricas de cultivos celulares para definir parámetros de interés para la purificación de subpoblaciones de interés y el seguimiento de sus características en los posteriores procesos de clonación y mantenimiento en cultivo (9).

La citometría de flujo puede aplicarse con éxito al análisis *in vitro* de células procarióticas y microorganismos en general (47, 48). Este tipo de aplica-

ciones puede tener gran interés en el campo de la Biotecnología, al permitir el seguimiento de las funciones microbianas durante procesos de fermentación y detectar contaminaciones o alteraciones de la productividad (49). Desde el punto de vista clínico, la citometría de flujo *in vitro* permite, por ejemplo, establecer en pocos minutos el Gram y la sensibilidad frente a antibióticos de microorganismos patógenos (50)

En nuestro laboratorio hemos iniciado y seguimos desde hace varios años una línea de investigación basada en el análisis citométrico *in vitro* del estrés oxidativo en *Escherichia coli*. Para ello, hemos debido superar inicialmente el problema de la impermeabilidad de la membrana externa de los bacilos Gram negativos, un obstáculo para el uso de fluorocromos vitales (51). Las cepas de *E. coli* B que presentan deficiencias intrínsecas en la estructura del lipopolisacárido de la membrana externa (cepas WP2) han sido utilizadas como cepas «tester» en estudios de mutagénesis (52) por su mayor permeabilidad a diversas sustancias de bajo y medio peso molecular, cuyas estructuras y propiedades químicas resultan similares a las de muchos fluorocromos comunes, por lo que aparecían como candidatas para su posible uso en citometría de flujo funcional. Nuestro grupo ha demostrado que las cepas WP2 de *E. coli* B pueden ser analizadas funcionalmente mediante citometría de flujo usando los fluorocromos vitales habituales (51) y ha publicado procedimientos normalizados para ello (53).

Sobre la base genética de *E. coli* B se han generado diversas cepas deficientes en uno o varios genes esenciales en las rutas de la respuesta antioxidante en *E. coli*, como el regulón *oxyR* y otros genes estrechamente relacionados. El análisis citométrico de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS), de óxido nítrico y de glutatión (GSH) muestra que estas cepas deficientes presentan niveles endógenos más elevados de ROS y son más sensibles a los efectos del estrés oxidativo exógeno (51, 53, 54). A partir de estas observaciones hemos diseñado un modelo experimental sencillo que se puede aplicar no sólo al estudio básico de los mecanismos de toxicidad y protección antioxidante en *E. coli*, sino también para detectar y cuantificar de forma sencilla y sensible los efectos prooxidantes de diferentes sustancias químicas (55) y la potencia antioxidante de otras moléculas de interés (56) (Figura 4).

4. In fluxo

Como se ha indicado anteriormente, desde aquí proponemos por primera vez el término *in fluxo* para el análisis cinético propio de la citometría de flu-

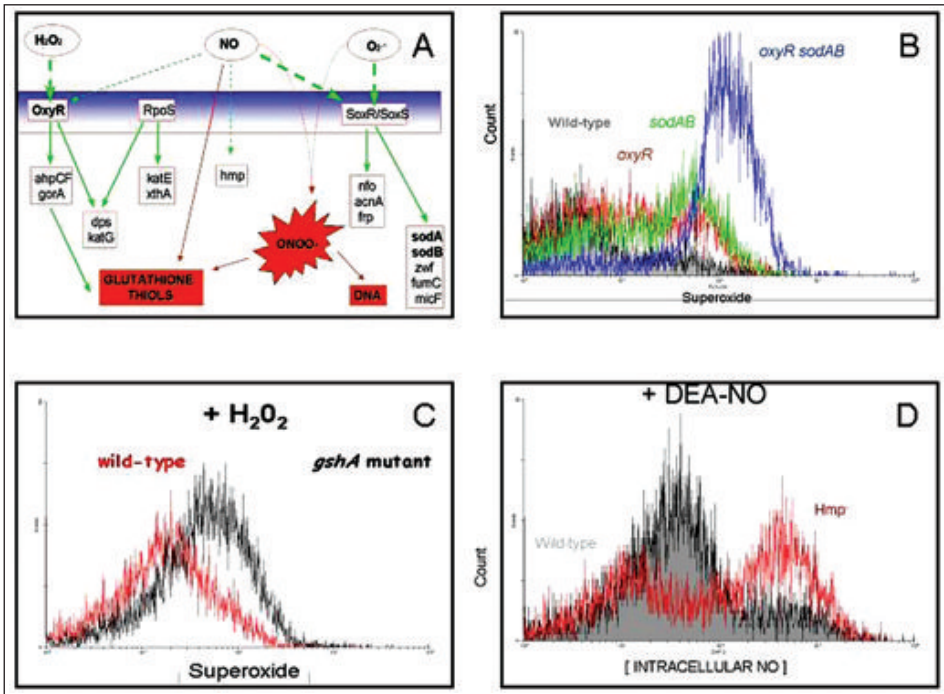


FIGURA 4. Análisis *in vitro* del estrés oxidativo por citometría de flujo utilizando cepas de *Escherichia coli* deficientes en genes de la defensa antioxidante. (A) Esquema de los principales genes implicados en la detección y respuesta frente a especies reactivas de oxígeno y del óxido nítrico. Genes como *oxyR* y *soxR/soxS* son regulones que controlan otros genes individuales. En nuestro laboratorio disponemos de mutantes deficientes en uno o varios de estos genes, que se muestran más sensibles a agentes prooxidantes, como a generadores de superóxido (B y C) o de óxido nítrico (D). Los dobles mutantes *oxyR/sodAB*, por ejemplo, son notablemente más sensibles que los mutantes simples y éstos que la cepa salvaje (B). Los mutantes deficientes en la síntesis del tripéptido antioxidante glutatión (mutantes *gshA*-), son más sensibles que la cepa salvaje a la acción de un dador de superóxido (C). Los mutantes deficientes en la defensa contra óxido nítrico (mutantes *hmp*-) son más sensibles frente a un compuesto generador de este oxidante (D).

jo. Mediante ejemplos de nuestro laboratorio se puede percibir las características de este tipo de aproximación metodológica y su aplicabilidad a los estudios funcionales propios de la Bioquímica y la Biología Celular.

Un ensayo *in fluxo* del primer tipo indicado más arriba, es decir, el que sigue cinéticamente la velocidad de captación de un fluorocromo en función de una modificación dada de las propiedades celulares es el que nos ha permitido transformar una cinética de captación de un fluorocromo en una cinética de Michaelis-Menten para una rama metabólica general y, sobre esta base, comparar cuantitativamente las características de la utilización de sustratos

energéticos en hepatocitos de rata normales y transformados (14, 15). En estudios previos por citometría de flujo, habíamos demostrado la correlación entre la captación del fluorocromo catiónico rodamina 123 (RH123) y el valor del potencial de membrana en mitocondrias aisladas (34). A partir de nuestros datos, y utilizando suspensiones de hepatocitos y hepatoma de rata demostramos que la velocidad de captación del fluorocromo RH123 en células enteras variaba en función del potencial de membrana mitocondrial, modificado por distintos sustratos respiratorios o inhibidores de la cadena de transporte electrónico (14). El análisis de la cinética de saturación de la velocidad de captación de RH123 en función de la concentración de glucosa o succinato nos permitió demostrar que dicho parámetro seguía una cinética de Michaelis-Menten, por lo que pudimos determinar sus valores de K_m y V_{max} (15). Con ello, se consigue caracterizar con indicadores perfectamente establecidos en la Bioquímica convencional, un conjunto secuencial de fenómenos que comprenden el transporte del sustrato, su metabolismo intermediario (glucolisis, en el caso de la glucosa), la entrada de sustratos en el ciclo de Krebs, la oxidación de compuestos reducidos en la cadena respiratoria y la formación de potencial de membrana mitocondrial, de acuerdo con la hipótesis quimio-osmótica de Mitchell (Figura 5). Aunque se trata de un proceso complejo, el uso de inhibidores adecuados nos permitió, por ejemplo en el caso de la glucosa, discernir la contribución del transporte de glucosa exógena de la contribución de la glucolisis, así como demostrar que hepatocitos y hepatoma no diferían en cuanto a la velocidad y capacidad de utilización energética de glucosa, pero que las células de hepatoma utilizaban con mayor afinidad y capacidad el succinato que los hepatocitos no transformados (Tabla I). Este modelo experimental, podría ser de utilidad para un estudio de cribado rápido de posibles efectos sobre el metabolismo bioenergético.

Un ensayo citométrico *in fluxo* del segundo tipo es aquél, más habitual, que transcurre mediante el seguimiento cinético de las propiedades biológicas de células previamente teñidas con uno o varios colorantes fluorescentes o sustratos fluorogénicos y sometidas a un estímulo apropiado. Como ejemplo ilustrativo de nuestro laboratorio, se muestra los resultados de un estudio destinado a detectar la presencia y actividad del transportador intercambiador de Na^+/H^+ (NHE) en la membrana de las distintas células leucocitarias en muestras de sangre entera. Recientemente, hemos descrito un método *in fluxo* para el estudio de la actividad NHE e cultivos celulares homogéneos (57). Nuestro grupo está interesado en el desarrollo de métodos citométricos para estudiar la actividad de este receptor y su inhibición en muestras clínicas, por su implicación en fenómenos de isquemia/reperfusión y otras situaciones patológicas (58).

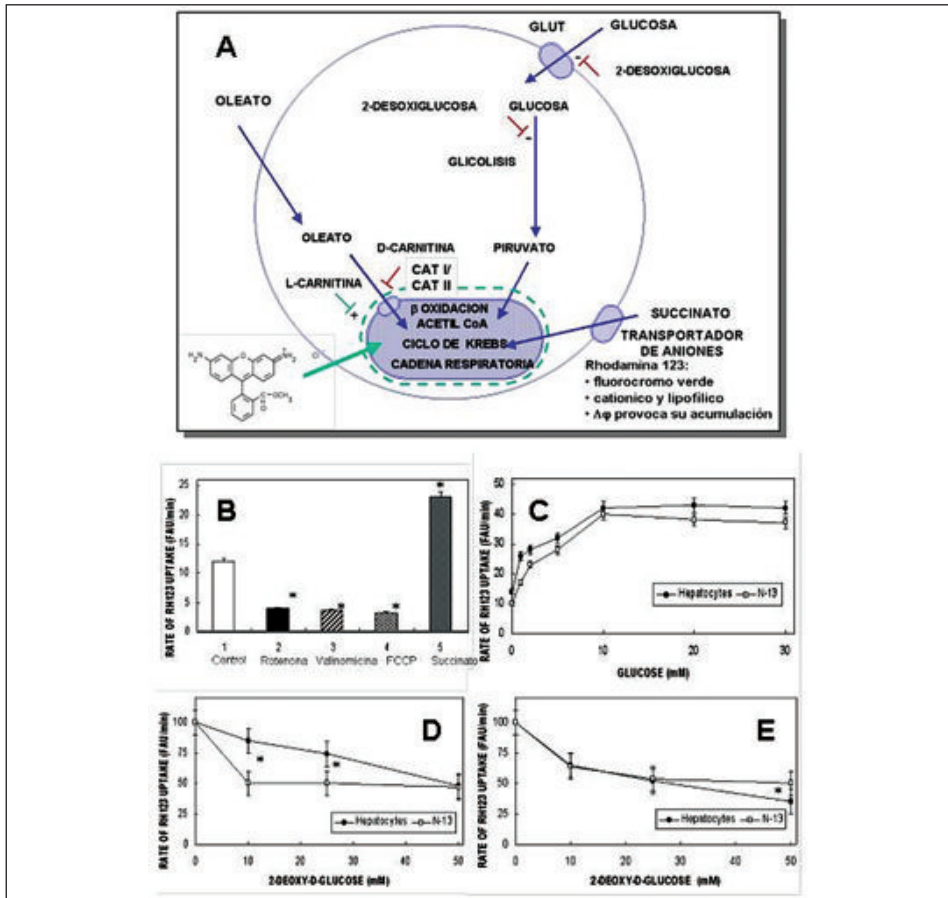


FIGURA 5. Análisis *in fluxo* de la velocidad de captación de Rhodamina 123 (RH123) en hepatocitos y células de hepatoma de rata para evaluar la respuesta del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) como indicador del metabolismo oxidativo de sustratos. (A) Esquema del diseño experimental: las células son incubadas con sustratos (glucosa, oleato o succinato) cuyo metabolismo oxidativo acaba generando $\Delta\psi$, el cual se estima a través de la velocidad de captación del fluorocromo lipofílico catiónico RH123. La preincubación con el análogo competitivo 2-desoxi-D-glucosa inhibe el transporte de glucosa exógena y/o la glucolisis. La preincubación con L-carnitina potencia el transporte intramitocondrial de acil CoA. (B) Efecto sobre la velocidad de captación de RH123 de sustratos que modifican ($\Delta\psi$): inhibidores como rotenona, valinomicina o FCCP reducen la velocidad de captación, mientras que sustratos respiratorios como el succinato, la aceleran. (C) Cinética de saturación (Michaelis-Menten) de la velocidad de captación de RH123 con respecto a la concentración de glucosa. La transformación lineal de esta gráfica permite obtener los parámetros K_m y V_{max} indicados en la Tabla I. (D) Efecto de la inhibición del transporte de glucosa exógena con 2-desoxi-D-glucosa sobre la velocidad de captación de Rh123. Las células de hepatoma N13 son más sensibles a la misma. (E) Efecto de la inhibición de la glucolisis a partir de glucosa endógena con 2-desoxi-D-glucosa sobre la velocidad de captación de RM123. Ambas poblaciones celulares presentan un comportamiento similar.

TABLA I

La cinética de captación de Rhodamina 123 analizada por citometría de flujo en hepatocitos y hepatoma de rata (N13) es un proceso que puede ser caracterizado con los parámetros cinéticos de la Enzimología Clásica

S U S T R A T O				
	Glucosa		Succinato	
Células	Km (mmol/L)	Vmax (UAF/seg)	Km (mmol/L)	Vmax (UAF/seg)
Hepatocitos	2.63	28.82	3.30	13.44
N13	3.50	30.73	0.33	26.10

Las suspensiones celulares fueron incubadas con diferentes concentraciones crecientes de glucosa o succinato y se calculó la velocidad constante de captación de rhodamina 123 en experimentos cinéticos por citometría de flujo, como se describe en las referencias 14 y 15.

El estudio en sangre completa plantea tres problemas metodológicos:

a) Interferencia de los eritrocitos e identificación de leucocitos: La elevada proporción de eritrocitos en las muestras a analizar dificulta la detección de los linfocitos por medidas puramente morfológicas. La eliminación bioquímica de los eritrocitos (lisis ácida, amónica o hipotónica) puede interferir con la fisiología leucocitaria. Para solucionar ambos aspectos, se procede a la selección de leucocitos basada en el marcaje selectivo con el anticuerpo CD45-PC5 y el análisis morfológico para distinguir las subpoblaciones de linfocitos, monocitos y granulocitos. El citómetro descarta para el análisis el resto de elementos formes de la sangre.

b) Medida del pH intracelular (pHi): Mediante los fluorocromos BCECF o SNARF, cuyas formas protonadas y desprotonadas presentan diferentes emisiones de fluorescencia. Con estos fluorocromos, se utilizan medidas de cocientes de fluorescencia, que tienen la ventaja de ser mucho más homogéneas, sensibles e independientes de la concentración intracelular de fluorocromo. El pHi se calibra a través de la incubación en presencia de un ionóforo de protones (nigericina) de las células teñidas con BCECF o SNARF, que se equilibran en medios de pH extracelular (pHe) definido

c) Inducción de la actividad NHE: El intercambiador NHE sólo se pone en marcha cuando se produce una acidificación intracelular, para compensarla mediante una expulsión de H⁺ en intercambio por iones Na⁺ que son importados desde el medio extracelular (57). Para acidificar el citosol sin modi-

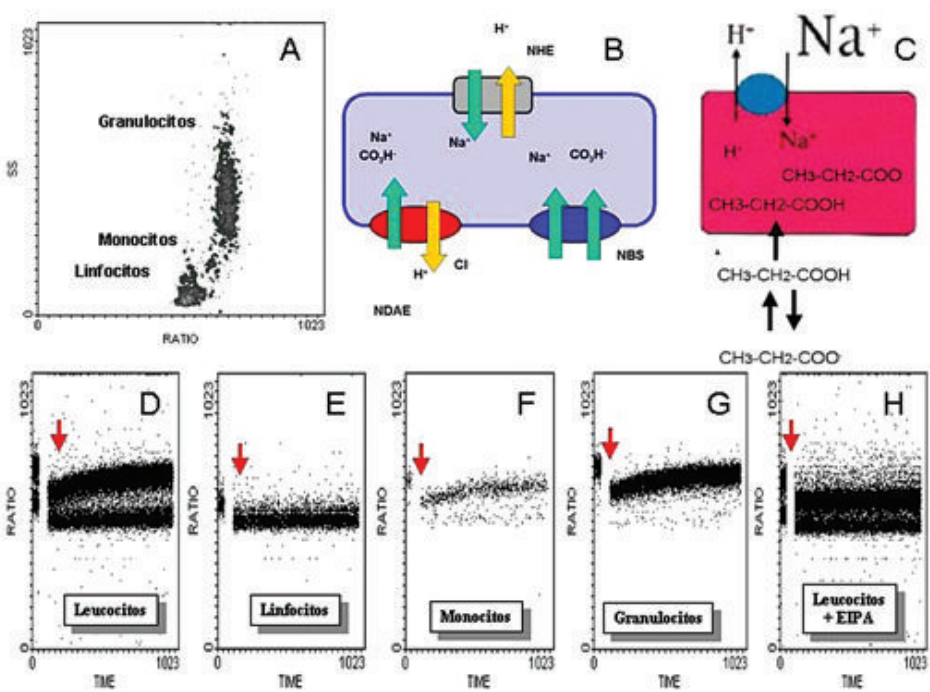


FIGURA 6. *Análisis in fluxo de la actividad del intercambiador Na^+/H^+ en leucocitos de sangre periférica.* Los leucocitos de sangre entera se identifican previamente con el anticuerpo CD45-PC5, como se ha mostrado previamente. El pH intracelular (pHi) se determina con el fluorocromo BCECF-AM cuyo cociente entre las emisiones verde/naranja (RATIO) es directamente proporcional al pHi. (A) La correlación entre RATIO y granularidad permite establecer el pHi basal en los leucocitos, mostrando que los granulocitos son los más alcalinos y los linfocitos los más ácidos. (B) Los sistemas que permiten regular pHi en condiciones de acidificación del citosol son el simportador $\text{Na}^+/\text{CO}_3\text{H}^-$ (NBE), el intercambiador Na^+/H^+ dependiente de Cl^- y CO_3H^- (NDAE) y el intercambiador de Na^+/H^+ (NHE). En el experimento ejemplificado, NBE y NDAE son inhibidos por la presencia de HEPES y la ausencia de CO_3H^- en el medio, por lo que la regulación de pHi en la acidificación in vitro es exclusivamente por NHE. (C) La acidificación intracelular se consigue a pH neutro del medio mediante un pulso con propionato sódico, que en forma no iónica (propiónico) penetra en la célula y libera un H^+ que acidifica el citosol y pone en marcha NHE. (D-G) El ensayo in fluxo permite distinguir la respuesta de acidificación consiguiente al pulso con propionato (flecha) y la cinética de recuperación, separando en la cinética compleja de los leucocitos totales (D), la contribución de linfocitos (E), monocitos (F) y granulocitos (G). Un control negativo con el inhibidor específico de NHE, etil-isopropil-amiloride (EIPA) demuestra que la cinética de recuperación de pHi es dependiente de NHE.

ficar el pHe, utilizamos la técnica del pulso con propionato sódico a pH neutro. En el medio, una fracción del propionato se protona para dar ácido propiónico, que atraviesa fácilmente la membrana plasmática y penetra en la célula donde, a su vez, se ioniza y libera un protón. De esta forma, se acidifica

el medio intracelular, mientras se mantiene neutro el pHe. La acidificación dispara la operación de NHE y el pHi, que había descendido rápida y significativamente por efecto del ácido propiónico intracelular, comienza a recuperarse (Fig. 4). El ensayo *in fluxo* diseñado por nosotros (57) permite determinar la actividad de NHE a través de la cinética de recuperación del pHi basal, así como detectar fenómenos de inhibición farmacológica de dicha actividad. Su aplicación al estudio de la actividad NHE en leucocitos de sangre entera se resume en la Figura 6. El ejemplo elegido, además de ilustrar la aplicación específica indicada, muestra claramente el elevado contenido de la información que puede generar el análisis por citometría de flujo multiparamétrica a partir de un solo tubo de muestra. La capacidad de diseñar estrategias analíticas complejas, como la que se presenta, es una de las razones por las que esta tecnología ha alcanzado un gran predicamento dentro del conjunto de las metodologías «-ómicas».

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el patrocinio del VI Programa Marco de la Comunidad Europea (Proyecto Integrado «A-Cute-Tox», LSHB-CT-2004-512051; Proyecto STREP «Predictomics», LSHB-CT-2004-504761) y de la Generalitat Valenciana (proyecto GV04B-143).

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. Shapiro, H.M. (2002) *Practical Flow Cytometry*, 4.^a Ed.. Wiley-Liss.
3. O'Connor, J.E., Herrera, G. y 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.
4. 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.
5. Herrera, B., Alvarez, A.M., Sanchez, A., Fernandez, M., Roncero, C., Benito, M., Fabregat, I. (2001) Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-de-

- pendent apoptosis induced by transforming growth factor β in fetal hepatocytes. *FASEB J.* 15:741-751.
6. Mathura, A., Honga, Y., Alvarez-Barrientos, A., Erusalimsky, J.D. (2000) Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* 46:126-138.
 7. O'Connor, J.E., Vargas, J.L., Kimler, B.F., Hernández-Yago, J., Grisolia, S. (1988) Use of rhodamine-123 to investigate alterations in mitochondrial activity in isolated mouse liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151: 568-573.
 8. Guasch, R., Guerri, C., O'Connor, J.E. (1993) Flow cytometric analysis of Concanavalin A binding to isolated Golgi fractions from rat liver. *Exp. Cell Res.* 207: 136-141.
 9. 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.
 10. 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.
 11. Monteiro, M.C., Sansonetty, F., Gonçalves, M.J., O'Connor, J.E. (2000) Multiparametric analysis of early events in platelet activation. *Cytometry Suppl.*10: 140a.
 12. Xia, G., Kovichich, M., Truitt, R.L., Johnson, B.D. (2004) Tracking *ex vivo*-expanded CD4+CD25+ and CD8+CD25+ regulatory T cells after infusion to prevent donor lymphocyte infusion-induced lethal acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 10:748-760.
 13. Leung, Y.F., Pang, C.P. (2002) EYE on bioinformatics: dissecting complex disease traits *in silico*. *Appl Bioinformatics* 1:69-80.
 14. Juan, G., Cavazzoni, M., Sáez, G.T., O'Connor, J.E. (1994) A fast kinetic method for assessing mitochondrial membrane potential in isolated hepatocytes with Rhodamine 123 and flow cytometry. *Cytometry* 15: 335-342.
 15. Juan, G., Callaghan, R.C., Gil-Benso, R., O'Connor, J.E. (1996) Oxidative metabolism in rat hepatoma and isolated hepatocytes: A comparative flow cytometric study. *Hepatology* 24: 385-390.
 16. 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.
 17. Monteiro, M.C., Gonçalves, M.J., Sansonetty, F., Martínez, M., O'Connor, J.E. (2003) Aplicación de la citometría de flujo funcional a la monitorización del tra-

- tamiento antiplaquetario: Movilización de Ca²⁺ y expresión de P-selectina en sujetos tratados con ticlopidina. *Rev. Diag. Biol.* 52: 23-31.
18. Hudnall, S.D. (Editor) (2000) *Introduction to Diagnostic Flow Cytometry : An Integrated Case-Based Approach (Pathology and Laboratory Medicine)*. Humana Press.
 19. Centro de Citometría y Citómica de la Universidad de Valencia: www.uv.es/cytomics
 20. Unidad de Citometría del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares: www.cnic.es/citometria
 21. Purdue University Cytometry Laboratories: www.cyto.purdue.edu
 22. Molecular Probes: www.probes.com
 23. 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.
 24. FACS Core Facility, The Scripps Research Institute: <http://facs.scripps.edu/facsindex.html>
 25. Iwashita, S., Yanagi, K., Ohshima, N., Suzuki, M. (2001) Insulin increases blood flow rate in the microvasculature of cremaster muscle of the anesthetized rats. *In Vivo* 15:11-15.
 26. Jain, R.K., Munn, L.L., Fukumura, D. (2002) Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. *Nat. Rev. Cancer* 2:266-276.
 27. Legendre, L., Courties, C., Troussellier, M. (2001) Flow cytometry in oceanography 1989-1999: environmental challenges and research trends. *Cytometry*. 44:164-172.
 28. Stewart, C.M., Nicholson, J. K.A. (2000) *Immunophenotyping*. Wiley-Liss, New York.
 29. Escudero, M., León, P., Palanca, J.M., O'Connor, J.E. (2001) Flow cytometric analysis of oxidative and nitrosidative stress in whole blood leukocytes using CD45-PC5 and fluorescent probes. VII Congreso da Sociedade Ibérica de Citometria, Coimbra (Portugal).
 30. García-Martínez, C., Labiós, M., Hermenegildo, C., Tarín, J.J., O'Connor, J.E., Cano, A. (2004) The effect of hormone replacement therapy on Ca²⁺ mobilization and P-selectin (CD62P) expression in platelets examined under flow cytometry. *Blood Coag. Fibrin*. 15: 1-8.
 31. Rodrigues-Monteiro, M.C. (2000) *Marcadores bioquímicos de la activación plaquetaria: Análisis multiparamétrico por citometría de flujo*. Tesis Doctoral, Facultad de Biológicas de la Universidad de Valencia.

32. Halliwell, B., Whiteman, M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142:231-255.
33. Monteiro, M.C., O'Connor, J.E., Martínez, M. (2002) La citometría de flujo en el análisis de las plaquetas (II) Aplicaciones en el análisis funcional. *Rev Diag. Biol.* 51: 87-99.
34. Petit, P.X., O'Connor, J.E., Grünwald, D., Brown, S.C. (1990) Analysis of the membrane potential of rat- and mouse-liver mitochondria by flow cytometry and possible applications. *Eur. J. Biochem.* 194: 389-397.
35. O'Connor, J.E., Kimler, B.F., Vargas, J.L. (1988) Flow cytometric analysis of the effects of high-protein diet on isolated rat liver mitochondria. *Cell Tissue Kinet.* 21: 331-338.
36. Sastre, J., Millán, A., García de la Asunción, J., Plá, R., Juan, G., Pallardó, F.V., O'Connor, J.E., Martín, J.A., Droy-Lefaux, M.T., Viña, J. (1998) A Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 24: 298-304.
37. Guasch, R.M., Guerri, C., O'Connor, J.E. (1995) Study of surface carbohydrates on isolated Golgi subfractions by fluorescent-lectin binding and flow cytometry. *Cytometry* 19: 112-118.
38. Alvarez, A.M., Callaghan R.C., O'Connor, J.E. (1997) Análisis del Estrés Oxidativo por Citometría de Flujo. En: *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo* (Cascales, M., Ed.). Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid, pp. 337-364.
39. O'Connor, J.E. (1993) Diagnostic applications of flow cytometry in clinical research. *Lettere GIC* 2: 13-24.
40. Sansonetty, F., O'Connor, J.E. (1998) Breve introdução á Citometria de Fluxo- Uma das alternativas para "fazer" Citologia e Citopatologia. *Análítica. Micron* 1: 14-20.
41. Renau-Piqueras, J., O'Connor, J.E., Báguena-Cervellera, R., Grisolí, S. (1986) Ammonium-chloride induced alterations in growth kinetics and ultrastructure of murine neuroblastoma cells. A flow cytometric and stereological study. *Virchows Arch. Cell Pathol.* 50: 271-283.
42. Gómez-Lechón, M.J., Ponsoda, X., O'Connor, J.E., Donato, T., Castell, J.V., Jover, R. (2003) Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Biochem. Pharmacol* 66: 2155-2167.
43. Martínez-Romero, A., Alvarez-Barrientos, A., Callaghan, R.C., Coecke, S., Arza, E., Nieto, R., Prieto, P., Torralbo, P., O'Connor, J.E. (2004) Role of CYP2D6-dependent metabolism in the cytotoxicity of mianserin and imipramin. *Cytometry* 59 A: 48.
44. 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, The European Commission (15348-1999-10FIED ISP ES).
45. A-Cute-Tox: Optimization and pre-validation of an *in vitro* test strategy for predicting acute human toxicity. Integrated Project. VI Frame Program, The European Commission (LSHB-CT-2004-512051).
 46. Predictomics: Short-term *in vitro* assays for long-term toxicity. Specific Targeted Research Project. VI Frame Program, The European Commission (LSHB-CT-2004-504761).
 47. Shapiro, H.M., Nebe-von-Caron, G. (2004) Multiparameter flow cytometry of bacteria. *Methods Mol. Biol.* 263:33-44.
 48. Álvarez-Barrientos, A., Arroyo, J., Cantón, R., Nombela C., Sánchez-Pérez, M., (2000) Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 13:167-195.
 49. Hewitt, C.J., Nebe-Von-Caron, G. (2004) The application of multi-parameter flow cytometry to monitor individual microbial cell physiological state. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 89:197-223.
 50. Mason, D.J., Shanmuganathan, S., Mortimer, F.C., Gant, V.A. (1998) A fluorescent Gram stain for flow cytometry and epifluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2681-2685.
 51. Herrera, G., Martínez, A., Blanco, M., O'Connor, J.E. (2002) Assessment of *Escherichia coli* B with enhanced permeability to fluorochromes for flow cytometric assays of bacterial cell function. *Cytometry* 49: 62-69.
 52. Blanco, M., Martinez, A., Urios, A., Herrera, G., O'Connor, J.E. (1998) Detection of oxidative mutagenesis by isoniazid and other hydrazine derivatives in *Escherichia coli* WP2 tester strain IC203, deficient in OxyR: strong protective effects of rat liver S9. *Mutat. Res.* 417:39-46.
 53. Herrera, G., Martínez, A., Blanco, M., O'Connor, J.E. (2003) Functional assays of oxidative stress using genetically engineered *Escherichia coli* strains. *Current Protocols in Cytometry*. 11.16.1-11.16.9
 54. Martínez, A., Herrera, G., Blanco, M., O'Connor, J.E. (2003) Bacterial cytomics (BCM) as an alternative method *in vitro* for screening xenobiotic metabolism and toxicity. VIII Congreso de la Sociedad Ibérica de Citometría, Madrid.
 55. Herrera, G., Blanco, M., O'Connor, J.E. (1999) Análisis por citometría de flujo de indicadores de estrés oxidativo en mutantes *oxyR* de *Escherichia coli*. En: *Evaluación Mutagénica y Genotóxica*. (E. de la Peña, Ed.), Ministerio de Educación y Cultura, Madrid, pp. 45-53.

56. Herrera, G., Blanco, M., Martínez, A., O'Connor, J.E. (1999) Flow cytometric analysis of prooxidants and antioxidants in single bacteria using modified *E. coli* strains as oxidative stress testers. *Eur. J. Histochem.* 43:26.
57. Dolz, M., O'Connor, J.E., Lequerica, J.L. (2004) Flow cytometric kinetic assay of the activity of Na⁺/H⁺ antiporter in mammalian cells. *Cytometry* 61A: 99-104.
58. Linz, W.J., Busch, A.E. (2003) NHE-1 inhibition: from protection during acute ischaemia/reperfusion to prevention/reversal of myocardial remodelling. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 368:239-246.