



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO

030E BIOQUÍMICA CLINICOMÉDICA E INMUNOLOGÍA

**DEVELOPMENT OF AN OXIDATIVE CYTOMIC PANEL OF HIGH-
CONTENT MINIATURIZED ASSAYS FOR DETECTION OF *IN VITRO*
CYTOTOXICITY AND PREDICTION OF ACUTE TOXICITY OF DRUGS AND
XENOBIOTICS**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

ÂNGELA SOFIA CARVALHO GOMES

DIRIGIDA POR:

DR. JOSÉ ENRIQUE O'CONNOR BLASCO

VALENCIA, 2015

VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO

030E BIOQUÍMICA CLINICOMÉDICA E INMUNOLOGÍA

**DEVELOPMENT OF AN OXIDATIVE CYTOMIC PANEL OF HIGH-
CONTENT MINIATURIZED ASSAYS FOR DETECTION OF *IN*
VITROCYTOTOXICITY AND PREDICTION OF ACUTE TOXICITY OF
DRUGS AND XENOBIOTICS**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

ÂNGELA SOFIA CARVALHO GOMES

VALENCIA, OCTUBRE 2015

VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA

José Enrique O'Connor Blasco, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia,

INFORMA:

Que D. Ângela Sofia Carvalho Gomes, Licenciada en Biología por la Universidad de Aveiro, Portugal, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo de investigación, presentado para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

En Valencia, a 28 de Octubre de 2015

Fdo.: José Enrique O'Connor Blasco

El presente trabajo ha sido subvencionado con ayudas de la Comisión Europea, en el Marco del Programa VI (LSHB-CT-2004-512051) y con una beca predoctoral de la *Fundação para a Ciência e a Tecnologia* (SFRH/BD/38323/2007, Portugal).



AGRADECIMIENTOS

Diversas personas han contribuido de diferentes formas para que yo pudiera estar escribiendo ahora estas páginas.

En primer lugar quiero agradecer al Profesor José Enrique O'Connor por recibirme en su laboratorio, sus consejos científicos y permitir que realice la tesis con su apoyo.

Quiero agradecer también a todos mis compañeros de trabajo del Laboratorio de Citómica por su ayuda y enseñanza a lo largo de estos años. Quiero destacar el apoyo, ayuda y amistad de Laura, Sandra, Marta, Sole y Paco.

Y a todos los compañeros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y a Mercedes y Carmina, que me han apoyado y ayudado en el desarrollo de este trabajo.

A nivel personal me gustaría dar las gracias a :

Todos os meus amigos Valencianos, Aveirenses e "pxitos". En especial a Laura: "Sabes que sin ti no lo hubiera podido hacer. Gracias por todo lo que me has ayudado, por tu energía y alegría, por ser la única persona capaz de hacerme reír en determinados momentos y darme fuerza para seguir, y seguir..."

Minha família, sem a qual não seria possível ter chegado até aqui, em especial à minha mãe: "Devo-te isto principalmente a ti mãe. MUITO OBRIGADA!"

Y a Nacho: "Sin ti no sé que hubiera hecho, no puedo poner en palabras cuanto te agradezco todo lo que has ayudado y aguantado estos años. Muchas gracias por creer en mí y darme fuerza día tras día. Siento que esta tesis nos haya robado tanto tiempo y a la vez me ilusiona poder empezar a recuperarlo contigo."

INDICE

ABREVIATURAS	13
---------------------	-----------

INTRODUCCIÓN	17
---------------------	-----------

1. La problemática de la predicción de la toxicidad humana	19
---	-----------

1.1 La toxicidad aguda y la necesidad de alternativas <i>in vitro</i>	19
---	----

1.2 Tipos de mecanismos de toxicidad	20
--------------------------------------	----

1.3 Las tres Rs: Reemplazo, Reducción y Refinamiento	21
--	----

1.4 Legislación REACH y reglamentos GHS y CLP para la clasificación y etiquetado de sustancias tóxicas	23
--	----

1.5 Los estudios MEIC, EDIT y el proyecto AcuteTox	27
--	----

2. Nuevas dianas y métodos para determinar la toxicidad <i>in vitro</i>	31
--	-----------

2.1 La Citómica y su papel en la detección y estudio de citotoxicidad	31
---	----

2.2 La Citometría de Flujo como método alternativo en Toxicología <i>in vitro</i>	32
---	----

2.3 Análisis de imagen de alto contenido	35
--	----

2.4 Evaluación de citotoxicidad usando métodos no tradicionales	37
---	----

2.5 Estrés oxidativo y nitrosativo como diana para la determinación de toxicidad de compuestos químicos	38
---	----

3. Limitaciones de los métodos <i>in vitro</i>	54
---	-----------

3.1 Transportadores ABC	54
-------------------------	----

3.2 Metabolismo de xenobióticos – biotransformación <i>in vitro</i>	67
---	----

OBJETIVOS	71
------------------	-----------

METODOLOGÍA	75
--------------------	-----------

1. Cultivos Celulares	77
------------------------------	-----------

1.1 Líneas celulares	77
----------------------	----

1.2 Medios de cultivo	78
-----------------------	----

1.3 Crecimiento y mantenimiento del cultivo celular	79
---	----

1.4 Crecimiento y mantenimiento de la línea HepaRG	81
--	----

2. Fármacos y xenobióticos en estudio	82
--	-----------

2.1 Selección de Fármacos y xenobióticos	82
--	----

2.2 Preparación de los compuestos tóxicos y tratamiento de las células	87
--	----

3. Determinación de los efectos de fármacos y xenobióticos	88
---	-----------

3.1 Ensayos de determinación de la viabilidad celular	88
---	----

3.2 Determinación de Estrés Oxidativo y Nitrosativo	90
---	----

4 Controles positivos	95
------------------------------	-----------

5. Identificación de Transportadores ABC y su implicación en la toxicidad <i>in vitro</i>	98
--	-----------

5.1 Identificación de los transportadores ABC mediante PCR en tiempo real (qPCR)	98
5.2 Identificación mediante CMF de transportadores ABC	102
5.3 Detección del transportador ABCB1 mediante ensayos funcionales	104
6 Análisis de datos	105
6.1 Muerte celular	105
6.2 Cálculo EC50 de parámetros estrés oxidativo	105
6.3 Cálculo de los valores mínimos (LOEC)	106
6.4 Determinación de la capacidad predictiva del panel citómico	107
6.5 Determinación de la capacidad de detección de la toxicidad <i>in vitro</i> dependiente del metabolismo usando como modelo HepaRG	113
6.6 Ensayo funcional detección de transportadores ABCB1	114
RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL	115
1 Determinación de la toxicidad <i>in vitro</i>	117
1.1 Validación de los ensayos citómicos	117
1.2 Cuantificación de la toxicidad <i>in vitro</i>	119
2. Evaluación de la capacidad predictiva de los ensayos citómicos <i>in vitro</i>	131
2.1 Correlación de los valores de toxicidad <i>in vitro</i> con la LC50 humana	131
2.2 Comparación de la capacidad predictiva de los ensayos citómicos con la de los valores de referencia de toxicidad experimental	133
2.3 Identificación y corrección de outliers y alertas del ensayo de 3T3 NRU	140
2.4 Identificación de posibles alertas y outliers en los ensayos citómicos	147
2.5 Evaluación de la capacidad de detección de la toxicidad órgano-específica	156
2.6 Clasificación de compuestos por su valor de toxicidad <i>in vitro</i>	167
2.7 La bio-transformación y su implicación en la determinación de la toxicidad <i>in vitro</i>	182
2.8 Transportadores MDR y su implicación en la toxicidad <i>in vitro</i>	192
CONCLUSIONES	213
BIBLIOGRAFÍA	217

ABREVIATURAS

8-oxo	8-oxoguanina
ABC	ATP-binding cassette
ABCA	ATP-binding cassette, sub-family A
ABCB	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR)
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR), member 1
ABCC	ATP-binding cassette, sub-family C (MRP)
ABCC1	ATP-binding cassette, sub-family C (MRP), member 1
ABCC23	ATP-binding cassette, sub-family C, member 23
ABCG	ATP-binding cassette, sub-family G
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G, member 2 (BCRP)
ADME	Absorción, distribución, metabolismo y excreción
ANT	Translocador de ADP / ATP
ATLA	<i>Alternatives to laboratory animals</i>
ATP	Adenosín trifosfato
AUC	Área bajo la curva
BCRP	<i>Breast cáncer resistance protein, ABCG2</i>
CFU-GM	Colonia de progenitores de granulocitos y macrófagos
CLP	<i>Classification, labelling and packaging</i>
CMF	Citometría de flujo
CoQ	Coenzima Q
CycD	Ciclofilina D
CYPs	Citocromo P450
Cytc	Citocromos c
DAF-FM DA	4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína diacetato
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DCF	2,7-diclorofluoresceína
DiOC ₂ (3)	3,3'-dietiloxacarbocianina yoduro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>

EDIT	<i>Evaluation-guided Development of New In Vitro Test</i>
EMEM	Medio mínimo esencial de Eagle
EU	<i>European Union</i>
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FIFRA	<i>Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMN	Flavín mononucleótido
FS	Dispersión frontal de la luz (<i>forward scatter</i>)
GABA _A	Receptor del neurotransmisor GABA
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GHS	<i>Global Harmonization System</i>
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación
GSTa1	Glutación S-transferasa a1
H ₂ DCF-DA	2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato
HCA	<i>High-content analysis</i>
HCS	<i>High-content screening</i>
HE	Hidroetidina
HKII	Hexoquinasa II
ICCVAM	<i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i>
LOEC	<i>Lowest observed effect concentration</i> (Valor mínimo)
LOEC _{oxi}	Valor mínimo de los ensayos de estrés oxidativo/nitrosativo
LOEC _{total}	Valor mínimo de todos los ensayos citómicos
LOEC _{viab}	Valor mínimo de los ensayos de viabilidad
MDR1	<i>Multidrug resistance protein 1 (MDR1); ABCB1</i>
MEIC	Multicenter Evaluation of <i>In vitro</i> Cytotoxicity
MEMO	Monografía del MEIC
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MnSOD	Superóxido dismutasa de manganeso mitocondrial
MPTP	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium·Br
MXR	<i>Mitoxantrone resistance gene</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAPQ1	N-acetil-p-benzo-quinona-imina

NE	No tiene efecto
NICE-ATM	<i>NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
NRU	Ensayo de captación del Rojo Neutro
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
ONOO-	Peroxinitrito
ONU	Organización de las Naciones Unidas
OT	Outliers
PBS	Tampón fosfato salino
PE	Ficoeritrina
REACH	<i>Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Error estándar
SH	Sulfhidrilo o Tiol
SLC	<i>Solute Carrier Family</i>
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SOD	Superóxido Dismutasa
SS	Dispersión lateral de la luz (<i>Side Scatter</i>)
SSCT	<i>Scandinavian Society for Cell Toxicology</i>
UFAW	<i>Universities Federation for Animal Welfare</i>
UGT	Uridinadifosfato glucuroniltransferasa
UN	<i>United Nations</i> (Naciones Unidas)
US	<i>United States</i> (Estados Unidos)
VDAC	Canales iónicos regulados por voltaje
VPA	Ácido valproico
YP	Yoduro de propidio

INTRODUCCIÓN

1. La problemática de la predicción de la toxicidad humana

1.1 La toxicidad aguda y la necesidad de alternativas *in vitro*

La predicción de la toxicidad aguda oral es el gran objetivo de los laboratorios dedicados a la problemática del reemplazo animal en la experimentación. El número de animales usados en Europa en ensayos de toxicidad aguda es todavía elevado (Anon, 2010; Prieto et al., 2013).

En las últimas dos décadas, la comunidad científica se ha enfocado en la búsqueda de alternativas al uso de animales *in vivo* para determinar la toxicidad oral aguda (Anon, 2006; Clemedson & Ekwall, 1999; Halle, 2003; Kinsner-Ovaskainen, Prieto, Stanzel, & Kopp-Schneider, 2013a). A pesar de los esfuerzos de científicos de todo el mundo, hasta la fecha, los ensayos de citotoxicidad apenas han sido usados como tests adicionales para estimar la dosis inicial para los tests de toxicidad oral sistémica *in vivo* (Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), 2010; Anon, 2006; Kinsner-Ovaskainen et al., 2013a).

En la actualidad, dos procesos biotecnológicos importantes y urgentes exigen métodos alternativos al animal de laboratorio para la detección y/o predicción de toxicidad humana: el descubrimiento de fármacos a partir de números ingentes de moléculas candidatas y la evaluación normativa del riesgo de toxicidad de miles de compuestos manejados en la Comunidad Europea.

Esta necesidad surge de imperativos ético-regulatorios de protección del consumidor y del animal (concepto 3Rs) y de aspectos económicos. Por ello, el desarrollo de métodos *in vitro* de análisis de citotoxicidad es una prioridad y ha dado lugar a un amplio repertorio de técnicas sencillas con una capacidad de detección de efectos *in vitro* y de predicción de toxicidad aguda *in vivo* más que aceptable. Sin embargo los métodos *in vitro* de referencia no predicen la toxicidad humana en

cerca del 30% de los casos y se basan en la detección de efectos muy generales o ambiguos para cuantificar la citotoxicidad de un fármaco o xenobiótico.

La toxicidad aguda se define como “el efecto adverso que ocurre después de un tiempo breve tras la administración de una sola dosis de una sustancia o de múltiples dosis de la misma administradas en 24 horas”. En el contexto humano, esta definición se puede aplicar a situaciones que ponen en peligro la vida, como ingestión accidental de sustancias, sobredosis o intento de suicidio. Por otra parte, los objetivos principales de un estudio de toxicidad aguda son: establecer si una sola exposición de seres humanos a un compuesto dado puede suponer un efecto adverso sobre la salud, proporcionar información acerca del diseño y la dosificación en estudios de dosis repetitivas y crónicas en animales y proporcionar información útil para el diagnóstico y el tratamiento de un envenenamiento por compuestos químicos.

1.2 Tipos de mecanismos de toxicidad

La toxicidad aguda sistémica suele resultar de toxicidad a nivel celular – citotoxicidad. Esta, a su vez, se produce como consecuencia de la interferencia de los tóxicos con estructuras y/o procesos esenciales para la supervivencia, la proliferación y la función de las células. Habitualmente, se distinguen dos tipos de mecanismos de citotoxicidad, siguiendo la división clásica de Ekwall, 1983 referidos como citotoxicidad general y citotoxicidad órgano específica (Ekwall, B., Ekwall, 1988; Repetto, 1995; Repetto, G., Peso, A., Zurita, 2006). Los mecanismos de citotoxicidad general se deben a interferencias producidas por un xenobiótico o sus metabolitos sobre los procesos basales comunes a la mayor parte de las células del organismo mostrando todos los tipos celulares una susceptibilidad similar.

La toxicidad órgano-específica, por su parte, corrobora la existencia de órganos diana para ciertos tóxicos y explica la mayor susceptibilidad y sensibilidad

de éstos como consecuencia de su biotransformación, su unión a receptores específicos o por su captación dependiente de mecanismos específicos. A su vez puede deberse a modificaciones de la actividad basal en células especializadas, como ocurre con los inhibidores de la división celular, que manifiestan sus efectos de forma más severa sobre la médula ósea debido a que es un tejido con alta velocidad de reproducción; o pueden alterar mecanismos celulares exclusivos de ese órgano o sistema, como por ejemplo la neurotransmisión. En muchos casos, la toxicidad órgano-específica en humanos aparece causada por mecanismos de citotoxicidad basal inducidos por la distribución de los compuestos en el correspondiente órgano. Además, la citotoxicidad basal es un mecanismo común de toxicidad general que no está restringido a altas dosis, y que puede ser también causa de efectos tóxicos leves (Ekwall, B., Ekwall, 1988; Repetto, 1995; Repetto, G., Peso, A., Zurita, 2006).

Por último, se puede distinguir un tercer tipo de toxicidad, la toxicidad extracelular que sucede cuando un producto químico afecta a la secreción de sustancias desde las células o cuando se ven afectadas las funciones extracelulares.

1.3 Las tres Rs: Reemplazo, Reducción y Refinamiento

El origen del concepto de alternativas de reemplazo animal fue discutido en la Sociedad UFAW (*Universities Federation for Animal Welfare*) por primera vez en 1957 por Charles Hume y William Russell en la que se habló de realizar los experimentos animales de forma menos dañina, lo que más tarde se llamaría las 3Rs – reemplazo, reducción y refinamiento (Balls, 1994; Doke & Dhawale, 2013). Desde entonces, la necesidad de alternativas al uso de animales en investigación se ha incrementado y la estrategia de las 3Rs se está aplicando de cara a reducir, refinar y reemplazar el uso de animales de laboratorio.

Russel y Burch definieron en 1954 el reemplazo como: "cualquier método científico que emplea material no sensible que pueda reemplazar en la experimentación animal a los métodos que usan animales vertebrados conscientes y vivos" (Balls, 1994). El reemplazo es lo que se considera mayoritariamente cuando se habla de alternativas al uso animal: los animales son reemplazados por métodos que no los usan en absoluto – reemplazo absoluto (ej. cultivo de líneas celulares humanas, uso de modelos informáticos) – o por métodos que sólo usan células o tejidos animales (Ranganatha & Kuppast, 2012) y en los que el animal no sufre durante el experimento – reemplazo relativo (Balls, 1994; Doke & Dhawale, 2013). El reemplazo también se puede referir a la sustitución de animales con mayores niveles de complejidad por organismos inferiores (Ranganatha & Kuppast, 2012; Zurlo, J., Rudacille, D., Goldberg, 1996). Se han sugerido diversas alternativas al uso de animales, tales como modelos *in vitro*, cultivos celulares, modelos computacionales y herramientas bioinformáticas (Doke & Dhawale, 2013; Eisenbrand et al., 2002). Los modelos *in vitro* permiten estudiar las respuestas celulares en un sistema cerrado, en condiciones experimentales controladas. El uso de estos métodos no sólo disminuye el sufrimiento animal, sino que proporciona diversas ventajas experimentales tales como la reducción del tiempo empleado, menos mano de obra (mantenimiento/dedicación), mayor rentabilidad (disminución de costes que son altísimos en experimentos con uso de animales) y evita las diferencias entre especies. Por esa razón, los métodos alternativos son frecuentemente más confiables, eficientes y precisos (Ranganatha & Kuppast, 2012).

La reducción implica la disminución del uso de animales en situaciones en las que, debido a la naturaleza del experimento, no se pueden reemplazar (Ranganatha & Kuppast, 2012). El uso de animales debe ser estudiado y planificado cuidadosamente de cara a poder reducir el número de animales y el dolor causado, manteniendo resultados científicos significativos (Doke & Dhawale, 2013). Un

ejemplo es el uso de cultivos primarios, donde de un mismo animal se pueden obtener varios tipos celulares que podrán ser utilizados en diferentes estudios de diferentes grupos si hay una buena coordinación y planificación de los experimentos.

Además, el intercambio o el suministro de los datos descubiertos evitan la necesidad de más estudios con animales (Doke & Dhawale, 2013).

El refinamiento consiste en mejorar la calidad de vida de esos animales mejorando las instalaciones, disminuyendo la incomodidad, el estrés y el dolor durante la vida y muerte del animal. Esta mejoría de la calidad de vida y disminución del sufrimiento, no solo es positivo para el animal, sino que también tiene un efecto positivo en la investigación a realizar. El estrés y el malestar del animal pueden alterar los resultados o llevar a fluctuaciones en los mismos dependiendo del tipo de experimento a realizar, llevando muchas veces a la necesidad de repetirlo (Doke & Dhawale, 2013). El refinamiento resulta necesario no sólo para mejorar la vida de los animales de laboratorio sino también para mejorar la calidad de la investigación (Doke & Dhawale, 2013; Hendriksen, 2009).

Se han sugerido diversas alternativas al uso de los animales y deben ser implementadas de una manera eficaz. Por ello, se deben integrar modelos computacionales, herramientas de bioinformática, cultivos celulares *in vitro*, sistemas de cribado y organismos modelo. El uso de técnicas analíticas modernas para la adquisición de datos y los procedimientos estadísticos para analizar los resultados de los protocolos alternativos pueden proporcionar buenos resultados (Doke & Dhawale, 2013).

1.4 Legislación REACH y reglamentos GHS y CLP para la clasificación y etiquetado de sustancias tóxicas

El desarrollo de nuevos fármacos se beneficiaría de la disponibilidad en las etapas iniciales de la selección de moléculas candidatas, de información toxicológica

relevante a las mismas. Para ello, las industrias farmacéuticas invierten cantidades enormes de recursos para descubrir nuevas moléculas y desarrollarlas en medicamentos eficaces, libres de efectos secundarios. Sin embargo, hay un elevado porcentaje de compuestos o fármacos que no completan el proceso de I+D por falta de eficacia o por efectos secundarios. Ello representa una pérdida de recursos muy importante, aparte del hecho más trascendental que es el de exponer a seres humanos durante los estudios clínicos a productos o medicamentos que no llegarán al mercado. Por lo tanto, es fundamental aumentar la capacidad traslacional de los ensayos no clínicos para poder aumentar la eficacia y reducir los efectos secundarios de nuevos fármacos.

En otro contexto, la entrada en vigor de la nueva política de la UE con respecto a los productos químicos que circulan por Europa aborda su Registro, Evaluación y Autorización (legislación REACH: Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals) e implica el estudio de la toxicidad aguda de las más de 30.000 sustancias existentes, que se ponen en circulación por encima de 1 Tm por año. Además, la reducción/reemplazo del uso de animales de laboratorio es una exigencia urgente por parte de la 7ª enmienda de la Directiva de Cosméticos cuya fecha límite para el uso de animales fue el año 2009 (Abbott, 2005). En este contexto, todos los ensayos animales de toxicidad tóxica han sido reemplazados con éxito por métodos alternativos, pero no ha sido así en el caso de la toxicidad química aguda sistémica.

La clasificación tóxica normativa de los compuestos químicos se realiza mediante la determinación del valor de su dosis letal media (LD50) definida por (Trevan, 1927) como “la dosis calculada estadísticamente de una sustancia que se espera que produzca la muerte del 50% de los animales de un grupo experimental”. El ensayo de la LD50, muy criticado por razones científicas y proteccionistas, fue suprimido de las recomendaciones de la OCDE en 2000. En 2002 el test de LD50 original (OECD401) fue suprimido de las líneas guía de la OCDE.

Aún así, de acuerdo con los ensayos normativos de toxicidad actuales, tales estudios de evaluación de riesgo químico exigirían el uso de 10-14 millones de animales de laboratorio por lo que, además del coste en vidas animales, la política REACH supone un extraordinario coste económico que encarecería los productos finales al consumidor.

Además, teniendo en cuenta la realidad del comercio mundial de productos químicos, el peligro que suponen desde su proceso de fabricación, su manipulación, transporte, uso y la necesidad de desarrollar programas nacionales para garantizar su uso seguro, transporte y eliminación, se reconoció la necesidad de un enfoque internacional armonizado para la clasificación y el etiquetado de compuestos químicos. El nuevo sistema, que fue llamado "Sistema Global y Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS – *“Global Armonization System”* – o CLP – *“classification, labelling and packaging of substances and mixtures”*), se ocupa de la clasificación de los productos químicos por tipos de riesgo y propone elementos armonizados de comunicación de peligros, incluyendo etiquetas y fichas de datos de seguridad. El trabajo sobre la elaboración del GHS comenzó con la premisa de que los sistemas existentes deberían armonizarse con el fin de desarrollar un sistema único y armonizado a nivel mundial para hacer frente a la clasificación de los productos químicos, etiquetas y fichas de datos de seguridad.

Su objetivo es asegurar que la información sobre los peligros físicos y la toxicidad de los productos químicos estén disponibles con el fin de mejorar la protección de la salud humana y el medio ambiente durante el manejo, transporte y uso de estos productos. El GHS también proporciona una base para la armonización de las normas y reglamentos sobre los productos químicos a nivel nacional, regional y mundial, un factor importante también para la facilitación del comercio ((UN), 2007).

El GHS se desarrolló bajo los auspicios de las Naciones Unidas ((UN), 2007; Seidle et al., 2010) para promover un aumento de la coherencia entre los diversos

marcos nacionales y sectoriales. Hasta la fecha, este sistema ha sido o está siendo implementado en diversos países en la UE, además de Nueva Zelanda, Corea, China, India, Japón y los Estados Unidos (Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), 2010; Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2007, 2009; Seidle et al., 2010) aunque en ciertos casos, la flexibilidad proporcionada por el diseño modular del GHS ha llevado a continuas diferencias en su aplicación. Por ejemplo, las autoridades Europeas y la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional de Estados Unidos aceptan una dosis límite de 2.000 mg / kg (es decir, categoría IV del GHS), más allá de la cual no se requiere la etiqueta de peligro de la sustancia o producto ((OJ), 2008; (OSHA), 2009; Seidle et al., 2010), mientras que otras autoridades requieren pruebas a una dosis límite de 5000 mg / kg (es decir, categoría V del GHS) para apoyar una designación sin etiqueta. La Figura 1 ilustra los esquemas de clasificación con los diferentes puntos de corte de nivel de riesgo entre la EU (CLP), las Naciones Unidas – GHS, y la FIFRA (*Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act*) de Estados Unidos ((EPA), 2004; Seidle et al., 2010). La mayoría de las empresas europeas encuestadas reportaron haber usado como dosis límite por defecto 2000 mg/kg, ya que la CLP desaconseja expresamente las pruebas más allá de 2000 mg/kg por razones del bienestar animal((UN), 2007; Seidle et al., 2010).

Las categorías para la determinación de la toxicidad oral en rata (LD50), así como los criterios, símbolo, palabra señal y descripción están representadas en la Tabla 1.

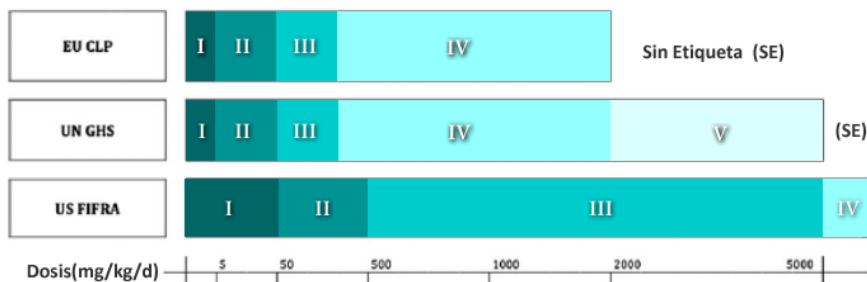


Figura 1: Esquema de clasificación de los compuestos químicos en función de la toxicidad oral aguda, según definen la Unión Europea (EU), las Naciones Unidas (UN) y Estados Unidos (US). Adaptado de (Seidle et al., 2010).

Tabla 1: Criterios de clasificación de compuestos químicos de acuerdo a la toxicidad oral en rata. Adaptado de:

http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Categoría / Peligro		1	2	3	4	5
Criterio		LD50 ≤ 5mg/kg del peso corporal	LD50 > 5 y ≤ 50mg/kg del peso corporal	LD50 > 50 y ≤ 300mg/kg del peso corporal	LD50 > 300 y ≤ 2000 mg/kg del peso corporal	LD50 > 2000mg/kg del peso corporal
Elemento comunicación peligro	Pictograma					No tiene
	Palabra señal	PELIGRO	PELIGRO	PELIGRO	ADVERTENCIA	ADVERTENCIA
	Descripción Peligro	FATAL si ingerido	FATAL si ingerido	TÓXICO si ingerido	PERJUDICIAL si ingerido	Puede ser perjudicial si ingerido

1.5 Los estudios MEIC, EDIT y el proyecto AcuteTox

Es evidente que el desarrollo de métodos *in vitro* de análisis de citotoxicidad es una prioridad y en los últimos cincuenta años se ha generado un amplio repertorio de técnicas sencillas, con aceptable capacidad de detección de efectos *in vitro* y de predicción de toxicidad aguda *in vivo*. Sin embargo, son muy pocos los métodos alternativos que han sido oficialmente validados como métodos normativos de referencia por el ECVAM, Centro Europeo de Métodos Alternativos (Worth &

Balls, 2002) o su homólogo americano, el ICCVAM (C. Hendriksen, Cussler, & Halder, 2002).

A mediados de la década de 1980, el destacado toxicólogo celular sueco Björn Ekwall inició el proyecto internacional multicéntrico de Evaluación de la citotoxicidad *in vitro* (MEIC), para evaluar la utilidad de las pruebas *in vitro* en la estimación de la toxicidad sistémica aguda humana (Walum, Tähti, & Kolman, 2011).

El programa MEIC fue un estudio de 7 años coordinado por la SSCT (*Scandinavian Society for Cell Toxicology*) en el que participaron 59 laboratorios de todo el mundo de forma voluntaria para probar 50 productos químicos de referencia seleccionados por el Centro de Información de Envenenamiento de Suecia, de acuerdo con sus protocolos internos (Walum, Tähti, & Kolman, 2011). Cada sustancia química fue respaldada por los datos relevantes de toxicidad y cinética humana (Monografía MEIC [MEMO]) para permitir la determinación de la concentración sanguínea letal (LC50) y su comparación con los datos *in vitro*. La principal conclusión del estudio del MEIC fue que ciertas pruebas de citotoxicidad basal en humanos se correlacionan con los valores de la LC50 calculados a partir de los pacientes con sobredosis intencionales o accidentales de drogas y químicos. Por otra parte, la predicción aumentó considerablemente cuando se utilizaron datos toxicocinéticos (es decir, el paso a través de la barrera sangre-cerebro) para corregir los valores *in vitro*. Se reconoció además que existen otros mecanismos toxicológicos importantes que sólo puede ser medidos utilizando ensayos *in vitro* suplementares (Gennari et al., 2004; Walum et al., 2011; Walum, 2014).

Posteriormente, los directivos del estudio MEIC comenzaron un nuevo programa internacional multicéntrico llamado EDIT (*Evaluation-guided Development of New In Vitro Test*) para evaluar ensayos de toxicocinética y la toxicidad específica de órganos, y posteriormente una batería de ensayos para la predicción de toxicidad sistémica aguda humana (Gennari et al., 2004). Los resultados del programa MEIC se publicaron como una serie de ocho artículos en ATLA (Clemedson et al., 1998a;

Clemedson et al., 1998b; Clemedson et al., 1996a; Clemedson et al., 1996b; Clemedson et al., 2000; Ekwall et al., 1998a; Ekwall et al., 1998b; Ekwall et al., 2000).

A pesar de que en la base de datos del ECVAM (<http://ecvam-sis.jrc.it>) se recogen unos 20 ensayos de citotoxicidad basal, su aplicación en estudios de correlación (MEIC, EDIT, NICE-ATM) no logra predecir la toxicidad humana en cerca del 30% de los casos (Gennari *et al.*, 2004) y puede precisar de algoritmos correctores que tienen en cuenta la influencia de factores biocinéticos y metabólicos entre otros.

Los compuestos en los que no se logra predecir su toxicidad *in vivo* utilizando ensayos *in vitro* se denominan “outliers”.

De la misma forma que en artículos anteriores (Gustafsson *et al.*, 2010; Kooijman, Devos, & Hooghe-Peters, 2010) los outliers del ensayo clásico de 3T3 NRU han sido identificados cuando los valores de IC50 determinados presentan una diferencia de al menos una unidad de Logaritmo comparado con los valores de LC50 estimados por Sjöström *et al.* (2008). Usando esta aproximación, se han detectado 13 outliers de este ensayo, que subestima la toxicidad de estos compuestos (Figura 2). Los compuestos se consideran alertas cuando, por el ensayo en estudio se detecta el efecto tóxico a concentraciones más bajas.

Las ideas del proyecto EDIT, junto con los del proyecto MEIC, se convirtieron en la base para proyectos internacionales de la UE internacionales de hoy en día, por ejemplo, ACuteTox, Sens-it-iv y ReProTect (Kolman & Walum, 2010).

En ese contexto, y con el propósito de identificar las causas de error y desarrollar una estrategia sencilla y robusta de ensayos para mejorar la predicción de toxicidad aguda sistémica en humanos, el VI Programa Marco de la Unión Europea financió el Proyecto Integrado «ACuteTox» (www.acutetox.org) con los siguientes objetivos:

Compilar, evaluar de forma crítica y producir datos *in vivo* e *in vitro* de calidad para el análisis comparativo;

Identificar los factores que modifican la correlación entre la toxicidad *in vitro* e *in vivo* y definir un algoritmo capaz de explicarlos;

Explorar herramientas y sistemas celulares innovadores para identificar nuevos puntos finales y estrategias que anticipen mejor la toxicidad animal y humana

Diseñar una estrategia sencilla, robusta y fiable de ensayos *in vitro*, susceptible de robotización y asociada con el modelo predictivo de toxicidad aguda (www.acutetox.org).

Este proyecto se basa en que la existencia de compuestos outliers en las correlaciones *in vitro-in vivo* se debe a mecanismos biocinéticos (ADME – absorción, distribución, metabolismo y excreción) o mecanismos específicos de toxicidad de los compuestos (Anon, 2006; Ekwall et al., 1998b; Gustafsson et al., 2010; Halle, 2003). De esta forma, la inclusión de datos de la biocinética de los compuestos y de la citotoxicidad basal con información de toxicidad específica de órganos, puede mejorar la correlación con la toxicidad aguda en humano (DeJonghet *al.*, 1999; Forsby & Blaauboer, 2007; Gustafsson *et al.*, 2010).

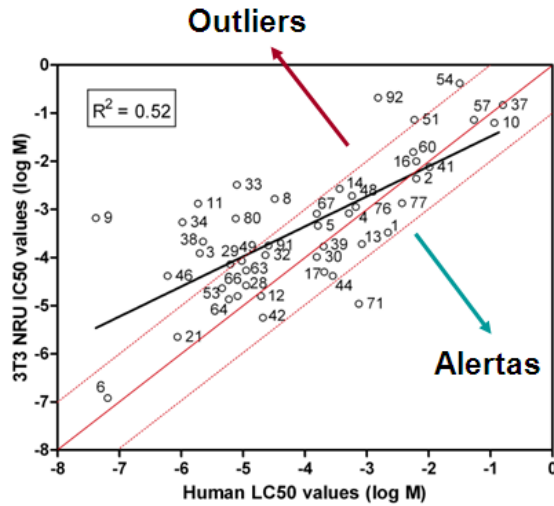


Figura 2: Identificación y correlación de los outliers del ensayo NRU en 3T3 frente a la LC50 de humano (Sjöström *et al.*, 2008). La línea continua marca la correlación perfecta 1:1 y las líneas discontinuas representan la desviación de una unidad de logaritmo decimal de la correlación perfecta, marcando el límite para la identificación de outliers o alertas. Los números representados corresponden a los números de referencia utilizados en el proyecto ACuteTox (Tabla13). Los compuestos que se sitúan por encima de la línea discontinua superior, representan los outliers de este ensayo.

2. Nuevas dianas y métodos para determinar la toxicidad *in vitro*

2.1 La Citómica y su papel en la detección y estudio de citotoxicidad

Los citomas pueden ser definidos como los sistemas y subsistemas celulares y los componentes funcionales del organismo. La heterogeneidad de los citomas, resultante de la expresión del genoma y la exposición a factores externos, es abordada por la Citómica, definida como el estudio de los fenotipos moleculares de las células individuales en combinación con una exhaustiva extracción bioinformática del conocimiento así obtenido (Bocsi *et al.*, 2006; Kriete, 2005). La citómica como

disciplina tiene como objetivo el conocimiento del diseño molecular y la funcionalidad de los citomas mediante el análisis célula a célula, una aproximación que permite evitar la pérdida de información que caracteriza a otras metodologías en que se obtienen valores promedios a partir del análisis de números elevados de células o de homogeneizados de tejidos. El uso de células vivas permite determinar múltiples parámetros funcionales en entornos intracelulares prácticamente inalterados en condiciones casi fisiológicas (Álvarez-Barrientos *et al.*, 2005; O'Connor *et al.*, 2001).

2.2 La Citometría de Flujo como método alternativo en Toxicología in vitro

La citometría de flujo (CMF) permite la cuantificación simultánea de múltiples emisiones de fluorescencia en una misma célula, derivadas de marcadores fluorescentes y dispersión de luz relacionada con su morfología, revelando características funcionales y estructurales de las células. Esas emisiones de fluorescencia son inducidas por la iluminación adecuada de células o partículas microscópicas en suspensión a medida que éstas fluyen de una en una a través de un compartimento de detección (Herrera *et al.*, 2007; O'Connor *et al.*, 2001). De esta forma, la CMF es una poderosa metodología citómica que permite cuantificar simultáneamente varios parámetros biológicos en la misma célula a una velocidad de adquisición de datos que alcanza los miles de eventos por segundo (Herrera *et al.*, 2007; O'Connor *et al.*, 2001).

La CMF se ha convertido en una de las tecnologías analíticas de fluorescencia más avanzadas y que evoluciona más rápidamente. Los principales aspectos ventajosos de la CMF se pueden resumir en los siguientes conceptos (O'Connor *et al.*, 2001; O'Connor *et al.*, 2005).

Adquisición multiparamétrica de datos: La mayoría de los procedimientos bioquímicos clásicos y moleculares determinan un sólo parámetro biológico por

ensayo y, en general, no son suficientemente sensibles para detectar una sola célula. Los citómetros de flujo modernos permiten recoger simultáneamente en cada célula o partícula dos señales de dispersión de luz (relacionadas con la morfología celular) y entre 3-10 señales de fluorescencia en los citómetros disponibles en nuestro laboratorio. De esta forma, uno o más parámetros pueden usarse para definir y acotar la sub-población de interés en un cigoma heterogéneo y el resto de señales disponibles son asignadas al análisis de estructuras específicas o funciones en la población seleccionada (Álvarez-Barrientos *et al.*, 2005; O'Connor *et al.*, 2001; O'Connor *et al.*, 2005).

Análisis multivariado de datos: La configuración de los citómetros modernos permite asociar la adquisición multiparamétrica de datos al análisis multivariado. Por ello, una población celular no es descrita por la mera enumeración de sus propiedades, sino por su correlación sobre cada célula individual, incrementando así su poder de discriminación. Además, los resultados generados en forma de matrices numéricas permite definir nuevas correlaciones internas, modificar la selección de sub-poblaciones y correlacionar los datos con otros descriptores biológicos, evaluando el carácter predictivo de la CMF (Álvarez-Barriento *et al.*, 2005; O'Connor *et al.*, 2001; Valet, 2005).

Análisis rápido de elevado número de células vivas: La CMF puede ser realizada en una gran variedad de material biológico en diferentes condiciones de viabilidad (ej. células frescas intactas, fijadas y/permeabilizadas). El uso de células vivas permite determinar múltiples parámetros funcionales en condiciones casi fisiológicas en entornos intracelulares mínimamente alterados. La elevada velocidad de adquisición de datos y la posibilidad de examinar millones de células individuales en poco tiempo, permite la detección y análisis preciso de células infrecuentes, de hasta 1 evento por 10^8 células (O'Connor *et al.*, 2001; O'Connor *et al.*, 2005; Álvarez-Barrientos *et al.*, 2005). Esta posibilidad contrasta con las determinaciones fluorimétricas estándares en las que se analizan a la vez millones de células o sus

extractos, proporcionando un simple valor de la media (Álvarez-Barrientos et al., 2005).

Por las razones de sensibilidad y capacidad de resolución descritas, se entiende que la CMF sea una alternativa de gran interés en el campo de la Toxicología *in vitro* (Herrera et al., 2007). Una serie de ventajas, desde el punto de vista de su aplicabilidad a modelos biológicos, explican su valor en esa área:

No invasibilidad: En la mayoría de aplicaciones, las técnicas citómicas no son invasivas de la integridad celular, por lo que las poblaciones celulares examinadas pueden encontrarse en condiciones casi-fisiológicas en el momento de su análisis (O'Connor et al., 2005).

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 (Herrera *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2003) en cultivo (análisis *in vitro*) e, incluso a poblaciones de microorganismos procedentes de productos manufacturados o de entornos medioambientales. De esta forma, la CMF se puede aplicar a la monitorización fenotípica de los efectos de fármacos y xenobióticos sobre el organismo entero, proporcionando múltiples biomarcadores de exposición y de efecto (O'Connor et al., 2005).

Elevado nivel de información biológica generada: La CMF produce una gran cantidad y calidad de información biológica. 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 (O'Connor et al., 2001; O'Connor et al., 2005). La capacidad multiparamétrica de la citometría de flujo permite revelar los

efectos producidos por la exposición al agente tóxico, identificar la expresión de receptores específicos para determinadas drogas/fármacos o la presencia de dianas estructurales o funcionales de una droga o xenobiótico dentro de una población celular (Herrera et al., 2007). En otros casos, los parámetros relevantes pueden estar relacionados con la absorción, retención, biotransformación y eflujo de xenobióticos. Los ensayos citómicos pueden revelar en un citoma completo o en sub-poblaciones específicas, los efectos producidos por la exposición de un compuesto tóxico, proporcionando así pruebas de la susceptibilidad o resistencia celular (Herrera et al., 2002, Herrera et al., 2003; Lage et al., 2001), y también pueden ser utilizados para el análisis cualitativo y cuantitativo de toxicidad celular y órgano específica (Álvarez-Barrientos *et al.*, 2001; Herrera *et al.*, 2007).

Por último, hay que destacar, desde el punto de vista de la detección y cuantificación de toxicidad, que la citometría de flujo es la técnica citómica más utilizada para el estudio cualitativo y cuantitativo de la citotoxicidad, aunque nunca ha sido aplicada al contexto sistemático y pre-normativo como método alternativo que en este proyecto proponemos. Las ventajas de la aproximación citométrica derivan, en primer lugar de su capacidad multiparamétrica que proporciona diversos puntos finales para evaluar la lesión y muerte celular en poblaciones seleccionadas, pudiendo ser tales parámetros marcadores precoces o tardíos del fenómeno citotóxico o, incluso, tratarse de fenómenos tóxicos minoritarios o incipientes (Herrera et al., 2007; O'Connor et al., 2001; O'Connor et al., 2005).

2.3 Análisis de imagen de alto contenido

La microscopía de fluorescencia cuantitativa se está convirtiendo en los últimos años en una de las herramientas de elección en análisis sistemáticos a gran escala de la función de proteínas (Starkuviene & Pepperkok, 2007). La aplicación de la microscopía de fluorescencia a gran escala necesita un considerable grado de

automatización de todos los pasos involucrados en el experimento. Estos son la preparación de muestras, la adquisición de imágenes, análisis de imágenes, almacenamiento, manipulación, el modelado y minería de los datos. La microscopía de fluorescencia de alto rendimiento y contenido automatizado permite la obtención de datos no supervisados con un alto contenido de información sobre la distribución espacial y temporal de distintas moléculas fluorescentes (multiplexado) (Lee & Howell, 2006; Liebel et al., 2003; Paran et al., 2006; Pepperkok & Ellenberg, 2006; Rines et al., 2006; Starkuviene & Pepperkok, 2007; Vaisberg et al., 2006)

De esta forma, grandes grupos de células con diferentes tratamientos se pueden visualizar de forma automatizada permitiendo la recopilación de grandes cantidades de datos, que a su vez se pueden analizar de forma estadísticamente fiable (Starkuviene & Pepperkok, 2007). El desarrollo de sistemas informáticos que permiten el análisis de la vasta información contenida en las imágenes a tiempo real, junto con el desarrollo del software de análisis de imagen automatizado han permitido la cuantificación simultánea de translocaciones intracelulares de distintas biomoléculas marcadas con fluorescencia. Además del tráfico proteico, las técnicas de alto contenido suministran información adicional sobre el ciclo celular, apoptosis, viabilidad, movimientos celulares, morfología, posición de los orgánulos intracelulares y otros fenómenos que dan lugar a cambios totales de la imagen fluorescente (Álvarez-Barrientos et al., 2005). Esto proporciona un alto grado de objetividad en el análisis de datos y una sensibilidad que permite la detección y clasificación de los fenotipos incluso sutiles, que fácilmente se podría perder en una evaluación manual de datos (Starkuviene & Pepperkok, 2007). Actualmente están disponibles distintos modelos comerciales de analizadores de imagen con focales de alto rendimiento, tales como el *In Cell Analyzer* de *Amersham Biosciences*, el *BDTM Pathway Bioimager* de *BD Biosciences*, el *ArrayScan HCS Reader* de *Cellomics* o el *OperaTM* de *Evotec Technologies*. Estos sistemas alcanzan velocidades de lectura de aproximadamente 1 pocillo/segundo y combinan una alta resolución temporal con

una alta resolución espacial (Álvarez-Barrientos et al., 2005). Algunos de estos sistemas tienen unidades que permiten el control de parámetros ambientales tales como la temperatura, humedad y niveles de dióxido de carbono, admitiendo de esta forma seguir el comportamiento celular durante períodos de tiempo prolongados bajo condiciones fisiológicas (Starkuviene & Pepperkok, 2007). La detección de células individuales suministra información adicional sobre la respuesta a tratamiento de poblaciones heterogéneas, que pueden diferir en su estado de desarrollo, fase dentro del ciclo celular, estado de transfección o variabilidad natural. La aplicación de estos sistemas tiene una gran importancia en el campo del diseño de drogas con valor farmacológico y en los ensayos de toxicidad de productos químicos (Álvarez-Barrientos et al., 2005) y permiten la investigación celular a gran escala utilizando placas multipocillos, y el análisis de millones de células por experimento (Álvarez-Barrientos et al., 2005).

2.4 Evaluación de citotoxicidad usando métodos no tradicionales

Por lo general, la citotoxicidad *in vitro* de células se calcula como la tasa de mortalidad, mientras que los estudios cualitativos de la bioquímica intracelular son sólo para toxicología mecanicista. Además, la mayoría de los estudios involucran a promedios de medidas generales en vez de mediciones basadas en las determinaciones de células individuales. La citometría de flujo y análisis de alto contenido por bioimagen (HCA) se basan en mediciones multiparamétricas de fluorescencia de una sola célula de poblaciones heterogéneas de células, manteniendo al mismo tiempo una tasa de adquisición de cientos-miles de células por segundo. Estos nuevos ensayos citómicos funcionales permiten la detección de eventos tempranos o transitorios, siendo más ventajosa que los ensayos de

cuantificación de variables sencillas, como la muerte celular o alteraciones celulares en general (Álvarez-Barrientos et al., 2005; Herrera et al., 2007).

2.5 Estrés oxidativo y nitrosativo como diana para la determinación de toxicidad de compuestos químicos

El estrés oxidativo es consecuencia de la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno o de la disminución de la defensa antioxidante, y causa citotoxicidad a través de alteraciones estructurales y funcionales con disrupción de la homeostasis celular (Figura 3).

2.5.1 Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) son moléculas derivadas del oxígeno y pueden existir de forma independiente conteniendo uno o más electrones desapareados en sus orbitales – radicales libres (Bergamini et al., 2004). Los radicales libres de oxígeno son productos de muchas reacciones de oxidación reducción biológicas.

Las ROS, que incluyen todas las moléculas altamente reactivas que contienen oxígeno, son una parte importante del mecanismo de defensa contra infecciones. La generación excesiva de ROS puede dañar los tejidos. Las ROS formadas en condiciones fisiológicas y patológicas son capaces de reaccionar con los lípidos de la membrana, ácidos nucleicos, proteínas y enzimas causando daño celular (Sharma et al., 2014; Zhou et al., 2004).

Las ROS incluyen las especies radicales tales como:

- **Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)**

La cadena mitocondrial de transporte de electrones mitocondrial es la principal fuente de la producción de ROS en forma de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

(Pereira et al., 2012). El anión superóxido es la primera especie reactiva de oxígeno generada en los sistemas biológicos y es formado por la reducción directa e incompleta por un único electrón del oxígeno. El anión superóxido tiene una vida media corta y es poco reactivo (Thannickal & Fanburg, 2000), de modo que no ataca de forma significativa a lípidos poliinsaturados ni tampoco al ácido desoxirribonucleico (DNA). Sin embargo, defectos en la Superóxido Dismutasa (SOD) pueden causar daños en la membrana celular debido a la elevada acumulación de este ROS (Fridovich, 1997). Su inestabilidad se debe a la rápida reacción de dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) catalizada por la enzima SOD (Thannickal & Fanburg, 2000).

- **Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)**

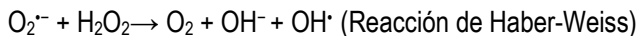
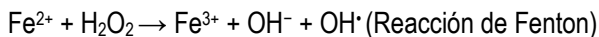
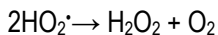
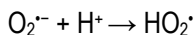
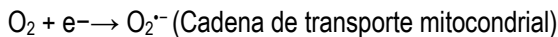
Al contrario del $O_2^{\cdot-}$, el peróxido de hidrógeno no es un radical libre por definición (no posee electrones desapareados), aunque se considere como metabolito reactivo de oxígeno (Kohen & Nyska, 2002). Es una molécula mucho más estable y menos reactiva que $O_2^{\cdot-}$ pero puede, sin embargo, causar daños a la célula a concentraciones relativamente bajas (10 μM). Esta molécula hidrosoluble puede difundirse con gran facilidad a través de las membranas biológicas lo que le proporciona la capacidad de reaccionar en diferentes zonas de la célula alejadas de su lugar de formación (Kohen & Nyska, 2002). Puede formarse por diversas reacciones metabólicas, como por ejemplo, la reacción de dismutación de $O_2^{\cdot-}$, catalizada por la SOD, que tiene como intermediario el radical hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}) (Tafazoli, 2009). También puede formarse en células eucariotas a partir de la reducción directa del oxígeno con dos electrones (Massey, 1994). El peróxido de hidrógeno origina otras especies reactivas de oxígeno con mayor capacidad reactiva como el radical hidroxilo, pero la actividad directa de H_2O_2 puede causar daños a la célula que incluyen la degradación de proteínas hemo, liberación de hierro,

inactivación de enzimas y oxidación de DNA, lípidos, grupos SH y cetoácidos (Kohen & Nyska, 2002).

- **Radical hidroxilo**

A pesar de que el H_2O_2 es un agente con una capacidad oxidativa mucho menor que el O_2^- , la interacción entre ambos en presencia de metales de transición puede dar lugar al radical hidroxilo (OH^\bullet) a través de las reacciones de Fenton y Harber-Weiss (Navarro, 2005; Orrenius, Nicotera, & Zhivotovsky, 2011). El radical hidroxilo es la especie derivada del oxígeno más reactiva y quizás la más tóxica (Kohen & Nyska, 2002). Reacciona indiscriminadamente con la mayoría de las biomoléculas que se encuentran cerca del sitio de formación debido a su vida media corta (Tafazoli, 2009; Yu, 1994). El radical OH^\bullet es un potente agente oxidante que puede reaccionar con la mayoría de moléculas orgánicas e inorgánicas en la célula, incluyendo el DNA, proteínas, lípidos, aminoácidos, azúcares y metales (Kohen & Nyska, 2002).

Las reacciones implicadas en la formación de las principales ROS son:



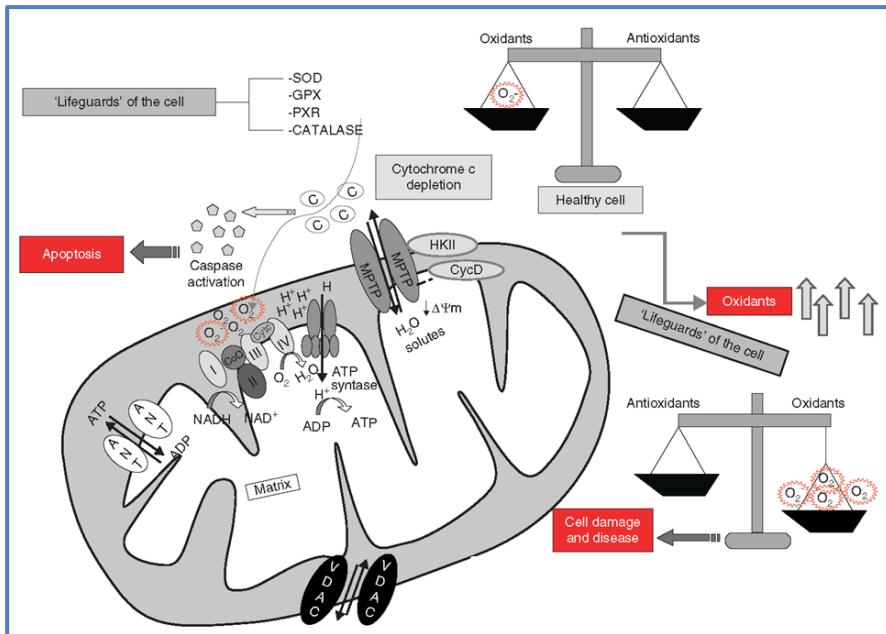


Figura 3: Las mitocondrias son la principal fuente de producción de ROS en las células. El anión superóxido se produce mayoritariamente en los complejos mitocondriales I y II. La excesiva acumulación de ROS puede conducir a un desequilibrio entre los mecanismos antioxidantes (enzimas tales como la SOD, catalasa, GPx, PXR) y las ROS producidas en la célula. Las ROS acumuladas pueden causar daño en la mitocondria. El aumento de ROS puede dañar el DNA mitocondrial y nuclear, puede causar la oxidación de tioles y peroxidación lipídica, que en última instancia puede conducir a la liberación del citocromo c, la apertura de poros de la transición de permeabilidad mitocondrial y finalmente apoptosis. ANT: translocador de ADP / ATP; CoQ: Coenzima Q; CycD: ciclofilina D; Cyt: citocromos c; GPx: glutatión peroxidasa; HKII: hexoquinasa II; MPTP: poro de transición de permeabilidad mitocondrial; PXR: peroxiredoxina; SOD: superóxido dismutasa; VDAC: Canales iónicos regulados por voltaje (Pereira et al., 2012). Imagen obtenida de Pereira et al., 2012.

Las especies reactivas del nitrógeno (RNS), como el óxido nítrico (NO^\bullet), el dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet) y el altamente reactivo peroxinitrito (ONOO^-), constituyen otra familia de moléculas reactivas en los sistemas biológicos.

- **Óxido Nítrico (NO^\bullet)**

El NO^\bullet es un gas incoloro y liposoluble sintetizado en varias partes del cuerpo (Bescós et al., 2012) y tiene una vida media corta que puede ser de 0,09 hasta 2 segundos (Thomas et al., 2001). Actualmente, se conoce que la síntesis de NO se produce a través de al menos dos vías fisiológicas: la reacción dependiente de la enzima Óxido Nítrico Sintasa (NOS) y la independiente de NOS (Figura 4). En el primer caso, la enzima NOS cataliza una reacción enzimática compleja que lleva a la formación de NO a partir de L-Arginina y oxígeno. En el segundo caso el óxido nítrico se sintetiza a través de la reducción de nitrato y nitrito, los principales productos de oxidación de NO (Bescós et al., 2012).

Esta molécula tiene un papel importante en muchas funciones como la regulación de la vasodilatación, el flujo sanguíneo, respiración mitocondrial y la función plaquetaria. El NO está implicado además en diversos procesos fisiológicos como por ejemplo la neurotransmisión noradrenérgica y no colinérgica, el aprendizaje y la memoria, la plasticidad sináptica y la neuroprotección (Brennan et al., 1999). La síntesis no regulada y excesiva puede contribuir a condiciones fisiopatológicas como el cáncer (Korde Choudhari et al., 2013), la diabetes, la hipertensión, el shock séptico, la deficiencia inmunitaria, la impotencia, la isquemia cerebral y algunos desórdenes neurodegenerativos (Brennan et al., 1999). A concentraciones muy elevadas es citotóxico induciendo la muerte celular por diversos mecanismos, incluyendo el daño al DNA, RNA, lípidos y proteínas (Brennan et al., 1999).

El NO^\bullet reacciona con el anión superóxido, formando el anión peroxinitrito (ONOO^-), un fuerte oxidante que causa la nitrosilación de proteínas (Balaguer et al., 2015).

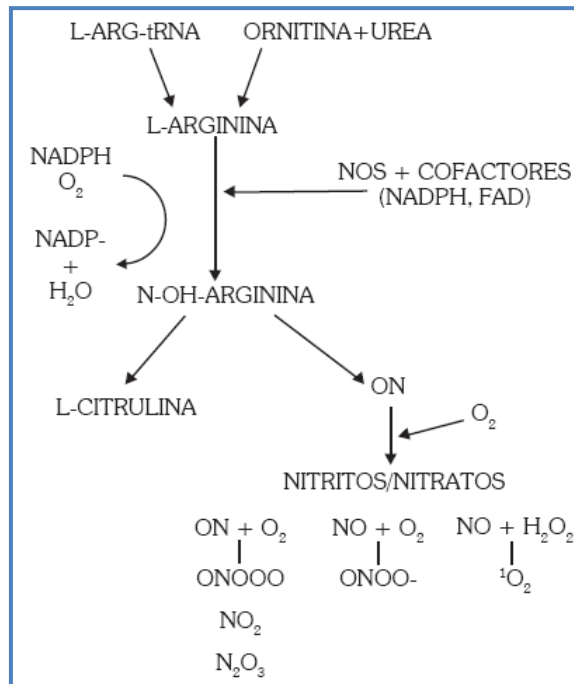


Figura 4: El óxido nítrico se produce a partir de la L-arginina por la acción de la óxido nítrico sintasa y algunos cofactores como el NADPH, FAD, FMN y tetrahydropterina. En el caso de la NOS se requiere, además, la participación de la calmodulina y calcio para activarse (Rosete et al., 1999). Imagen obtenida de Rosete et al., 1999.

2.5.2 Generación de radicales libres

La generación de ROS puede implicar moléculas endógenas o exógenas. La exposición a fuentes endógenas es más importante y extensa, ya que es un proceso continuo durante la vida útil de cada célula en el organismo (Kohen & Nyska, 2002). Entre las fuentes endógenas de las especies reactivas de oxígeno se puede nombrar las células, como por ejemplo los leucocitos que son los principales

productores endógenos de ROS con sus mecanismos inmunológicos frente a bacterias e invasores; las enzimas, algunas de ellas como producto de su actividad (como la formación de radicales superóxido por la xantina oxidasa) y otras producen directamente los ROS, como la NOS que produce radicales NO•, la respiración aeróbica, la mitocondria es el principal orgánulo responsable de la producción de ROS (Kohen & Nyska, 2002).

La producción excesiva de radicales libres puede ocurrir como respuesta a factores exógenos tales como la exposición a un xenobiótico, daño por radiación y enfermedades (Deavall et al., 2012). Las radiaciones ionizantes y no-ionizantes constituyen la mayor fuente exógena de ROS. Los contaminantes del aire como el humo del cigarro, del escape de los automóviles y los contaminantes industriales que abarcan muchos derivados del NO constituyen las principales fuentes de ROS que dañan el organismos por interacción directa con la piel o inhalación (Kohen & Nyska, 2002).

2.5.3 Estrés oxidativo inducido por xenobióticos como mecanismo de toxicidad

Los fármacos son también una fuente importante de ROS. Hay medicamentos, cuyo mecanismo de acción es mediado por la producción de ROS, otros que son donantes de NO• y otros que producen ROS de forma indirecta (Kohen & Nyska, 2002). En respuesta a la exposición a algunos fármacos hay evidencia de un aumento celular de ROS y que esa es la causa de la toxicidad del compuesto aunque muchas veces los mecanismos por los que se genera el estrés oxidativo no están completamente caracterizados (Deavall et al., 2012).

El estrés oxidativo inducido por fármacos está implicado en los mecanismos de toxicidad en numerosos tejidos y órganos, incluyendo el hígado, el riñón y los sistemas nervioso y cardiovascular (Deavall et al., 2012). Debido a la formación de especies de oxígeno muy reactivas por parte de xenobióticos, se relaciona la

toxicidad de los compuestos químicos con la producción de ROS (Figura 5) (Kappus & Clinic, 1987). Hay una gran diversidad de fármacos con efectos adversos que están asociados al estrés oxidativo en los que se incluyen fármacos antitumorales, antiinflamatorios no esteroideos, antirretrovirales, antipsicóticos, y analgésicos (Deavall et al., 2012). La medida en que los mecanismos de estrés oxidativo inducido por fármacos causan toxicidad varía según el compuesto (Deavall et al., 2012).

Los narcóticos y los gases anestésicos son considerados los principales contribuyentes a la producción de ROS (Kohen & Nyska, 2002). Una gran variedad de xenobióticos (por ejemplo, toxinas, pesticidas, y herbicidas como el paraquat) y productos químicos como el alcohol producen ROS como un subproducto de su metabolismo *in vivo* (Kohen & Nyska, 2002).

Los compuestos organofosforados se han utilizado ampliamente como pesticidas a nivel mundial. Estos productos químicos inducen estrés oxidativo como un posible mecanismo de acción. Los pesticidas pueden generar estrés oxidativo mediante irritación pulmonar que induce la generación del radical superóxido por los macrófagos; pueden ser más reactivos con un radical libre de oxígeno que vuelve a oxidarse para formar el anión superóxido; pueden ser ellos mismos radicales libres o pueden causar depleción de las defensas antioxidantes (Sharma et al., 2014). El efecto general es la producción de más radicales libres. Las actividades de la SOD, la glutatión (GSH) peroxidasa y la GSH reductasa disminuyen debido al consumo de enzimas para neutralizar los radicales libres generados por los plaguicidas (Amer et al., 2002; Sharma et al., 2014). Ejemplos de pesticidas que se conoce que causan toxicidad asociada al estrés oxidativo son el diclorvos, el paraquat, el malatión y el paratón (Sharma et al., 2014).

El metabolismo de un fármaco puede generar un intermediario reactivo que puede reducir directamente el oxígeno molecular para generar ROS como ocurre con la doxorubicina (Deavall et al., 2012). Otro antineoplásico, el cis-platino causa

toxicidad relacionada con el estrés oxidativo en múltiples tejidos y es un ejemplo de fármaco que exhibe toxicidad multiorgánica causada por un desequilibrio redox (siendo la nefrotoxicidad la mayor limitación del uso de este compuesto en clínica). Tanto *in vivo* como *in vitro* se ha demostrado que el cis-platino incrementa el estrés oxidativo mediante el aumento de los niveles de anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (Deavall *et al.*, 2012). Se ha verificado en ratas que el fallo renal agudo inducido por el cis-platino va acompañado de perturbaciones en las funciones e integridad mitocondrial (se sugiere que causadas por peroxidación lipídica), la depleción de antioxidantes (GSH peroxidasa y GSH reductasa), alteraciones en el potencial de la membrana, cambios de flujo de calcio, activación de la caspasa-3 y apoptosis (Santos *et al.*, 2007).

Diversos fármacos como el acetaminofeno y el ácido valproico (VPA) inducen lesión hepática causando disfunción mitocondrial y agotamiento del ATP (Pereira *et al.*, 2012). El acetaminofeno es un analgésico que puede causar hepatotoxicidad debido a la formación de un metabolito muy reactivo, el N-acetil-p-benzo-quinonamina (NAPQ1) que agota el GSH y se une a las proteínas, especialmente en las mitocondrias induciendo estrés oxidativo y formación de peroxinitrilo, produciendo daño en el DNA mitocondrial y la apertura del poro de transición mitocondrial y consecuentemente la muerte celular (Figura 6) (Deavall *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2012).

El ácido valproico es un antiepiléptico de amplio espectro y se usa de forma considerablemente segura a pesar de haber sido asociado con hepatotoxicidad idiosincrásica debida a esteatosis microvesicular (Pereira *et al.*, 2012). Se han hecho estudios de la implicación del estrés oxidativo en la hepatotoxicidad del VPA (Chang & Abbott, 2006). Se ha verificado que este fármaco presenta numerosas alteraciones en marcadores de estrés oxidativo como los isoprostanos y aldehídos indicadores de peroxidación lipídica. También se verificó que hepatocitos tratados con VPA exhibían un aumento de formación de ROS. En la sangre de los niños con

trastornos convulsivos que fueron sometidos a tratamiento con VPA se detectó daño oxidativo en el DNA en forma de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (Chang & Abbott, 2006; Pereira *et al.*, 2012; Schulpis *et al.*, 2006).

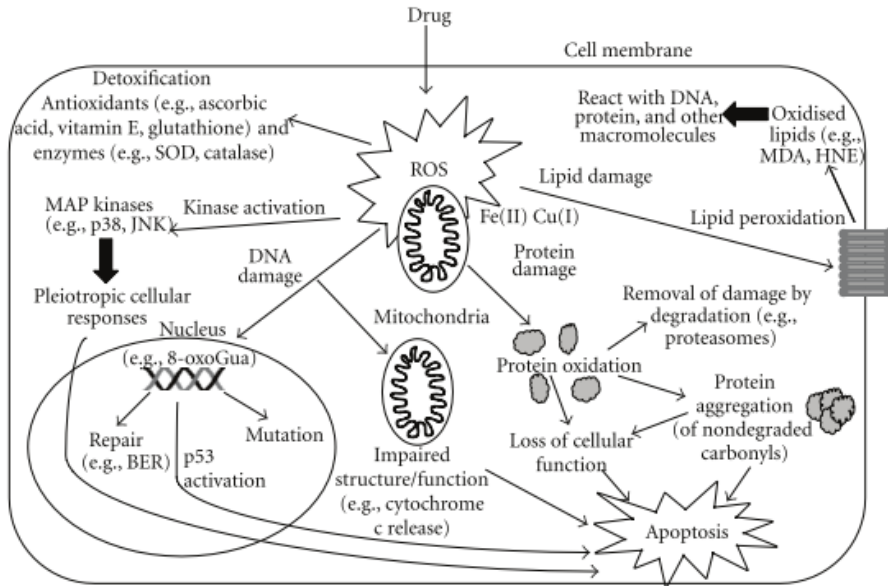


Figura 5: Mecanismos que conducen a los principales efectos causados por el estrés oxidativo inducido por xenobióticos. El aumento de los niveles intracelulares de ROS pueden ocasionar alteraciones en el DNA, oxidación de lípidos y proteínas. Imagen obtenida de Deavall *et al.*, 2012.

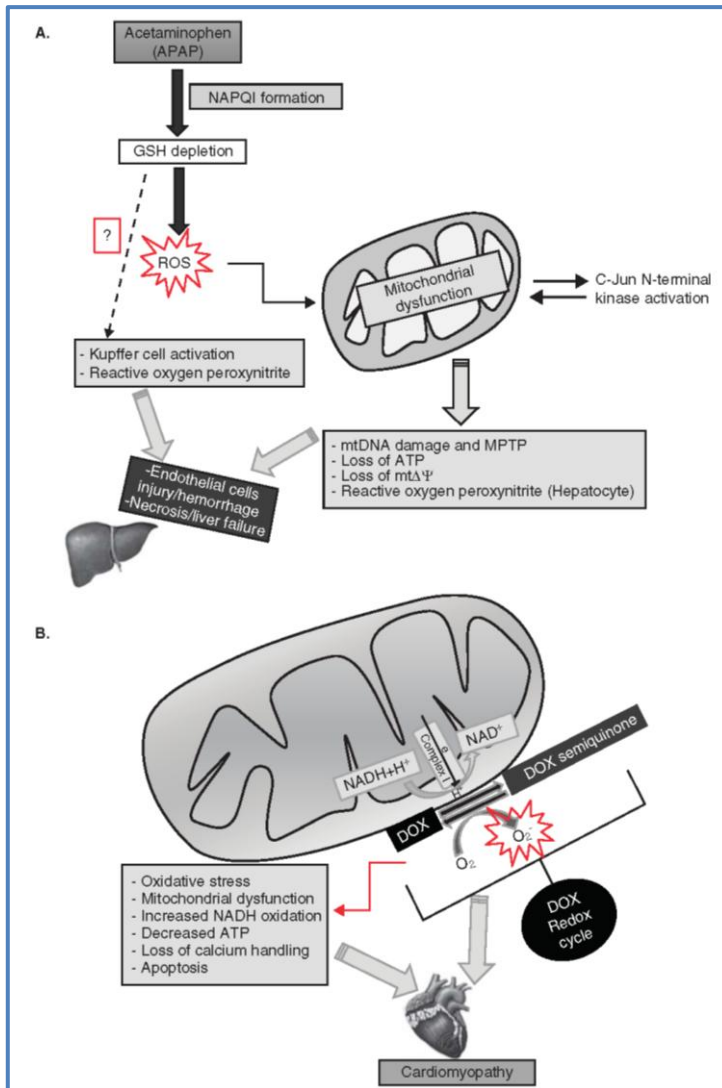


Figura 6: Posibles mecanismos que conducen al estrés oxidativo por parte de dos xenobióticos. A – El metabolismo del acetaminofeno causa la formación de un metabolito altamente tóxico (NAPQ1) que se une a las proteínas mitocondriales e inicia una cascada de estrés oxidativo debido a la depleción del GSH. B – La doxorubicina (DOX) causa el deterioro mitocondrial a través del ciclo en el complejo I, causando la transición de la permeabilidad mitocondrial, además de otras consecuencias mitocondriales causando cardiopatía en el tratamiento con DOX. Imagen obtenida de Pereira *et al.*, 2012.

2.5.4 Sistemas que contrarrestan las ROS

En la célula existen diferentes sistemas que contrarrestan la generación de ROS, ya sean los constituidos por moléculas capaces de eliminar directamente las ROS, como los basados en sistemas enzimáticos que actúan en cascada para eliminar rápidamente el $O_2^{\cdot-}$ y sus metabolitos (Raha & Robinson, 2001; Thirunavukkarasu *et al.*, 2004).

En condiciones fisiológicas los efectos perjudiciales de las ROS son contrarrestados por los sistemas antioxidantes (Abate *et al.*, 1990; Barrett *et al.*, 1999). Las células tienen una variedad de mecanismos de defensa como los antioxidantes de bajo peso molecular, tales como ácido ascórbico, vitamina E y glutatión, y enzimas antioxidantes tales como tiorredoxinas, SOD, catalasa y glutatión peroxidasa. Un ejemplo clave es la superóxido dismutasa de manganeso mitocondrial (MnSOD) que convierte los radicales superóxido a peróxido de hidrógeno, que posteriormente por acción de peroxidases para a agua (Deavall *et al.*, 2012). Como consecuencia de estas actividades, los niveles fisiológicos de ROS son bajos. Sin embargo la producción excesiva de ROS o una disminución en la capacidad antioxidante, provoca una situación de estrés oxidativo.

En este caso, las ROS inducen modificaciones irreversibles en las moléculas biológicas que resultan en el daño del tejido. Las ROS pueden alterar por ejemplo, la estructura y función de proteínas (Abate *et al.*, 1990; Barrett *et al.*, 1999) del DNA, y provocan peroxidación lipídica, con la consiguiente formación de productos secundarios tóxicos (Urso & Clarkson, 2003). Las ROS están también relacionados con la regulación del proceso de apoptosis. Aunque tradicionalmente se consideraron como inductores de la muerte celular, actualmente se sabe que también pueden jugar un importante papel como mensajeros secundarios, iniciando vías de señalización encaminadas a la supervivencia celular (Allen & Tresini, 2000; Navarro, 2005; Sastre, Pallardó, & Viña, 2000). A nivel molecular, el grado de daño

depende de muchos factores incluyendo el sitio de la producción de ROS, la reactividad del radical libre y la disponibilidad de iones metálicos. Proteínas y lípidos modificados pueden ser removidos por la renovación celular normal, pero el daño del DNA requiere mecanismos de reparación específicos (Deavall *et al.*, 2012).

Estos daños en el DNA ha sido asociados con la aparición y el desarrollo de muchas enfermedades incluyendo las enfermedades cardiovasculares, degeneraciones neurológicas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular isquémico) y el cáncer, así como con los procesos normales de envejecimiento (Deavall *et al.*, 2012).

2.5.5 Medición por CMF de ROS y RNS

La elevada reactividad y la relativa inestabilidad de las ROS y RNS, complica mucho su detección en los sistemas biológicos. Así, las determinaciones de la producción de estas moléculas se realizan a menudo de forma indirecta, valorando la generación de productos finales de la reacción de las ROS/RNS con componentes celulares, como los lípidos, proteínas o DNA (Freeman & Crapo, 1982; Pryor & Godber, 1991).

Un buen marcador de estrés oxidativo debe tener dos requisitos principales, por un lado el marcador debe aumentar en presencia de un incremento de los inductores de estrés oxidativo y por otro el marcador debe permanecer sin alteraciones en ausencia del estrés oxidativo (Pereira *et al.*, 2012).

Los ensayos fluorimétricos están entre las técnicas con mayor sensibilidad para detectar ROS en células vivas. Las células son incubadas con compuestos no fluorescentes que en presencia de ROS pasan a emitir fluorescencia. Además de la elevada sensibilidad y especificidad otros factores deben considerarse en el diseño de sondas para los sistemas biológicos tales como la baja auto-oxidación, alta fotoestabilidad, elevada solubilidad en medios acuosos y lipídicos, buena permeabilidad celular y baja interferencia del entorno biológico (Pereira *et al.*, 2012).

La generación de ROS y RNS puede ser determinada mediante análisis de fluorescencia utilizando diversos compuestos (Figura 7).

2.5.5.1 Detección de la actividad peroxidativa

La 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H₂DCF-DA) es un compuesto apolar que se convierte en un derivado polar no fluorescente impermeable a la membrana (H₂DCF) por esterasas celulares que eliminan los grupos acetado (DA). El H₂DCF es rápidamente oxidado a molécula fluorescente 2,7-diclorofluoresceína (DCF) en presencia de ROS intracelulares (Pereira et al., 2012). Inicialmente se pensaba que la DCF era un indicador específico de los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno producido (Cathcart et al., 1983; LeBel et al., 1992; Gomes et al., 2005). Más tarde se ha demostrado que la 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) es oxidada por otros ROS y RNS tales como el HO[•], NO[•] y ONOO⁻ (Gomes et al., 2005). Esta conversión ocurre en distintos pasos, primero la H₂DCF-DA es transportada a través de la membrana celular al citoplasma para ser después deacetilada por esterasas intracelulares a H₂DCF (Cathcart, Schwieters, & Ames, 1983; LeBel, Ischiropoulos, & Bondy, 1992) y en presencia de ROS, RNS y peroxidasa, este compuesto se convierte en DCF, una molécula muy fluorescente ($\lambda_{\text{excitación}} = 498\text{nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 522\text{ nm}$) (Gomes et al., 2005). La DCF es un indicador de la actividad peroxidativa celular (Gomes et al., 2005). Una limitación fundamental de la DCF es que su localización citosólica hace que pueda perderse fuera de la célula en las primeras etapas de la lesión de la membrana plasmática. La vida intracelular media de la DCF es de apenas algunos minutos lo que limita su uso en microscopia confocal, FCM y ensayos de lectores de microplacas en células intactas (Pereira et al., 2012).

2.5.5.2 Detección de anión superóxido

El indicador de anión superóxido hidroetidina (HE) se ha convertido en la sonda más usada en la determinación de los niveles intracelulares de superóxido. Esta molécula emite fluorescencia azul en el citoplasma hasta que es oxidada y se intercala en el DNA nuclear, tiñendo el núcleo de fluorescencia roja brillante (Pereira et al., 2012).

Recientemente se ha comercializado una nueva sonda fluorescente derivada de la HE para la detección más rápida y selectiva del anión superóxido en las mitocondrias de células vivas (Mukhopadhyay et al., 2007a; Mukhopadhyay et al., 2007b; Wojtala et al., 2014). El MitoSOX™ red dye (MitoSOX) es un indicador de anión superóxido mitocondrial altamente selectivo (no se une a otros ROS y NRS). Al entrar en célula, pasa a las mitocondrias donde es oxidado por el anión superóxido. Aquí la carga positiva del grupo fosfonio del MitoSOX se une selectivamente a la mitocondria donde se acumula debido al potencial de membrana mitocondrial, exhibiendo fluorescencia roja tras la oxidación y unión al DNA mitocondrial ($\lambda_{\text{excitación}} = 510 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 580 \text{ nm}$) (Mukhopadhyay et al., 2007a; www.thermofisher.com)

En diversos estudios recientes se ha validado el MitoSOX para el uso en microscopia confocal y citometría de flujo para la detección selectiva de la producción del anión superóxido mitocondrial en células endoteliales, cardiomiocitos, queratinocitos, fibroblastos, células epiteliales y células neuronales (Pereira et al., 2012).

2.5.5.3 Detección del óxido nítrico

El 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM DA) es un reactivo fluorogénico que permite la cuantificación de bajas concentraciones de óxido nítrico. El DAF-FM DA es un derivado mejorado de las diaminofluoresceínas con mayor sensibilidad, más fotoestable (más resistente al "photobleaching"), menos

sensible a alteraciones de pH y permite la determinación de los niveles de NO únicamente a nivel intracelular (Gomes et al., 2006; Pye et al., 2007). Es un compuesto esencialmente no fluorescente hasta que reacciona con el óxido nítrico (www.invitrogen.com). El DAF-FM DA exógeno atraviesa la membrana celular por difusión pasiva y, una vez dentro de la célula, es desacetilado por esterasas para generar DAF-FM intracelular (de baja fluorescencia) que en presencia de óxido nítrico, forma un derivado de benzotriazol, emitiendo fluorescencia verde (Balaguer et al., 2015). El rendimiento cuántico de la fluorescencia de DAF-FM es bajo (alrededor de 0.005), pero aumenta alrededor de 160 veces al ser oxidado por el NO (Balaguer et al., 2015).

2.5.5.4 Detección de 8-Oxo-guanina

Se cree que la generación de 8-Oxo-guanina (8-Oxo) es la forma más común de daño oxidativo del DNA siendo por eso, un marcador muy útil de oxidación del DNA. La 8-Oxo deriva de la adición del radical -OH a la posición C8 de la guanina. El kit comercial OxyDNA es un ensayo de fluorescencia para la detección *in vitro* del daño oxidativo en el DNA causado por los radicales libres. Se aplica al estudio en células fijadas y la fluorescencia puede ser cuantificada mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia. A diferencia de otros procedimientos que requieren la extracción o purificación de DNA de muestras biológicas, el ensayo con el kit OxyDNA es realizado y observado directamente en las células. El uso de algoritmos apropiados para la segmentación de la célula permite cuantificar los niveles de anticuerpo unido a la zona citosólica y nuclear, por lo que se puede determinar la presencia y la cantidad de 8-oxo en el DNA mitocondrial y nuclear (Cheng et al., 1992; Schneider et al., 1990; Shibutani, Takeshita, & Grollman, 1991; www.invitrogen.com).

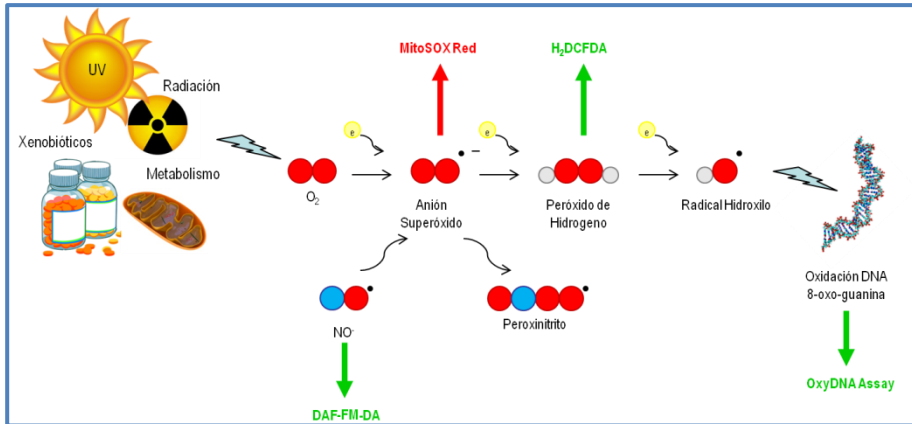


Figura 7: Formación de las especies reactivas de oxígeno y sondas fluorescentes que las miden.

3. Limitaciones de los métodos *in vitro*

En los estudios de toxicidad usando líneas celulares, se encuentran varias dificultades a la hora de extrapolarlo a la toxicidad *in vivo*. En este trabajo hemos encontrado dos problemas que se extienden a la mayoría de líneas celulares usadas: la presencia de mecanismos de eflujo de compuestos tóxicos y la pérdida de la capacidad de biotransformación en líneas celulares derivadas del hígado.

Una limitación de los métodos *in vitro* para predecir de forma precisa la toxicidad *in vivo* es la sobreexpresión en las líneas celulares, de mecanismos de resistencia a fármacos y xenobióticos.

3.1 Transportadores ABC

El movimiento de muchos fármacos y moléculas endógenas a través de la membrana celular se rige por los transportadores de proteínas. Los transportadores de membrana pueden ser divididos en dos grandes superfamilias: la familia de

transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) y la familia de transportadores de solutos (SLC) (Liang, Li, & Chen, 2015) que no será abordada en este trabajo.

La superfamilia de los transportadores ABC en humano incluye 49 genes agrupados en siete familias (de la ABCA a la ABCG) con diversas funciones y, al menos dieciséis de esas proteínas están implicadas en la resistencia a múltiples fármacos en cáncer (Cole, 2013; Di & Zhao, 2014). Son transportadores activos primarios que utilizan la energía a partir de la hidrólisis de ATP para transportar sustratos a través de la membrana contra un gradiente de concentración (Liang et al., 2015). Esta amplia superfamilia tiene un papel fundamental en la distribución y eliminación de xenobióticos en los diferentes tejidos que participan en los mecanismos ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) (Figura 8) (Kusch-Poddar, 2006; Liang et al., 2015). El fenómeno de la resistencia a múltiples fármacos en humanos, está asociado principalmente a tres transportadores ABC, la gp-P, el MRP1 y el ABCG2 (Robey et al., 2007), que son los principales transportadores de las tres principales subfamilias ABCB, ABCC y ABCG (Sarkadi et al., 2006).

Gracias a estudios clínicos y experimentales se ha podido establecer la capacidad de estos transportadores para reconocer una amplia gama de sustratos farmacológicos. Aunque la mayoría de los sustratos son compuestos hidrofóbicos, los transportadores ABC también son capaces de extruir una variedad de aniones y cationes anfipáticos. El transportador ABCB1 extruye preferentemente moléculas hidrofóbas grandes, mientras que ABCC1 y ABCG2 pueden transportar fármacos hidrofobos y compuestos anionicos grandes, como fármacos conjugados. Esta capacidad así como el reconocimiento de muchos sustratos en común por las tres clases principales de los transportadores ABC, proporcionan una elevada capacidad de resistencia a los fármacos en las células tumorales (Figura 9) (Sarkadi et al., 2006).

La Tabla 2 resume la distribución de estos transportadores en tejidos humanos, así como su papel fisiológico, sustratos endógenos y exógenos y patologías relacionadas (Liang et al., 2015). Con respecto a su papel fisiológico, los transportadores ABC muy probablemente evolucionaron como un sistema complejo de defensa celular para el reconocimiento y la eliminación mediante transporte activo de agentes tóxicos que entran en células u organismos desde su entorno (Sarkadi et al., 2006).

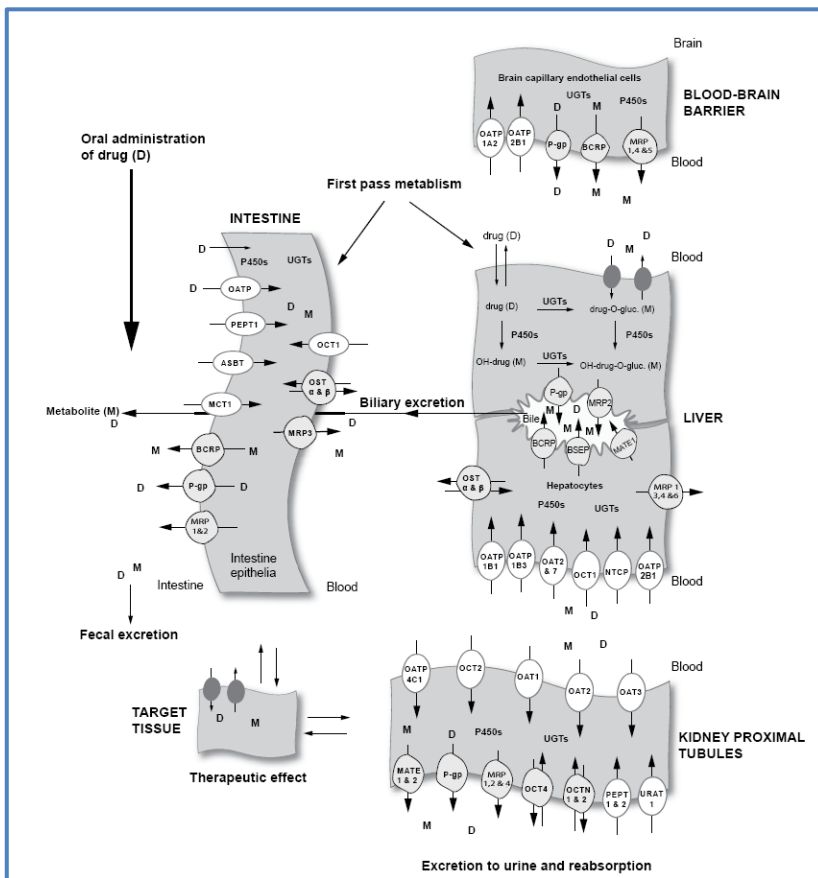


Figura 8: Esquema general de las proteínas de transporte de múltiples fármacos y sustancias endógenas expresadas en el epitelio intestinal, células endoteliales de los capilares cerebrales, hepatocitos y en los túbulos proximales y la presencia de las enzimas P450 y UGT en los mismos tejidos (pertenecientes a los órganos responsables por los mecanismos ADME). Después de ingerido el fármaco, los transportadores y enzimas de

metabolización pueden condicionar la biodisponibilidad del fármaco (D). El fármaco y/o el metabolito (M) pueden ser eliminados del cuerpo a través de la excreción de orina, bilis y heces. Imagen obtenida de (Darnell, 2012)

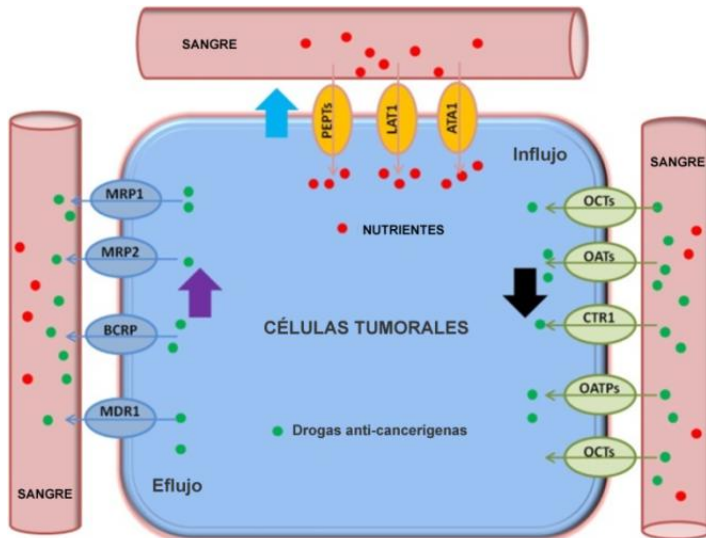


Figura 9: Modelo esquemático del desarrollo de resistencia a los fármacos en tumores debido a alteraciones en la expresión de los transportadores. Mientras los transportadores SLC, representados con óvalos verdes (OCTs, OATs, CTR y OATPs) introducen los medicamentos en las células tumorales, algunos transportadores ABC (MDR1, MRP1, MRP2 y BCRP – en azul) provocan la extrusión de esos fármacos, y ciertos transportadores SLC (PEPTs, LAT, y ATA1 – óvalos amarillos) median en la captación de nutrientes por las células cancerosas permitiendo su supervivencia. La disminución en la expresión de los transportadores SLC (flecha negra) responsables de la absorción de fármacos y/o el aumento de la expresión del transportador ABC (flecha morada) que permiten el flujo de salida de xenobióticos, hace que las células cancerosas sean más resistentes a los medicamentos contra el cáncer. El aumento de la expresión de los transportadores SLC (flecha azul) responsables de la captación de nutrientes también puede facilitar la resistencia a medicamentos al tener la ventaja de suministro de nutrientes permitiendo su supervivencia (Li & Shu, 2014). Adaptado de (Li & Shu, 2014).

3.1.1 Familia ABCB: Glicoproteína-P/ABCB1

La glicoproteína P (Gp-P, ABCB1), producto del gen MDR-1 es el causante de la resistencia a medicamentos mejor caracterizado, más estudiado y el primero en ser identificado (Hennessy & Spiers, 2007; Pétriz & García-López, 1997a; Pétriz, O'Connor, & García-López, 1996). Fue descrita farmacológicamente y bioquímicamente por primera vez en el año 1970 y posteriormente clonada en los años 1980 (Cole, 2013; Gottesman & Ling, 2006). La Gp-P es una glicoproteína fosforilada de 160 - 170kDa, que actúa como una bomba de eflujo multiespecífica dependiente de ATP (Kusch-Poddar, 2006; Sharma & Rose, 1995; Wang, Zhang, Kathawala, & Chen, 2014). La Gp-P tiene una gran variedad de sustratos que incluyen cationes orgánicos, bases orgánicas débiles, algunos aniones orgánicos y compuestos sin carga, como polipéptidos y sus derivados. También son sustratos algunas clases de fármacos entre los que se encuentran: quimioterapéuticos, inmunosupresores, antibióticos, antivíricos, opioides y bloqueadores de los canales de calcio (Fricker & Miller, 2004; Kusch-Poddar, 2006). La importancia clínica de la resistencia a fármacos mediada por la Gp-P, hizo que aumentara la investigación y esfuerzo de encontrar inhibidores. El verapamilo (bloqueador de los canales de calcio) y la ciclosporina A (inmunosupresor), son dos fármacos inhibidores de primera generación, pero que debido a su baja afinidad/capacidad de unión, son necesarias elevadas dosis para su uso clínico, causando toxicidad en el paciente (Hennessy & Spiers, 2007; Kusch-Poddar, 2006).

Como se describe en la Tabla 1, la Gp-P se expresa en una gran diversidad de tejidos normales vinculados a la secreción o a funciones de transporte (colon, intestino delgado, hígado, páncreas, riñón, útero y placenta) (Abdallah *et al.*, 2015), y en los tumores confiere el fenotipo de multirresistencia a fármacos (Figura 9), estando sobre expresada en tumores como el adenocarcinoma renal, hepatoma y

neuroblastoma (Giaccone & Pinedo, 1996), los tipos de tumores de los que proceden las líneas celulares más utilizadas en los estudios *in vitro* de nefrototoxicidad, hepatotoxicidad y neurotoxicidad. Esta sobreexpresión en células tumorales conlleva a una reducción significativa de la concentración intracelular de los fármacos antitumorales debida a su eflujo, disminuyendo su citotoxicidad (Abdallah et al., 2015). Sin embargo, no existen estudios sistemáticos sobre la influencia cuantitativa de los transportadores de fármacos en los datos de la citotoxicidad *in vitro* y su extrapolación a la toxicidad *in vivo* en humanos.

3.1.2 Familia ABCC: ABCC1/MRP1

Estas proteínas conocidas como proteínas asociadas a multiresistencia a fármacos (MRPs, familia ABCC) pertenecen a la superfamilia ABC de transportadores de membrana. Esta familia incluye 13 miembros (ABCC1 a ABCC23) (Wang et al., 2014). Los MRPs son transportadores de una gran variedad de sustratos incluyendo aniones orgánicos (ejemplo metotrexato), glutatión, compuestos conjugados como glucurónidos, varios análogos de nucleósidos y también fármacos neutros (Kusch-Poddar, 2006). Las familias ABCB y ABCC comparten la especificidad de los sustratos salvo algunas excepciones (Hipfner, 1999).

El primer miembro de esta familia descubierto fue MRP1 (ABCC1) debido a su capacidad de conferir multiresistencia a fármacos en células de cáncer de pulmón (Cole, 2013; Cole et al., 1992; Deeley & Cole, 2006), pero también se detectó en tejidos humanos normales (Kusch-Poddar, 2006). Es una proteína de 190 kDa que reconoce y transporta activamente muchos agentes antineoplásicos hidrofóbicos e hidrofílicos al exterior de las células, lo que causa una reducción en la acumulación del fármaco y hace que las células tumorales creen resistencia (Cole, 2013). MRP1 es responsable de la resistencia a fármacos en diversos tipos de cáncer, tales como

pulmón, mama, próstata y neuroblastoma (Munoz et al., 2007) y se encuentra sobre expresado en carcinomas de colon, vejiga, tiroide, cervix, glioma, fibrosarcoma y diferentes tipos de leucemia (Hipfner, Deeley, & Cole, 1999; Munoz et al., 2007). Según numerosos estudios en diversas preparaciones epiteliales, el MRP1 se localiza en la zona basolateral de las estas células (Kusch-Poddar, 2006; Zhang et al., 2004).

Además de su papel en la resistencia a los fármacos, la función de MRP1 (y proteínas relacionadas) es transportar activamente diversos aniones orgánicos, muchos de los cuales se forman por la biotransformación de diversos xenobióticos y moléculas endógenas por las enzimas de conjugación de fase II, tales como la glutatión S-transferasa, estando por lo tanto, involucrado en una serie de procesos celulares relacionados con el metabolismo de glutatión (Hipfner et al., 1999).

3.1.3 Familia ABCG: BCRP/ABCG2

ABCG2 fue el primer transportador identificado de esta familia en una línea celular de cáncer de mama (MCF-7/AdrVp) con elevada resistencia a doxorrubicina. Por esa razón se denominó BCRP del Inglés "*Breast cancer resistance protein*" (Doyle et al., 1998; Kusch-Poddar, 2006; Robey et al., 2007). Poco tiempo después, Allikmets et al. describieron un gen idéntico que nombraron ABCP expresado en la placenta (Allikmets et al., 1998) y, por otra parte el grupo de Robey denominó a un gen clonado de una línea celular de carcinoma de colon con resistencia a mitoxantrona, como MXR o "*mitoxantrone resistance gene*" (Miyake et al., 1999). Cuando se compararon las secuencias se verificó que eran esencialmente idénticas y que pertenecían a una subfamilia de transportadores ABC que no había sido asociada previamente a resistencia de múltiples fármacos en humanos y se asignó al gen el nombre ABCG2, siendo el segundo gen de la subfamilia G de los transportadores ABC (Robey et al., 2007).

ABCG2 se expresa fisiológicamente en células madre y una gran variedad de tejidos, siendo más abundante en la placenta y con menor expresión en el epitelio del intestino delgado, próstata, testículos, ovarios, colon, pulmón, riñón, cerebro, membrana canalicular del hígado y canaliculos biliares, glándulas suprarrenales y sudoríparas, así como en el endotelio de venas y capilares, incluyendo la barrera hematoencefálica (Doyle et al., 1998; Jonker et al., 2000; Sarkadi et al., 2006). Se ha demostrado también la elevada expresión de este transportador en islotes y células acinares del páncreas, en neumocitos alveolares, glándulas sebáceas, zona reticular de las glándulas adrenales, hepatocitos, en los túbulos corticales del riñón y epitelio de la próstata (Fetsch et al., 2006; Robey et al., 2007).

Al igual que Gp-P, ABCG2 es una glicoproteína de membrana localizada en la región apical en células polarizadas (Kusch-Poddar, 2006; Maliepaard et al., 2001; Sarkadi et al., 2006). ABCG2 es un transportador con una amplia especificidad de sustratos que incluyen moléculas grandes, cargadas positivamente y negativamente con carácter anfifílico/anfipático (Tabla 2) (Sarkadi et al., 2006). Varios sustratos son compartidos con la Gp-P, tales como la doxorubicina, daunorrubicina, Hoechst 33342 y Rodamina-123 (Tabla 2) (Doyle & Ross, 2003; Kusch-Poddar, 2006).

La expresión de ABCG2 en la membrana apical en células epiteliales a lo largo del tracto gastrointestinal y sus propiedades de transporte sugieren un importante papel de este transportador en la primera línea de defensa de las células contra los xenobióticos (Robey et al., 2007; Sarkadi et al., 2006). Esta protección se extiende además a los epitelios luminal biliar y renal responsables de la eliminación de toxinas (Sarkadi et al., 2006).

Tabla 2: Perfil biológico de los tres transportadores de drogas. Adaptado de Liang et al., 2015; Sarkadi et al., 2006.

Nombre Transportador	Distribución en los tejidos	Función fisiológica	Sustratos
MDR1 (ABCB1)	Universal; Mayoritariamente en: hígado, riñón, intestino delgado, colon, barrera hematoencefálica, barrera hematotesticular, barrera hematoplacentaria	Extrusión de xenobióticos de las células al espacio extracelular (ej. BBB) o para el exterior del cuerpo (ej. Intestino) o para detoxificación vía renal y hepática	Fármacos: Etoposido, doxorubicina, vincristina, diltiazem, verapamilo, indinavir, ritonavir, eritromicina, ketoconazole, ciclosporina A, tacrolimus, digoxina, quinidina Otros: Esteroides, lípidos, bilirrubina, ácidos biliares, testosterona, progesterona
MRP1 (ABCC1)	Extendida: hígado, riñón, barrera hematorraquídea, barrera hematotesticular, cardiomiocitos, placenta, próstata Menor expresión: intestino delgado, colon, cerebro	Extrusión de xenobióticos y metabolitos endógenos Secreción de leucotrieno (LTC4) por leucocitos	Fármacos: Vicristina, metotrexato, saquinavir, grepafloxacina antraciclinas, etoposide, teniposide Otros: LTC4, conjugado de glutatión del ácido etacrínico, estradiol-17-D-glucurónido, GSH, glutatión oxidado
BCRP (MXR) (ABCG2)	Intestino, hígado, riñón, cerebro Placenta, colon, pulmón, glándulas suprarrenales, mamarias y sudoríparas, barrera hematoencefálica, células troncales	Regulación de la absorción intestinal y secreción renal y biliar de sustratos, y protección del cerebro y feto frente a toxinas; Papel muy importante en la resistencia a fármacos. Transporte normal de hemo durante la maduración de los eritrocitos	Fármacos: Metotrexato, mitoxantrona, análogos de la camptotecina (SN-38, etc), topotecán, Irinotecán, flavopiridol Otros: 4-metilumbeliferona glucurónido, estradiol-17-D-glucurónido, colesterol, estradiol

3.1.4 Análisis por CMF de la función de transporte de fármacos

Los niveles de transportadores ABC en las células pueden ser determinados mediante varias técnicas. Se puede identificar las proteínas con anticuerpos específicos usando las técnicas de Western blot, inmunohistoquímica y CMF, también a través de la determinación de los niveles de mRNA de los transportadores (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y Northern blot), y mediante el análisis de su actividad funcional por CMF (Pétriz & García-López, 1997b).

Se pueden evaluar fenotipos de resistencia a múltiples fármacos con precisión mediante el uso de ensayos funcionales de los transportadores ABC (García-Escarp et al., 2004). El análisis funcional de los transportadores puede realizarse mediante diversas técnicas: usando sustratos marcados con radioactividad (^3H vinblastina), a través del análisis cinético del transporte de fármacos usando sustratos de transportadores ABC unidos a compuestos fluorescentes (cumarina-vinblastina), y la determinación por CMF del eflujo de sondas fluorescentes (Pétriz & García-López, 1997b).

Los ensayos funcionales por FCM permiten medir el flujo activo de salida de sustratos fluorescentes específicos de esos transportadores. Los primeros estudios en los que se utilizó la citometría de flujo para monitorizar el eflujo de fármacos datan de la década de 1980. Estos ensayos y la tinción simultánea con anticuerpos monoclonales han sido ampliamente utilizados para caracterizar funcional y fenotípicamente las células tumorales con resistencia a múltiples fármacos (García-Escarp et al., 2004). La detección de la actividad de transportadores multi-fármaco en muestras de tumores humanos es de gran interés clínico, particularmente en la investigación de sustratos que puedan revertir el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (Pétriz & García-López, 1997b).

Varios fármacos antitumorales como las antraciclinas (doxorubicina, daunorrubicina, mitoxantrona), tienen propiedades fluorescentes, de forma que pueden ser utilizadas para cuantificar su captación, su retención y su eflujo en células tumorales. Además de fármacos también existen sondas fluorescentes muy conocidas y de muy baja toxicidad, que son sustrato de los transportadores ABC, tales como la rodamina-123 (Rh123), bis-benzimidazoles (Hoechst 33342) (Pétriz & García-López, 1997b), Bodipy-VER, JC-1 (Sarkadi et al., 2006), Syto13 (Wlodkowic et al., 2008), 3,3'-dietiloxacarbocianina yoduro (DiOC₂(3)), 3,3'-dietiloxadicarbocianinayoduro (DODC), derivados de tiazol y oxazol (SY-38 y SY-3150 respectivamente), y sondas fluorescentes de calcio (Indo-1AM, fluo-3AM, Calceína y Calceína-AM) (Pétriz & García-López, 1997b).

Los transportadores ABCB1, ABCC1 y ABCG2 comparten la especificidad de muchos sustratos (Figura 10) y para identificar el transportador que se expresa en las células es imprescindible el uso simultáneo de sustratos fluorescentes e inhibidores específicos.

La Gp-P además de compartir con el ABCG2 sustratos tales como la doxorubicina, daunorrubicina, Hoechst 33342 y Rh123 (Figura 10 y Tabla 3) (Doyle & Ross, 2003; Kusch-Poddar, 2006) comparte además inhibidores tales como el verapamilo. Un inhibidor muy específico de alta afinidad de la resistencia a fármacos en células tumorales que expresan ABCG2 (Sarkadi et al., 2006) es la fumitremorgina C, una toxina derivada del hongo *Aspergillus fumigatus*, que puede ser utilizada para estudios farmacológicos *in vitro*, pero que debido a su elevada neurotoxicidad, no se puede usar en animales y humanos (Kusch-Poddar, 2006; Rabindran et al., 2000).

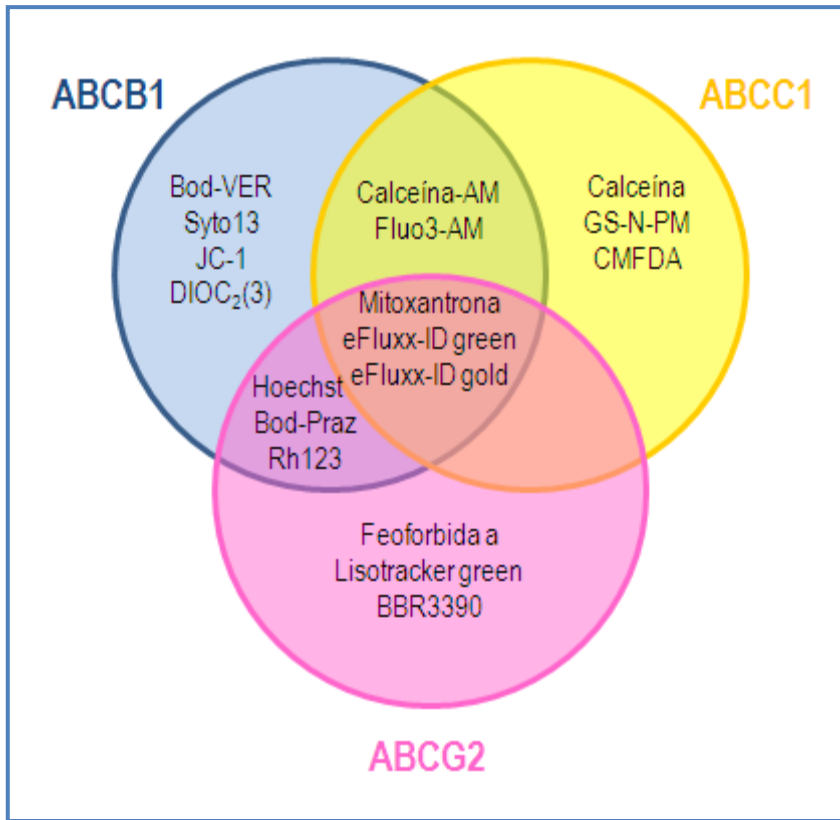


Figura 10: Diagrama de Venn de las sondas fluorescentes utilizadas en estudios funcionales de transportadores ABC. Algunas de las sondas son selectivas para uno o dos transportadores pero la mayoría tienen especificidades solapadas. (Lebedeva, Pande, & Patton, 2011; Sarkadi et al., 2006; Schinkel & Jonker, 2012). Adaptado de Sarkadi et al., 2006.

Tabla 3: Sustratos fluorescentes e inhibidores de los transportadores ABCB1, ABCC1 y ABCG2. (Lebedeva et al., 2011; Sarkadi et al., 2006; Schinkel & Jonker, 2012). Adaptado de (Sharom, 2008).

Nombre Transportador	Sustratos Fluorescentes	Inhibidores
MDR1 (ABCB1)	BODIPY-VER Syto13 JC-1 DIOC ₂ (3) Hoechst 33342 Rh123 BODIPY-prazosin Calceína-AM Fluo3-AM Mitoxantrona eFluxx-ID green eFluxx-ID gold	Primera generación Verapamilo Ciclosporina A Segunda generación PSC833 (Valspodar) VX-710 (Biricodar) Tercera generación OC144-093 (Ontogen) GF120918 (Elacridar) XR9576 (Tariquidar) LY335979 (Zosuquidar)
MRP1 (ABCC1)	GS-N-PM CMFDA Calceína Calceína-AM Fluo3-AM Mitoxantrona eFluxx-ID green eFluxx-ID gold	Probenecid VX-710 (Biricodar)
BCRP (MXR) (ABCG2)	Feoforbida a Lysotracker green BBR3390 Hoechst 33342 Rh123 BODIPY-prazosin Mitoxantrona eFluxx-ID green eFluxx-ID gold	Cicloporina A Fumitremorgina C GF120918 (Elacridar) Ko143 Pantoprazole XR9576 (Tariquidar) VX-710 (Biricodar)

3.2 Metabolismo de xenobióticos – biotransformación *in vitro*

Como se ha descrito anteriormente, el uso de modelos animales para el estudio de la toxicidad humana, tiene la ventaja de tener en cuenta los diferentes mecanismos de regulación (ADMEtox), aunque también cuenta con la desventaja de las diferencias entre especie, además de las ya comentadas como el elevado coste, el problema ético-animal y el tiempo dedicado a los experimentos, así como la elevada variabilidad. Por lo contrario, el uso de líneas celulares continuas, mejora estos aspectos, pero carece de la complejidad del organismo, además de la pérdida de muchas características típicas de sus tipos celulares, como por ejemplo la expresión de enzimas con actividad de biotransformación.

El uso de líneas celulares para predecir la toxicidad *in vivo* es limitado en los estudios de toxicidad dependiente de biotransformación. Las líneas celulares continuas y los cultivos primarios de células hepáticas son las más utilizadas como modelos *in vitro* para determinar la toxicidad hepática (Soldatow et al., 2013; Tomida et al., 2015) a pesar de sus limitaciones (Tabla 4).

Los hepatocitos inmortalizados sufren la pérdida de la mayor parte de sus actividades de biotransformación (Aninat et al., 2006; Donato & O'Connor, 2004; Martínez-Romero et al., 2004). La línea celular HepG2 se ha usado ampliamente en estudios de daño hepático *in vitro*, pero carece de funciones específicas del hígado, particularmente del metabolismo de xenobióticos realizado por el citocromo P450 (CYPs) (Guguen-Guillouzo & Guillouzo, 2010; Tomida et al., 2015).

Los cultivos primarios de hepatocitos humanos por otra parte, han sido los más elegidos a la hora de estudiar la toxicidad y el metabolismo de xenobióticos (Hewitt et al., 2007; LeCluyse, 2001; Tomida et al., 2015) aún siendo fenotípicamente inestables, muy variables (variabilidad entre donantes y tipo de metabolizador), de difícil disponibilidad y de tiempo de vida muy limitado (Guguen-Guillouzo & Guillouzo, 2010; Tomida et al., 2015).

Los avances en el área de cultivo celular, han permitido que algunas líneas celulares continuas mantengan sus características normales sin perder sus funciones especializadas (Zucco, 1992).

Recientemente, se ha desarrollado una nueva línea celular humana derivada de carcinoma hepatocelular, la línea HepaRG (Gripon et al., 2002). Esta línea presenta una alternativa prometedora, ya que, al contrario que las líneas celulares continuas como las HepG2, expresa los marcadores de hepatocitos, y mantiene varias funciones metabólicas, secretoras y de actividad de desintoxicación de drogas (Aninat et al., 2006).

En cultivo, estas células pueden diferenciarse de un estado de células progenitoras a hepatocitos maduros y a células biliares primitivas, manteniendo la funcionalidad relativamente estable durante varias semanas a elevada confluencia (Jossé et al., 2008; Mueller et al., 2015). Expresan de 81% a 92% de los genes activos en hepatocitos humanos y, también un subconjunto de genes específicos relacionados con su estado transformado, algunas anomalías cromosómicas y la presencia de progenitores de células epiteliales biliares (Mueller et al., 2015; Rogue et al., 2012).

Por todo lo descrito, se espera que estas células puedan ser una alternativa al uso de hepatocitos primarios y otras líneas celulares continuas para el estudio de la toxicidad in vitro y el metabolismo de xenobióticos.

Tabla 4: Modelos para determinación de hepatotoxicidad y características. Adaptada de Schroeder et al., 2011; Wilk-Zasadna et al., 2015.

Modelo Características	Ventajas	Limitaciones
<p>Hígado aislado perfundido</p> <p><i>Cultivo órgano ex vivo</i> Más parecido a in vivo</p>	<p>Enzimas y cofactores totales del hígado; estructura del hígado; todos los tipos de células del hígado; flujo de bilis</p>	<p>Necesidad de tejido fresco; viabilidad muy limitada (2-3h); sólo se puede testar uno o unos pocos compuestos; diferencias entre especies (no se puede utilizar el humano); baja reducción del número de animales</p>
<p>Muestra/corte de tejido hepático</p> <p><i>Cultivo de tejido ex vivo</i></p> <p>Parecido a in vivo</p>	<p>Mantiene la estructura hepática básica, las funciones metabólicas competentes al menos durante las primeras fases de incubación; enzimas y cofactores totales del hígado; mayoría de los tipos celulares presentes en el hígado; interacciones célula-célula.</p>	<p>Requiere una preparación y técnicas de incubación especializadas; diferencias en el flujo de los nutrientes dependiendo del espesor del corte; deterioro gradual; se necesita tejido fresco; viabilidad limitada (≈ 24h); células dañadas en la superficie de corte; aireación marginal de las células interiores; no tiene flujo de bilis; crio preservación limitada.</p>
<p>Cultivos primarios de hepatocitos aislados (también criopreservados)</p> <p><i>Cultivo celular ex vivo de biopsias o hígados</i></p>	<p>Considerado el estándar – contiene todos los enzimas y cofactores de la metabolización de xenobióticos; refleja la variación inter-individual – es recomendable testar con múltiples “lotes” (batches); posibilidad de crio preservar; posibilidad de hacer cribados de alto contenido</p>	<p>En cultivo baja la capacidad de metabolización de xenobióticos (las funciones metabólicas disminuyen con el tiempo); refleja variación inter-individuos – puede ser una desventaja dependiendo del propósito del estudio; muy caro/costoso, requiere espacios especializados; necesidad de procedimientos y técnicas específicas bien establecidas; pérdida de la estructura del hígado; variabilidad entre lotes (Viabilidad, eficiencia de adhesión)</p>

<p>HepaRG</p> <p><i>Cultivo in vitro</i></p>	<p>Mantiene la capacidad metabólica comparable a los hepatocitos humanos; puede usarse en estudios de aclaramiento hepático; ofrece buena reproducibilidad y robustez experimental.</p>	<p>No puede aportar información de la variabilidad inter-individuo – representa únicamente un donante.</p>
<p>HepG2</p> <p><i>Cultivo in vitro</i></p>	<p>Ampliamente usada en toxicología a pesar de la falta de actividad metabólica; buena herramienta para estudiar los compuestos parentales; buena reproducibilidad inter-experimentos; posibilidad de crio preservar; posibilidad de hacer cribados de alto contenido.</p>	<p>Ausencia o baja expresión de enzimas; actividad enzimática endógena de CYP limitada; inestabilidad de genotipo y fenotipo.</p>
<p>Microsomas de hígado</p> <p><i>Suspensión celular de fracción de orgánulos</i></p>	<p>Consistentemente representa el tejido original y puede ser usado en estudios iniciales de caracterización y cuantificación de perfiles metabólicos; fácil de usar; posibilidad de crio preservar; posibilidad de hacer cribados de alto contenido.</p>	<p>No adecuado como sistema in vitro de pruebas de toxicidad reales; patrones metabólicos de elevada variabilidad; los microsomas sólo contienen CYPs, FMOs y UGTs; ausencia de enzimas de la fase II; requiere suplementos de co-factores; extrapolación limitada a la situación in vivo; perfil metabólico parcial.</p>
<p>Células modificadas genéticamente</p> <p><i>Sistema artificial</i></p>	<p>Buena reproducibilidad inter-experimental; crio preservación posible; adecuado para cribado de alto contenido.</p>	<p>Número de limitado de enzimas por experimento; necesidad de estudio piloto; estudio a corto plazo; extrapolación limitada a la situación in vivo.</p>
<p>Células embrionarias y células troncales pluripotentes inducidas</p>	<p>Exhibe funciones hepáticas específicas como el almacenamiento de glicógeno, gluconeogénesis, síntesis de urea, glucuronoconjugación y propiedades farmacológicas tales como la actividad de enzimas de las fases I y II.</p>	<p>Potencialmente prometedoras – Dudas entre fenotipo adulto/fetal; actividad P450 relativa; elevado coste.</p>

OBJETIVOS

El objetivo principal del estudio es mejorar el valor predictivo de la citotoxicidad basal como alternativa *in vitro* a los animales de laboratorio, mediante la puesta a punto de procedimientos miniaturizados de cultivo celular y la incorporación de parámetros más específicos, indicadores de dianas moleculares. Esto se abordará mediante la investigación de las alteraciones celulares tempranas inducidas por compuestos tóxicos, aplicando una plataforma de ensayos de toxicidad de alto contenido, el conjunto de ensayos denominados "Panel Citómico de Ensayos de Estrés Oxidativo".

Los objetivos concretos son:

1 – Miniaturizar y optimizar un Panel Citómico de Ensayos de Estrés Oxidativo basado en la citometría de flujo en líneas celulares humanas.

2 – Evaluar la capacidad predictiva de toxicidad humana aguda *in vivo* del Panel Citómico de Ensayos de Estrés Oxidativo, mediante la correlación de los valores de citotoxicidad obtenidos en los ensayos de estrés oxidativo con los obtenidos en ensayos *in vitro* de referencia.

3 – Determinar la capacidad del Panel Citómico de Ensayos de Estrés Oxidativo para clasificar correctamente los compuestos usando un sistema de estimación de riesgo de toxicidad química en humanos, adaptado del Sistema de Armonización Global (GHS).

4 – Determinar la capacidad del Panel Citómico de Ensayos de Estrés Oxidativo para predecir la toxicidad órgano-específica.

5 – Aplicar el Panel Citómico de Ensayos de Estrés Oxidativo al análisis cuantitativo *in vitro* de la citotoxicidad basal y la toxicidad dependiente de biotransformación de diferentes xenobióticos.

6 – Determinar la expresión de transportadores multifármaco en las líneas utilizadas.

METODOLOGÍA

1. Cultivos Celulares

1.1 Líneas celulares

Las siguientes líneas celulares establecidas humanas (ECACC, European Collection Cell Cultures, Salisbury, UK y Life Technologies) han sido utilizadas para determinar la citotoxicidad basal órgano específica.

A704 (ECACC No 93020513) es una línea celular humana derivada de un adenocarcinoma de riñón.

HepG2 (ECCAC No 85011430) es derivada de un carcinoma hepático bien diferenciado. Esta línea celular produce un gran rango de proteínas, presenta valores despreciables de enzimas de biotransformación.

SH-SY5Y (ECCAC No 94030304) es una sublínea de la línea de neuroblastoma SK-N-SH establecida a partir de una metástasis en hueso.

HepaRG (Life Technologies HPRGC10) es una línea celular que mantiene la expresión de enzimas que participan en la activación de los compuestos químicos.

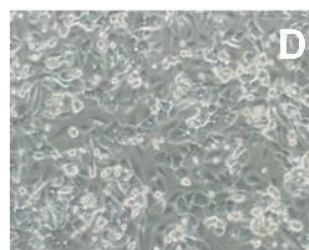
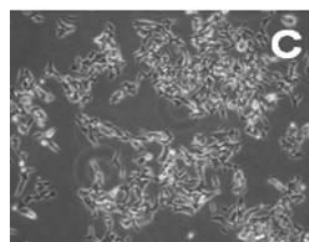
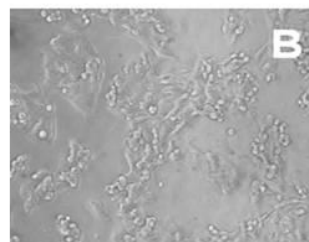
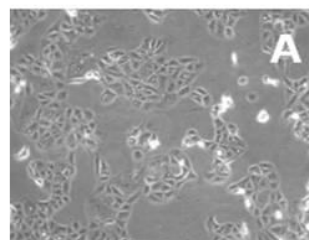


Figura 11: líneas celulares utilizadas. A – A704; B – HepG2; C – SY-SY5Y; D – HepaRG

1.2 Medios de cultivo

1.2.1 Medios de cultivo rutinarios

a) Cultivo de células A-704: medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) con sales de Earle y bicarbonato sódico, sin L-Glutamina (Sigma, M2279).

Suplementado con:

- 10 % SBF inactivado por calor (Gibco, 16140-071)
- 1% aminoácidos no esenciales (Gibco, 11140)
- 2 mM Glutamina (Gibco,25030-024)
- 100 UI/mL Penicilina y 100 µg/mL Estreptomina (Gibco, 15140-031)
- 1 mM Piruvato Sódico (Gibco, 11360-039)

b) Cultivo de células HepG2: medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) con sales de Earle y bicarbonato sódico, sin L-Glutamina (Sigma, M2279).

Suplementado con:

- 10 % SBF inactivado por calor (Gibco, 16140-071)
- 1% aminoácidos no esenciales (Gibco, 11140)
- 2 mM Glutamina (Gibco,25030-024)
- 100 IU/mL Penicilina y 100 µg/mL Estreptomina (Gibco, 15140-031)

c) Cultivo de células SH-SY5Y: mezcla 1:1 de medio Dulbecco modificado con Eagle y medio Ham F12 con Glutamax (Gibco, 31331) suplementado con:

- 15 % SBF inactivado por calor (Gibco, 16140-071)
- 1% aminoácidos no esenciales (Gibco, 11140)
- 2 mM Glutamina (Gibco,25030-024)

- 100 IU/mL Penicilina y 100 µg/mL Estreptomicina (Gibco, 15140-031)

d) Cultivo de células HepaRG: Medio William's E (Gibco, 12551) adicionado con:

- 10% (v/v) de suero HyClone FetalClone inactivado por calor (Celbio).
- 1% aminoácidos no esenciales (Gibco, 11140)
- 2 mM Glutamina (Gibco, 25030-024)
- 100/mL Penicilina y 100 µg/mL Estreptomicina (Gibco, 15140-031)
- 5 µg/ml de Insulina bovina (Sigma Aldrich, I6634)
- 50 µM de hidrocortisona (Sigma Aldrich, H0888)

1.2.2 Medios de cultivo para el tratamiento con tóxicos

Se utiliza el medio de cultivo rutinario de cada línea suplementado con 5% de SBF.

1.2.3 Medio de diferenciación de HepaRG

Se utiliza el medio de cultivo rutinario suplementado con 2% (v/v) de DMSO.

1.3 Crecimiento y mantenimiento del cultivo celular

Tras su recepción los viales de las células criopreservadas son almacenados en nitrógeno líquido.

1.3.1 Congelación y descongelación

Cuando las líneas celulares A704, SH-SY5Y y HepG2 alcanzan el 60-80% de confluencia en cultivo se despegan del frasco con la ayuda de tripsina, se centrifugan y se cuentan utilizando una cámara de Neubauer. Son resuspendidas después en SBF al 10% de DMSO (agente criopreservante), alicuotadas en crioviales estériles y almacenadas en un congelador a -80°C en el recipiente “Mr Frosty” durante varias horas, se consigue así un descenso de temperatura gradual de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ necesaria para la preservación de la viabilidad celular. En el caso particular de las células HepaRG, se dejan proliferar durante dos semanas hasta superar en 100% de confluencia y posteriormente se congelan de forma similar a la descrita para las demás líneas celulares. Las células son almacenadas a continuación en nitrógeno líquido hasta su utilización.

1.3.2 Descongelación

Se introducen los criotubos en el baño a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ y se agitan hasta su total descongelación, e inmediatamente son transferidos a frascos de cultivo que contienen medio de cultivo rutinario ya atemperado.

1.3.3 Mantenimiento y cultivo rutinario

Las líneas celulares crecen como monocapa en frascos de cultivo (25 cm^2) o placas de cultivo de 96 pocillos a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, $90\% \pm 5\%$ humedad, y $5.0\% \pm 1\%$ CO_2 . Las células son observadas diariamente al microscopio de contraste de fases, y cualquier alteración morfológica deberá ser anotada. Cuando las células se encuentran entre el 50 – 80% de confluencia son extraídas del frasco con tripsina-EDTA 0.25% y subcultivadas a la mitad de confluencia.

1.3.4 Siembra de placas de cultivo

Las células en fase logarítmica de crecimiento son sembradas en placas de 96 pocillos con medio de cultivo rutinario a la concentración final de $1,4 \times 10^5$, 2×10^5 y 9×10^4 células/mL para SH-SY5Y, HepG2 y A704, respectivamente y son incubadas a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $90\% \pm 5\%$ humedad y $5.0\% \pm 1\%$ CO_2 durante 24 horas.

1.4 Crecimiento y mantenimiento de la línea HepaRG

Para el cultivo de esta línea celular se ha seguido las recomendaciones descritas anteriormente en diversos artículos científicos (Aninat et al., 2008; Guillouzo et al., 2007; Jennen et al., 2010; Kanebratt & Andersson, 2008; Lübberstedt et al., 2011).

Al contrario de las demás líneas celulares, las células HepaRG no se dividieron hasta pasadas dos semanas de incubación con medio de cultivo. Entonces se sembraron las placas de 96 pocillos en la proporción de 1 frasco para 4 placas.

Estas células necesitan ser cultivadas a baja densidad, en la que adquieren la morfología de células indiferenciadas con apariencia de fibroblastos. Se dejaron proliferar durante 2 semanas hasta llegar a una confluencia elevada. Después se reemplazó el medio de cultivo por medio de diferenciación (medio de cultivo suplementado con 2% (v/v) de DMSO) y se incubaron durante 2 a 3 semanas (cambiando el medio cada 2 días) permitiendo la formación de colonias de células con apariencia de hepatocitos maduros (hepatocyte-like-cells) (Figura 12) delimitadas por estructuras típicas de canalículos biliares y que expresan marcadores específicos de hígado (Aninat, 2005).

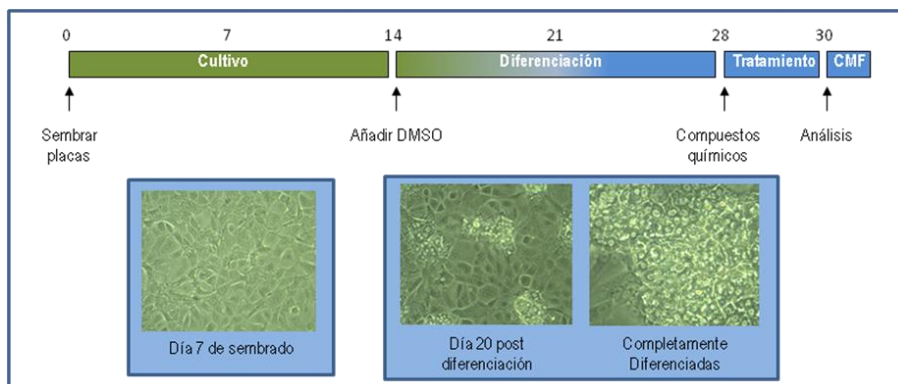


Figura 12: Resumen del cultivo, diferenciación, tratamiento y pase de muestra de la línea celular HepaRG (adaptado de www.medscape.com).

2. Fármacos y xenobióticos en estudio

2.1 Selección de Fármacos y xenobióticos

Para la selección de la librería de compuestos para nuestro estudio de citotoxicidad *in vitro* se han seguido las recomendaciones del ECVAM Biostatistics Task Force. Se han seleccionado 60 compuestos de referencia (Tabla 5), que incluyen fármacos y productos químicos industriales y biocidas, de los que se dispone de datos de toxicidad aguda *in vivo* (LD50 o LC50 en sangre) en diferentes registros de toxicidad, que abarcan un rango de toxicidad tisular en animales y humano y que tienen diferentes mecanismos de toxicidad y dianas tisulares y sistémicas.

Están incluidos compuestos de las diferentes categorías de toxicidad (del 1 al 5) de acuerdo con el Sistema Global de Armonización de Clasificación y Etiquetado de químicos (GHS) (Sjöström *et al.* 2008). Además, en la mayoría de los casos, se ha establecido la correlación entre su citotoxicidad basal *in vitro* (IC50 en el ensayo de captación de Rojo Neutro) y su toxicidad aguda *in vivo* (LD50), según los resultados del principal estudio multicéntrico disponible de correlación de toxicidad *in vitro/in vivo*, el estudio MEIC (Multicenter Evaluation of *In vitro* Cytotoxicity)

(Scheers, Ekwall, & Dierickx, 2001), con su estudio derivado ADEIT (Clemedson et al., 2002)

Además el conjunto de tóxicos seleccionados incluye, por una parte, compuestos en los que los ensayos de citotoxicidad basal predicen la toxicidad humana aguda y compuestos que no se localizan sobre la recta de regresión en la correlación *in vitro/in vivo* (“outliers”).

Tabla 5: Compuestos tóxicos de estudio. SNC – sistema nervioso central; SNP – sistema nervioso periférico. Datos extraídos o generados por el consorcio del Proyecto ACuteTox (AcutoxBase) (Clemedson et al., 2002; Galofré et al., 2010; Kinsner-Ovaskainen et al., 2009).

Compuesto	Uso Común	Tipo de toxicidad / órgano diana
17 α -Ethinilestradiol	Fármaco – contraceptivo oral	Aumento relativo del riesgo de carcinoma del endometrio y de cáncer de mama. Colestasis
2,4-Ácido diclorofenoxiacético	Herbicida	SNC, hígado, riñón y corazón
5-Fluorouracilo	Fármaco – Antitumoral	Corazón, medula ósea, sistema inmune y sangre
Acetaminofeno	Fármaco – Antiinflamatorio	Hepatotóxico. Estrés oxidativo, hígado, riñón, SNC
Acetonitrilo	Industria – Solvente	Pulmón, sangre, riñón, hígado y SNC
Ácido Acetilsalicílico	Fármaco – Analgésico, antipirético y antiinflamatorio	Sangre
Amiodarona clorhidrato	Fármaco – Antiarrítmico	Sistema cardiovascular, pulmón, hígado
Amitriptilina clorhidrato	Fármaco – Antidepresivo	SNC y corazón
Arsénico trióxido	Industria – Producción de otros compuestos de arsénico usados en insecticidas, fungicidas y herbicidas.	Citotoxicidad, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad. Aparato digestivo
Atropina monohidrato sulfato	Fármaco – Usado en oftalmología y como antídoto en casos de envenenamiento por organofosfatos y hongos	SNC, SNP, corazón. Es un antagonista de los receptores muscarínicos.
Benceno	Industria – Producción químicos: polímeros, detergentes, pesticidas, fármacos, etc. Uso como solvente y aditivo de gasolina	Sangre, medula ósea, hígado y SNC. Genera radicales de oxígeno

Tabla 5:(Continuación).

Cadmio cloruro	Industria – Usado en baterías, pesticidas y fungicidas. Presente en materiales industriales, otros metales y combustibles fósiles	Riñón, hígado, pulmón y linfocitos T
Cafeína	Fármaco, aditivos de comidas y bebidas. Usado como estimulante del SNC, antidepresivo y calmante del dolor	SNC, corazón, riñón
Carbamazepina	Fármaco – Anticonvulsivo. Usado en el tratamiento de epilepsia, dolor neurálgico y trastorno bipolar afectivo	Nervios, sangre, hígado, riñón, sistema endocrino
Cloral hidrato	Industria y fármaco – hipnótico y sedante. Usado como anestésico en medicina veterinaria	Nervios, riñón, corazón, SNC, hígado
cis-Diaminoplatino (II) dicloruro	Fármaco antineoplásico	Nefrotoxicidad, neurotoxicidad. Riñón, hígado, intestinos
Colchicina	Fármaco antiinflamatorio.	Hígado
Cicloheximida	Fármaco – Antibiótico. Usado en combinación con otros agentes en el tratamiento de varios tipos de cáncer. Usado en agricultura como fungicida	Riñón, glándulas adrenales
Ciclosporina A	Fármaco – Inmunosupresor. Usado en trasplantes de órganos	Riñón, hígado
Diazepam	Fármaco – Ansiolítico. Sedante, anticonvulsivo, anestésico, relajante muscular	SNC
Diclorvos	Pesticida. Insecticida organofosforado.	SNC, sangre, corazón, ojos, hígado
Dietilenglicol	Industria – Solvente anticongelante y humectante de tabaco, esponjas sintéticas, corcho, etc	Hepatotoxicidad y neurotoxicidad. Riñón, hígado, nervios
Digoxina	Fármaco – Tratamiento de arritmias y fallo cardíaco	Corazón, aparato digestivo, SNC
Dimetilformamida	Industria – Solvente orgánico usado en industria química y laboratorios	Toxicidad hepática y del aparato digestivo
Diquat dibromuro	Herbicida	Riñón, aparato digestivo. Estrés oxidativo
Epinefrina bitartrato	Fármaco utilizado en choques anafilácticos y reanimación cardíaca, tratamiento de asma y glaucoma. Cirugías, inmunoterapia, etc	Sistema nervioso simpático, corazón, músculo liso
Etanol	Componente de bebidas alcohólicas. Solvente usado en laboratorios y en industria de fármacos, perfumes, etc	Hepatotoxicidad. Sistema nervioso central y cardiovascular

Tabla 5:(Continuación).

Etilenglicol	Industria – Anticongelante, solvente. Ingrediente de condensadores electrolíticos	SNC, corazón y riñón
Amonio glufosinato	Herbicidas y algunos pesticidas	SNC
Hexaclorobenceno	Industria, fungicida, herbicida	Hígado, sangre
Hexaclorofeno	Antiséptico, bacteriostático. Usado como fungicida y bactericida en agricultura	SNC, piel, aparato digestivo
Hierro (II) sulfato	Industria – fertilizantes, suplementos alimentario, fármaco, etc	Riñón, SNC, sistema cardiovascular. Vasculitis y
Isopropanol	Industria química. Solvente anticongelante, antiséptico y usado como fármaco	SNC, sistema cardiovascular, pulmón
Lindano	Pesticida	SNC, hígado riñón
Litio sulfato	Industria. Fármaco – tratamiento psiquiátrico: manía, depresión endógena, psicosis y esquizofrenia	SNC, riñón, sistema cardiovascular
Malatión	Pesticida	CNS, músculos, corazón
Mercurio (II) cloruro	Industria. Antiséptico, desinfectante	Riñón, sistema vascular, aparato digestivo
Metanol	Industria. Solvente. Anticongelante	CNS, páncreas, hígado y corazón
Nicotina	Fármaco. Biocida. Usado en veterinaria en el tratamiento frente a los parásitos. Cigarros.	SNC, SNP
Ocratoxina A	Micotoxina existente en cereales, café, frutos secos.	Nefrotoxicidad. Carcinogénico
Orfenadrina clorhidrato	Fármaco. Antidepresivo; usado como medicación en la enfermedad de Parkinson; actividad antihistamínica; relajante muscular	SNC, corazón, hígado
Paraquat dicloruro	Herbicida (uso doméstico y en agricultura)	Pulmón, riñón, hígado. Generación de radicales libres
Paratión	Pesticida usado en agricultura	SNC, SNP
Pentaclorofenol	Biocida. Usado en la industria textil y en productos sanitarios y desinfectantes	Hígado, corazón, riñón, sistema vascular, SNC
Fenobarbital	Fármaco. Barbitúrico, depresor del SNC, anticonvulsivo (epilepsia), sedante (ansiedad) y utilizado en el tratamiento de la hiperbilirrubinemia neonatal	SNC, corazón
Fisostigmina	Fármaco usado en Oftalmología y como antídoto en intoxicaciones por compuestos con efectos anticolinérgicos y antidepresivos tricíclicos	SNC, SNP

Tabla 5:(Continuación).

Propranolol clorhidrato	Fármaco bloqueador β -adrenérgico. Tratamiento de hipertensión, arritmias, angina de pecho, infarto de miocardio, glaucoma de ángulo abierto, migrañas	SNC, hígado, riñón
Pireno	Industria. Utilizado para hacer tintes, pesticidas, productos farmacéuticos y plásticos	Pulmón, hígado, aparato digestivo (datos obtenidos de animales experimentales)
Rifampicina	Fármaco. Antibiótico (tuberculosis y lepra)	Hígado
Sodio cloruro	Aditivo de comida fundamental	SNC, pulmón, riñón, sistema vascular
Sódico fluoruro	Fármaco. Previene caries. Tratamiento de osteoporosis	Veneno celular (la formación de fluoruro de calcio hace que disminuya la concentración plasmática de calcio)
Dodecilsulfato sódico (SDS)	Detergente usado en la industria cosmética. Tóxico de referencia en pruebas toxicológicas	Desconocido
Sodio selenato	Insecticida usado en horticultura de plantas no comestibles	(Selenio): SNC, corazón, pulmón, hígado, riñón
Ácido valproico	Fármaco anticonvulsivo	SNC, sistema cardiovascular, hígado
Estricnina	Se utiliza en medicamentos veterinarios, en raticidas, y avicidas	SNC, corazón, hígado, riñón
Talio sulfato	Industria. Raticida.	Corazón, riñón, hígado, SNC, sistema vascular, SNP
<i>tert</i> -butilo Hidroperóxido	Industria química	Inductor de peroxidación; reducción de los niveles de glutatión en eritrocitos humanos.
Tetraciclina clorhidrato	Fármaco – Antibiótico bacteriostático	Riñón y hígado
Verapamilo clorhidrato	Fármaco. Tratamiento hipertensión, arritmias cardiacas, taquicardias, angina de pecho y otros trastornos cardiovasculares	Sistema cardiovascular, hígado. Bloqueador de los canales de calcio
Warfarina	Fármaco anticoagulante. Usado como raticida	Hígado, sistema vascular

2.2 Preparación de los compuestos tóxicos y tratamiento de las células

Para la preparación de las correspondientes soluciones de trabajo, se tuvieron en cuenta las propiedades de solubilidad de los compuestos a estudiar.

Las células en fase logarítmica de crecimiento se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas antes de añadirles los compuestos tóxicos permitiendo así que las células se adhirieran correctamente y pudieran incorporar el tóxico. La incubación de las células con los tóxicos fue de 24 horas para SH-SY5Y y de 48 horas para A704, HepG2 y HepaRG en las condiciones descritas anteriormente.

2.2.1 Tratamiento con los compuestos tóxicos solubles en DMSO o etanol

Para los tóxicos disueltos en DMSO o etanol, la concentración final de estos solventes en las células fue de 0,5% v/v en los controles del vehículo y en todas las concentraciones del tóxico. Para ello se preparó una solución madre del tóxico 200 veces concentrada en DMSO/etanol y a partir de ella, se hicieron diluciones seriadas en el mismo solvente aplicando el factor de dilución conveniente. Se realizó una dilución 1/100 en medio de cultivo de cada una de las diluciones realizadas previamente. Por último, se añadieron 100 μL de medio de cultivo con 5% de SBF por pocillo a la placa de 96 pocillos donde se había sembrado la monocapa de células y finalmente se añadieron 100 μL de cada una de las diluciones de los tóxicos en el medio obteniendo la concentración final (1x) de los compuestos y 0,5% v/v de DMSO o etanol en medio.

2.2.2 Tratamiento con los compuestos tóxicos solubles en medio de cultivo

Se preparó una solución madre del tóxico 2 veces concentrada en medio de cultivo al 5 % de SBF. Se hicieron diluciones seriadas aplicando el factor de dilución apropiado añadiendo 100 μL de cada una de las diluciones de los tóxicos a la placa donde previamente se había añadido 100 μL de medio de cultivo con 5 % de SBF por pocillo.

3. Determinación de los efectos de fármacos y xenobióticos

3.1 Ensayos de determinación de la viabilidad celular

De acuerdo con las recomendaciones de los ensayos clásicos de citotoxicidad, en una primera fase de experimentos se estudió un rango amplio de concentraciones (factor $2^{\sqrt{10}} = 3.16$) para establecer la IC50, definida como la concentración de tóxico que produce el 50% de muerte celular y elegir las concentraciones de tóxico utilizadas para el panel citómico de estrés oxidativo. Para la IC50 se utilizaron los ensayos de Yoduro de Propidio y de captación de Rojo Neutro.

3.1.1 Ensayo de captación de Rojo Neutro

Este método se basa en el descrito por Borenfreund y Puerner (1985). La captación del colorante Rojo Neutro por los lisosomas y endosomas de las células

vivas se utiliza como una indicación cuantitativa del número de células y la viabilidad.

Preparación de soluciones

- **Solución stock de Rojo Neutro**

Se preparó la solución stock de Rojo Neutro (Sigma, N2889) a la concentración de 3,3 mg/mL en agua destilada. Se filtró la solución con un filtro de 0,45 µm de diámetro para evitar la posterior formación de cristales. Esta solución puede almacenarse durante meses en oscuridad a temperatura ambiente.

- **Solución de Rojo Neutro en medio de cultivo**

Se prepara una solución de Rojo Neutro de 33 µg/mL en medio de cultivo suplementado con 5% de SBF. La solución debe mantenerse a 37° C antes de añadirse a las células.

- **Solución de fijación/permeabilización**

La solución de fijación se preparó con las siguientes proporciones:

- 1% solución de ácido acético glacial (Sigma, 537020)
- 50% Etanol absoluto (Sigma, 34923)
- 49% H₂O destilada

Procedimiento

Se desechó el sobrenadante con los compuestos químicos y se lavaron las células con 100 µL de PBS y se añadió la solución de Rojo Neutro en medio de

cultivo durante 1 hora en un incubador a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, $90\% \pm 5\%$ de humedad y $5.0\% \pm 1\%$ CO_2 . Posteriormente se descartó el medio con rojo neutro, se lavaron las células con $100\ \mu\text{L}$ de PBS y se añadió la solución de fijación. Se midió la absorbancia en un lector de placas a $540\ \text{nm}$.

3.1.2 Ensayo de exclusión de Yoduro de Propidio

Pasado el tiempo de incubación con el tóxico, el sobrenadante de cada pocillo se transfirió de la placa a tubos de polipropileno para no perder las células necróticas y apoptóticas despegadas de la monocapa. Se lavaron los pocillos con $50\ \mu\text{L}$ de PBS libre de Mg^{2+} y Ca^{2+} (Sigma, D5652). Se añadieron $50\ \mu\text{L}$ de tripsina-EDTA 25% (Gibco, 25200-072) por pocillo y se incubaron 5 minutos a 37°C . Posteriormente se añadió a los pocillos $100\ \mu\text{L}$ de una solución de medio con Yoduro de Propidio (YP) (Tabla 6) y se añadió la solución a los tubos que contenían el medio de cultivo con los tóxicos y el PBS. Se incubó a $37\ ^{\circ}\text{C}$ en oscuridad durante 5 minutos y se analizó con el citómetro de flujo FC500 (Beckman-Coulter, Brea, CA) excitando a $488\ \text{nm}$ y emitiendo a $635\ \text{nm}$ (fluorescencia naranja).

3.2 Determinación de Estrés Oxidativo y Nitrosativo

3.2.1 Panel Citómico de Ensayos de Estrés Oxidativo

El panel citómico consta de la determinación por citometría de flujo de tres parámetros celulares relacionados con la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en líneas celulares humanas adherentes:

Niveles intracelulares de anión superóxido: se mide utilizando el fluorocromo MitoSOX™ Red (se excita a $488\ \text{nm}$ y emite a $625\ \text{nm}$)

Actividad peroxidativa: se mide utilizando el fluorocromo H₂DCF-DA (se excita a 488 nm y emite a 525 nm)

Niveles intracelulares de óxido nítrico: se mide utilizando el fluorocromo DAF-FM-DA (se excita a 488 nm y emite a 525 nm).

Para cada compuesto toxico son elegidas cinco dosis dentro del rango de IC20-IC80 de forma a que se obtenga una curva dosis-respuesta amplia entre concentraciones críticas permitiendo determinar la EC50, la concentración en molar de tóxico que produce el 50% de la intensidad de fluorescencia máxima detectada.

3.2.1.1 Preparación de los fluorocromos

Las soluciones stock de MitoSOX Red, H₂DCFDA y DAF-FM-DA se preparan de acuerdo con las instrucciones del proveedor y se mantienen a -80°C. Las concentraciones, así como el solvente, la casa comercial y referencia de los fluorocromos están indicados en la Tabla 6.

Tabla 6: Características de los fluorocromos utilizados en los ensayos de citometría de flujo.

Fluorocromos	Referencia / Casa comercial	Solvente	Tiempo de incubación (minutos)	[] Stock	[] Final A7M y SH-SY5Y	[] Final HepG2
H ₂ DCF-DA	D-6883 / SIGMA	DMSO	30	2 mM	10 µM	4 µM
MitoSOX Red	M36008 / INVITROGEN	DMSO	30	0,5 mM	1,25 µM	1,25 µM
DAF-FM-DA	D-23842 / INVITROGEN	DMSO	15	2,5 mM	2 µM	2 µM
YP	P-4170 / SIGMA	H ₂ O	5	1,5 mM	3,75 µM	3,75 µM

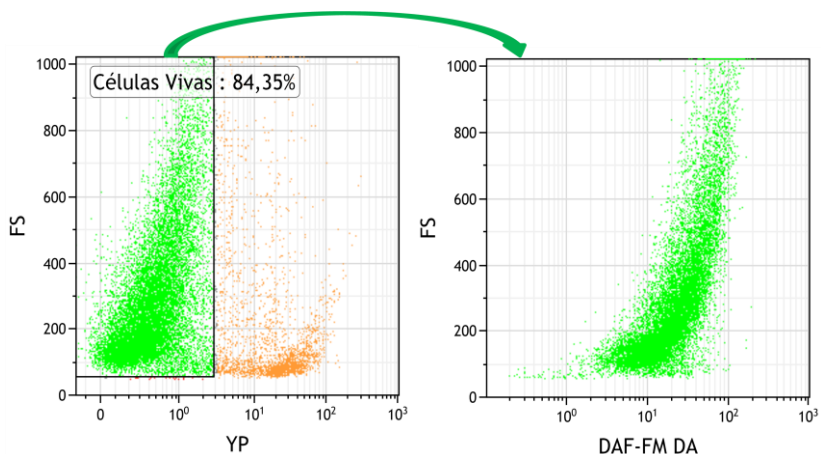
3.2.1.2 Tinción celular y análisis en el citómetro

El procedimiento para la detección de las especies reactivas es similar al de la determinación de viabilidad con YP (Tabla 6). Los protocolos citómicos para la

medida de la dispersión de la luz y de las emisiones de fluorescencia se diseñaron de forma que permitiera combinaciones multiparamétricas compatibles a nivel del espectro y de la compensación. Los valores de fluorescencia que midieron los parámetros funcionales se restringieron (“gating”) a la población de células vivas identificadas por sus propiedades morfológicas y de exclusión. Las combinaciones multiparamétricas incluyeron el tamaño celular (dispersión frontal de la luz); granularidad intracelular (dispersión lateral de la luz - 90°); indicadores de la viabilidad celular e indicadores de estrés oxidativo y nitrosativo.

Se adquirió un número suficiente de eventos celulares que garantizaba la obtención de mediciones estables y significativas. Un rango de 2000-10000 eventos es suficiente para este propósito.

Figura 13: Gráfica bivariada de puntos (dotplot) que muestra un ejemplo de la selección de la población de células vivas mediante el tamaño celular (FS) y la exclusión del YP. Los parámetros funcionales se determinaron exclusivamente en la población de células vivas.



3.2.2 Ensayo de determinación de la 8-oxo-guanina (8-Oxo)

La cuantificación de la 8-Oxo fue realizada por HCA por bioimagen, usando un microscopio epifluorescente automatizado (In Cell Analyzer 1000, GE Healthcare) y de acuerdo con las instrucciones indicadas en el kit OxyDNA (Calbiochem).

Este ensayo se realizó en las líneas celulares A704, SH-SY5Y y HepG2. En HepaRG no se cuantificó la alteración 8-Oxoal DNA debido a que, para los estudios de metabolismo, se necesita las células diferenciadas. Para ello, es fundamental que las células crezcan a una confluencia superior al 100% de la monocapa. Ese efecto impide la correcta segmentación y cuantificación del daño causado, por el software de análisis de imagen del In-Cell-Analyzer, y consecuentemente imposibilita la correcta cuantificación de ese parámetro.

Este ensayo se basa en la unión directa de un anticuerpo conjugado a una molécula fluorescente (FITC) a moléculas de 8-Oxo presentes en la guanosina del DNA oxidado de las células fijadas. Para la tinción del núcleo se utilizó DAPI.

Los pasos esenciales del procedimiento son:

- Fijación con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos en hielo.
- Deshidratación con Metanol al 75% y 95%.
- Permeabilización con Metanol al 99%, 30 minutos en hielo.
- Bloqueo de los sitios de unión no específica con una solución de bloqueo durante 45 minutos a 37°C.
- Incubación con el anticuerpo conjugado con FITC durante la noche a 4°C con agitación.
- Tinción nuclear con DAPI (1µg/mL).

A diferencia de otros procedimientos, que requieren la extracción o purificación del DNA a partir de muestras biológicas, este ensayo permite observar el efecto directamente en las células.

3.2.2.1 Análisis de imagen en el In Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare)

El análisis de imagen fue realizado con el software de análisis "Investigator Developer Toolbox" (GE Healthcare) utilizando algoritmos apropiados para la segmentación celular y el cálculo de los datos.

Antes de la cuantificación de la fluorescencia se aplicó a todas las imágenes la corrección del ruido de fondo. Se utilizó la tinción con DAPI para definir el núcleo mediante un algoritmo de segmentación basado en la detección de los límites de la región de interés, que permite separar las células de forma individual. Esto permitió la cuantificación de la 8-Oxo en dos compartimentos distintos – el núcleo y la mitocondria (Figura 14). La medición del daño oxidativo fue únicamente determinado en células que estaban vivas, justo antes de la fijación celular, ya que todas las células utilizadas son adherentes y en el momento en que pierden la viabilidad, se despegan de la placa y de esa forma, son descartadas.

Se consideró una variación del 20% de la intensidad de fluorescencia para todos los compuestos estudiados en comparación con las células no tratadas teniendo en cuenta que es la variación ocasionada por el control positivo para la medición de este parámetro.

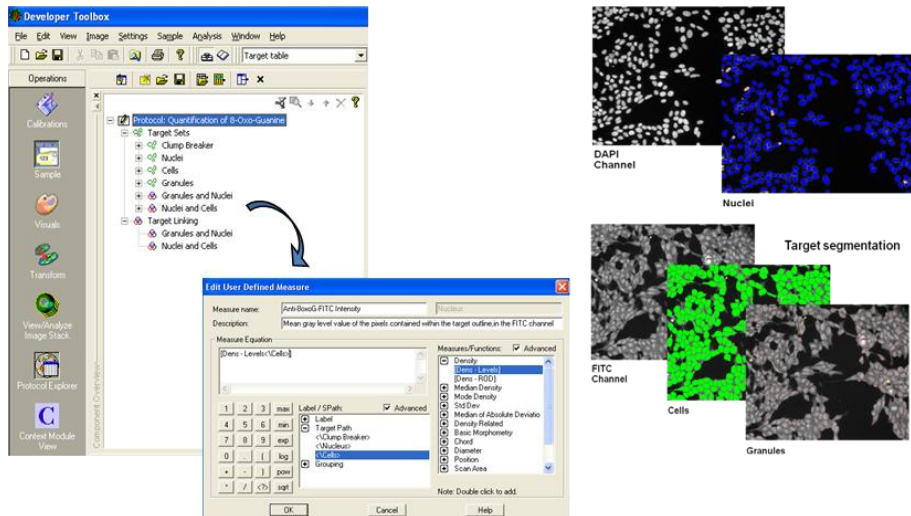


Figura 14: Esquema del análisis realizado con el software Investigator Developer Toolbox (GE Healthcare) para obtener la MFI de la 8-Oxo-FITC por separado en los núcleos y citoplasma de las células.

4 Controles positivos

Para las etapas de optimización de los ensayos citómicos se han seleccionado una serie de controles positivos, compuestos que modifican de forma conocida los diferentes parámetros celulares examinados mediante los ensayos citómicos. El conjunto de controles positivos se recoge en la Tabla 7. En todos los casos (tóxicos en estudio y controles positivos) se consideraron como controles negativos los pocillos incubados con el volumen adecuado del vehículo de administración del compuesto exógeno.

La toxicidad inducida por los controles positivos fue determinada por citometría de flujo y HCA por bioimagen. Se midió la viabilidad, los niveles intracelulares del

anión superóxido, óxido nítrico, actividad peroxidativa y los niveles de 8-Oxo en el DNA nuclear y mitocondrial.

Tabla 7: Controles positivos usados para validar el Panel Citómico de Ensayos de Estrés Oxidativo.

Compuesto	Parámetro que modifica	Referencia / Casa comercial	Tiempo de incubación	Concentración
Plumbagina	Generación de superóxido	P-7262 / SIGMA	1h	10 - 50 μ M
tert-butilo Hidroperóxido	Estrés oxidativo / peróxidos	B-2633 / SIGMA	1h	100 - 400 μ M
NOR-1	Generación de óxido nítrico	sc-202736 / Santa Cruz Biotechnology	-	2 μ M
Colchicina	Produce más 8-oxoG que el control positivo habitual - azul metileno + luz	27650 / FLUKA	24h	100 - 320 μ M
Microondas	Rotura membrana celular/ muerte celular	-	Segundos	

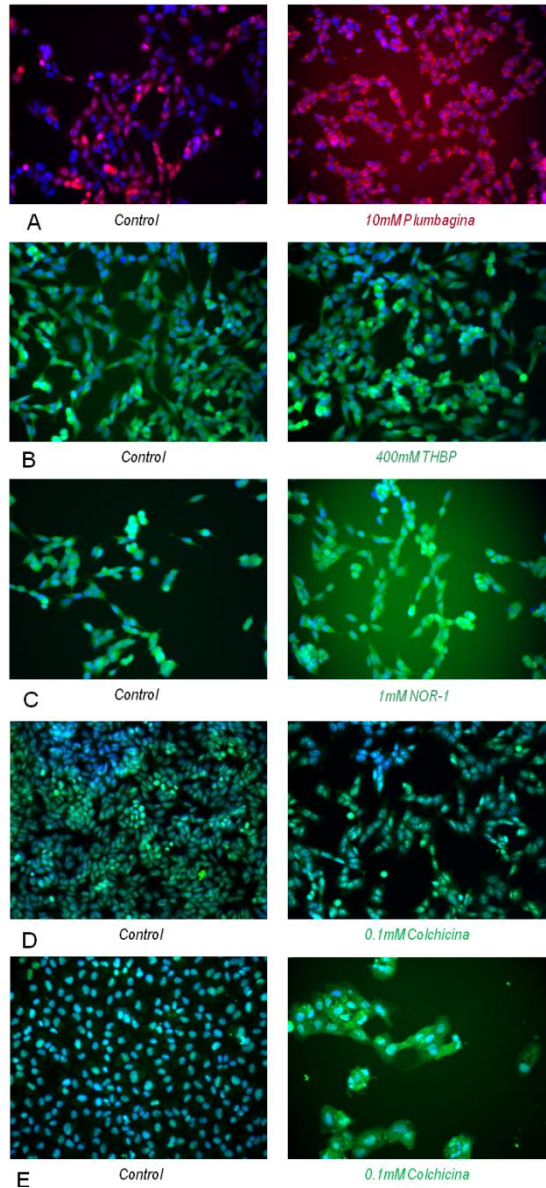


Figura 15: La toxicidad inducida por los controles positivos fue determinada por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia utilizando el In Cell Analyzer. Se midió la viabilidad, y los niveles intracelulares del anión superóxido (A), actividad peroxidativa (B), óxido nítrico (C), y los niveles de alteraciones en el DNA derivadas de la adición del radical $-OH$ en la posición C8 de la guanina en el núcleo (D) y mitocondria (E) para asegurar la efectividad de estos ensayos. En la figura se muestran los niveles obtenidos por el In Cell Analyzer para la línea celular SH-SY5Y.

5. Identificación de Transportadores ABC y su implicación en la toxicidad in vitro

5.1 Identificación de los transportadores ABC mediante PCR en tiempo real (qPCR)

Para identificar los transportadores ABC mediante qPCR se han usado 100.000 células de A704, SH-SY5Y, HepG2 y HepaRG.

5.1.1 Aislamiento y cuantificación de RNA

La extracción del RNA total se llevó a cabo utilizando el kit comercial RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se desechó el medio de cultivo de las placas, se lavaron y se despegaron utilizando PBS y tripsina. Se lisaron las células añadiendo 350 μ L de tampón RLT con mercaptoetanol (1:100). Se homogenizó con el vórtex, se le añadió la misma cantidad de etanol al 70% y se mezcló cuidadosamente con la pipeta. Se transfirió la muestra a una columna RNeasy MinElute colocada en un tubo de colección de 2 mL y se centrifugó durante 15 segundos a $\geq 8000 \times g$. Se desechó el líquido filtrado y se lavó la columna con 350 μ L de tampón RW1 centrifugando a la misma velocidad durante 15 segundos. Se añadió la mezcla de DNasa con tampón RDD (1:8) directamente a la membrana de la columna y se agitó suavemente volteando el tubo. Para que la digestión fuera completa, se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió 350 μ L de RW1 a la columna, y se centrifugó durante 15 segundos a $\geq 8000 \times g$ para lavar la membrana. Se desechó el líquido y se agregó 500 μ L de tampón RPE + etanol absoluto a la proporción de 1:5 a la columna y se centrifugó en las mismas condiciones que anteriormente.

Después se colocó 500 μ L de etanol al 80% a la columna y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones para lavar la membrana. Se desechó el líquido del tubo colector retirando la columna con mucho cuidado para evitar que se quede etanol en la columna. Se volvió a colocar la columna en otro tubo de colección de 2 mL, se abrió el tapón y se centrifugó a la máxima velocidad durante 5 minutos y desechó el tubo con el etanol con objeto de evitar futuras interferencias por parte de éste en las reacciones.

La elución del RNA se realizó añadiendo 14 μ L de agua libre de RNasa a la columna colocada en un tubo de 1,5 mL y centrifugando a máxima velocidad durante 1 minuto.

Tras la extracción del RNA se determinó su cantidad y calidad mediante una medida espectrofotométrica usando el NanoDrop ND-2000 (NanoDrop Technologies) a tres longitudes de onda: 230, 260 y 280 nm. Con la absorbancia a 260 nm se obtuvo el valor de la concentración de ácido nucleico (cerca a 2,2 para RNA), y con el cociente entre la absorbancia a 260/280 nm y 260/230 nm se obtiene el grado de pureza del RNA. Los valores comprendidos entre 1.8-2.0 y 2.0-2.2 para el primer y el segundo cociente respectivamente, indican que se obtuvo un RNA de buena calidad. Si el ratio presenta un valor inferior, es indicativo de que existen proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorben en longitudes de onda cercanas a 280 nm y que pueden afectar de forma significativa la sensibilidad y especificidad de los resultados.

El RNA fue congelado después a -80°C hasta su transcripción reversa a cDNA.

5.1.2 Eliminación de DNA genómico y transcripción reversa a cDNA

Después de cuantificar el RNA y visto su grado de pureza, se procedió a la eliminación del DNA genómico y su transcripción reversa a cDNA. Para ello se utilizó

el kit *QuantiTect® Reverse Transcription* (Qiagen, Hilden, Alemania). Se siguieron las instrucciones del fabricante. Se incubó 1 µg de RNA total con 2 µL del tampón gDNA Wipeout al 7X y complementado con agua libre de RNasa hasta un volumen final de 14 µL por muestra. Estas soluciones se incubaron durante 2 minutos a 42°C y pasado ese tiempo se colocaron inmediatamente en hielo.

Aparte se preparó en hielo la máster mix de transcripción reversa para el total del número de reacciones a realizar (40 + el 10% para garantizar el volumen necesario a todas las muestras) de acuerdo con la Tabla 8. Se trasladaron 6 µL a cada uno de los 40 tubos debidamente identificados, a los que posteriormente se agregó el RNA obtenido libre de DNA genómico correspondiente a cada muestra. Se incubó durante 15 minutos a 42°C y después 3 minutos a 95°C para inactivar la *Quantiscript Reverse Transcriptase*. Se congelaron las muestras a -20°C hasta su cuantificación por qPCR.

Durante todo el procedimiento, las muestras de RNA fueron mantenidas en hielo para evitar su degradación.

Tabla 8: Componentes para la reacción de transcripción reversa.

Componente	Volumen/reacción [µL]
Máster mix de transcripción reversa:	6 µL por reacción:
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µL
Quantiscript RT Buffer	4 µL
RT Primer Mix	1 µL
"Template RNA":	
Solución de eliminación de DNA genómico	14 µL
Volume total de la reacción	20 µL

5.1.3 qPCR

La cuantificación de la expresión de los genes se realizó por qPCR. La PCR a tiempo real es una técnica muy sensible y precisa que permite la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción a través de la unión de marcadores fluorescentes. El incremento de la señal fluorescente es directamente proporcional a la concentración de DNA en un intervalo amplio y realizando una correlación lineal entre los productos de la PCR y la intensidad de fluorescencia se calcula la cantidad de producto existente en el inicio de la reacción. El punto en el que la fluorescencia se detecta por primera vez por encima de la línea de base de forma estadísticamente significativa se denomina ciclo umbral (*threshold cycle*), o Valor Ct, que es a partir del cual la intensidad de fluorescencia empieza a ser apreciable. Este valor es determinado de forma automática por la mayoría de los instrumentos. Teóricamente, un número igual de moléculas está presente en todas las reacciones para un determinado nivel de fluorescencia. Por lo tanto, en el nivel umbral, se asume que todas las reacciones contienen el mismo número de amplicones específicos. Cuanto mayor sea la cantidad inicial de DNA de la muestra, antes se detecta el producto acumulado a partir de los datos de emisión de fluorescencia y menor es el valor de Ct (<https://www.sigmaaldrich.com>).

Para la realización de la q-PCR se utilizó el *QuantiTect® SYBR Green PCR Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Los cebadores utilizados fueron prediseñados por la casa comercial (Tabla 9). Los genes fueron amplificados usando el *QuantiTect® Primer Assay* (Qiagen, Hilden, Alemania). Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado usando dos muestras de distintos días en el sistema *7900HT Fast Real-Time PCR* (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación usadas fueron: 2 min a 50°C, 95°C durante 15 min para activar la *HotStarTaq DNA Polimerase* y, a continuación 40

ciclos de: 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y finalmente 72°C durante 34 segundos.

Tabla 9: Cebadores usados en la determinación de la expresión de los diferentes transportadores ABC.

Nombre(s) del gen	Descripción	# Catálogo
ABCB1, MDR1, P-GP, CD243	Hs_ABCB1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00081928
ABCG2, CD338	Hs_ABCG2_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00073206
ABCC1; MRP1	Hs_ABCC1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00061159
GAPDH	Hs_GAPDH_2_SG QuantiTect Primer Assay	QT01192646

5.2 Identificación mediante CMF de transportadores ABC

Para los ensayos de transportadores ABC se utilizaron las cuatro líneas celulares descritas anteriormente con un pase inferior a 10 a partir de su compra. Se determinó la existencia de los transportadores ABCB1, ABCB2 y ABCC1 por distintos abordajes. Por una parte se utilizó la tinción con anticuerpos monoclonales medidos por CMF para determinar la existencia de esas proteínas en la membrana de las células, por otra parte, se determinó por PCR cuantitativa si se expresaba el RNA de esas proteínas en las células, y por último, la funcionalidad de los transportadores detectados por ambas técnicas.

La identificación de los marcadores fenotípicos de membrana se realizó por citometría de flujo de acuerdo con el protocolo estándar de tinción de superficie.

Las cuatro líneas celulares humanas descritas anteriormente (A704, SH-SY5Y, HepG2 y HepaRG) fueran marcadas con los anticuerpos monoclonales de superficie para los transportadores en estudio – ABCB1, ABCB2 y ABCC1 – o con los correspondientes isotipos (Tabla 10).

Las líneas celulares fueran despegadas con PBS y tripsina y preparadas a una concentración de 1×10^6 células/mL en PBS. De esa suspensión se colocó en

diferentes tubos 100 μ L a los que se han añadido diferentes concentraciones de los anticuerpos de los respectivos isotipos de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial.

Se incubaron a temperatura ambiente y oscuridad durante 60 minutos. Trascurrido el tiempo de incubación se añadieron 400 μ L de PBS y se analizó por el citómetro de flujo Gallios™ (Beckman Coulter).

Para determinar el grado de expresión de estos transportadores se determinó la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las moléculas isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (PE) excitadas con el láser azul (488 nm) y que emiten a 518 nm y 578 nm respectivamente. Las células muertas se descartaron por análisis de la morfología utilizando la dispersión frontal y lateral de la luz.

Como controles negativos se utilizaron los isotipos unidos a las moléculas fluorescentes.

Tabla 10: Anticuerpos e isotipos utilizados en la determinación de los transportadores ABC con las concentraciones utilizadas y características de excitación y emisión.

Anticuerpo Monoclonal (Clon)	Isotipo	Molécula fluorescente	Excitación/ Emisión	Volumen (μ L)	Casa Comercial
Anti MDR1 (UIC2)	mouse IgG _{2a}	PE	480 / 578 nm	1 - 2,5 - 5 - 10	Santa Cruz Biotechnologies (SC-73354-PE)
Anti ABCG2 (5D3)	mouse IgG _{2b}	PE	480 / 578 nm	1 - 2,5 - 5 - 10	Santa Cruz Biotechnologies (SC-18841-PE)
Anti MRP1 (QCRL-2)	mouse IgG _{2b}	FITC	480 / 518 nm	1 - 2,5 - 5 - 10	Santa Cruz Biotechnologies (SC-18836 FITC)

5.3 Detección del transportador ABCB1 mediante ensayos funcionales

Para determinar la actividad del ABCB1 se realizó un ensayo funcional de extrusión de moléculas fluorescentes que son sustrato de ese transportador.

Se utilizaron tres fluorocromos, la Calceína-AM y el Syto13 (ambos de Life Technologies) y la rhodamina 123 (Rh123) (Sigma Aldrich) a las concentraciones descritas en la Tabla 11. Para inhibir la extrusión de los fluorocromos, se utilizaron verapamil y ciclosporina A (Sigma Aldrich), conocidos por bloquear el transportador ABCB1, a distintas concentraciones (0,5 μM , 1 μM , 5 μM y 10 μM de ciclosporina y 1, 5, 10 y 20 μM de verapamil). Se prepararon soluciones stock de los compuestos con objeto de que la concentración final de los solventes fuera igual en todas las réplicas e inferior al 0,5%.

Se sembraron las células en placas de 24 pocillos al 100% de confluencia. Pasadas 24h, con las células ya adheridas a los pocillos de la placa, se añadieron los sustratos en presencia o ausencia de los inhibidores y se incubaron durante 1 hora a 37°C y 5 % de CO₂. Pasado el tiempo de incubación se reemplazó el medio de cultivo con los sustratos fluorescentes en ausencia o presencia de inhibidores, con medio privado de los sustratos fluorescentes pero con los respectivos inhibidores, y se incubaron las células durante 1h en las mismas condiciones. Una vez terminada la incubación se despegaron las células con PBS y tripsina, se recogieron en un tubo de polipropileno al que se añadió el yoduro de propidio a la concentración de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se analizaron en el citómetro de flujo con el protocolo apropiado.

Se analizó la dispersión frontal (FS) y dispersión lateral de la luz (SS) en escala lineal, y la fluorescencia verde (filtro 525 BP 40) y naranja (620 BP 30) en escala logarítmica. Se discriminaron las células muertas seleccionando únicamente las que no incorporaban el yoduro de propidio.

Tabla 11. Sustratos fluorescentes utilizados en los ensayos de extrusión por la gp-P con las concentraciones utilizadas y el espectro de excitación y emisión.

Fluorocromo	Excitación/Emisión	Concentración final SH-SY5y y A704	Concentración final HepG2	Concentración final HepaRG
Calceína-AM (Life Technologies, C1430)	494/517	10 nM	10 nM	10 nM
Syto13 (Life Technologies, C1430)	488/509	20 nM	100 nM	50 nM
Rh123 (Sigma Adrich, R8004)	507/529	2,5 μ M	2,5 μ M	2,5 μ M

6 Análisis de datos

6.1 Muerte celular

La IC20, IC50 y IC80 se definen como la concentración molar de un tóxico que causa el 20, 50 y 80 % de la muerte celular. El cálculo de las IC20, IC50 y IC80 se realizó usando el programa informático Phototox®.

6.2 Cálculo EC50 de parámetros estrés oxidativo

Para obtener la EC50 (concentración molar de una sustancia que causa el 50% de la máxima respuesta) se ha determinado la media de la intensidad de fluorescencia de los controles y de las diferentes concentraciones de los tratados, la **MF150** que es la mitad de la intensidad de fluorescencia máxima observada en un rango de concentraciones desde una IC20 a una IC80; el ratio de los valores de intensidad de fluorescencia media de las diferentes concentraciones de los compuestos frente al valor de intensidad de fluorescencia media basal; el **RMFI50** que corresponde a la mitad del valor máximo del ratio entre los tratado y los controles; y, finalmente el valor de **EC50 RMFI** (EC50) que corresponde a la concentración en molar de tóxico que produce el 50% de la intensidad de

fluorescencia máxima detectada entre un rango de concentraciones de un compuesto químico.

Para la determinación de los valores de IC50 y EC50, se han usado los siguientes criterios de aceptación:

La viabilidad celular de los controles debía ser igual o superior al 80% de células vivas determinadas por el ensayo del YP y/o por morfología (dispersión frontal vs dispersión lateral de la luz).

La desviación estándar de la media de la intensidad de fluorescencia de las muestras control y tratadas con los compuestos no debía superar el 15 %.

La media de la intensidad de fluorescencia de las células tratadas debía ser al menos dos veces la del control negativo.

Estos cálculos se han realizado en el Microsoft Office Excel 2003.

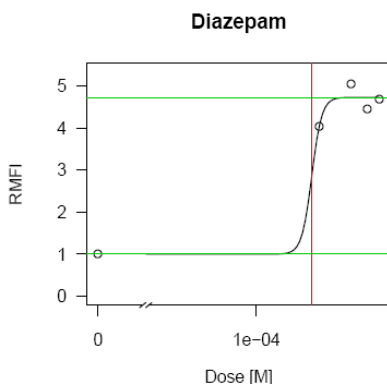


Figura 16: Ejemplo del cálculo de la EC50 mediante. Se representa en el eje de las abscisas la concentración de tóxico en logaritmo y en el eje de las ordenadas el RMFI.

6.3 Cálculo de los valores mínimos (LOEC)

Después de determinar los valores de EC50, IC50 y EC20 para todos los ensayos en las diferentes líneas celulares, se ha identificado el valor mínimo del

efecto causado (viabilidad y estrés oxidativo/nitrosativo) por cada compuesto en las tres líneas celulares por separado y en el conjunto – LOEC_{total}. Además se determinó también el IC50 mínimo de los diferentes ensayos de viabilidad – LOEC_{viab} – y el mínimo valor de EC50 de los distintos compuestos que producen estrés oxidativo/nitrosativo – LOEC_{oxi}. Estas transformaciones se han realizado para obtener una visión más global de la capacidad predictiva de nuestros ensayos.

6.4 Determinación de la capacidad predictiva del panel citómico

6.4.1 Cálculo del coeficiente de determinación de Pearson

La valoración de la capacidad predictiva de toxicidad humana aguda de los ensayos citómicos de citotoxicidad *in vitro* se ha llevado a cabo mediante varias aproximaciones complementarias. Por una parte, se han establecido correlaciones entre los diferentes valores de citotoxicidad *in vitro* para cada pareja tóxico/ensayo (IC50/EC50 en el ensayo correspondiente) y la estimación de los valores de LC50 en sangre humana (Sjöström et al., 2008) (Tabla 12). Se han trazado de esta forma las diferentes rectas de regresión y se han determinado los coeficientes de determinación de (R^2) entre nuestros datos y los publicados. Los coeficientes de determinación se calcularon mediante el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU) utilizando los resultados en logaritmo de la concentración en Molar.

Se han comparado esos resultados con los valores registrados para la toxicidad aguda *in vivo* de rata y ratón (LD50), y en ratón *in vitro* (3T3 NRU), usados como referencia para predecir la toxicidad en humanos.

Tabla 12: Valores de toxicidad de los 60 compuestos de los ensayos de referencia (IC50 de 3T3 NRU, LD50 de rata y ratón) y de LC50 de humano determinados por Sjöström *et al.*, 2008. NE - No efecto a la máxima concentración probada, ND - No hay dato facilitado por el proyecto Acutetox, NT - No testado.

Número Acutoxbase	Compuesto Referencia	Número CAS	3T3 NRU IC50 (M)	Humano LC50 (M)	Rata LD50 (M)	Ratón LD50 (M)
1	Acetaminofeno	103-90-2	3,31E-04	2,19E-03	1,77E-02	4,42E-03
2	Ácido acetilsalicílico	50-78-2	4,37E-03	6,31E-03	8,80E-03	8,51E-03
3	Atropina monohidrato sulfato	5908-99-6	1,23E-04	2,00E-06	1,02E-03	8,77E-04
4	Cafeína	58-08-2	8,32E-04	5,13E-04	1,43E-03	1,18E-03
5	Carbamazepina	298-46-4	4,57E-04	1,62E-04	1,37E-02	8,82E-03
6	Colchicina	64-86-8	1,20E-07	6,46E-08	ND	4,41E-05
7	Cicloheximida	66-81-9	1,05E-06	ND	6,40E-06	3,17E-04
8	Diazepam	439-14-5	1,66E-03	3,24E-05	ND	1,48E-03
9	Digoxina	20830-75-5	6,61E-04	4,17E-08	ND	ND
10	Isopropanol	67-63-0	6,31E-02	1,15E-01	8,44E-02	ND
11	Malatión	121-75-5	1,32E-03	1,86E-06	3,86E-03	3,62E-03
12	Mercurio (II) cloruro	7487-94-7	1,58E-05	1,95E-05	1,95E-04	1,10E-04
13	Pentaclorofenol	87-86-5	1,91E-04	8,32E-04	4,07E-04	5,34E-04
14	Fenobarbital	50-06-6	2,69E-03	3,63E-04	9,76E-04	1,04E-03
15	Dodecilsulfato sódico (SDS)	151-21-3	1,62E-04	ND	5,81E-03	ND
16	Ácido valproico	1069-66-5	1,00E-02	6,31E-03	5,16E-03	5,10E-03
17	5-Fluorouracilo	51-21-8	5,01E-05	2,04E-04	ND	ND
18	Benceno	71-43-2	2,29E-01	ND	6,72E-02	ND
19	tert-butil Hidroperóxido	75-91-2	6,17E-05	ND	6,53E-03	ND
21	Cadmio cloruro	10108-64-2	2,24E-06	8,71E-07	8,32E-04	ND
23	Pireno	129-00-0	1,91E-03	ND	ND	ND
26	Hexaclorobenceno	118-74-1	NE <3,98E-04	1,70E-06	4,36E-02	ND
28	Amiodarona clorhidrato	19774-82-4	2,63E-05	1,12E-05	ND	ND
29	Verapamilo clorhidrato	162-11-4	7,24E-05	6,17E-06	ND	ND
30	Ritempicina	13292-46-1	1,02E-04	1,55E-04	2,18E-03	ND
31	Tetraciclina clorhidrato	64-75-5	8,32E-04	ND	ND	7,64E-03
32	Orfenadrina clorhidrato	341-69-5	1,12E-04	2,29E-05	ND	ND
33	Nicotina	54-11-5	3,24E-03	7,94E-06	4,80E-04	3,90E-04
34	Lindano	58-89-9	5,37E-04	1,05E-06	5,42E-04	7,22E-04
37	Etanol	64-17-5	1,48E-01	1,58E-01	2,72E-01	1,89E-01
38	Paratión	56-38-2	2,14E-04	2,24E-06	2,88E-05	4,84E-05
39	Didorvos	62-73-7	1,70E-04	2,00E-04	2,91E-04	4,31E-04
40	Fisostigmina	57-47-6	1,02E-04	ND	ND	ND
41	Amonio glufofinato	77182-82-2	7,59E-03	1,02E-02	8,49E-03	2,20E-03
42	cis-Diaminoplatina (II) dicloruro	15863-27-1	5,62E-06	2,09E-05	ND	ND
43	Dietilenglicol	111-46-6	1,29E-01	ND	1,84E-01	2,26E-01
44	Diquat dibromuro	6385-62-2	4,17E-05	2,82E-04	7,32E-04	ND
45	Ocratoxina A	303-47-9	6,61E-05	ND	5,60E-05	1,38E-04
46	Ciclosporina A	59865-13-3	4,17E-05	6,03E-07	ND	ND
47	17 α -Ethinestradíol	57-63-6	2,29E-05	ND	ND	ND
48	Sodio fluoruro	7681-49-4	1,91E-03	5,75E-04	3,84E-03	2,55E-03
49	Paraquat dicloruro	1910-42-5	8,51E-05	9,55E-06	4,85E-04	ND
51	Dimetilformamida	68-12-2	7,24E-02	5,89E-03	5,88E-02	6,27E-02
52	Hierro (II) sulfato	7782-63-0	NT	2,29E-04	5,88E-03	5,33E-03
53	Amitriptilina clorhidrato	549-18-8	2,29E-05	4,57E-06	1,30E-03	7,01E-04
54	Etilenglicol	107-21-1	4,17E-01	3,16E-02	1,35E-01	1,60E-01
55	Metanol	67-56-1	NE <1,10E-01	7,76E-02	3,04E-01	2,28E-01
57	Sodio cloruro	7647-14-5	7,24E-02	5,37E-02	7,14E-02	8,76E-02
60	Litio sulfato	10377-49-7	1,55E-02	5,62E-03	ND	ND
63	Propranolol clorhidrato	318-98-9	5,37E-05	1,12E-05	ND	1,32E-03
64	Arsénico trióxido	1327-53-3	1,35E-05	5,89E-06	4,63E-04	5,34E-04
66	Talio sulfato	7446-18-6	1,58E-05	8,13E-06	4,26E-05	ND
67	Warfarina	81-81-2	8,13E-04	1,55E-04	5,51E-05	2,06E-03
71	Hexaclorofeno	70-30-4	1,10E-05	7,41E-04	2,71E-04	4,92E-04
76	Cloral hidrato	302-17-0	1,12E-03	6,61E-04	4,35E-03	ND
77	2,4-Ácido diclorofenoxiacético	94-75-7	1,35E-03	3,72E-03	1,71E-03	1,66E-03
80	Estricnina	57-24-9	6,46E-04	7,59E-06	3,89E-05	ND
91	Sodio selenato	13410-01-0	1,78E-04	2,57E-05	ND	ND
92	Acetonitrilo	75-05-8	2,09E-01	1,51E-03	9,60E-02	ND
96	Epinefrina bitartrato	51-42-3	1,91E-04	ND	ND	ND

6.4.2 Identificación y corrección de compuestos que caen fuera de la recta de regresión: outliers y alertas

Los outliers son valores atípicos fuera de un rango y las Alertas son outliers en los que se detecta la toxicidad en los ensayos *in vitro* a concentraciones inferiores que en el test de referencia usado.

Para determinar si nuestros ensayos corrigen outliers del ensayo de NRU de 3T3 se utilizó el rango de una unidad de log de desviación comparado con la LC50 de humanos siguiendo lo descrito por Kooijman et al., 2010.

6.4.3 Determinación de la capacidad de predicción de la toxicidad órgano-específica

Para determinar la capacidad predictiva de las líneas celulares A704, SH-SY5Y y HepG2 para determinar la toxicidad órgano-específica se compararon los valores de toxicidad obtenidos en estas líneas células para los compuestos nefrotóxicos, neurotóxicos y hepatotóxicos, con los valores obtenidos en los fibroblastos de ratón - ensayo de NRU en 3T3 obtenidos de la base de datos de Acutoxbase descrita en Kinsner-Ovaskainen et al. (2009). Siguiendo la estrategia de Gustafsson *et al.*, (2010) se realizó la prueba t de Student, usando el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU).

Una vez obtenida la significancia de los resultados, se comprobó si esas diferencias mejoraban la predicción de la toxicidad en humanos (Sjöström et al., 2008).

6.4.4 Determinación de la capacidad de clasificación de los compuestos

Por otra parte, los patrones de toxicidad de los datos citométricos generados por nuestros ensayos *in vitro* han sido evaluados para valorar su utilidad en la clasificación de los compuestos en las cinco clases de toxicidad de la Global Harmonization System (GHS). Esta clasificación está basada en los valores de la LD50 en rata *in vivo* (Tabla 13) y se adaptó a los valores de LC50 de humano estimados por Sjöström *et al.*, 2008.

Tabla 13: Tabla con los criterios de clasificación de los compuestos en 5 clases de toxicidad de acuerdo al GHS. (Adaptado de: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/).

Categoría / Peligro		1	2	3	4	5
Criterio		LD50 ≤ 5mg/kg del peso corporal	LD50 > 5 y ≤ 50mg/kg del peso corporal	LD50 > 50 y ≤ 300mg/kg del peso corporal	LD50 > 300 y ≤ 2000 mg/kg del peso corporal	LD50 > 2000mg/kg del peso corporal
Elemento comunicación peligro	Pictograma					No tiene
	Palabra señal	PELIGRO	PELIGRO	PELIGRO	ADVERTENCIA	ADVERTENCIA
	Descripción Peligro	FATAL si ingerido	FATAL si ingerido	TÓXICO si ingerido	PERJUDICIAL si ingerido	Puede ser perjudicial si ingerido

6.4.4.1 Transformación de los resultados para el análisis de matriz de datos

Para proceder a la distribución de los datos de toxicidad en forma de matriz y valorar su utilidad en la clasificación de los tóxicos se han utilizado los programas bioinformáticos de dominio público “Cluster” y “Treeview” ambos disponibles en <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>.

Las IC50 y EC50 son la concentración molar de tóxico que produce el 50% del efecto máximo. Para establecer el grado de toxicidad de los compuestos utilizando la clasificación GHS, es necesario convertir los valores de concentración en molar a unidades de peso por litro o kilogramo. Para asegurar la escala requerida por el programa "Cluster" (son necesarios valores positivos y negativos), se realizó una transformación en logaritmo de base diez y se ordenaron los compuestos químicos por orden creciente de LC50 de humano. Finalmente, se han utilizado los programas "Cluster" y "Treeview" para la realización de la matriz de datos.

La escala utilizada en la matriz de datos permite distinguir la toxicidad usando diferentes gradaciones de color. Así los compuestos rojos representan los valores negativos y más tóxicos, los amarillos representan los compuestos de toxicidad intermedia y corresponden al valor cero y por último, los compuestos verdes corresponden a los valores positivos y menos tóxicos. Las cuadrículas blancas corresponden a los compuestos sin efecto. Así, en caso de perfecta clasificación de los compuestos por el panel citotómico, debería verse una gradación de color semejante a la representada en la Figura 17 correspondiente a los valores de LC50 de humano.



Figura 17: Escala de color de los compuestos por orden decreciente de toxicidad de humano (LC50) (Sjöström et al., 2008) con los límites de las clases del GHS.

6.4.4.2 Análisis de las curvas ROC

Otra aproximación fue aplicar el análisis de las curvas ROC que se usa en el contexto clínico, para verificar si una prueba diagnóstica es buena para distinguir entre enfermos y no enfermos.

Aplicado a toxicología para el análisis de nuestros ensayos, consideramos distinguir entre los compuestos bien o mal clasificados en su categoría de

clasificación del sistema GHS adaptándola a las LC50 de humano estimadas por Sjöström *et al.* (2008).

La curva ROC es una representación grafica de la Razón de verdaderos positivos (sensibilidad) frente a 1 menos razón de verdaderos negativos (1-especificidad) para un sistema clasificador binario según varía el umbral de discriminación. Se han usado como umbrales los valores 5 mg/L, 50 mg/L, 300 mg/L y 2000 mg/L correspondientes al valor máximo de toxicidad de cada clase de clasificación de la toxicidad del sistema GHS.

Primero se realizan las tablas de contingencia en las que se estima la magnitud de los aciertos y errores que pueden cometerse. De acuerdo a lo representado en la Tabla 14 se pueden producir dos errores:

Resultado falso positivo: clasificar un compuesto como más tóxico de lo que realmente es (alerta)

Resultado falso negativo: clasificar a un compuesto como menos tóxico que determinado por la LC50 de humano.

Y dos aciertos:

Resultado verdadero positivo: el compuesto está bien clasificado en las clases más tóxicas

Resultado verdadero negativo: el compuesto está bien clasificado en clases que se consideran con baja o nula toxicidad.

Una vez realizadas las tablas de contingencia para las distintas clases GHS, se realizan las curvas ROC en las que se determina el valor de AUC (área bajo la curva). Ese valor es calculado y representado en una gráfica de frente a 1-Especificidad y nos permite verificar que ensayos tienen mejor capacidad predictiva (AUC cerca de 1) de las que tienen peor capacidad predictiva (AUC cerca de 0,5) (Figura 18). Este análisis fue realizado con el software SPSS 14.0 (IBM Company).

Tabla 14. Posibles resultados de las curvas ROC aplicadas a la determinación de la clasificación del sistema GHS de compuestos tóxicos.

		Clasificación LC50 humano		
		- Tóxico	+ Tóxico	
Resultado ensayo citómico	- Tóxico	Verdadero Negativo (VN)	Falso Negativo (FN)	VN+FN
	+ Tóxico	Falso Positivo (FP)	Verdadero Positivo (VP)	FP+VP
		VN+FP	FN+VP	

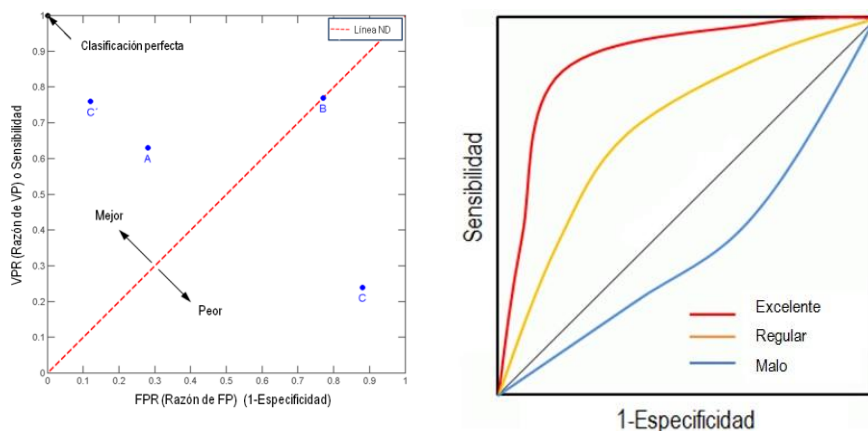


Figura 18: Ejemplo de curvas ROC con diferentes AUC.

6.5 Determinación de la capacidad de detección de la toxicidad *in vitro* dependiente del metabolismo usando como modelo HepaRG

Uno de los problemas a la hora de la determinación *in vitro* de la toxicidad humana usando líneas celulares hepáticas reside en la pérdida de la actividad metabólica por parte de éstas dificultando la predicción real de la toxicidad de

compuestos que sufren una bio-transformación por parte del hígado. Para determinar el impacto que puede tener esta capacidad en los ensayos de toxicidad *in vitro*, hemos estudiado el modelo de hepatoma celular HepaRG, una línea celular recientemente comercializada que mantiene la expresión de enzimas que participan en la activación de los compuestos químicos.

Para establecer si las HepaRG son un modelo *in vitro* adecuado para la detección de la toxicidad dependiente del metabolismo se han determinado los valores de IC50 y EC50 para los 60 compuestos de referencia. Para determinar la sensibilidad de esta línea celular frente a la HepG2, se realizaron correlaciones de ambas líneas frente a la LC50 determinada para humano en 2008 por Sjostrom *et al.*

También se realizó una correlación de los resultados obtenidos para estas dos líneas celulares, donde se discriminaron entre compuestos cuyos metabolitos presentan más toxicidad que el compuesto antes de su transformación por los citocromos, de los que son más tóxicos en su forma inicial.

Las correlaciones fueron realizadas en el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU) utilizando los resultados en logaritmo de la concentración en molar.

6.6 Ensayo funcional detección de transportadores ABCB1

Los datos obtenidos en el citómetro FC500 de Beckman Coulter fueron analizados con el software CXP. Las gráficas y el análisis estadístico fueron realizados en el GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA) usando la intensidad media de fluorescencia ($MFI \pm SEM$) y expresada en porcentaje relativa al control. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA de 1 vía) seguido del test de Bonferroni comparando cada tratamiento con el control (ausencia de inhibidor). En todos los casos se consideraron las diferencias significativas cuando el valor de $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

1 Determinación de la toxicidad in vitro

1.1 Validación de los ensayos citómicos

El primer objetivo planteado fue el desarrollo de un panel citómico para predecir la toxicidad aguda humana. Una vez se cultivadas las líneas celulares y tratadas con los diferentes compuestos durante 24 o 48h, se procedió a la determinación por CMF y HCA de los diferentes parámetros de toxicidad temprana (anterior a la muerte).

La determinación por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia de la citotoxicidad incluye la viabilidad y determinación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno: actividad peroxidativa, anión superóxido, óxido nítrico, y de un marcador de daño oxidativo del DNA, la 8-oxoguanina. Se usaron controles positivos para validar la efectividad de los ensayos/líneas celulares para determinar la capacidad de generación de esas especies reactivas por las líneas celulares en estudio (Figura 19).

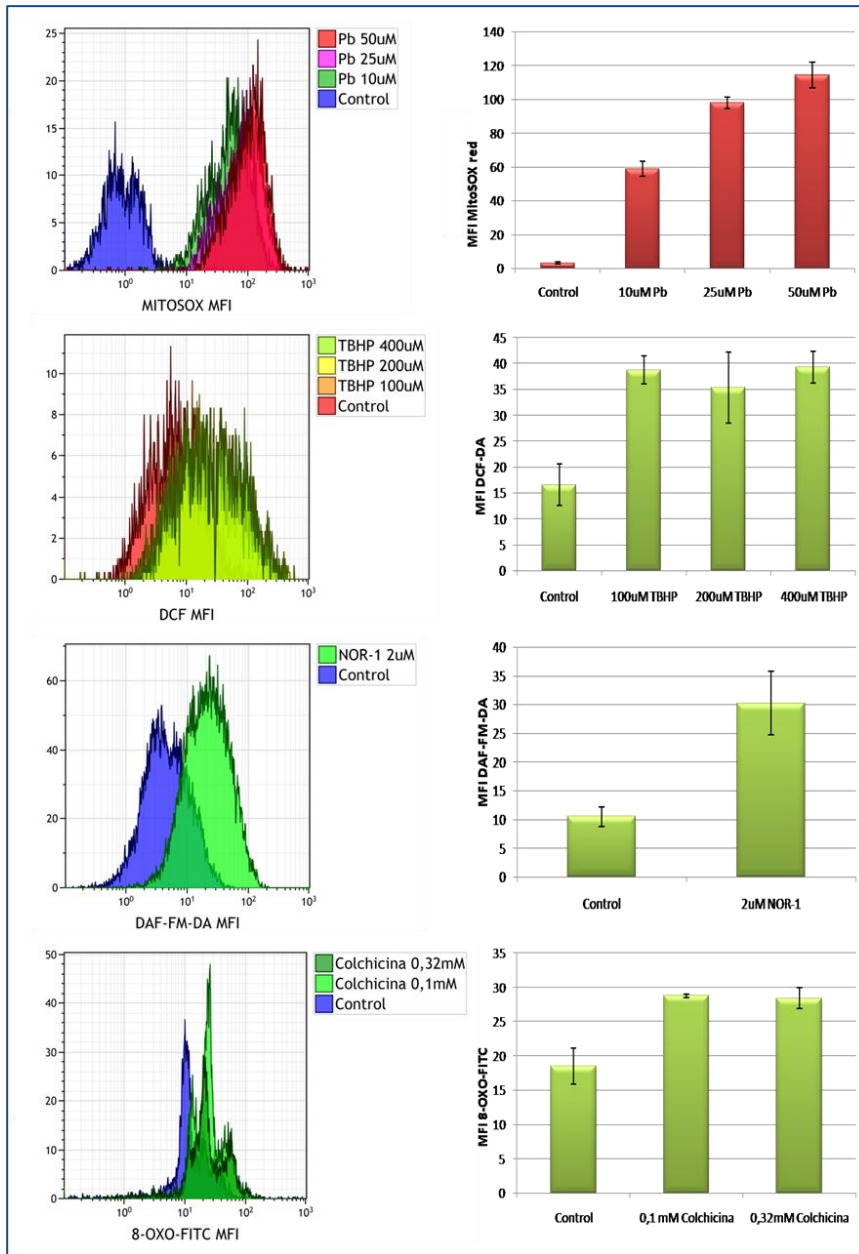


Figura 19: La toxicidad inducida por los controles positivos fue determinada por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia utilizando el In Cell Analyzer. Se midieron los niveles intracelulares del anión superóxido, óxido nítrico, actividad peroxidativa y los niveles de 8-oxo en el DNA nuclear y mitocondrial. En la Figura se muestran los niveles obtenidos para la línea celular SH-SY5Y por CMF.

1.2 Cuantificación de la toxicidad *in vitro*

Una vez obtenidos los valores de la intensidad de fluorescencia media a las distintas concentraciones de los sesenta compuestos testados, se determinó la IC50 y EC50 de los parámetros de viabilidad y estrés oxidativo y nitrosativo en el conjunto de las tres líneas celulares humanas (HepG2 - hepatoma, SH-SY5Y - neuroblastoma y A704 - adenocarcinoma renal). Este panel proporcionó una base de datos de los valores de toxicidad que se resumen en las Tablas 15, 16, y 17. Los datos generados sólo se tuvieron en consideración cuando los coeficientes de variación eran inferiores al 15%. A dos de los sesenta compuestos no se les pudo asignar una IC50/EC50 en cualquiera de las tres líneas celulares y ensayos (18-benceno y 34-lindano). En los casos en los que no se pudo determinar la IC50/EC50, la concentración máxima probada viene indicada precedida por la señal > (Tabla 15, 16 y 17).

Con la línea celular A704 no se pudo determinar los valores de toxicidad por ninguno de los ensayos en 5 de los 60 compuestos testados (benceno, pireno, lindano, paratión y el sodio cloruro). Para el mismo número de compuestos no se pudo determinar valor de toxicidad en la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y, y en 8 en la línea celular HepG2. En el primer caso no se pudo obtener ningún valor de IC50/EC50 en los compuestos benceno, lindano, paratión, ocratoxina A y sodio cloruro. En HepG2, los compuestos que no presentaron toxicidad fueron el 5-fluorouracilo, benceno, pireno, hexaclorobenceno, rifampicina, lindano, amonio glufosinato y estricnina.

Además, para los compuestos benceno y lindano no se pudo obtener ningún valor de toxicidad. Esta ausencia de efecto también se observó en los estudios de Kooijman et al. (2010) en los que se midió el efecto de los compuestos en la secreción de las citoquinas IL-5, IFN γ y TNF α por las células mononucleares de sangre periférica, aunque se estudiaron concentraciones bastante inferiores a las usadas en estos ensayos. Cerrato et al. (2009) usando un sistema basado en cultivo

primario de células mononucleares humanas de cordón umbilical (CFU-GM) tampoco pudieron obtener efecto para el benceno, pero sí pudieron detectar la toxicidad del lindano. Esto puede indicar que la toxicidad de este compuesto se puede determinar usando cultivos primarios y no en líneas celulares continuas ya que al igual que Cerrato *et al.* (2009), Galofré *et al.*, (2010) también pudieron determinar la toxicidad del lindano usando cultivos primarios de células de neuronas corticales, aunque en este caso puede deberse a que el sistema nervioso central es la principal diana de la toxicidad de este organoclorado y que además se analizó mediante un ensayo de la actividad del receptor GABA_A, cuya inhibición parece ser la causa de la neurotoxicidad inducida por este compuesto (AcutoxBASE (A. Kinsner-Ovaskainen *et al.*, 2009)).

El benceno ha sido descrito como inhibidor de la hematopoyesis (Cerrato *et al.*, 2009; Kooijman *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2001), pero tampoco el estudio de Cerrato *et al.* (2009) desarrollado en progenitores CFU-GM pudo determinar la toxicidad *in vitro* de este compuesto. Se describió que la hematotoxicidad de este compuesto se debe a sus metabolitos (Cerrato *et al.*, 2009; Van Den Heuvel, Leppens, & Schoeters, 2001) lo que implica la necesidad de un estudio realizado en células con capacidad de bioactivación para poder determinar la toxicidad de este compuesto.

Leyendas de las Tablas 15 a 17:

Tabla 15: Valores de EC50/IC50 (M) para los 60 compuestos sobre la línea celular A704 (en negrita). Para los compuestos químicos de referencia cuya IC50/EC50 no se ha podido determinar, se ha representado la máxima concentración probada sin efecto precedida del símbolo (>). N Acutoxbase es el número de referencia de los compuestos en el proyecto ACuteTox; NRU – Ensayo de captación del Rojo Neutro; YP – ensayo de exclusión del yoduro de propidio; Perox. – ensayo de determinación de la actividad peroxidativa; Superox. – ensayo de determinación de los niveles intracelulares del anión superóxido; NO – ensayo de determinación de los niveles intracelulares de óxido nítrico; 8-Oxo Nuc – ensayo de determinación de los niveles de 8-oxo en DNA nuclear y 8-Oxo Mit en DNA mitocondrial.

Tabla 16: Valores de EC50/IC50 (M) para los 60 compuestos sobre la línea celular SH-SY5Y (en negrita). Para los compuestos químicos de referencia cuya IC50/EC50 no se ha podido determinar, se ha representado la máxima concentración probada sin efecto precedida del símbolo (>). N Acutoxbase es el número de referencia de los compuestos en el proyecto ACuteTox; NRU – Ensayo de captación del Rojo Neutro; YP – ensayo de exclusión del yoduro de propidio; Perox. – ensayo de determinación de la actividad peroxidativa; Superox. – ensayo de determinación de los niveles intracelulares del anión superóxido; NO – ensayo de determinación de los niveles intracelulares de óxido nítrico; 8-Oxo Nuc – ensayo de determinación de los niveles de 8-oxo en DNA nuclear y 8-Oxo Mit en DNA mitocondrial.

Tabla 17: Valores de EC50/IC50 (M) para los 60 compuestos sobre la línea celular HEPG2 (en negrita). Para los compuestos químicos de referencia cuya IC50/EC50 no se ha podido determinar, se ha representado la máxima concentración probada sin efecto precedida del símbolo (>). N Acutoxbase es el número de referencia de los compuestos en el proyecto ACuteTox; NRU – Ensayo de captación del Rojo Neutro; YP – ensayo de exclusión del yoduro de propidio; Perox. – ensayo de determinación de la actividad peroxidativa; Superox. – ensayo de determinación de los niveles intracelulares del anión superóxido; NO – ensayo de determinación de los niveles intracelulares de óxido nítrico; 8-Oxo Nuc – ensayo de determinación de los niveles de 8-oxo en DNA nuclear y 8-Oxo Mit en DNA mitocondrial.

Tabla 15.

Número Acutoxbase	Compuestos	A704 LOG EC50/IC50 RMFI (M)						
		Panel Viabilidad		Panel Oxidativo				
		NRU	YP	Perox.	Superox.	NO	8-Oxo Nuc.	8-Oxo Mit.
1	Acetaminofeno	2,36E-02	3,45E-02	8,71E-03	1,39E-02	3,57E-02	>4,63E-02	>4,63E-02
2	Ácido acetilsalicílico	>2,00E-02	1,47E-02	1,21E-02	1,67E-02	>2,00E-02	5,25E-03	>2,00E-02
3	Atropina monohidrato sulfato	7,93E-04	1,61E-03	4,26E-05	1,50E-03	>2,00E-03	4,17E-04	2,51E-04
4	Cafeína	2,49E-02	>4,00E-02	1,13E-02	1,78E-02	7,14E-04	2,34E-02	>3,50E-02
5	Carbamazepina	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	1,11E-04	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03
6	Colchicina	5,37E-03	4,87E-03	2,64E-06	3,70E-05	>1,00E-02	2,95E-06	>3,20E-04
7	Cicloheximida	3,40E-04	>1,00E-02	2,13E-04	4,70E-05	>1,00E-02	1,78E-03	>1,00E-02
8	Diazepam	4,45E-04	4,55E-04	>5,00E-04	2,22E-04	>5,00E-04	6,92E-06	>5,00E-04
9	Digoxina	>1,49E-04	>1,49E-04	7,71E-06	>1,49E-04	1,23E-08	2,19E-06	>1,28E-04
10	Isopropanol	3,04E-01	5,88E-01	9,11E-02	4,17E-02	>8,32E-01	2,24E-02	>1,16E+00
11	Malatión	>1,00E-03	>1,00E-03	1,71E-04	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03
12	Mercurio (II) cloruro	1,93E-05	5,30E-05	1,85E-06	6,14E-05	>1,47E-04	>3,68E-05	>3,68E-05
13	Pentaclorofenol	1,01E-04	2,41E-04	1,08E-04	9,32E-05	>3,00E-04	4,47E-05	>9,39E-05
14	Fenobarbital	1,13E-02	>1,50E-02	1,88E-03	4,46E-03	>1,50E-02	>1,50E-02	>1,50E-02
15	Dodecilsulfato sódico (SDS)	2,48E-04	2,18E-04	1,39E-04	1,71E-04	5,84E-05	>2,77E-04	>2,77E-04
16	Ácido valproico	>2,30E-02	>2,30E-02	6,22E-03	3,99E-03	>2,30E-02	3,39E-04	>2,80E-03
17	5-Fluorouracilo	1,52E-02	>2,00E-02	>2,00E-02	4,22E-03	>2,00E-02	>2,00E-02	>2,00E-02
18	Benceno	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02
19	tert-butil Hidroperóxido	8,06E-06	7,30E-06	1,29E-04	1,80E-06	>1,00E-04	>2,74E-05	>2,74E-05
21	Cadmio cloruro	3,98E-06	5,07E-06	>7,00E-05	5,11E-06	7,53E-06	2,95E-06	>1,50E-05

Tabla 15(continuación).

Número Acutoxbase	Compuestos	A704 LOG EC50/IC50 RMFI (M)						
		Panel Viabilidad		Panel Oxidativo				
		NRU	YP	Perox.	Superox.	NO	8-Oxo Nuc.	8-Oxo Mit.
23	Pireno	>5,81E-05	>5,81E-05	>5,81E-05	>5,81E-05	>5,81E-05	>2,70E-05	>2,70E-05
26	Hexaclorobenceno	>7,50E-05	>7,50E-05	>7,50E-05	>7,50E-05	5,24E-05	>7,50E-05	>7,50E-05
28	Amiodarona clorhidrato	2,31E-04	5,63E-05	>2,50E-04	7,29E-05	>2,50E-04	3,31E-06	>1,10E-05
29	Verapamilo clorhidrato	1,99E-04	2,04E-04	2,18E-06	6,65E-05	>5,00E-03	>1,25E-04	>1,25E-04
30	Rifampicina	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	8,05E-05	>2,50E-04	1,86E-06	>2,50E-04
31	Tetraciclina clorhidrato	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	3,02E-05	>2,50E-04
32	Orfenadrina clorhidrato	2,51E-04	2,08E-04	>5,00E-04	1,00E-04	>5,00E-04	2,24E-05	2,14E-06
33	Nicotina	3,81E-03	1,23E-02	>2,00E-02	1,53E-03	>2,00E-02	5,89E-04	>8,00E-03
34	Lindano	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04
37	Etanol	1,12E+00	1,15E+00	5,22E-01	2,16E-02	>2,17E+00	2,14E+00	>3,00E+00
38	Paratión	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>2,20E-04	>2,20E-04
39	Diclorvos	1,29E-04	1,69E-04	8,56E-05	6,11E-05	1,18E-04	3,63E-05	3,09E-05
40	Fisostigmina	3,29E-03	9,29E-04	9,01E-04	1,73E-03	7,54E-04	1,12E-03	1,07E-03
41	Amonio glufosinato	>8,00E-02	>8,00E-02	2,80E-02	5,13E-04	>8,00E-02	>8,00E-02	>8,00E-02
42	cis-Diaminoplatino (II) dicloruro	>3,50E-04	>3,50E-04	>3,50E-04	1,04E-04	>3,50E-04	>3,50E-04	>3,50E-04
43	Dietilenglicol	4,76E-01	5,20E-01	>9,40E-01	3,00E-01	2,29E-01	1,15E-01	5,62E-03
44	Diquat dibromuro	3,43E-04	7,92E-04	3,14E-04	2,43E-04	>1,00E-03	1,45E-04	>8,00E-04
45	Ocratoxina A	>1,00E-04	>1,00E-04	1,25E-05	>1,00E-04	>1,00E-04	>1,00E-04	>1,00E-04
46	Ciclosporina A	2,28E-05	>2,50E-05	3,12E-06	2,64E-07	>2,50E-05	>2,50E-05	>2,50E-05
47	17 α -Etinilestradiol	1,11E-04	2,12E-04	>5,00E-04	>5,00E-04	>5,00E-04	8,91E-06	>5,28E-05

Tabla 15(continuación).

Número Acutoxbase	Compuestos	A704 LOG EC50/IC50 RMFI (M)						
		Panel Viabilidad		Panel Oxidativo				
		NRU	YP	Perox.	Superox.	NO	8-Oxo Nuc.	8-Oxo Mit.
48	Sodio fluoruro	2,87E-03	3,84E-03	2,13E-03	2,14E-03	9,60E-04	3,24E-03	>7,00E-03
49	Paraquat dicloruro	6,14E-04	5,75E-03	2,86E-03	1,76E-03	5,18E-04	>3,16E-03	>3,16E-03
51	Dimetilformamida	2,01E-01	1,63E-01	1,88E-01	1,25E-01	>5,00E-01	>2,50E-01	>2,50E-01
52	Hierro (II) sulfato	7,29E-03	1,24E-02	2,08E-03	2,34E-03	1,36E-03	>3,60E-03	>3,60E-03
53	Amitriptilina clorhidrato	>5,00E-05	2,89E-05	>5,00E-05	6,17E-06	>5,00E-05	2,09E-06	>5,00E-05
54	Etilenglicol	1,52E+00	1,98E+00	>4,00E+00	>4,00E+00	>4,00E+00	>1,61E+00	>1,61E+00
55	Metanol	2,53E+00	3,61E+00	2,50E+00	2,44E+00	>5,00E+00	>3,15E+00	>3,15E+00
57	Sodio cloruro	>1,00E-02	>1,00E-02	>1,00E-02	>1,00E-02	>1,00E-02	>1,00E-02	>1,00E-02
60	Litio sulfato	4,14E-02	6,99E-02	2,09E-02	1,05E-01	1,41E-03	5,50E-02	>7,50E-02
63	Propranolol clorhidrato	1,25E-04	1,05E-04	2,03E-05	9,83E-05	2,88E-05	9,77E-07	>1,50E-04
64	Arsénico trióxido	>4,62E-03	>4,62E-03	1,80E-03	8,81E-06	>4,62E-03	>2,73E-05	>2,73E-05
66	Talio sulfato	4,16E-04	1,96E-03	>2,00E-03	9,41E-04	>2,00E-03	>2,00E-03	>2,00E-03
67	Warfarina	>4,65E-03	>4,65E-03	2,91E-04	6,45E-05	>4,65E-03	>2,20E-03	>2,20E-03
71	Hexaclorofeno	2,03E-05	1,35E-04	5,16E-05	7,61E-05	>1,97E-04	>9,83E-05	>9,83E-05
76	Cloral hidrato	1,44E-03	9,09E-03	6,26E-03	1,00E-04	2,02E-03	3,09E-04	>1,00E-02
77	2,4-Ácido diclorofenoxiacético	>3,00E-02	>3,00E-02	5,72E-02	>3,00E-02	>3,00E-02	>3,00E-02	>3,00E-02
80	Estricnina	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	3,48E-04	>1,00E-03	1,82E-05	>1,00E-03
91	Sodio selenato	3,30E-04	4,53E-04	1,76E-04	3,45E-04	>2,44E-02	>7,94E-04	>7,94E-04
92	Acetonitrilo	8,81E-01	1,58E+00	2,76E-01	3,30E-01	>4,00E+00	4,68E-01	3,72E-01
96	Epinefrina bitartrato	2,98E-04	2,79E-04	8,34E-04	8,24E-04	>7,50E-04	>1,08E-04	>1,08E-04

Tabla 16.

Número Acutoxbase	Compuestos	SH-SY5Y LOG EC50/IC50 RMFI (M)						
		Panel Viabilidad		Panel Oxidativo				
		NRU	YP	Perox.	Superox.	NO	8-Oxo Nuc.	8-Oxo Mit.
1	Acetaminógeno	1,77E-02	2,11E-02	>3,31E-02	1,70E-02	>4,63E-02	1,29E-02	1,29E-02
2	Ácido acetilsalicílico	1,20E-02	1,63E-02	>2,00E-02	>2,00E-02	1,12E-03	1,45E-02	7,08E-03
3	Atropina monohidrato sulfato	1,10E-03	1,53E-03	>1,50E-03	1,45E-03	>2,00E-03	5,75E-04	>1,00E-03
4	Cafeína	2,06E-02	2,45E-02	>4,00E-02	3,00E-02	>4,00E-02	4,07E-06	>1,00E-04
5	Carbamazepina	>2,00E-03	>2,00E-03	>2,00E-03	4,74E-04	2,10E-04	>1,00E-03	>1,00E-03
6	Colchicina	>1,00E-02	>1,00E-02	2,19E-05	8,65E-04	>1,00E-02	6,46E-04	6,76E-05
7	Cicloheximida	2,31E-03	5,01E-03	>5,00E-03	>5,00E-03	>5,00E-03	1,23E-04	3,24E-07
8	Diazepam	2,97E-04	3,20E-04	>5,00E-04	3,10E-05	>5,00E-04	8,13E-05	>1,60E-04
9	Digoxina	8,70E-03	1,95E-04	2,82E-07	>6,40E-05	>6,40E-05	1,70E-08	1,51E-08
10	Isopropanol	5,07E-01	4,15E-02	>6,30E-02	>6,30E-02	>2,93E-02	>6,30E-02	>6,30E-02
11	Malatión	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	5,39E-04	>1,00E-03	6,46E-07	>1,00E-03
12	Mercurio (II) cloruro	2,80E-05	1,14E-04	>3,33E-05	6,90E-05	>1,60E-04	2,29E-06	>3,30E-05
13	Pentaclorofenol	1,52E-04	3,51E-04	2,40E-04	7,94E-05	3,56E-05	1,07E-04	>2,50E-04
14	Fenobarbital	7,30E-03	1,05E-02	1,19E-02	1,53E-03	1,37E-03	6,31E-07	>1,00E-04
15	Dodecilsulfato sódico (SDS)	2,18E-04	2,28E-04	9,40E-05	3,16E-04	>3,40E-04	1,45E-06	>2,43E-04
16	Ácido valproico	>2,30E-02	>2,30E-02	2,72E-04	>2,30E-02	>2,30E-02	1,41E-02	5,89E-05
17	5-Fluorouracilo	>2,00E-02	>2,00E-02	>2,00E-02	2,15E-05	>2,00E-02	6,61E-05	>6,30E-04
18	Benceno	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02	>1,50E-02	>1,50E-02
19	tert-butil Hidroperóxido	1,68E-05	1,36E-05	1,21E-05	>2,00E-05	>1,00E-04	>2,61E-05	>2,61E-05
21	Cadmio cloruro	2,01E-05	4,51E-05	>6,80E-05	1,19E-05	>5,00E-04	7,08E-06	4,27E-06

Tabla 16 (continuación).

Número Acutoxbase	Compuestos	SH-SY5Y LOG EC50/IC50 RMFI (M)						
		Panel Viabilidad		Panel Oxidativo				
		NRU	YP	Perox.	Superox.	NO	8-Oxo Nuc.	8-Oxo Mit.
23	Pireno	>6,00E-05	>6,00E-05	>6,00E-05	>6,00E-05	>6,00E-05	3,31E-07	>6,00E-05
26	Hexaclorobenceno	>7,50E-05	>7,50E-05	>7,50E-05	>7,50E-05	>7,50E-05	5,13E-07	4,07E-07
28	Amiodarona clorhidrato	9,67E-05	2,68E-04	>2,30E-04	1,32E-04	>9,00E-05	4,68E-06	>1,00E-04
29	Verapamilo clorhidrato	5,04E-05	1,06E-04	>1,25E-04	1,60E-05	>1,25E-04	>1,25E-04	>1,25E-04
30	Rifampicina	>2,50E-04	2,10E-04	1,15E-05	>2,50E-04	2,18E-05	6,76E-06	4,47E-07
31	Tetraciclina clorhidrato	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	2,51E-05	1,05E-06
32	Orfenadrina clorhidrato	2,28E-04	3,59E-04	1,38E-04	1,84E-04	3,47E-04	>1,60E-04	>1,60E-04
33	Nicotina	1,54E-02	4,95E-03	5,42E-03	9,43E-03	>1,00E-02	>5,00E-03	>5,00E-03
34	Lindano	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04
37	Etanol	1,20E+00	1,05E+00	>1,09E+00	9,33E-02	>1,01E+00	>5,43E-01	>5,43E-01
38	Paratión	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>3,20E-04	>3,20E-04
39	Diclorvos	1,82E-04	9,70E-04	>1,50E-03	3,32E-04	1,03E-03	>4,70E-04	>4,70E-04
40	Fisostigmina	7,90E-04	2,96E-03	2,18E-03	4,62E-03	>5,00E-03	>1,60E-03	>1,60E-03
41	Amonio glufosinato	7,45E-02	>8,00E-02	2,58E-04	2,59E-02	>8,00E-02	5,13E-03	>7,50E-02
42	cis-Diaminoplatino (II) dicloruro	6,60E-05	2,85E-05	1,69E-04	1,57E-04	>3,50E-04	>1,10E-04	>1,10E-04
43	Dietilenglicol	2,92E-01	4,77E-01	3,19E-01	2,92E-01	>4,00E-01	1,20E-03	7,24E-04
44	Diquat dibromuro	3,93E-05	7,93E-04	>5,00E-03	1,54E-04	3,77E-06	1,66E-04	>3,50E-03
45	Ocratoxina A	>1,00E-04	>1,00E-04	>1,00E-04	>1,00E-04	>1,00E-04	>4,70E-05	>4,70E-05
46	Ciclosporina A	1,16E-05	1,04E-05	1,22E-05	8,16E-06	>1,20E-05	1,95E-08	>1,20E-05
47	17 α -Ethinilestradiol	1,01E-04	1,56E-04	1,25E-05	4,76E-06	>1,00E-04	1,49E-04	1,49E-04

Tabla 16(continuación).

Número Acutoxbase	Compuestos	SH-SY5Y LOG EC50/IC50 RMFI (M)						
		Panel Viabilidad		Panel Oxidativo				
		NRU	YP	Perox.	Superox.	NO	8-Oxo Nuc.	8-Oxo Mit.
48	Sodio fluoruro	1,28E-02	1,19E-02	4,79E-05	>7,92E-03	>5,00E-03	>1,50E-02	>1,50E-02
49	Paraquat dicloruro	2,81E-04	5,75E-03	1,68E-03	6,94E-04	>1,00E-02	>1,00E-03	>1,00E-03
51	Dimetilformamida	2,08E-01	2,70E-01	>5,00E-01	2,10E-01	>3,00E-01	>2,33E-01	>2,33E-01
52	Hierro (II) sulfato	7,61E-03	8,90E-03	1,58E-03	2,15E-03	>1,80E-02	>1,80E-02	>1,80E-02
53	Amitriptilina clorhidrato	8,27E-06	8,08E-05	3,16E-05	2,60E-07	>1,00E-04	>1,00E-05	>1,00E-05
54	Etilenglicol	1,37E+00	1,77E+00	1,61E+00	8,71E-01	>4,00E+00	>1,61E+00	>1,61E+00
55	Metanol	2,90E+00	1,83E+00	2,86E+00	6,43E-01	>3,20E+00	>3,20E+00	>3,20E+00
57	Sodio cloruro	>1,00E-02	>1,00E-02	>1,00E-02	>1,00E-02	>1,00E-02	>4,00E-03	>4,00E-03
60	Litio sulfato	1,25E-02	4,73E-02	5,69E-02	1,02E-02	>9,00E-02	3,09E-06	>6,00E-05
63	Propranolol clorhidrato	2,28E-04	2,92E-04	>2,00E-04	7,34E-05	>2,50E-04	1,86E-04	>2,50E-04
64	Arsénico trióxido	1,20E-04	3,79E-05	4,66E-05	3,53E-05	4,86E-05	>5,86E-05	>5,86E-05
66	Talio sulfato	1,27E-03	1,98E-03	>2,00E-03	1,60E-03	>9,30E-04	>2,00E-03	>2,00E-03
67	Warfarina	3,84E-03	3,50E-03	7,19E-04	3,29E-03	1,07E-03	>4,65E-03	>4,65E-03
71	Hexaclorofeno	3,50E-05	1,08E-04	5,10E-05	9,13E-05	>1,23E-04	>9,83E-05	>9,83E-05
76	Cloral hidrato	5,77E-03	1,84E-02	3,15E-03	7,99E-03	4,22E-06	8,51E-03	1,00E-03
77	2,4-Ácido diclorofenoxiacético	4,58E-03	1,43E-02	2,88E-03	1,25E-03	>2,00E-02	2,45E-01	5,75E-02
80	Estricnina	>1,00E-03	>1,00E-03	7,60E-04	3,34E-04	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03
91	Sodio selenato	2,60E-05	1,66E-04	6,38E-03	4,09E-04	1,92E-03	>2,46E-03	>2,46E-03
92	Acetonitrilo	8,61E-01	9,54E-01	2,94E+00	1,63E+00	>4,00E+00	2,57E-03	>5,00E-02
96	Epinefrina bitartrato	1,33E-03	3,88E-04	2,32E-04	3,40E-04	8,55E-06	2,40E-04	>1,50E-03

Tabla 17.

Número Acutoxbase	Compuestos	HepG2 LOG EC50/IC50 RMFI (M)						
		Panel Viabilidad		Panel Oxidativo				
		NRU	YP	Perox.	Superox.	NO	8-Oxo Nuc.	8-Oxo Mit.
1	Acetaminofeno	2,17E-02	1,95E-02	1,13E-02	3,09E-02	>4,63E-02	1,29E-02	>1,40E-02
2	Ácido acetilsalicílico	1,21E-02	1,89E-02	5,53E-03	>2,00E-02	>2,00E-02	>1,00E-03	>1,00E-03
3	Atropina monohidrato sulfato	2,45E-03	1,70E-03	8,31E-05	1,33E-03	1,33E-03	>9,30E-04	>9,30E-04
4	Cafeína	1,13E-02	2,76E-02	9,41E-03	1,34E-02	>4,00E-02	>1,00E-03	>1,00E-03
5	Carbamazepina	>1,00E-03	>1,00E-03	2,29E-04	9,85E-04	8,76E-04	>1,00E-03	>1,00E-03
6	Colchicina	3,96E-03	4,69E-03	5,14E-03	9,47E-04	>1,00E-02	2,45E-05	7,71E-06
7	Cicloheximida	9,14E-05	>1,00E-02	1,83E-07	>1,00E-02	>1,00E-02	>1,00E-03	>1,00E-03
8	Diazepam	1,76E-05	1,93E-04	4,73E-05	2,00E-04	4,65E-05	>7,57E-05	>7,57E-05
9	Digoxina	9,14E-07	2,57E-07	>1,28E-04	3,98E-08	>1,28E-04	>1,20E-04	>1,20E-04
10	Isopropanol	1,79E-01	1,76E-01	1,15E-01	>8,32E-01	1,79E-01	>4,00E-04	>4,00E-04
11	Malatión	4,87E-04	8,50E-04	1,32E-04	5,95E-04	2,39E-04	>1,00E-03	>1,00E-03
12	Mercurio (II) cloruro	6,13E-05	5,94E-05	2,73E-05	1,65E-05	4,59E-05	>4,70E-05	>4,70E-05
13	Pentaclorofenol	5,05E-05	8,63E-05	>3,00E-04	1,06E-04	1,18E-04	>3,60E-04	>3,60E-04
14	Fenobarbital	>5,00E-03	>5,00E-03	3,30E-03	>5,00E-03	3,72E-03	>1,00E-03	>1,00E-03
15	Dodecilsulfato sódico (SDS)	1,86E-04	2,18E-04	1,03E-04	1,92E-04	1,41E-04	1,70E-04	>2,36E-04
16	Ácido valproico	1,16E-02	9,07E-03	>2,30E-02	>2,30E-02	>2,30E-02	>1,00E-03	>1,00E-03
17	5-Fluorouracilo	>2,00E-02	>2,00E-02	>2,00E-02	>2,00E-02	>2,00E-02	>1,00E-03	>1,00E-03
18	Benceno	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02	>1,00E-03	>1,00E-03
19	tert-butil Hidroperóxido	1,83E-04	1,71E-04	>2,33E-04	>2,33E-04	>2,33E-04	>6,80E-05	>6,80E-05
21	Cadmio cloruro	8,18E-06	7,78E-06	6,80E-06	>1,00E-05	7,61E-06	>1,47E-05	>1,47E-05

Tabla 17(continuación).

Número Acutoxbase	Compuestos	HepG2 LOG EC50/IC50 RMFI (M)						
		Panel Viabilidad		Panel Oxidativo				
		NRU	YP	Perox.	Superox.	NO	8-Oxo Nuc.	8-Oxo Mit.
23	Pireno	>6,00E-05	>6,00E-05	>6,00E-05	>6,00E-05	>6,00E-05	>2,79E-05	>2,79E-05
26	Hexaclorobenceno	>7,50E-05	>7,50E-05	>7,50E-05	>7,50E-05	>7,50E-05	>2,33E-05	>2,33E-05
28	Amiodarona clorhidrato	2,03E-05	3,06E-05	3,63E-05	>1,00E-04	3,65E-04	>4,00E-05	3,39E-05
29	Verapamilo clorhidrato	7,61E-05	1,03E-04	8,00E-05	>2,50E-04	>2,50E-04	3,46E-07	>1,25E-04
30	Rifampicina	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04
31	Tetraciclina clorhidrato	>2,50E-04	>2,50E-04	2,01E-05	>2,50E-04	1,82E-04	>2,50E-04	>2,50E-04
32	Orfenadrina clorhidrato	2,49E-04	3,15E-04	1,40E-04	2,30E-04	1,87E-04	>1,60E-04	>1,60E-04
33	Nicotina	5,01E-03	4,87E-03	2,87E-03	1,15E-03	>1,00E-02	>1,00E-02	6,27E-03
34	Lindano	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04	>6,00E-05	>6,00E-05
37	Etolol	1,64E+00	1,55E+00	7,16E-01	>2,17E+00	5,09E-01	>1,09E+00	>1,09E+00
38	Paratión	>1,00E-03	>1,00E-03	1,18E-05	>1,00E-03	1,81E-04	4,47E-06	3,16E-06
39	Diclorvos	6,31E-04	8,35E-04	3,47E-04	1,46E-04	6,39E-04	>4,70E-04	>4,70E-04
40	Fisostigmina	6,01E-03	6,29E-03	2,30E-03	4,08E-03	3,41E-03	>2,50E-03	>2,50E-03
41	Amonio glufosinato	>8,00E-02	>8,00E-02	>8,00E-02	>8,00E-02	>8,00E-02	>8,00E-02	>8,00E-02
42	cis-Diaminoplatino (II) dicloruro	2,09E-04	1,57E-04	2,62E-05	2,11E-04	>3,50E-04	1,26E-04	8,71E-05
43	Dietilenglicol	2,27E-01	2,74E-01	2,30E-01	1,54E-01	1,21E-01	9,33E-04	1,66E-03
44	Diquat dibromuro	9,56E-04	4,93E-04	7,62E-05	7,60E-04	2,12E-04	1,23E-04	>2,20E-04
45	Ocratoxina A	7,08E-06	4,93E-06	1,89E-07	>1,00E-04	>1,00E-04	>1,00E-04	>1,00E-04
46	Ciclosporina A	1,49E-05	>1,70E-05	>1,70E-05	1,31E-05	>1,70E-05	2,95E-06	3,63E-06
47	17 α -Etinilestradiol	6,59E-05	9,75E-05	4,34E-05	>1,49E-04	>1,49E-04	7,24E-06	>1,49E-04

Tabla 17 (continuación).

Número Acutoxbase	Compuestos	HepG2 LOG EC50/IC50 RMFI (M)						
		Panel Viabilidad		Panel Oxidativo				
		NRU	YP	Perox.	Superox.	NO	8-Oxo Nuc.	8-Oxo Mit.
48	Sodio fluoruro	>2,50E-03	>2,50E-03	>2,50E-03	>2,50E-03	1,39E-03	>2,50E-03	>2,50E-03
49	Paraquat dicloruro	3,15E-04	3,93E-04	1,47E-04	2,19E-04	2,23E-04	>1,00E-03	>1,00E-03
51	Dimetilformamida	2,62E-01	4,07E-01	3,65E-01	>5,00E-01	>5,00E-01	>2,79E-01	>2,79E-01
52	Hierro (II) sulfato	7,26E-03	1,00E-02	3,29E-03	>1,44E-02	8,76E-03	>1,00E-03	>1,00E-03
53	Amitriptilina clorhidrato	4,86E-05	6,05E-05	2,87E-05	1,16E-05	6,17E-05	>1,00E-05	>1,00E-05
54	Etilenglicol	1,01E+00	1,47E+00	9,79E-01	1,25E+00	>3,00E+00	7,59E-01	9,12E-01
55	Metanol	1,30E+00	1,20E+00	>1,86E+00	>1,86E+00	>1,86E+00	1,55E+00	>3,20E+00
57	Sodio cloruro	>8,56E-02	>8,56E-02	5,97E-02	>8,56E-02	>8,56E-02	>1,00E-03	>1,00E-03
60	Litio sulfato	4,82E-02	7,45E-02	1,28E-02	4,95E-02	6,47E-03	>4,19E-02	>4,19E-02
63	Propranolol clorhidrato	7,97E-05	7,87E-05	>1,00E-04	>1,00E-04	>1,00E-04	>1,00E-03	>1,00E-03
64	Arsénico trióxido	8,86E-05	1,12E-04	1,39E-06	3,94E-05	6,15E-06	2,57E-05	>1,26E-04
66	Talio sulfato	1,01E-03	1,56E-03	1,70E-04	1,90E-06	>2,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03
67	Warfarina	2,02E-03	>2,20E-03	1,29E-04	>2,20E-03	1,69E-03	>1,02E-03	>1,02E-03
71	Hexaclorofeno	2,77E-06	1,32E-05	1,35E-06	2,07E-05	>2,46E-06	>4,92E-05	>4,92E-05
76	Cloral hidrato	1,00E-02	8,78E-03	1,41E-03	>2,00E-02	1,16E-02	>1,49E-02	>1,49E-02
77	2,4-Ácido diclorofenoxiacético	4,29E-03	4,75E-03	6,45E-03	4,55E-03	8,52E-03	5,37E-05	>1,50E-04
80	Estricnina	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03
91	Sodio selenato	2,85E-04	3,85E-04	9,72E-05	>1,06E-03	>1,06E-03	>1,06E-03	>1,06E-03
92	Acetonitrilo	1,49E+00	1,52E+00	>2,00E+00	>2,00E+00	>2,00E+00	>1,50E+00	>1,50E+00
96	Epinefrina bitartrato	1,67E-03	4,06E-04	8,37E-04	>5,00E-03	>5,00E-03	>1,50E-03	>1,50E-03

2. Evaluación de la capacidad predictiva de los ensayos citómicos *in vitro*

2.1 Correlación de los valores de toxicidad *in vitro* con la LC50 humana

Para evaluar la capacidad predictiva de nuestros ensayos se compararon con los valores de LC50 de humano determinados por Sjöström *et al.* (2008).

Los valores de LC50 de humano fueron determinados a partir de la concentración letal y subletal de los compuestos en sangre obtenida de informes médicos y forenses de casos de envenenamiento agudo (Sjöström *et al.*, 2008). Para los compuestos cicloheximida, SDS, benceno, tert-butilo hidroperóxido, pireno, tetraciclina, fisostigmina, dietilenglicol, ocratoxina A, 17 α -Ethinilestradiol y epinefrina bitartrato fue posible determinar la toxicidad letal aguda en humano. Por ello, se realizaron correlaciones con 49 compuestos cuya LC50 es conocida.

Tal y como se ha descrito anteriormente, no se obtuvo para todos los ensayos y líneas celulares una IC50/EC50. En la Tabla 18 se resume el valor de R² y n obtenidos para cada correlación, así como el número de referencia de los compuestos que presentan efecto en ese ensayo.

Tabla 18: Correlación de los valores IC50/EC50 del panel citómico de estrés oxidativo con los valores LC50 obtenidos por Sjöström *et al.*, (2008). n representa el número de compuestos que producen efecto y se utilizan en las correlaciones, cuyo código se incluye.

A704						
Viabilidad (NRU) n = 39	Viabilidad (YP) n = 36	Actividad Peroxidativa n = 38	Anión Superóxido n = 47	Óxido Nítrico n = 15	8-Oxo nuclear n = 29	8-Oxo mitocondrial n = 6
R ² = 0.531 n = 32	R ² = 0.539 n = 30	R ² = 0.692 n = 32	R ² = 0.530 n = 41	R ² = 0.790 n = 12	R ² = 0.580 n = 24	R ² = 0.335 n = 4
1, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 14, 17, 21, 28, 29, 32, 33, 37, 39, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 60, 63, 66, 71, 76, 91, 92	1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, 13, 21, 28, 29, 32, 33, 37, 39, 44, 48, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 60, 63, 66, 71, 76, 91, 92	1, 2, 3, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 29, 37, 39, 41, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 55, 60, 63, 64, 67, 71, 76, 77, 91, 92	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 21, 28, 29, 30, 32, 33, 37, 39, 41, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 60, 63, 64, 66, 67, 71, 76, 80, 91, 92	1, 4, 9, 21, 26, 39, 48, 49, 52, 60, 63, 76	2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 13, 16, 21, 28, 30, 32, 33, 37, 39, 44, 48, 53, 60, 63, 76, 80, 92	3, 32, 39, 92
SH-SY5Y						
Viabilidad (NRU) n = 45	Viabilidad (YP) n = 45	Actividad Peroxidativa n = 32	Anión Superóxido n = 44	Óxido Nítrico n = 13	8-Oxo nuclear n = 31	8-Oxo mitocondrial n = 13
R ² = 0.521 n = 38	R ² = 0.634 n = 38	R ² = 0.451 n = 26	R ² = 0.464 n = 39	R ² = 0.003 n = 12	R ² = 0.381 n = 25	R ² = 0.529 n = 10
1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 21, 28, 29, 32, 33, 37, 39, 41, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 60, 63, 64, 66, 67, 71, 76, 77, 91, 92	1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 21, 28, 29, 30, 32, 33, 37, 39, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 60, 63, 64, 66, 67, 71, 76, 77, 91, 92	6, 9, 13, 14, 16, 30, 32, 33, 41, 42, 46, 48, 49, 52, 53, 54, 55, 60, 64, 67, 71, 76, 77, 80, 91, 92	1, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 14, 17, 21, 28, 29, 32, 33, 37, 39, 41, 42, 44, 46, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 60, 63, 64, 66, 67, 71, 76, 77, 80, 91, 92	2, 5, 13, 14, 30, 32, 39, 44, 64, 67, 76, 91	1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 21, 26, 28, 30, 41, 44, 46, 60, 63, 76, 77, 92	1, 2, 6, 9, 16, 21, 26, 30, 76, 77
HepG2						
Viabilidad (NRU) n = 46	Viabilidad (YP) n = 43	Actividad Peroxidativa n = 43	Anión Superóxido n = 27	Óxido Nítrico n = 28	8-Oxo nuclear n = 14	8-Oxo mitocondrial n = 8
R ² = 0.552 n = 38	R ² = 0.572 n = 36	R ² = 0.519 n = 35	R ² = 0.453 n = 24	R ² = 0.680 n = 24	R ² = 0.685 n = 11	R ² = 0.761 n = 7
1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 21, 28, 29, 32, 33, 37, 39, 42, 44, 46, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 60, 63, 64, 66, 67, 71, 76, 77, 91, 92	1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 21, 28, 29, 32, 33, 37, 39, 42, 44, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 60, 63, 64, 66, 71, 76, 77, 91, 92	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 14, 21, 28, 29, 32, 33, 37, 38, 39, 42, 44, 49, 51, 52, 53, 54, 57, 60, 64, 66, 67, 71, 76, 77, 91	1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 32, 33, 39, 42, 44, 46, 49, 53, 54, 60, 64, 66, 71, 77	1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 32, 33, 39, 42, 44, 46, 49, 53, 54, 60, 64, 66, 71, 77	1, 6, 29, 38, 42, 44, 46, 54, 55, 64, 77	6, 28, 33, 38, 42, 46, 54

2.2 Comparación de la capacidad predictiva de los ensayos citómicos con la de los valores de referencia de toxicidad experimental

Una vez obtenidas las correlaciones, se pretendía determinar si nuestros ensayos eran mejores para predecir la toxicidad humana que los ensayos de referencia *in vivo* e *in vitro*.

Para ello, correlacionamos los datos IC50 obtenidos por el ensayo del Rojo Neutro (NRU) en 3T3, el ensayo de citotoxicidad *in vitro* de referencia (Sjöström et al., 2008) y la LD50 de rata y ratón (Hoffmann et al., 2010) con los datos de LC50 de humano (Figura 20 y Tabla 19). De los 60 compuestos del estudio, 58 tenían datos de IC50 del NRU de 3T3 (Sjöström et al., 2008), 40 de LD50 de rata y 32 de LD50 de ratón (Hoffmann et al., 2010).

La correlación más alta de los ensayos de referencia con la LC50 de humano corresponde a la toxicidad *in vivo* de ratón con una R^2 de 0,621. El siguiente valor más alto de R^2 es de 0,522 y corresponde a la correlación entre la citotoxicidad *in vitro* (IC50 de 3T3 NRU), y el más bajo corresponde a la correlación entre los valores de toxicidad en *in vivo* de rata y humana con una R^2 de 0,458.

Podemos ver que nuestro ensayo del yoduro de propidio en SH-SY5Y mejora la correlación *in vivo* de rata y ratón con los datos de LC50 de humano además de detectar más compuestos en ese análisis, aumentando también la n ($R^2 = 0,634$ y $n=38$). El ensayo de la actividad peroxidativa en A704 es el que presenta el mayor R^2 (0,692) pero con una n inferior (32), mejorando la correlación *in vivo* de ratón y rata con una n superior sólo en el primer caso. Es evidente que en los ensayos *in vivo* presentados, no se han podido obtener los 49 datos de toxicidad recopilados de la bibliografía por Hoffmann et al. (2010) (por diferentes causas apuntadas en la publicación).

La determinación *in vitro* por el NRU con 3T3 se usa como ensayo de referencia y aunque posea una R^2 inferior a la *in vivo*, permite abarcar un mayor número de compuestos cuya toxicidad es caracterizada con este ensayo. Ninguno de nuestros ensayos ha conseguido superar el número de compuestos correlacionados con la LC50 de humano.

Comparándolo con este ensayo vemos que la línea celular de adenocarcinoma humano (A704) mejora el coeficiente de determinación (R^2) en los ensayos de viabilidad NRU (0,531) y YP (0,539), y en los de determinación de la actividad peroxidativa (0,692) y anión superóxido (0,530). Con HepG2 mejoran los ensayos de viabilidad con un valor de R^2 de 0,552 en NRU y 0,572 en YP, y en SH-SY5Y con el ensayo de yoduro de propidio (0,634). También se comprobó la mejora del coeficiente de determinación en los ensayos de NO (0,680), de 8-Oxo nuclear (0,685) y mitocondrial (0,761) en HepG2, de NO (0,790), y de 8-Oxo nuclear (0,580) en A704 y 8-Oxo mitocondrial (0,529) en SH-SY5Y pero con un número de compuestos inferior a la mitad de los compuestos totales correlacionados, por lo que, a pesar de los elevados valores de R^2 en algunos casos no se puede considerar que son buenos ensayos en la predicción de la toxicidad humana.

De forma general, podemos ver que el ensayo en el que se ha podido determinar la toxicidad en más compuestos, fue el de determinación intracelular del anión superóxido en A704 ($n = 47$), aunque únicamente se pudieron correlacionar 41 compuestos debido a la ausencia de datos forenses para la toxicidad aguda humana en 6 de ellos. El mejor ensayo a nivel de correlaciones fue el de YP en SH-SY5Y con una n ligeramente inferior (45), de los que sólo 38 coinciden con la LC50 de humano, y R^2 de 0,634, superando incluso a las correlaciones *in vivo*.

Consideradas conjuntamente las tres líneas celulares, la correlación de los datos de LC50 de humano con el valor mínimo de las IC50/EC50 ($LOEC_{total}$) de cada

compuesto en cada ensayo, éstas presentan una mejor correlación ($R^2 = 0,5684$) con mayor número de compuestos ($n=48$) que el test de referencia de citotoxicidad del proyecto AcuteTox 3T3 NRU (Tabla 20). Si separamos la viabilidad ($LOEC_{viab}$) del panel de estrés oxidativo ($LOEC_{oxi}$) y consideramos además del valor mínimo general, el valor mínimo obtenido para cada línea celular con objeto de determinar tanto qué línea como que panel son los más efectivos a la hora de predecir la toxicidad humana, vemos que con el panel oxidativo podemos determinar la toxicidad de más compuestos que lo que permiten los ensayos clásicos de viabilidad. Eso se puede deber a que, usando los ensayos de estrés oxidativo, se detectan procesos tempranos de daño celular que precede la muerte, lo que permite incluir más compuestos. Las correlaciones por línea celular ofrecen mejores resultados con los ensayos de estrés oxidativo que con los de viabilidad con la excepción de SH-SY5Y, que por el contrario, disminuye bastante el valor de R^2 con estos ensayos (Tabla 20).

Para evaluar qué ensayo presenta una mejor capacidad predictiva de la toxicidad humana, se ha determinado el LOEC de cada ensayo y se ha correlacionado con la LC50 de humano (Figura 20). Se han representado en las gráficas las líneas que delimitan los outliers y alertas según la estrategia elegida por Kooijman *et al.* (2010) que será explicada más adelante.

Analizando los LOEC de cada ensayo por separado se verifica que el mejor ensayo para predecir la toxicidad aguda en humanos es el de la determinación de la actividad peroxidativa, que mejora el coeficiente de determinación de los tres ensayos de referencia y mejora la n de los dos ensayos *in vivo*, igualando la n del ensayo de 3T3 de NRU. Realmente, comparando las correlaciones obtenidas de nuestros valores LOEC con la LC50 de humano con el valor de la correlación de la LD50 de rata se contempla que todos presentan mejor R^2 , y la n es inferior apenas en los parámetros NO y 8-oxo mitocondrial. Esto se debe a que sólo disponemos de

datos de la LD50 de compuestos en rata y ratón considerados por Hoffman *et al.* (2010) como válidos para considerar su toxicidad.

En la Figura 22 se representa un resumen de los valores obtenidos en las correlaciones con humano.

Aplicando el test de transformación de Fisher se verificó que ningún test mejora significativamente las correlaciones de la IC50 de 3T3 NRU, LD50 de rata y ratón con la LC50 en humanos.

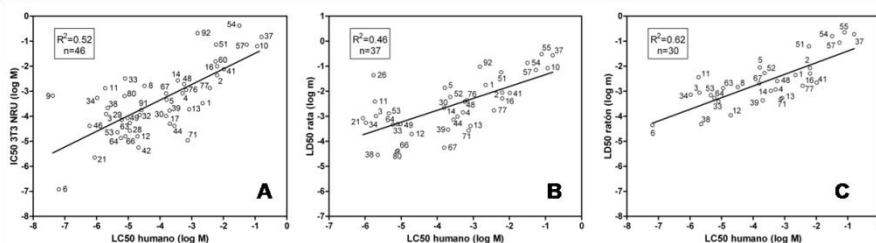


Figura 20: Correlaciones entre la LC50 de humano (Sjöström et al., 2008) y la IC50 del ensayo NRU de 3T3 (Sjöström et al., 2008), LD50 de rata y ratón (Hoffmann et al., 2010). Los números representados corresponden a los números de referencia de los compuestos utilizados en el proyecto ACuteTox (Tabla 12).

Tabla 19: Correlación de los valores de las IC50, LC50 y LD50 de NRU de 3T3, humano, rata y ratón.

	3T3	Rata	Ratón
Humano	0.552 n=46	0.458 n=37	0.621 n=30

Tabla 20: Correlación de los valores LOEC_{total} del conjunto de todos los ensayos, de los valores LOEC_{viab} y LOEC_{oxi} para cada línea celular y para el conjunto de las tres líneas, con los valores de la LC50 de humano. Se indica el número de compuestos (n) usados en la correlación.

		LOEC total	LOEC viab	LOEC oxi
Total	R ²	0,5816	0,542	0,5755
	n	48	42	48
A704	R ²	0,6634	0,5505	0,6464
	n	46	34	45
SH-SY5Y	R ²	0,43	0,6002	0,3849
	n	45	39	44
HEPG2	R ²	0,6257	0,53	0,6153
	n	43	37	39

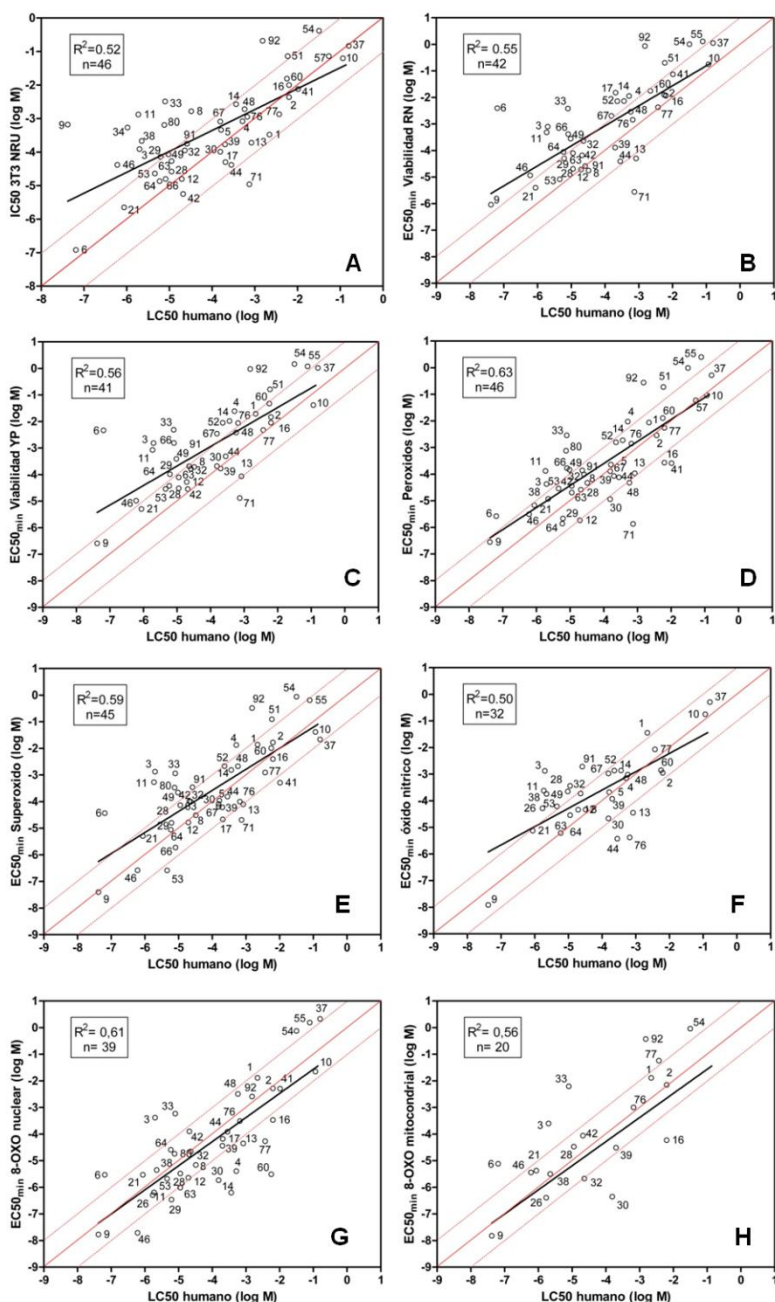


Figura 21: Correlaciones entre los datos de LC50 humana estimados a partir de la concentración letal y subletal en sangre realizados en el proyecto ACuteTox (Sjöström *etal.*2008) y los valores LOEC de IC50/EC50 obtenidos en las tres líneas celulares para cada

ensayo. Los números de las coordenadas corresponden al número de referencia de cada compuesto usado en el proyecto ACuteTox (Tablas 15, 16 y 17). La línea continua representa la correlación 1:1 y la línea discontinua representa una desviación de una unidad de logaritmo de la línea de correlación 1:1, marcando los límites de identificación de los outliers o alertas. (A) Correlación NRU de 3T3 de referencia, (B) Viabilidad determinada por el ensayo NRU, (C) viabilidad determinada por el ensayo citómico del YP, (D) actividad peroxidativa, (E) generación mitocondrial de anión superóxido, (F) niveles de óxido nítrico intracelular, (G) niveles de 8-Oxo en el DNA nuclear y (H) niveles de 8-Oxo en el DNA mitocondrial.

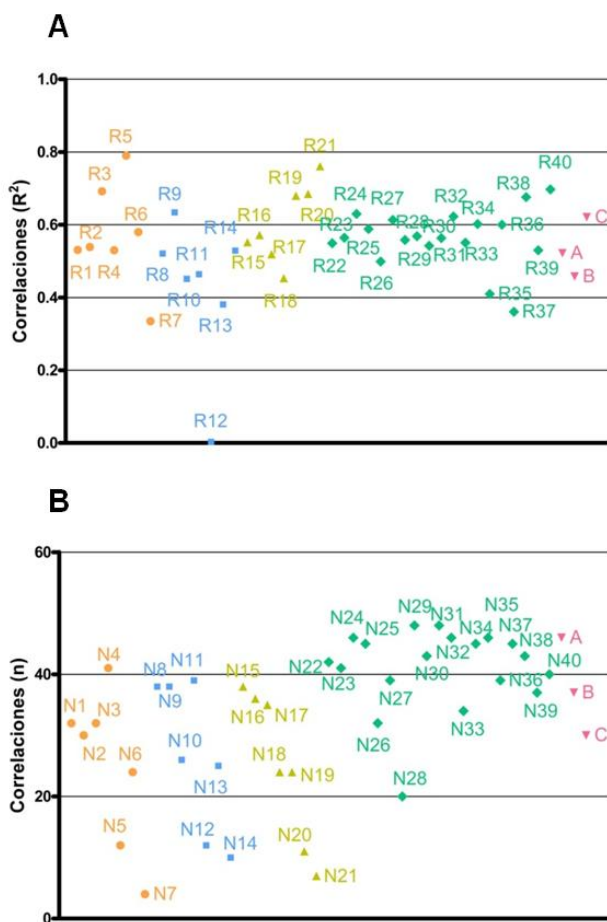


Figura 22: Gráficas resumen de los valores del coeficiente de determinación de Pearson (R^2) (A) y el número de compuestos usados en las correlaciones de humano (B). Los puntos naranjas corresponden a las correlaciones de la línea celular A704, los cuadrados azules a

SH-SY5Y, los triángulos amarillos a HepG2, los rombos verdes a los valores LOEC determinados y los triángulos rosa a los valores de los ensayos de referencia. Los puntos 1, 8 y 15 se refieren a los valores de R^2 y n del ensayo de NRU, los números 2, 9 y 16 son referentes al ensayo de YP. 3, 10 y 17 corresponden al ensayo de determinación de la actividad peroxidativa, 4, 11 y 18 de anión superóxido, 5, 12 y 19 son referentes al NO y los números 5, 13 y 20, 6, 14 y 21 se refieren a la 8-Oxo nuclear y mitocondrial respectivamente. Los valores de la R y N del 22 al 28 corresponden a los valores de R^2 y al número de compuestos que se ha correlacionado con humano cuando se determinaba el valor mínimo del ensayo del NRU, YP, peróxidos, superóxidos, NO y 8-oxo Nuc y Mit respectivamente. El R y N29, 32, 35 y 38 corresponden a las correlaciones de los valores LOEC_{total}, de A704, SH-SY5Y y HepG2 respectivamente, así como los valores de R y N30, 33, 36 y 39 corresponden a los valores LOEC_{viab} y los R y N31, 34, 37 y 40 a los valores LOEC_{oxi}. A, B y C conciernen a las correlaciones de los ensayos de referencia de la IC50 de NRU de 3T3, LD50 de rata y LD50 de ratón respectivamente.

2.3 Identificación y corrección de outliers y alertas del ensayo de 3T3 NRU

Otro objetivo de este estudio era desarrollar un modelo *in vitro* que permita la identificación y corrección de outliers de los ensayos clásicos de toxicidad *in vitro*. Outliers son compuestos químicos que en los ensayos *in vitro* de citotoxicidad presentan una baja correlación con la toxicidad aguda en humano (Sjöström et al., 2008).

Para su determinación se siguió la estrategia elegida por Kooijman *et al.* (2010), en la que se atribuía la definición de outliers del test de NRU de 3T3 a los compuestos cuyo valor de IC50 mostraba al menos una diferencia de una unidad de logaritmo cuando se comparó con los valores de LC50 de humano obtenidos por Sjöström et al. (2008). Se consideran como outliers los compuestos con un valor de IC50/EC50 superior a la LC50 en al menos una unidad de logaritmo y como alertas los compuestos con un valor de IC50/EC50 inferior a la LC50 en al menos una unidad de logaritmo. Según este criterio, un outlier es un compuesto más tóxico *in vivo* que *in vitro* y una alerta es un compuesto más tóxico *in vitro* que *in vivo*.

El ensayo de 3T3 NRU genera un total de 13 outliers: sulfato de atropina monohidratada, diazepam, digoxina, malatión, verapamilo clorhidrato, nicotina, lindano, paratión, ciclosporina A, dimetilformamida, etilenglicol, estricnina y acetonitrilo y sólo un alerta, el hexaclorofeno (Figura 23A).

Considerando los valores $LOEC_{total}$ determinados en nuestros ensayos, seis de estos compuestos (diazepam, digoxina, malatión, paratión, estricnina y acetonitrilo) fueron corregidos, colocándose en el rango válido de predicción de la toxicidad humana. Dos de ellos, el verapamilo clorhidrato y la ciclosporina A, pasaron a ser alertas – predicen la toxicidad a dosis al menos 10 veces inferiores a las determinadas por la estimación de la toxicidad humana – considerándose una gran mejora en la predicción de toxicidad ya que, al contrario que NRU de 3T3, no sólo no subestima la toxicidad de estos compuestos si no que la considera alta a dosis mucho más bajas. Kooijman et al., (2010) también pudieron corregir la toxicidad de diazepam, digoxina, malatión y verapamilo e identificaron como alerta la ciclosporina A, al igual que lo verificado por nuestros ensayos. Dos de las alertas de NRU en 3T3 (atropina monohidrato sulfato y la nicotina) mejoraron, acercándose así más al rango de predicción correcta y dos de ellos (dimetilformamida y el etilenglicol) se alejaron ligeramente del rango, prácticamente sobreponiéndose con los valores de 3T3 NRU (Figura 23B). Esta Figura también muestra que nuestro sistema de determinación de la toxicidad incrementa la predicción de once de estos trece compuestos.

Un dato importante es que sólo tres de estos outliers se pudieron corregir utilizando únicamente los ensayos de viabilidad ($LOEC_{viab}$) (diazepam, digoxina y verapamilo clorhidrato) frente a los seis que se posicionaron en el rango de predicción de toxicidad óptimo y las dos alertas conseguidas utilizando los valores $LOEC_{oxi}$ (de los ensayos del panel oxidativo) (Figura 24). Una vez más se evidencia

que los ensayos que determinan un daño celular que precede a la muerte, aportan una mejoría frente a los ensayos clásicos de determinación de la muerte celular. Forsby et al. (2009) también mostraron que los ensayos de viabilidad o de integridad de membrana en células neuronales no corregían los outliers del ensayo de NRU en 3T3, obteniéndose valores muy semejantes a los determinados en ese ensayo y manifestó la necesidad de enfocar los estudios *in vitro* en otro tipo de alteraciones celulares anteriores a la muerte.

Considerados los ensayos por separado se verificó que el más sensible a la hora de corregir outliers es el ensayo de la 8-Oxo nuclear. Lo hace en seis compuestos (diazepam, digoxina, malatión, paratión, estricnina y acetonitrilo), y transforma en alertas los compuestos verapamilo clorhidrato (29) y ciclosporina A (46) (Figura 25). Hay que tener en cuenta que en estos ensayos se calculó la EC20 porque es el máximo efecto causado por el control positivo. A continuación se sitúa el ensayo de determinación de la actividad peroxidativa que permite corregir cinco compuestos (diazepam, digoxina, verapamilo clorhidrato, paratión, y ciclosporina A), y después el del anión superóxido, que lo hace en cuatro casos (diazepam, digoxina, verapamilo clorhidrato y ciclosporina A). El único ensayo que transforma los outliers de NRU a alertas es el de la 8-Oxo nuclear, que puede deberse al hecho de utilizar un indicador más sensible, como es la EC20.

Analizando la corrección de outliers en cada línea celular no se observan muchas diferencias entre ellas (Figura 26). Verificamos que diazepam, digoxina y verapamilo clorhidrato son corregidos por todas las líneas, destacando el verapamilo clorhidrato, un fármaco hepatotóxico que es una alerta en HepG2. La ciclosporina A es corregida por A704 y HepG2. Era de esperar que este compuesto fuera corregido por ambas líneas celulares, ya que se sabe que sus dianas de toxicidad son el riñón y el hígado (Clothier et al., 2013; Acutoxbase; Kinsner-Ovaskainen et al., 2009). Los

compuestos malatión y acetonitrilo, dos compuestos neurotóxicos (Clothier et al., 2013; Acutoxbase; Kinsner-Ovaskainen et al., 2009) sólo son corregidos por SH-SY5Y mientras que paratión (hepatotóxico y neurotóxico) (Clothier et al., 2013) y estricnina (nefrotóxico, neurotóxico y hepatotóxico) (Clothier et al., 2013; Acutoxbase; Kinsner-Ovaskainen et al., 2009) sólo se corrigen por HepG2 y A704, respectivamente.

Forsby *et al.* (2009) usando SH-SY5Y diferenciadas, pudo corregir los outliers digoxina, lindano, malatión y paratión. Este último no fue corregido por nuestros ensayos en esta línea celular, pero sí con HepG2. Tampoco se corrigió el lindano con ninguno de los ensayos en ninguna línea celular, aunque si lo pudieron hacer Forsby *et al.*, (2009) y Gustafsson *et al.*, (2010). Además, Gustafsson *et al.*, usando cultivos primarios pudieron corregir atropina y nicotina, que no se pudo corregir por ningún otro ensayo.

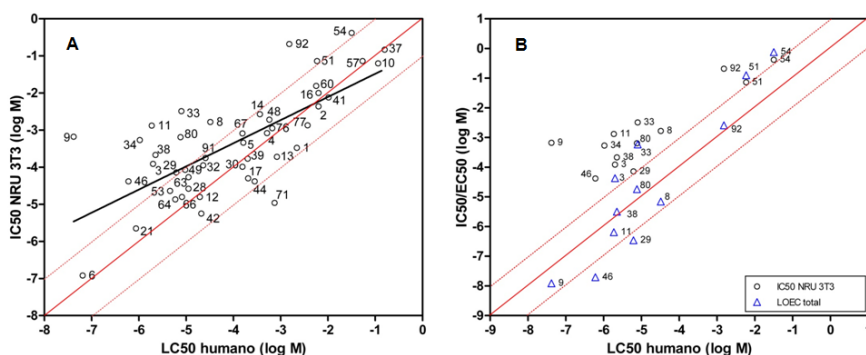


Figura 23: Identificación y correlación de los outliers del ensayo NRU frente a la LC50 de humano (Sjöström et al. 2008). La línea continua marca la correlación perfecta 1:1 y las líneas discontinuas representan la desviación de una unidad de logaritmo de base 10 de la correlación perfecta, marcando el límite para la identificación de outliers o alertas. Los números representados corresponden a los números de referencia utilizados en el proyecto ACuteTox (Tabla 12). (A) Correlación entre los valores de IC50 el ensayo de NRU en 3T3 y LC50 de humano (Sjöström et al. 2008). Los compuestos que se sitúan encima de la línea discontinua superior, representan los outliers de este ensayo. El compuesto 71 (hexaclorofeno) es el alerta de este test. (B) Correlación de los outliers identificados en el ensayo de NRU en 3T3 con los valores LOEC obtenidos en el panel citómico en las tres

líneas celulares. Los círculos representan los valores de NRU 3T3 y los triángulos los valores LOEC obtenidos en nuestros experimentos.

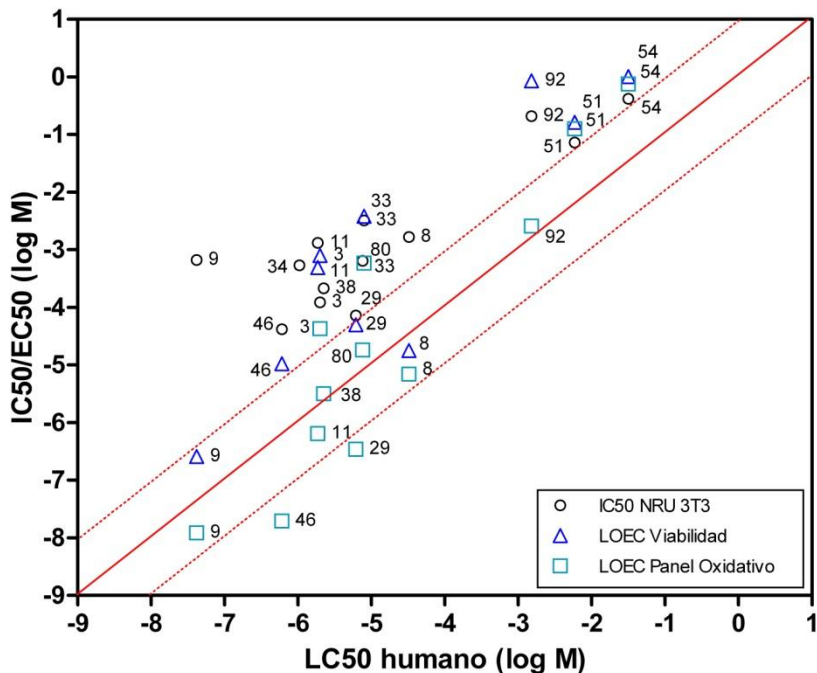


Figura 24: Correlación de los outliers del ensayo de NRU en 3T3 identificados para humano y comparación con los valores LOEC obtenidos por el panel citómico de estrés oxidativo y viabilidad. La línea continua representa la correlación 1:1 y la línea discontinua representa una desviación de una unidad de logaritmo de la línea de correlación 1:1, marcando los límites establecidos para la identificación de los outliers. Los números de las coordenadas son los números de referencia de los compuestos utilizados en el proyecto ACuteTox (Tabla 12). Los círculos representan los valores de IC50 para el ensayo de NRU en 3T3, los triángulos el valor $LOEC_{viab}$ obtenido en nuestro ensayo de viabilidad por YP y NRU y los cuadrados los valores $LOEC_{oxi}$ obtenidos en el panel de estrés oxidativo.

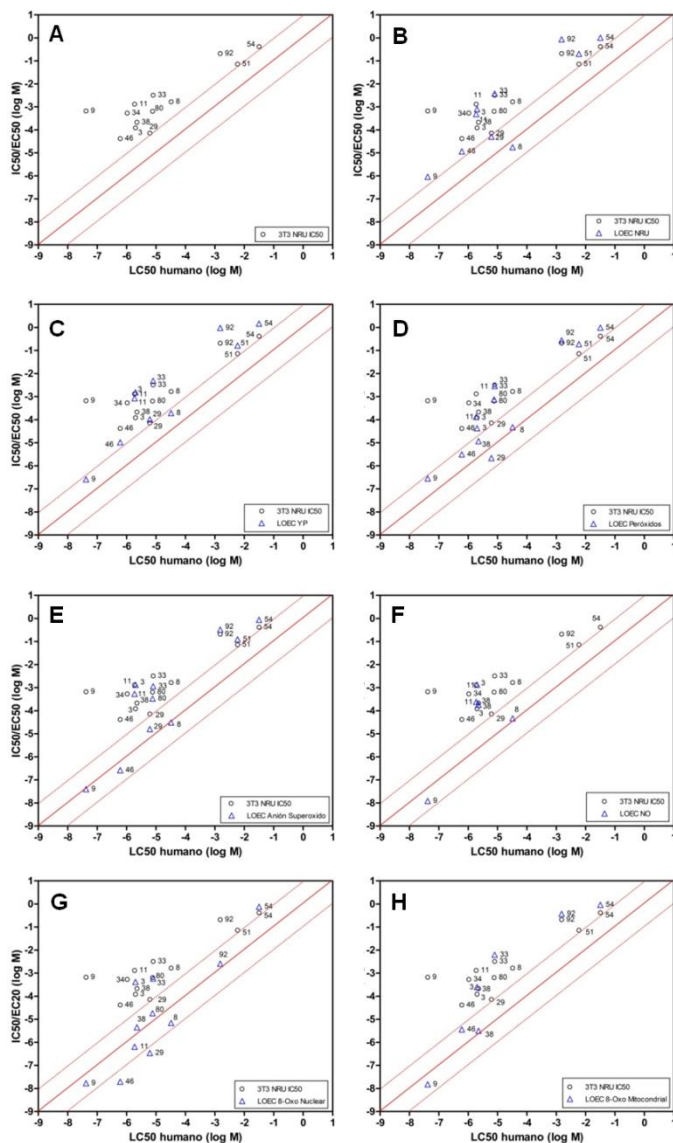


Figura 25: Correlación de los outliers del ensayo de NRU en 3T3 identificados para humano y comparación con los valores LOEC de IC50 y EC50 obtenidos por cada parámetro en las tres líneas celulares. La línea continua representa la correlación 1:1 y la línea discontinua representa una desviación de una unidad de logaritmo de la línea de correlación 1:1, marcando los límites establecidos para la identificación de los outliers. Los números de las coordenadas son los números de referencia de los compuestos utilizados en el proyecto ACuteTox (Tabla 12). Los círculos representan los valores de IC50 para el ensayo de NRU en 3T3, los triángulos el valor LOEC de IC50 o EC50 obtenido en nuestros ensayos.

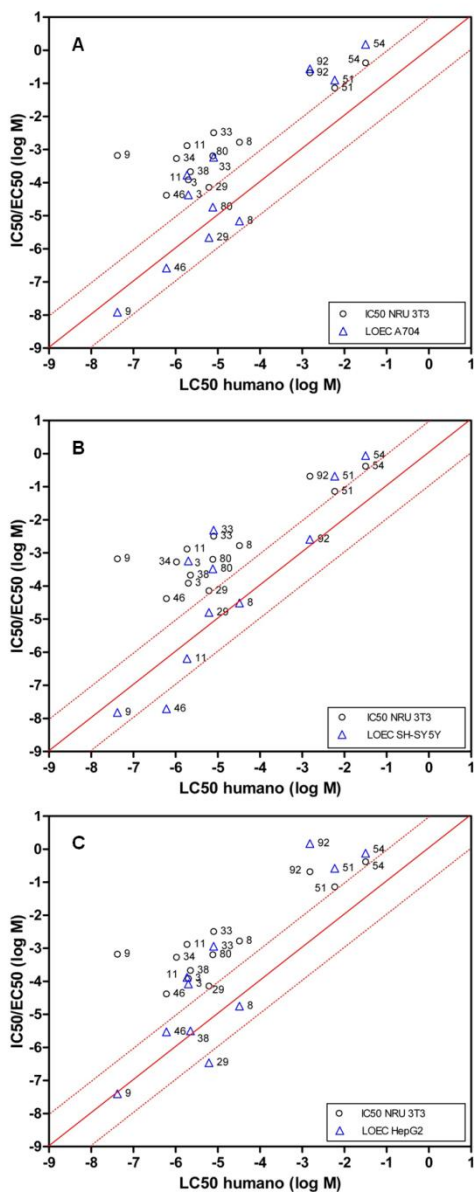


Figura 26: Correlación de outliers del ensayo de NRU en 3T3 identificados para humano y comparación con los valores LOEC de IC50 y EC50 obtenidos en todos los ensayos para cada línea celular. La línea continua representa la correlación 1:1 y la línea discontinua representa una desviación de una unidad de logaritmo de la línea de correlación 1:1, marcando los límites establecidos para la identificación de los outliers. Los números de las coordenadas son los números de referencia de los compuestos utilizados en el proyecto

ACuteTox (Tabla 12). Los círculos representan los valores de IC50 para el ensayo de NRU en 3T3, los triángulos el valor LOEC obtenido en nuestros ensayos para las líneas celulares A704 (A), SH-SY5Y (B) y HepG2 (C).

2.4 Identificación de posibles alertas y outliers en los ensayos citómicos

Con objeto de simplificar la visualización de los datos y la identificación de alertas y outliers a través de las correlaciones de nuestros ensayos con la LC50 de humano, se presenta dos Tablas en las se reflejan, por colores, la capacidad predictiva de los compuestos en todos los ensayos y en los valores LOEC. Así, las cuadrículas verdes corresponden a los compuestos cuyo valor de toxicidad se encuentra en el rango de aceptación de buena predicción de la toxicidad humana, en naranja las alertas y en rojo los outliers para cada ensayo (Tabla 21) y para los valores LOEC en cada línea celular (Tabla 22). En blanco se identifican los compuestos para los cuales no se obtuvo valor de toxicidad por nuestros ensayos o que no se conoce su valor LC50 en humano.

Tal y como se ha expuesto anteriormente, considerando el análisis de los ensayos de forma individual, ninguno supera al ensayo de NRU en número de compuestos correlacionados correctamente y en el valor de R^2 . Además, muchos de ellos tienen un mayor número de outliers. Eso es especialmente notorio en los ensayos de viabilidad que superan los outliers de NRU en 3T3 en las tres líneas celulares.

Un total de diez ensayos son incapaces de detectar toxicidad en más de la mitad de los compuestos que se quería correlacionar con la LC50 de humano, lo que es evidente por el elevado número de cuadrículas blancas representadas en la Tabla 21. Esos ensayos coinciden en su mayoría en las tres líneas celulares (NO, 8-

Oxo nuclear y mitocondrial) a los que hay que sumar el ensayo de los niveles intracelulares de anión superóxido que sólo en HepG2 tiene tan baja sensibilidad. El peor ensayo, sin duda, es el ensayo de la 8-Oxo mitocondrial que en A704 no correlaciona más del 90% de los compuestos estudiados.

Comparado con los ensayos *in vivo*, y debido al bajo número de compuestos aceptados como válidos por Hoffmann *et al.* (2010), podemos verificar que, con respecto a la LD50 de ratón, el ensayo de detección de los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno en A704 mejora el coeficiente de correlación, el número de compuestos correlacionados y el número de alertas, además de disminuir el número de outliers. El ensayo del YP en SH-SY5Y mejora el coeficiente de correlación y el número de compuestos pero, por el contrario, aumenta el número de compuestos outliers.

Analizando qué ensayos mejoran los valores de LD50 en rata, se comprueba que todos los ensayos en los que el número de compuestos válidos (n) es mayor que el número de compuestos con valor establecido de LD50, mejoran el coeficiente de correlación. Eso ocurre en los ensayos de detección de anión superóxido en A704 y en SH-SY5Y, en el ensayo del YP en SH-SY5Y y en el ensayo del NRU en SH-SY5Y y HepG2. En estos ensayos el número de outliers es superior al de los outliers en la correspondiente correlación con la LD50 de Rata.

También se observa que los ensayos de los niveles de óxido nítrico y de 8-Oxo nuclear y mitocondrial, presentan un número de valores muy bajo, que no llega a la mitad de los compuestos ensayados, en los que se conoce la toxicidad en humanos. En la línea celular A704 sólo cuatro de los cuarenta y nueve compuestos alcanzaron un valor de toxicidad usando el ensayo de la 8-oxo mitocondrial.

En 11 de los compuestos ensayados, cicloheximida (7), SDS (15), benceno (18), tert-butil hidroperóxido (19), pireno (23), tetraciclina clorhidrato (31), fisostigmina (40), dietilenglicol (43), ocratoxina A (45), 17 α -etinilestradiol (47) y epinefrina bitartrato (96), no se pudo estimar la LC50 en humano según Sjöström et al. (2008) por falta de datos clínicos, por lo que no se pudo llevar a cabo la correlación.

Con respecto a los valores LOEC obtenidos en las tres líneas celulares, para determinar qué ensayo es el que mejor correlaciona con los datos *in vivo* de humano se confirma que los mejores ensayos son:

Determinación de la actividad peroxidativa:

Mejora el número de compuestos que entran en la correlación y el valor de R² y disminuye el número de outliers. Identifica más compuestos como alertas. Sólo en tres compuestos no se pudo determinar efecto tóxico: 5-fluorouracilo (17), hexaclorobenceno (26) y lindano (34). Para este último, no se pudo obtener ningún valor de toxicidad. El hexaclorobenceno tampoco se pudo determinar en el ensayo de NRU en 3T3 a la concentración máxima probada.

Niveles intracelulares de anión superóxido:

Mejora el valor de R² pero en este ensayo hay cuatro compuestos sin efecto, hexaclorobenceno (26), lindano (34), paratión (38) y sodio cloruro (57), frente a tres compuestos en NRU en 3T3, hexaclorobenceno (26), hierro (II) sulfato (52) y metanol (55). Hay que indicar que los cuatro compuestos en los que no se pudo mostrar efecto, presentaron dificultad a la hora de disolverlos con la excepción del sodio cloruro.

8-Oxo nuclear:

Mejora el valor de R^2 , el número de outliers y de alertas, pero no el número de compuestos en correlación. Además, de forma individual no es apreciable en ninguna línea celular, ya que no llega a tener efecto en más de la mitad de los compuestos.

Los peores ensayos son:

8-Oxo mitocondrial:

De los 49 compuestos, más de la mitad no presentaron efecto en este ensayo.

Óxido Nítrico:

La suma de compuestos sin efecto y outliers superó la mitad de los compuestos (26). Además el valor de R^2 no llegó a 0,5.

Estas tablas permiten además, comprobar qué compuestos se correlacionan de forma perfecta por todos nuestros ensayos utilizando el valor LOEC:

Los compuestos ácido acetilsalicílico (2); cadmio cloruro (21) y diclorvos (39) son correctamente clasificados por todos los ensayos LOEC;

Los compuestos acetaminofeno (1), diazepam (8), digoxina (9), isopropanol (10), amiodarona clorhidrato (28), orfenadrina clorhidrato (32) y cis-diaminoplatino (II) dicloruro (42) que correlacionan de forma correcta en todos los ensayos, excepto en los ensayos que no llegan a determinar el efecto de la mitad de los compuestos (NO y 8-Oxo mit, a excepción de la digoxina, que es un outlier por el ensayo del Rojo Neutro como en el ensayo de 3T3, lo que indica que el ensayo NRU no es el indicado para determinar la toxicidad de la digoxina.

Una vez más, podemos observar que el panel oxidativo permite la corrección de compuestos que por los ensayos de viabilidad se definen como outliers. Con

respecto a los valores $LOEC_{viab}$ frente a $LOEC_{oxi}$ de las tres líneas celulares por separado o en su conjunto, vemos que muchos compuestos pasan de outlier a correctamente clasificado o de outlier a alerta, como ya pasaba cuando analizamos los outliers de 3T3.

Cuando se consideran las tres líneas en conjunto verificamos que se corrigen:

De outlier a alerta los compuestos cafeína, fenobarbital y ciclosporina A.

De outlier al intervalo de correlación, los compuestos malatión, 5-fluorouracilo, hierro (II) sulfato, metanol, talio sulfato, warfarina y acetoneitrilo.

Los compuestos mercurio (II) cloruro (12), ácido valproico (16), verapamilo clorhidrato (29), rifampicina (30), orfenadrina clorhidrato (32), amonio glufosinato (41), diquat dibromuro (44), sodio fluoruro (48), amitriptilina clorhidrato (53), litio sulfato (60), propranolol clorhidrato (63), cloral hidrato (76) y 2,4-ácido diclorofenoxiacético (77) que había sido perfectamente correlacionados por los ensayos de viabilidad ($LOEC_{viab}$), pasan a alertas con los ensayos del estrés oxidativo/nitrosativo, lo que permite detectar la toxicidad de forma temprana. También se han identificado compuestos cuya toxicidad no se pudo determinar con aquellos ensayos, y si en cambio con los de estrés oxidativo: carbamazepina (5), hexaclorobenceno (26), paratión (38), sodio cloruro (57) y estricnina (80).

De forma resumida, se representa en la Tabla 23 los compuestos que son corregidos en las tres líneas celulares utilizando los valores LOEC de los ensayos de estrés oxidativo/nitrosativo, comparado con los de viabilidad mostrando así como mejora el valor predictivo de la toxicidad.

Podemos verificar que con la línea celular A704 se ha corregido ocho outliers (acetaminofeno, cafeína, diazepam, fenobarbital, verapamilo clorhidrato, ciclosporina A, hierro (II) sulfato, sodio selenato) que pasaron a estar perfectamente

correlacionados usando los valores LOEC_{oxi}. Doce compuestos han pasado de no mostrar efecto a ser detectados (carbamazepina, digoxina, malatión, ácido valproico, hexaclorobenceno, rifampicina, amonio glufosinato, cis-diaminoplatino (II) dicloruro, arsénico trióxido, warfarina, 2,4-ácido diclorofenoxiacético y estricnina) y otros cuatro pasaron de estar en el rango de buena correlación a la categoría de alertas (mercurio (II) cloruro, pentaclorofenol, orfenadrina clorhidrato, propranolol clorhidrato). Hay que destacar 13 de los compuestos que mejoran la predicción de la LC50 de humano con los ensayos de estrés oxidativo en A704 comparado con los ensayos de viabilidad son nefrotóxicos.

En los ensayos sobre células SH-SY5Y cuatro compuestos (cafeína, fenobarbital, ciclosporina A, sodio fluoruro) han pasado de ser outliers en los ensayos de viabilidad a ser considerados alertas por estrés oxidativo/nitrosativo y siete a estar perfectamente correlacionados (digoxina, cadmio cloruro, hierro (II) sulfato, metanol, propranolol clorhidrato, warfarina y acetonitrilo). Siete compuestos (pentaclorofenol, rifampicina, amonio glufosinato, diquat dibromuro, amitriptilina clorhidrato, litio sulfato, cloral hidrato) han pasado de estar correlacionados a convertirse en alertas y otros siete compuestos sin efecto (carbamazepina, colchicina, malatión, ácido valproico, 5-fluorouracilo, hexaclorobenceno, estricnina) han pasado a tenerlo. Es importante resaltar que 16 de estos compuestos que mejoran su capacidad predictiva con los ensayos de estrés oxidativo respecto a los ensayos de viabilidad en SH-SY5Y, son neurotóxicos.

Los ensayos en las células HepG2 transforman un compuesto (verapamilo clorhidrato) de outlier a alerta. Otro compuesto (2,4-ácido diclorofenoxiacético) pasa de estar correctamente correlacionado a ser alerta. Ocho outliers (orfenadrina clorhidrato, ciclosporina A, amitriptilina clorhidrato, arsénico trióxido, talio sulfato, cloral hidrato y sodio selenato) se incluyen en el rango de correlación perfecta y cinco compuestos sin efecto (carbamazepina, paratión, sodio fluoruro, etilenglicol,

sodio cloruro) pasan a tener efecto. Cabe indicar que once de los quince compuestos mejorados por los ensayos de estrés oxidativo son hepatotóxicos.

Sólo en muy pocos casos los ensayos de estrés oxidativo/nitrosativo tienen menor capacidad predictiva que los de viabilidad. Así, los compuestos etilenglicol en A704, isopropanol en SH-SY5Y y ácido valproico, propranolol clorhidrato y acetonitrilo en HepG2, que presentaban efecto en los ensayos de viabilidad pasan a no tenerlo en los ensayos de estrés oxidativo/nitrosativo. Por otra parte, en SH-SY5Y el sodio selenato pasa de estar perfectamente correlacionado a outlier y el pentaclorofenol pasa de alerta a estar perfectamente correlacionado.

Leyendas de las Tablas 21 y 22:

Tabla 21: Tabla resumen de colores con la representación de los valores de IC50 y EC50 obtenidos en los ensayos realizados y de los valores de IC50 y LD50 de referencia de 3T3 y de rata y ratón. En verde se representan los compuestos que se correlacionan en el rango de aceptación con buena capacidad predictiva de toxicidad para humano, en naranja las alertas y en rojo los outliers. (N representa el número del compuesto de referencia del proyecto ACuteTox; NRU – ensayo de captación del Rojo Neutro; YP – ensayo de exclusión del yoduro de propidio; H₂O₂ – ensayo de determinación de la actividad peroxidativa; O²⁻ – ensayo de determinación de los niveles intracelulares del anión superóxido; NO – niveles intracelulares de óxido nítrico; 8-Oxo Nuc y 8-Oxo Mit – los niveles de 8-Oxo nuclear y mitocondrial respectivamente; n – número de compuestos que se correlacionan con la LC50 de humano; N° OT – número de outliers; N° A – número de alertas). En negrita están los valores de R² superiores a los obtenidos por el ensayo de referencia de NRU de 3T3. En rojo y negrita están representados los valores de n inferiores a 25 (la mitad del número total de compuestos que se conoce la LC50 de humano, del grupo de compuestos elegidos por el proyecto Acute-Tox).

Tabla 22: Tabla de colores resumen con la representación de los valores LOEC de los ensayos realizados. En verde se representan los compuestos que se correlacionan en el rango de aceptación con buena capacidad predictiva de toxicidad para humano, en naranja las alertas y en rojo los outliers. (N representa el número del compuesto de referencia del proyecto AcuteTox; NRU – ensayo de captación del Rojo Neutro; YP – ensayo de exclusión del yoduro de propidio; H₂O₂ – ensayo de determinación de la actividad peroxidativa; O²⁻ – ensayo de determinación de los niveles intracelulares del anión superóxido; NO – niveles intracelulares de óxido nítrico; 8-Oxo nuc y 8-Oxo mit – los niveles 8-Oxo nuclear y mitocondrial respectivamente; n – número de compuestos que se correlacionan con la LC50 de humano; N° OT – número de outliers; N° A – número de alertas). En negrita están los valores que presentan una mejoría frente a NRU de 3T3 – mayor R², mayor número de compuestos en la correlación, mayor número de alertas y menor número de outliers – y en

Tabla 22.

N	LOEC			LOEC A7M4			LOEC SH-SY5Y			LOEC HEPG2			LOEC Ensayos						
	Total	Viab	Oxi	Total	Viab	Oxi	Total	Viab	Oxi	Total	Viab	Oxi	NRU	YP	H2O2	O2-	NO	β-Oxo Nuc	β-Oxo Mit
1																			
2																			
3																			
4																			
5																			
6																			
8																			
9																			
10																			
11																			
12																			
13																			
14																			
16																			
17																			
21																			
26																			
28																			
29																			
30																			
32																			
33																			
34																			
37																			
38																			
39																			
41																			
42																			
44																			
46																			
48																			
49																			
51																			
52																			
53																			
54																			
55																			
57																			
60																			
63																			
64																			
66																			
67																			
71																			
76																			
77																			
80																			
91																			
92																			
R ²	0,5684	0,542	0,5634	0,6227	0,5505	0,6022	0,4098	0,6002	0,3607	0,6076	0,5300	0,6974	0,5493	0,5644	0,6297	0,5885	0,4986	0,6132	0,5582
n	48	43	48	46	34	45	46	39	45	43	37	40	42	41	46	45	32	39	20
NPOT	6	16	6	13	18	12	8	17	9	11	19	10	18	17	12	11	9	6	6
NP A	18	2	18	8	1	8	13	1	13	4	2	3	2	1	6	4	3	10	3

Tabla 23: Tabla resumen de comparación de los valores LOEC de los ensayos de viabilidad frente al conjunto de ensayos de estrés oxidativo en las tres líneas celulares. Para cada línea celular se indica que compuestos de referencia pasan de outlier a alerta, de outlier a perfectamente correlacionado, de perfectamente correlacionado a alerta y de no tener efecto a tenerlo. NE: sin efecto.

A704				
Outlier →Alerta	Outlier →Correcto	Correcto →Alerta	NE → Efecto	Efecto → NE
	1, 4, 8, 14, 29, 46, 52, 91	12, 13, 32, 63	5, 9, 11, 16, 26, 30, 41, 42, 64, 67, 77, 80	54
SH-SY5Y				
Outlier →Alerta	Outlier →Correcto	Correcto →Alerta	NE → Efecto	Efecto → NE
4, 14, 46, 48	9, 21, 52, 55, 63, 67, 92	13, 30, 41, 44, 53, 60, 76	5, 6, 11, 16, 17, 26, 80	10
HepG2				
Outlier →Alerta	Outlier →Correcto	Correcto →Alerta	NE → Efecto	Efecto → NE
29	32, 46, 53, 64, 66, 67, 76, 91	77	5, 38, 48, 54, 57	16, 63, 92

2.5 Evaluación de la capacidad de detección de la toxicidad órgano-específica

Uno de los objetivos de este proyecto era evaluar si los ensayos de citotoxicidad y/o los ensayos funcionales de estrés oxidativo y nitrosativo realizados en líneas celulares provenientes de distintos órganos diana proporcionan diferentes resultados. Además, es importante determinar si el uso de líneas celulares puede sustituir el uso de cultivos primarios de los órganos diana y sobrepasar los ensayos de citotoxicidad proporcionando modelos *in vitro* capaces de identificar la toxicidad específica de órganos que puede ser la causa de la ineficacia de diversos ensayos en las correlaciones *in vitro/in vivo* y causar los outliers.

Para determinar la eventual capacidad de detección de toxicidad órgano-específica de las tres líneas celulares A704, SH-SY5Y y HepG2 se identificaron los compuestos de nuestros estudios clasificados como nefrotóxicos, neurotóxicos y hepatotóxicos según Clothier et al., (2013) y la base de datos de AcuteTox (Kinsner-

Ovaskainen et al., 2009). Para cada uno de estos grupos de compuestos, se comparó la capacidad de predicción de toxicidad humana de los ensayos citómicos (viabilidad y funcionales) en cada línea celular, con la capacidad predictiva del ensayo de citotoxicidad basal en la línea de fibroblastos de 3T3, como modelo celular no órgano-específico (Sjöström et al., 2008). La comparación estadística se realizó con el test T de Student (Gustafsson et al., 2010).

Sólo se consideraron para este cálculo los compuestos que disponen de valores de LC50 de humano, de IC50 de NRU de 3T3 y de LOEC de viabilidad y estrés oxidativo, aunque se incluyeron en el análisis los compuestos que no causaron toxicidad a la máxima concentración probada, ya que la incapacidad de obtener un valor de toxicidad subestima la toxicidad de tales compuestos. Como intervalo de confianza de correlación correcta, se definió una desviación de 1 unidad de Log de LC50.

De esta forma, con los ensayos de LOEC_{viab} se pudo comparar 33 compuestos neurotóxicos mientras que con los valores de LOEC_{oxi} se compararon 31. Se verificó si había diferencias estadísticamente significativas entre los valores de LOEC y IC50 del ensayo de NRU en 3T3 y, en caso positivo se verificó si mejoraba, corregía, subestimaba o sobreestimaba la correlación de la toxicidad *in vitro* (NRU en 3T3), frente a la toxicidad humana. Los compuestos con valores de toxicidad significativamente superiores a los de 3T3, pero que siguen en el rango aceptable de buena predicción de toxicidad al igual que 3T3 se consideraron como que no cambian la predicción de toxicidad (Tablas 24, 25 y 26 - No cambia*)

La medida de neurotoxicidad en SH-SY5Y corrigió 4 compuestos (diazepam, digoxina, malatión y acetónitrilo) con los ensayos de estrés y sólo dos (diazepam y verapamilo clorhidrato) por los ensayos de viabilidad siendo todos outliers de NRU en 3T3. Además, ha mejorado la predicción de toxicidad de un compuesto (hexaclorofeno) por el valor de LOEC_{oxi} y tres (cis-diaminoplatino (II) dicloruro,

amitriptilina clorhidrato y sodio selenato) por el valor de $LOEC_{viab}$. Ha sobreestimado la neurotoxicidad de siete compuestos determinada por estrés oxidativo (mercurio (II) cloruro, pentaclorofenol, fenobarbital, ácido valproico, amonio glufosinato, amitriptilina clorhidrato y cloral hidrato). Los compuestos sobreestimados causan efecto a una concentración significativamente inferior a la determinada por el test de citotoxicidad del NRU en 3T3, son por lo tanto alertas de la neurotoxicidad (Tabla 24).

En total 38,7% de los ensayos de estrés oxidativo (12 / 31) ha mejorado significativamente la predicción de la neurotoxicidad (diazepam, digoxina, malatión, mercurio (II) cloruro, pentaclorofenol, fenobarbital, ácido valproico, amonio glufosinato, amitriptilina clorhidrato, hexaclorofeno, cloral hidrato y acetónitrilo), de los cuales 4 eran outliers (diazepam, digoxina, malatión y acetónitrilo) de la correlación del ensayo de NRU en 3T3 con LC50 de humanos.

Los ensayos de viabilidad sólo mejoraron significativamente la predicción en 5 compuestos (15,15%), dos de los cuales (diazepam y verapamiloclorhidrato) eran outliers de NRU en 3T3 y son corregidos. Verificamos así que, a pesar de que el valor $LOEC_{viab}$ presenta una mejor correlación con LC50 en humanos, los ensayos de los valores $LOEC_{oxi}$ en SH-SY5Y poseen una mejor capacidad de detección de neurotoxicidad. En el 38,7% de los casos estudiados mejoran la predicción de neurotoxicidad, de los que el 22,6% son alertas (mercurio (II) cloruro, pentaclorofenol, fenobarbital, ácido valproico, amonio glufosinato, amitriptilina clorhidrato y cloral hidrato).

Estos ensayos no pudieron mejorar la predicción de la neurotoxicidad, subestimándola en el 14,7% de los casos, que corresponden a los outliers de la neurotoxicidad de $LOEC_{oxi}$ (acetaminofeno, nicotina y etilenglicol) y no cambia de forma estadísticamente significativa en el 38,71% de los compuestos neurotóxicos analizados (atropina monohidrato sulfato, cafeína, carbamazepina, orfenadrina

clorhidrato, diclorvos, cis-diaminoplatino (II) dicloruro, litio sulfato, propranolol clorhidrato, arsénico trióxido, 2,4-ácido diclorofenoxiacético, estricnina y sodio selenato).

Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por Gustafsson et al. (2010), que midieron las alteraciones del potencial de membrana celular en SH-SY5Y diferenciadas, se deduce que usando este método dicho grupo consiguió mejorar o corregir la predicción de toxicidad de los outliers de NRU en 3T3 (atropina monohidrato sulfato, nicotina y lindano) lo que con nuestros ensayos no se pudo conseguir.

En cambio, con nuestros ensayos se ha mejorado (incluyendo corregir outliers y generar alertas) once compuestos (diazepam, digoxina, malatión, fenobarbital, ácido valproílico, amonio glufosinato, amitriptilina clorhidrato, cloral hidrato, sodio selenato, verapamilo clorhidrato, cis-diaminoplatino (II) dicloruro y acetonitrilo, los últimos tres por LOEC_{viable}), para los que Gustafsson et al. (2010) no consiguieron diferencias significativas con los datos de citotoxicidad basal obtenidos en la línea celular no neuronal 3T3 o, simplemente no pudieron detectar efecto tóxico.

Si comparamos con los estudios de Galofré et al. (2010), que usan cultivos primarios de neuronas corticales de ratón aplicando ensayos funcionales neuronales *in vitro* para identificar compuestos químicos que interfieren en la transmisión sináptica excitatoria e inhibitoria, se demuestra una vez más que los ensayos citómicos mejoran la predicción de un mayor número de compuestos neurotóxicos con respecto a la predicción de la citotoxicidad basal, a pesar de que Galofré *et al.* (2010) use cultivos primarios.

En dicho estudio tampoco se pudo mejorar la predicción de compuestos que actúan a nivel de los receptores nicotínicos y de acetilcolina, como la nicotina y la atropina monohidrato sulfato, pero se demostró la capacidad de sus ensayos para

detectar las alertas neurotóxicas: malatión, digoxina, diazepam, fenobarbital, paratión, estricnina, cafeína y lindano (Galofré et al. (2010). Los cuatro últimos no se han podido predecir con nuestros ensayos. Sin embargo, predecimos la neurotoxicidad de los quince compuestos neurotóxicos representados en negrita en la Tabla 24, lo que nos permite afirmar que nuestros ensayos predicen mejor la toxicidad específica de compuestos neurotóxicos que los presentados por Galofré et al. (2010) o Gustafsson et al. (2010).

No obstante, no se puede obviar que en más de un 60% no se ha podido mejorar la predicción de la neurotoxicidad, comparada con la citotoxicidad basal determinada en la línea celular no órgano-específica de fibroblastos 3T3. Esto puede deberse a que muchos de los compuestos neurotóxicos presentan mecanismos de toxicidad muy específicos del SNC y como tal, son muy difíciles de determinar por nuestros ensayos, como por ejemplo el lindano (insecticida organoclorado conocido por bloquear los receptores GABA (Poisindex, Thomson Micromedex, 2005 *vía* Acutoxbase) y que mostró su neurotoxicidad en el ensayo que media precisamente las alteraciones del transporte por los receptores GABA_A (Galofré *et al.*, 2010). Otros ejemplos son el paratión, un insecticida organosforado que causa acumulación de la acetilcolina en el SNC inhibiendo la acetilcolinesterasa (Poisindex, Thomson Micromedex, 2005 *vía* Acutoxbase) o la atropina monohidrato sulfato, que es un antagonista competitivo de los receptores muscarínicos colinérgicos usado precisamente como antídoto en envenenamiento por organofosfatos (Poisindex, Thomson Micromedex, 2005 *vía* Acutoxbase).

Usando la línea celular A704 para determinar la toxicidad de los 26 compuestos nefrotóxicos no se pudo determinar la capacidad de los ensayos citómicos para detectar la nefrotoxicidad en seis compuestos por falta del dato de LC50 en humano o de IC50 en NRU en 3T3 (Tabla 25). Además, en los ensayos

LOEC_{viab} no se obtuvo valor de citotoxicidad en siete xenobióticos, en dos no se pudo realizar el test estadístico por falta de réplicas y únicamente se mejoró la predicción del diquat dibromuro, que en el ensayo del NRU en 3T3 ya predijo correctamente la LC50 de humano, lo que indica que la línea celular A704 con los ensayos de viabilidad no tiene la capacidad de predecir la nefrotoxicidad de humano.

Analizando los valores de LOEC_{oxi} se verifica una mejora en la predicción de cuatro compuestos, corrigiendo únicamente 2 (ciclosporina A y estricnina) e identificando como alertas de nefrotoxicidad a mercurio (II) cloruro, pentaclorofenol y propranolol clorhidrato. No se modificó la predicción de 7 compuestos y se subestimó la toxicidad de 1 compuesto (paraquat dicloruro) frente a NRU en 3T3.

Usando esta línea celular y estos ensayos no se puede predecir la nefrotoxicidad ya que por LOEC_{viab} y LOEC_{oxi} apenas se pudo mejorar la predicción de NRU en 3T3 NRU con respecto a humano en el 3,03% y el 16,13% de los compuestos respectivamente. Los estudios realizados por Lin y Will (2012) en los que se estudiaron 41 compuestos nefrotóxicos en la línea celular de NRK-52E también revelaron que no se podía verificar diferencias entre la toxicidad determinada por esta línea celular y otra que correspondiera a otro órgano.

Usando la línea celular de hepatoma humano HepG2, empleada en muchos ensayos de toxicología *in vitro*, para verificar su capacidad de predicción de compuestos hepatotóxico, se contrastó que no se detectan diferencias estadísticas significativas con los valores de toxicidad determinados por NRU en 3T3 en el 30,30% de los compuestos usando los valores de LOEC_{viab} y en el 32,26% de compuestos usando el valor de LOEC_{oxi} (Tabla 26).

Con los ensayos de viabilidad en HepG2 sólo se mejora la predicción de la hepatotoxicidad de 2 compuestos, la amiodarona clorhidrato y el pentaclorofenol que es una alerta de la hepatotoxicidad con este ensayo. Estos 2 compuestos no han sido mejorados usando los ensayos del estrés oxidativo. Con estos ensayos se

mejora la predicción de otros 6 compuestos (verapamilo clorhidrato, paratión, cis-diaminoplatino (II) dicloruro, ciclosporina A, amitriptilina clorhidrato y talio sulfato) pero sólo 2 de ellos son corregidos (paratión y ciclosporina A). El verapamilo clorhidrato sobreestima su hepatotoxicidad en 3T3 y humano considerándose una alerta de hepatotoxicidad.

En el estudio publicado por Clothier et al.(2013), usando un análisis de cluster jerarquizado se demostró que había diferencias entre los valores de toxicidad medidos por el ensayo del MTT en 3T3, y los ensayos de NRU en 3T3 y en NHK , con respecto a los medidos también con el ensayo del MTT en HepG2 y en cultivos primarios de hepatocitos de ratón. También verificaron que entre estos dos últimos no había diferencias usando únicamente los compuestos hepatotóxicos, al igual que cuando se incluyeron todos los 57 compuestos.

En ese mismo artículo se confirma que el ensayo del YP determinado en nuestro laboratorio tiene más similitudes entre las tres líneas celulares usadas (SH-SY5Y, A704 y HepG2) que con los ensayos de NRU de NHK y 3T3 y MTT de 3T3, HepG2 y hepatocitos de ratón, independientemente de la inclusión de todos los compuestos o únicamente de los hepatotóxicos. Verificaron que no parecía haber diferencias de toxicidad entre el uso de líneas celulares específicas de órganos de las que no lo son. Tampoco entre células provenientes de distintos órganos diana de toxicidad específica, y que más que la línea celular que se usa, influye el ensayo utilizado en esa determinación y el mecanismo de acción de cada compuesto.

Los resultados del estudio de Clothier et al.(2013) apoyan los datos obtenidos por Lin & Will (2012) al evaluar la toxicidad específica de 109 compuestos hepatotóxicos, 62 cardiotóxicos y 41 nefrotóxicos en tres líneas celulares órgano-específicas (HepG2, H9c2 y NRK-52E) usando el ensayo del ATP para determinar la

viabilidad celular y compararla con la predicción de la toxicidad general. Este grupo mostró que no había diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de las tres líneas celulares órgano-específicas, usando únicamente los compuestos con toxicidad órgano-específica y comparando todos los compuestos para la determinación de la toxicidad general. Sólo aproximadamente un 5% de los compuestos presentaban respuestas de toxicidad diferentes pero sin una correlación directa y evidente con la toxicidad órgano-específica conocida *in vivo*.

Los estudios presentados por Xia et al.(2008) que testaron 1408 compuestos en trece líneas celulares primarias o transformadas de humano y de roedores concluyeron que algunos de los compuestos químicos estudiados eran citotóxicos para todas las células a concentraciones similares y que otros presentan citotoxicidad específica de especie y de tipo celular. Schoonen et al. (2005) que estudiaron 100 compuestos en HepG2 y HeLa y 60 compuestos en las líneas celulares ECC-1 y CHO, verificaron que en general todos los compuestos testados presentan dosis y perfiles de toxicidad muy similares en todas las líneas celulares y que únicamente difirieron en tres compuestos.

Nuestros resultados, al igual que los presentados en Clothier et al. (2013), Lin & Will (2012), Xia et al. (2008) y Schoonen et al. (2005), sugieren que desde una perspectiva de cribado general, el uso de diferentes líneas celulares no aporta diferentes valores de citotoxicidad basal relativamente a la órgano-específica.

Tabla 24: Comparación de los valores de toxicidad de compuestos neurotóxicos. Las alertas identificadas en SH-SY5Y comparando la LOEC_{viab} y LOEC_{oxi} con el log (IC50) de NRU en 3T3 usando el test t de Student están representadas en negrita. La capacidad de mejorar la predicción de la toxicidad humana fue determinada comparando los valores de LOEC y IC50 de 3T3 con los datos de LC50 de humano (Sjöström et al., 2008). (# compuestos outliers de 3T3; * valores que cambian de forma estadísticamente significativa pero que siguen estando en el rango de una unidad de logaritmo del valor de log (LC50) de humano.

	Compuesto referencia	Valor-p LOEC viab	Valor-p LOEC oxi	Predicción Toxicidad LOEC viab	Predicción Toxicidad LOEC oxi
NEUROTOXICIDAD					
1	Acetaminofeno	P<0,0001	P<0,0001	Subestimada	Subestimada
3	Atropina sulfato #	n.s.	n.s.	No cambia	No cambia
4	Cafeína	P<0,0001	n.s.	Subestimada	No cambia
5	Carbamazepina	d.i.	n.s.	Sin efecto IC50	No cambia
8	Diazepam #	0,0032	P<0,0001	Corregida	Corregida
9	Digoxina #	n.s.	P<0,0001	No cambia	Corregida
10	Isopropanol	n.s.	d.i.	No cambia	Sin efecto EC50
11	Malatión #	d.i.	0,0013	Sin efecto IC50	Corregida
12	Mercurio cloruro	n.s.	0,0177	No cambia	Sobreestimada
13	Pentaclorofenol	n.s.	0,0011	No cambia	Sobreestimada
14	Fenobarbital	0,0001	P<0,0001	Subestimada	Sobreestimada
16	Ácido Valproico	d.i.	0,0028	Sin efecto IC50	Sobreestimada
18	Benceno	d.i.	d.i.	Ausencia dato Humano	Ausencia dato Humano
29	Verapamilo #	0,0402	d.i.	Corregida	Datos insuficientes
32	Orfenadrina	n.s.	n.s.	No cambia	No cambia
33	Nicotina #	n.s.	0,0369	No cambia	Subestimada
34	Lindano #	d.i.	d.i.	Sin efecto IC50	Sin efecto EC50
37	Etanol	P<0,0001	d.i.	No cambia*	Datos insuficientes
38	Paratión #	d.i.	d.i.	Sin efecto IC50	Sin efecto EC50
39	Diclorvos	n.s.	n.s.	No cambia	No cambia
40	Fisostigmina	0,0001	P<0,0001	Ausencia dato Humano	Ausencia dato Humano
41	Amonio glufosinato	d.i.	0,0007	Datos insuficientes	Sobreestimada
42	cis-Diaminoplatino	0,0014	P<0,0001	Mejora	No cambia*
43	Dietilenglicol	0,0254	0,0022	Ausencia dato Humano	Ausencia dato Humano
52	Hierro sulfato	d.i.	d.i.	Ausencia dato 3T3 NRU	Ausencia dato 3T3 NRU
53	Amitriptilina	0,0454	0,0007	Mejora	Sobreestimada
54	Etilenglicol #	0,0002	0,0093	Subestimada	Subestimada
55	Metanol	d.i.	d.i.	Ausencia dato 3T3 NRU	Ausencia dato 3T3 NRU
57	Sodio cloruro	d.i.	d.i.	Sin efecto IC50	Sin efecto EC50
60	Liño sulfato	n.s.	n.s.	No cambia	No cambia
63	Propranolol	P<0,0001	n.s.	Subestimada	No cambia
64	Arsénico trióxido	0,0711	0,0297	No cambia*	No cambia*
66	Talio sulfato	P<0,0001	d.i.	Subestimada	Datos insuficientes
71	Hexaclorofeno	n.s.	0,0143	No cambia	Mejora
76	Cloral hidrato	0,0003	0,0002	Subestimada	Sobreestimada
77	DPA	n.s.	n.s.	No cambia	No cambia
80	Estricnina #	d.i.	n.s.	Sin efecto IC50	No cambia
91	Sodio selenato	0,0163	n.s.	Mejora	No cambia
92	Acetonitrilo #	P<0,0001	0,0038	Subestimada	Corregida
96	Epinefrina bitartrato	0,0166	0,0001	Ausencia dato Humano	Ausencia dato Humano

Tabla 25: Comparación de los valores de toxicidad de compuestos nefrotóxicos. Las alertas identificadas en A704 comparando la LOEC_{viab} y LOEC_{oxi} con el log (IC50) de NRU en 3T3 usando el test t de Student están representadas en negrita. La capacidad de mejorar la predicción de la toxicidad humana fue determinada comparando los valores de LOEC y IC50 de 3T3 con los datos de LC50 de humano (Sjöström et al., 2008). (# compuestos outliers de 3T3; * valores que cambian de forma estadísticamente significativa pero que siguen estando en el rango de una unidad de logaritmo del valor de log (LC50) de humano.

Compuesto referencia		Valor-p IC50 LOEC	Valor-p EC50 LOEC	Predicción Toxicidad IC50 LOEC	Predicción Toxicidad EC50 LOEC
NEFROTOXICIDAD					
1	Acetaminofeno	P<0,0001	P<0,0001	Subestimada	Subestimada*
4	Cafeína	d.i.	n.s.	Datos insuficientes	No cambia
5	Carbamazepina	d.i.	d.i.	Sin efecto IC50	Datos insuficientes
7	Cicloheximida	d.i.	0,0006	Ausencia dato Humano	Ausencia dato Humano
12	Mercurio (II), cloruro de	n.s.	0,0117	No cambia	Sobreestimada
13	Pentaclorofenol	n.s.	0,002	No cambia	Sobreestimada
21	Cadmio, cloruro de	0,0499	n.s.	Subestimada*	No cambia
31	Tetraciclina clorhidrato	d.i.	d.i.	Ausencia dato Humano	Ausencia dato Humano
34	Lindano	d.i.	d.i.	Sin efecto IC50	Sin efecto EC50
42	cis-Diaminoplatina (II)	d.i.	d.i.	Sin efecto IC50	Datos insuficientes
43	Dietilenglicol	0,0024	0,0014	Ausencia dato Humano	Ausencia dato Humano
44	Dicuat dibromido	0,0309	n.s.	Mejora	No cambia
45	Ocratoxina A	d.i.	d.i.	Ausencia dato Humano	Ausencia dato Humano
46	Ciclosporina A	d.i.	P<0,0001	Datos insuficientes	Corregida
49	Paraquat, dicloruro	0,001	P<0,0001	Subestimada	Subestimada
52	Hierro (II), sulfato de	d.i.	d.i.	Ausencia dato 3T3 NRU	Ausencia dato 3T3 NRU
54	Etilenoglicol	P<0,0001	d.i.	Subestimada	Sin efecto EC50
55	Metanol	d.i.	d.i.	Ausencia dato 3T3 NRU	Ausencia dato 3T3 NRU
57	Sodio, cloruro de	d.i.	d.i.	Sin efecto IC50	Sin efecto EC50
60	Litio, sulfato de	n.s.	n.s.	No cambia	No cambia
63	Propranolol clorhidrato	0,0003	P<0,0001	Subestimada*	Sobreestimada
64	Arsénico, trióxido de	d.i.	n.s.	Sin efecto IC50	No cambia
66	Talio, Sulfato de	0,0001	d.i.	Subestimada	Datos insuficientes
77	DPA	d.i.	d.i.	Sin efecto IC50	Datos insuficientes
80	Estricnina	d.i.	0,0015	Sin efecto IC50	Corregida
91	Sodio, selenato de	n.s.	n.s.	No cambia	No cambia

Tabla 26: Comparación de los valores de toxicidad de compuestos hepatotóxicos. Las alertas identificadas en HepG2 comparando la LOEC_{viab} y LOEC_{oxi} con el log (IC50) de NRU en 3T3 usando el test t de Student están representadas en negrita. La capacidad de mejorar la predicción de la toxicidad humana fue determinada comparando los valores de LOEC y IC50 de 3T3 con los datos de LC50 de humano (Sjöström et al., 2008). (# compuestos outliers de 3T3; * valores que cambian de forma estadísticamente significativa pero que siguen estando en el rango de una unidad de logaritmo del valor de log (LC50) de humano.

Compuesto referencia	Valor-p IC50 LOEC	Valor-p EC50 LOEC	Predicción Toxicidad IC50 LOEC	Predicción Toxicidad EC50 LOEC	
HEPATOTOXICIDAD					
1	Acetaminofeno	P<0,0001	P<0,0001	Subestimada*	Subestimada*
2	Ácido Acetilsalicílico	n.s.	d.i.	No cambia	Datos insuficientes
5	Carbamazepina	d.i.	n.s.	Sin efecto IC50	No cambia
6	Colchicina	P<0,0001	0,0011	Subestimada	Subestimada
13	Pentaclorofenol	0,0089	n.s.	Sobrestimada	No cambia
16	Valproico, Ácido	n.s.	d.i.	No cambia	Sin efecto EC50
18	Benceno	d.i.	d.i.	Ausencia dato Humano	Ausencia dato Humano
19	t-butilo, hidroperóxido	0,0017	d.i.	Ausencia dato Humano	Ausencia dato Humano
21	Cadmio, Cloruro de	0,0009	0,0019	Subestimada*	Subestimada*
23	Pireno	d.i.	d.i.	Ausencia dato Humano	Ausencia dato Humano
26	Hexaclorobenceno	d.i.	d.i.	Ausencia dato 3T3 NRU	Ausencia dato 3T3 NRU
28	Amiodarona	0,0324	n.s.	Mejora	No cambia
29	Verapamilo	n.s.	0,0005	No cambia	Sobrestimada
30	Rifampicina	d.i.	d.i.	Sin efecto IC50	Sin efecto EC50
31	Tetraciclina	d.i.	0,0004	Ausencia dato Humano	Ausencia dato Humano
32	Orfenadrina	n.s.	n.s.	No cambia	No cambia
34	Lindano	d.i.	d.i.	Sin efecto IC50	Sin efecto EC50
37	Etanol	P<0,0001	P<0,0001	Subestimada*	Subestimada*
38	Paration	d.i.	0,0002	Sin efecto IC50	Corregida
42	cis-Diaminoplatina (II)	P<0,0001	0,0037	Subestimada	Mejora
43	Dietilenglicol	n.s.	0,0007	Ausencia dato Humano	Ausencia dato Humano
46	Ciclosporina A	d.i.	P<0,0001	Datos insuficientes	Corregida
47	17 α -Ethinilestradiol	n.s.	n.s.	Ausencia dato Humano	Ausencia dato Humano
49	Paraquat	P<0,0001	P<0,0001	Subestimada	Subestimada
51	Dimetilformamida	P<0,0001	d.i.	Subestimada	Datos insuficientes
53	Amitriptilina	0,0002	0,0263	Subestimada	Mejora
55	Metanol	d.i.	d.i.	Ausencia dato 3T3 NRU	Ausencia dato 3T3 NRU
63	Propranolol	0,0121	d.i.	Subestimada*	Sin efecto EC50
66	Talio, Sulfato de	P<0,0001	0,0408	Subestimada	Mejora
67	Warfarina	d.i.	n.s.	Datos insuficientes	No cambia
76	Cloral hidratado	P<0,0001	n.s.	Subestimada	No cambia
77	DPA	n.s.	n.s.	No cambia	No cambia
80	Estricnina	d.i.	d.i.	Sin efecto IC50	Sin efecto EC50
91	Sodio, Selenato de	n.s.	d.i.	No cambia	Datos insuficientes

2.6 Clasificación de compuestos por su valor de toxicidad *in vitro*

Uno de los objetivos de este trabajo era la correcta clasificación de los compuestos en las 5 clases de toxicidad definidas según los criterios del sistema global de armonización (GHS), clasificación basada en los valores de LD50 en rata (Tabla 13).

Para ello seguimos dos estrategias de análisis distintas. Por una parte se procedió a la distribución de los datos de toxicidad en forma de matriz y se valoró su utilidad en la clasificación de los compuestos mediante un análisis de cluster.

Por otra parte, se realizaron curvas ROC de cada ensayo para cada una de las cinco clases del GHS, para comparar la capacidad clasificativa de cada uno de ellos.

Los compuestos testados se distribuyeron en cinco clases de toxicidad, siguiendo los criterios del GHS para la toxicidad oral en rata, en la que:

Clase I: toxicidad aguda estimada ≤ 5 mg/kg.

Clase II: toxicidad aguda estimada <5 y ≤ 50 mg/kg.

Clase III: toxicidad aguda estimada <50 y ≤ 300 mg/kg.

Clase IV: toxicidad aguda estimada <300 y ≤ 2000 mg/kg.

Clase V: >2000 mg/kg o no tóxico.

2.6.1 Comparación entre las clases de toxicidad definidas por el sistema GHS mediante análisis de matriz de datos

Tras las transformaciones necesarias para la clasificación de los compuestos utilizando una matriz de datos, se ordenaron los compuestos por orden decreciente de toxicidad, según su valor de LD50 *in vivo* de rata. De acuerdo con esta transformación, los valores negativos representan los compuestos más tóxicos, el

cero los compuestos intermedios, y finalmente, los valores positivos los menos tóxicos o no tóxicos. Basándonos en esto, el color rojo se aplica al más tóxico, el amarillo para los intermedios y el verde para los menos tóxicos. El blanco representa los compuestos que no mostraron efecto.

Usando la clasificación de toxicidad anteriormente descrita, la matriz de datos aparece con las cinco clases con diferente gradación de color. Si existiera una correlación de los datos perfecta, la clase I sería totalmente roja, la clase II naranja, la clase III amarilla y finalmente la clase IV y V de menos a más verde.

Como se representa a continuación en la Figura 27, la distribución de los 60 tóxicos según el orden creciente de su toxicidad oral *in vivo* en rata, base de la clasificación GHS, permite observar la escala de color en el que se distinguen perfectamente las cinco clases.

Cuando utilizamos este tipo de clasificación para los cuatro ensayos de referencia, aparecen grandes discrepancias entre ellos (Figura 27).

Al verificar que muchos compuestos que en humano son muy tóxicos y que, en la matriz de rata aparecen en las clase IV o incluso V, decidimos adaptar la clasificación GHS a los valores de LC50 de humano en mg/L en sangre (Tabla 27 y Figura 28).

Para ello, se redistribuyeron los xenobióticos según su valor de toxicidad *in vivo* en humanos (Sjöström et al., 2008). A continuación, y para evaluar la capacidad de clasificación de los ensayos citómicos, se establecieron unos límites idénticos a los establecidos por la clasificación GHS.

En la Figura 28 se muestra el conjunto de los ensayos de referencia para la predicción de la toxicidad en humanos. Si hubiera una buena clasificación, el patrón de colores debería ser el mismo que el de humano. Sin embargo eso no ocurre.

Al analizar los 49 compuestos de los que conocemos el dato de LC50 en humano, podemos verificar que muchos de ellos pasan a la clase I del GHS, que es la clase de toxicidad más elevada. En la Tabla 28 se indican los compuestos que se

clasifican bien con el ensayo de 3T3 NRU, LD50 de rata y ratón según las clases de toxicidad de humano.

Se comprueba que los ensayos *in vivo* no clasifican correctamente ningún compuesto en la clase I de humano, lo que implica que estos no son buenos ensayos a la hora de distinguir los compuestos que presentan más toxicidad, infravalorando la toxicidad de la mayoría de ellos. En la clase II sólo se clasifican correctamente un compuesto. A nivel de la clasificación de los compuestos según su nivel de toxicidad, el ensayo *in vitro* de NRU en 3T3 permite clasificar más compuestos que los ensayos *in vivo*.

En la Figura 29 se muestra la evaluación del conjunto de ensayos citómicos, teniendo como referencia de ordenación de los tóxicos la LC50 en humanos.

Al observar la matriz de datos, se pueden detectar claramente los parámetros citómicos cuya capacidad predictiva no es representativa, puesto que para más de la mitad de los compuestos no se detecta efecto cuando es determinado por ese ensayo (espacios en blanco).

Podemos ver además, de forma bastante clara que compuestos como la digoxina (9) y cadmio cloruro (21) están bien clasificados, que por ejemplo el pentaclorofenol (13) y hexaclorofeno (71) presentan una toxicidad mucho más elevada con nuestros ensayos que *in vivo* en humano, correspondiendo a alertas de toxicidad, y que en compuestos como atropina monohidrato sulfato (3) y nicotina (33) la toxicidad es infravalorada por nuestros ensayos (outliers).

Al realizar este análisis utilizando los valores de LOEC obtenidos para cada parámetro en las tres líneas celulares, se comprueba de forma más nítida qué ensayos no son buenos, y qué compuestos no se pueden clasificar bien con estos ensayos (Figura 30).

Se puede verificar que en la clase I hay un compuesto, el lindano (34), que no presenta efecto por ninguno de los ensayos realizados, también verificamos que el hexaclorobenceno (26) sólo tiene efecto en los ensayos considerados malos (8-

oxo y NO). Los compuestos malati6n (11), nicotina (33), atropina monohidrato sulfato (3), paraquat dicloruro (49), estricnina (80) y talio (66) est1n infravalorados por nuestros ensayos, aparentando menor toxicidad que la que producen *in vivo* en humano.

La colchicina, es un compuesto que por nuestros ensayos de viabilidad no se ha podido clasificar bien, pero por los niveles de estr6s oxidativo lo hace perfectamente.

En la clase II verificamos que los compuestos 5-fluorouracilo (17) y sodio fluoruro (48) est1n mal clasificados por nuestros ensayos, y que la warfarina (67) 1nicamente se clasifica bien por los ensayos de detecci6n de la actividad peroxidativa y los niveles intracelulares de an6n super6xido.

La clase III es la peor clasificada, donde s6lo el diquat dibromuro (44) y el cloral hidrato (76) aparecen bien clasificados por alguno de los LOEC de los par1metros. En la clase IV no se puede clasificar bien los compuestos dimetilformamida (51) y etilenglicol (54) que parecen presentar menor da1o celular que *in vivo*, y el hexaclorofeno (71), que es un alerta por nuestros ensayos. Sin embargo, la clase V est1 bien clasificada por todos los ensayos excepto por el de la 8-oxo mitocondrial (Tabla 29).



Figura 27: Análisis de la matriz de datos entre los valores de citotoxicidad en el ensayo de citotoxicidad *in vitro* (IC50 de NRU en 3T3), la toxicidad *in vivo* en rata y ratón (LD50) y humanos (LC50), usando como criterio de ordenación de la matriz los criterios del GHS según la toxicidad oral *in vivo* de rata. Los espacios en blanco en la matriz indican que no se conoce el valor de toxicidad de ese compuesto.

Tabla 27: Compuestos que se conoce la LC50 en humano en las clases de toxicidad correspondientes, de acuerdo a la aproximación basada en la clasificación del GHS.

Clases GHS adaptadas a la LC50 de Humano				
Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V
6 Colchicina	12 Mercurio (II) cloruro	92 Acetonitrilo	71 Hexaclorofeno	41 Amonio glufofosinato
9 Digoxina	42 cis-Diaminoplatino (II) dic.	52 Hierro (II) sulfato	1 Acetaminofeno	55 Metanol
21 Cadmio cloruro	32 Orfenadrina clorhidrato	14 Fenobarbital	51 Dimetilformamida	57 Sodio cloruro
34 Lindano	28 Amiodarona clorhidrato	4 Cafeína	60 Litio sulfato	10 Isopropanol
26 Hexaclorobenceno	8 Diazepam	44 Diquat dibromuro	77 2,4-Ácido diclorofenoxiac.	37 Etanol
11 Malatión	48 Sodio fluoruro	76 Cloral hidrato	16 Ácido valproico	
38 Paratión	17 5-Fluorouracilo	30 Rifampicina	2 Ácido Acetilsalicílico	
46 Ciclosporina A	5 Carbamazepina	13 Pentaclorofenol	54 Etilenglicol	
64 Arsénico trióxido	39 Diclorvos			
33 Nicotina	67 Warfarina			
3 Atropina sulfato				
53 Amitriptilina clorhidrato				
49 Paraquat dicloruro				
80 Etricina				
29 Verapamilo clorhidrato				
63 Propranolol clorhidrato				
66 Talio sulfato				
91 Sodio selenato				

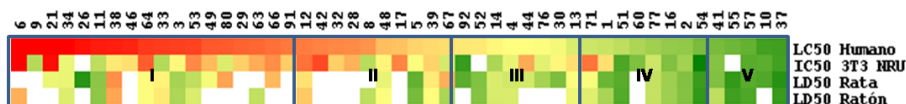


Figura 28: Análisis de la matriz de datos entre los valores de citotoxicidad en el ensayo de citotoxicidad *in vitro* (IC50 de NRU en 3T3), la toxicidad *in vivo* en rata y ratón (LD50) y humanos (LC50), usando como criterio de ordenación de la matriz la LC50 de humano. Los espacios en blanco en la matriz indican que no se conoce el valor de toxicidad de ese compuesto.

Tabla 28: Compuestos que se clasifican bien en los ensayos de 3T3 NRU, LD50 de rata y LD50 de ratón.

Compuestos en común en las clases GHS - 3T3 y Humano				
Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V
6 Colchicina	17 5-Fluorouracilo	4 Cafeína	2 Ácido Acetilsalicílico	10 Isopropanol
21 Cadmio cloruro	28 Amiodarona clorhidrato	13 Pentaclorofenol	16 Ácido valproico	37 Etanol
64 Arsénico trióxido	32 Orfenadrina clorhidrato	30 Rifampicina	60 Lito sulfato	57 Sodio cloruro
	39 Diclorsvos	76 Cloral hidrato		
Compuestos en común en las clases GHS - Rata y Humano				
Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V
Ninguno	67 Warfarina	4 Cafeína	2 Ácido Acetilsalicílico	10 Isopropanol
		13 Pentaclorofenol	16 Ácido valproico	37 Etanol
		14 Fenobarbital	77 2,4-Ácido diclorofenoxiac.	55 Metanol
		44 Diquat dibromuro		57 Sodio cloruro
Compuestos en común en las clases GHS - Ratón y Humano				
Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V
Ninguno	12 Mercurio (II) cloruro	4 Cafeína	1 Acetaminofeno	37 Etanol
		13 Pentaclorofenol	2 Ácido Acetilsalicílico	55 Metanol
		14 Fenobarbital	16 Ácido valproico	57 Sodio cloruro
			77 2,4-Ácido diclorofenoxiac.	

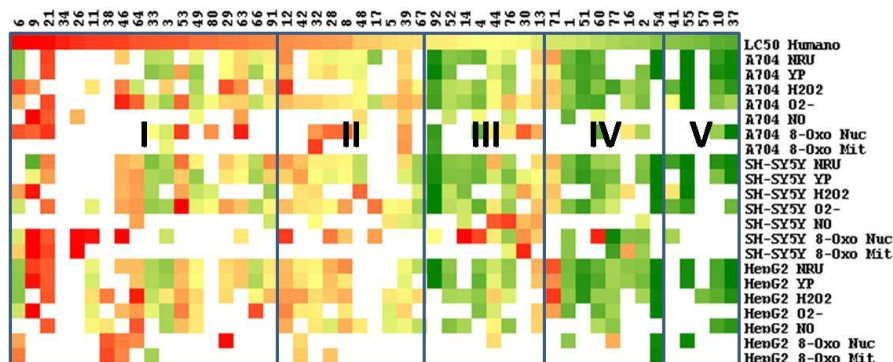


Figura 29: Análisis de la matriz de datos entre los valores de toxicidad (IC50/EC50) del conjunto de ensayos citómicos y la toxicidad *in vivo* humana (LC50). Los espacios en blanco en la matriz indican que el tóxico no tiene efecto en el rango de dosis ensayado y no se ha podido obtener un valor de IC50/ EC50.

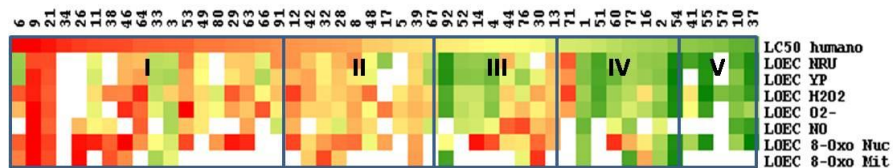


Figura 30: Análisis de la matriz de datos con los valores LOEC de los siete ensayos de toxicidad realizados en las tres líneas celulares usando como criterio de ordenación de la matriz la toxicidad *in vivo* de humano.

Tabla 29: Compuestos que se clasifican bien con los valores de LOEC de los ensayos de NR, YP, Peróxidos, Superóxido, NO, 8-Oxo nuclear y mitocondrial. NE significa que no se ha podido determinar una IC50/EC50 – no tiene efecto.

Compuestos en común en las clases GHS - LOEC NRU y Humano				
Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V
9 Digoxina	8 Diazepam	76 Cloral hidrato	16 Ácido valproico	10 Isopropanol
21 Cadmio cloruro	12 Mercurio (II) cloruro		60 Lito sulfato	37 Etanol
53 Amitriplina clorhidrato	28 Amiodarona clorhidrato		77 2,4-Ácido diclorofenoxic.	41 Amonio glufozinato
91 Sodio selenato	39 Diclorvos			55 Metanol
	42 cis-Diaminoplatino (II) dic.			57 Sodio cloruro (NE)
Compuestos en común en las clases GHS - LOEC YP y Humano				
Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V
9 Digoxina	12 Mercurio (II) cloruro	30 Rifampicina	16 Ácido valproico	10 Isopropanol
21 Cadmio cloruro	28 Amiodarona clorhidrato	44 Diquat dibromuro	77 2,4-Ácido diclorofenoxic.	37 Etanol
	39 Diclorvos			55 Metanol
	42 cis-Diaminoplatino (II) dic.			41 Amonio glufozinato (NE)
				57 Sodio cloruro (NE)
Compuestos en común en las clases GHS - LOEC H2O2 y Humano				
Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V
6 Colchicina	8 Diazepam	76 Cloral hidrato	1 Acetaminofeno	10 Isopropanol
9 Digoxina	28 Amiodarona clorhidrato		2 Ácido Acetilsalicico	37 Etanol
29 Verapamilo clorhidrato	32 Orfenadrina clorhidrato		60 Lito sulfato	55 Metanol
38 Paratión	39 Diclorvos		77 2,4-Ácido diclorofenoxic.	57 Sodio cloruro
46 Ciclosporina A	42 cis-Diaminoplatino (II) dic.			
64 Arsénico trióxido	67 Warfarina			
Compuestos en común en las clases GHS - LOEC O2- y Humano				
Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V
9 Digoxina	5 Carbamazepina	30 Rifampicina	16 Ácido valproico	10 Isopropanol
21 Cadmio cloruro	8 Diazepam	44 Diquat dibromuro	60 Lito sulfato	55 Metanol
46 Ciclosporina A	28 Amiodarona clorhidrato			57 Sodio cloruro (NE)
53 Amitriplina clorhidrato	32 Orfenadrina clorhidrato			
64 Arsénico trióxido	39 Diclorvos			
66 Talio sulfato	42 cis-Diaminoplatino (II) dic.			
	67 Warfarina			
Compuestos en común en las clases GHS - LOEC NO y Humano				
Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V
9 Digoxina	5 Carbamazepina	4 Cafeína	77 2,4-Ácido diclorofenoxic.	10 Isopropanol
21 Cadmio cloruro	8 Diazepam			37 Etanol
64 Arsénico trióxido	12 Mercurio (II) cloruro			41 Amonio glufozinato (NE)
	39 Diclorvos			55 Metanol (NE)
	48 Sodio fluoruro			57 Sodio cloruro (NE)
Compuestos en común en las clases GHS - LOEC 8-Oxo Nuclear y Humano				
Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V
6 Colchicina	17 5-Fluorouracilo	44 Diquat dibromuro	1 Acetaminofeno	37 Etanol
9 Digoxina	32 Orfenadrina clorhidrato	76 Cloral hidrato	2 Ácido Acetilsalicico	55 Metanol
11 Malatión	39 Diclorvos	92 Acetonitrilo		57 Sodio cloruro (NE)
21 Cadmio cloruro				
26 Hexaclorobenceno				
29 Verapamilo clorhidrato				
38 Paratión				
46 Ciclosporina A				
53 Amitriplina clorhidrato				
63 Propranolol clorhidrato				
Compuestos en común en las clases GHS - LOEC 8-Oxo Mitocondrial y Humano				
Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V
6 Colchicina	28 Amiodarona clorhidrato	76 Cloral hidrato	1 Acetaminofeno	10 Isopropanol (NE)
9 Digoxina	39 Diclorvos		2 Ácido Acetilsalicico	37 Etanol (NE)
21 Cadmio cloruro	42 cis-Diaminoplatino (II) dic.			41 Amonio glufozinato (NE)
26 Hexaclorobenceno				55 Metanol (NE)
38 Paratión				57 Sodio cloruro (NE)
46 Ciclosporina A				

2.6.2 Análisis mediante curvas ROC de la clasificación de compuestos por los ensayos citómicos

Por otra parte, se han realizado curvas ROC de cada ensayo, con las que se obtuvo el valor de AUC para cada una de las cinco clases del GHS. En las Tablas 30, 31 Y 32 se representan respectivamente los valores de AUC de todos los ensayos realizados y también de los ensayos de referencia, el NRU en 3T3, LD50 de rata y ratón cuando se comparan con la LC50 de humano.

El valor de AUC corresponde al área bajo la curva generada por una gráfica de sensibilidad frente a 1 – especificidad e informa de la probabilidad que tiene determinado ensayo de clasificar correctamente un compuesto en la correspondiente clase de toxicidad humana basada en el reglamento del GHS.

Si usamos los análisis de las curvas ROC para valorar cuantos de nuestros ensayos tienen la probabilidad de clasificar mejor los compuestos químicos que los ensayos de referencia, verificamos que en la clase I el 77,5% de los ensayos mejoran al de NRU en 3T3, el 42,5% mejora la clasificación de los compuestos de la clase II, el 15% y el 17,5% mejoran la clasificación en las clases IV y V respectivamente.

Ninguno de los ensayos mejora la probabilidad de clasificación de los compuestos de NRU en 3T3 de la clase III al igual que tampoco lo hacen para la LD50 de rata y LD50 de ratón. Esto está de acuerdo a lo descrito anteriormente con el análisis de una matriz de datos (Figura 31), donde pudimos demostrar que únicamente el compuesto diquat dibromuro (44) coincide correctamente en esa clase.

Las clases I y II se consiguen clasificar mejor por los ensayos citómicos en respectivamente un 92,5% y 85% de los casos comparado con LD50 de rata y en el 92,5% y 82,5% comparado con la LD50 de ratón. La clase IV sólo mejora en un 20% de los ensayos comparado con la LD50 de rata y en el 60% en la clase V.

Comparado con la toxicidad de ratón se consigue mejorar únicamente en un 7,5% la clase IV y en el 70% la clase V (Tablas 30, 31 y 32).

Si usamos las curvas ROC para valorar cual de nuestros ensayos tiene mejor capacidad de clasificación verificamos que el ensayo de la determinación de la capacidad peroxidativa en HepG2 clasifica mejor los compuestos en las clases I, II y IV que el test de referencia del NRU en 3T3. Si lo comparamos con los ensayos *in vivo*, este ensayo mejora además la clasificación de los compuestos de la clase V.

Cuando analizamos la capacidad de clasificación según el GHS de los valores LOEC obtenidos para cada parámetro, verificamos una vez más que el ensayo de la detección de la actividad peroxidativa es el que mejora a los ensayos de referencia en más clases (Tablas 30, 31 y 32), además del LOEC de NRU, que lo iguala en clasificación de los compuestos por distintos niveles de toxicidad, pero que no mejora el ensayo de NRU en 3T3 cuando se correlaciona con los datos de LC50 de humano (Figura 21).

Se puede verificar que el ensayo de determinación de la actividad peroxidativa mejora la clasificación de los compuestos de las clases I, II y IV con respecto a 3T3 (Tabla 31), las clases I, II y IV frente a LD50 en rata (Tabla 32) y las clases I, II, IV y V frente a LD50 en ratón (Tabla 33). Además se comprueba que en estos dos casos, las clases I y II son mejoradas prácticamente por todos los ensayos de forma individual, y por todos los valores LOEC.

Realmente hemos comprobado que, a excepción de la clase III, prácticamente todos los ensayos igualan o mejoran la clasificación de los ensayos *in vivo*. Eso puede deberse a que sólo se han considerado 37 y 30 valores de LD50 para rata y ratón respectivamente cuando para los demás ensayos se usaron 49 valores.

Al verificar que muchos de nuestros ensayos mejoraban la clasificación de los ensayos *in vivo*, decidimos incluir sólo los compuestos para los que se dispone de datos de toxicidad *in vivo* en rata o ratón. De esta forma, se podría determinar si la probabilidad de clasificación correcta aumenta en este subconjunto, de la misma forma que en el total de compuestos (Tablas 33 y 34).

Eliminando los compuestos de los que no se conocen el efecto en rata o ratón se verificó igualmente que las clases I y II mejoran en casi todos los ensayos (87,5% y 62,5% respectivamente en rata y 65% y 72,5% en ratón). En la clase V únicamente mejoran en el 22,5% (rata) y 17,5% (ratón).

Comparando con la toxicidad en rata verificamos que el ensayo que mejora la clasificación de compuestos es el de determinación de la actividad peroxidativa en HepG2 y los valores LOEC_{H₂O₂}, que mejoran todas las clases excepto la clase III.

Una vez comparado con ratón, los ensayos que más clases mejoran, la I, II y V, son los niveles de anión superóxido en SH-SY5Y, la actividad peroxidativa en HepG2, los valores LOEC de NRU y los valores LOEC de óxido nítrico.

Las curvas ROC permiten la identificación de los ensayos que mejoran la probabilidad de clasificación correcta de los compuestos y la probabilidad de acierto de su clasificación, pero no permiten distinguir entre los compuestos que son bien clasificados de los que no lo son. Para ello es importante el uso de la matriz de datos que nos permite identificar los compuestos correctamente clasificados.

La capacidad de clasificación de los ensayos citómicos fue también evaluada por Kinsner-Ovaskainen et al. (2013b) usando un enfoque distinto. En ese análisis usaron los valores de la LD50 de rata y las clases GHS definidas por esos valores y concluyeron que los ensayos citómicos únicamente clasificaban correctamente un máximo del 9% de los compuestos. Como hemos verificado en el análisis por matriz de datos, la clasificación de los compuestos usando la LD50 de rata dista mucho de

la clasificación por la LC50 de humano lo que explica el bajo porcentaje de clasificación en el primer caso.

Aproximaciones y cálculos para corregir estas diferencias entre los valores de rata y los valores de humano, así como, adaptaciones de las clases definidas por el GHS y CLP deberían desarrollarse para permitir una clasificación más ajustada a la realidad de la predicción de la toxicidad humana.

Tabla 30: Valores de AUC de los ensayos citómicos y los de referencia determinados por análisis de las curvas ROC para las clases de toxicidad GHS adaptadas a la LC50 en humanos (n=49). Los ensayos están ordenados en orden decreciente de su valor de probabilidad de clasificación. En rojo se representa el ensayo de referencia NRU en 3T3, en rosa los ensayos con AUC igual al ensayo de referencia, en verde los ensayos que lo mejoran y en blanco los ensayos que empeoran la capacidad de clasificación del ensayo de NRU en 3T3.

Clase I 0-5mg	Clase II 5-50mg	Clase III 50-300mg	Clase IV 300-2000mg	Clase V >2000mg
LOEC total HepG2 0,718	A704 EC50 Superox. 0,773	LD60 Rata 0,640	LOEC Perox. 0,701	LOEC total HepG2 0,909
LOEC oxil HepG2 0,718	LOEC Superox. 0,773	3T3 NRU 0,628	HepG2 EC50 Perox. 0,701	LOEC oxil HepG2 0,886
LOEC 8-Oxo Nuc. 0,665	HepG2 EC50 Perox. 0,723	LD50 Ratoán 0,602	LOEC total HepG2 0,701	LOEC viab 0,864
LOEC total 0,651	LOEC oxil HepG2 0,710	SH-SY5Y IC50 YP 0,602	LD50 Ratoán 0,665	LOEC total SH-SY5Y 0,855
LOEC Perox. 0,646	LOEC total HepG2 0,697	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc. 0,601	LOEC oxil HepG2 0,630	LOEC oxil SH-SY5Y 0,855
LOEC total A704 0,642	LOEC NO 0,686	A704 EC50 8-Oxo Nuc. 0,576	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mlt. 0,625	SH-SY5Y EC50 Superox. 0,852
LOEC oxil A704 0,642	LOEC viab 0,673	LOEC 8-Oxo Nuc. 0,576	3T3 NRU 0,614	LOEC NRU 0,852
LOEC Superox. 0,634	LOEC NRU 0,673	LOEC viab 0,564	LOEC NRU 0,614	3T3 NRU 0,843
LOEC 8-Oxo Mlt. 0,634	LOEC Perox. 0,672	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mlt. 0,563	LOEC viab 0,614	LOEC Perox. 0,832
LOEC oxil 0,624	LOEC total A704 0,660	A704 IC50 YP 0,552	LOEC 8-Oxo Mlt. 0,613	LOEC YP 0,830
A704 EC50 Superox. 0,611	LOEC oxil A704 0,660	A704 EC50 Superox. 0,552	LD60 Rata 0,602	LOEC NO 0,830
LOEC viab 0,595	LOEC total SH-SY5Y 0,660	LOEC oxil A704 0,552	LOEC 8-Oxo Nuc. 0,601	HepG2 EC50 Perox. 0,830
LOEC NRU 0,595	LOEC 8-Oxo Mlt. 0,637	LOEC YP 0,552	HepG2 EC50 NO 0,576	LOEC viab SH-SY5Y 0,818
A704 EC50 8-Oxo Nuc. 0,591	LOEC 8-Oxo Nuc. 0,636	LOEC 8-Oxo Mlt. 0,550	LOEC Superox. 0,576	HepG2 IC50 NR 0,807
SH-SY5Y IC50 NR 0,583	A704 IC50 YP 0,624	LOEC total A704 0,540	A704 EC50 Perox. 0,564	LOEC viab HepG2 0,807
HepG2 EC50 8-Oxo Nuc. 0,583	LOEC total 0,623	LOEC viab A704 0,540	HepG2 IC50 YP 0,564	SH-SY5Y IC50 NR 0,784
HepG2 EC50 8-Oxo Mlt. 0,583	LOEC viab HepG2 0,623	A704 EC50 NO 0,538	LOEC total A704 0,564	HepG2 IC50 YP 0,784
LOEC viab SH-SY5Y 0,583	3T3 NRU 0,610	A704 IC50 NR 0,527	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc. 0,563	SH-SY5Y IC50 YP 0,773
A704 EC50 Perox. 0,567	LOEC oxil 0,610	LOEC Superox. 0,527	SH-SY5Y IC50 NR 0,562	A704 EC50 Superox. 0,750
SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mlt. 0,567	LOEC oxil SH-SY5Y 0,610	A704 EC50 Perox. 0,526	LOEC oxil A704 0,562	LOEC viab A704 0,750
HepG2 EC50 Perox. 0,567	LOEC YP 0,610	LOEC total 0,526	LOEC viab HepG2 0,552	HepG2 EC50 NO 0,739
HepG2 EC50 Superox. 0,567	HepG2 EC50 8-Oxo Mlt. 0,600	LOEC oxil 0,526	LOEC YP 0,552	A704 IC50 NR 0,727
SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc. 0,558	HepG2 IC50 YP 0,586	SH-SY5Y EC50 Perox. 0,514	A704 EC50 8-Oxo Nuc. 0,550	A704 IC50 YP 0,727
A704 EC50 NO 0,556	LOEC viab A704 0,586	HepG2 EC50 Perox. 0,514	HepG2 IC50 NR 0,540	HepG2 EC50 Superox. 0,727
HepG2 IC50 YP 0,556	A704 EC50 NO 0,574	LOEC total HepG2 0,514	LOEC viab SH-SY5Y 0,540	LOEC Superox. 0,698
HepG2 EC50 NO 0,556	A704 EC50 8-Oxo Nuc. 0,574	LOEC oxil HepG2 0,514	HepG2 EC50 Perox. 0,538	LD60 Rata 0,696
LOEC YP 0,556	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc. 0,574	LOEC Perox. 0,514	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc. 0,526	LOEC 8-Oxo Mlt. 0,693
LOEC NO 0,551	HepG2 EC50 NO 0,574	LOEC viab HepG2 0,502	LOEC total 0,526	LOEC 8-Oxo Nuc. 0,686
SH-SY5Y EC50 Superox. 0,539	SH-SY5Y IC50 NR 0,573	LOEC NRU 0,502	LOEC oxil 0,526	LOEC total 0,666
HepG2 IC50 NR 0,539	SH-SY5Y EC50 Superox. 0,573	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc. 0,500	LOEC total SH-SY5Y 0,514	LOEC oxil 0,666
LOEC viab HepG2 0,539	HepG2 IC50 NR 0,573	HepG2 EC50 8-Oxo Mlt. 0,500	LOEC oxil SH-SY5Y 0,514	LD50 Ratoán 0,661
3T3 NRU 0,636	LOEC viab SH-SY5Y 0,573	LOEC total SH-SY5Y 0,489	SH-SY5Y EC50 Perox. 0,502	A704 EC50 Superox. 0,662
LOEC total SH-SY5Y 0,533	A704 EC50 8-Oxo Mlt. 0,550	LOEC viab SH-SY5Y 0,489	LOEC NO 0,502	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc. 0,639
A704 IC50 NR 0,528	A704 IC50 NR 0,549	A704 EC50 8-Oxo Mlt. 0,488	A704 EC50 8-Oxo Mlt. 0,500	SH-SY5Y EC50 NO 0,636
A704 IC50 YP 0,528	LD50 Ratoán 0,524	HepG2 IC50 YP 0,477	HepG2 EC50 8-Oxo Mlt. 0,488	LOEC total A704 0,632
LOEC viab A704 0,528	SH-SY5Y IC50 YP 0,523	HepG2 EC50 Superox. 0,477	A704 EC50 Superox. 0,477	LOEC oxil A704 0,632
SH-SY5Y EC50 Perox. 0,512	LD50 Rata 0,512	LOEC NO 0,477	A704 EC50 NO 0,476	SH-SY5Y EC50 Perox. 0,627
LOEC oxil SH-SY5Y 0,505	SH-SY5Y EC50 NO 0,512	HepG2 EC50 NO 0,465	SH-SY5Y EC50 Superox. 0,465	A704 EC50 NO 0,625
LD50 Rata 0,500	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc. 0,512	LOEC oxil SH-SY5Y 0,465	A704 IC50 NR 0,463	A704 EC50 8-Oxo Nuc. 0,616
LD50 Ratoán 0,500	HepG2 EC50 Superox. 0,499	SH-SY5Y EC50 NO 0,463	SH-SY5Y EC50 NO 0,463	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mlt. 0,602
SH-SY5Y IC50 YP 0,500	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mlt. 0,474	SH-SY5Y EC50 Superox. 0,463	LOEC viab A704 0,451	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc. 0,580
A704 EC50 8-Oxo Mlt. 0,484	A704 EC50 Perox. 0,473	SH-SY5Y IC50 NR 0,439	A704 IC50 YP 0,427	HepG2 EC50 8-Oxo Mlt. 0,557
SH-SY5Y EC50 NO 0,468	SH-SY5Y EC50 Perox. 0,460	HepG2 IC50 NR 0,427	SH-SY5Y IC50 YP 0,427	A704 EC50 8-Oxo Mlt. 0,534

Tabla 31: Valores de AUC de los ensayos citómicos y los de referencia determinados por análisis de las curvas ROC para las clases de toxicidad GHS adaptadas a la LC50 de humano (n=49). Los ensayos están colocados en orden decreciente de su valor de probabilidad de clasificación. En rojo se representa el ensayo de referencia LD50 de rata, en rosa los ensayos con AUC igual a la LD50 de rata, en verde los ensayos que mejoran la capacidad de clasificación de LD50 de rata y en blanco los ensayos que la empeoran.

Clase I 0-5mg	Clase II 5-50mg	Clase III 50-300mg	Clase IV 300-2000mg	Clase V >2000mg					
LOEC total HepG2	0,718	A704 EC50 Superox.	0,773	LD50 Rata	0,640	LOEC Perox.	0,701	LOEC total HepG2	0,909
LOEC oxi HepG2	0,718	LOEC Superox.	0,773	3T3 NRU	0,628	HepG2 EC50 Perox.	0,701	LOEC oxi HepG2	0,886
LOEC 8-Oxo Nuc.	0,665	HepG2 EC50 Perox.	0,723	LD50 Ratin	0,602	LOEC total HepG2	0,701	LOEC viab	0,864
LOEC total	0,651	LOEC oxi HepG2	0,710	SH-SY5Y IC50 YP	0,602	LD50 Ratin	0,695	LOEC total SH-SY5Y	0,855
LOEC Perox.	0,646	LOEC total HepG2	0,697	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc.	0,601	LOEC oxi HepG2	0,639	LOEC oxi SH-SY5Y	0,855
LOEC total A704	0,642	LOEC NO	0,686	A704 EC50 8-Oxo Nuc.	0,576	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mit.	0,625	SH-SY5Y EC50 Superox.	0,852
LOEC oxi A704	0,642	LOEC viab	0,673	LOEC 8-Oxo Nuc.	0,576	LOEC NRU	0,614	LOEC NRU	0,852
LOEC Superox.	0,634	LOEC NRU	0,673	LOEC viab	0,564	3T3 NRU	0,614	3T3 NRU	0,843
LOEC 8-Oxo Mit.	0,634	LOEC Perox.	0,672	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mit.	0,563	LOEC viab	0,614	LOEC Perox.	0,832
LOEC oxi	0,624	LOEC total A704	0,660	A704 IC50 YP	0,562	LOEC 8-Oxo Mit.	0,613	LOEC YP	0,830
A704 EC50 Superox.	0,611	LOEC oxi A704	0,660	A704 EC50 Superox.	0,562	LD50 Rata	0,602	LOEC NO	0,830
LOEC viab	0,595	LOEC total SH-SY5Y	0,660	LOEC oxi A704	0,562	LOEC 8-Oxo Nuc.	0,601	HepG2 EC50 Perox.	0,830
LOEC NRU	0,595	LOEC 8-Oxo Mit.	0,637	LOEC YP	0,562	HepG2 EC50 NO	0,576	LOEC viab SH-SY5Y	0,818
A704 EC50 8-Oxo Nuc.	0,591	LOEC 8-Oxo Nuc.	0,636	LOEC 8-Oxo Mit.	0,550	LOEC Superox.	0,576	HepG2 IC50 NR	0,807
SH-SY5Y IC50 NR	0,583	A704 IC50 YP	0,624	LOEC total A704	0,540	A704 EC50 Perox.	0,564	LOEC viab HepG2	0,807
HepG2 EC50 8-Oxo Nuc.	0,583	LOEC total	0,623	LOEC viab A704	0,540	HepG2 IC50 YP	0,564	SH-SY5Y IC50 NR	0,784
HepG2 EC50 8-Oxo Mit.	0,583	LOEC viab HepG2	0,623	A704 EC50 NO	0,538	LOEC total A704	0,564	HepG2 IC50 YP	0,784
LOEC viab SH-SY5Y	0,583	3T3 NRU	0,610	A704 IC50 NR	0,527	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc.	0,563	SH-SY5Y IC50 YP	0,773
A704 EC50 Perox.	0,567	LOEC oxi	0,610	LOEC Superox.	0,527	SH-SY5Y IC50 NR	0,562	A704 EC50 Perox.	0,750
SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mit.	0,567	LOEC oxi SH-SY5Y	0,610	A704 EC50 Perox.	0,526	LOEC oxi A704	0,562	LOEC viab A704	0,750
HepG2 EC50 Perox.	0,567	LOEC YP	0,610	LOEC total	0,526	LOEC viab HepG2	0,562	HepG2 EC50 NO	0,739
HepG2 EC50 Superox.	0,567	HepG2 EC50 8-Oxo Mit.	0,600	LOEC oxi	0,526	LOEC YP	0,562	A704 IC50 NR	0,727
SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc.	0,558	HepG2 IC50 YP	0,586	SH-SY5Y EC50 Perox.	0,514	A704 EC50 8-Oxo Nuc.	0,560	A704 IC50 YP	0,727
A704 EC50 NO	0,556	LOEC viab A704	0,586	HepG2 EC50 Perox.	0,514	HepG2 IC50 NR	0,540	HepG2 EC50 Superox.	0,727
HepG2 IC50 YP	0,556	A704 EC50 NO	0,574	LOEC total HepG2	0,514	LOEC viab SH-SY5Y	0,540	LOEC Superox.	0,698
HepG2 EC50 NO	0,556	A704 EC50 8-Oxo Nuc.	0,574	LOEC oxi HepG2	0,514	HepG2 EC50 Superox.	0,538	LD50 Rata	0,656
LOEC YP	0,556	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc.	0,574	LOEC Perox.	0,514	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc.	0,526	LOEC 8-Oxo Mit.	0,693
LOEC NO	0,551	HepG2 EC50 NO	0,574	LOEC viab HepG2	0,502	LOEC total	0,526	LOEC 8-Oxo Nuc.	0,686
SH-SY5Y EC50 Superox.	0,539	SH-SY5Y IC50 NR	0,573	LOEC NRU	0,502	LOEC oxi	0,526	LOEC total	0,666
HepG2 IC50 NR	0,539	SH-SY5Y EC50 Superox.	0,573	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc.	0,500	LOEC total SH-SY5Y	0,514	LOEC oxi	0,666
LOEC viab HepG2	0,539	HepG2 IC50 NR	0,573	HepG2 EC50 8-Oxo Mit.	0,500	LOEC oxi SH-SY5Y	0,514	LD50 Ratin	0,661
3T3 NRU	0,535	LOEC viab SH-SY5Y	0,573	LOEC total SH-SY5Y	0,489	SH-SY5Y EC50 Perox.	0,502	A704 EC50 Superox.	0,652
LOEC total SH-SY5Y	0,533	A704 EC50 8-Oxo Mit.	0,550	LOEC viab SH-SY5Y	0,489	LOEC NO	0,502	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc.	0,639
A704 IC50 NR	0,528	A704 IC50 NR	0,549	A704 EC50 8-Oxo Mit.	0,488	A704 EC50 8-Oxo Mit.	0,500	SH-SY5Y EC50 NO	0,636
A704 IC50 YP	0,528	LD50 Ratin	0,524	HepG2 IC50 YP	0,477	HepG2 EC50 8-Oxo Mit.	0,488	LOEC total A704	0,632
LOEC viab A704	0,528	SH-SY5Y IC50 YP	0,523	HepG2 EC50 Superox.	0,477	A704 EC50 Superox.	0,477	LOEC oxi A704	0,632
SH-SY5Y EC50 Perox.	0,512	LD50 Rata	0,512	LOEC NO	0,477	A704 EC50 NO	0,476	SH-SY5Y EC50 Perox.	0,627
LOEC oxi SH-SY5Y	0,505	SH-SY5Y EC50 NO	0,512	HepG2 EC50 NO	0,465	SH-SY5Y EC50 Superox.	0,465	A704 EC50 NO	0,625
LD50 Rata	0,600	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc.	0,512	LOEC oxi SH-SY5Y	0,465	A704 IC50 NR	0,463	A704 EC50 8-Oxo Nuc.	0,616
LD50 Ratin	0,500	HepG2 EC50 Superox.	0,499	SH-SY5Y EC50 NO	0,463	SH-SY5Y EC50 NO	0,463	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mit.	0,802
SH-SY5Y IC50 YP	0,500	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mit.	0,474	SH-SY5Y EC50 Superox.	0,463	LOEC viab A704	0,451	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc.	0,580
A704 EC50 8-Oxo Mit.	0,484	A704 EC50 Perox.	0,473	SH-SY5Y IC50 NR	0,439	A704 IC50 YP	0,427	HepG2 EC50 8-Oxo Mit.	0,557
SH-SY5Y EC50 NO	0,468	SH-SY5Y EC50 Perox.	0,460	HepG2 IC50 NR	0,427	SH-SY5Y IC50 YP	0,427	A704 EC50 8-Oxo Mit.	0,534

Tabla 32: Valores de AUC de los ensayos citómicos y los de referencia determinados por análisis de las curvas ROC para las clases de toxicidad GHS adaptadas a la LC50 de humano (n=49). Los ensayos están colocados en orden decreciente de su valor de probabilidad de clasificación. En rojo se representa el ensayo de referencia LD50 de ratón, en rosa los ensayos con AUC igual a la LD50 de ratón, en verde los ensayos que mejoran la capacidad de clasificación de LD50 de ratón y en blanco los ensayos que la empeoran.

Clase I 8-5mg	Clase II 5-50mg	Clase III 50-300mg	Clase IV 300-2000mg	Clase V >2000mg
LOEC total HepG2	A704 EC50 Superox.	LD50 Rata	LOEC Perox.	LOEC total HepG2
LOEC oxil HepG2	LOEC Superox.	3T3 NRU	HepG2 EC50 Perox.	LOEC oxil HepG2
LOEC 8-Oxo Nuc.	HepG2 EC50 Perox.	LD50 Ratoñ	LOEC total HepG2	LOEC viab
LOEC total	LOEC oxil HepG2	SH-SY5Y IC50 YP	LD50 Ratoñ	LOEC total SH-SY5Y
LOEC Perox.	LOEC total HepG2	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc.	LOEC oxil HepG2	LOEC oxil SH-SY5Y
LOEC total A704	LOEC NO	A704 EC50 8-Oxo Nuc.	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mt.	SH-SY5Y EC50 Superox.
LOEC oxil A704	LOEC viab	LOEC 8-Oxo Nuc.	LOEC NRU	LOEC NRU
LOEC Superox.	LOEC NRU	LOEC viab	3T3 NRU	3T3 NRU
LOEC 8-Oxo Mt.	LOEC Perox.	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mt.	LOEC viab	LOEC Perox.
LOEC oxil	LOEC total A704	A704 IC50 YP	LOEC 8-Oxo Mt.	LOEC YP
A704 EC50 Superox.	LOEC oxil A704	A704 EC50 Superox.	LD50 Rata	LOEC NO
LOEC viab	LOEC total SH-SY5Y	LOEC oxil A704	LOEC 8-Oxo Nuc.	HepG2 EC50 Perox.
LOEC NRU	LOEC 8-Oxo Mt.	LOEC YP	HepG2 EC50 NO	LOEC viab SH-SY5Y
A704 EC50 8-Oxo Nuc.	LOEC 8-Oxo Nuc.	LOEC 8-Oxo Mt.	LOEC Superox.	HepG2 IC50 NR
SH-SY5Y IC50 NR	A704 IC50 YP	LOEC total A704	A704 EC50 Perox.	LOEC viab HepG2
HepG2 EC50 8-Oxo Nuc.	LOEC total	LOEC viab A704	HepG2 IC50 YP	SH-SY5Y IC50 NR
HepG2 EC50 8-Oxo Mt.	LOEC viab HepG2	A704 EC50 NO	LOEC total A704	HepG2 IC50 YP
LOEC viab SH-SY5Y	3T3 NRU	A704 IC50 NR	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc.	SH-SY5Y IC50 YP
A704 EC50 Perox.	LOEC oxil	LOEC Superox.	SH-SY5Y IC50 NR	A704 EC50 Perox.
SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mt.	LOEC oxil SH-SY5Y	A704 EC50 Perox.	LOEC oxil A704	LOEC viab A704
HepG2 EC50 Perox.	LOEC YP	LOEC total	LOEC viab HepG2	HepG2 EC50 NO
HepG2 EC50 Superox.	HepG2 EC50 8-Oxo Mt.	LOEC oxil	LOEC YP	A704 IC50 NR
SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc.	HepG2 IC50 YP	SH-SY5Y EC50 Perox.	A704 EC50 8-Oxo Nuc.	A704 IC50 YP
A704 EC50 NO	LOEC viab A704	HepG2 EC50 Perox.	HepG2 IC50 NR	HepG2 EC50 Superox.
HepG2 IC50 YP	A704 EC50 NO	LOEC total HepG2	LOEC viab SH-SY5Y	LOEC Superox.
HepG2 EC50 NO	A704 EC50 8-Oxo Nuc.	LOEC oxil HepG2	HepG2 EC50 Superox.	LD50 Rata
LOEC YP	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc.	LOEC Perox.	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc.	LOEC 8-Oxo Mt.
LOEC NO	HepG2 IC50 NO	LOEC viab HepG2	LOEC total	LOEC 8-Oxo Nuc.
SH-SY5Y EC50 Superox.	SH-SY5Y IC50 NR	LOEC NRU	LOEC oxil	LOEC total
HepG2 IC50 NR	SH-SY5Y EC50 Superox.	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc.	LOEC total SH-SY5Y	LOEC oxil
LOEC viab HepG2	HepG2 IC50 NR	HepG2 EC50 8-Oxo Mt.	LOEC oxil SH-SY5Y	LD50 Ratoñ
3T3 NRU	LOEC viab SH-SY5Y	LOEC total SH-SY5Y	SH-SY5Y EC50 Perox.	A704 EC50 Superox.
LOEC total SH-SY5Y	A704 EC50 8-Oxo Mt.	LOEC viab SH-SY5Y	LOEC NO	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc.
A704 IC50 NR	A704 IC50 NR	A704 EC50 8-Oxo Mt.	A704 EC50 8-Oxo Mt.	SH-SY5Y EC50 NO
A704 IC50 YP	LD50 Ratoñ	HepG2 IC50 YP	HepG2 EC50 8-Oxo Mt.	LOEC total A704
LOEC viab A704	SH-SY5Y IC50 YP	HepG2 EC50 Superox.	A704 EC50 Superox.	LOEC oxil A704
SH-SY5Y EC50 Perox.	LD50 Rata	LOEC NO	A704 EC50 NO	SH-SY5Y EC50 Perox.
LOEC oxil SH-SY5Y	SH-SY5Y EC50 NO	HepG2 EC50 NO	SH-SY5Y EC50 Superox.	A704 EC50 NO
LD50 Ratoñ	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc.	LOEC oxil SH-SY5Y	A704 IC50 NR	A704 EC50 8-Oxo Nuc.
LD50 Rata	HepG2 EC50 Superox.	SH-SY5Y EC50 NO	SH-SY5Y EC50 NO	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mt.
SH-SY5Y IC50 YP	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mt.	SH-SY5Y EC50 Superox.	LOEC viab A704	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc.
A704 EC50 8-Oxo Mt.	A704 EC50 Perox.	SH-SY5Y IC50 NR	A704 IC50 YP	HepG2 EC50 8-Oxo Mt.
SH-SY5Y EC50 NO	SH-SY5Y EC50 Perox.	HepG2 IC50 NR	SH-SY5Y IC50 YP	A704 EC50 8-Oxo Mt.

Tabla 33: Valores de AUC de los ensayos citómicos y los de referencia determinados por análisis de las curvas ROC para las clases de toxicidad GHS adaptadas a la LC50 de humano con n=37. Los ensayos están colocados en orden decreciente de su valor de probabilidad de clasificación. En rojo se representa el ensayo de referencia LD50 de rata, en rosa los ensayos con AUC igual a la LD50 de rata, en verde los ensayos que mejoran la capacidad de clasificación de LD50 de rata y en blanco los ensayos que la empeoran.

Clase I 0.5mg	Clase II 5-50mg	Clase III 50-300mg	Clase IV 300-2000mg	Clase V >2000mg
LOEC total HepG2 0.668	A704 EC50 Superox. 0.853	SH-SY5Y IC50 YP 0.670	LOEC total HepG2 0.664	LOEC total HepG2 0.891
LOEC oxil HepG2 0.668	LOEC NO 0.838	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc. 0.625	HepG2 EC50 Perox. 0.648	LOEC oxil HepG2 0.875
LOEC Superox. 0.647	LOEC total A704 0.806	LD50 Rata 0.595	LOEC Perox. 0.648	HepG2 EC50 Perox. 0.844
LOEC total 0.632	LOEC oxil A704 0.806	A704 IC50 YP 0.591	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mt. 0.643	LOEC NO 0.844
LOEC oxil 0.632	LOEC Superox. 0.753	A704 IC50 NR 0.573	LOEC 8-Oxo Mt. 0.626	LOEC total SH-SY5Y 0.838
LOEC 8-Oxo Nuc. 0.628	LOEC total 0.708	LOEC viab A704 0.573	LOEC 8-Oxo Nuc. 0.610	LOEC oxil SH-SY5Y 0.838
A704 EC50 Superox. 0.625	LOEC oxil 0.706	LOEC YP 0.573	LD50 Rata 0.596	LOEC Perox. 0.822
HepG2 EC50 Perox. 0.605	A704 IC50 YP 0.684	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mt. 0.563	LOEC oxil HepG2 0.593	SH-SY5Y EC50 Superox. 0.813
LOEC 8-Oxo Mt. 0.605	A704 EC50 NO 0.684	A704 EC50 Superox. 0.556	HepG2 IC50 YP 0.576	LOEC viab 0.813
LOEC total A704 0.585	A704 IC50 NR 0.669	A704 EC50 8-Oxo Nuc. 0.556	LOEC viab 0.576	LD50 Rata 0.806
LOEC oxil A704 0.585	LOEC viab 0.653	LOEC viab 0.556	LOEC total A704 0.576	LOEC NRU 0.797
SH-SY5Y IC50 NR 0.583	LOEC viab A704 0.653	LOEC 8-Oxo Nuc. 0.556	LOEC NRU 0.576	LOEC YP 0.797
SH-SY5Y EC50 Superox. 0.583	LOEC NRU 0.653	A704 EC50 NO 0.545	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc. 0.571	LOEC viab SH-SY5Y 0.781
HepG2 EC50 NO 0.583	SH-SY5Y IC50 NR 0.638	LOEC viab SH-SY5Y 0.545	A704 EC50 Perox. 0.560	HepG2 IC50 NR 0.766
LOEC viab SH-SY5Y 0.583	HepG2 EC50 Perox. 0.638	LOEC 8-Oxo Mt. 0.545	LOEC oxil A704 0.560	HepG2 EC50 NO 0.766
SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc. 0.565	LOEC total SH-SY5Y 0.638	LOEC oxil A704 0.539	LOEC viab HepG2 0.560	LOEC viab HepG2 0.766
LOEC Perox. 0.565	LOEC viab SH-SY5Y 0.638	LOEC total A704 0.522	LOEC YP 0.560	A704 EC50 Perox. 0.750
A704 EC50 8-Oxo Nuc. 0.563	LOEC YP 0.638	A704 EC50 Perox. 0.511	A704 EC50 8-Oxo Nuc. 0.555	SH-SY5Y IC50 NR 0.750
SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mt. 0.563	LOEC total HepG2 0.622	SH-SY5Y EC50 Perox. 0.511	HepG2 EC50 Superox. 0.555	HepG2 IC50 YP 0.750
HepG2 EC50 Superox. 0.563	LOEC oxil HepG2 0.622	HepG2 IC50 YP 0.511	HepG2 IC50 NR 0.543	SH-SY5Y IC50 YP 0.734
LOEC viab 0.563	A704 EC50 8-Oxo Mt. 0.600	LOEC total 0.511	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc. 0.521	HepG2 EC50 Superox. 0.719
LOEC NRU 0.563	LOEC 8-Oxo Mt. 0.584	LOEC oxil 0.511	LOEC total 0.521	A704 IC50 YP 0.703
LOEC NO 0.543	LOEC Perox. 0.575	LOEC viab HepG2 0.511	LOEC oxil 0.521	LOEC viab A704 0.703
A704 IC50 NR 0.542	A704 EC50 8-Oxo Nuc. 0.569	LOEC Superox. 0.504	SH-SY5Y EC50 Perox. 0.505	A704 IC50 NR 0.688
A704 IC50 YP 0.542	HepG2 EC50 NO 0.569	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc. 0.500	HepG2 EC50 NO 0.505	LOEC 8-Oxo Mt. 0.672
A704 EC50 NO 0.542	LD50 Rata 0.553	HepG2 EC50 8-Oxo Mt. 0.500	LOEC total SH-SY5Y 0.505	LOEC Superox. 0.659
HepG2 IC50 YP 0.542	A704 EC50 Perox. 0.553	HepG2 EC50 Perox. 0.494	LOEC oxil SH-SY5Y 0.505	LOEC 8-Oxo Nuc. 0.659
HepG2 EC50 8-Oxo Nuc. 0.542	SH-SY5Y EC50 Superox. 0.553	HepG2 EC50 Superox. 0.494	LOEC Superox. 0.505	SH-SY5Y EC50 NO 0.656
HepG2 EC50 8-Oxo Mt. 0.542	SH-SY5Y IC50 NO 0.553	LOEC total HepG2 0.494	LOEC NO 0.505	LOEC total 0.656
LOEC viab A704 0.542	HepG2 IC50 NR 0.553	LOEC oxil HepG2 0.494	A704 EC50 8-Oxo Mt. 0.500	LOEC oxil 0.653
LOEC YP 0.542	HepG2 EC50 Superox. 0.553	LOEC NRU 0.494	HepG2 EC50 8-Oxo Mt. 0.483	A704 EC50 Superox. 0.628
LOEC total SH-SY5Y 0.527	LOEC viab HepG2 0.553	LOEC Perox. 0.494	A704 EC50 Superox. 0.471	A704 EC50 NO 0.625
LOEC oxil SH-SY5Y 0.527	SH-SY5Y IC50 YP 0.538	LOEC NO 0.494	SH-SY5Y IC50 NR 0.471	SH-SY5Y EC50 Perox. 0.619
HepG2 IC50 NR 0.522	HepG2 IC50 YP 0.538	A704 EC50 8-Oxo Mt. 0.483	A704 IC50 NR 0.467	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mt. 0.609
LOEC viab HepG2 0.522	LOEC oxil SH-SY5Y 0.538	SH-SY5Y IC50 NR 0.483	A704 EC50 NO 0.467	LOEC total A704 0.606
LD50 Rata 0.500	LOEC 8-Oxo Nuc. 0.522	SH-SY5Y EC50 NO 0.466	SH-SY5Y EC50 NO 0.467	LOEC oxil A704 0.606
A704 EC50 8-Oxo Mt. 0.500	HepG2 EC50 8-Oxo Mt. 0.500	SH-SY5Y EC50 Superox. 0.459	LOEC viab A704 0.467	A704 EC50 8-Oxo Nuc. 0.603
SH-SY5Y IC50 YP 0.500	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mt. 0.484	HepG2 EC50 NO 0.459	LOEC viab SH-SY5Y 0.455	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc. 0.603
A704 EC50 Perox. 0.480	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc. 0.469	LOEC total SH-SY5Y 0.459	A704 IC50 YP 0.417	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc. 0.578
SH-SY5Y EC50 Perox. 0.480	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc. 0.453	HepG2 IC50 NR 0.448	SH-SY5Y IC50 YP 0.400	A704 EC50 8-Oxo Mt. 0.531
SH-SY5Y EC50 NO 0.460	SH-SY5Y EC50 Perox. 0.422	LOEC oxil SH-SY5Y 0.442	SH-SY5Y EC50 Superox. 0.383	HepG2 EC50 8-Oxo Mt. 0.531

Tabla 34: Valores de AUC de los ensayos citómicos y los de referencia determinados por análisis de las curvas ROC para las clases de toxicidad de GHS adaptadas a la LC50 de humano con n=30. Los ensayos están colocados en orden decreciente de su valor de probabilidad de clasificación. En rojo se representa el ensayo de referencia LD50 de ratón, en rosa los ensayos con AUC igual a la LD50 de ratón, en verde los ensayos que mejoran la capacidad de clasificación de LD50 de ratón y en blanco los ensayos que la empeoran.

Clase I 0-5mg	Clase II 5-50mg	Clase III 50-300mg	Clase IV 300-2000mg	Clase V >2000mg
LOEC total 0,690	LOEC NO 0,854	LD50 Ratón 0,740	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mt. 0,643	LOEC total HepG2 0,942
LOEC oxil 0,690	LOEC total A704 0,771	A704 EC50 NO 0,625	LD50 Ratón 0,634	LOEC oxil HepG2 0,904
LOEC 8-Oxo Nuc. 0,683	LOEC oxil A704 0,771	SH-SY5Y EC50 Perox. 0,587	HepG2 EC50 Perox. 0,627	HepG2 EC50 Perox. 0,846
LOEC total A704 0,675	A704 EC50 Superox. 0,750	A704 IC50 YP 0,567	LOEC total HepG2 0,627	LOEC NO 0,846
LOEC oxil A704 0,675	LOEC Superox. 0,750	SH-SY5Y IC50 YP 0,567	LOEC Perox. 0,627	SH-SY5Y EC50 Superox. 0,827
LOEC total HepG2 0,675	HepG2 EC50 Perox. 0,708	LOEC NO 0,567	LOEC 8-Oxo Nuc. 0,621	LOEC viab 0,827
LOEC oxil HepG2 0,675	LOEC viab 0,688	LOEC total A704 0,548	LOEC 8-Oxo Mt. 0,621	LOEC NRU 0,827
A704 EC50 8-Oxo Nuc. 0,643	LOEC oxil HepG2 0,688	LOEC oxil A704 0,548	A704 EC50 Perox. 0,578	LD50 Ratón 0,817
A704 EC50 Superox. 0,611	LOEC NRU 0,688	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mt. 0,500	HepG2 IC50 YP 0,578	LOEC Perox. 0,817
HepG2 EC50 8-Oxo Mt. 0,611	LOEC total 0,667	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc. 0,500	LOEC total A704 0,578	LOEC YP 0,808
LOEC 8-Oxo Mt. 0,611	LOEC oxil 0,667	HepG2 EC50 8-Oxo Mt. 0,500	LOEC oxil A704 0,578	LOEC total SH-SY5Y 0,798
LOEC Perox. 0,595	LOEC total HepG2 0,667	A704 EC50 8-Oxo Mt. 0,481	A704 EC50 8-Oxo Nuc. 0,571	LOEC oxil SH-SY5Y 0,798
HepG2 EC50 Perox. 0,587	A704 EC50 NO 0,646	A704 IC50 NR 0,462	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc. 0,571	A704 EC50 Perox. 0,788
LOEC Superox. 0,587	A704 IC50 YP 0,625	SH-SY5Y IC50 NR 0,462	HepG2 IC50 NR 0,556	HepG2 IC50 NR 0,788
SH-SY5Y IC50 NR 0,556	HepG2 EC50 NO 0,625	SH-SY5Y EC50 NO 0,462	LOEC viab HepG2 0,556	LOEC viab HepG2 0,788
SH-SY5Y EC50 Superox. 0,556	LOEC total SH-SY5Y 0,625	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc. 0,462	LOEC oxil HepG2 0,556	HepG2 IC50 YP 0,769
HepG2 EC50 NO 0,556	LOEC Perox. 0,625	HepG2 IC50 NR 0,462	LOEC YP 0,556	HepG2 EC50 NO 0,769
HepG2 EC50 8-Oxo Nuc. 0,556	A704 IC50 NR 0,604	LOEC viab 0,462	LOEC viab 0,534	LOEC viab SH-SY5Y 0,769
LOEC viab SH-SY5Y 0,556	SH-SY5Y IC50 NR 0,604	LOEC viab A704 0,462	LOEC NRU 0,534	SH-SY5Y IC50 NR 0,750
LOEC NO 0,556	LOEC viab SH-SY5Y 0,604	LOEC viab SH-SY5Y 0,462	SH-SY5Y EC50 Perox. 0,528	HepG2 EC50 Superox. 0,750
A704 EC50 Perox. 0,532	A704 EC50 8-Oxo Mt. 0,583	LOEC viab HepG2 0,462	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc. 0,528	LOEC 8-Oxo Nuc. 0,740
HepG2 EC50 Superox. 0,532	SH-SY5Y EC50 Superox. 0,583	LOEC NRU 0,462	HepG2 EC50 Superox. 0,528	SH-SY5Y IC50 YP 0,731
LOEC viab 0,532	HepG2 IC50 NR 0,583	LOEC Perox. 0,462	LOEC total 0,528	A704 IC50 YP 0,712
LOEC NRU 0,532	LOEC viab A704 0,583	A704 EC50 Perox. 0,442	LOEC oxil 0,528	A704 EC50 8-Oxo Nuc. 0,712
LOEC total SH-SY5Y 0,516	LOEC viab HepG2 0,583	HepG2 IC50 YP 0,442	HepG2 EC50 NO 0,506	LOEC viab A704 0,712
LOEC oxil SH-SY5Y 0,516	A704 EC50 8-Oxo Nuc. 0,563	HepG2 EC50 Perox. 0,442	LOEC total SH-SY5Y 0,506	LOEC total 0,692
LD50 Ratón 0,500	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc. 0,563	LOEC total 0,442	LOEC oxil SH-SY5Y 0,506	LOEC oxil 0,692
A704 IC50 NR 0,500	LOEC YP 0,563	LOEC oxil 0,442	A704 EC50 8-Oxo Mt. 0,500	A704 IC50 NR 0,673
A704 IC50 YP 0,500	LOEC 8-Oxo Mt. 0,563	LOEC YP 0,442	A704 EC50 Superox. 0,484	LOEC total A704 0,654
A704 EC50 NO 0,500	LD50 Ratón 0,542	A704 EC50 Superox. 0,423	SH-SY5Y IC50 NR 0,484	LOEC oxil A704 0,654
A704 EC50 8-Oxo Mt. 0,500	LOEC oxil SH-SY5Y 0,542	A704 EC50 8-Oxo Nuc. 0,423	LOEC Superox. 0,484	LOEC 8-Oxo Mt. 0,654
SH-SY5Y IC50 YP 0,500	SH-SY5Y EC50 NO 0,542	SH-SY5Y EC50 Superox. 0,423	LOEC NO 0,484	SH-SY5Y EC50 NO 0,635
SH-SY5Y EC50 NO 0,500	SH-SY5Y IC50 YP 0,521	HepG2 EC50 Superox. 0,423	A704 EC50 NO 0,478	LOEC Superox. 0,615
SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mt. 0,500	HepG2 EC50 Superox. 0,521	LOEC total SH-SY5Y 0,423	HepG2 EC50 8-Oxo Mt. 0,478	A704 EC50 NO 0,596
HepG2 IC50 YP 0,500	LOEC 8-Oxo Nuc. 0,521	LOEC total HepG2 0,423	LOEC viab SH-SY5Y 0,463	SH-SY5Y EC50 Perox. 0,587
LOEC viab A704 0,500	A704 EC50 Perox. 0,500	LOEC oxil HepG2 0,423	A704 IC50 NR 0,457	A704 EC50 Superox. 0,577
LOEC oxil 0,500	HepG2 EC50 8-Oxo Mt. 0,500	LOEC 8-Oxo Nuc. 0,423	SH-SY5Y EC50 NO 0,457	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mt. 0,577
SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc. 0,484	HepG2 IC50 YP 0,479	HepG2 EC50 NO 0,404	A704 IC50 YP 0,435	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc. 0,577
SH-SY5Y EC50 Perox. 0,476	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Mt. 0,458	LOEC oxil SH-SY5Y 0,404	LOEC viab A704 0,435	SH-SY5Y EC50 8-Oxo Nuc. 0,567
HepG2 IC50 NR 0,476	HepG2 EC50 8-Oxo Nuc. 0,458	LOEC Superox. 0,404	SH-SY5Y IC50 YP 0,413	A704 EC50 8-Oxo Mt. 0,538
LOEC viab HepG2 0,476	SH-SY5Y EC50 Perox. 0,396	LOEC 8-Oxo Mt. 0,481	SH-SY5Y EC50 Superox. 0,370	HepG2 EC50 8-Oxo Mt. 0,538

2.7 La bio-transformación y su implicación en la determinación de la toxicidad *in vitro*

2.7.1 HepaRG como modelo *In Vitro* para la toxicidad dependiente del metabolismo

Uno de los problemas que presentan las líneas celulares como método para predecir la toxicidad es su pérdida de la capacidad de metabolización de los compuestos. Aunque la línea celular HepG2 presentó unas buenas correlaciones con la LD50 de humano y clasificación según el criterio GHS de toxicidad oral adaptada a humano, se ha observado que, para diversos compuestos no se ha podido obtener valores de IC50/EC50. Por tanto, se procedió a la realización de los mismos ensayos en la línea celular HepaRG que conserva su capacidad metabólica cuando es cultivada en condiciones de diferenciación (descritas en material y métodos). Debido a las condiciones necesarias para la diferenciación de esta línea celular de tipo fibroblasto a tipo hepatocito, no se realizaron los ensayos de determinación del daño oxidativo al DNA nuclear y mitocondrial (por la compleja estructura de estas líneas celulares, el uso de técnicas de análisis de imagen presenta dificultades debidas a la interferencia de la fluorescencia sobrepuesta proveniente de células que crecen de forma vertical (Walker *et al.*, 2011).

Los valores obtenidos para los sesenta compuestos estudiados en las dos líneas celulares están representados en la Tabla 35.

Para determinar cuál de las dos predice mejor la toxicidad humana, se realizaron correlaciones para los cinco ensayos de toxicidad celular en las que se representaron los valores de IC50/EC50 de ambas líneas celulares comparadas con la LD50 de humano (Figura 31). Se verificó que el R² de HepaRG mejora en todos los ensayos a HepG2 a excepción del ensayo de determinación de los niveles

intracelulares de óxido nítrico ($R^2 = 0,213$) y a la vez, que el número de compuestos con efecto disminuyó.

Usando los ensayos citómicos para determinar la capacidad predictiva de compuestos que causan toxicidad relacionada con el metabolismo se verificó que no hay una mejoría significativa de la sensibilidad en las células HepaRG. De hecho las células HepaRG tienden a presentar menor sensibilidad en la mayoría de los compuestos cuando son comparadas con HepG2.

Un factor importante a la hora de la determinación de la toxicidad de un compuesto descrito en Gülden et al. (2002), es la concentración celular. Para obtener HepaRG con fenotipo y funciones de hepatocitos es necesario que sean cultivadas hasta obtener el 100% de confluencia para después añadir DMSO durante 2 a 3 semanas hasta que se diferencien. Esta necesidad conlleva a que el número de este tipo celular sea muy superior al de HepG2 en los estudios realizados. Gülden et al. (2002) pudo determinar que los valores de EC50 de los compuestos testados pudieron suponer un aumento de hasta 20 veces de un mismo compuesto testado a una densidad celular 100 veces superior. Estos datos pueden indicar que esa sea la causa por la cual no conseguimos mejorar la predicción de la toxicidad de HepG2 utilizando las HepaRG.

Walker et al. (2011) también concluyeron que para la mayoría de los compuestos testados la línea celular HepaRG es menos sensible que HepG2. Esto resulta sorprendente debido a la existencia de capacidad metabólica por parte de HepaRG y su inexistencia en HepG2.

Dado que nuestro estudio incluía tóxicos que se bioinactivan, se dividieron los compuestos en dos subgrupos:

- Compuestos que una vez metabolizados presentan una mayor toxicidad (Figura 32, puntos en rojo).
- Compuestos que no son metabolizados o que lo son, transformándose en compuestos que causan menor toxicidad (Figura 32, puntos en azul).

Comparando los valores de IC50 y EC50 obtenidos en las dos líneas celulares y separando los compuestos en los dos subgrupos en función de su capacidad de inducir mayor o menor toxicidad no se verifica una clara distinción de los compuestos que metabolizados son más tóxicos de los contrarios en HepaRG comparado con HepG2 (Figura 32).

Sería de esperar, que los compuestos representados en rojo se localizaran en la parte inferior de las gráficas, indicando así, que la línea celular dotada de capacidad metabólica sería capaz de detectar el efecto nocivo de esos compuestos a concentraciones inferiores a las necesarias en HepG2, y los compuestos en azul, por el contrario, deberían presentarse en la zona superior izquierda de las gráficas. Eso no ocurre con excepción de algún caso aislado (ocratoxina A en el ensayo del yoduro de propidio), habiendo una correlación muy elevada entre ambas líneas celulares en los dos tipos de compuestos, estando prácticamente todos ellos dentro del rango de perfecta correlación entre ambos.

Observando la Tabla 36 que resume los resultados de las correlaciones de la Figura 32, verificamos que los compuestos que son metabolizados a productos más tóxicos tienen una correlación perfecta entre las dos líneas celulares superando en la mayoría de los ensayos al 0,9 de coeficiente de determinación. Esto indica que no podemos demostrar de forma concluyente una relación de toxicidad metabólica en HepaRG al igual que tampoco Walker et al. (2011) pudieron hacerlo.

A posteriori, se realizó la matriz de datos comparando las dos líneas celulares según las clases GHS adaptadas a LC50 de humano (Figura 33). Una vez más se comprueba que no hay grandes diferencias entre ambas líneas celulares y que incluso es en HepG2 ($LOEC_{total}$) donde más compuestos coinciden correctamente en las clases de humano (Tabla 37) incluyendo a compuestos con elevada toxicidad una vez metabolizados.

La mayoría de los estudios publicados referentes a esta línea celular (Gerets et al., 2012; Guillouzo et al., 2007; Jennen et al., 2010; Kanebratt & Andersson,

2008; Turpeinen et al., 2009) se refieren a la capacidad metabólica y expresión de enzimas responsables para esta función. No es de nuestro conocimiento que se haya publicado estudios comparativos de la toxicidad de una amplia batería de compuestos entre HepaRG y HepG2 u otra línea celular usada comunmente en estudios de toxicología, o con hepatocitos humanos. Como tal no podemos compararlo con otros estudios salvo el estudio limitado de Walker *et al.* (2011)

Walker *et al.* (2011) a pesar de comprobar la elevada actividad de los citocromos P450 en las HepaRG comparada con HepG2, no ha podido demostrar una toxicidad relacionada con el metabolismo en las HepaRG. También sugieren que ello se puede deber a la mayor expresión de proteínas transportadoras en esta línea celular (MDR1, MDR3, MRP1, MRP2, MRP3 y BCRP que se expresan a niveles iguales o superiores que en los hepatocitos humanos) y menor expresión de transportadores de captación (OATP2B1, OATP1B1, OATP1B3, SLC22A7, SLC22A1, SLC10A1 y SLC15A1), que se expresan a niveles inferiores que en hepatocitos humanos primarios como presentan Kanebratt & Andersson (2008)

También argumentan que las HepaRG expresan el doble de la enzima metabólica de fase II glutatión S-transferasa α 1 (GST α 1) que los hepatocitos humanos y diez veces más que en HepG2 (Kanebratt & Andersson, 2008). Por ello se plantean que estas células poseen una fuerte defensa celular contra el daño causado por tóxicos y que pueden incluso llegar a ser más resistentes a los metabolitos tóxicos (Walker *et al.*, 2011).

Mueller *et al.* (2014), compararon la toxicidad causada por cuatro compuestos en dos modelos de cultivo de HepG2 y HepaRG (cultivados en dos y tres dimensiones) y verificaron que los compuestos amiodarona y ácido valproico en los modelos de cultivo en 2D presentaban mayor toxicidad en las HepG2 que en HepaRG, al igual que nuestro panel citómico. Cuando fue determinada la toxicidad en los modelos en 3D, verificaron que necesitan menores dosis de compuestos que

en HepG2. En el caso del ácido valproico comprobaron que el valor de EC50 en el modelo 3D era inferior al valor de EC50 en la misma línea celular cuando se cultivó en 2D. Lo mismo ocurrió con el compuesto aflatoxina B1 que no ha sido estudiado en el panel citómico. Estos estudios indican que el uso de cultivos esféricos en 3D proporcionan una mejora en la funcionalidad a largo plazo en las HepaRG (Mueller et al., 2014) al igual que en HepG2 (Mueller et al., 2011).

Tabla 35: Valores de EC50/IC50 en Molar obtenidos para los 60 compuestos en HepG2 y HepaRG (negrita). Cuando no se ha podido determinar la IC50/EC50 se ha representado la concentración máxima probada sin efecto precedida del símbolo (>). N Acubase es el número de referencia de los compuestos en el proyecto Acute-Tox; NRU – Ensayo de captación del Rojo Neutro; YP – ensayo de exclusión del yoduro de propidio; Perox. – ensayo de determinación de la actividad peroxidativa; Superox. – niveles intracelulares del anión superóxido; NO – niveles intracelulares de óxido nítrico.

Tabla 35.

Número Acutoxbase	Compuestos	HepG2 LOG EC50/IC50 RMFI (M)					HepaRG LOG EC50/IC50 RMFI (M)				
		Panel Viabilidad		Panel Oxidativo			Panel Viabilidad		Panel Oxidativo		
		NRU	YP	Perox	Superox	NO	NRU	YP	Perox	Superox	NO
1	Acetaminofeno	2,17E-02	1,95E-02	1,13E-02	3,09E-02	>4,63E-02	2,44E-02	3,90E-02	8,67E-03	>4,63E-02	>4,63E-02
2	Ácido acetilsalicílico	1,21E-02	1,89E-02	5,53E-03	>2,00E-02	>2,00E-02	1,14E-02	1,61E-02	1,84E-03	1,68E-02	2,64E-04
3	Atropina monohidrato sulfato	2,45E-03	1,70E-03	8,31E-05	1,33E-03	1,33E-03	4,43E-03	4,43E-03	7,31E-05	2,56E-04	>1,00E-02
4	Caféina	1,13E-02	2,76E-02	9,41E-03	1,34E-02	>4,00E-02	1,20E-02	>4,00E-02	1,17E-02	7,59E-04	>4,00E-02
5	Carbamazepina	>1,00E-03	>1,00E-03	2,29E-04	9,85E-04	8,76E-04	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03
6	Colchicina	3,96E-03	4,69E-03	5,14E-03	9,47E-04	>1,00E-02	>1,00E-02	>1,00E-02	2,49E-05	>1,00E-02	>1,00E-02
7	Cicloheximida	9,14E-05	>1,00E-02	1,83E-07	>1,00E-02	>1,00E-02	1,02E-04	7,22E-04	4,34E-04	5,86E-04	>1,00E-02
8	Diazepam	1,76E-05	1,93E-04	4,73E-05	2,00E-04	4,65E-05	1,84E-04	2,21E-04	>6,00E-04	1,09E-04	1,15E-04
9	Digoxina	9,14E-07	2,57E-07	>1,28E-04	3,98E-08	>1,28E-04	1,57E-06	6,35E-06	4,35E-06	3,57E-06	2,88E-06
10	Isopropanol	1,79E-01	1,76E-01	1,15E-01	>8,32E-01	1,79E-01	4,93E-01	2,62E-01	1,16E-01	8,83E-02	>8,32E-01
11	Malatión	4,87E-04	8,50E-04	1,32E-04	5,95E-04	2,39E-04	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03
12	Mercurio (II) cloruro	6,13E-05	5,94E-05	2,73E-05	1,65E-05	4,59E-05	1,57E-04	1,44E-04	5,39E-06	>3,68E-04	>3,68E-04
13	Pentaclorofenol	5,05E-05	8,63E-05	>3,00E-04	1,06E-04	1,18E-04	2,97E-04	2,12E-04	2,23E-04	2,40E-04	1,09E-04
14	Fenobarbital	>5,00E-03	>5,00E-03	3,30E-03	>5,00E-03	3,72E-03	>5,00E-03	>5,00E-03	>5,00E-03	>5,00E-03	>5,00E-03
15	Dodecilsulfato sódico (SDS)	1,86E-04	2,18E-04	1,03E-04	1,92E-04	1,41E-04	1,23E-04	5,78E-04	6,37E-05	>6,93E-04	>6,93E-04
16	Ácido valproico	1,16E-02	9,07E-03	>2,30E-02	>2,30E-02	>2,30E-02	>2,30E-02	>2,30E-02	1,25E-03	>2,30E-02	>2,30E-02
17	5-Fluorouracilo	>2,00E-02	>2,00E-02	>2,00E-02	>2,00E-02	>2,00E-02	>2,00E-02	>2,00E-02	>2,00E-02	>2,00E-02	>2,00E-02
18	Benceno	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02	>5,00E-02
19	tert-butil Hidroperóxido	1,83E-04	1,71E-04	>2,33E-04	>2,33E-04	>2,33E-04	9,58E-04	8,07E-04	>1,00E-03	4,64E-04	>1,00E-03
21	Cadmio cloruro	8,18E-06	7,78E-06	6,80E-06	>1,00E-05	7,61E-06	2,29E-06	5,78E-06	1,98E-06	1,98E-06	1,43E-07
23	Pireno	>6,00E-05	>6,00E-05	>6,00E-05	>6,00E-05	>6,00E-05	>6,00E-05	>6,00E-05	>6,00E-05	1,79E-05	>6,00E-05
26	Hexaclorobenceno	>7,50E-05	>7,50E-05	>7,50E-05	>7,50E-05	>7,50E-05	>7,50E-05	>7,50E-05	>7,50E-05	>7,50E-05	>7,50E-05
28	Amiodarona clorhidrato	2,03E-05	3,06E-05	3,63E-05	>1,00E-04	3,65E-04	>1,00E-04	>1,00E-04	>1,00E-04	>1,00E-04	3,05E-06
29	Verapamilo clorhidrato	7,61E-05	1,03E-04	8,00E-05	>2,50E-04	>2,50E-04	1,63E-04	2,06E-04	1,06E-05	3,75E-04	2,65E-04
30	Rifampicina	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04
31	Tetraciclina clorhidrato	>2,50E-04	>2,50E-04	2,01E-05	>2,50E-04	1,82E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	>2,50E-04	8,60E-05
32	Orfenadrina clorhidrato	2,49E-04	3,15E-04	1,40E-04	2,30E-04	1,87E-04	1,70E-04	4,10E-04	>5,00E-04	1,44E-04	>5,00E-04
33	Nicotina	5,01E-03	4,87E-03	2,87E-03	1,15E-03	>1,00E-02	1,24E-02	1,61E-02	3,66E-04	7,90E-03	3,77E-03
34	Lindano	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04	>1,29E-04
37	Etanol	1,64E+00	1,55E+00	7,16E-01	>2,17E+00	5,09E-01	>2,17E+00	5,99E-01	>2,17E+00	1,62E+00	>2,17E+00

Tabla 35 (Continuación).

Número Acutoxbase	Compuestos	HepG2 LOG EC50/IC50 RMFI (M)					HepaRG LOG EC50/IC50 RMFI (M)				
		Panel Viabilidad		Panel Oxidativo			Panel Viabilidad		Panel Oxidativo		
		NRU	YP	Perox	Superox	NO	NRU	YP	Perox	Superox	NO
38	Paratión	>1,00E-03	>1,00E-03	1,18E-05	>1,00E-03	1,81E-04	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03
39	Diclorvos	6,31E-04	8,35E-04	3,47E-04	1,46E-04	6,39E-04	4,47E-04	8,67E-04	5,20E-04	7,68E-04	1,89E-04
40	Fisostigmina	6,01E-03	6,29E-03	2,30E-03	4,08E-03	3,41E-03	1,10E-03	2,14E-03	8,87E-04	1,22E-03	9,95E-04
41	Amonio glufosinato	>8,00E-02	>8,00E-02	>8,00E-02	>8,00E-02	>8,00E-02	>8,00E-02	>8,00E-02	>8,00E-02	>8,00E-02	1,34E-03
42	cis-Diaminoplatina (II) dicloruro	2,09E-04	1,57E-04	2,62E-05	2,11E-04	>3,50E-04	>3,50E-04	>3,50E-04	>3,50E-04	>3,50E-04	>3,50E-04
43	Dietilenglicol	2,27E-01	2,74E-01	2,30E-01	1,54E-01	1,21E-01	3,90E-01	3,65E-01	1,68E-01	1,93E-01	3,15E-01
44	Diquat dibromuro	9,56E-04	4,93E-04	7,62E-05	7,60E-04	2,12E-04	4,84E-04	1,50E-03	7,01E-04	>5,00E-03	9,47E-04
45	Ocratoxina A	7,08E-06	4,93E-06	1,89E-07	>1,00E-04	>1,00E-04	>1,00E-04	>1,00E-04	1,57E-06	>1,00E-04	>1,00E-04
46	Ciclosporina A	1,49E-05	>1,70E-05	>1,70E-05	1,31E-05	>1,70E-05	>1,70E-05	>1,70E-05	6,74E-06	>1,70E-05	>1,70E-05
47	17 α -Ethinilestradiol	6,59E-05	9,75E-05	4,34E-05	>1,49E-04	>1,49E-04	1,54E-04	2,73E-04	6,28E-05	2,28E-04	4,11E-06
48	Sodio fluoruro	>2,50E-03	>2,50E-03	>2,50E-03	>2,50E-03	1,39E-03	>2,50E-03	>2,50E-03	>2,50E-03	>2,50E-03	>2,50E-03
49	Paraquat dicloruro	3,15E-04	3,93E-04	1,47E-04	2,19E-04	2,23E-04	5,50E-04	3,13E-03	1,47E-03	1,18E-03	8,21E-04
51	Dimetilformamida	2,62E-01	4,07E-01	3,65E-01	>5,00E-01	>5,00E-01	>4,00E-01	2,99E-01	>4,00E-01	>4,00E-01	>4,00E-01
52	Hierro (II) sulfato	7,26E-03	1,00E-02	3,29E-03	>1,44E-02	8,76E-03	>1,80E-02	>1,80E-02	8,19E-05	>1,80E-02	>1,80E-02
53	Amitriptilina clorhidrato	4,86E-05	6,05E-05	2,87E-05	1,16E-05	6,17E-05	>1,00E-04	2,42E-05	7,01E-06	3,48E-05	1,33E-06
54	Etilenglicol	1,01E+00	1,47E+00	9,79E-01	1,25E+00	>3,00E+00	>3,00E+00	9,24E-01	1,79E-01	4,61E-01	>3,00E+00
55	Metanol	1,30E+00	1,20E+00	>1,86E+00	>1,86E+00	>1,86E+00	1,89E+00	6,90E-01	>4,00E+00	9,00E-02	>4,00E+00
57	Sodio cloruro	>8,56E-02	>8,56E-02	5,97E-02	>8,56E-02	>8,56E-02	>8,56E-02	>8,56E-02	>8,56E-02	>8,56E-02	>8,56E-02
60	Litio sulfato	4,82E-02	7,45E-02	1,28E-02	4,95E-02	6,47E-03	7,58E-02	>9,00E-02	>9,00E-02	>9,00E-02	>9,00E-02
63	Propranolol clorhidrato	7,97E-05	7,87E-05	>1,00E-04	>1,00E-04	>1,00E-04	6,01E-05	2,70E-04	8,66E-05	>1,00E-04	>1,00E-04
64	Arsénico trióxido	8,86E-05	1,12E-04	1,39E-06	3,94E-05	6,15E-06	3,05E-05	6,71E-05	>1,26E-04	>1,26E-04	1,55E-06
66	Talio sulfato	1,01E-03	1,56E-03	1,70E-04	1,90E-06	>2,00E-03	3,83E-04	>2,00E-03	3,88E-04	4,20E-05	1,77E-04
67	Warfarina	2,02E-03	>2,20E-03	1,29E-04	>2,20E-03	1,69E-03	>2,20E-03	1,69E-03	1,40E-03	6,58E-04	8,32E-04
71	Hexaclorofeno	2,77E-06	1,32E-05	1,35E-06	2,07E-05	>2,46E-06	1,14E-05	1,00E-05	1,13E-05	1,83E-05	1,71E-06
76	Cloral hidrato	1,00E-02	8,78E-03	1,41E-03	>2,00E-02	1,16E-02	6,34E-04	1,49E-03	>2,00E-02	1,02E-03	>2,00E-02
77	2,4-Ácido diclorofenoxiacético	4,29E-03	4,75E-03	6,45E-03	4,55E-03	8,52E-03	9,76E-03	8,86E-03	1,13E-04	>3,00E-02	>3,00E-02
80	Estricina	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	>1,00E-03	5,40E-05	3,90E-05	1,24E-04
91	Sodio selenato	2,85E-04	3,85E-04	9,72E-05	>1,06E-03	>1,06E-03	4,00E-04	3,00E-04	9,90E-04	1,07E-04	9,38E-05
92	Acetonitrilo	1,49E+00	1,52E+00	>2,00E+00	>2,00E+00	>2,00E+00	1,63E+00	1,58E+00	>2,00E+00	3,48E-01	>2,00E+00
96	Epinefrina bitartrato	1,67E-03	4,06E-04	8,37E-04	>5,00E-03	>5,00E-03	>5,00E-03	>5,00E-03	1,94E-03	2,02E-03	>5,00E-03

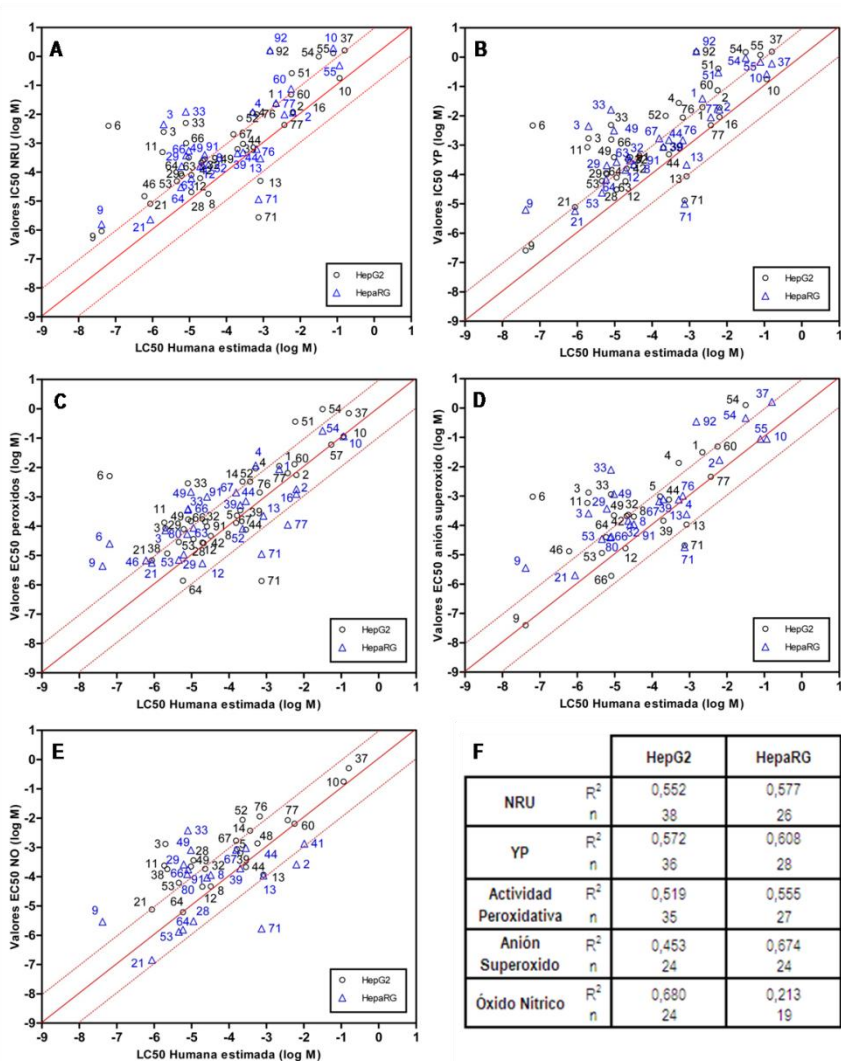


Figura 31: Regresión lineal entre los datos de LC50 humana estimados a partir de la concentración letal y subletal en sangre realizados en el proyecto ACuteTox (Sjorstrom *et al*, 2008) y los valores de IC50/EC50 obtenidos en HepG2 - triángulos azules - y HepaRG - círculos negros para cada ensayo. La línea continua representa la correlación 1:1 y la línea discontinua representa una desviación de una unidad de logaritmo de la línea de correlación 1:1, marcando los límites establecidos para la identificación de los outliers. Los números de las coordenadas son los números de referencia de los compuestos utilizados en el proyecto ACuteTox (Tabla 12). A – ensayo de NRU, (B) ensayo de viabilidad determinada por YP, (C) ensayos de la determinación de la actividad peroxidativa, (D) ensayos de la determinación de la generación mitocondrial de anión superóxido, (E) ensayos de los niveles de NO intracelular, (F) Tabla con los valores de R² obtenidos.

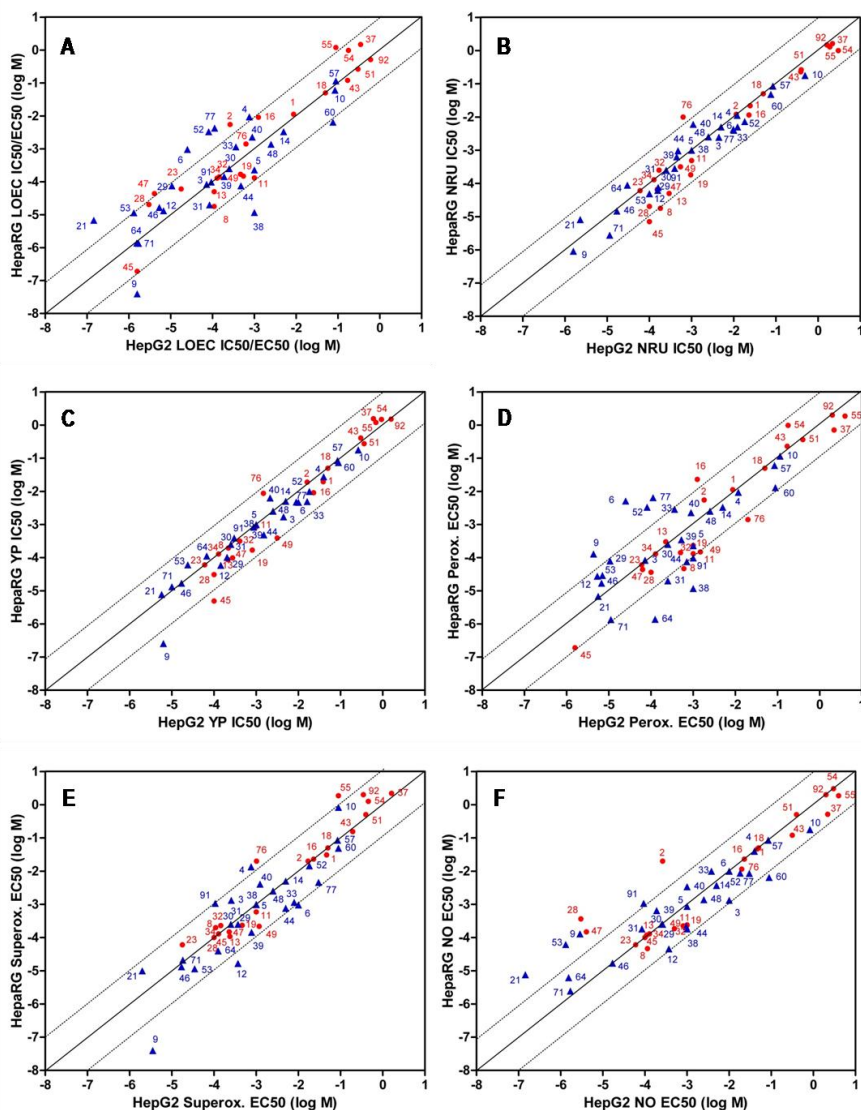


Figura 32: Correlación entre los valores de IC₅₀/EC₅₀ obtenidos en HepG2 y HepaRG. Para los compuestos sin efecto, se ha usado el valor de la máxima concentración probada. Los círculos rojos corresponden a los compuestos cuya metabolización origina compuestos más tóxicos, y los triángulos azules a los compuestos que no sufren metabolización o que se transforman en metabolitos menos tóxicos. La línea continua representa la correlación 1:1 y la línea discontinua representa una desviación de una unidad de logaritmo de la línea de correlación 1:1, marcando el rango de aceptación de perfecta correlación entre ambos. Los números de las coordenadas son los números de referencia de los compuestos utilizados en el proyecto ACuteTox. A – Correlación de los valores LOEC_{total}, B – ensayo de NRU, C –

viabilidad determinada por el ensayo citómico del YP, D – ensayos de la determinación de la actividad peroxidativa, E – ensayo de la determinación de la generación mitocondrial de anión superóxido y F – ensayo de la determinación de los niveles de óxido nítrico intracelular. En los compuestos en los que no se obtuvo una IC50/EC50 se adjudicó el valor de la máxima concentración probada.

Tabla 36: Valores de R² obtenidos en las correlaciones entre HepG2 y HepaRG para los compuestos que metabolizados pasan a presentar mayor toxicidad y los compuestos que no sufren metabolización o que pasan a presentar menor toxicidad cuando han sido metabolizados.

	Metabolizado n = 22	No metabolizado n= 27
NRU	0,933	0,944
YP	0,948	0,932
Actividad Peroxidativa	0,904	0,478
Anión Superóxido	0,920	0,758
Óxido Nítrico	0,843	0,824
LOEC _{total}	0,883	0,659

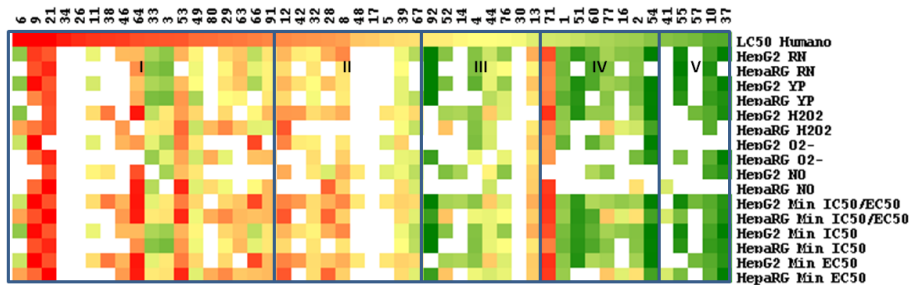


Figura 33: Análisis de la matriz de datos entre los valores de toxicidad (IC50/EC50) del conjunto de ensayos citómicos obtenidos en HepG2 y HepaRG y la toxicidad *in vivo* humana (LC50). Los espacios en blanco en la matriz indican que el tóxico no tiene efecto en el rango de dosis ensayado y no se ha podido obtener un valor de IC50/ EC50.

Tabla 37: Compuestos que se clasifican bien con el valor mínimo total obtenido en los ensayos de NR, YP, actividad peroxidativa, anión superóxido y NO. En rojo se indican los compuestos cuya toxicidad aumenta una vez metabolizados.

Compuestos en común en las clases GHS - LOEC HepG2 y Humano				
Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V
9 Digoxina	8 Diazepam	76 Cloral hidrato	1 Acetaminofeno	10 Isopropanol
21 Cadmio cloruro	28 Amiodarona clorhidrato		2 Ácido Acetilsalicílico	37 Etanol
38 Paratión	32 Orfenadrina clorhidrato		16 Ácido valproico	55 Metanol
53 Amitriptilina clorhidrato	39 Diclorvos		60 Litio sulfato	57 Sodio cloruro
64 Arsénico trióxido	42 cis-Diaminoplatino (II) dic.		77 2,4-Ácido diclorofenoxiac.	
	67 Warfarina			
Compuestos en común en las clases GHS - LOEC HepaRG y Humano				
Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V
9 Digoxina	8 Diazepam	4 Cafeína	1 Acetaminofeno	10 Isopropanol
21 Cadmio cloruro	32 Orfenadrina clorhidrato	44 Diquat dibromuro		37 Etanol
53 Amitriptilina clorhidrato	39 Diclorvos			55 Metanol

2.8 Transportadores MDR y su implicación en la toxicidad in vitro

2.9.1 Identificación de proteínas implicadas en la resistencia a fármacos

Los niveles de expresión de las proteínas ABCB1 (Gp-P), MRP-1 y ABCG2 fueron determinados primero por citometría de flujo en las cuatro líneas celulares comparando los niveles de tinción con los anticuerpos monoclonales (MDR1(UIC2), MRP1(QCRL-2) y ABCG2(5D3), que reconocen un dominio externo de los transportadores ABCB1, ABCC1 y ABCG2 respectivamente. Los niveles de expresión se compararon con los respectivos isotipos para establecer la unión inespecífica. Las células muertas fueron descartadas por sus propiedades de morfología utilizando la dispersión frontal y lateral de la luz. Los resultados del análisis se muestran en la Figura 34.

Comparando la intensidad media de fluorescencia (MFI) se verifica que en las cuatro líneas se puede detectar la presencia del transportador ABCB1 (Gp-P) utilizando este anticuerpo y, por el contrario, no se detecta expresión de MRP1 y

ABCG2 en ninguna de ellas, siendo los niveles de intensidad de fluorescencia del mismo orden del isotipo.

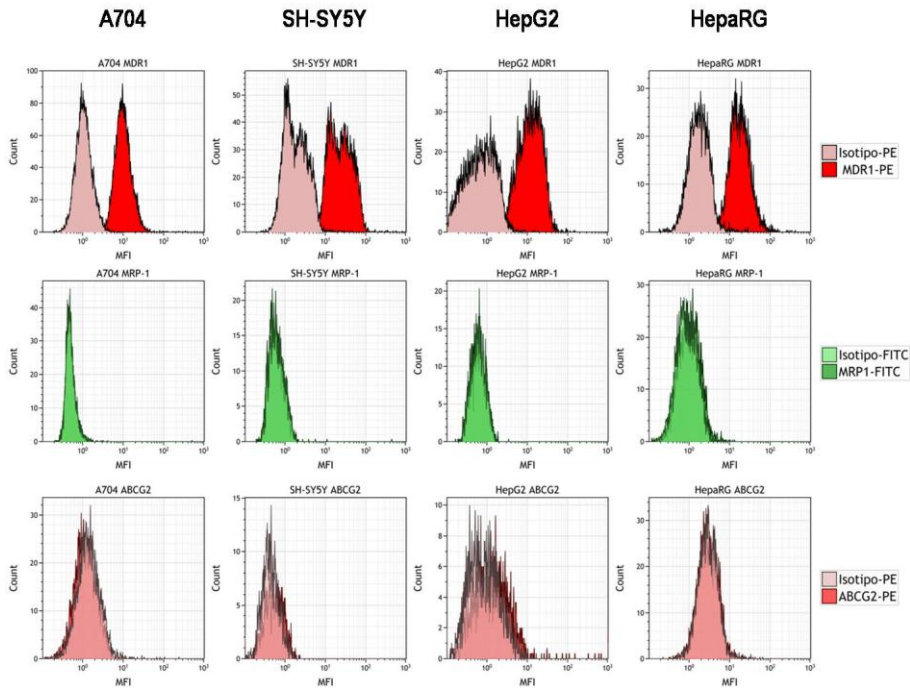


Figura 34: Superposición de histogramas representativos de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de los anticuerpos monoclonales unidos a los transportadores MDR-1, MRP-1 y ABCG2 comparados con los isotipos en las cuatro líneas celulares. Se observa expresión de la proteína MDR-1 en todas las líneas celulares y la ausencia de expresión del resto de transportadores.

2.8.2 Identificación de los transportadores ABC mediante qPCR

Para verificar la presencia de los transportadores ABC se estudió la expresión relativa de los genes ABCB1, ABCC1 y ABCG2 mediante qPCR. Para ello, se extrajo de los distintos tipos celulares el RNA total y se siguieron las instrucciones del fabricante para obtener el valor Ct, tal y como se describe en Metodología. Cuanto mayor es la cantidad inicial de RNA de la muestra, antes se detecta el producto acumulado a partir de los datos de emisión de fluorescencia y

menor es el valor de Ct. Cuando no se obtiene ningún valor de Ct es porque no se detecta el RNA de estudio de esa muestra. En la Figura 35 se representa la gráfica con los valores de Ct obtenidos para los tres transportadores y el gen de referencia utilizado (GAPDH) en las cuatro líneas celulares. Se detecta la presencia de RNA del transportador ABCB1 en las cuatro líneas celulares, y de ABCG2 sólo en HepG2 y HepaRG. Al igual que lo determinado por citometría de flujo, en ninguna de las cuatro líneas celulares se detectó expresión de ABCC1.

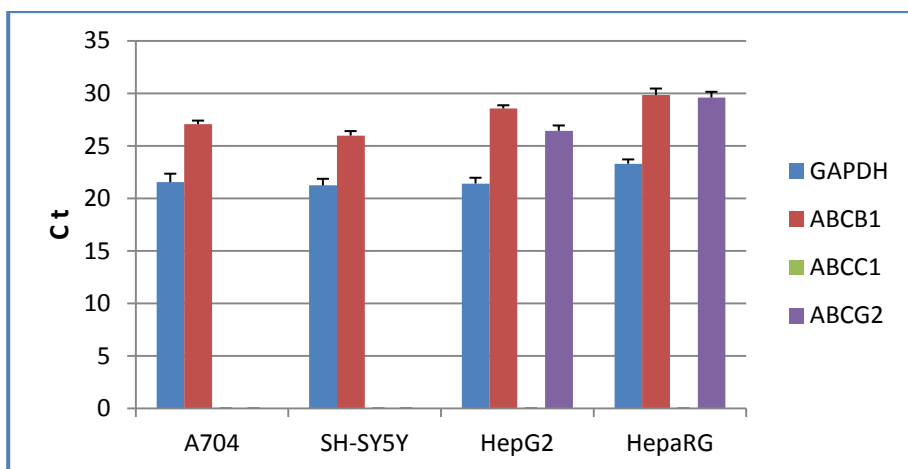


Figura 35: Valores de Ct obtenidos en la determinación por qPCR de la expresión de los genes ABCB1, ABCC1 y ABCG2 en las cuatro líneas celulares. Los datos están expresados como media \pm SEM (n=6).

2.8.3 Ensayo funcional de extrusión de sustratos fluorescentes

La acumulación y/o extrusión de sustratos fluorescentes de la glicoproteína-P se determinó por citometría de flujo. Con estos ensayos se pretendía determinar la funcionalidad de este transportador, verificando la capacidad de extrusión de sustratos fluorescentes en presencia o ausencia de verapamilo y ciclosporina A, inhibidores del transportador ABCB1.

Las cuatro líneas celulares fueron tratadas con los sustratos fluorescentes en presencia o ausencia de los inhibidores durante 1h a 37°C y 5% de CO₂. Terminada la incubación, se reemplazó el medio de cultivo por medio sin sustrato fluorescente y con inhibidores y se incubó durante 1h a 37°C y 5% de CO₂. Finalmente se despegaron y se determinó la intensidad de fluorescencia de las células usando el citómetro de flujo.

Se realizó el análisis estadístico para verificar las diferencias existentes entre las células teñidas con los sustratos fluorescentes en ausencia y en presencia de inhibidores. Se realizaron análisis de ANOVA de 1 vía y en caso de presentar diferencias estadísticamente significativas, se realizó el test de Bonferroni ($P < 0.05$).

En el ensayo de extrusión de sustratos fluorescentes por la línea celular de adenocarcinoma humano A704 (Figura 36 y 37) se verificó que todos los sustratos fluorescentes testados en ausencia de inhibidores presentan menor intensidad de fluorescencia de forma estadísticamente significativa. El Syto13 es el sustrato que mejor se retiene produciendo un aumento de la MFI hasta quince veces respecto al control en presencia del inhibidor ciclosporina A ($p < 0.001$) y de hasta doce en presencia de verapamilo ($p < 0.001$). Las diferencias de la intensidad de fluorescencia son en general directamente proporcionales a la concentración de inhibidor utilizado, aunque prácticamente no se puedan identificar diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes concentraciones de inhibidores respectivamente al control.

En el ensayo de la extrusión de calceína por la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, se observa que las células incubadas en presencia de ciclosporina A emiten hasta 3 veces más fluorescencia de las que se incuban en ausencia de ésta ($p < 0,001$). No existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes concentraciones de ciclosporina A utilizadas, verificándose el mismo efecto a la concentración más baja. Cuando se utilizó el verapamilo, si que se verificó una diferencia entre las dos concentraciones más

bajas y las dos más altas, aunque para todas se verificó, que frente al control presentan una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$).

Lo mismo se pudo ver en el ensayo de extrusión del Syto13 pero en los dos inhibidores (diferencia estadísticamente significativa entre las dos concentraciones más bajas y las dos más altas) (Figuras 38 y 39). Las concentraciones más altas proporcionan una mayor retención del sustrato. Una vez más, el Syto13 es el sustrato fluorescente que mejor refleja el eflujo de compuestos y su retención con estos inhibidores. En presencia de verapamilo, la MFI de Syto13 llega a alcanzar una fluorescencia 100 veces superior a las células control (células sin inhibidores).

En el ensayo con rodamina 123, se comprobó que las diferentes concentraciones de los inhibidores bloquean el eflujo de fluorocromo de forma significativa excepto a la concentración más baja de verapamilo. Las demás concentraciones de verapamilo inhiben la fluorescencia de forma estadísticamente significativa ($p < 0,001$). Frente al control, todas las concentraciones de ciclosporina testadas en este ensayo presentaron diferencias de $p < 0,001$ excepto a la concentración más baja ($p < 0,01$).

En la línea HepG2 usando el sustrato fluorescente Calceína-AM no se verificó que el verapamilo inhibiera su salida al medio extracelular, pero sí a las dosis más altas de ciclosporina A (aumenta la retención con el aumento de inhibidor) (Figura 40 y 41).

Cuando se usó el Syto13 pasó lo contrario, no se verificaron diferencias estadísticas significativas usando la ciclosporina A como sustrato pero en cambio el verapamilo retuvo el Syto13 a todas las concentraciones utilizadas con la excepción de la concentración más baja.

Usando la rodamina 123, se comprobó que la ciclosporina A bloqueó su eflujo de igual forma a las distintas concentraciones, presentando diferencias significativas frente al control no tratado ($p < 0,001$). En el caso del verapamilo, no se

verificaron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes concentraciones de inhibidor con relación al control.

En el ensayo de la extrusión de sustratos fluorescentes por la línea celular HepaRG no se contrataron diferencias estadísticamente significativas en la MFI de la Calceína-AM en presencia o ausencia de los inhibidores. En el ensayo de Syto13 tampoco se comprobaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y las células tratadas con ciclosporina A pero sí se verificaron diferencias significativas de la MFI usando las distintas concentraciones de verapamilo. En el ensayo del eflujo de rodamina (Figura 42 y 43), la ciclosporina A retiene el eflujo del sustrato fluorescente de igual forma a las distintas concentraciones testadas frente a las células control (sin inhibidores) ($p < 0,001$). Reemplazando la ciclosporina A por el verapamilo, únicamente se verifica la retención de la Rh123 a la concentración más baja de inhibidor. Las dos concentraciones más elevadas de verapamilo inducen una bajada de la MFI al contrario de lo esperado. Esto se debe probablemente a la toxicidad causada por el inhibidor en esta línea celular que ha demostrado ser más sensible a este compuesto, causando alteraciones en la función celular a concentraciones similares ($\approx 10\mu\text{M}$) (Tabla 35).

En los estudios de la caracterización de las líneas celulares utilizadas a nivel de expresión de transportadores de fármacos mediante técnicas de cuantificación de RNA, de inmunofluorescencia y ensayos funcionales por CMF, sólo se pudo demostrar la presencia del transportador ABCG2 por PCR cuantitativa en las líneas celulares HepaRG y HepG2. El transportador ABCB1 se detectó en las cuatro líneas celulares por las distintas técnicas en las que se pudo verificar además su funcionalidad. La capacidad para inhibir este transportador se demostró en las líneas celulares A704 y SH-SY5Y con los tres sustratos fluorescentes usando los dos inhibidores. No ocurrió lo mismo en las líneas celulares hepáticas.

La detección del transportador ABCB1 mediante el análisis funcional de eflujo de sustratos fluorescentes en la línea neuronal SH-SY5Y se ha confirmado en otros estudios. Uno de los más recientes, el de Dalzell et al., 2015 describe la capacidad transportadora de las SH-SY5Y mediante el eflujo del marcador fluorescente el Hoechst33342 y su inhibición con avermectinas y ciclosporina A. También verifican que esta línea celular no inhibe el eflujo de Hoechst33342 usando el inhibidor específico de ABCG2, la fumitremorgina A, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio que por qPCR no pudieron cuantificar RNA de este transportador, además del bloqueo del eflujo de todos los sustratos del ABCB1, algunos en común con el ABCG2, por ambos inhibidores, uno de ellos específico de la Gp-P.

La expresión del transportador ABCB1 en A704 determinado mediante inmunofluorescencia por CMF ya fue descrito por Yu, Chang, & Ma, 1998. La capacidad del verapamilo para inhibir sustratos del ABCB1 en esta línea celular había sido descrito por los mismos autores Yu, Sun, Ma, & Chang, 2000.

Como se ha señalado anteriormente, los transportadores ABC comparten afinidad con muchos sustratos e inhibidores. La Rh123 es sustrato de ABCB1 y ABCG2 y en estas células únicamente se inhibe su eflujo usando el inhibidor ciclosporina A que es también inhibidor de esos dos transportadores (García-Escarp et al., 2004). En las líneas celulares HepG2 y HepaRG se ha demostrado por qPCR la expresión de ambos transportadores. Kanebratt & Andersson, 2008 demostraron que estas líneas celulares hepáticas expresan diversos transportadores de fármacos entre los que se incluyen el ABCB1 y ABCG2. La Calceína-AM es también sustrato de otros transportadores además de la Gp-P, entre ellos el MRP1 y la incapacidad en las HepaRG para retener este sustrato puede deberse a la existencia de otros transportadores no estudiados en este trabajo. En la línea celular HepG2 tratada con verapamilo únicamente se pudo ver la retención del eflujo de Syto13 que es sustrato únicamente de ABCB1 (al igual que el verapamilo es inhibidor del ABCB1) y tratadas

con ciclosporina A se pudo comprobar la retención de Calceína, Syto13 y Rh123 señalada por el aumento progresivo de su MIF en función de la concentración de inhibidor. Esto puede deberse a que la ciclosporina A también es inhibidor de ABCG2.

García-Escarp et al., 2004 demostraron al igual que estudios anteriores, que mutaciones en los transportadores (en este caso en la posición 482 del ABCG2), tienen un papel crítico en la determinación de la especificidad del sustrato y que el Syto13 puede ser usado para el análisis funcional de ABCG2 en los variantes de G482 y T482. En el mismo estudio no se ha podido revertir la actividad de ningún variante del ABCG2 usando el verapamilo.

La citometría de flujo es una herramienta útil para analizar las diferencias de la retención o eflujo de compuestos pero es imprescindible tener en cuenta que alteraciones genéticas pueden aumentar o disminuir la especificidad de los sustratos. Serían necesarios más estudios para determinar con precisión que transportadores se expresan en las líneas celulares utilizadas. Con los estudios realizados únicamente podemos afirmar la expresión del transportador ABCB1 en las cuatro líneas celulares y la existencia de mRNA de ABCG2 en las células de origen hepático. En este caso no se pudo determinar mediante inmunofluorescencia por CMF la expresión de la proteína de superficie lo que puede indicar que aunque se exprese el gen, la proteína no pasa a la superficie, o que el anticuerpo monoclonal utilizado no puede identificar a alguna variación de ABCG2. Estudios de eflujo usando la fumitremorgina C (Rabindran et al., 2000) como inhibidor específico del ABCG2 podrían aportar la información necesaria para aclarar este dato.

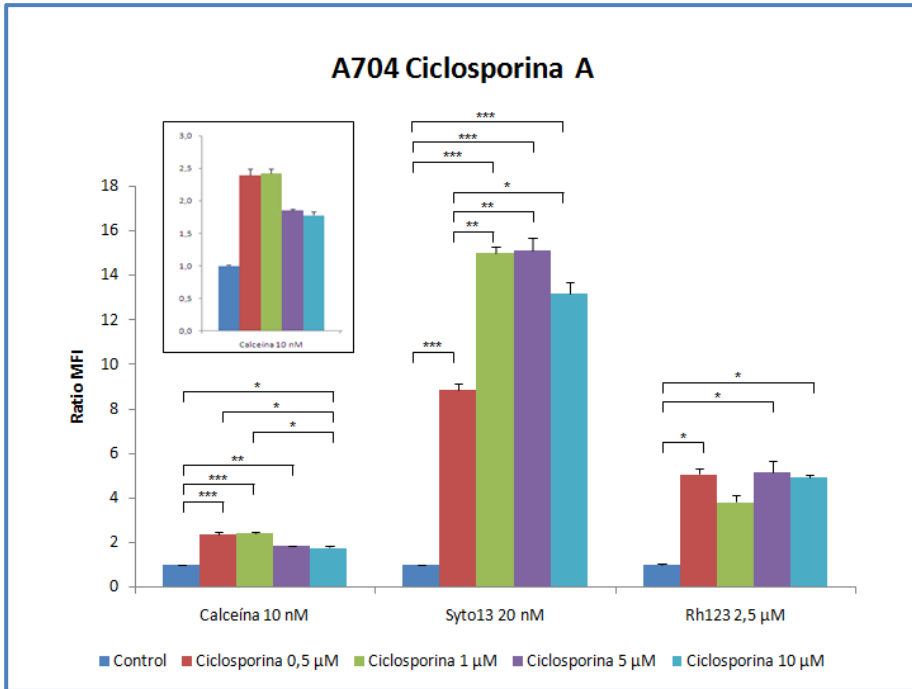


Figura 36: Ensayo del eflujo de sustratos fluorescentes Calceína-AM, Syto13 y Rh123 por el transportador MDR-1 en ausencia y presencia de ciclosporina A en A704. El cuadrado superior izquierdo representa una ampliación de la escala correspondiente al eflujo de la Calceína-AM. En las gráficas se representan los valores de MFI normalizados con el control pasada 1h de incubación en ausencia del sustrato fluorescente. Cada barra representa la media \pm SEM (n=3). (** $p < 0.001$, * $p < 0.01$, $p < 0.05$) comparando todos los tratamientos frente al control.

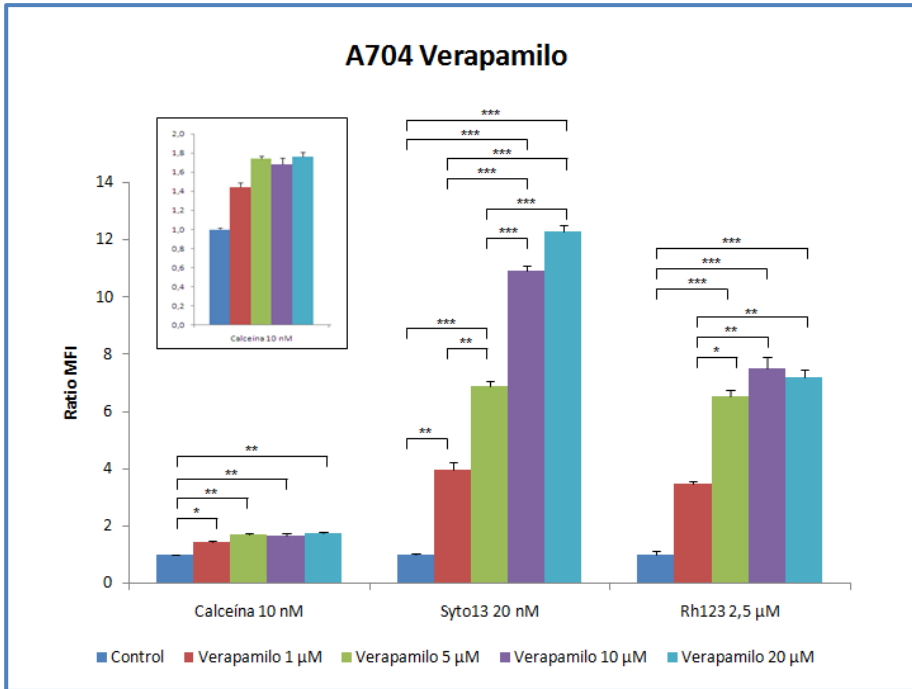


Figura 37: Ensayo del flujo de sustratos fluorescentes Calceína-AM, Syto13 y Rh123 por el transportador MDR-1 en ausencia y presencia de verapamilo en A704. El cuadrado superior izquierdo representa una ampliación de la escala correspondiente al flujo de la Calceína-AM. En las gráficas se representan los valores de MFI normalizados con el control pasada 1h de incubación en ausencia del sustrato fluorescente. Cada barra representa la media \pm SEM (n=3). (***) $p < 0.001$, (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$) comparando todos los tratamientos frente al control.

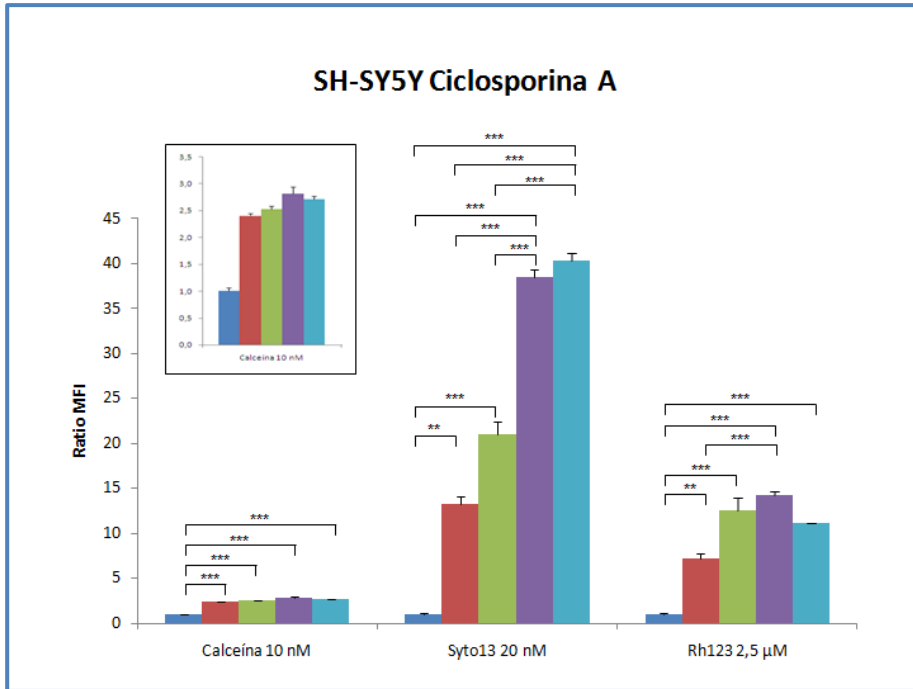


Figura 38: Ensayo del eflujo de sustratos fluorescentes Calceína-AM, Syto13 y Rh123 por el transportador MDR-1 en ausencia y presencia de ciclosporina A en SH-SY5Y. El cuadrado superior izquierdo representa una ampliación de la escala correspondiente al eflujo de la Calceína-AM. En las gráficas se representan los valores de MFI normalizados con el control pasada 1h de incubación en ausencia del sustrato fluorescente. Cada barra representa la media \pm SEM (n=3). (** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05) comparando todos los tratamientos frente al control.

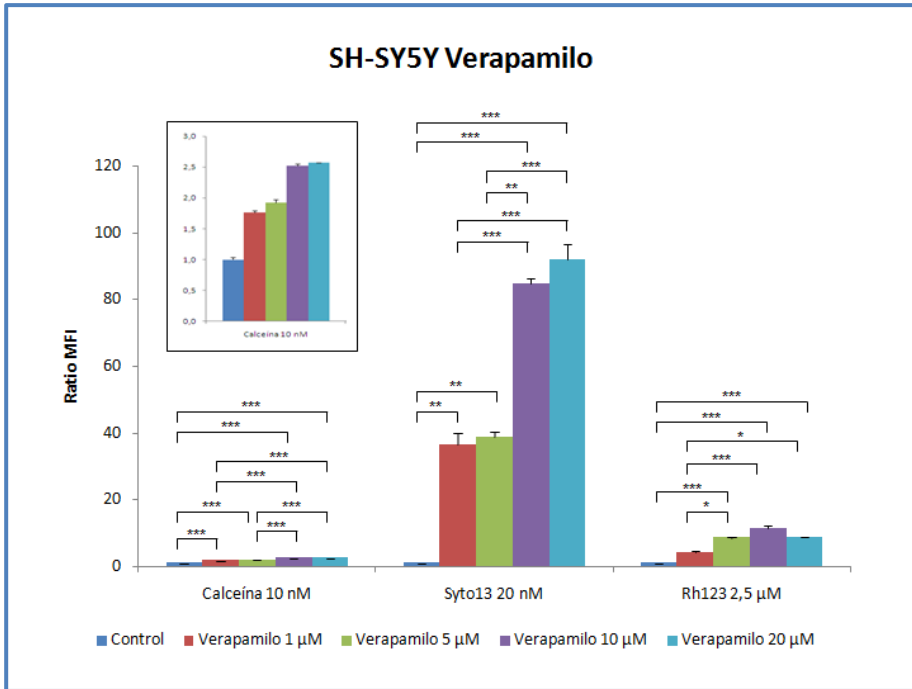


Figura 39: Ensayo del flujo de sustratos fluorescentes Calceína-AM, Syto13 y Rh123 por el transportador MDR-1 en ausencia y presencia de verapamilo en SH-SY5Y. El cuadrado superior izquierdo representa una ampliación de la escala correspondiente al flujo de la Calceína-AM. En las gráficas se representan los valores de MFI normalizados con el control pasada 1h de incubación en ausencia del sustrato fluorescente. Cada barra representa la media \pm SEM (n=3). (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) comparando todos los tratamientos frente al control.

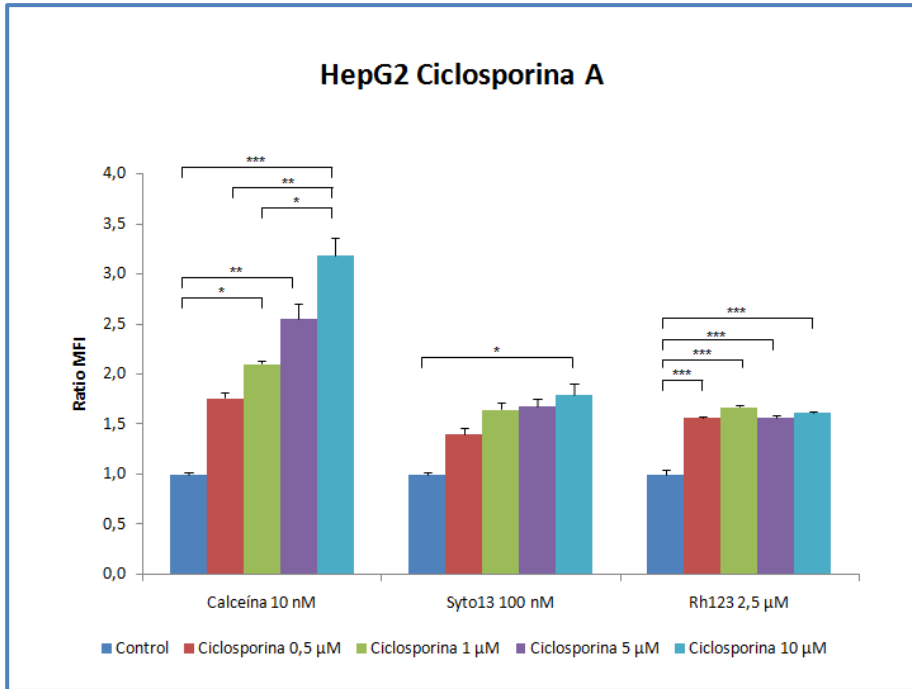


Figura 40: Ensayo del eflujo de sustratos fluorescentes Calceína-AM, Syto13 y Rh123 por el transportador MDR-1 en ausencia y presencia de ciclosporina A en HepG2. En las gráficas se representan los valores de MFI normalizados con el control pasada 1h de incubación en ausencia del sustrato fluorescente. Cada barra representa la media \pm SEM (n=3). (** $p < 0.001$, * $p < 0.01$, * $p < 0.05$) comparando todos los tratamientos frente al control.

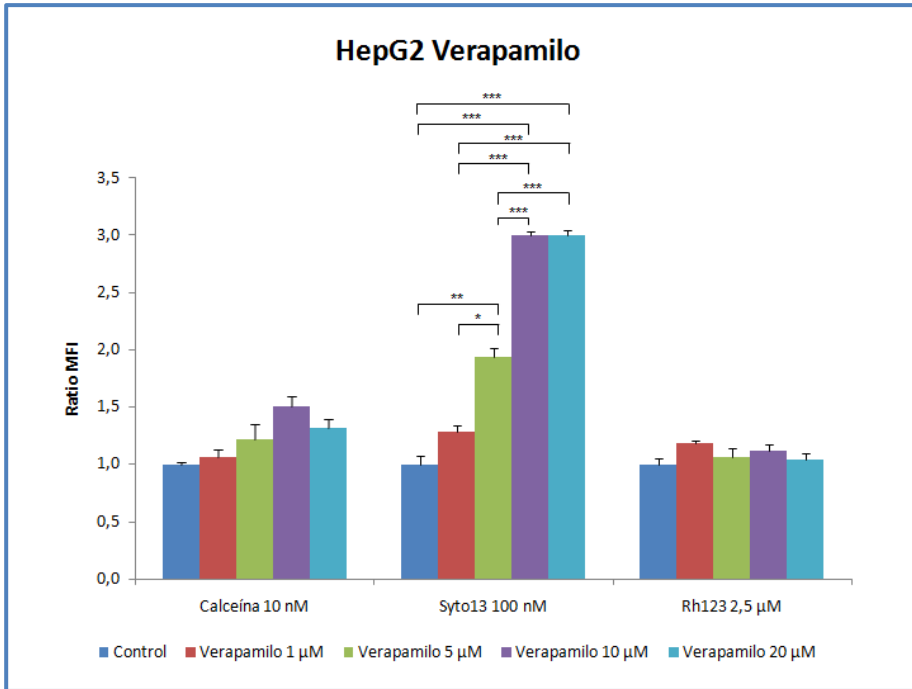


Figura 41: Ensayo del eflujo de sustratos fluorescentes Calceína-AM, Syto13 y Rh123 por el transportador MDR-1 en ausencia y presencia de verapamilo en HepG2. En las gráficas se representan los valores de MFI normalizados con el control pasada 1h de incubación en ausencia del sustrato fluorescente. Cada barra representa la media \pm SEM (n=3). (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) comparando todos los tratamientos frente al control.

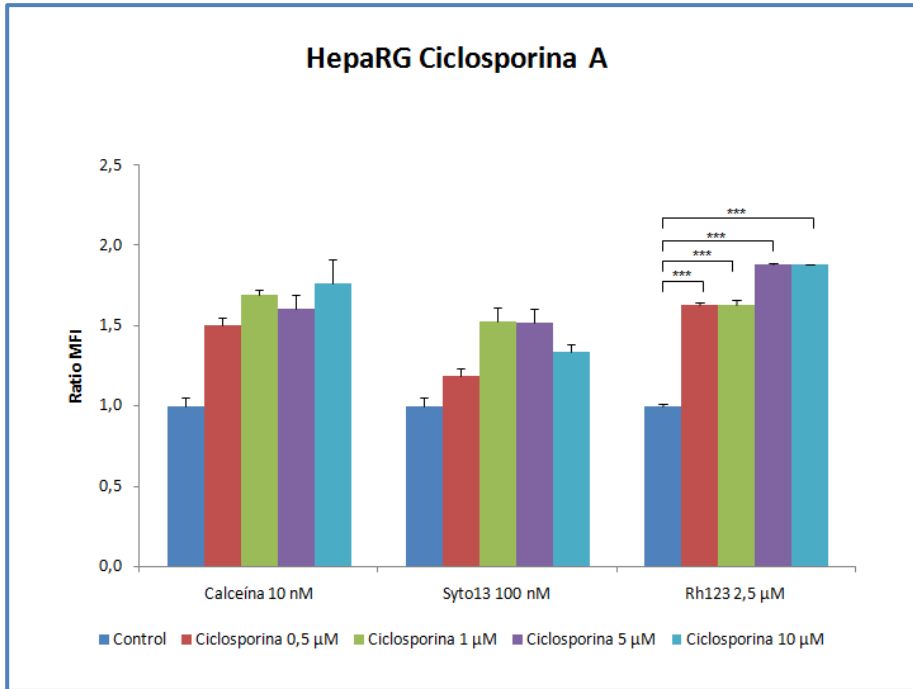


Figura 42: Ensayo del flujo de sustratos fluorescentes Calceína-AM, Syto13 y Rh123 por el transportador MDR-1 en ausencia y presencia de ciclosporina A en HepaRG. En las gráficas se representan los valores de MFI normalizados con el control pasada 1h de incubación en ausencia del sustrato fluorescente. Cada barra representa la media \pm SEM (n=3). (** $p < 0.001$, * $p < 0.01$, $p < 0.05$) comparando todos los tratamientos frente al control.

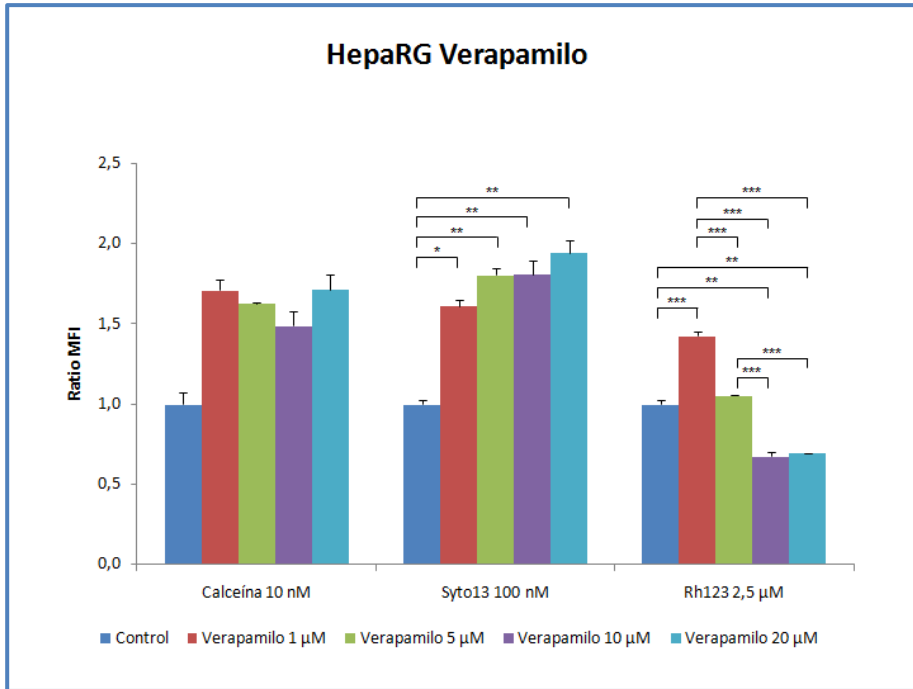


Figura 43: Ensayo del flujo de sustratos fluorescentes Calceína-AM, Syto13 y Rh123 por el transportador MDR-1 en ausencia y presencia de verapamilo en HepaRG. En las gráficas se representan los valores de MFI normalizados con el control pasada 1h de incubación en ausencia del sustrato fluorescente. Cada barra representa la media \pm SEM (n=3). (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$) comparando todos los tratamientos frente al control.

	A704	SH-SY5Y	HepG2	Hepa-RG
ABCB1	+ IF + RNA + Funcional	+ IF + RNA + Funcional	+ IF + RNA + Funcional	+ IF + RNA + Funcional
ABCC1	-IF - RNA	-IF - RNA	-IF - RNA	-IF - RNA
ABCG2	-IF - RNA	-IF - RNA	-IF + RNA ¿Funcional?	-IF + RNA ¿Funcional?

Tabla 38: Resumen de la expresión de los transportadores ABC y técnicas utilizadas en su identificación en las cuatro líneas celulares estudiadas. IF: Inmunofluorescencia.

Resumen de los resultados:

La evaluación de las líneas celulares A704, SH-SY5Y y HepG2 como modelos *in vitro* para la predicción de la toxicidad humana usando un panel citómico de estrés oxidativo ha permitido comprobar varios aspectos importantes:

- Ninguno de los ensayos individuales permite mejorar la predicción de toxicidad humana *in vitro* del ensayo de NRU en 3T3;

- El mejor ensayo del panel citómico fue el de la determinación de la viabilidad con yoduro de propidio en SH-SY5Y que obtuvo una R^2 de 0,634 correlacionando 38 compuestos con humano. Este ensayo mejoró los valores de R^2 de la LD50 de rata y ratón comparados con la LC50 de humano. Se consigue mejorar los ensayos *in vivo* más clásicos de determinación de la toxicidad *in vivo* de humano.

- El mejor ensayo del panel oxidativo citómico fue el de la actividad peroxidativa en la línea de adenocarcinoma humano, A704. Con este ensayo se mejoró la correlación de ambos ensayos *in vivo* y se consiguió obtener el mayor valor de coeficiente de determinación de Pearson (excluyendo el valor de la 8-oxo mitocondrial en HepG2 con una n muy inferior al valor total de compuestos testados). También mejoró el número de compuestos correlacionados con humano de la LD50 de ratón.

- Consideradas conjuntamente las tres líneas celulares usando los valores mínimos (LOEC) se verificó que el panel de oxidativo (LOEC_{oxi}) mejora en n y R^2 al panel de viabilidad (LOEC_{viab}), seguramente debido a la determinación de parámetros tempranos de daño celular que preceden a la muerte.

- Lo mismo se verifica considerando las líneas celulares separadamente con la excepción de las SH-SY5Y en las que el LOEC_{viab} supera a LOEC_{oxi}.

- El panel citómico LOEC_{total} permitió corregir seis outliers (diazepam, digoxina, malatión, paratión, estricnina y acetónitrilo) y pasó a alertas de toxicidad a

dos (verapamilo clorhidrato y ciclosporina A) de los trece outliers de NRU en 3T3 de humano;

- El panel oxidativo LOEC_{viab.} permitió corregir únicamente tres de esos outliers (diazepam, digoxina y verapamilo clorhidrato) frente a los seis que se posicionaron en el rango de predicción de toxicidad óptimo y las dos alertas conseguidos utilizando los valores LOEC_{oxi}

- Los ensayos que determinan un daño celular que precede a la muerte, aportan una mejoría frente a los ensayos clásicos de determinación de la muerte celular en la predicción de la toxicidad humana y en la corrección de outliers.

- El mejor parámetro de determinación de toxicidad para la predicción de la toxicidad humana es el de la actividad peroxidativa (LOEC_{H2O2}) que consigue mejorar el valor de R², mejorar o igualar el número de compuestos en la correlación, disminuir el número de outliers y aumentar el de alertas de los ensayos clásicos usados para determinar la toxicidad humana, el ensayo de NRU de 3T3, la LD50 de rata y la LD50 de ratón.

- La línea celular de neuroblastoma humano usando el panel oxidativo permite mejorar la predicción de la neurotoxicidad de forma estadísticamente significativa en un 38,7% de los compuestos neurotóxicos comparando con 3T3.

- El 22,6% de los 38,7% de los compuestos que mejoran de forma estadísticamente significativa son alertas de neurotoxicidad. Estos valores superan a los obtenidos por Galofré et al. y Gustafsson et al. en 2010 usando cultivos primarios de neuronas corticales y células modificadas aplicando ensayos muy específicos de neurotoxicidad.

- No se ha podido mejorar la predicción de la nefrotoxicidad, neurotoxicidad y hepatotoxicidad en más de un 60% de los compuestos usando las líneas celulares A704, SH-SY5Y y HepG2, comparando con la citotoxicidad basal determinada en una línea celular no órgano-específica. No se pueden utilizar estas líneas celulares para determinar la toxicidad órgano-específica.

- La capacidad de clasificación de los compuestos en las clases de toxicidad del GHS de los ensayos citómicos supera a la capacidad del ensayo de RNU de 3T3 en un 77,5% de los ensayos en la clase I, 42,5% en la clase II, 15% en la clase IV y 17,5% en la clase V.

- El ensayo que tiene mejor capacidad de clasificación es el ensayo de la capacidad peroxidativa de HepG2 que mejora al ensayo de NRU 3T3 en todas las clases a excepción de la clase III.

- Ningún ensayo citómico mejora la capacidad de clasificación de los compuestos de la clase III comparado con el ensayo *in vitro* y los ensayos *in vivo* de LD50 de rata y ratón.

- Casi todos los ensayos citómicos consiguen mejorar la capacidad de clasificación de los compuestos de las clase I y II *in vivo* (87,5% y 62,5% de ensayos citómicos en la clase I y II respectivamente en rata y 65% y 72,5% en ratón).

- Los ensayos citómicos mejoran la capacidad de clasificación de compuestos en las clases de toxicidad más elevadas, teniendo una mayor sensibilidad para detectar compuestos más tóxicos para humano que el ensayo *in vitro* de referencia y los ensayos *in vivo* realizados en rata y ratón. También son muy buenos para clasificar los compuestos no tóxicos o pertenecientes a la clase V en los que pueden llegar hasta un 90% de probabilidad de acierto.

- El panel citómico permite medir los cambios en dianas celulares que se realizan exclusivamente en células vivas.

- Las sustancias tóxicas pueden tener diferente destino celular (DNA mitocondrial, nuclear, etc.)

- Clasifica muy bien los compuestos pertenecientes a las clases I, II, IV y V del GHS

- Las curvas ROC adaptadas a la toxicología permiten la identificación de los ensayos que mejoran la probabilidad de clasificación correcta de los compuestos y

la probabilidad de acierto de su clasificación, pero no permiten distinguir entre los compuestos que son bien clasificados de los que no lo son.

- El uso de la matriz de datos permite identificar los compuestos correctamente clasificados.

- Las herramientas "ómicas" para el análisis de matrices de datos son muy útiles para la integración y clasificación de los datos de toxicidad

- La citómica es una técnica prometedora para ensayos de toxicidad *in vitro* que permite además detectar dianas celulares.

- Los estudios estadísticos muestran que algunos ensayos citómicos proporcionan resultados reproducibles que pueden convertirse en herramientas de estudios de toxicidad *in vitro* para la predicción de la toxicidad aguda para los seres humanos.

La evaluación de la línea celular HepaRG como modelo *in vitro* para la predicción la toxicidad humana dependiente de biotransformación, ha permitido comprobar que:

- La línea celular HepaRG no cambia de forma significativa la determinación de la toxicidad de compuestos dependiente de la biotransformación comparada con HepG2, una línea celular que perdió su capacidad de metabolización.

- No es un buen modelo *in vitro* para determinar la toxicidad dependiente de metabolismo.

En los estudios de determinación de la expresión de transportadores multifármaco se ha observado que:

- Las cuatro líneas celulares utilizadas en este estudio expresan el transportador ABCB1 que se pudo identificar mediante la cuantificación de RNA total por qPCR, también mediante la identificación por inmunofluorescencia de la proteína por CMF y finalmente se determinó su funcionalidad usando la misma técnica.

- Únicamente se verificó expresión de RNA del transportador ABCG2 en las líneas celulares hepáticas HepG2 y HepaRG. No se verificó lo mismo a nivel de expresión de la proteína en la membrana por citometría de flujo.

- El transportador MRP1 no se identificó en ninguna de las líneas celulares estudiadas por ninguna de las técnicas.

CONCLUSIONES

1. Se ha miniaturizado y optimizado una plataforma de ensayos citómicos de alto contenido de estrés oxidativo basada en la CMF para el análisis *in vitro* en células humanas, susceptible de ser adaptada a la robotización, que permite además detectar dianas celulares de toxicidad.
2. El panel citómico de ensayos de estrés oxidativo mejora, en algunos casos, la correlación de los valores de toxicidad *in vivo* e *in vitro* de referencia con los valores de LC50 en humanos, lo que permitiría la reducción de animales usados en estudios de toxicidad.
3. El panel citómico de ensayos de estrés oxidativo corrige diversos outliers del ensayo de citotoxicidad basal de referencia (3T3 NRU) e identifica nuevas alertas de toxicidad.
4. El panel citómico de ensayos de estrés oxidativo permite clasificar correctamente un gran porcentaje de los compuestos en una variante del sistema GHS adaptado a los datos de humano.
5. El panel citómico de ensayos de estrés oxidativo supera a los ensayos de referencia de toxicidad *in vivo* e *in vitro*, principalmente en las clases de elevada toxicidad, además de permitir distinguir con elevada sensibilidad los compuestos considerados no tóxicos.
6. Algunos de los ensayos del panel proporcionan resultados reproducibles que pueden convertirse en herramientas de estudios de toxicidad *in vitro* para la predicción de la toxicidad aguda para los seres humanos.

7. Los ensayos citómicos sobre líneas tumorales específicas de órganos no han logrado predecir correctamente la toxicidad órgano-específica. Tampoco han detectado la toxicidad dependiente de biotransformación comparando dos líneas celulares hepáticas, una de ellas con capacidad metabólica.

8. Se han detectado transportadores multifármacos en las cuatro líneas celulares mediante qPCR, inmunofluorescencia y ensayos funcionales por citometría de flujo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abate, C., Patel, L., Rauscher, F. J., & Curran, T. (1990). Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4973), 1157–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2118682>
- Abbott, A. (2005). Animal testing: more than a cosmetic change. *Nature*, 438(7065), 144–146. <http://doi.org/10.1038/438144a>
- Abdallah, H. M., Al-Abd, A. M., El-Dine, R. S., & El-Halawany, A. M. (2015). P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(1), 45–62. <http://doi.org/10.1016/j.jare.2014.11.008>
- Allen, R. G., & Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(3), 463–99. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699758>
- Allikmets, R., Schriml, L. M., Hutchinson, A., Romano-Spica, V., & Dean, M. (1998). A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Research*, 58(23), 5337–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9850061>
- 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. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 15(4-5), 407–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566571>
- Álvarez-Barrientos, A., O'Connor, J.E., Callaghan, R. C. (2005). Citómica: técnicas y estrategias en citometría de sistemas. In E. M. Cascales, M.J. Gómez-Lechón y J.E. O'Connor (Ed.), *Las Ómicas Genómica, Proteómica, Citómica y Metabolómica: Modernas Tecnologías Para el Desarrollo de Fármacos* (Instituto). Madrid.
- Amer, Met Walli, y A. el-M. (2002). Skin Disease and Enzymatic Antioxidants Activity Among Workers Exposed to Pesticides.

- Aninat, C., Glaise, D., Dumont, J., Morel, F., Poul, J., & Guguen-guillouzo, C. (2008). Long-Term Functional Stability of Human HepaRG Hepatocytes and Use for Chronic Toxicity and Genotoxicity Studies ABSTRACT : *Pharmacology*, 36(6), 1111–1118. <http://doi.org/10.1124/dmd.107.019901>. especially
- Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T., Langouët, S., Morel, F., ... Guillouzo, A. (2006). Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 34(1), 75–83. <http://doi.org/10.1124/dmd.105.006759>
- Anon. (2006). Validation of Neutral Red Uptake Test Methods NIH/In Vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity, Publication No. 07-4518, (Xx), 1–38.
- Anon. (2010). Sixth Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union. Retrieved from <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2010:0511:FIN:EN:PDF>
- Balaguer, S., Diaz, L., Gomes, A., Herrera, G., O'Connor, J.-E., Urios, A., ... Montoliu, C. (2015). Real-time cytometric assay of nitric oxide and superoxide interaction in peripheral blood monocytes: A no-wash, no-lyse kinetic method. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 00(February), n/a–n/a. <http://doi.org/10.1002/cyto.b.21237>
- Balls, M. (1994). Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Laboratory Animals*, 28(3), 193–211. <http://doi.org/10.1258/002367794780681714>
- Barrett, W. C., DeGnore, J. P., Keng, Y. F., Zhang, Z. Y., Yim, M. B., & Chock, P. B. (1999). Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *The Journal of*

- Biological Chemistry*, 274(49), 34543–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10574916>
- Bergamini, C. M., Gambetti, S., Dondi, A., & Cervellati, C. (2004). Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Current Pharmaceutical Design*, 10(14), 1611–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15134560>
- Bescós, R., Sureda, A., Tur, J. a., & Pons, A. (2012). The effect of nitric-oxide-related supplements on human performance. *Sports Medicine*, 42(2), 99–117. <http://doi.org/10.2165/11596860-000000000-00000>
- Bocsi, J., Mittag, A., Sack, U., Gerstner, A. O. H., Barten, M. J., & Tárnok, A. (2006). Novel aspects of systems biology and clinical cytomics. *Cytometry. Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 69(3), 105–108. <http://doi.org/10.1002/cyto.a.20239>
- Brennan, P. A., Downie, I. P., Langdon, J. D., & Zaki, G. A. (1999). Emerging role of nitric oxide in cancer. *The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 37(5), 370–3. <http://doi.org/10.1054/bjom.1999.0201>
- Cathcart, R., Schwieters, E., & Ames, B. N. (1983). Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Analytical Biochemistry*, 134(1), 111–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6660480>
- Cerrato, L., Valeri, A., Bueren, J. a., & Albella, B. (2009). In vitro sensitivity of granulo-monocytic progenitors as a new toxicological cell system and endpoint in the ACuteTox Project. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(2), 111–119. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2009.05.005>
- Chang, T. K. H., & Abbott, F. S. (2006). Oxidative Stress as a Mechanism of Valproic Acid-Associated Hepatotoxicity. *Drug Metabolism Reviews*, 38(4), 627–639. <http://doi.org/10.1080/03602530600959433>
- Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S., & Loeb, L. A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T

- and A---C substitutions. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(1), 166–72.
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1730583>
- Clemedson, C., & Ekwall, B. (1999). Overview of the Final MEIC Results: I. The In Vitro--In Vitro Evaluation. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 13(4-5), 657–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20654531>
- Clemedson, C., Nordin-Andersson, M., Bjerregaard, H. F., Clausen, J., Forsby, A., Gustafsson, H., ...Scheers, E. (2002). Development of an in vitro test battery for the estimation of acute human systemic toxicity: An outline of the EDIT project. Evaluation-guided Development of New In Vitro Test Batteries. *Alternatives to Laboratory Animals : ATLA*, 30(3), 313–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12106010>
- Clemedson, C., Andersson, M., Aoki, Y., Barile, F.A., Bassi, A.M., Calleja, M.C., Castano, A., Clothier, R.H., Dierickx, P., Ekwall, B., Ferro, M., Fiskesjö, G., Garza- Ocañas, L., Gómez-Lechón, M.J., Gülden, M., Hall, T., Imai, K., Isomaa, B., Kahru, A., B. (1998). MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part IV. In vitro results from 67 toxicity assays used to test reference chemicals 31–50 and a comparative cytotoxicity analysis. *ATLA*, 26(Suppl. 1), 131–183.
- Clemedson, C., Barile, F.A., Chesné, C., Cottin, M., Curren, R., Ekwall, B., Ferro, M., Gómez-Lechón, M.J., Imai, K., Janus, J., Kemp, R.B., Kerszman, G., Kjellstrand, P., Lavrijsen, K., Logemann, P., McFarlane-Abdulla, E., Roguet, R., Segner, H., Thuvand, B. (2000). MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part VII. Prediction of human toxicity by results from testing of the first 30 reference chemicals with 27 further in vitro assays. *ATLA*, 28(Suppl. 1), 161–200.
- Clemedson, C., Barile, F.A., Ekwall, B., Gómez- Lechón, M.J., Hall, T., Imai, K., Kahru, A., Logemann, P., Monaco, F., Ohno, T., Segner, H., Sjöström, M., Valentino, M., Walum, E., Wang, X. & Ekwall, B. (1998). MEIC evaluation of

- acute systemic toxicity. Part III. In vitro results from 16 additional methods used to test the first 30 reference chemicals and a comparative cytotoxicity analysis. *ATLA*, 26(Suppl. 1), 93–129.
- Clemedson, C., McFarlane-Abdulla, E., Andersson, M., Barile, F.A., Calleja, M.C., Chesné, C., Clothier, R., Cottin, M., Curren, R., Daniel-Szolgay, E., Dierickx, P., Ferro, M., Fiskesjö, G., Garza-Ocañas, L., Gómez-Lechón, M.J., Gülden, M., Isomaa, B., J, B. (1996). MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part I. Methodology of 68 in vitro toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals. *ATLA*, 24(Suppl. 1), 251–272.
- Clemedson, C., McFarlane-Abdulla, E., Andersson, M., Barile, F.A., Calleja, M.C., Chesné, C., Clothier, R., Cottin, M., Curren, R., Dierickx, P., Ferro, M., Fiskesjö, G., Garza-Ocañas, L., Gómez-Lechón, M.J., Gülden, M., Isomaa, B., Janus, J., Judge, P., B. (1996). MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part II. In vitro results from 68 toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals and a comparative cytotoxicity analysis. *ATLA*, 24(Suppl. 1), 273–311.
- Clothier, R., Gómez-Lechón, M. J., Kinsner-Ovaskainen, A., Kopp-Schneider, A., O'Connor, J. E., Prieto, P., & Stanzel, S. (2013). Comparative analysis of eight cytotoxicity assays evaluated within the ACuteTox Project. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 27(4), 1347–56. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.08.015>
- Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., ... Deeley, R. G. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5088), 1650–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1360704>
- Cole, S. P. C. (2013). Targeting Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1): Past, Present, and Future. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*,

- (September 2013), 1–23. <http://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-135959>
- Dalzell, A. M., Mistry, P., Wright, J., Williams, F. M., & Brown, C. D. a. (2015). Characterization of multidrug transporter-mediated efflux of avermectins in human and mouse neuroblastoma cell lines. *Toxicology Letters*, 235(3), 189–198. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.04.005>
- Darnell, M. (2012). *HUMAN LIVER IN VITRO MODELS FOR EVALUATION OF DRUG METABOLISM AND DISPOSITION*.
- Deavall, D. G., Martin, E. a., Horner, J. M., & Roberts, R. (2012). Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *Journal of Toxicology*, 2012, 1–13. <http://doi.org/10.1155/2012/645460>
- Deeley, R. G., & Cole, S. P. C. (2006). Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Letters*, 580(4), 1103–1111. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.036>
- DeJongh, J., Nordin-Andersson, M., Ploeger, B. A., & Forsby, A. (1999). Estimation of systemic toxicity of acrylamide by integration of in vitro toxicity data with kinetic simulations. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 158(3), 261–8. <http://doi.org/10.1006/taap.1999.8670>
- Di, C., & Zhao, Y. (2014). Multiple drug resistance due to resistance to stem cells and stem cell treatment progress in cancer (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 289–293. <http://doi.org/10.3892/etm.2014.2141>
- Doke, S. K., & Dhawale, S. C. (2013). Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 223–229. <http://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>
- Donato, T., O'Connor, J. E. (2004). (2004). Métodos de evaluación del citocromo P450 y su papel en el metabolismo de fármacos. In M. J. G.-L. y M. Cascales (Ed.), *Citocromo P450* (Instituto, pp. 313–360). Madrid.

- Doyle, L. A., & Ross, D. D. (2003). Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene*, 22(47), 7340–7358. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1206938>
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., & Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15665–70. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=28101&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, a., ... Kleiner, J. (2002). Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 40(2-3), 193–236. [http://doi.org/10.1016/S0278-6915\(01\)00118-1](http://doi.org/10.1016/S0278-6915(01)00118-1)
- Ekwall, B. (1983). Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 407, 64–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6349488>
- Ekwall, B., Barile, F.A., Castano, A., Clemedson, C., Clothier, R.H., Dierickx, P., Ekwall, B., Ferro, M., Fiskesjö, G., Garza-Ocañas, L., Gómez-Lechón, M.J., Gulden, M., Hall, T., Isomaa, B., Kahru, A., Kerszman, G., Kristen, U., Kunimoto, M., Kärenlampi, F. (1998). MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part VI. The prediction of human toxicity by rodent LD50 values and results from 61 in vitro methods. *ATLA*, 26(Suppl. 2), 617–658.
- Ekwall, B., Clemedson, C., Crafoord, B., Ekwall, B., Hallander, S., Walum, E. & Bondesson, I. (1998). MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part V. Rodent and human toxicity data for the 50 reference chemicals. *ATLA*, 26(Suppl. 2), 571–616.
- Ekwall, B., Ekwall, K. (1988). Comments on the use of diverse cell systems in toxicity testing. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 15, 193–201.

- Ekwall, B., Ekwall, B. & Sjöström, M. (2000). MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part VIII. Multivariate partial least squares evaluation, including the selection of a battery of cell line tests with a good prediction of human acute lethal peak blood concentrations for 50 chemicals. *ATLA*, 28(Suppl. 1), 201–234.
- Fetsch, P. A., Abati, A., Litman, T., Morisaki, K., Honjo, Y., Mittal, K., & Bates, S. E. (2006). Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Letters*, 235(1), 84–92.
<http://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.04.024>
- Forsby, a, Bal-Price, a K., Camins, a, Coecke, S., Fabre, N., Gustafsson, H., ... Zurich, M. G. (2009). Neuronal in vitro models for the estimation of acute systemic toxicity. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 23(8), 1564–1569.
<http://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.017>
- Forsby, A., & Blaauboer, B. (2007). Integration of in vitro neurotoxicity data with biokinetic modelling for the estimation of in vivo neurotoxicity. *Human & Experimental Toxicology*, 26(4), 333–338.
<http://doi.org/10.1177/0960327106072994>
- Freeman, B. A., & Crapo, J. D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 47(5), 412–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6290784>
- Fricker, G., & Miller, D. S. (2004). Modulation of drug transporters at the blood-brain barrier. *Pharmacology*, 70(4), 169–76. <http://doi.org/10.1159/000075545>
- Fridovich, I. (1997). Superoxide Anion RADical, superoxide dismutases and related matters. *Biochemistry*, 18515–18517. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.30.18515>
- Galofré, M., Babot, Z., García, D. a., Iraola, S., Rodríguez-Farré, E., Forsby, A., & Suñol, C. (2010). GABAA receptor and cell membrane potential as functional endpoints in cultured neurons to evaluate chemicals for human acute toxicity.

- Neurotoxicology and Teratology*, 32(1), 52–61.
<http://doi.org/10.1016/j.ntt.2009.01.010>
- García-Escarp, M., Martínez-Muñoz, V., Sales-Pardo, I., Barquinero, J., Domingo, J. C., Marin, P., & Petriz, J. (2004). Flow cytometry-based approach to ABCG2 function suggests that the transporter differentially handles the influx and efflux of drugs. *Cytometry*, 62A(2), 129–138. <http://doi.org/10.1002/cyto.a.20072>
- Gennari, A., Berghe, C. Van Den, Casati, S., Castell, J., Coecke, S., Colombo, A., ... Negro, G. D. (2004). Strategies to Replace In Vivo Acute Systemic Toxicity Testing, 437–459.
- Gerets, H. H. J., Tilmant, K., Gerin, B., Chanteux, H., Depelchin, B. O., Dhalluin, S., & Aтиenzar, F. a. (2012). Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biology and Toxicology*, 28(2), 69–87.
<http://doi.org/10.1007/s10565-011-9208-4>
- Giaccone, G., & Pinedo, H. (1996). Drug Resistance. *The Oncologist*, 1(1 & 2), 82–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10387972>
- Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. L. F. C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65(2-3), 45–80. <http://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003>
- Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. L. F. C. (2006). Use of Fluorescence Probes for Detection of Reactive Nitrogen Species: A Review. *Journal of Fluorescence*, 16(1), 119–139. <http://doi.org/10.1007/s10895-005-0030-3>
- Gottesman, M. M., & Ling, V. (2006). The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research. *FEBS Letters*, 580(4), 998–1009. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.060>
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., ... Guguen-Guillouzo, C. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B

- virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15655–60. <http://doi.org/10.1073/pnas.232137699>
- Guguen-Guillouzo, C., & Guillouzo, A. (2010). General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 640, 1–40. http://doi.org/10.1007/978-1-60761-688-7_1
- Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F., & Guguen-Guillouzo, C. (2007). The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions*, 168(1), 66–73. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.003>
- Gustafsson, H., Runesson, J., Lundqvist, J., Lindegren, H., Axelsson, V., & Forsby, A. (2010). Neurofunctional endpoints assessed in human neuroblastoma SH-SY5Y cells for estimation of acute systemic toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245(2), 191–202. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2010.02.018>
- Halle, W. (2003). The Registry of Cytotoxicity: toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity (LD50) and to reduce testing in animals. *Alternatives to Laboratory Animals : ATLA*, 31(2), 89–198. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15612878>
- Hendriksen, C., Cussler, K., & Halder, M. (2002). ECVAM's role in the implementation of the three Rs concept in the field of biologicals. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 30(SUPPL. 2), 41–46.
- Hendriksen, C. F. (2009). Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert Rev. Vaccines*, 8, 313–322.
- Hennessy, M., & Spiers, J. P. (2007). A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacological Research*, 55(1), 1–15. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2006.10.007>

- Herrera, G., Diaz, L., Martinez-Romero, A., Gomes, A., Villamón, E., Callaghan, R. C., & O'Connor, J. E. (2007). Cytomics: A multiparametric, dynamic approach to cell research. *Toxicology in Vitro*, 21(2), 176–182.
- Herrera, G., Martinez, 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(2), 62–9.
<http://doi.org/10.1002/cyto.10148>
- Herrera, G., Martínez, A., O'Connor, J.-E., & Blanco, M. (2003). Functional assays of oxidative stress using genetically engineered Escherichia coli strains. *Current Protocols in Cytometry / Editorial Board, J. Paul Robinson, Managing Editor ... [et Al.]*, Chapter 11, Unit 11.16. <http://doi.org/10.1002/0471142956.cy1116s24>
- Hewitt, N. J., Lechón, M. J. G., Houston, J. B., Hallifax, D., Brown, H. S., Maurel, P., ... Hengstler, J. G. (2007). Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metabolism Reviews*, 39(1), 159–234. <http://doi.org/10.1080/03602530601093489>
- Hipfner, D. R., Deeley, R. G., & Cole, S. P. C. (1999). Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1461(2), 359–376. [http://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00168-6](http://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00168-6)
- Hoffmann, S., Kinsner-Ovaskainen, A., Prieto, P., Mangelsdorf, I., Bieler, C., & Cole, T. (2010). Acute oral toxicity: Variability, reliability, relevance and interspecies comparison of rodent LD50 data from literature surveyed for the ACuteTox project. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 58(3), 395–407.
<http://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.08.004>
- Jennen, D. G. J., Magkoufopoulou, C., Ketelslegers, H. B., van Herwijnen, M. H. M., Kleinjans, J. C. S., & van Delft, J. H. M. (2010). Comparison of HepG2 and HepaRG by whole-genome gene expression analysis for the purpose of

- chemical hazard identification. *Toxicological Sciences*, 115(1), 66–79.
<http://doi.org/10.1093/toxsci/kfq026>
- Jonker, J. W., Smit, J. W., Brinkhuis, R. F., Maliepaard, M., Beijnen, J. H., Schellens, J. H., & Schinkel, A. H. (2000). Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(20), 1651–6. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11036110>
- Jossé, R., Aninat, C., Glaise, D., Dumont, J., Fessard, V., Morel, F., ... Guillouzo, A. (2008). Long-term functional stability of human HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 36(6), 1111–8.
<http://doi.org/10.1124/dmd.107.019901>
- Kanebratt, K. P., & Andersson, T. B. (2008). Evaluation of HepaRG Cells as an in Vitro Model for Human Drug Metabolism Studies □ ABSTRACT : *Drug Metabolism and Disposition*, 36(7), 1444–1452.
<http://doi.org/10.1124/dmd.107.020016>
- Kappus, H., & Clinic, R. V. (1987). *Toxicology* 9, 144–149.
- Kinsner-Ovaskainen, a., Prieto, P., Stanzel, S., & Kopp-Schneider, a. (2013a). Selection of test methods to be included in a testing strategy to predict acute oral toxicity: An approach based on statistical analysis of data collected in phase 1 of the ACuteTox project. *Toxicology in Vitro*, 27(4), 1377–1394.
<http://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.11.010>
- Kinsner-Ovaskainen, a., Prieto, P., Stanzel, S., & Kopp-Schneider, a. (2013b). Selection of test methods to be included in a testing strategy to predict acute oral toxicity: An approach based on statistical analysis of data collected in phase 1 of the ACuteTox project. *Toxicology in Vitro*, 27(4), 1377–1394.
<http://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.11.010>

- Kinsner-Ovaskainen, A., Bulgheroni, A., Hartung, T., & Prieto, P. (2009). ECVAM's ongoing activities in the area of acute oral toxicity. *Toxicology in Vitro*, 23(8), 1535–1540. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.004>
- Kinsner-Ovaskainen, A., Rzepka, R., Rudowski, R., Coecke, S., Cole, T., & Prieto, P. (2009). Acutoxbase, an innovative database for in vitro acute toxicity studies. *Toxicology in Vitro*, 23(3), 476–485. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.12.019>
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Toxicologic Pathology. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620–650. <http://doi.org/10.1080/0192623029016672>
- Kolman, A., & Walum, E. (2010). Björn Ekwall, an outstanding Swedish cell toxicologist. *Toxicology in Vitro*, 24(8), 2060–2062. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.04.004>
- Kooijman, R., Devos, S., & Hooghe-Peters, E. (2010). Inhibition of in vitro cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells treated with xenobiotics: Implications for the prediction of general toxicity and immunotoxicity. *Toxicology in Vitro*, 24(6), 1782–1789. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.07.007>
- Korde Choudhari, S., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadball, A. R., & Joshi, V. (2013). Nitric oxide and cancer: a review. *World Journal of Surgical Oncology*, 11(1), 118. <http://doi.org/10.1186/1477-7819-11-118>
- Kriete, A. (2005). Cytomics in the realm of systems biology. *Cytometry Part A*, 68(1), 19–20. <http://doi.org/10.1002/cyto.a.20184>
- Kusch-Poddar, M. (2006). *In Vitro Models of the Blood-Brain Barrier: Applications and Evaluation of a New Human Immortalized Brain Capillary Endothelial Cell Lines*. Universitat Basel.
- 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(3), 226–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11429773>

- Lebedeva, I. V., Pande, P., & Patton, W. F. (2011). Sensitive and Specific Fluorescent Probes for Functional Analysis of the Three Major Types of Mammalian ABC Transporters. *PLoS ONE*, 6(7), e22429. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0022429>
- LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., & Bondy, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, 5(2), 227–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1322737>
- LeCluyse, E. L. (2001). Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 13(4), 343–68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408150>
- Lee, S., & Howell, B. J. (2006). High-content screening: emerging hardware and software technologies. *Methods in Enzymology*, 414, 468–83. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)14025-2](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)14025-2)
- Li, Q., & Shu, Y. (2014). Role of solute carriers in response to anticancer drugs. *Molecular and Cellular Therapies*, 2(1), 15. <http://doi.org/10.1186/2052-8426-2-15>
- Liang, Y., Li, S., & Chen, L. (2015). The physiological role of drug transporters. *Protein & Cell*, 6(5), 334–350. <http://doi.org/10.1007/s13238-015-0148-2>
- Liebel, U., Starkuviene, V., Erfle, H., Simpson, J. C., Poustka, A., Wiemann, S., & Pepperkok, R. (2003). A microscope-based screening platform for large-scale functional protein analysis in intact cells. *FEBS Letters*, 554(3), 394–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14623100>
- Lin, Z., & Will, Y. (2012). Evaluation of drugs with specific organ toxicities in organ-specific cell lines. *Toxicological Sciences*, 126(1), 114–127. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfr339>

- Lübberstedt, M., Müller-Vieira, U., Mayer, M., Biemel, K. M., Knöspel, F., Knobeloch, D., ... Zeilinger, K. (2011). HepaRG human hepatic cell line utility as a surrogate for primary human hepatocytes in drug metabolism assessment in vitro. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 63(1), 59–68. <http://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.04.013>
- Maliepaard, M., Scheffer, G. L., Faneyte, I. F., van Gastelen, M. A., Pijnenborg, A. C., Schinkel, A. H., ... Schellens, J. H. (2001). Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Research*, 61(8), 3458–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309308>
- 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 Part A*, 59, 48–49.
- Massey, V. (1994). Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(36), 22459–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8077188>
- Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., ... Bates, S. E. (1999). Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Research*, 59(1), 8–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892175>
- Mueller, D., Koetemann, A., & Noor, F. (2011). Organotypic Cultures of Hepg2 Cells for In Vitro Toxicity Studies. *Journal of Bioengineering and Biomedical Sciences*, 01(S2), 9538. <http://doi.org/10.4172/2155-9538.S2-002>
- Mueller, D., Krämer, L., Hoffmann, E., Klein, S., & Noor, F. (2014). 3D organotypic HepaRG cultures as in vitro model for acute and repeated dose toxicity

- studies. *Toxicology in Vitro*, 28(1), 104–112.
<http://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.06.024>
- Mueller, S. O., Guillouzo, A., Hewitt, P. G., & Richert, L. (2015). Drug biokinetic and toxicity assessments in rat and human primary hepatocytes and HepaRG cells within the EU-funded Predict-IV project. *Toxicology in Vitro*.
<http://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.04.014>
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Haskó, G., Hawkins, B. J., Madesh, M., & Pacher, P. (2007). Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nature Protocols*, 2(9), 2295–301. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.327>
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Yoshihiro, K., Haskó, G., & Pacher, P. (2007). Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(1), 203–8. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.106>
- Munoz, M., Henderson, M., Haber, M., & Norris, M. (2007). Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life*, 59(12), 752–757. <http://doi.org/10.1080/15216540701736285>
- Navarro, Y. (2005). *Estudio Funcional de la Proteína Desacopladora Mitocondrial Ucp3 en Relación con La Apoptosis y las Especies Reactivas de Oxígeno*. Universidad Barcelona.
- O'Connor, J. E., Callaghan, R. C., Escudero, M., Herrera, G., Martínez, a, Monteiro, M. D., & Montolíu, H. (2001). The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. *IUBMB Life*, 51(4), 231–239.
<http://doi.org/10.1080/152165401753311771>
- O'Connor, J. E., Martínez, 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(1), 48–58. <http://doi.org/10.1002/cyto.a.20095>

- Occupational Safety & Health Administration (2009). Hazard communication; proposed rule. 74 Fed. Regist. 50280.
- Official Journal of the European Commission (2008). Regulation (EC) No. 1272/2008 of the European Parliament and of the Council on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures. EU Publications Office, Brussels, Belgium.
- Organisation for Economic Cooperation and Development (1987). Test Guideline 401. Acute Oral Toxicity (Borrada en 2002).
- Organisation for Economic Cooperation and Development (2007). Report on Preparation of GHS Implementation by the OECD Countries. OECD Series on Testing and Assessment No. 70. OECD, Paris, France.
- Organisation for Economic Cooperation and Development (2009). Draft Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests. OECD, Paris, France.
- Organisation for Economic Cooperation and Development (2010). Guidance Document No. 129 on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests. Retrieved from [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2010\)20&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2010)20&doclanguage=en)
- Orrenius, S., Nicotera, P., & Zhivotovsky, B. (2011). Cell Death Mechanisms and Their Implications in Toxicology. *Toxicological Sciences*, 119(1), 3–19. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfq268>
- Paran, Y., Lavelin, I., Naffar-Abu-Amara, S., Winograd-Katz, S., Liron, Y., Geiger, B., & Kam, Z. (2006). Development and application of automatic high-resolution light microscopy for cell-based screens. *Methods in Enzymology*, 414, 228–47. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)14013-6](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)14013-6)

- Pepperkok, R., & Ellenberg, J. (2006). High-throughput fluorescence microscopy for systems biology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(9), 690–6.
<http://doi.org/10.1038/nrm1979>
- Pereira, C. V, Nadanaciva, S., Oliveira, P. J., & Will, Y. (2012). The contribution of oxidative stress to drug-induced organ toxicity and its detection in vitro and in vivo. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 8(2), 219–37.
<http://doi.org/10.1517/17425255.2012.645536>
- Pétriz, J., & García-López, J. (1997a). Flow cytometric analysis of P-glycoprotein function using rhodamine 123. *Leukemia*, 11(7), 1124–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9205001>
- Pétriz, J., & García-López, J. (1997b). Flow cytometric analysis of P-glycoprotein function using rhodamine 123. *Leukemia : Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 11(7), 1124–1130.
<http://doi.org/10.1038/sj.leu.2400659>
- Pétriz, J., O'Connor, J. E., & García-López, J. (1996). Rhodamine 123 efflux in drug resistance assays. *Leukemia*, 10(4), 748–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8618459>
- Prieto, P., Kinsner-Ovaskainen, a., Stanzel, S., Albella, B., Artursson, P., Campillo, N., ... Kopp-Schneider, a. (2013). The value of selected in vitro and in silico methods to predict acute oral toxicity in a regulatory context: Results from the European Project ACuteTox. *Toxicology in Vitro*, 27(4), 1357–1376.
<http://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.07.013>
- Pryor, W. A., & Godber, S. S. (1991). Oxidative stress status: an introduction. *Free Radical Biology & Medicine*, 10(3-4), 173. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1864521>
- Pye, D., Palomero, J., Kabayo, T., & Jackson, M. J. (2007). Real-time measurement of nitric oxide in single mature mouse skeletal muscle fibres during

- contractions. *The Journal of Physiology*, 581(1), 309–318.
<http://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.125930>
- Rabindran, S. K., Ross, D. D., Doyle, L. A., Yang, W., & Greenberger, L. M. (2000). Fumitremorgin C Reverses Multidrug Resistance in Cells Transfected with the Breast Cancer Resistance Protein Advances in Brief Fumitremorgin C Reverses Multidrug Resistance in Cells Transfected with the Breast Cancer Resistance Protein 1, 47–50.
- Raha, S., & Robinson, B. H. (2001). Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *American Journal of Medical Genetics*, 106(1), 62–70.
<http://doi.org/10.1002/ajmg.1398>
- Ranganatha, N., & Kuppast, I. J. (2012). *A c a d e m i c S c i e n c e s*, 4.
- Repetto, M. (1995). Métodos alternativos: estudios toxicológicos in vitro. In *Toxicología Avanzada* (pp. 37–60).
- Repetto, G., Peso, A., Zurita, J. L. (2006). La aplicación de procedimientos In Vitro en la evaluación toxicológica alimentaria. In *Toxicología alimentaria* (pp. 95–125).
- Rines, D. R., Tu, B., Miraglia, L., Welch, G. L., Zhang, J., Hull, M. V, ... Chanda, S. K. (2006). High-content screening of functional genomic libraries. *Methods in Enzymology*, 414, 530–65. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)14028-8](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)14028-8)
- Robey, R. W., Polgar, O., Deeken, J., To, K. W., & Bates, S. E. (2007). ABCG2: Determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(1), 39–57. <http://doi.org/10.1007/s10555-007-9042-6>
- Rogue, A., Lambert, C., Spire, C., Claude, N., & Guillouzo, A. (2012). Interindividual variability in gene expression profiles in human hepatocytes and comparison with HepaRG cells. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 40(1), 151–8. <http://doi.org/10.1124/dmd.111.042028>
- Rosete, P. G., Ledesma, R. L., Mancilla, B. E., & Galindo, E. Z. (1999). Óxido nítrico, una molécula multifuncional, 3(Figura 1).

- Santos, N. a. G., Catão, C. S., Martins, N. M., Curti, C., Bianchi, M. L. P., & Santos, a. C. (2007). Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Archives of Toxicology*, *81*(7), 495–504. <http://doi.org/10.1007/s00204-006-0173-2>
- Sarkadi, B., Homolya, L., Szakács, G., & Váradi, A. (2006). Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiological Reviews*, *86*(4), 1179–1236. <http://doi.org/10.1152/physrev.00037.2005>
- Sastre, J., Pallardó, F. V., & Viña, J. (2000). Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*, *49*(5), 427–35. <http://doi.org/10.1080/152165400410281>
- Scheers, E. M., Ekwall, B., & Dierickx, P. J. (2001). In vitro long-term cytotoxicity testing of 27 MEIC chemicals on Hep G2 cells and comparison with acute human toxicity data. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, *15*(2), 153–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11287174>
- Schinkel, A. H., & Jonker, J. W. (2012). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: An overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*(SUPPL.), 138–153. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.027>
- Schneider, J. E., Price, S., Maitt, L., Gutteridge, J. M., & Floyd, R. A. (1990). Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage. *Nucleic Acids Research*, *18*(3), 631–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=333472&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Schoonen, W. G. E. J., Westerink, W. M. A., de Roos, J. A. D. M., & Débiton, E. (2005). Cytotoxic effects of 100 reference compounds on Hep G2 and HeLa

- cells and of 60 compounds on ECC-1 and CHO cells. I mechanistic assays on ROS, glutathione depletion and calcein uptake. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 19(4), 505–16.
<http://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.01.003>
- Schroeder, K., Bremm, K. D., Alépée, N., Bessems, J. G. M., Blaauboer, B., Boehn, S. N., ... Diembeck, W. (2011). Report from the EPAA workshop: In vitro ADME in safety testing used by EPAA industry sectors. *Toxicology in Vitro*, 25(3), 589–604. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.12.005>
- Schulpis, K., Lazaropoulou, C., Regoutas, S., Karikas, G., Margeli, a, Tsakiris, S., & Papassotiriou, I. (2006). Valproic acid monotherapy induces DNA oxidative damage. *Toxicology*, 217(2-3), 228–232.
<http://doi.org/10.1016/j.tox.2005.10.004>
- Seibert, H., Mörchel, S., & Gülden, M. (2002). Factors influencing nominal effective concentrations of chemical compounds in vitro: Medium protein concentration. *Toxicology in Vitro*, 16(3), 289–297. [http://doi.org/10.1016/S0887-2333\(02\)00014-0](http://doi.org/10.1016/S0887-2333(02)00014-0)
- Seidle, T., Robinson, S., Holmes, T., Creton, S., Prieto, P., Scheel, J., & Chlebus, M. (2010). Cross-sector review of drivers and available 3Rs approaches for acute systemic toxicity testing. *Toxicological Sciences*, 116(2), 382–396.
<http://doi.org/10.1093/toxsci/kfq143>
- Sharma, P., Sharma, A., Jasuja, N. D., & Joshi, S. C. (2014). Organophosphorous compounds and oxidative stress: a review. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 96(5), 681–698. <http://doi.org/10.1080/02772248.2014.972045>
- Sharma, S., & Rose, D. R. (1995). Cloning, overexpression, purification, and characterization of the carboxyl-terminal nucleotide binding domain of P-glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(23), 14085–93.
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7775470>

- Sharom, F. J. (2008). ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*, 9(1), 105–127.
<http://doi.org/10.2217/14622416.9.1.105>
- Shibutani, S., Takeshita, M., & Grollman, A. P. (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, 349(6308), 431–4. <http://doi.org/10.1038/349431a0>
- Sjöström, M., Kolman, A., Clemedson, C., & Clothier, R. (2008). Estimation of human blood LC50 values for use in modeling of in vitro-in vivo data of the ACuteTox project. *Toxicology in Vitro*, 22(5), 1405–1411.
<http://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.04.017>
- Soldatow, V. Y., Lecluyse, E. L., Griffith, L. G., & Rusyn, I. (2013). In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicology Research*, 2(1), 23–39.
<http://doi.org/10.1039/C2TX20051A>
- Starkuviene, V., & Pepperkok, R. (2007). The potential of high-content high-throughput microscopy in drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 152(1), 62–71. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707346>
- Tafazoli, S. (2009). Mechanisms of Drug-induced Oxidative Stress in the Hepatocyte Inflammation Model.
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005–28. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11076791>
- Thirunavukkarasu, C., Watkins, S., Harvey, S. A. K., & Gandhi, C. R. (2004). Superoxide-induced apoptosis of activated rat hepatic stellate cells. *Journal of Hepatology*, 41(4), 567–75. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.06.023>
- Thomas, D. D., Liu, X., Kantrow, S. P., & Lancaster, J. R. (2001). The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and

- O2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(1), 355–360. <http://doi.org/10.1073/pnas.98.1.355>
- Tomida, T., Okamura, H., Satsukawa, M., Yokoi, T., & Konno, Y. (2015). Multiparametric assay using HepaRG cells for predicting drug-induced liver injury. *Toxicology Letters*, 236, 16–24. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.04.014>
- Trevan, J. W. (1927). The error of determination of toxicity. *Proc. R. Soc. Lond.*, 1(1B), 483.
- Turpeinen, M., Tolonen, A., Chesne, C., Guillouzo, A., Uusitalo, J., & Pelkonen, O. (2009). Functional expression, inhibition and induction of CYP enzymes in HepaRG cells. *Toxicology in Vitro*, 23(4), 748–753. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.03.008>
- United Nations Organization (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Retrieved from http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html
- United States Environmental Protection Agency (2004). Chemical Hazard Classification and Labeling: Comparison of OPP Requirements and the GHS. U.S. EPA, Washington, DC. Retrieved from <http://www.epa.gov/oppfead1/international/global/ghscriteria-summary.pdf>
- Urso, M. L., & Clarkson, P. M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189(1-2), 41–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12821281>
- Vaisberg, E. A., Lenzi, D., Hansen, R. L., Keon, B. H., & Finer, J. T. (2006). An infrastructure for high-throughput microscopy: instrumentation, informatics, and integration. *Methods in Enzymology*, 414, 484–512. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)14026-4](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)14026-4)

- Valet, G. (2003). Past and present concepts in flow cytometry: A European perspective. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 17(3), 213–222.
- Valet, G. (2005). Human cytome project: A new potential for drug discovery. In E. M. Cascales, M.J. Gómez-Lechón y J.E. O'Connor (Ed.), *Las Omicas Genómica, Proteómica, Citómica y Metabolómica: Modernas Tecnologías Para el Desarrollo de Fármacos* (Instituto , pp. 207–228). Madrid. pp.207-228.
- Van Den Heuvel, R. L., Leppens, H., & Schoeters, G. E. (2001). Use of in vitro assays to assess hematotoxic effects of environmental compounds. *Cell Biology and Toxicology*, 17(2), 107–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11499694>
- Walker, P., Fox, K., Butler, P., Annand, R., Mouchet, N., Camus, S., Dilworth, C., Chesne, C., Gill, H. & Tsaioun, K. (2011). Comparison of different cell models in High Content Screening to investigate metabolism-mediated hepatotoxicity. Cyprotex.<http://www.heparg.com/index.php?rub=posters>
- Walum, E. (2014). Scandinavian Society for Cell Toxicology - Thirty Years of Scientific Pioneering. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 115(1), 88–92. <http://doi.org/10.1111/bcpt.12194>
- Walum, E., Hedander, J., & Garberg, P. (2005). Research perspectives for pre-screening alternatives to animal experimentation: On the relevance of cytotoxicity measurements, barrier passage determinations and high throughput screening in vitro to select potentially hazardous compounds in large sets of. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2 SUPPL.), 393–397. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2005.01.056>
- Walum, E., Tähti, H., & Kolman, A. (2011). The tenth anniversary of the Björn Ekwall memorial foundation. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 39(4), 389–402.

- Wang, Y.-J., Zhang, Y.-K., Kathawala, R., & Chen, Z.-S. (2014). Repositioning of Tyrosine Kinase Inhibitors as Antagonists of ATP-Binding Cassette Transporters in Anticancer Drug Resistance. *Cancers*, 6(4), 1925–1952. <http://doi.org/10.3390/cancers6041925>
- Wilk-Zasadna, I., Bernasconi, C., Pelkonen, O., & Coecke, S. (2015). Biotransformation in vitro: An essential consideration in the quantitative in vitro-to-in vivo extrapolation (QIVIVE) of toxicity data. *Toxicology*, 332, 8–19. <http://doi.org/10.1016/j.tox.2014.10.006>
- Wlodkovic, D., Skommer, J., & Darzynkiewicz, Z. (2008). SYTO probes in the cytometry of tumor cell death. *Cytometry Part A*, 73(6), 496–507. <http://doi.org/10.1002/cyto.a.20535>
- Wojtala, A., Bonora, M., Malinska, D., Pinton, P., Duszynski, J., & Wieckowski, M. R. (2014). *Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry. Conceptual background and bioenergetic/mitochondrial aspects of oncometabolism* (1st ed., Vol. 542). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00013-3>
- Worth, A. P., & Balls, M. (2002). The principles of validation and the ECVAM validation process. *Alternatives to Laboratory Animals : ATLA*, 30 Suppl 2, 15–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12513647>
- Xia, M., Huang, R., Witt, K. L., Southall, N., Fostel, J., Cho, M.-H., ... Austin, C. P. (2008). Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. *Environmental Health Perspectives*, 116(3), 284–91. <http://doi.org/10.1289/ehp.10727>
- Yoon, B. I., Hirabayashi, Y., Kawasaki, Y., Kodama, Y., Kaneko, T., Kim, D. Y., & Inoue, T. (2001). Mechanism of action of benzene toxicity: cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells (CFU-GM). *Experimental Hematology*, 29(3), 278–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274754>

- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74(1), 139–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8295932>
- Yu, D. S., Chang, S. Y., & Ma, C. P. (1998). The expression of mdr-1-related gp-170 and its correlation with anthracycline resistance in renal cell carcinoma cell lines and multidrug-resistant sublines. *British Journal of Urology*, 82(4), 544–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9806185>
- Yu, D. S., Sun, G. H., Ma, C. P., & Chang, S. Y. (2000). Verapamil modulation of multidrug resistance in renal cell carcinoma. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi*, 99(4), 311–6. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/10870315>
- Zhang, Y., Schuetz, J. D., Elmquist, W. F., & Miller, D. W. (2004). Plasma membrane localization of multidrug resistance-associated protein homologs in brain capillary endothelial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(2), 449–55. <http://doi.org/10.1124/jpet.104.068528>
- Zhou, J., Zhou, W., Luo, Y., & Chen, H. (2004). Oxidative stress and free radical damage in patients with acute dipterex poisoning. *Biomedical Environmental Science*, 17(1), 223–233.
- Zucco F. (1992). Use of continuous cell lines for toxicological studies. In G.-L. M. Castell Jv (Ed.), *In vitro alternatives to animal pharmacotoxicology* (Serie cien, pp. 43–68). Farmindustria.
- Zurlo, J., Rudacille, D., Goldberg, A. M. (1996). The three Rs: the way forward. *Environ. Health Perspect.*, 104(878).