



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Programa de Doctorado 030G
Señalización Celular y Patologías Asociadas.

TESIS DOCTORAL

VALOR DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO
MULTIPARAMÉTRICA EN UNA ESTRATEGIA BASADA EN
LA TOXICOLOGÍA *IN VITRO* PARA LA PREDICCIÓN DE
RIESGO Y CLASIFICACIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS.

Autora:
Laura Díaz Vico
Licenciada en Biología

Director:
Dr. José Enrique O'Connor Blasco

Valencia, 2015

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

INFORMA:

que la presente Tesis Doctoral titulada "**VALOR DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA EN UNA ESTRATEGIA BASADA EN LA TOXICOLOGÍA IN VITRO PARA LA PREDICCIÓN DE RIESGO Y CLASIFICACIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS**", presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia, ha sido realizada bajo mi dirección por la licenciada en Biología LAURA DÍAZ VICO.

Fdo. José Enrique O'Connor Blasco

**A MI FAMILIA,
GRACIAS POR ACOMPAÑARME EN TODO EL CAMINO**

Ha llegado el momento por fin de escribir estas palabras y me parece increíble. Pero aquí estamos después de todo el esfuerzo profesional y personal.

En primer lugar quiero agradecer a mi director, la oportunidad de poder realizar esta Tesis Doctoral en su laboratorio y poder formar parte de su equipo, de la formación recibida y las vivencias adquiridas en todo este tiempo, gracias Enrique.

Gracias a Ali y a Guadalupe por la dedicación y el esfuerzo en formarme. Y gracias a todos y cada uno de mis compañeros del Laboratorio de Citómica desde el director hasta la última persona de prácticas, porque de una u otra manera han colaborado y sufrido este trabajo.

Me llevo la amistad de seis loquillas, las risas en el "labo" (aunque muchas veces fuera risa nerviosa), las reuniones en "La bodegueta" (no quiero ni pensar en la de este diciembre) y las cervecitas improvisadas. Os quiero mucho a todas y mil gracias. Sin vosotras hubiera sido todavía más difícil acabar esta Tesis.

Angie...ya lo sabes. Gracias por apoyarme, por saber cuando estaba bien o mal sin necesidad de decir nada, por todas las horas que nos hemos pasado analizando una y otra vez nuestros queridos datos brutos, por las risas y por los llantos. Mejor que tú no sabe nadie lo

que ha costado, porque como siempre decimos: "esto hay que vivirlo para saberlo".

Gracias a Patricia por ayudarme en el análisis de los datos, eres un *solete*.

Gracias a Elena, Belén, Antonio y Ana por animarme y hacer que el trabajo me sirviera como refugio.

Gracias a todos mis amigos y familia que están deseando que por fin acabe y tenga tiempo. Estoy deseando compartirlo con vosotros.

Gracias Isa y Esther, sin vosotras no sé lo que haría. Sois parte de mi familia y esta Tesis también es vuestra. Gracias por compartir vuestras vidas conmigo, da igual que nos pasen cosas buenas o malas siempre os tengo ahí y eso no tiene precio.

Gracias a Rosa Mari y Antonio. No hay palabras para agradeceros todos los sacrificios que habéis tenido que hacer y seguís haciendo para que yo consiga mis objetivos. Gracias por educarme, quererme, y guiarme.

A ti Juanjo qué decirte, has vivido esta Tesis como si fuera tuya y sin ti hubiera sido imposible. Gracias por todo el sacrificio que has tenido que hacer para que yo pudiera escribir, créeme que lo sé. Y gracias por quererme, por estar a mi lado, por saber sacarme siempre una

carcajada en los peores momentos, por dejar que me contagie de tu optimismo y por darme lo mejor que he hecho en mi vida, a nuestra niña. Eres el mejor compañero de viaje que podría haber tenido nunca.

Gracias Aitana, porque solo una mirada tuya me da fuerzas para seguir y saber lo que es importante en la vida de verdad.

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	1
II. INTRODUCCIÓN	5
1. CONTEXTO REACH Y REGLAMENTO CLP.	7
2. CONCEPTO DE TOXICIDAD AGUDA Y SISTÉMICA.	12
3. PRINCIPIO DE LAS TRES Rs: REDUCCIÓN, REFINAMIENTO Y REEMPLAZO.	13
4. MÉTODOS ALTERNATIVOS. MODELOS COMPUTACIONALES.	15
5. CONCEPTO DE CITOTOXICIDAD BASAL.	16
6. DE LOS PROGRAMAS MEIC Y EDIT AL PROGRAMA ACUTETOX.	17
7. LA CITOMETRÍA DE FLUJO COMO ESTRATEGIA EN TOXICOLOGÍA <i>IN VITRO</i> .	26
7.1 Citometría de flujo (CMF).	26
7.2 Instrumentación y funcionamiento de un citómetro de flujo.	27
8. NUEVAS TÉCNICAS Y PARÁMETROS PARA LA EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD	31
8.1. Medición de la viabilidad celular por citometría de flujo.	31
8.2. Bases físico químicas del potencial de membrana plasmática	33
8.3. Homeostasis del Ca ²⁺ en condiciones fisiológicas.	38
8.4 Las mitocondrias.	44
III. METODOLOGÍA	49
1. MATERIALES.	51
1.1 Cultivos celulares.	51
1.2 Medios de cultivo.	52
1.3. Compuestos del estudio.	53

1.4. Instrumentación.	53
	54
2. MÉTODOS.	
2.1 Mantenimiento y cultivo celular.	54
2.2. Preparación de los compuestos.	57
2.3. Tratamiento con los compuestos.	59
2.4. Estrategia Citómica <i>In Vitro</i> (ECIV).	61
2.5. Análisis de resultados.	69
IV. OBJETIVOS	85
V. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL	89
1. DETERMINACIÓN DE LOS INDICADORES DE TOXICIDAD IC50, EC50 Y LOEC MEDIANTE LA ESTRATEGIA CITÓMICA <i>IN VITRO</i> (ECIV).	91
2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PREDICTIVA DE LA ESTRATEGIA CITÓMICA <i>IN VITRO</i>.	101
2.1 Correlación de los valores de los indicadores de toxicidad <i>in vitro</i> de la ECIV con los valores de referencia de IC50 en toxicidad humana <i>in vivo</i> .	102
2.2. Evaluación de la correlación interna entre los indicadores de toxicidad <i>in vitro</i> proporcionados por los ensayos de la ECIV y por los ensayos no citométricos de viabilidad.	108
2.3. Evaluación de la capacidad de la ECIV para corregir compuestos outliers y detectar alertas de toxicidad <i>in vitro</i> .	117
3. ANÁLISIS DE LA POTENCIA DE LA ECIV PARA CLASIFICAR LOS COMPUESTOS DE ACUERDO CON LOS CRITERIOS DEL SISTEMA GHS.	136
3.1 Aplicación de una estrategia basada en la bioinformática para la ordenación de los compuestos químicos en clases de toxicidad humana similares a las definidas por el sistema GHS.	136
3.2. Validación estadística de la ordenación de los compuestos químicos en clases de toxicidad humana similares a las definidas por el sistema GHS.	140

4. CONSIDERACIONES FINALES SOBRE EL VALOR PARA LA TOXICOLOGÍA DE LA PLATAFORMA CITÓMICA Y LA ESTRATEGIA CITÓMICA <i>IN VITRO</i>.	160
VI. CONCLUSIONES FINALES	163
VII. BIBLIOGRAFÍA	167

ABREVIATURAS

AM	Éster de acetoximetilo
ATP	Adenosín trifosfato
AUC	Área por debajo de la curva
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane- N,N,N',N'- tetraacetic acid
Ca ²⁺	Ión Calcio
CADD	Computer Aided Drug Design
CIPF	Centro de Investigación Príncipe Felipe
CLP	Reglamento 1272/2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas
CMF	Citometría de Flujo
DAG	sn-1,2-diacilglicerol
DiBAC	bis-(ácido 1.3-dibutilbarbiturico) trimetino oxonol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPA	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
DS	Desviación estándar
EC50	Concentración Efectiva 50%
ECACC	Colección Europea de Cultivos Celulares
ECIV	Estrategia Citómica <i>In Vitro</i>
ECVAM	Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos
EDIT	Evaluation-guided Development of New In Vitro Test
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EF	Ensayos Funcionales
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético

EV	Ensayos de Viabilidad
FP	Falsos positivos
FS	Dispersión Frontal de luz
GHS	Sistema de Armonización Global
IC50	Concentración Inhibidora 50%
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
LC50	Concentración Letal 50%
LD50	Dosis Letal 50%
LOEC	Concentración mínima con efecto observado
MEIC	Multicentre Evaluation of <i>In Vitro</i> Cytotoxicity
MIF50	Intensidad de fluorescencia máxima al 50%
MMP	Potencial de membrana mitocondrial
NRU	Neutral Red Uptake
OCDE	Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo
PBS	Tampón fosfato salino o buffer fosfato salino
PI	Yoduro de Propidio
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PLS	Regresión de mínimos cuadrados parciales
PMP	Potencial de membrana plasmática
QSARs	Quantitative structure-activity relationships
RE	Retículo endoplasmática
RMFI50	Ratio de MIF50
ROC	Receiver Operating Characteristic
SDS	Lauril sulfato de sodio
SS	Dispersión Lateral de luz

SVHC	Substances of Very High Concern
TPM	Transición de la permeabilidad mitocondrial
UVEG	Universidad de Valencia Estudio General
VP	Verdaderos positivos
WP	Work package; grupo de trabajo
Δp	Fuerza protón motriz
$\Delta\Psi$	Potencial de membrana
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. CONTEXTO REACH Y REGLAMENTO CLP.

Los actuales métodos regulados y aceptados para la determinación de toxicidad oral aguda se basan exclusivamente en la experimentación *in vivo*. El clásico ensayo de LD50 definida como “la dosis calculada estadísticamente que se espera produzca la muerte del 50% de los animales de un grupo experimental, se modificó en 2002 con 3 métodos alternativos descritos por la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OCDE): TG 420 (Procedimiento de dosis fija), TG 423 (Método de las clases de toxicidad aguda) aprobado y TG 425 (Procedimiento arriba y abajo) (1-3). Estos métodos dan lugar, a una reducción y refinamiento de la metodología para la estimación de la toxicidad sistémica aguda oral. La aplicación del nuevo Reglamento REACH sobre productos químicos de la UE (4) y la séptima modificación de la Directiva sobre cosméticos (5) motivaron el desarrollo de ensayos alternativos más rápidos, éticos, baratos y científicamente demostrados.

La entrada en vigor en enero de 2009 del Reglamento 1272/2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (**Reglamento CLP**) tuvo como objetivo conseguir un funcionamiento eficaz del comercio de sustancias y mezclas químicas determinando cuáles se deben de clasificar como peligrosas e identificándolas adecuadamente para garantizar la salud humana y del medio ambiente (6).

El reglamento CLP introdujo en la Unión Europea un nuevo sistema para clasificar y etiquetar productos químicos basados en el Sistema Globalmente Armonizado (GHS). El GHS es un sistema que se creó bajo la estructura de las Naciones Unidas para identificar los productos químicos peligrosos y para informar a los usuarios sobre sus peligros. Para ello durante doce años se desarrollaron criterios armonizados de etiquetado y clasificación (6).

El CLP modifica y deroga las Directivas sobre sustancias peligrosas (67/548/CEE) y preparados peligrosos (1999/45/CE) y da prioridad a la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros usos científicos, y deben de considerarse en primer lugar la utilización de métodos distintos a la experimentación animal para el etiquetado y clasificación de sustancias químicas en el sentido de la Directiva 2010/63/UE que tiene por objeto armonizar las leyes de los Estados miembros para reducir al mínimo el número de animales de experimentación (7) . El CLP se rige por la Reglamento 900/2014 (8) por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH) (4).

REACH regula la producción y el uso de sustancias químicas, y sus potenciales impactos tanto sobre la salud humana como sobre el ecosistema. Sus 849 páginas tardaron siete años en ser elaboradas, siendo descrito como la más compleja legislación de la historia de la

Unión Europea y la más importante en los últimos 20 años. Es hasta la fecha la legislación más estricta reguladora de las sustancias químicas e impactará en las industrias a todo lo largo del planeta. El Reglamento REACH entró en vigor en junio de 2007, mediante una fase de implantación que se extiende a lo largo de la siguiente década. Cuando el Reglamento REACH se encuentre plenamente en vigor, requerirá que todas las empresas que fabriquen o importen sustancias químicas a la Unión Europea en cantidades superiores a una tonelada al año a que registren esas sustancias en una nueva Agencia Química Europea con sede en Helsinki, Finlandia.

Alrededor de 143.000 sustancias químicas comercializadas en la Unión Europea fueron prerregistradas hasta la fecha tope del 1 de diciembre de 2008. Aunque el prerregistro no era obligatorio, otorgaba a los potenciales registrantes un plazo más extenso para el trámite de registrarse. El suministro de sustancias al mercado europeo que no hayan sido prerregistradas o registradas es ilegal (en lo que se conoce en el Reglamento REACH como "sin datos, no hay mercado").

El Reglamento REACH también regula el uso continuado de las 'Sustancias Químicas Muy Preocupantes' (abreviadamente SVHC, del inglés Substances of Very High Concern) por su potencial impacto negativo en la salud humana o en el ecosistema. Desde el 1 de junio de 2011, la Agencia Química Europea debe recibir notificación de la presencia de SVHCs en artículos en los que la cantidad total usada

sea mayor a una tonelada por año y que la SVHC esté presente en más de un 0'1 % de la masa del objeto. Algunos usos de las SVHC pueden estar sujetos a la autorización previa por parte de la Agencia Química Europea, y los solicitantes de autorización tendrán que incluir planes para reemplazar el uso de la SVHC por una alternativa más segura (o, si no existen alternativas seguras, el solicitante habrá de trabajar en conseguir una) - lo cual es conocido como 'sustitución'. A marzo de 2009 hay quince SVHCs.

El Reglamento REACH es aplicable a todas las sustancias químicas importadas o producidas en la UE, en contraste con el Acta de Control de Sustancias Tóxicas estadounidense que solo se aplica a las sustancias químicas que entran de nuevas en uso. La Agencia Química Europea gestionará los aspectos técnicos, científicos y administrativos del sistema REACH.

Aparte de los potenciales costes para la industria y de la complejidad de la nueva ley, el Reglamento REACH ha atraído también la atención dado su potencial para un incremento muy significativo de la experimentación con animales en su propuesta. La experimentación animal con vertebrados se permite sólo una vez por sustancia y cuando no puedan ser utilizadas alternativas adecuadas. El Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) que forma parte del Centro Común de Investigación de la Comisión Europea se formó en 1991 y tiene un papel importante en la evaluación y validación científicas de métodos de ensayo alternativos

como respuesta a la Directiva 2010/63/UE. La cuál en el artículo 13, apartado 1 establece que « los Estados miembros velarán por que no se realice un procedimiento si la legislación de la Unión reconoce otro método u otra estrategia de ensayo para obtener el resultado perseguido que no impliquen la utilización de un animal vivo » (7).

En la Directiva 2010/63/UE, en el apartado 2 del artículo 13 se detalla como requisito para elegir entre diversos procedimientos, la reducción del número de animales así como la disminución del dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero del animal (7).

La entrada en vigor del Reglamento REACH y CLP fomentó que la Unión Europea financiara diferentes programas marco para desarrollar estrategias *in vitro* para evaluar la seguridad de los productos químicos y reducir el número de animales y el coste económico. Entre otros programas se financió el proyecto EU FP6 AcuteTox, dirigido a diseñar una estrategia basada en ensayo de citotoxicidad, biocinética, metabolismo y toxicidad órgano específica para predecir la toxicidad sistémica aguda oral.

Todos los ensayos de toxicidad tópica con animales han sido reemplazados con éxito por métodos alternativos (9), (10), pero no ha sido así en el caso de la toxicidad química aguda sistémica.

2. CONCEPTO DE TOXICIDAD AGUDA Y SISTÉMICA.

La toxicidad aguda se define como "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 la ingestión accidental de sustancias, sobredosis o intento de suicidio.

En la toxicidad sistémica los efectos adversos se producen lejos del lugar de entrada del tóxico. Al contrario que la toxicidad local, donde el efecto tóxico de la sustancia se manifiesta en el primer lugar de contacto con el sistema biológico (ojos, vías respiratorias, piel...).

Muchas sustancias que producen toxicidad sistémica muestran mayor efecto en uno o dos órganos, los cuales se denominan órganos diana. Éstos a menudo no son el sitio de mayor concentración de la sustancia tóxica. Los órganos normalmente afectados por este tipo de toxicidad por orden de frecuencia son el sistema nervioso central; sistema circulatorio; sangre y sistema hematopoyéticos; órganos como el hígado, riñón, páncreas y piel. Músculos y huesos son raramente tejidos diana para los efectos sistémicos.

3. PRINCIPIO DE LAS TRES Rs: REDUCCIÓN, REFINAMIENTO Y REEMPLAZO.

El concepto de reposición de animales se discutió por primera vez en 1957 por Charles Hume y William Russell (11). Russell y Burch (1959) sugirieron algunas maneras de hacer los experimentos con animales más humanamente, que más tarde se llamó como 3 Rs. Este enfoque alienta el uso de un menor número de animales es decir, "reducción" en el número total de animales utilizados en un experimento. Con la ayuda de un apoyo estadístico y una cuidadosa selección del diseño del estudio se pueden producir resultados científicos significativos en un solo experimento. Por ejemplo, el cultivo de células *in vitro* es una buena manera de detectar los compuestos en las primeras etapas de la investigación (12).

El uso de animales debe ser planificado y "refinado" cuidadosamente de tal manera que el dolor y la angustia causada durante el experimento deben ser minimizados. Enriquecer el entorno de la jaula para el cuidado de los animales reduce la presión sobre éstos. Los científicos deben refinar las instalaciones de los animales para que el dolor, la incomodidad y angustia durante la vida de los animales y los procedimientos se reduzcan. Por otra parte, bajo la tensión y el malestar provocado puede haber desequilibrios en los niveles hormonales de los animales que lleven a fluctuaciones en los resultados. Por lo tanto, los experimentos que deben ser repetidos

provocan un aumento en el número de animales de experimentación. Así el refinamiento es necesario no sólo para mejorar la vida de los animales de laboratorio, sino también para mejorar la calidad de la investigación (13). Por otra parte, si es posible, los animales superiores deben ser sustituidos con metodologías alternativas y organismos inferiores (14,15). El reemplazo de animales se define como: "cualquier método científico empleando material no sensible que puede reemplazar el uso de vertebrados conscientes en la experimentación animal" (11). Los animales se sustituyen, ya sea mediante métodos que no implican ningún animal (reemplazo absoluto) o por aquellos que sólo utilizan las células o tejidos de animales (reemplazo relativo). Muchas alternativas de reemplazo implican técnicas *in vitro*, donde se realizan los estudios con células o tejidos en cultivo. Si las células provienen de los seres humanos, es reemplazo absoluto. Si provienen de animales, es reemplazo relativo. Existen varias alternativas al uso de animales, como los modelos *in vitro*, cultivos celulares, modelos informáticos y técnicas de análisis de imagen (16).

Los modelos *in vitro* proporcionan la posibilidad de estudiar la respuesta celular en un sistema cerrado, donde se mantienen las condiciones experimentales, proporcionando información preliminar para el resultado de un experimento *in vivo*.

4. MÉTODOS ALTERNATIVOS. MODELOS COMPUTACIONALES.

Estos métodos proporcionan un medio alternativo para el análisis de drogas y compuestos químicos. Presentan una serie de ventajas como son, la eficiencia del tiempo, requieren menos mano de obra, y la rentabilidad es mayor.

Los modelos computacionales se utilizan para predecir los posibles efectos biológicos, tóxicos y el potencial químico de un fármaco sin disección de animales (17).

Sólo las moléculas más prometedoras obtenidas de un cribado primario se utilizan para la experimentación *in vivo*. Por ejemplo, para conocer el sitio de unión al receptor de un fármaco, la experimentación *in vivo* es necesaria. El software conocido como Computer Aided Drug Design (CADD) se utiliza para predecir el sitio de unión al receptor de un fármaco potencial. CADD trabaja para identificar el sitio de unión y por lo tanto evita probables ensayos *in vivo* de productos químicos no deseados que no tienen actividad biológica (14).

Quantitative structure-activity relationships (QSARs) son técnicas informáticas que pueden reemplazar a las pruebas con animales, haciendo cálculos sofisticados de la probabilidad de que una

sustancia pueda ser peligrosa, basados en su similitud con las sustancias existentes y el conocimiento de la biología humana (18) (19).

Este conjunto de técnicas informáticas reducen el número total de animales de experimentación y logran los objetivos de Russel y de Burche 3 Rs.

5. CONCEPTO DE CITOTOXICIDAD BASAL.

Björn Ekwall (1940-2000) toxicólogo sueco hizo contribuciones pioneras en el campo de la toxicología *in vitro*. En concreto, formuló el llamado “concepto de citotoxicidad basal” (20), según el cual, el daño que producen las sustancias tóxicas en el ser humano se debe a la interferencia con las funciones comunes de todas las células especializadas.

La toxicidad aguda sistémica suele resultar de la toxicidad a nivel celular, es decir, de citotoxicidad. Esta, a su vez, se produce como consecuencia de la interferencia de los tóxicos con estructuras y/o propiedades esenciales para la supervivencia, la proliferación y la función de las células.

A partir de este concepto de citotoxicidad basal, Ekwall en 1983, desarrolló una clasificación de la toxicidad dividida en tres categorías (20).

a) Citotoxicidad basal: afecta a una o varias de las estructuras y procesos celulares clave, y todos los tipos celulares estudiados muestran una susceptibilidad similar.

b) Citotoxicidad órgano-específica: se produce cuando algunos tipos de células diferenciadas son más sensibles a los efectos de un tóxico particular que otras, como consecuencia de su transformación, su unión a receptores específicos o por su captación dependiente de mecanismos.

c) Toxicidad extracelular: sucede cuando un producto químico afecta a la secreción de sustancias desde las células o cuando funciones extracelulares se ven afectadas.

6. DE LOS PROGRAMAS MEIC Y EDIT AL PROGRAMA ACUTETOX.

El programa MEIC (Multicentre Evaluation of *In vitro* Cytotoxicity) fue un programa internacional para evaluar la relevancia y fiabilidad de los test *in vitro* para predecir la toxicidad aguda humana.

El estudio fue iniciado por Björn Ekwall en 1989 y organizado por el comité de la Sociedad Escandiva de Toxicología Celular.

Durante 1989-1996, 97 laboratorios de todo el mundo se presentaron voluntarios para testar los mismos 50 compuestos con sus propios sistemas *in vitro* de manera totalmente gratuita y luego someter los resultados al comité del programa MEIC.

Las referencias de los compuestos fueron seleccionadas por expertos del Centro de Información de Envenenamientos Sueco. Las referencias seleccionadas representaban diferentes clases de compuestos con toxicidad humana variada.

Los objetivos y normas del programa junto a las primeras 50 referencias de los compuestos fueron publicadas por Wallum y Ekwall en 1989 (21).

El estudio tenía tres objetivos, el primero de ellos era la evaluación de la relevancia de los test de citotoxicidad *in vitro* para predecir la toxicidad humana aguda sistémica, basándose en la correlación de la IC50 obtenida de los test de citotoxicidad con los datos de toxicidad humana (22).

El segundo objetivo era evaluar los valores de LD50 de rata para predecir la toxicidad humana aguda sistémica, y además comparar la predictividad de los métodos *in vitro* con los métodos con animales.

El último objetivo era construir una batería de métodos *in vitro* con la mejor predicción para la toxicidad humana aguda sistémica (20), (23), (24).

Con el fin de realizar una base de datos con las concentraciones en sangre letales de humano, se creó el sub-proyecto MEMO. En dicho proyecto se recogían las concentraciones en sangre letales tanto en suero como en plasma, junto con la descripción clínica y los casos forenses por envenenamiento. Para la realización de la base de datos se trabajó con diferentes centros de envenenamiento de diferentes países, además de incluir información de libros de texto, revistas y bases de datos. La información recogida en el proyecto MEMO constaba de: las dosis letales en humano, las concentraciones en sangre letales y subletales procedentes de datos clínicos y forenses, el tiempo entre la ingestión y la muerte, el órgano diana, el mecanismo tóxico de envenenamiento y la LD50 tanto para rata como para ratón (22).

Cuando concluyó el proyecto en febrero de 1996, 29 laboratorios habían testado los 50 compuestos utilizando 67 ensayos citotóxicos. Los resultados obtenidos de la evaluación *in vitro-in vivo* fueron publicados en ocho artículos en la revista ATLA.

En los primeros cuatro artículos se describen los métodos y presentan los resultados de 67 ensayos *in vitro* en las 50 referencias de los compuestos (25–28).

La parte V contiene la base de datos de las LC50 en sangre de humano de los 50 compuestos (26). Entendiendo como LC50 la concentración, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de ésta, del 50% de los animales expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado (29).

En los tres últimos artículos se comparó los valores de LD50 en rata con los valores de LC50 en sangre de humano. Además se realizó una comparación entre los valores de IC50 procedentes de 67 ensayos *in vitro* para los 50 compuestos con los valores de LC50 de dosis letales en humano (30), (31). Y se realizó una evaluación estadística de los resultados usando un análisis de regresión lineal y de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) (32).

Se obtuvieron correlaciones alrededor del 70% entre los valores de citotoxicidad basal *in vitro* y las concentraciones letales en sangre. A pesar de los buenos resultados, el ensayo de citotoxicidad basal no predecía completamente la toxicidad sistémica aguda, ya que alrededor del 14% de los compuestos estaban mal clasificados (los denominados outliers) (33), (32), (34).

Al finalizar el programa MEIC, Ekwall comenzó en 1999 un nuevo programa internacional multicentro llamado EDIT (Evaluation-guided Development of New *In vitro* Test). El objetivo del programa era ampliar la batería de ensayos obtenidos del programa MEIC,

añadiendo ensayos toxicocinéticos u órganos específicos (35). Por desgracia, el programa no se terminó debido a la muerte de Ekwall.

Sin embargo gracias a programas como MEIC y EDIT que han contribuido al desarrollo de ensayos de citotoxicidad *in vitro*, en los últimos años se han desarrollado nuevos proyectos internacionales 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.

En este contexto, el VI Programa Marco de la Unión Europea financió el Proyecto Integrado **ACuteTox**. El Laboratorio de Citómica (Unidad Mixta de Investigación CIPF-UVEG) fue responsable del grupo de trabajo: New cell systems, new endpoints.

El programa tuvo una duración de 5 años, desde 2005 a 2010 y en él intervinieron 35 participantes, procedentes de 13 países diferentes, distribuidos en 10 grupos de trabajo como se muestra en la Figura 1. El objetivo general del proyecto fue desarrollar una estrategia basada únicamente en ensayos *in vitro* e *in silico* lo suficientemente robusta para reemplazar los métodos *in vivo* para determinar la toxicidad sistémica aguda en humano. Además de clasificar los compuestos dentro de las diferentes clases de toxicidad según el reglamento CLP y el GHS y de esta manera reducir los costes y mejorar la validez científica de los resultados.

Los objetivos científicos del proyecto, fueron:

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

Según el CLP las sustancias clasificadas como peligrosas se deben envasar y etiquetar de acuerdo a su clasificación. Para ello se utilizan etiquetas y fichas de datos establecidas en el Reglamento n° 1907/2006 (4) y es el único instrumento de información para consumidores y trabajadores. De esta manera todos se benefician de una herramienta armonizada de comunicación de peligros mediante el etiquetado, como se explica en el Reglamento CLP (6).

Los criterios para clasificar las sustancias por su toxicidad aguda, se basan en los valores de dosis letales. Según el rango estimado de

LD50 la sustancia química se clasificará en una de las cuatro categorías de toxicidad.

En la etiqueta de las sustancias o las mezclas que cumplan los criterios de clasificación para esta clase de peligro figurarán los elementos de acuerdo con los pictogramas de peligro, las palabras de advertencia, las indicaciones de peligro y los consejos de prudencia que constituyen la información básica del GHS tal como se presenta en la Figura 2.

Según el Reglamento CLP existe una clase más para los compuestos con una LD50 superior a 2000 mg/L. A los cuales no se les asigna ningún pictograma de seguridad.

Otro de los objetivos principales del proyecto es la identificación de los factores que mejoren y optimicen la correlación *in vitro-in vivo* para la toxicidad sistémica aguda. Sin embargo cuando se utilizan los ensayos *in vitro* existentes y se comparan con los valores de toxicidad *in vivo*, un cierto número de compuestos son mal clasificados.

Los grupos de trabajo (WP) 1 y 2 se ocuparon de generar la base de datos *in vivo* e *in vitro* respectivamente.

En la WP1 se realizó una selección de las referencias de los compuestos que se iban a utilizar y generó la base de datos *in vivo*. Este grupo proporcionó al resto de grupos de trabajo los valores de

dosis letal (LD50) en rata y ratón y los valores de concentración letal (LC50) determinados en sangre en casos de envenenamiento en humanos. Los valores de LD50 y de LC50 están disponibles en la base de datos del proyecto Acutoxbase (36) publicados (37), (34) para permitir correlacionar y los resultados *in vitro* con los valores *in vivo*. El objetivo de la WP2 fue definir los protocolos y criterios de aceptación para generar la base de datos (38). Los valores *in vitro* de concentración inhibitoria (IC50) se realizaron en la línea celular de ratón 3T3 y el ensayo de citotoxicidad que se utilizó fue la Captación de Rojo Neutro (NRU) (39). Estos valores se utilizaron para la identificación de los compuestos mal clasificados (outliers) al compararlos con los valores *in vivo* publicados. Los objetivos de las demás WP se detallan en la figura 1.

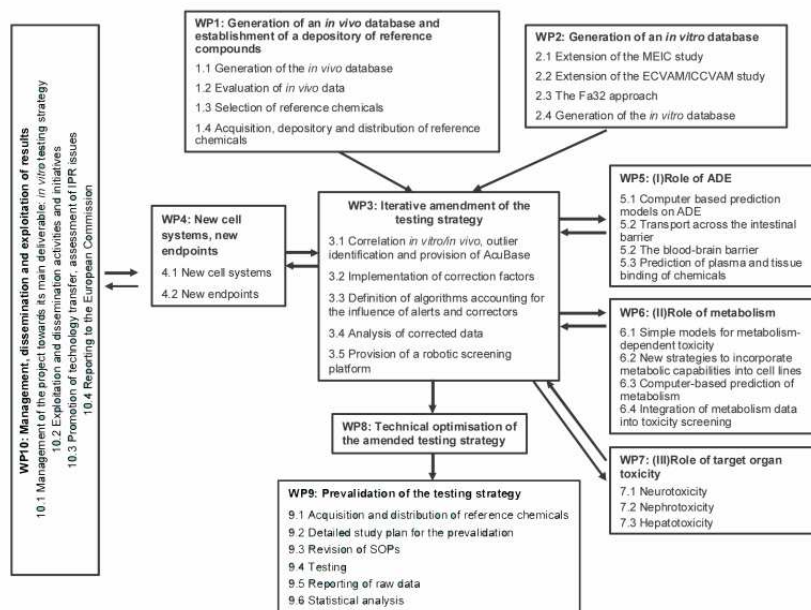


Figura 1. Estructura del plan de trabajo del proyecto AcuteTox.





	Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV
Rango concentración	0-5 mg/L	5-50 mg/L	50-300 mg/L	300-2000 mg/L
Pictograma del SGA				
Palabra de advertencia	PELIGRO	PELIGRO	PELIGRO	ATENCIÓN
Indicación de peligro en caso de ingestión	MORTAL	MORTAL	TÓXICO	NOCIVO

Figura 2. Esquema de la clasificación de sustancias químicas y el etiquetado por su toxicidad según el GHS. Se indica: el rango de concentración asignado a cada clase; los pictogramas; la palabra de advertencia y la indicación de peligro (6).

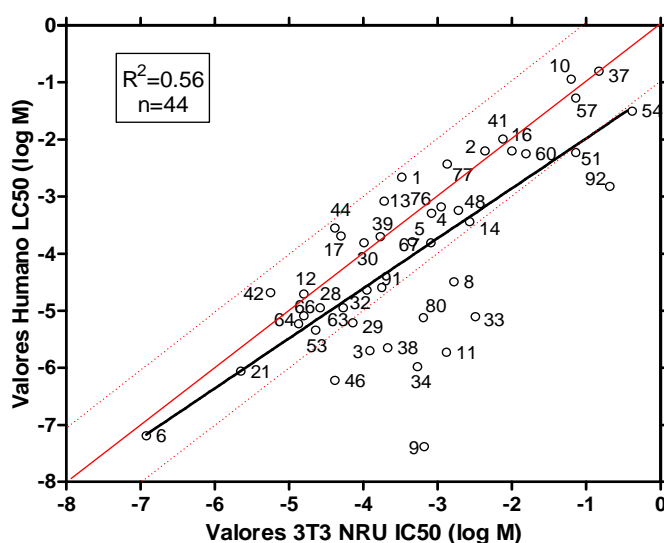


Figura 3. Correlación entre valores de toxicidad aguda *in vivo* en humanos (concentración letal LC50 en sangre) y de citotoxicidad basal *in vitro* (concentración inhibitoria IC50) determinada por el ensayo de captación de Rojo Neutro en células 3T3 (37). Los números corresponden a la referencia del compuesto usada en el proyecto AcuteTox. La línea continua representa una correlación 1:1 y la línea discontinua roja representa \pm la desviación de una unidad de logaritmo de la línea de correlación 1:1, generando los límites para la identificación de outliers y alertas.

7. LA CITOMETRÍA DE FLUJO COMO ESTRATEGIA EN TOXICOLOGÍA *IN VITRO*.

7.1 CITOMETRÍA DE FLUJO (CMF).

La CMF permite la medida simultánea de emisiones de fluorescencia y dispersión de luz 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 (40). 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.

El término «Citómica» (Cytomics) apareció por primera vez en 2001 (41) e introducía a la CMF dentro del conjunto de disciplinas denominadas «ómicas» como son la genómica, proteómica o metabolómica (42). El objetivo de la citómica es entender los sistemas celulares complejos, estudiando el fenotipo molecular de la célula como resultado de la interacción del genoma y el ambiente extracelular (43) mediante el análisis célula a célula.

La CMF se ha convertido en una de las tecnologías analíticas de fluorescencia más avanzadas y que evoluciona más rápidamente. Con respecto a otras -ómicas basadas en la fluorescencia, la CMF es

ventajosa porque permite la cuantificación simultánea de múltiples parámetros biológicos sobre la misma célula o partícula, a la vez que miles de ellas son examinadas por segundo cuando desfilan de una en una a través de un sistema adecuado de iluminación (42). Como consecuencia, un amplio abanico de tipos de poblaciones celulares heterogéneas puede ser descrito mediante las propiedades biométricas de sus componentes individuales. 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 permiten definir nuevas correlaciones internas, modificar la selección de subpoblaciones y correlacionar los datos con otros descriptores biológicos, evaluando el carácter predictivo de la CMF (44), (45). 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* (43).

7.2 INSTRUMENTACIÓN Y FUNCIONAMIENTO DE UN CITÓMETRO DE FLUJO.

Los citómetros de flujo constan a grandes rasgos de un sistema de fluidos, de un sistema óptico-electrónico y de un sistema informático. El **sistema de fluidos** está constituido por el líquido que contiene la suspensión celular y el líquido envolvente que transporta las células. Ambos líquidos son empujados por un sistema regulable de presiones y entran en contacto en la **cámara de flujo**, donde las

células se introducen en el centro del fluido envolvente generándose un flujo laminar (46). Las células deben de cruzar perpendicularmente, alineadas y de una en una a través del punto de interrogación, que es el punto donde el láser y la muestra se cruzan y el sistema óptico recoge la fluorescencia y la dispersión frontal (FS) y lateral (SS) de la luz. Estas magnitudes son proporcionales al tamaño de la célula en el caso del FS a y su complejidad y granulosidad en el caso del SS (47).

Como se muestra en la figura 4 la dispersión frontal y lateral permiten diferenciar claramente, por ejemplo entre células vivas y muertas.

La luz fluorescente procedente de las células marcadas pasa a través de la luz del laser siguiendo el mismo camino que la luz del SS. Y pasa directamente a través de unos **filtros y espejos** que dejan pasar una determina longitud de onda hasta el detector apropiado (46).

Un filtro óptico es un dispositivo que transmite selectivamente un intervalo de longitudes de onda, evitando el paso del resto de luz fluorescente. Existen diferentes tipos de filtros:

Filtros de paso largo (Long Pass): transmiten luz por encima de un valor de longitud de onda

Filtros de paso corto (Short pass): transmiten luz por debajo de un valor de longitud de onda

Filtros de paso de banda (Band pass): transmiten luz alrededor de un valor de longitud de onda

Filtros de bloqueo (Blocking): transmiten toda la luz excepto alrededor de un valor de longitud de onda

Filtros de densidad neutra (ND): reducen la intensidad total de la luz transmitida.

La luz fluorescente una vez llega al detector es traducida en un pulso eléctrico cuya área, altura y anchura son directamente proporcionales a la fluorescencia emitida (48).

Estas señales se amplifican multiplicándolas por un factor lineal o logarítmico. En el caso de la dispersión frontal y lateral se suele analizar de forma lineal mientras que la fluorescencia se analiza de forma logarítmica.

Todos los pulsos son grabados y se pueden representar gráficamente en forma de histogramas o gráficas de densidad de puntos.

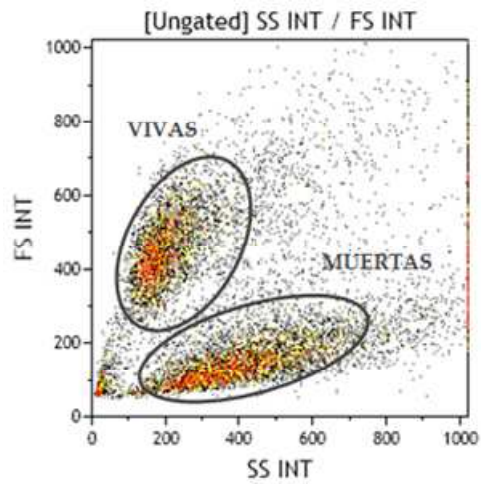


Figura 4. Características morfológicas de la línea celular SH-SY5Y, determinadas por los parámetros citométricos de dispersión frontal (FS) y lateral (SS)

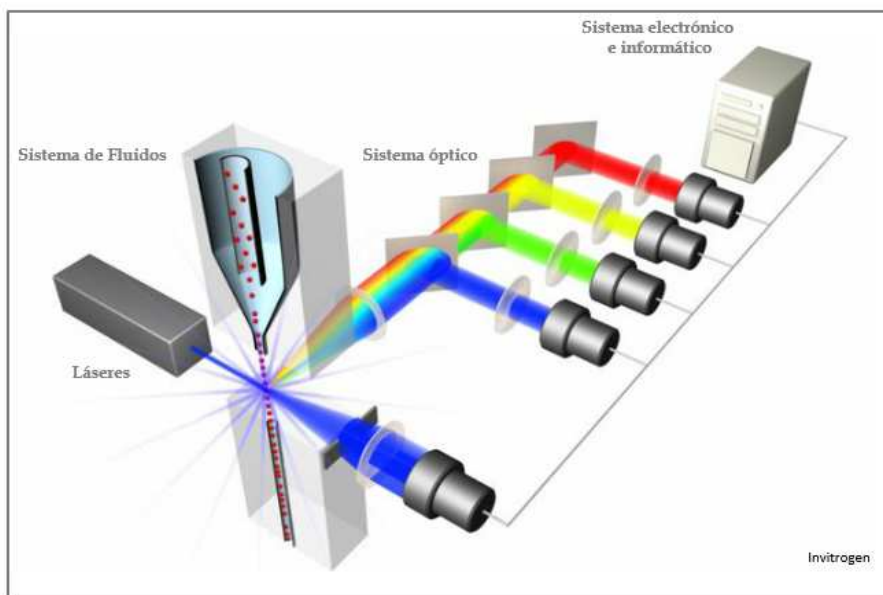


Figura 5. Esquema general de un sistema de citometría de flujo. Imagen adaptada de la página web de Invitrogen (www.invitrogen.com)

8. NUEVAS TÉCNICAS Y PARÁMETROS PARA LA EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD

En la Estrategia Citómica *In Vitro* (ECIV) que se plantea en este trabajo se van a cuantificar los siguientes parámetros celulares: Viabilidad Celular, Potencial de Membrana Plasmática, Potencial de Membrana Mitocondrial y Niveles de Calcio Intracelular.

8.1. MEDICIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Cuando una célula se expone a un agente tóxico sufre una serie de modificaciones en su membrana plasmática y en su citoesqueleto.

En las células apoptóticas se reduce su volumen alrededor de un 30 y un 50% (49) esa disminución es provocada por la liberación de partículas del retículo endoplasmático que migran y se fusionan en la membrana plasmática, liberando su contenido al medio extracelular (49).

Las células necróticas sufren un aumento en su volumen celular provocado por la pérdida de control del flujo de iones, resultando en la entrada masiva de agua dentro de la célula.

La integridad de la membrana citoplasmática y el estado fisiológico de la célula son dos propiedades fundamentales para la medición de

la viabilidad celular. Cuando las células tienen las membranas intactas son impermeables a moléculas cargadas, además de mantener el gradiente citoplasmática. Hecho que refleja el estado fisiológico de las células, ya que para mantener ese gradiente intracelular de iones la célula necesita energía.

Para la medición de la viabilidad celular en la ECIV se han utilizado dos métodos: el ensayo de Captación de Rojo Neutro (NRU) y el ensayo de entrada de Yoduro de Propidio (PI). Ambos métodos permitirán el cálculo de la IC50 (Concentración Inhibitoria al 50%) para cada compuesto en las tres líneas celulares, una vez calculada la IC50 se procederá a la realización del ensayo citómico utilizando un rango de concentraciones que irá desde la IC20 a la IC80.

El fluorocromo yoduro de propidio es incapaz de entrar en células con su membrana intacta o con un metabolismo activo. Cuando la célula tiene su membrana dañada el yoduro de propidio entra en el núcleo y se intercala entre el ADN emitiendo una fluorescencia que el citómetro detecta a una longitud de onda aproximadamente de 620 nm.

El método del Rojo Neutro (*3-amino-7-dimetilamino-2-metil fenazina* hidrocloreto), se utilizó previamente para la identificación de células vivas en cultivos celulares (50).

El Rojo Neutro se acumula en los lisosomas de las células viables no dañadas. Además, el Rojo Neutro absorbe la luz de manera óptima a una longitud de onda de 540 nm y sus cualidades fotocolorimétricas no varían por efecto de la luz, oscuridad y temperatura (37°C), manteniéndose estable a través del tiempo.

8.2. BASES FÍSICO QUÍMICAS DEL POTENCIAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA ($\Delta\Psi$).

Las permeabilidades de las membranas biológicas a los iones como H^+ , Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , etc., se controlan mediante sistemas específicos de transporte.. Las diferencias de carga que resultan a través de una membrana biológica generan una diferencia de potencial eléctrico, $\Delta\Psi = \Psi(\text{dentro}) - \Psi(\text{fuera})$, donde $\Delta\Psi$ se denomina **potencial de membrana** (51).

Existen dos proteínas que son cruciales para generar y mantener el potencial de membrana. La primera es la bomba de $Na^+ - K^+$, que bombea activamente Na^+ al exterior de la célula y K^+ al interior, de forma que la concentración de K^+ es superior en el interior, sucediendo lo contrario para el Na^+ . La otra proteína es un canal de fuga de K^+ , este canal fluctúa en forma aleatoria entre los estados abierto y cerrado independientemente de las condiciones presentes en el interior o exterior de las células y cuando están abiertos permiten el libre desplazamiento del K^+ . En una célula en reposo estos canales representan los principales canales iónicos abiertos en la

membrana plasmática. Esto determina que la membrana plasmática en reposo sea mucho más permeable al K^+ que a otros iones. Como consecuencia de la salida neta de K^+ , el interior de la célula pasa a ser eléctricamente negativo en relación con el exterior. El potencial de membrana resultante retarda el movimiento hacia fuera de la célula del K^+ a través del canal de fuga. Así la tendencia del K^+ a salir de la célula a causa de su gradiente de concentración se halla exactamente equilibrada por la tendencia del K^+ a entrar en la célula a causa de su gradiente eléctrico (potencial de membrana). En este punto se alcanza el potencial de membrana en reposo, y es en esta condición de equilibrio en la que el flujo de iones positivos y negativos a través de la membrana plasmática se encuentra exactamente equilibrado, por lo que no se acumulará ninguna diferencia de carga adicional a través de la membrana. En las células animales, el potencial de membrana en reposo varía entre -20 y -200 milivoltios (mV) según el organismo y el tipo celular considerados. Este parámetro se expresa como valor negativo debido a que el interior de la célula es negativo con respecto al exterior (las cargas negativas intracelulares predominan ligeramente con respecto a las positivas).

El potencial de membrana en reposo a través de la membrana citoplasmática se estima frecuentemente mediante la ecuación de Goldman (52):

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_e}{P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e + P_{Cl} [Cl^-]_i}$$

Donde $\Delta\Psi$ es el potencial de membrana, R la constante gaseosa (8,314510 J/mol*K), T es la temperatura en grados Kelvin (K), F es la constante de Faraday (9,6485309x 10⁴ C/mol), $[X]_i$ es la concentración del ión X en el interior celular, $[X]_e$ es la concentración del ión X en el exterior celular, y P_x es la permeabilidad de la membrana para el ión X.

Puesto que el canal de fuga de K⁺ es ligeramente permeable al Na⁺, algunos iones Na⁺ penetran lentamente en la célula siguiendo su gradiente electroquímico. Esta entrada neta de Na⁺ hace que el interior de la célula quede cargado más positivamente, y por consiguiente, reduce el potencial de membrana y permite que más iones K⁺ abandonen la célula. Esto conduciría a la igualación de las concentraciones y a la desaparición del potencial de membrana, pero no es así gracias a la bomba Na⁺-K⁺. Ésta mantiene el gradiente de concentración de Na⁺ y K⁺ través de la membrana, bombeando 3 iones Na⁺ hacia el exterior y 2 iones K⁺ hacia el interior de la célula, con la hidrólisis concomitante de ATP intracelular (53)

Después de una hiperpolarización de la membrana, la cual se define como un incremento en la magnitud del $\Delta\Psi$, el valor de $\Delta\Psi$ es más bajo que antes (por ejemplo: -150 vs -60 mV). Cuando se produce una despolarización de la membrana, en el caso de mitocondrias o bacterias la despolarización es completa cuando el $\Delta\Psi$ va desde un valor negativo a cero. Pero no es así en el caso de la membrana plasmática, durante el potencial de acción de las células musculares o

nerviosas el interior celular resulta transitoriamente positivo respecto al exterior. De esta forma se asume $\Delta\Psi$ en las células u orgánulos es inicialmente negativo en el interior, una despolarización dejará el interior menos negativo, y una hiperpolarización dejará el interior más negativo (54).

8.2.1 ESTIMACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.

El Potencial de Membrana Plasmática se ve afectada por compuestos citotóxicos y juega un papel central en muchos procesos fisiológicos, incluidos la propagación del impulso nervioso, la contracción muscular, señalización celular y entrada de iones a través de canales.

Para la determinación del $\Delta\Psi$ se utilizan marcadores lipofílicos fluorescentes catiónicos o aniónicos. Conocidos como fluorocromos distribucionales, éstos pueden atravesar la membrana fácilmente hasta que $\Delta\Psi$ alcance el equilibrio. La distribución intracelular y extracelular del fluorocromo se mide por citometría de flujo, y se usa para estimar el $\Delta\Psi$.

Cuando las células se han equilibrado con un indicador catiónico (como es el caso de las cianinas), una despolarización de las células se traduce como una reducción en el $\Delta\Psi$, la cual causará una liberación del indicador al medio por parte de las células. Cuando se produzca una polarización de las células se incrementará el $\Delta\Psi$, el cual provocará la entrada de indicador a las células. Lo contrario sucederá

cuando el indicador sea aniónico como es el caso de los oxonoles. Estos ensayos distribucionales son adecuadas para la detección de cambios lentos en el $\Delta\Psi$, éstos no se pueden utilizar para cambios rápidos como ocurre en la propagación de potenciales de acción en tejidos como el músculo o los nervios.

Los oxonoles son fluorocromos cargados negativamente, la concentración intracelular se mantiene inferior que la concentración extracelular, de esta manera resulta menos tóxico para la célula. Además no se acumulan en los orgánulos. A parte no se ven afectados por las bombas de eflujo. Por estas razones para la ECIV se ha elegido el fluorocromo bis-(ácido 1,3-dibutilbarbitúrico) trimetino oxonol, o DiBAC4(3) (DiBAC) es un fluorocromo aniónico lipofílico excluido de la membrana plasmática por su potencial eléctrico negativo. DIBAC se acumula en las células una vez se ha perdido o diseminado el potencial eléctrico. Un incremento en la intensidad de fluorescencia del DIBAC se asocia a la despolarización de la membrana, mientras que una disminución del DIBAC debido a la salida del fluorocromo refleja una hiperpolarización de la membrana. Además se excita y emite con los mismos filtros que se utilizan para la fluoresceína ($\lambda_{\text{excitación}}$ a 488 nm; $\lambda_{\text{emisión}}$ a 520-530nm). En la Figura 6 se muestra su estructura química.

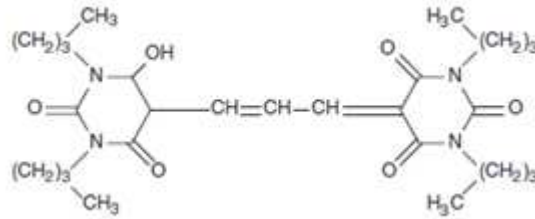


Figura 6. Estructura del fluorocromo oxonol bis(1,3-dibutilbarbiturico) trimetine oxonol, DiBAC₄(3). Adaptado de Practical Flow Cytometry. Shapiro, 1994 (55).

8.3. HOMEOSTASIS DEL Ca²⁺ EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS.

El calcio está implicado en numerosas funciones celulares como son la contracción muscular, activador de exocitosis, glucógenolisis y muerte celular, lo cual convierte el calcio en una diana celular a tener en cuenta en Toxicología *In Vitro*.

En condiciones de reposo, las células eucariotas mantienen la concentración intracelular del ión calcio libre en el citosol muy baja. La concentración intracelular es unas 10.000 veces inferior a la del mismo ión en el compartimento extracelular, ya que la mayor parte del Ca²⁺ de las células se encuentra unido a otras moléculas o secuestrado en las mitocondrias y en otros orgánulos intracelulares. Esto es debido a la existencia de un enorme gradiente de la concentración de Ca²⁺ libre a través de la membrana plasmática de las

células, gradiente que tiende a impulsar al Ca^{2+} hacia el interior de la célula (56).

Los estímulos extracelulares que conducen a liberación del calcio deben estar mediados por una señal intracelular. Se observó que la movilización de calcio y la tasa de recambio del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) estaban estrechamente relacionados. El PIP_2 es parte de un importante sistema de mensajeros secundarios, **la cascada del fosfoinosítido**. Dicha cascada media en la transmisión de numerosas señales hormonales y produce hasta tres tipos de mensajeros secundarios a través de la siguiente secuencia de acontecimientos:

- La unión de un agonista al receptor específico de membrana, por mediación de la proteína G, G_p , activa al enzima integral de membrana fosfolipasa C para que hidrolice el (PIP_2) a inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y sn-1,2-diacilglicerol (DAG).
- El IP_3 , hidrosoluble, actuando como un mensajero secundario, difunde a través del citoplasma hasta el retículo endoplasmática (RE), donde estimula la liberación de calcio hacia el citoplasma, posiblemente a través de interacciones con un sistema de transporte de calcio unido a RE.
- El calcio, a su vez, estimula una variedad de procesos celulares por mediación de la calmodulina y sus homólogos (51).

Para mantener una baja concentración de calcio intracelular, cualquier entrada neta de calcio a través de la membrana plasmática debe estar compensada por una salida neta a través de esta membrana. Esto se consigue gracias a una Ca^{2+} -ATPasa, unida a la membrana plasmática, que utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para bombear Ca^{2+} fuera de la célula. En algunas células, el Ca^{2+} también se expulsa activamente por otras bombas unidas a la membrana plasmática que actúan como transporte de intercambio impulsados por Na^+ , acoplando la salida de Ca^{2+} a la entrada de Na^+ , (53).

Las Ca^{2+} -ATPasas unidas a las membranas posibilitan que RE capte grandes cantidades de Ca^{2+} del citosol en contra de un intenso gradiente de concentración. Las mitocondrias en cambio utilizan el gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna, generado durante la fosforilación oxidativa, para impulsar la absorción de Ca^{2+} procedente del citosol (51).

El mantenimiento de los niveles de Ca^{2+} se consigue gracias a los sistemas de transporte en la membrana plasmática y en las membranas de los diferentes orgánulos subcelulares, así como de la unión específica de Ca^{2+} a diferentes proteínas citosólicas con distinto grado de afinidad, como se resume en la Tabla 1 (56).

Un aumento de Ca^{2+} intracelular (1-10 μM) mantenido durante algunos minutos, es suficiente para provocar alteraciones

metabólicas, eléctricas y estructurales que conducen a la muerte celular (56). Este aumento es debido al eflujo neto de Ca^{2+} través de la membrana plasmática y la liberación de Ca^{2+} de las mitocondrias y del RE, como se muestra en la Figura 7, así como de aumentos inespecíficos en la permeabilidad de membrana.

Este incremento activa varias enzimas, con efectos celulares potencialmente deletéreos. Las enzimas que se activan por el calcio incluyen ATPasas (aceleran la depleción del ATP), fosfolipasas (producen lesión en la membrana), proteasas (rompen las proteínas de membrana y citoesqueléticas), y endonucleasas (responsables de la fragmentación del DNA y la cromatina). Los niveles incrementados de Ca^{2+} intracelular también dan lugar a un hiperproducción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. También provoca un aumento en la permeabilidad mitocondrial y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, desencadenando el evento conocido como **la transición de la permeabilidad mitocondrial (TPM)**. Es un poro transmembrana que permite la entrada de agua y solutos. Al entrar gran cantidad de agua, la mitocondria se hincha y se agota el ATP por detenerse su producción, provocando la muerte celular (57)

Tabla 1. Resumen de los mecanismos implicados en la homeostasis intracelular de Ca^{2+} .

<p>1. TRANSPORTE DE Ca^{2+} A TRAVÉS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.</p> <ul style="list-style-type: none">- Canales de Ca^{2+}- Intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$- ATPasa dependiente de Ca^{2+}
<p>2. TRANSPORTE DE Ca^{2+} A TRAVÉS DE MEMBRANAS INTRACELULARES</p> <ul style="list-style-type: none">- ATPasa dependiente de en retículo endoplásmico y calciosomas- Calsequestrina en cisternas terminales del retículo endoplásmico.- Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana mitocondrial.- Transporte unidireccional dependiente del potencial de membrana mitocondrial.
<p>3. UNIÓN DE POR PROTEÍNAS CITOSÓLICAS</p> <ul style="list-style-type: none">- Calmodulina- Troponina C y Parvalbúmina- Sinexina y Calelectrinas- Diferentes proteínas relacionada inmunológicamente

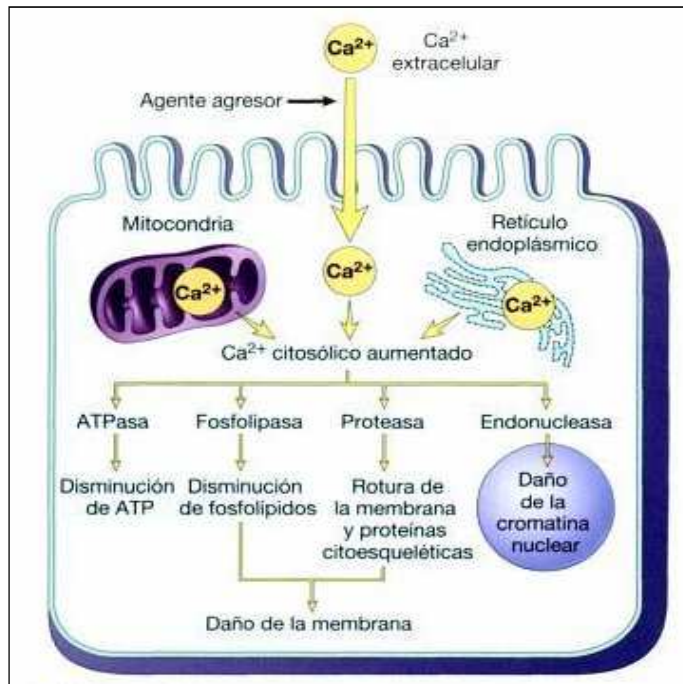


Figura 7. Fuentes y consecuencias del aumento de Ca^{2+} citosólico en la agresión celular. Adaptado de Robbins y Contran, Patología estructural y funcional (Vinay Kumar, Abul K. Abbas 2008)

8.3.1 ESTIMACIÓN DE LOS NIVELES DE CALCIO INTRACELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

La citometría de flujo permite la aplicación de fluorocromos a la cuantificación del Ca^{2+} en suspensiones celulares o en partículas individuales (58). La información obtenida permite estimar el contenido medio de la población y, gracias al análisis individualizado, la posible heterogeneidad de su distribución.

En los últimos años se han desarrollado una serie de fluorocromos que sufren cambios en sus propiedades espectrales tras su unión a iones Ca^{2+} . En su mayoría, son derivados fluorescentes de los quelantes clásicos de Ca^{2+} , como el EGTA y BAPTA, modificados químicamente para mantener distintos grados de afinidad hacia los iones de Ca^{2+} y adquirir capacidad de emisión de fluorescencia (59).

El Fluo-4 AM se utiliza como fluorocromo indicador del calcio intracelular que revela muchos de los procesos dinámicos de señalización del calcio. Fluo-4 AM es un derivado del EDTA, un quelante del calcio. Su forma esterificada AM le permite atravesar la membrana libremente, una vez retenido dentro de la célula por acción de esterasas intracelulares se convierte en su forma activa Fluo-4, que rápidamente secuestra el calcio. Esta unión se refleja como un aumento de la fluorescencia verde (525 nm).

8.4 LAS MITOCONDRIAS.

Desde hace tiempo, se sabe que en las mitocondrias se centran la producción de energía para la célula, genera alrededor del 95% del ATP. Además juega un papel crucial en la oxidación de ácidos grasos, homeostasis del calcio, síntesis de esteroides, termogénesis, muerte celular programada y supervivencia celular. De ahí su importancia como diana celular de diferentes xenobióticos y como anomalías en su estructura y función están relacionadas con diversas enfermedades

8.4.1. LA MITOCONDRIA Y LA MUERTE CELULAR.

Los procesos que ocurren en las mitocondrias son esenciales para la vida de las células. Son la fuente de energía para la célula, en ella se sintetiza el ATP a partir de la glucosa y otros combustibles por medio del Ciclo de Krebs. Por ello cualquier alteración en las mitocondrias resulta tan grave para célula, la gravedad de la lesión dependerá del número de mitocondrias afectadas. Cuando son pocas las mitocondrias afectadas, la autofagia constituye el mecanismo responsable de eliminar el daño de estos orgánulos. Cuando son todas las mitocondrias las afectadas, la consecuencia es el agotamiento del ATP con la resultante necrosis celular. Y por último cuando son muchas las afectadas el mecanismo que se activa es la apoptosis. Resulta paradójico que siendo tan importantes para la supervivencia celular también participen en la muerte celular programada o apoptosis.

8.4.2. IMPORTANCIA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_M$).

Éste es un parámetro fisiológico muy importante ya que está relacionado con la capacidad que tiene la célula para generar ATP en la fosforilación oxidativa, es un indicador de la salud celular.

La energía que requiere la célula la obtiene principalmente en forma de ATP gracias a la fuerza protón motriz (Δp).

La transferencia de electrones a lo largo de la cadena respiratoria (desde el complejo I al IV) va acompañada de un bombeo de protones hacia el espacio intermembrana, esto da lugar a una distribución asimétrica de cargas ($\Delta\Psi_m$), donde el interior de las mitocondrias queda cargado más negativamente que el exterior. A la vez provoca también una distribución asimétrica de H^+ , el pH exterior es más ácido que el interior (ΔpH).

El $\Delta\Psi_m$ junto con el ΔpH da lugar a la fuerza protón motriz (Δp) que se usa posteriormente para impulsar la síntesis de ATP, en la medida que los protones fluyen pasivamente hacia la matriz, a través de la subunidad F_o de la ATP Sintasa.

Mientras que Δp proporciona la fuerza bioenergética para conducir y regular la producción de ATP, el $\Delta\Psi_m$ componente de Δp proporciona el gradiente de cargas para el secuestro del Ca^{2+} mitocondrial, regula la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (60) además de ser un regulador central en la homeostasis celular (60), (61–64).

8.4.3. MEDICIÓN DEL $\Delta\Psi_m$ POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

La determinación del $\Delta\Psi_m$ indica el estado fisiológico y funcional de la mitocondria.

Los fluorocromos lipofílicos catiónicos como la tetrametilrodamina metil ester (TMRM) miden directamente el $\Delta\Psi_m$, componente de Δp .

Estos fluorocromos se acumulan en la mitocondria de forma inversamente proporcional al $\Delta\Psi_m$ según la ecuación de Nerst (61–65).

Cuanto más polarizada está la mitocondria, más negativo es el $\Delta\Psi_m$. El fluorocromo se acumulará más en el interior de la mitocondria. Cuando el potencial de membrana mitocondrial se pierde, se produce la salida del fluorocromo de la célula.

METODOLOGÍA

1. MATERIALES.

1.1 CULTIVOS CELULARES.

Las líneas celulares establecidas utilizadas para este estudio se obtuvieron a partir de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC):

-A-704. Línea celular derivada de un adenocarcinoma de riñón humana

-SH-SY5Y. Línea celular derivada de un neuroblastoma humano establecida a partir de una metástasis en hueso.

-HEPG2. Línea celular derivada de un carcinoma hepático humano

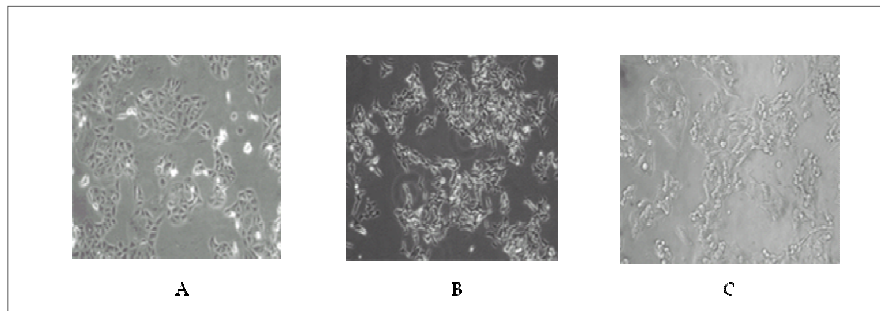


Figura 8. Fotografías con microscopio de contraste de fases de fases de las líneas celulares. (A): A-704; (B): SH-SY5Y; (C):HEPG2.

1.2 MEDIOS DE CULTIVO.

1.2.1 MEDIOS DE CULTIVO RUTINARIOS.

Cultivo de células A-704 y HepG2: medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) con sales de Eagle y bicarbonato sódico, sin L-Glutamina (Sigma). Suplementado con:

- 10 % SBF inactivado por calor (Gibco).
- 1% aminoácidos no esenciales (Gibco).
- 2 mM Glutamina (Gibco).
- 100 UI/mL Penicillina y 100 µg/mL Estreptomina (Gibco).

Cultivo de células SH-SY5Y: mezcla 1:1 de medio Dulbecco modificado con Eagle y medio Ham F12 con Glutamax (Gibco) suplementado de la misma manera que la línea celular A-704 y HepG2.

1.2.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA EL TRATAMIENTO CON LOS COMPUESTOS.

Se utiliza el medio rutinario de cada línea celular suplementado con suero bovino fetal al 5% en lugar de al 10%.

1.2.3. MEDIO DE CRIOPRESERVACIÓN CELULAR.

El medio de criopreservación consiste en una mezcla de SBF con un 10% del agente criopreservador dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma).

1.3. COMPUESTOS DEL ESTUDIO.

Para este estudio se ensayaron 57 compuestos que abarcan las cinco categorías de toxicidad según el sistema globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (GHS). Además cubren diferentes usos genéricos como pesticidas, drogas y compuestos industriales. Para ver la relación de los 57 compuestos ir a la tabla 9, donde también se especifica el número CAS y el número asignado por Acutoxbase (36).

1.4. INSTRUMENTACIÓN.

El análisis por citometría de flujo se llevo a cabo con los siguientes citómetros:

- **FC500 MCL Flow Cytometer** (Beckman-Coulter, CA, USA), equipado con dos láseres: 488nm y 635 nm y 5 detectores de fluorescencia. Con Adquisición manual o automática de muestras con carrusel.
- **FC500 MPL** (Beckman-Coulter), equipado con un láser de 488nm. Con posibilidad de adquirir las muestras en diferentes formatos (tubos o placas de pocillos).

Para la realización del ensayo de viabilidad de Captación del Rojo Neutro (NRU) se utilizó un lector de placas modelo **Multi-Mode Microplate Reader** (Sinergy HT, Biotek), equipado con un filtro de

540 nm para medir la absorbancia del colorante extraído por las células viables (66).

2. MÉTODOS.

2.1 MANTENIMIENTO Y CULTIVO CELULAR.

2.1.1. CRIOPRESERVACIÓN DE LAS CÉLULAS.

Las células se almacenan en criotubos estériles en nitrógeno líquido, usando DMSO como agente crioprotector. Para su criopreservación las células tripsinizadas se centrifugan a 200 x g y se resuspenden en medio de criopreservación. A continuación, se alicuota 1.8 mL de suspensión celular en criotubos a una concentración final de $1-1,5 \times 10^5$ células/mL. Los criotubos se colocan en un sistema de congelación gradual (Mister Frosty) y son mantenidas a -80°C durante varias horas o durante toda la noche. Esto permite que la T^{a} disminuya aproximadamente $1^{\circ}\text{C} / \text{min}$. Finalmente, los criotubos se almacenan en nitrógeno líquido.

2.1.2. DESCONGELACIÓN CELULAR.

Se introduce cada criotubo en el baño a 37°C y se transfiere su contenido a un frasco de cultivo el cual contiene 10mL de medio de cultivo rutinario ya atemperado.

2.1.3. CULTIVO RUTINARIO.

Las células crecen en monocapa en frascos de 75 cm², a 37°C, 90% ± 5% de humedad y 5.0% CO₂. Las células son examinadas diariamente con el microscopio de contraste de fases.

2.1.4. SUBCULTIVO CELULAR.

- Las monocapas celulares son tripsinizadas cuando la confluencia alcanza el 60% y nunca por encima del 80%. Para ello, hay que:
 - Decantar el medio de cultivo.
 - Lavar dos veces con 3 mL de PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺.
 - Añadir 3 mL de tripsina-EDTA 0,25 %.
 - Incubar 5 minutos a 37°C, 90% ± 5% de humedad y 5.0% CO₂.
 - Observar al microscopio que las células estén despegadas, momento en que se añade 17 mL de medio de cultivo rutinario para que el suero presente en el medio de cultivo inactive la tripsina y proceder a repartir 10 mL a dos frascos de 75 cm².

2.1.5. CONTAJE CELULAR.

- Pipetear un volumen 50µl de la suspensión celular.
- Añadir la solución colorante azul tripán al 0.4% en una proporción 1:1 (v/v). En este caso 50µl y mezclar bien.

- Esperar 2 minutos (nunca más de 5 minutos). Mientras se prepara la cámara Neubauer.
- Mezclar nuevamente la suspensión justo antes de pipetear y depositar la cantidad suficiente entre el cubre y el porta para cubrir completamente la cuadrícula (~10 μ L). Evitar poner en exceso. Colocar la cámara en el microscopio y contar las células. Las células muertas son aquellas que aparecen teñidas de azul.
- El número de células contadas debe ser de 100 al menos. Si es superior a 400 diluir la muestra y volver a contar.
- De las células que toquen las líneas de la cuadrícula se contarán únicamente las que toquen las líneas superior y línea izquierda.
- No contar las células que toquen los bordes inferiores y derechos.
- Calcular el número de células de la suspensión teniendo en consideración que el volumen de cada cuadrante es de 0.1 μ l y el factor de dilución 1/2 de azul tripán.
- Para expresar el resultado en mililitros la formula a aplicar será:

Células/mL= Media del número de células en los cuatro cuadrantes $\times 10^4 \times 2$ (inversa de la dilución).

2.1.6. SIEMBRA DE LOS CULTIVOS CELULARES EN PLACAS DE 96 POCILLOS.

- Una vez determinado el número celular, se prepara una suspensión de 1×10^5 células/mL en medio de cultivo rutinario con 10% SBF.
- Se inocula 200 μ L a cada pocillo (concentración final de células por pocillo 2×10^4).
- Se incuba la placa de 96 pocillos a 37°C, 90% \pm 5% de humedad y 5.0% CO₂, durante 24 horas. En este momento y tras descartar el medio de cultivo rutinario se reemplaza por 200 μ L de medio de cultivo que contiene 5% de SBF, con la concentración adecuada de cada compuesto a ensayar.

2.2. PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS.

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

2.2.1. COMPUESTOS SOLUBLES EN DMSO (e.j: Digoxina, Pentaclorofenol (PCP) y acetaminofeno (AAP)).

- Preparar una solución madre del compuesto en DMSO concentrada 200x.

- Hacer diluciones seriadas en DMSO a partir de la solución 200x, aplicando el factor de dilución que proceda.
- Realizar una dilución 1/100 en medio de cultivo de cada una de las diluciones realizadas previamente.
- Añadir 100 μ L de medio de cultivo con 5 % SBF a cada pocillo sembrado con células.
- Añadir 100 μ L de cada dilución. De esta forma, los compuestos tendrán la concentración deseada, en la que el solvente será del 0,5 % v/v.

2.2.2. COMPUESTOS SOLUBLES EN MEDIO DE CULTIVO (e.j. sodio dodecilsulfato (SDS), HgCl₂, Isopropanol).

- Preparar una solución madre del compuesto concentrada 2 veces en medio de cultivo con el 5 % de SBF.
- Hacer diluciones seriadas, aplicando el factor de dilución que proceda.
- Añadir 100 μ L de medio de cultivo con el 5 % SBF a cada pocillo sembrado con células.
- Añadir 100 μ L de cada dilución. De esta forma los compuestos tendrán la concentración final deseada.

2.2.3. FACTORES DE DILUCIÓN APLICADOS.

El factor de dilución aplicado en los ensayos de viabilidad (ver figura 10) es de 0,1 a partir de la concentración de compuesto más alta que se puede disolver.

En el caso de los Ensayos Funcionales los factores de dilución aplicados son: 3.16, 2.15, 1,47 y 1,21.

2.3. TRATAMIENTO CON LOS COMPUESTOS.

Después de sembrar las placas de 96 pocillos se incuban durante 24 horas a 37°C, 90% ± 5% de humedad y 5.0% CO₂, para que las células se adhieran correctamente, se incorporan los compuestos durante 24 horas en las líneas celulares SH-SY5Y y HepG2. En la línea celular A-704 el tratamiento con los compuestos es de 48 horas.

Según se realicen los ensayos de viabilidad o los Ensayos Funcionales la disposición de la placa de 96 pocillos varía, como se observa en la figura 9. También se describe el ensayo que se realizará con cada conjunto de pocillos, tal como se describe con más detalle en la Figura 10.

Los pocillos más externos de la placa se rellenan únicamente con medio de cultivo para mantener las mismas condiciones de humedad en todos los pocillos con células.

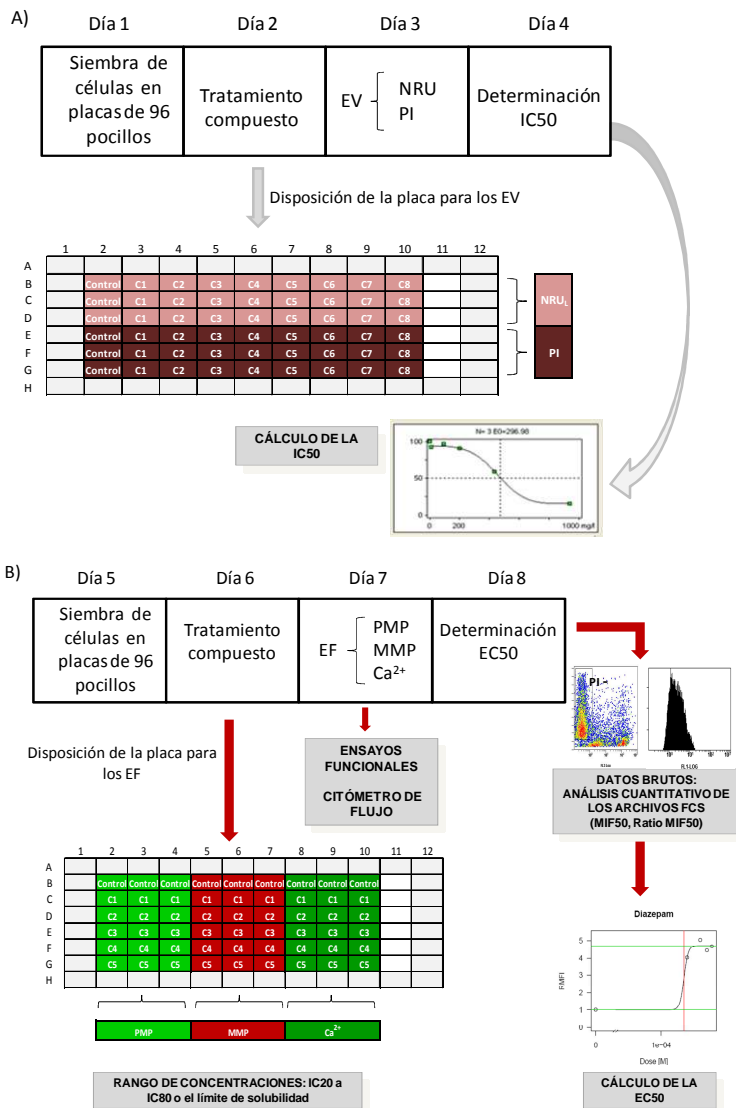


Figura 9. Esquema del cronograma de los experimentos y la disposición de los compuestos en la placa de 96 pocillos para el tratamiento con las células. A) Ensayos de Viabilidad (EV); B) Ensayos Funcionales (EF). NRU: Captación de Rojo Neutro, PI: Yoduro de Propidio, PMP: Potencial de Membrana Plasmática, MMP: Potencial de Membrana Mitocondrial, Ca²⁺: Niveles de Calcio Intracelular, C1: Concentración más alta de compuesto, C8: Concentración más baja de compuesto.

2.4. ESTRATEGIA CITÓMICA IN VITRO (ECIV).

La Estrategia Citómica In vitro (ECIV) se divide en dos tipos de ensayos: de viabilidad (EV) y funcionales (EF), tal como se describe en los apartados siguientes y se visualiza en la figura 10. Todos los ensayos se realizaron en los 57 compuestos en las tres líneas celulares.



Figura 10. Esquema descriptivo de los ensayos y las líneas celulares que forman parte de la Estrategia Citómica *In vitro* (ECIV).

2.4.1 ENSAYOS DE VIABILIDAD (EV).

Para la determinación del indicador de toxicidad IC50, definido como la concentración de tóxico que produce el 50% de muerte celular se realizan los ensayos de: a) Yoduro de Propidio (PI) y b) Captación del Rojo Neutro (NRU_L) que forman el **Ensayo de Viabilidad**.

La nomenclatura para el ensayo de NRU realizado en nuestro laboratorio, con los 57 compuestos en las tres líneas celulares bajo las mismas condiciones que el resto de ensayos de la ECIV es NRU_L, para que no haya confusión con los valores teóricos de IC50 del ensayo NRU_T proporcionados por la WP1 (37).

Los 57 compuestos fueron probados con ocho concentraciones por experimento y tres repeticiones por concentración en cada una de las tres líneas celulares seleccionadas. Cada experimento se repitió tres días diferentes.

2.4.1.1. ENSAYO DE YODURO DE PROPIDIO (PI).

- Transferir los 200 µL de cada pocillo de la placa a tubos de polipropileno. El sobrenadante contiene células necróticas y apoptóticas despegadas de la monocapa.
- Lavar cada pocillo con 50 µL de PBS libre de Mg²⁺ y Ca²⁺.
- Recoger el sobrenadante al correspondiente tubo de polipropileno.

- Añadir 50 μL de tripsina-0.25% EDTA (Gibco) 5 minutos a 37°C.
- Recoger el tripsinizado en los tubos que contienen el medio de cultivo con los compuestos y el PBS.
- Añadir 100 μL de solución PI (15 μM) a los 300 μL de suspensión celular. La concentración final del fluorocromo es de 3,75 μM .
- Incubar a 37 °C en oscuridad durante 5 minutos.
- Analizar inmediatamente en el citómetro de flujo FC500 (Beckman-Coulter, Brea, CA) excitando a 488 nm y emitiendo a 635 nm.

2.4.1.2. ENSAYO DE CAPTACION DE ROJO NEUTRO (NRU_L)

El ensayo de rojo neutro se basa en la inclusión del colorante no tóxico Rojo Neutro por los lisosomas de las células viables. Las células muertas con sus membranas celulares dañadas no lo retienen, excluyendo el colorante al medio de cultivo.

Preparación de las soluciones de trabajo.

Solución Stock de Rojo Neutro de 11mM (SIGMA).

Solución de Rojo Neutro en medio de cultivo: la concentración final de rojo neutro es de 110 μM en medio de cultivo suplementado con 5% de SBF. La solución se debe filtrar con un filtro de 0,45 μm de

diámetro para evitar la formación de cristales. La solución se debe mantener a 37°C antes de añadirla a las células.

Solución de Etanol/Ac Acético. La solución de fijación se prepara con las siguientes proporciones:

- 1% Solución de ácido acético glacial.
- 50% Etanol
- 49% H₂O

Procedimiento.

- Lavar las células con 150 µL de PBS. Descartar el PBS y añadir la solución de Rojo Neutro e incubar a 37°C, 90% ± 5% de humedad y 5.0% CO₂ durante una hora.
- Después de la incubación se descarta el medio con rojo neutro y se lavan las células con 150 µL de PBS
- Se retira el PBS.
- Añadir solución de fijación.
- Lectura en un lector de placas midiendo la absorbancia a 540nm de cada pocillo de la placa.

2.4.2. ENSAYOS FUNCIONALES.

Para determinación del indicador de toxicidad EC₅₀ que es la concentración en molar de tóxico que produce el 50% de la intensidad de fluorescencia máxima detectada entre un intervalo de

concentraciones comprendidas entre la IC20 y la IC80, se realizan 3 ensayos:

- A. Niveles de calcio intracelular (Ca²⁺).** Se mide utilizando el fluorocromo Fluo-4 AM (se excita a 488 nm y emite a 525 nm).
- B. Potencial de membrana plasmática (PMP).** Se mide utilizando el fluorocromo bis-(ácido 1.3-dibutilbarbitúrico) trimetino oxonol, o DiBAC4(3) (Dibac) (se excita a 488 nm y emite a 525 nm).
- C. Potencial de membrana mitocondrial (MMP).** Se mide utilizando el fluorocromo tetrametilrodamina metil éster (TMRM) (se excita a 488 nm y emite a 625 nm). Este ensayo se midió únicamente en la línea celular HepG2.

Los 57 compuestos fueron probados con cinco concentraciones por experimento y tres repeticiones por concentración en cada una de las tres líneas celulares seleccionadas. Cada experimento se repitió tres días diferentes.

2.4.2.1. PREPARACIÓN DE LOS FLUOROCROMOS.

Las concentraciones stock y final, el solvente, casa comercial y referencia de los fluorocromos se muestran en las Tablas 2 y 3 para cada línea celular. La solución stock de los fluorocromos utilizados se almacena en un congelador a -80°C.

2.4.2.2. TINCIÓN CELULAR.

- Transferir los 200 μ L de cada pocillo de la placa al tubo de polipropileno correspondiente.
- Lavar cada pocillo con 50 μ L de PBS libre de Mg^{2+} y Ca^{2+} .
- Recoger el sobrenadante al tubo de polipropileno correspondiente.
- Añadir 50 μ L de tripsina-0.25% EDTA (Gibco) 5 minutos a 37°C.
- Recoger el tripsinizado en los tubos que contienen el medio de cultivo con los compuestos y el PBS.
- Añadir 100 μ L de solución del fluorocromo a los 300 μ L de suspensión celular. Las concentraciones finales de cada fluorocromo están indicadas en las tablas 3 y 4.
- Incubar a 37 °C en oscuridad durante 15 minutos (para los fluorocromos DIBAC, TMRM) y 30 minutos en el caso del Fluo-4.
- Analizar inmediatamente en el citómetro de flujo.

2.4.3. CONTROLES POSITIVOS.

Para evaluar la validez de los procedimientos de análisis citómico de los diferentes parámetros indicadores de citotoxicidad, se diseñaron

controles positivos basados en el tratamiento de los cultivos celulares con compuestos químicos de acción conocida sobre cada uno de los parámetros en estudio.

A. MEDICIÓN DE CALCIO INTRACELULAR

Control positivo. Las células se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con Fluo4-AM, a continuación se trataron durante 5 minutos con el ionóforo de calcio ionomicina 70 µM.

B. MEDICIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA.

Control positivo: las células se incubaron durante 15 minutos a 37 °C con el fluorocromo DiBAC, se después se trataron con 10 µM del ionóforo gramicidina durante 5 minutos.

C. MEDICIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.

Control positivo: las células se incubaron con TMRM durante 20 minutos a 37 °C, a continuación se trataron con 20 µM del desacoplante mitocondrial FCCP.

Tabla 2. Fluorocromos utilizados en la ECIV en las líneas celulares A-704 y SH-SY5Y

A704 Y SH-SY5Y					
Fluorocromo	Referencia	Casa Comercial	Solvente	C_{Stock}	C_{Final}
DiBAC ₄ (3)	B-438	Invitrogen	DMSO	1 mM	0,3 μM
FLUO-4	F-14201	Invitrogen	DMSO	0,5 mM	0,5 μM
TMRM	T-668	Sigma	DMSO	1 mM	150 nM
PI	P-4170	Sigma	H ₂ O	1,5 mM	3,75 μM

Tabla 3. Fluorocromos utilizados en la ECIV en la línea celular HepG2.

HEPG2					
Fluorocromo	Referencia	Casa Comercial	Solvente	C_{Stock}	C_{Final}
DiBAC ₄ (3)	B-438	Invitrogen	DMSO	1 mM	37,5 nM
FLUO-4	F-14201	Invitrogen	DMSO	0,5 mM	0,25 μM
TMRM	T-668	Sigma	DMSO	1 mM	150 nM
PI	P-4170	Sigma	H ₂ O	1,5 mM	3,75 μM

2.5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

2.5.1. CÁLCULO DEL INDICADOR DE TOXICIDAD IC50.

Después del tercer día de experimentos, tal como se muestra en la Figura 9.A, se procede a determinar el indicador de toxicidad IC50.

La IC50 es la concentración de tóxico que produce el 50% de muerte celular medida con los ensayos de viabilidad de PI y NRU_L. La IC50 se calcula mediante el programa informático Phototox, como se muestra en la figura 14.

La desviación estándar en porcentaje (DS%) de las intensidades de fluorescencia media de los controles y de cada una de las dosis no deberá ser superior al 15%.

Una vez calculada la IC50 para un compuesto se procede a la determinación de la EC50.

2.5.2. CÁLCULO DEL INDICADOR DE TOXICIDAD EC50.

En el octavo día de experimento, después de sembrar las células y tratarlas con el compuesto como se muestra en la figura 9, se procede a determinar el indicador de toxicidad EC50. Para ello, se deben calcular los siguientes parámetros:

Media aritmética: de las intensidades de fluorescencia media de los controles y tratados.

Desviación Estándar (DS): de las intensidades de fluorescencia media de los controles y de cada una de las dosis.

Desviación Estándar (%): la desviación estándar en porcentaje de las intensidades de fluorescencia media de los controles y de cada una de las dosis.

MIF50: es el la mitad de la intensidad de fluorescencia máxima observada en un rango de concentraciones desde una IC20 a una IC80.

RATIO: es el cociente entre el valor de intensidad de fluorescencia media de los tratados y el valor de intensidad de fluorescencia media del basal.

RMFI50: es la mitad del valor máximo del ratio.

EC50 RMFI: es la concentración en molar de tóxico que produce el 50% de la intensidad de fluorescencia máxima detectada entre un rango de concentraciones desde una IC20 a una IC80, es decir, desde la concentración a la cual está inhibida el 20% de la población hasta la concentración que se inhibe el 80% de la población. La EC50 se calcula con el programa GraphPadPrism6 o Microsoft Office Excel 2007.

Una vez se han calculado los parámetros que se muestran en la Tabla 4 se puede calcular el valor MIF50, en este caso sería de 20,12 que

corresponde a la mitad de la intensidad de fluorescencia máxima observada, en este caso 40,24. El valor de RMFI 50 se calcula de la misma manera pero teniendo en cuenta únicamente los valores de ratio, en este ejemplo sería de 2,14 (la mitad de 4,27).

Para el cálculo de EC50 RMFI se necesita hacer la representación gráfica como se muestra en la Figura 15 y calcular la ecuación de la curva. Una vez está calculada la ecuación de la curva, se sustituyen las x por el valor de RMFI 50 para obtener el logaritmo de la concentración en milimolar de tóxico que produce el 50% de la intensidad de fluorescencia máxima. El último paso será realizar el antilogaritmo y cambiar las unidades de EC50 RMFI de milimolar a molar.

Los criterios de aceptación para admitir como válido el experimento para el cálculo de la EC50 o de la IC50 para un compuesto son:

-Viabilidad celular: los controles deben ser superior o igual al 80% de células vivas determinadas por PI o por morfología en los histogramas biparamétricos de Forward Scatter (FS) vs Side Scatter (SS).

-Desviación estándar en porcentaje de las intensidades de fluorescencia media debe ser inferior al 15 % tanto en los controles como en el rango de concentraciones de cada compuesto desde la IC20 a la IC80 con las que se tratan las células.

2.5.3. CÁLCULO DE LOS INDICADORES DE TOXICIDAD LOEC.

Definimos el indicador de toxicidad LOEC, como la concentración con efecto mínimo observado. Para cada compuesto obtenemos 8 valores de LOEC, los indicadores fueron calculados mediante el programa Microsoft Office Excel 2007.

-1 valor de **LOEC-ECIV**: concentración con efecto mínimo observado entre todos los ensayos que forman parte de la Estrategia Citómica In vitro (ECIV), tanto de los Ensayos de Viabilidad (EV), como de los Ensayos Funcionales (EF).

-1 valor de **LOEC-EF**: concentración con efecto mínimo observado de los Ensayos Funcionales que forman parte de la ECIV.

-1 valor **LOEC- ECIV** y 1 valor **LOEC-EF** para cada una de las tres líneas celulares que forman parte de la ECIV. La nomenclatura será el nombre de la línea celular seguido de LOEC-ECIV o LOEC-EF.

2.5.4. CÁLCULO DE LOS COEFICIENTES DE DETERMINACIÓN.

Los valores de LC50 en sangre determinados en casos de envenenamientos en humano (37), valores proporcionados por la WP1 del proyecto AcuteTox, se correlacionaron con:

- Los valores de IC50 *in vitro* del test de Captación de Rojo Neutro (NRU_T) por la línea celular 3T3, fibroblastos murinos (37).
- Los valores LD50 *in vivo* de rata y ratón (34).

-Los valores de IC50 y EC50 de la ECIV.

El coeficiente de determinación (R^2), el cual es igual a la fracción de la varianza que es compartida por ambos parámetros, fue calculado haciendo la raíz cuadrada del coeficiente de correlación de Pearson (r). El ajuste de la curva se realizó por regresión lineal (método de mínimos cuadrados) usando el programa GraphPadPrism 6 (La Jolla, CA). Las unidades con las que se trabajó fueron el logaritmo de la concentración en Molar. El número asignado a cada compuesto procede de Acutoxbase (36), la base de datos del proyecto AcuteTox. Tal como se muestra en la Tabla 6.

Figura 11. Ejemplo del cálculo de la IC50 mediante el programa Phototox. Impresión de pantalla donde se muestra la curva representando los valores para la determinación de la IC50 y las diferentes concentraciones del tratamiento con los valores correspondientes de absorbancia del ensayo de viabilidad *in vitro* de Captación de Rojo Neutro.

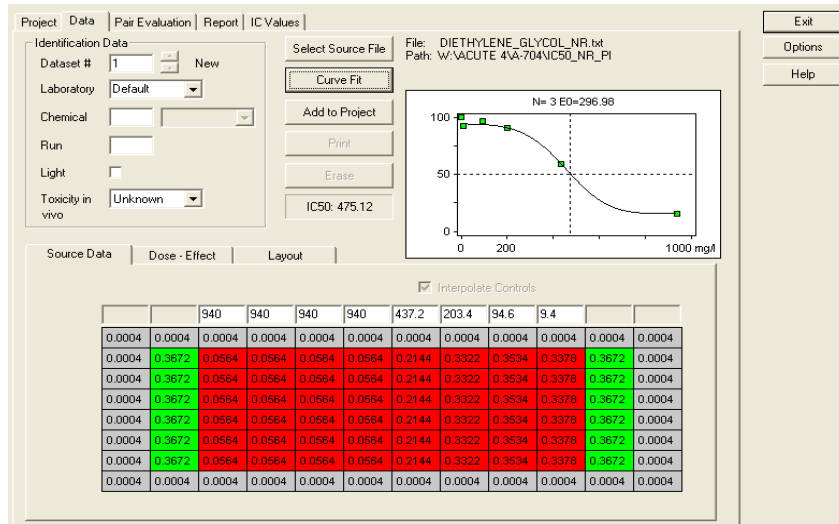


Figura 12. Ejemplo del cálculo de la ecuación de la curva para el posterior cálculo de la EC50 RMFI mediante Microsoft Office Excel 2003. Se representa RMFI en el eje de abscisas y el logaritmo de la concentración milimolar del compuesto en el eje de ordenadas.

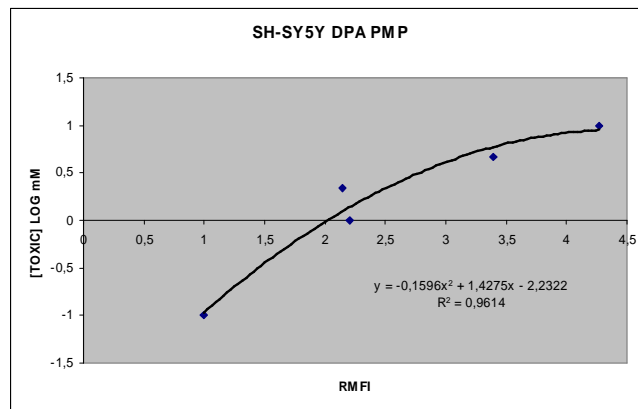


Tabla 4. Ejemplo del cálculo del promedio, ratio, DS y porcentaje de la DS de la intensidad media de fluorescencia de cada una de las concentraciones probadas para un compuesto de ejemplo (ácido 2,4-diclorofenoxiacético, DPA) midiendo el parámetro celular de potencial de membrana en la línea celular SH-SY5Y. Parámetros necesarios para el cálculo de la EC50 RMFI.

Rango de concentraciones en molar de DPA					
Contro	4,65E-				
1	1,00E-03	2,16E-03	03	1,00E-02	
10	22,3	21,5	35,2	43,8	
10,1	21,8	21,3	36,4	44,5	
10,3	19,5	20,3	36	47,8	
9,76	19,3	17,2	35,8	47,2	
9,95	21,8	19,6	27,5	33,8	
8,31	18,1	21	26,7	37,2	
7,51	21,8	20,2	26,3	38,7	
8,98	22,4	20,2	33,4	35,2	
9,86	20,2	20,8	30,4	34	
Promedio	9,42	20,80	20,23	31,97	40,24
Ratio	1,00	2,21	2,15	3,39	4,27
DS	0,95	1,56	1,29	4,26	5,63
%DS	10,1	7,49	6,36	13,34	14

Tabla 5. Ejemplo de los valores de MIF 50, RMFI 50, EC50 RMFI y DS en porcentaje (la más alta del rango de concentraciones) en la línea celular SH-SY5Y con el tratamiento durante 24 horas con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (DPA) midiendo el parámetro celular de potencial de membrana plasmática.

SH-SY5Y DPA PMP			
MIF 50	RMFI 50	EC50 RMFI	SD (%)
20,12	2,14	1,23E-03	14

Tabla 6. Valores teóricos de toxicidad aguda *in vivo* y de toxicidad basal *in vitro* utilizados para realizar las correlaciones con los ensayos de la ECIV.

Número en Acutoxbase	Compuesto	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	Monohidrato de sulfato de atropina	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	Alcohol isopropílico	67-63-0	6,31E-02	1,15E-01	8,44E-02	ND
11	Malathion	121-75-5	1,32E-03	1,86E-06	3,86E-03	3,62E-03
12	Cloruro de mercurio (II)	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	Lauril sulfato de sodio	151-21-3	1,62E-04	ND	5,81E-03	ND
16	Valproato de sodio	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-butilhidroperóxido	75-91-2	6,17E-05	ND	6,53E-03	ND
20	Acraldehído (acroleína)	107-02-8	8,51E-04	ND	ND	ND
21	Cadmio (II) 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
28	Clorhidrato de amiodarona	19774-82-4	2,63E-05	1,12E-05	ND	ND
29	Clorhidrato de verapamilo	152-11-4	7,24E-05	6,17E-06	ND	ND
30	Rifampicina	13292-46-1	1,02E-04	1,55E-04	2,18E-03	ND
31	Clorhidrato de tetraciclina	64-75-5	8,32E-04	ND	ND	7,64E-03
32	Clorhidrato Orfenadrina	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	Diclorvos	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	Glufosinato de amonio	77182-82-2	7,59E-03	1,02E-02	8,49E-03	2,20E-03
42	Cis-diammineplatino	15663-27-1	5,62E-06	2,09E-05	ND	ND
43	Dietilenglicol	111-46-6	1,29E-01	ND	1,84E-01	2,26E-01
44	Dibromuro diquat	85-00-7	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 -etinilestradiol	57-63-6	2,29E-05	ND	ND	ND
48	Fluoruro de sodio	7681-49-4	1,91E-03	5,75E-04	3,84E-03	2,55E-03
51	Dimetilformamida	68-12-2	7,24E-02	5,89E-03	5,68E-02	6,27E-02
53	Clorhidrato de amitriptilina	549-18-8	2,29E-05	4,57E-06	1,30E-03	7,01E-04
54	Etileno glicol	107-21-1	4,17E-01	3,16E-02	1,35E-01	1,60E-01
55	Metanol	67-56-1	NE	7,76E-02	3,04E-01	2,28E-01
57	Cloruro de sodio	7647-14-5	7,24E-02	5,37E-02	7,14E-02	8,76E-02
60	Sulfato de litio	10377-48-7	1,55E-02	5,62E-03	ND	ND
63	Clorhidrato de propranolol	318-98-9	5,37E-05	1,12E-05	ND	1,32E-03
64	Trióxido de arsénico	1327-53-3	1,35E-05	5,89E-06	4,63E-04	5,34E-04
66	Sulfato de talio	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
76	Hidrato de cloral	302-17-0	1,12E-03	6,61E-04	4,35E-03	ND
77	Ácido 2,4-diclorofenoacético	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	Selenato de sodio	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	Bitartrato de epinefrina	51-43-4	1,91E-04	ND	ND	ND

ND, no dato; NE, no efecto.

2.5.5. CÁLCULO DE LAS CURVAS ROC.

Las curvas ROC (acrónimo de Receiver Operating Characteristic) se utilizan en un contexto clínico, con un sistema de clasificación binario (bien diagnosticado, mal diagnosticado). Pero se puede aplicar al campo de la toxicología sustituyendo mal diagnosticado por mal clasificado y bien diagnosticado por bien clasificado.

El primer paso es realizar las tablas de contingencia para definir los verdaderos positivos (VP) y los falsos positivos (FP). La razón de VP indica hasta qué punto el Ensayo Citómico es capaz de detectar o clasificar correctamente los compuestos positivos (muy tóxicos). La razón de FP define cuántos compuestos se clasifican como positivos (muy tóxicos) siendo incorrectos.

La razón de VP equivale a la sensibilidad de la prueba y se representa en el eje de las abscisas y la razón de FP equivale a 1-Especificidad de la prueba y se representa en el eje de ordenadas. En el espacio ROC los puntos en las coordenadas (0,1) corresponden a una clasificación perfecta, ningún falso negativo. La diagonal divide el espacio ROC y se denomina la línea de no discriminación, los puntos que quedan en la parte izquierda superior representan los puntos que clasifican mejor que al azar y los que quedan por debajo de la diagonal los que clasifican peor que al azar (Figura 13).

El CLP o Reglamento CLP es el nuevo reglamento europeo sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas químicas. La legislación introduce en la Unión Europea un nuevo sistema llamado "Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS), aborda la clasificación de los productos químicos por tipos de riesgo y se proponen elementos de comunicación de peligro armonizadas, incluidas las etiquetas y fichas de datos de seguridad, (portalreach.info).

Mediante el programa estadístico SPSS se calculó el área por debajo de la curva (AUC) (67) como indicador de qué ensayo de la ECIV junto con el ensayo de NRU_T y los valores de LD50 en rata y ratón clasificaban mejor los 57 compuestos según las clases establecidas por la GHS.

Se calculó un índice del AUC para cada clase y uno más agrupando las clases 1 y 2, ya que estas dos clases según el reglamento GHS llevarían la misma etiqueta informativa en el exterior del compuesto. El pictograma de la calavera, la palabra mortal como tipo de riesgo en caso de ingestión y peligro como la palabra de señalización.

Se realizaron un análisis total de 6 curvas ROC como se mostrará en el apartado de resultados.

-El paso previo para el cálculo de AUC fue cambiar las unidades de IC50 y EC50 de la ECIV y las LD50 en el caso de los test *in vivo* en rata y ratón, de molar a unidades de peso por litro o kilogramo.

- Se ordenaron los 45 compuestos (de los 57 compuestos presentados por el proyecto AcuteTox solo hay disponibles datos bibliográficos de LC50 de 45) por orden creciente de LC50, ya que el objetivo es ver como clasifica la ECIV, el test de NRU_T y los test *in vivo* de rata y ratón los 45 compuestos comparado con los valores de toxicidad aguda en humano. Por esta razón se toman como referencia los valores de LC50 en sangre determinados en casos de envenenamientos en humano (37), de esta manera se clasificaron los compuestos según el GHS tal como se muestra en la Tabla 7.

Figura 13. Espacio ROC con un ejemplo de cuatro puntos. El punto C correspondería al ensayo que mejor clasifica, seguido de los puntos A, B y C. Imagen adaptada de la página web de Invitrogen (www.wikipedia.com).

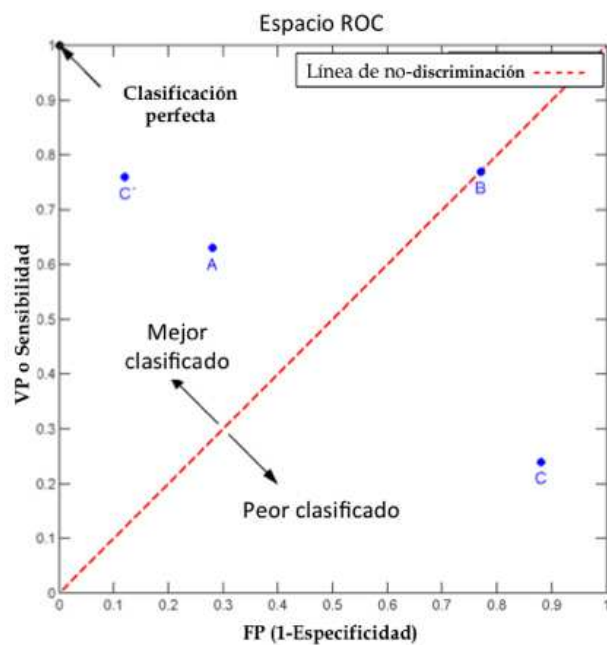



Tabla 7. Valores de LC50 en sangre determinados en casos de envenenamientos en humanos y distribuidos en las clases de toxicidad aguda según el GHS, con la información que debe ir asociada a la etiqueta.

Información en la etiqueta	Clase	Número en Acutoxbase	Compuesto	LC50 (mg/L)
 PELIGRO MORTAL	I [0-5] mg/L	6	Colchicina	0,026
		9	Digoxina	0,033
		21	Cadmio (II) cloruro	0,160
		34	Lindano	0,305
		11	Malathion	0,615
		38	Paratión	0,652
		46	Ciclosporina A	0,725
		64	Trióxido de arsénico	1,165
		33	Nicotina	1,288
		3	Monohidrato de sulfato de atropina	1,386
		53	Clorhidrato de amitriptilina	1,435
		80	Estricnina	2,537
		29	Clorhidrato de verapamilo	3,028
		63	Clorhidrato de propranolol	3,319
66	Sulfato de talio	4,103		
91	Selenato de sodio	4,855		
 PELIGRO MORTAL	II [5-50] mg/L	12	Cloruro de mercurio (II)	5,294
		42	Cis-diammineplatinum	6,269
		32	Clorhidrato Orfenadrina	7,005
		28	Clorhidrato de amiodarona	7,650
		8	Diazepam	9,213
		48	Fluoruro de sodio	24,163
		17	5-fluorouracilo	26,563
		5	Carbamazepina	38,323
		39	Diclorvos	44,091
		67	Warfarina	47,755
 PELIGRO TÓXICO	III [50-300] mg/L	92	Acetonitrilo	62,132
		14	Fenobarbital	84,318
		4	Cafeína	99,598
		44	Dibromuro diquat	102,054
		76	Hidrato de cloral	109,279
		30	Rifampicina	127,468
 CUIDADO PERJUDICIAL	IV [300-2000] mg/L	13	Pentaclorofenol	221,532
		1	Acetaminofeno	330,790
		51	Dimetilformamida	430,445
		60	Sulfato de litio	618,013
		77	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	821,241
		16	Valproato de sodio	1048,651
		2	Ácido acetilsalicílico	1136,985
54	Glicol etileno	1962,826		
	V >2000 mg/L	41	Glufosinato de amonio	2027,757
		55	Metanol	2487,096
		57	Cloruro de sodio	3138,414
		10	Alcohol isopropílico	6900,403
		37	Etanol	7301,603

2.5.6 ANALISIS POR AGRUPAMIENTO JERARQUIZADO (CLUSTERING).

Para proceder a la distribución de los datos de toxicidad en forma de array y valorar su utilidad en la clasificación de los tóxicos se ha utilizado los programas "Cluster" y "Treeview". Ambos disponibles en <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>.

Se han clasificado los 45 compuestos de los que se disponía datos bibliográficos frente al ensayo citómico en las tres líneas celulares.

Los compuestos testados se han distribuido en cinco clases de toxicidad por el Global Harmonization System (GHS), basándonos en los datos de LC50 en sangre determinados en casos de envenenamientos en humano, tal como se muestra en la tabla anterior.

Transformación de los resultados antes del análisis de datos

- Para establecer el grado de toxicidad de los compuestos utilizando la clasificación GHS, es necesario transformar los valores de 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.

- Se ordenaron los compuestos por orden creciente de LC50 en sangre determinados en casos de envenenamientos en humano.
- 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 tóxicos que no tienen 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, la distribución de los 45 compuestos según el orden creciente de su toxicidad, donde se observa la escala de color donde se distinguen las cinco clases. Se han incluido los compuestos con el número asignado por el proyecto AcuteTox.

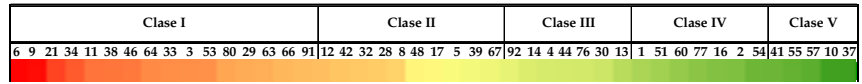


Figura 14. Escala de color de la distribución de los 45 compuestos según el orden creciente de su toxicidad, con los límites de las cinco clases GHS tomando como referencia los valores de LC50 en sangre determinados en casos de envenenamientos en humanos.

OBJETIVOS

El objetivo último de esta tesis es el de proporcionar métodos citómicos, como alternativa *in vitro* al animal de laboratorio para mejorar el valor predictivo de los ensayos de citotoxicidad basal y dependiente de biotransformación mediante la puesta a punto de procedimientos miniaturizados de cultivo celular.

Los objetivos concretos son:

1. Optimizar una Estrategia Citómica In vitro (ECIV) de alto contenido basada en la citometría de flujo automatizada para el análisis *in vitro* en células de origen humano, susceptible de ser adaptado a robotización y al análisis bioinformático de los resultados.
2. Aplicar la ECIV al análisis cuantitativo *in vitro* de la citotoxicidad de diferentes compuestos.
3. Validar la ECIV mediante la correlación de los valores de citotoxicidad obtenidos en este trabajo de investigación con los valores de citotoxicidad obtenidos con ensayos *in vitro* de toxicidad basal.
4. Evaluar la capacidad predictiva de toxicidad humana aguda *in vivo* del ensayo citómico *in vitro* mediante su aplicación a una serie de compuestos en los que la correlación entre la

toxicidad *in vivo* e *in vitro* ha sido previamente investigada en estudios multicéntricos.

5. Disminuir el número de compuestos mal clasificados (outliers) que resultan al correlacionar los valores de toxicidad *in vivo* e *in vitro*.
6. Evaluar la capacidad de ECIV para clasificar los compuestos dentro de las clases estipuladas por el reglamento GHS.

RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

1. DETERMINACIÓN DE LOS INDICADORES DE TOXICIDAD IC50, EC50 Y LOEC MEDIANTE LA ESTRATEGIA CITÓMICA IN VITRO (ECIV).

En la Tabla 8 se indican los valores de IC50 o EC50 de los compuestos de estudio, determinados mediante la aplicación del conjunto de ensayos integrados en la ECIV. Tras realizar cada ensayo tres veces por triplicado, todos los valores de IC50 o EC50 que se obtuvieron en la ECIV presentaron una desviación estándar menor del 15%.

Por razones de su baja toxicidad intrínseca o su limitada solubilidad, en ciertos compuestos y para ciertos parámetros no fue posible llegar a establecer dichos indicadores numéricos de citotoxicidad, tras analizar un amplio rango de concentraciones. Así, en la Tabla 8, los valores precedidos del símbolo > indican la concentración más alta que fue posible estudiar en los compuestos, sin haber observado ningún efecto significativo en el ensayo que se realizó.

La forma de establecer estos valores de citotoxicidad mediante la ECIV es diferente, según se refiera a Ensayos Funcionales o Ensayos de Viabilidad. En los primeros, la capacidad de la citometría de acotar de forma selectiva subpoblaciones celulares de interés, permite restringir el análisis a células vivas, incluso en condiciones de tratamiento que provocan la muerte celular. En el Ensayo de Viabilidad con PI, solamente se cuantifica el porcentaje de células

vivas o muertas. Por ello, la ECIV aporta dos valores añadidos a la toxicología *in vitro*:

a) Resolución temporal: permite detectar fenómenos que ocurren antes de que la célula muera, ya que se producen en células aún viables.

b) Resolución mecanística: permite comparar cuantitativamente los indicadores de toxicidad para los parámetros funcionales y para la muerte celular, de acuerdo a la idea de que los parámetros funcionales que precedieran a la muerte celular mostrarían una respuesta más sensible al tóxico (IC50 o EC50 del Ensayo Funcional menor que IC50 o EC50 del Ensayo de Viabilidad), mientras que aquellos parámetros modificados por efecto de la muerte celular o no implicados secuencialmente en su inducción, presentarían valores de IC50 o EC50 muy similares a los de los Ensayos de Viabilidad.

El amplio conjunto de valores que muestra la Tabla 8 es imposible de analizar de forma individual y en detalle, no siendo, además, ese tipo de estudio descriptivo el objetivo de este trabajo. Sin embargo, a grandes rasgos, estos resultados apoyan estas hipótesis. Un claro ejemplo lo proporciona el compuesto lauril sulfato de sodio (SDS, compuesto #15), un detergente catiónico que produce la muerte celular de forma inmediata e inespecífica por rotura de la membrana plasmática y que, por dicho mecanismo se utiliza como control positivo de muerte celular en numerosos ensayos de viabilidad. Como puede verse en la Tabla 8, los valores de IC50 para este compuesto son prácticamente idénticos en todos los Ensayos Funcionales y de Viabilidad y, además, para todas las líneas celulares,

como cabría esperar de un compuesto citotóxico que actúa a través de un mecanismo osmótico. Por el contrario, encontramos numerosos ejemplos en los que los Ensayos Funcionales determinan valores de IC50 o EC50 de hasta varios órdenes de magnitud inferiores a los determinados por los Ensayos de Viabilidad, destacando el caso extremo de la digoxina (#9).

En cuanto a la aplicabilidad práctica de la ECIV en estudios de Toxicología *In Vitro*, cabe considerar que el ensayo de la ECIV más sensible sería aquel que permita calcular un mayor número de indicadores de toxicidad, ya sean IC50 o EC50. Como se observa en la Tabla 8, el ensayo del potencial de membrana plasmática (PMP) en la línea celular A.704 es el más sensible entre los Ensayos Funcionales, con un 75% de compuestos en los que se pudo determinar el valor del indicador de toxicidad.

Respecto a los Ensayos de Viabilidad, los más sensibles son el ensayo colorimétrico de captación de Rojo Neutro (NRU_L) y el ensayo citómico de exclusión del yoduro de propidio (PI) en la línea celular SH-SY5Y, también con un porcentaje del 75% de compuestos con indicador de toxicidad calculado. Por el contrario, el ensayo de niveles intracelulares de Ca²⁺ en la línea celular HepG2 es el ensayo menos sensible, ya que es el que obtiene menos indicadores de toxicidad, con un total de 20 valores de EC50 y 37 compuestos sin efecto a la concentración máxima probada. En la Figura 15 se

representan los ensayos, ordenados de menor a mayor sensibilidad, para facilitar la comprensión de los datos presentados en la Tabla 8.

Considerando la ECIV en su totalidad, tan sólo en tres compuestos, el benceno (#18), el pireno (#23) y cloruro de sodio (#57) no ha sido posible determinar ninguno de los indicadores de toxicidad IC50 o EC50.

Con respecto al indicador de toxicidad LOEC, la concentración con efecto mínimo observado, la ECIV en su conjunto ha permitido determinar al menos un valor del indicador de toxicidad LOEC en 54 de los compuestos, exceptuando al cloruro de sodio (#57), el benceno (#18) y el pireno (#23). La línea celular que permite establecer más valores de LOEC es HepG2, seguida de SH-SY5Y y, por último, A704. Considerando únicamente el conjunto de Ensayos Funcionales, las tres líneas presentan una sensibilidad similar, ya que permiten determinar la LOEC de 46 compuestos utilizando A704 y HepG2, o 44 compuestos con la línea SH-SY5Y. Igualmente, en el caso de los Ensayos de Viabilidad, el número de compuestos para los que se pudo determinar la LOEC asciende a 46, como se muestra en la Tabla 9.

Al integrar todos los resultados presentados en las Tablas 8 y 9, se pone de manifiesto que con la ECIV no se pudo cuantificar ningún indicador de toxicidad (IC50, EC50 o LOEC) tan sólo en tres de los 57 compuestos de la biblioteca en estudio, concretamente benceno (#18),

pireno (#23) y cloruro de sodio (#57). Por otra parte, también resulta evidente que la ECIV completa (Ensayos Funcionales + Ensayos de Viabilidad) es mejor que los Ensayos Funcionales o los Ensayos de Viabilidad por separado para poder proporcionar un indicador cuantitativo de toxicidad *in vitro* de los productos químicos, paso necesario para poder iniciar los estudios de predicción de toxicidad *in vivo* en humanos o animales.

En estudios anteriores de nuestro laboratorio se había desarrollado un ensayo funcional por citometría de flujo con células túbulo renales expuestas a toxinas nefrotóxicas a concentraciones sub-letales (68). Los resultados sugerían que el ensayo citómico funcional detectaba cambios tempranos en el proceso de la toxicidad, reflejando una ventaja frente a otros métodos de cuantificación de muerte celular a punto final (69). Además los datos obtenidos por CMF en nefrotoxicidad eran consistentes respecto a los obtenidos por microscopía confocal, otra poderosa técnica citómica, en un laboratorio independiente (68), (70). En estos primeros estudios de prueba de concepto, que utilizaron tres líneas celulares y tres compuestos químicos nefrotóxicos, se definieron las bases para utilizar la CMF como estrategia integrada con otras herramientas analíticas para un estudio toxicológico.

La primera aportación del presente estudio a la Toxicología *In Vitro* ha sido la aplicación de la CMF como estrategia única, normalizada y sistemática, para establecer un método *in vitro* alternativo de

valoración de riesgo químico de una biblioteca relativamente grande (57 compuestos) en tres líneas celulares derivadas de tres órganos diana diferente, analizando tanto la citotoxicidad basal como los parámetros funcionales afectados. Además, el desarrollo de protocolos de miniaturización (formato de placa de 96 pocillos) de los respectivos ensayos citómicos se ha mostrado como muy reproducible, con coeficientes de variación intra- e interensayos muy bajos (<15%), lo que permite implementar procedimientos fácilmente automatizables y transferibles a otros laboratorios dotados de sistemas de citometría de flujo, cada vez más frecuentes en el entorno de la Biología Celular y la Biotecnología.



Figura 15. Ensayos de la ECIV ordenados de menor a mayor sensibilidad.

Tabla 8. Valores en concentración Molar (M) de los indicadores de toxicidad IC50 y de EC50 en la Estrategia Citómica *In Vitro* (ECIV).

COMPUESTOS	Número Ácidos base	ESTRATEGIA CITÓMICA IN VITRO (ECIV)																			
		A704						SH-SY5Y						HEPG2							
		ENSAYOS FUNCIONALES		ENSAYOS VIABILIDAD		ENSAYOS FUNCIONALES		ENSAYOS VIABILIDAD		ENSAYOS FUNCIONALES		ENSAYOS VIABILIDAD		ENSAYOS FUNCIONALES		ENSAYOS VIABILIDAD					
FMP	C ₅₀	NRU	PI	FMP	C ₅₀	NRU	PI	FMP	C ₅₀	NRU	PI	FMP	C ₅₀	NRU	PI	FMP	C ₅₀	NRU	PI		
Acetaminofeno	1	>9.49E-03	1.90E-03	2.36E-02	3.45E-02	3.31E-02	1.86E-02	1.77E-02	2.11E-02	1.10E-02	3.30E-02	2.60E-02	4.63E-02	>4.63E-02	>4.63E-02	>4.63E-02	>4.63E-02	3.30E-02	2.60E-02	4.63E-02	>4.63E-02
17 α -etiltestosterol	47	6.74E-05	2.23E-05	1.11E-04	2.12E-04	>9.30E-05	3.50E-05	1.01E-04	1.56E-04	7.80E-05	>1.49E-04	9.31E-05	1.77E-04	2.14E-04	>2.14E-04	>2.14E-04	>2.14E-04	1.49E-04	9.31E-05	1.77E-04	2.14E-04
5-fluorouracilo	17	1.12E-02	2.37E-03	1.52E-02	>2.00E-02	>2.00E-03	6.23E-05	>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	>2.00E-02	>2.00E-02	>2.00E-02	>2.00E-02
Acetonitrilo	92	5.42E-01	>4.30E-00	6.91E-01	1.59E-00	>4.30E-00	1.59E-01	6.91E-01	1.59E-00	>4.30E-00	1.59E-01	6.91E-01	>4.30E-00	>4.30E-00	>4.30E-00	>4.30E-00	>4.30E-00	>4.30E-00	>4.30E-00	>4.30E-00	>4.30E-00
DPA	77	1.90E-03	7.03E-05	>3.00E-02	>3.00E-02	1.23E-03	2.48E-03	4.58E-03	1.49E-02	7.09E-04	>3.00E-02	>3.00E-03	>3.00E-02	>3.00E-02	>3.00E-02	>3.00E-02	>3.00E-02	>3.00E-02	>3.00E-02	>3.00E-02	>3.00E-02
Ácido acetilsalicílico	2	6.99E-04	>2.00E-02	>2.00E-02	1.47E-02	>2.00E-02	>2.00E-02	1.20E-02	1.63E-02	>2.00E-02	>2.00E-02	>2.00E-02	1.56E-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
Acroleína	20	>2.30E-05	>2.30E-05	4.25E-05	4.04E-05	>1.00E-05	>1.00E-05	8.66E-05	6.67E-05	>1.00E-04	>1.00E-04	>1.00E-04	7.52E-05	9.06E-05	>9.06E-05	>9.06E-05	>9.06E-05	>1.00E-04	>1.00E-04	>1.00E-04	>1.00E-04
Alcohol isopropílico	10	3.40E-02	3.74E-02	3.04E-01	5.88E-01	>6.30E-02	2.00E-02	5.07E-01	4.15E-02	3.00E-04	>4.00E-02	1.40E-02	7.13E-01	8.75E-01	>8.75E-01	>8.75E-01	>8.75E-01	>4.00E-02	1.40E-02	7.13E-01	8.75E-01
Benceno	15	>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	>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
Bitartrato de epinefrina	96	6.80E-04	3.04E-04	2.98E-04	2.79E-04	9.66E-05	>4.70E-04	1.33E-03	3.88E-04	6.90E-04	>4.70E-04	1.70E-04	1.02E-03	8.70E-04	>8.70E-04	>8.70E-04	>8.70E-04	>4.70E-04	1.70E-04	1.02E-03	8.70E-04
Cadmio (II) cloruro	21	2.55E-03	2.62E-03	3.95E-06	3.07E-06	>4.60E-05	5.75E-06	2.01E-05	4.51E-05	>3.16E-05	2.40E-07	>3.16E-05	2.20E-05	2.60E-05	>2.60E-05	>2.60E-05	>2.60E-05	>3.16E-05	2.40E-07	>3.16E-05	2.20E-05
Cafetina	4	2.89E-03	1.06E-03	2.49E-02	>4.00E-02	1.68E-02	7.03E-03	2.06E-02	2.45E-02	1.70E-03	>2.00E-02	4.80E-03	3.96E-02	>3.96E-02	>3.96E-02	>3.96E-02	>3.96E-02	>2.00E-02	1.70E-03	>2.00E-02	4.80E-03
Carbamazepina	5	>1.00E-03	>1.00E-03	>1.00E-03	>1.00E-03	>2.00E-03	4.50E-04	>2.00E-03	>2.00E-03	>2.00E-03	>2.00E-03	>2.00E-03	>2.00E-03	>2.00E-03	>2.00E-03	>2.00E-03	>2.00E-03	>2.00E-03	>2.00E-03	>2.00E-03	>2.00E-03
Cicloheximida	7	2.06E-03	8.89E-06	3.40E-04	>1.00E-02	>5.00E-03	1.85E-04	2.31E-03	5.01E-03	4.41E-04	5.40E-04	4.40E-04	3.70E-05	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>5.40E-04	4.40E-04	4.40E-04	3.70E-05
Ciclosporina A	46	6.99E-07	1.23E-05	2.38E-05	>2.50E-05	>2.50E-05	2.95E-07	1.16E-05	1.04E-05	1.50E-05	>1.16E-05	>1.70E-05	>1.70E-05	>1.70E-05	>1.70E-05	>1.70E-05	>1.70E-05	>1.16E-05	1.50E-05	>1.16E-05	>1.70E-05
Cis-diamirineplatinum	42	1.46E-05	3.19E-05	>3.50E-04	>3.50E-04	3.10E-05	1.67E-06	6.60E-05	2.85E-05	2.23E-04	>3.40E-04	2.26E-04	1.87E-04	>3.40E-04	>3.40E-04	>3.40E-04	>3.40E-04	>3.40E-04	2.23E-04	2.26E-04	1.87E-04
Clorhidrato de amiodarona	28	4.19E-05	1.03E-04	2.91E-04	5.63E-05	>2.66E-05	1.25E-05	9.67E-05	2.68E-04	5.47E-05	>7.00E-05	>9.00E-05	5.17E-05	6.92E-05	>6.92E-05	>6.92E-05	>6.92E-05	>7.00E-05	5.47E-05	>7.00E-05	>9.00E-05
Clorhidrato de amitriptilina	53	1.20E-07	2.33E-05	>5.00E-05	2.89E-05	>1.00E-05	>1.00E-05	8.27E-06	8.08E-05	3.32E-05	>5.00E-05	>5.00E-05	5.49E-05	>5.00E-05	>5.00E-05	>5.00E-05	>5.00E-05	>5.00E-05	3.32E-05	>5.00E-05	>5.00E-05
Clorhidrato de propranolol	63	4.63E-06	1.39E-05	1.23E-04	1.03E-04	2.45E-05	1.81E-05	2.28E-04	2.92E-04	2.04E-04	>1.82E-04	>1.82E-04	1.80E-04	>1.80E-04	>1.80E-04	>1.80E-04	>1.80E-04	>1.82E-04	2.04E-04	>1.82E-04	>1.82E-04
Clorhidrato de tetraciclina	31	>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	>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

ESTRATEGIA CITÓMICA IN VITRO (ECIV)

COMPUESTOS	Número Acoros base	A704										SH-S153Y										HEPG2														
		ENSAYOS FUNCIONALES			ENSAYOS VIABILIDAD			ENSAYOS FUNCIONALES			ENSAYOS VIABILIDAD			ENSAYOS FUNCIONALES			ENSAYOS VIABILIDAD			ENSAYOS FUNCIONALES			ENSAYOS VIABILIDAD			ENSAYOS FUNCIONALES			ENSAYOS VIABILIDAD							
		PMP	C _a ²⁺	NRU _L	PI	PMP	C _a ²⁺	NRU _L	PI	PMP	C _a ²⁺	NRU _L	PI	PMP	C _a ²⁺	NRU _L	PI	PMP	C _a ²⁺	NRU _L	PI	PMP	C _a ²⁺	NRU _L	PI	PMP	C _a ²⁺	NRU _L	PI	PMP	C _a ²⁺	NRU _L	PI			
Clorhidrato de verapamilo	29	2.48E-05	8.42E-06	1.99E-04	2.04E-04	4.60E-05	4.58E-05	5.04E-05	1.06E-04	1.00E-04	1.48E-05	1.48E-05	1.10E-04	1.00E-04	1.48E-05	1.48E-05	1.10E-04	1.00E-04	1.48E-05	1.48E-05	1.10E-04	1.00E-04	1.48E-05	1.48E-05	1.10E-04	1.00E-04	1.48E-05	1.48E-05	1.10E-04	1.00E-04	1.48E-05	1.48E-05	1.10E-04	1.00E-04		
Clorhidrato Orfenadrina	32	3.17E-05	9.38E-05	2.51E-04	2.08E-04	8.78E-07	2.46E-04	2.28E-04	3.89E-04	7.50E-04	7.50E-05	7.50E-04	3.89E-04	3.89E-04	7.50E-05	7.50E-05	3.89E-04	3.89E-04	7.50E-05	7.50E-05	3.89E-04	3.89E-04	7.50E-05	7.50E-05	3.89E-04	3.89E-04	7.50E-05	7.50E-05	3.89E-04	3.89E-04	7.50E-05	7.50E-05	3.89E-04	3.89E-04		
Cloruro de mercurio (II)	12	3.21E-05	3.67E-05	1.93E-05	5.30E-05	1.57E-05	>1.15E-04	2.80E-05	1.44E-04	>4.73E-05	>1.03E-04	4.90E-05	5.83E-05	6.37E-05	>1.00E-02	>8.56E-02	>8.56E-02	>8.56E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02		
Cloruro de sodio	57	>1.00E-02	>1.00E-02	>8.56E-02	>8.56E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>8.56E-02	>8.56E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>8.56E-02	>8.56E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02	>1.00E-02		
Colchicina	6	2.22E-05	1.87E-05	5.37E-03	4.87E-03	>1.00E-02	3.58E-03	2.97E-04	3.20E-04	3.16E-04	6.10E-05	6.10E-05	3.78E-04	4.30E-04	2.40E-02	2.40E-02	3.78E-04	4.30E-04	2.40E-02	2.40E-02	3.78E-04	4.30E-04	2.40E-02	2.40E-02	3.78E-04	4.30E-04	2.40E-02	2.40E-02	3.78E-04	4.30E-04	2.40E-02	2.40E-02	3.78E-04	4.30E-04		
Diazepam	8	6.24E-05	8.86E-05	4.45E-04	4.55E-04	>8.50E-04	1.10E-04	2.97E-04	3.20E-04	3.16E-04	6.10E-05	6.10E-05	3.78E-04	4.30E-04	2.40E-02	2.40E-02	3.78E-04	4.30E-04	2.40E-02	2.40E-02	3.78E-04	4.30E-04	2.40E-02	2.40E-02	3.78E-04	4.30E-04	2.40E-02	2.40E-02	3.78E-04	4.30E-04	2.40E-02	2.40E-02	3.78E-04	4.30E-04		
Dibromuro diquat	44	1.99E-05	7.18E-04	9.43E-04	7.92E-04	1.19E-05	2.55E-04	3.99E-05	7.93E-04	9.81E-04	>1.00E-03	5.69E-04	2.27E-04	7.50E-04	1.99E-05	1.99E-05	7.93E-04	9.81E-04	>1.00E-03	5.69E-04	2.27E-04	7.50E-04	1.99E-05	1.99E-05	7.93E-04	9.81E-04	>1.00E-03	5.69E-04	2.27E-04	7.50E-04	1.99E-05	1.99E-05	7.93E-04	9.81E-04		
Diclofurov	39	9.69E-05	1.98E-05	1.29E-04	1.69E-04	3.13E-04	6.20E-04	1.83E-04	9.70E-04	3.80E-04	>9.00E-04	1.20E-04	4.10E-04	4.10E-04	1.29E-04	1.29E-04	9.70E-04	3.80E-04	>9.00E-04	1.20E-04	4.10E-04	4.10E-04	1.29E-04	1.29E-04	9.70E-04	3.80E-04	>9.00E-04	1.20E-04	4.10E-04	4.10E-04	1.29E-04	1.29E-04	9.70E-04	3.80E-04		
Dietilglicol	43	3.93E-01	7.50E-01	4.76E-01	5.20E-01	>4.37E-01	4.64E-04	2.92E-01	4.77E-01	9.31E-01	6.11E-01	9.31E-01	5.93E-01	6.48E-01	4.76E-01	4.76E-01	9.31E-01	6.11E-01	9.31E-01	5.93E-01	6.48E-01	6.48E-01	4.76E-01	4.76E-01	9.31E-01	6.11E-01	9.31E-01	5.93E-01	6.48E-01	6.48E-01	4.76E-01	4.76E-01	9.31E-01	6.11E-01		
Digoxina	9	1.50E-05	3.00E-06	>1.49E-04	>1.49E-04	5.30E-09	5.50E-07	8.70E-03	1.95E-04	6.90E-10	5.25E-08	3.29E-09	>1.28E-04	3.81E-05	1.50E-05	1.50E-05	1.95E-04	6.90E-10	5.25E-08	3.29E-09	>1.28E-04	3.81E-05	1.50E-05	1.50E-05	1.95E-04	6.90E-10	5.25E-08	3.29E-09	>1.28E-04	3.81E-05	1.50E-05	1.50E-05	1.95E-04	6.90E-10		
Dimetilformamida	51	>2.50E-01	>2.50E-01	2.01E-01	1.63E-01	1.88E-01	2.13E-01	2.08E-01	2.70E-01	1.85E-01	>6.00E-01	2.03E-01	9.06E-01	7.19E-01	>2.50E-01	>2.50E-01	2.01E-01	1.63E-01	1.88E-01	2.13E-01	2.08E-01	2.70E-01	1.85E-01	>6.00E-01	2.03E-01	9.06E-01	7.19E-01	>2.50E-01	>2.50E-01	2.01E-01	1.63E-01	1.88E-01	2.13E-01	2.08E-01	2.70E-01	
Estreptina	80	2.60E-04	5.36E-04	>1.00E-03	>1.00E-03	2.86E-04	9.97E-05	>1.00E-03	>1.00E-03	1.35E-04	3.50E-05	>1.00E-03	>1.00E-03	>1.00E-03	2.60E-04	2.60E-04	>1.00E-03	>1.00E-03	1.35E-04	3.50E-05	>1.00E-03	>1.00E-03	>1.00E-03	>1.00E-03	2.60E-04	2.60E-04	>1.00E-03	>1.00E-03	>1.00E-03	>1.00E-03	>1.00E-03	>1.00E-03	>1.00E-03	>1.00E-03		
Etanol	37	1.28E-00	1.23E-00	1.12E+00	1.15E+00	1.23E+00	1.97E-01	1.20E+00	1.05E+00	>3.50E-01	>1.01E+00	1.46E+00	1.57E+00	1.57E+00	1.28E-00	1.23E-00	1.12E+00	1.15E+00	1.23E+00	1.97E-01	1.20E+00	>3.50E-01	>1.01E+00	1.46E+00	1.57E+00	1.28E-00	1.23E-00	1.12E+00	1.15E+00	1.23E+00	1.97E-01	1.20E+00	>3.50E-01	>1.01E+00	1.46E+00	1.57E+00
Fenobarbital	14	6.15E-03	1.74E-03	1.13E-02	>1.50E-02	>1.50E-02	>1.50E-02	7.30E-03	1.05E-02	>2.00E-03	3.40E-02	1.10E-03	9.98E-03	1.22E-02	6.15E-03	6.15E-03	1.13E-02	>1.50E-02	>1.50E-02	>1.50E-02	7.30E-03	1.05E-02	>2.00E-03	3.40E-02	1.10E-03	9.98E-03	1.22E-02	6.15E-03	6.15E-03	1.13E-02	>1.50E-02	>1.50E-02	>1.50E-02	7.30E-03	1.05E-02	
Fisostigmina	40	4.87E-04	4.97E-04	3.29E-03	9.29E-04	1.22E-03	1.86E-03	7.90E-04	2.86E-03	3.22E-03	3.20E-03	7.19E-03	4.51E-03	4.51E-03	4.87E-04	4.87E-04	3.29E-03	9.29E-04	1.22E-03	1.86E-03	7.90E-04	2.86E-03	3.22E-03	3.20E-03	7.19E-03	4.51E-03	4.51E-03	4.87E-04	4.87E-04	3.29E-03	9.29E-04	1.22E-03	1.86E-03	7.90E-04		
Fluoruro de sodio	48	5.92E-05	2.20E-03	2.87E-03	3.84E-03	>1.50E-02	7.14E-05	1.28E-02	1.49E-02	>2.50E-03	>2.50E-03	>2.50E-03	>2.50E-03	>2.50E-03	5.92E-05	5.92E-05	2.87E-03	3.84E-03	>1.50E-02	7.14E-05	1.28E-02	>2.50E-03	>2.50E-03	>2.50E-03	>2.50E-03	5.92E-05	5.92E-05	2.87E-03	3.84E-03	>1.50E-02	7.14E-05	1.28E-02	>2.50E-03	>2.50E-03		
Glicol etileno	54	>1.61E-00	6.76E-01	1.52E+00	1.98E+00	>1.62E+00	>1.62E+00	1.37E+00	1.77E+00	>1.61E+00	1.40E+00	>1.61E+00	3.32E+00	3.32E+00	>1.61E-00	>1.61E-00	1.52E+00	1.98E+00	>1.62E+00	>1.62E+00	1.37E+00	1.77E+00	>1.61E+00	>1.61E+00	3.32E+00	3.32E+00	>1.61E-00	>1.61E-00	1.52E+00	1.98E+00	>1.62E+00	>1.62E+00	1.37E+00	1.77E+00		
Gitofosinato de amonio	41	6.31E-04	>8.00E-02	>8.00E-02	>8.00E-02	1.43E-03	2.92E-02	7.45E-02	>8.00E-02	>8.00E-02	>8.00E-02	>8.00E-02	>8.00E-02	>8.00E-02	6.31E-04	6.31E-04	>8.00E-02	>8.00E-02	>8.00E-02	>8.00E-02	1.43E-03	2.92E-02	7.45E-02	>8.00E-02	>8.00E-02	6.31E-04	6.31E-04	>8.00E-02	>8.00E-02	>8.00E-02	>8.00E-02	>8.00E-02	>8.00E-02	>8.00E-02		
Hidrato de cloral	76	3.60E-02	6.03E-03	1.44E-03	9.09E-03	>1.00E-02	1.44E-04	5.77E-03	1.84E-02	1.33E-03	>1.47E-02	2.73E-03	1.14E-02	2.47E-02	3.60E-02	3.60E-02	1.44E-03	9.09E-03	>1.00E-02	1.44E-04	5.77E-03	1.84E-02	1.33E-03	>1.47E-02	2.73E-03	1.14E-02	2.47E-02	3.60E-02	3.60E-02	1.44E-03	9.09E-03	>1.00E-02	1.44E-04	5.77E-03		
Lauril sulfato de sodio	15	1.80E-04	1.30E-04	2.48E-04	2.18E-04	1.60E-04	1.69E-04	2.18E-04	2.28E-04	5.80E-05	3.09E-04	1.79E-04	1.45E-04	3.03E-04	1.80E-04	1.80E-04	2.48E-04	2.18E-04	1.60E-04	1.69E-04	2.18E-04	2.28E-04	5.80E-05	3.09E-04	1.79E-04	1.45E-04	3.03E-04	1.80E-04	1.80E-04	2.48E-04	2.18E-04	2.28E-04	5.80E-05	3.09E-04	1.79E-04	1.45E-04

COMPUESTOS	Número Acetox base	ESTRATEGIA CITÓMICA IN VITRO (ECIV)											
		A704				SH-S5SY				HEPG2			
		ENSAYOS FUNCIONALES		ENSAYOS VIABILIDAD		ENSAYOS FUNCIONALES		ENSAYOS VIABILIDAD		ENSAYOS FUNCIONALES		ENSAYOS VIABILIDAD	
PMP	C _a ²⁺	NRU ₁	PI	PMP	C _a ²⁺	NRU ₁	PI	PMP	C _a ²⁺	NRU ₁	PI		
Lindano	34	>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	>1.29E-04	
Malathion	11	>1.00E-03	>1.00E-03	>1.00E-03	>1.00E-03	8.00E-06	>1.00E-03	>1.00E-03	8.00E-04	>2.00E-03	>2.00E-03	>1.00E-03	
Metanol	55	2.37E-00	2.49E-00	2.53E-00	3.61E-00	5.34E-01	1.83E-00	2.90E-00	>1.00E+00	>1.00E+00	>1.00E+00	1.05E-01	
Atropina	3	3.36E-05	7.03E-04	7.93E-04	1.61E-03	3.04E-04	1.10E-03	1.10E-03	1.61E-04	2.09E-04	>9.30E-04	2.48E-03	
Nicotina	33	2.74E-03	6.99E-03	3.81E-03	1.23E-02	1.26E-03	2.59E-03	1.54E-02	4.95E-03	3.00E-03	1.43E-03	>2.00E-02	
Ocratoxina A	45	1.79E-05	2.00E-06	>1.00E-04	>1.00E-04	1.47E-05	>1.00E-04	>1.00E-04	3.76E-05	>1.00E-04	>1.00E-04	>1.00E-04	
Paratión	35	>1.00E-03	>1.00E-03	>1.00E-03	>1.00E-03	>1.00E-03	>1.00E-03	>1.00E-03	7.00E-04	>1.00E-03	1.70E-04	>1.00E-03	
Pentaclorofenol	13	2.65E-05	5.69E-05	1.01E-04	2.41E-04	1.39E-04	1.30E-04	1.52E-04	>3.60E-04	7.00E-05	7.60E-05	2.23E-04	
Pireno	23	>5.81E-05	>5.81E-05	>5.81E-05	>5.81E-05	>6.00E-05	>6.00E-05	>6.00E-05	>6.00E-05	>6.00E-05	>6.00E-05	>6.00E-05	
Rifampicina	30	>2.50E-04	>2.50E-04	>2.50E-04	>2.50E-04	4.32E-05	>2.50E-04	>2.50E-04	2.42E-05	>2.50E-04	>2.50E-04	>2.50E-04	
Selenato de sodio	91	>5.65E-03	1.41E-03	3.30E-04	4.59E-04	3.03E-03	>5.65E-02	2.60E-05	1.66E-04	>1.22E-02	>6.09E-03	6.32E-04	
Sulfato de litio	60	1.60E-01	3.57E-03	4.14E-02	6.99E-02	>7.00E-02	2.13E-02	1.25E-02	4.73E-02	4.68E-02	>1.00E-01	6.60E-02	
Sulfato de talio	66	1.36E-04	2.23E-04	4.16E-04	1.96E-03	>2.00E-03	>2.00E-03	1.27E-03	1.98E-03	>1.00E-03	>1.00E-03	>2.00E-03	
tert-butilhidroperóxido	19	1.12E-06	>6.00E-06	3.06E-06	7.30E-06	>2.00E-05	8.23E-08	1.68E-05	1.36E-05	>1.47E-04	3.80E-06	3.01E-04	
Trióxido de arsénico	64	2.37E-05	5.36E-06	>1.26E-04	>4.63E-03	>1.26E-04	>1.26E-04	1.20E-04	3.79E-05	>1.26E-04	9.47E-05	>1.26E-04	
Valproato de sodio	16	1.89E-03	9.79E-04	>2.30E-02	>2.30E-02	>2.30E-02	>2.30E-02	>2.30E-02	>2.30E-02	>2.30E-02	1.70E-02	>2.30E-02	
Warfarina	67	6.04E-04	2.20E-05	>4.63E-03	>4.63E-03	2.57E-04	>2.30E-03	3.84E-03	>2.20E-03	>2.20E-03	1.70E-02	>2.20E-03	

Tabla 9. Valores de los indicadores de toxicidad LOEC en la Estrategia Citómica *In Vitro* (ECIV).

COMPUESTOS	Número Acetoxibase	INDICADORES DE TOXICIDAD LOEC DE LA ECIV							
		LOEC ECIV	LOEC EF	A704 LOEC ECIV	A704 LOEC EF	SH-SVSY LOEC ECIV	SH-SVSY LOEC EF	HepG2 LOEC ECIV	HepG2 LOEC EF
Acetaminofeno	1	1,90E-03	1,90E-03	1,90E-03	1,90E-03	1,78E-02	1,86E-02	1,10E-02	1,10E-02
17 α -etilnilestradiol	47	3,50E-06	3,50E-06	6,74E-06	6,74E-06	3,50E-06	3,50E-06	7,80E-05	7,80E-05
5-fluorouracilo	17	6,55E-06	6,55E-06	2,37E-03	2,37E-03	6,23E-05	6,23E-05	6,55E-06	6,55E-06
Acetonitrilo	92	3,47E-02	1,59E-01	5,12E-01	5,12E-01	1,59E-01	1,59E-01	3,47E-02	3,84E-01
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	77	7,03E-05	7,03E-05	7,03E-05	7,03E-05	1,23E-03	1,23E-03	7,09E-04	7,09E-04
Ácido acetilsalicílico	2	6,99E-04	6,99E-04	6,99E-04	6,99E-04	1,20E-02	NE	1,55E-02	NE
Acetilaldehído (acroleína)	20	4,07E-05	NE	4,07E-05	NE	6,61E-05	NE	7,59E-05	NE
Alcohol isopropílico	10	8,00E-04	8,00E-04	3,40E-02	3,40E-02	2,00E-02	2,00E-02	8,00E-04	8,00E-04
Benceno	18	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Bitartrato de epinafrina	96	9,66E 05	9,66E 05	2,82E 04	3,04E 04	9,66E 05	9,66E 05	1,70E 04	1,70E 04
Cadmio (II) cloruro	21	2,40E-07	2,40E-07	3,98E-06	2,55E-05	5,75E-06	5,75E-06	2,40E-07	2,40E-07
Cafeína	4	1,06E-03	1,06E-03	1,06E-03	1,06E-03	7,03E-03	7,03E-03	1,70E-03	1,70E-03
Carbamazepina	5	4,50E-04	4,50E-04	NE	NE	4,50E-04	4,50E-04	NE	NE
Cicloheximida	7	8,89E-06	8,89E-06	8,89E-06	8,89E-06	1,85E-04	1,85E-04	3,72E-05	4,40E-04
Ciclosporina A	46	2,95E-07	2,95E-07	6,59E-07	6,59E-07	2,95E-07	2,95E-07	1,50E-05	1,50E-05
Cis diammineplatino	42	1,67E-06	1,67E-06	1,46E-05	1,46E-05	1,67E-06	1,67E-06	1,86E-04	2,23E-04
Clorhidrato de amidaroma	28	1,25E-05	1,25E-05	4,19E-05	4,19E-05	1,25E-05	1,25E-05	5,13E-05	5,47E-05
Clorhidrato de amitriptilina	53	1,20E-07	1,20E-07	1,20E-07	1,20E-07	8,32E-06	NE	3,32E-05	3,32E-05
Clorhidrato de propranolol	63	4,65E-06	4,65E-06	4,65E-06	4,65E-06	1,81E-05	1,81E-05	1,66E-04	2,04E-04
Clorhidrato de tetraciclina	31	2,30E-04	2,30E-04	NE	NE	NE	NE	2,30E-04	2,30E-04
Clorhidrato de verapamilo	29	8,42E-06	8,42E-06	8,42E-06	8,42E-06	4,58E-05	4,58E-05	1,48E-05	1,48E-05
Clorhidrato Ordenadina	32	8,78E-07	8,78E-07	3,17E-05	3,17E-05	8,78E-07	8,78E-07	7,50E-05	7,50E-05
Cloruro de mercurio (II)	12	1,57E-05	1,57E-05	1,95E-05	3,21E-05	1,57E-05	1,57E-05	4,90E-05	4,90E-05
Cloruro de sodio	57	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Colchicina	6	4,48E-07	4,48E-07	1,87E-05	1,87E-05	3,58E-03	3,58E-03	4,48E-07	4,48E-07
Diazepam	8	6,10E-05	6,10E-05	6,24E-05	6,24E-05	1,10E-04	1,10E-04	6,10E-05	6,10E-05
Dibromuro diguaf	44	1,19E 05	1,19E 05	1,89E 05	1,99E 05	1,19E 05	1,19E 05	2,29E 04	3,81E 04
Dietorvos	39	1,98E-05	1,98E-05	1,98E-05	1,98E-05	1,82E-04	3,15E-04	1,20E-04	3,80E-04
Diisilenglicol	43	4,64E-04	4,64E-04	3,93E-01	3,93E-01	4,64E-04	4,64E-04	5,37E-01	6,11E-01
Digoxina	9	6,90E-10	6,90E-10	3,00E-06	3,00E-06	5,30E-09	5,30E-09	6,90E-10	6,90E-10
Dimetiltormamida	51	1,62E-01	1,85E-01	1,62E-01	NE	1,88E-01	1,88E-01	1,85E-01	1,85E-01
Estricnina	80	3,50E 05	3,50E 05	2,60E 04	2,60E 04	9,97E 05	9,97E 05	3,50E 05	3,50E 05
Etanol	37	1,97E-01	1,97E-01	1,12E+00	1,23E+00	1,97E-01	1,97E-01	1,08E+00	1,08E+00
Etileno glicol	54	6,76E-01	6,76E-01	6,76E-01	6,76E-01	1,38E+00	NE	1,40E+00	1,40E+00
Fenobarbital	14	1,10E-03	1,10E-03	1,74E-03	1,74E-03	7,24E-03	NE	1,10E-03	1,10E-03
Fisostigmina	40	4,87E-04	4,87E-04	4,87E-04	4,87E-04	7,94E-04	1,22E-03	3,20E-03	3,20E-03
Fluoruro de sodio	48	5,92E-05	5,92E-05	5,92E-05	5,92E-05	7,14E-05	7,14E-05	2,42E-03	2,42E-03
Glufofosinato de amonio	41	6,31E-04	6,31E-04	6,31E-04	6,31E-04	1,43E-03	1,43E-03	NE	NE
Hidrato de cloral	76	4,32E-04	4,32E-04	1,45E-03	6,03E-03	4,32E-04	4,32E-04	1,33E-03	1,33E-03
Lauril sulfato de sodio	15	5,80E-05	5,80E-05	1,30E-04	1,30E-04	1,60E-04	1,60E-04	5,80E-05	5,80E-05
Lindano	34	1,50E-04	1,50E-04	NE	NE	NE	NE	1,50E-04	1,50E-04
Malathion	11	8,00E-06	8,00E-06	NE	NE	8,00E-06	8,00E-06	8,00E-04	8,00E-04
Metanol	55	1,05E 01	5,54E 01	2,37E+00	2,37E+00	5,54E 01	5,54E 01	1,05E 01	NE
Monohidrato de sulfato de atropina	3	3,36E-05	3,36E-05	3,36E-05	3,36E-05	2,57E-04	2,57E-04	1,61E-04	1,61E-04
Nicolina	33	1,26E-03	1,26E-03	2,74E-03	2,74E-03	1,26E-03	1,26E-03	1,43E-03	1,43E-03
Ocratoxina A	45	2,00E-06	2,00E-06	2,00E-06	2,00E-06	1,47E-05	1,47E-05	3,76E-05	3,76E-05
Paratión	38	1,70E-04	1,70E-04	NE	NE	NE	NE	1,70E-04	1,70E-04
Pentaclorofenol	13	2,65E 05	2,65E 05	2,65E 05	2,65E 05	1,30E 04	1,30E 04	7,00E 05	7,00E 05
Pireno	23	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Rifampicina	30	2,42E-05	2,42E-05	NE	NE	4,32E-05	4,32E-05	2,42E-05	2,42E-05
Selenato de sodio	91	2,57E 05	1,41E 03	3,31E 04	1,41E 03	2,57E 05	3,03E 03	6,31E 04	NE
Sulfato de litio	60	3,57E-03	3,57E-03	3,57E-03	3,57E-03	1,26E-02	2,13E-02	4,68E-02	4,68E-02
Sulfato de talio	66	1,36E-04	1,36E-04	1,36E-04	1,36E-04	1,26E-03	NE	6,92E-04	NE
tert-butilhidroperóxido	19	8,23E-08	8,23E-08	1,12E-06	1,12E-06	8,23E-08	8,23E-08	3,80E-06	3,80E-06
Trióxido de arsénico	64	5,36E-06	5,36E-06	5,36E-06	5,36E-06	3,80E-05	NE	9,47E-05	9,47E-05
Valproato de sodio	16	9,79E-04	9,79E-04	9,79E-04	9,79E-04	NE	NE	1,70E-02	1,70E-02
Warfarina	67	2,20E-05	2,20E-05	2,20E-05	2,20E-05	2,57E-04	2,57E-04	NE	NE

2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PREDICTIVA DE LA ESTRATEGIA CITÓMICA *IN VITRO*.

Tras haber establecido los valores numéricos de los indicadores de toxicidad *in vitro* (IC50, EC50 y LOEC) aplicando la ECIV a la biblioteca de compuestos, se procedió a evaluar su valor predictivo de toxicidad humana *in vivo*. Para ello, siguiendo los procedimientos de validación utilizados en diferentes estudios multicéntricos similares a este trabajo (28), se compararon los valores de toxicidad *in vitro* presentados en el apartado 1, con los valores de referencia de LC50 en humanos, publicados por los grupos de la Work Package 1 del Proyecto AcuteTox (37).

Los valores de IC50 y EC50 de la ECIV se compararon exclusivamente con los valores de LC50 en humanos, ya que los estudios multicéntricos de referencia han demostrado que los valores de IC50 obtenidos a partir de ensayos *in vitro* se correlacionan mejor con los valores de LC50 que con los valores de LD50 (71). Una serie de factores biocinéticos podrían explicar esta mejor correlación, incluyendo la toxicidad órgano-específica y a la absorción, distribución y metabolismo del compuesto (72).

Para comparar el valor predictivo de la ECIV con la capacidad de predicción de ensayos *in vitro* de referencia, se estableció también la correlación de los valores de LC50 humana con los valores de IC50 del ensayo de captación del Rojo Neutro por fibroblastos murinos 3T3

(NRU_T), previamente publicados por los grupos de la Work Package 2 del proyecto AcuteTox (37).

Por último, para poder comparar la capacidad predictiva de la ECIV con la de los ensayos de toxicidad *in vivo*, los valores de referencia de LD50 en rata y ratón, publicados por los grupos de la Work Package 1 del Proyecto AcuteTox (34) se correlacionaron de la misma forma con los valores de LC50 en humanos.

2.1 CORRELACIÓN DE LOS VALORES DE LOS INDICADORES DE TOXICIDAD IN VITRO DE LA ECIV CON LOS VALORES DE REFERENCIA DE LC50 EN TOXICIDAD HUMANA *IN VIVO*.

En estadística, el coeficiente de correlación de Pearson es el índice que puede utilizarse para medir el grado de relación de dos variables siempre y cuando ambas sean cuantitativas. En el caso de una regresión simple, como es el de nuestras comparaciones, el mejor coeficiente para determinar la calidad predictiva del modelo es el coeficiente de determinación (R^2), el cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson.

Los indicadores de toxicidad IC50 y EC50 para los 13 ensayos de la ECIV y los indicadores de toxicidad LOEC fueron correlacionados con los valores de LC50 para obtener los valores de R^2 , tal como se muestra en la Tabla 10. No fueron incluidos en el estudio estadístico

de correlación los valores señalados con el signo > en la Tabla 8, ni tampoco los compuestos sin efecto (EF) de la Tabla 9.

Como se muestra en la Tabla 10, tan sólo los indicadores IC50/EC50 de los ensayos HepG2-NRU_L, SH-SY5Y-NRU_L y A704-PMP, así como el valor de LOEC en la línea SH-SY5Y, presentan coeficientes de determinación inferiores a los obtenidos con el ensayo *in vitro* de referencia 3T3-NRU_T, al compararlos con las correspondientes LC50 en humanos. Los 17 valores restantes de los indicadores de toxicidad proporcionados por la ECIV mejoran los coeficientes R² del ensayo de referencia de citotoxicidad *in vitro* (3T3-NRU_T) en su comparación con la toxicidad humana *in vivo*.

Con respecto a los valores de referencia de toxicidad *in vivo* en rata (LD50), se pudo comprobar que ocho de los indicadores de toxicidad generados por los ensayos de la ECIV mejoran los coeficientes R² de toxicidad *in vivo* de referencia en rata, en concreto los valores de IC50/EC50 de los ensayos A704-Ca²⁺, A704-PI y A704-NRU_L, y los valores LOEC generados por la ECIV total y la ECIV en la línea HepG2, por el conjunto de Ensayos Funcionales de la ECIV (EF), y por los Ensayos de Viabilidad (EV) en las líneas HepG2 y A.704.

Por último, con respecto a los valores de referencia de toxicidad *in vivo* en ratón (LD50), sus coeficientes R² son mejorados por los valores IC50/EC50 de los ensayos SH-SY5Y-PI, HepG2-PI y HepG2-PMP.

El establecimiento de la significación estadística de las diferencias observadas entre los coeficientes R^2 de las diferentes correlaciones *in vitro/in vivo* e *in vivo/in vivo* resumidas en la Tabla 10, presenta dificultades derivadas de la diferencia del tamaño poblacional entre los diferentes indicadores de toxicidad manejados, ya que no todos los conjuntos de datos que se comparan contienen el mismo número de datos para el mismo número de compuestos. Así, en el caso de la toxicidad humana *in vivo*, únicamente están disponibles los valores de LC50 en 45 compuestos, mientras que en el caso de toxicidad murina *in vivo*, sólo se han determinado hasta el momento los valores de LD50 para 33 compuestos en el caso de la rata y para 28 compuestos en el ratón.

Para superar esta dificultad se compararon los R^2 utilizando el paquete estadístico "Psych" (73), en lenguaje R (74). Mediante este paquete se ha aplicado un test estadístico que compara las correlaciones entre los valores de referencia y los valores generados por la ECIV, indicando si la correlación es significativamente mejor en alguno de los casos. El programa examinó la diferencia entre dos correlaciones, considerando tres variables: X, Y, Z., siendo (X) los valores de LC50 en humanos, (Y) los valores de IC50 del ensayo NRU_T , los valores LD50 en rata o los valores en LD50 de ratón y (Z) los valores de los indicadores de toxicidad generados por la ECIV. Por ejemplo, se analizó si la correlación XY (LC50 vs IC50 NRU_T) era diferente de la correlación XZ (LC50 vs IC50 A704-PI) y si esta diferencia era estadísticamente significativa. De esta manera se

compararon todos los indicadores de toxicidad de la ECIV con los valores de referencia *in vitro* e *in vivo*. Los valores de significación estadística (p) obtenidos en las diferentes comparaciones fueron en todos los casos superiores a 0,05. Este resultado indica que la capacidad predictiva de la ECIV y de sus ensayos no es significativamente diferente de las capacidades predictivas de los ensayos de referencia de toxicidad *in vivo* e *in vitro*, a pesar de que, como se ha mostrado en la Tabla 10, en bastantes casos, los coeficientes R² de nuestros ensayos son claramente mejores que los de los valores de referencia.

La significación estadística depende tanto del tamaño de la muestra como de la varianza existente entre los valores a comparar. En este estudio, a pesar de tener un tamaño muestral relativamente grande, la diferencia entre los valores a comparar es muy pequeña (al tratarse de correlaciones su valor está en el intervalo [0,1]) ya que los valores de correlación son muy parecidos entre ellos.

En otros grupos de investigación donde se ensayaron los mismos compuestos obtuvieron coeficientes de determinación de 0,51 con el ensayo de unidades formadoras de colonias de granulocitos y monocitos, que tampoco resultó estadísticamente significativo (75) y de 0,63 mediante la medida de la producción de citoquinas *in vitro* utilizando células mononucleadas de sangre periférica (PBGM) (72), pero únicamente correlacionando 28 compuestos de los 57 a analizar. En este caso también utilizaron la LOEC en un total de 5 ensayos.

Con respecto a otros estudios toxicológicos de envergadura similar, el nuestro puede ser comparado con el programa multicéntrico MEIC, ya comentado en el apartado de Introducción (Clemedson et al 1996.b.). En dicho programa se establecieron los indicadores de toxicidad *in vitro* (EC50) de diez ensayos celulares de toxicidad aguda (24h) con líneas humanas para una biblioteca de 50 compuestos, y se compararon sus correspondientes indicadores de referencia de toxicidad *in vivo* en humanos (71) y roedores y con datos de farmacocinética (76) En este estudio se demostró que la EC50 promedio de los diez ensayos con los 50 compuestos predecía mejor ($R^2 = 0,74$, un valor similar al obtenido en nuestra ECIV) la LC50 en humanos que los indicadores de toxicidad *in vivo* en roedores ($R^2 = 0,60-0,66$). Hay que destacar que la predicción *in vitro-in vivo* mejoró notablemente al utilizar un algoritmo basado en las propiedades de permeabilidad de la barrera hemato-encefálica (77), del que nosotros no hemos dispuesto en nuestro trabajo.

Tabla 10. Coeficientes de determinación de Pearson (R^2) entre los valores de los indicadores de toxicidad de la ECIV y los datos teóricos respecto a la LC50 de humano (37).

LÍNEA CELULAR/ESPECIE	INDICADOR DE TOXICIDAD	ENSAYO	n	R^2
HepG2	EC50	PMP	22	0,771
HepG2	IC50	PI	24	0,708
SH-SHY5Y	IC50	PI	35	0,696
RATÓN	LD50	In Vivo	28	0,650
HepG2	LOEC	ECIV	41	0,643
HepG2	LOEC	EF	37	0,626
A704/SH-SY5Y/HepG2	LOEC	ECIV	44	0,626
A704/SH-SY5Y/HepG2	LOEC	EF	44	0,603
A704	IC50	NRU _L	29	0,596
A704	IC50	PI	27	0,595
A704	LOEC	ECIV	39	0,594
A704	EC50	Ca ²⁺	35	0,592
RATA	LD50	In Vivo	33	0,591
SH-SHY5Y	EC50	Ca ²⁺	31	0,588
SH-SHY5Y	EC50	PMP	22	0,580
HepG2	EC50	MMP	20	0,580
HepG2	EC50	Ca ²⁺	14	0,579
SH-SHY5Y	LOEC	ECIV	41	0,575
A704	LOEC	EF	38	0,5612
3T3	IC50	NRU_T	44	0,561
A704	EC50	PMP	35	0,559
SH-SHY5Y	IC50	NRU _L	35	0,558
HepG2	IC50	NRU _L	28	0,557
SH-SHY5Y	LOEC	EF	35	0,5328

2.2. EVALUACIÓN DE LA CORRELACIÓN INTERNA ENTRE LOS INDICADORES DE TOXICIDAD *IN VITRO* PROPORCIONADOS POR LOS ENSAYOS DE LA ECIV Y POR LOS ENSAYOS NO CITOMÉTRICOS DE VIABILIDAD.

La obtención de indicadores cuantitativos de toxicidad LOEC para cada uno de los ensayos de la ECIV en casi todos los compuestos, además de permitir evaluar su capacidad predictiva de toxicidad humana, permite establecer la correlación entre los diferentes Ensayos de Viabilidad y entre éstos y los Ensayos Funcionales. Mediante el diseño de gráficas de regresión entre los valores de LOEC de los diferentes ensayos (Figuras 16, 17, 18 y 19) se puede, por una parte, estimar la coherencia interna, la redundancia o la aparente inconsistencia entre los ensayos de la ECIV. Por otra parte, y de más interés para nosotros, dichas correlaciones permiten mostrar las características diferenciales del análisis toxicológico por CMF tal y como se plantea en nuestro estudio, es decir, seleccionando la población de células vivas para la cuantificación de parámetros funcionales.

La primera comparación se estableció entre los resultados del ensayo *in vitro* de referencia NRU_T , que se determina sobre cultivos de fibroblastos murinos 3T3, y el ensayo homólogo de captación del Rojo Neutro adaptado en nuestro laboratorio (NRU_L) para su aplicación a las tres líneas del presente estudio (Figura 16). El análisis de la correlación en un total de 44 compuestos, muestra una correlación

positiva entre los valores de toxicidad de ambos ensayos, como cabía esperar, con sólo 7 compuestos fuera del intervalo de confianza de la correlación perfecta, de los que la mayoría aparecen menos tóxicos en nuestro ensayo interno (NRU_L) que en el ensayo de referencia (NRU_T).

Sin embargo, y contrariamente a lo esperable, el coeficiente de determinación no es muy elevado ($R^2 = 0,58$), indicando cierta discrepancia entre ambos ensayos. El comportamiento en esta gráfica del compuesto de referencia, lauril sulfato sódico (#15), detergente empleado como control positivo de muerte celular por necrosis (36), demuestra que dicha discrepancia no se debe a problemas metodológicos: este compuesto presenta una correlación perfecta entre ambos ensayos, situándose en una posición central, sobre la misma línea de regresión 1:1. La explicación de la discrepancia habría que buscarla, probablemente, en la diferente sensibilidad de las líneas celulares humanas, con respecto a los fibroblastos murinos del ensayo de referencia.

Este resultado sugiere que no es recomendable establecer correlaciones entre los datos de toxicidad generados por el ensayo de referencia (NRU_T) y los ensayos *in vitro* realizados con otras líneas celulares a la hora de validar los resultados de éstos últimos.

Mucho más coherente resultó la comparación entre el ensayo citómico de viabilidad con PI y el ensayo de Captación del Rojo Neutro adaptado (NRU_L) a las tres líneas celulares de nuestro estudio. Como muestra la Figura 17, la correlación entre ambos

ensayos para 43 compuestos es prácticamente perfecta ($R^2 = 0,85$) y genera una recta de regresión casi superponible con la línea de regresión perfecta. Además, sólo tres compuestos quedan fuera del intervalo de confianza de la línea de regresión. De nuevo, el control positivo lauril sulfato sódico se muestra en una posición central en la correlación.

Estos datos confirman que el ensayo citómico con PI y el ensayo standard de viabilidad (NRU_I) son totalmente consistentes cuando se utilizan las mismas líneas celulares, lo que valida el análisis citómico de viabilidad como herramienta en la cuantificación de toxicidad *in vitro*. Hay que tener en cuenta, además, que si un laboratorio dispone de sistemas de CMF multiparamétrica, el ensayo citómico con PI es más rápido que el ensayo de NRU y permite multiplexar la cuantificación de viabilidad con otros parámetros funcionales, estimados con fluorocromos compatibles ópticamente con PI.

Las correlaciones entre el ensayo citómico de viabilidad con PI y los Ensayos Funcionales de la ECIV, calculadas en las Figuras 18 y 19 para un total de 44 compuestos, muestran coeficientes de determinación más bajos que el de la excelente correlación entre el ensayo citómico de viabilidad con PI y el ensayo NRU_L . La correlación entre el ensayo del potencial de membrana plasmática (PMP) y el ensayo de captación de PI presenta una $R^2 = 0,61$ (Figura 18), con 11 compuestos fuera del intervalo de confianza, de los que 10 presentan más toxicidad en el ensayo de PMP. Con respecto a la

correlación entre el ensayo del Ca^{2+} libre intracelular y el ensayo de captación de PI, ésta presenta una R^2 de 0,48 (Figura 19), con 15 compuestos fuera del intervalo de confianza, de los que 12 presentan más toxicidad en el ensayo de Ca^{2+} libre intracelular.

Esta aparente baja correlación entre los ensayos citómicos de viabilidad y los funcionales no es de carácter metodológico, como una vez más lo demuestra el compuesto de control positivo, lauril sulfato sódico, que en estas correlaciones también se sitúa de forma central en la recta de correlación perfecta. La explicación del resultado deriva de la especial forma en que los parámetros funcionales se determinan: análisis citómico específico de las células viables, identificadas por sus características de morfología y exclusión del colorante de células muertas (PI). El hecho de que los valores mínimos de concentración con efecto (LOEC) sobre los parámetros funcionales sean menores que los valores de concentración con efecto de muerte celular para algunos compuestos, indica que en dichos casos el parámetro funcional se comporta como un indicador más temprano de toxicidad y su alteración antecede a la entrada de la célula en el proceso de muerte, detectada por la captación de PI. Las células afectadas tempranamente por los compuestos tóxicos (menores LOEC de Ensayos Funcionales) podrían poner en marcha procesos adaptativos o compensatorios que les permitirían retrasar su muerte (mayores LOEC de ensayo de PI). Estos resultados tampoco contradicen los conocimientos existentes acerca del valor establecido del PMP y del Ca^{2+} libre intracelular como marcadores tempranos de citotoxicidad (56).

Nuestros datos, por el contrario, muestran el interés de la CMF para detectar fenómenos tempranos de toxicidad celular y posibles cambios adaptativos mediante la selección de células viables, en un entorno de muerte celular que, además, puede ser cuantificada simultáneamente al análisis de los procesos funcionales que la preceden. Es evidente que esta aproximación metodológica es mucho más informativa que las determinaciones típicas de la Toxicología *In Vitro* (IC50 basada en la letalidad) e, incluso, que los análisis bioquímicos o metabólicos realizados con técnicas que no discriminan la subpoblación de células vivas (genómica, proteómica o metabolómica).

Al aplicar el panel de citotoxicidad no se observa una mejora en el número de compuestos outlier, no se identificó ninguna alerta y la clasificación de los compuestos según las clases de GHS tampoco mejoró respecto al test de 3T3 o los test *in vivo* en rata y ratón ¿Esto sucede por el tipo de ensayo o por las líneas celulares que utilizamos?

En el contexto del Proyecto AcuteTox, se realizó un análisis estadístico independiente, comparando los 8 ensayos de citotoxicidad basal aplicados en el Proyecto a la misma biblioteca de 57 compuestos estudiados en este trabajo. Nuestros ensayos de entrada de yoduro de propidio (PI) (78) en las tres líneas establecidas derivadas de órganos diana se incluyeron en el análisis. Para los ensayos de PI, las curvas de concentración-respuesta fueron sorprendentemente similares entre los tres experimentos diferentes realizados para cada línea de célula.

Dada la baja variabilidad en la respuesta, se evaluaron en un análisis conjunto.

Los dos principales cluster que se identificaron indicaron que los ensayos de MTT (79) y NRU (66) proporcionan información similar que difería de la proporcionada por el ensayo de punto final de PI. A partir de los principales sub-clusters se confirmaba la similitud entre los dos sistemas celulares hepáticos (cultivo primario de rata y HepG2) con el ensayo de MTT, mientras que existían diferencias obvias entre el ensayo de 3T3 MTT y los dos sistemas celulares hepáticos. Con el ensayo de MTT, las células hepáticas primarias no identificaron selectivamente hepatotóxicos específicos, probablemente debido al hecho de que los efectos hepatotóxicos inducidos son crónicos en lugar de agudos (80).

La agrupación de los resultados obtenidos de la aplicación del análisis jerárquico de clústeres de los 29 compuestos neurotóxicos y de los 17 hepatotóxicos no mostró diferencias significativas en la agrupación de los ocho ensayos de citotoxicidad en comparación con el observado para el conjunto completo de 57 sustancias químicas. Por tanto, no se reveló toxicidad específica de tejido. En otros estudios (Lin & Will 2012), se probaron distintos compuestos hepatotóxicos, cardiotóxicos y nefrotóxicos en tres líneas celulares de órganos específicos (HepG2, H9c2 y NRK-52E) utilizando el ensayo de ATP como sustituto de la viabilidad celular. Los autores concluyeron que la toxicidad órgano-específica no se puede predecir

con precisión, siendo la farmacocinética esencial para la evaluación de la toxicidad del compuesto.

Los resultados mostraron que el tipo de ensayo parece tener mayor influencia sobre el resultado de la clasificación y correlación, independientemente del origen de las células utilizadas.

Se puede concluir, por tanto, que los Ensayos de Viabilidad no son los métodos más adecuados para agrupar y clasificar compuestos, así como para identificar toxicidad órgano específica. Pero sí fue útil incluirlos en nuestra estrategia para determinar las dosis citotóxicas para cada compuesto y poder realizar el panel citómico en un rango de viabilidad celular entre un 20 y un 80%.

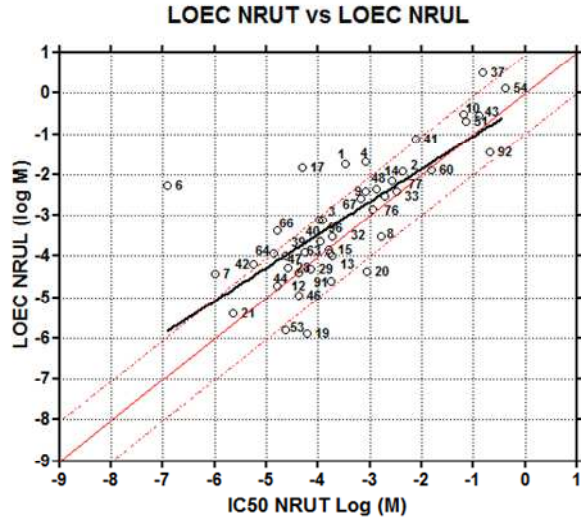


Figura 16. Correlación ($R^2=0,58$) entre los valores de IC50 mediante el ensayo NRU_T en las células 3T3 y los valores de LOEC mediante el ensayo de NRU_L de la ECIV en las tres líneas celulares.

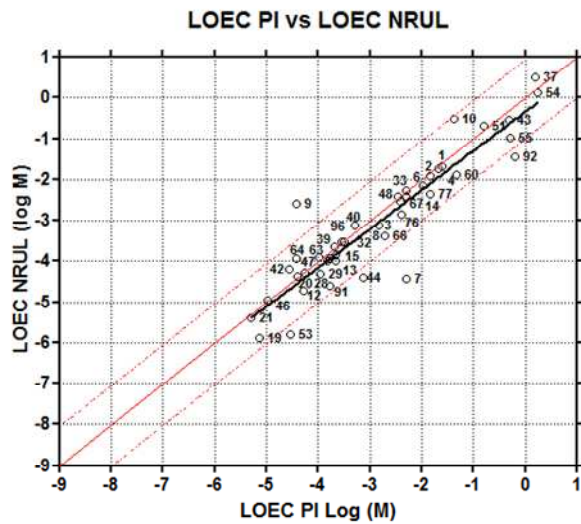


Figura 17. Correlación ($R^2=0,85$) entre los valores de LOEC mediante el ensayo NRU_L y los valores de LOEC mediante el ensayo de PI de la ECIV en las tres líneas celulares.

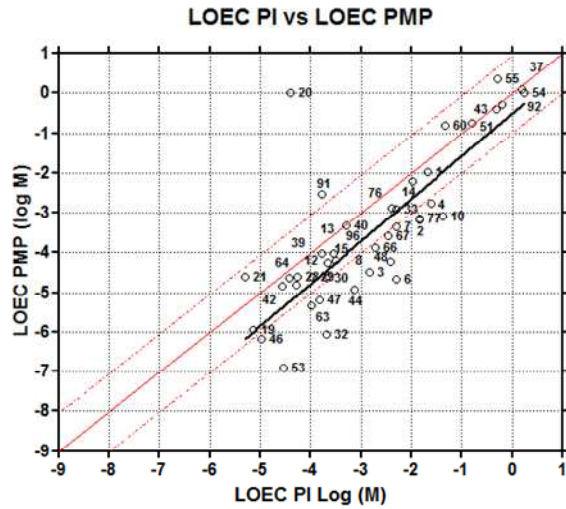


Figura 18. Correlación ($R^2=0,61$) entre los valores de LOEC mediante el ensayo PMP y los valores de LOEC mediante el ensayo de PI de la ECIV en las tres líneas celulares.

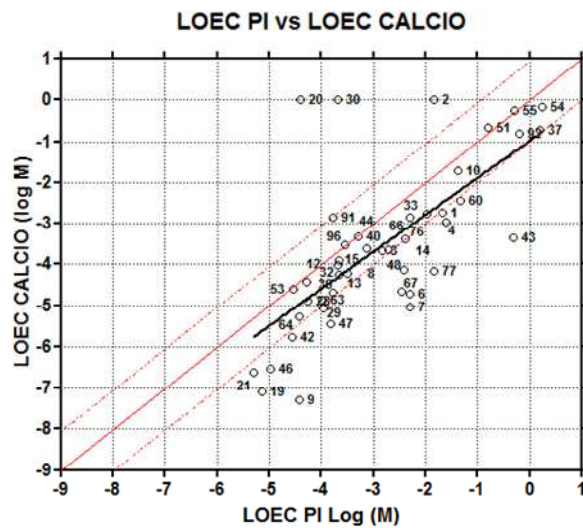


Figura 19. Correlación ($R^2=0,48$) entre los valores de LOEC mediante el ensayo PMP y los valores de LOEC mediante el ensayo de PI de la ECIV en las tres líneas celulares.

2.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LA ECIV PARA CORREGIR COMPUESTOS OUTLIERS Y DETECTAR ALERTAS DE TOXICIDAD *IN VITRO*.

El anglicismo outlier se puede traducir como valor extremo o valor excepcional, el valor que se aleja del grupo principal (por ejemplo, la nube de puntos en gráficos de dispersión). En el contexto toxicológico de nuestro estudio, se identifican como outliers aquellos compuestos que se alejan de una correlación estadísticamente aceptable entre los valores de referencia de LC50 en sangre en humanos y la IC50 del ensayo *in vitro* de referencia NRU_T en células 3T3, presentados en la Figura 3. En nuestro estudio hemos establecido una distinción según si el compuesto se aleja de la recta de regresión y su intervalo de confianza por presentar una IC50 tanto mayor como menor que la LC50. De esta manera, podemos establecer un criterio que diferencia entre outliers y alertas.

Consideramos un compuesto como outlier cuando su IC50 en el correspondiente ensayo *in vitro* (ensayo de referencia o ECIV) es mayor que la LC50 de referencia, al menos en una unidad de logaritmo. Es decir, dicho compuesto resulta menos tóxico *in vitro* que *in vivo*, por lo que el correspondiente ensayo *in vitro* podría subestimar la toxicidad del compuesto.

Consideramos un compuesto como alerta cuando su IC50 en el correspondiente ensayo *in vitro* (ensayo de referencia o ECIV) es menor que la LC50 de referencia, al menos en una unidad de logaritmo. El compuesto en cuestión resulta más tóxico *in vitro* que *in*

vivo. Estrictamente, una alerta no deja de ser un valor que se aleja de la nube de puntos y no entra en el rango de una buena correlación, en el sentido de que el correspondiente ensayo *in vitro* podría subestimar la toxicidad del compuesto. Por el contrario, esta discrepancia puede resultar de gran relevancia toxicológica, ya que sugiere que el ensayo *in vitro* correspondiente detecta la toxicidad antes de que se observe *in vivo*. En el caso concreto de los Ensayos Funcionales de la ECIV, y gracias a la selección citométrica de poblaciones celulares vivas (Figuras 4 y 10) se determinan parámetros celulares que se ven afectados antes de que se produzca la muerte celular. Que un compuesto tenga una IC50 inferior a la LC50 es indicativo de que se detecta un daño celular antes de observar un efecto letal sobre la célula.

Al comparar los valores de IC50 y LC50 de referencia, procedentes de la información generada en el Proyecto AcuteTox, tal como se muestra en la Figura 3, aparecen sólo 13 compuestos clasificables como outliers y ninguno como alerta. Para evaluar comparativamente la capacidad de nuestros ensayos y de la ECIV en general para corregir outliers e identificar alertas, se ha procedido a comparar el número de compuestos que aparecen como outliers o como alertas en cada uno de los ensayos, utilizando la IC50/EC50 como indicador, así como el conjunto de la ECIV en cada línea celular, mediante el indicador de toxicidad LOEC. Se han comparado todos los ensayos de la ECIV y los valores de LD50 en rata y ratón con los valores de LC50 en humanos.

Para facilitar la visualización e interpretación de estos datos, se ha diseñado un diagrama de colores (Tablas 11 y 12) en el que se ha asignado el color rojo a los compuestos clasificados como outliers (es decir, con valores de IC50, EC50 o LD50 > LC50). A los compuestos clasificados como alertas (es decir, con valores de IC50, EC50 o LD50 < LC50) se les asignó el color naranja y, por último, a los compuestos que entraban dentro de los límites de confianza de la recta de regresión, se les asignó el color verde. El color blanco indica que el compuesto no mostró efecto en ningún ensayo.

En la Tabla 11 se observa como los valores de IC50 en los ensayos de viabilidad en las tres líneas celulares de nuestro estudio no reducen el número total de outliers con respecto al test *in vitro* de NRU_T ni a los test *in vivo* en rata y ratón. No es así en el caso de los Ensayos Funcionales, que reducen el número de outliers y además detectan alertas. Cabe destacar el número de compuestos sin efecto, específicamente en el ensayo de calcio intracelular en HepG2, donde el tamaño poblacional es de 14 compuestos con efecto, de los 44 que se comparan con 3T3.

En la Tabla 12 donde se muestran los valores de los indicadores de toxicidad LOEC, se observan resultados similares a los de la Tabla 11. Se comprueba que los valores de LOEC de los ensayos de viabilidad en las tres líneas celulares no reducen el número de outliers, identificando 16 outliers en el caso de las líneas A-704 y SH-SY5Y y 19 outliers con la línea HepG2.

Como se ha indicado, en el ensayo de referencia *in vitro* (NRU_T en células 3T3), 13 compuestos de nuestra biblioteca de xenobióticos fueron identificados como outliers. Para evaluar específicamente en cuáles de estos 13 compuestos los valores de LOEC de los ensayos de la ECIV mejoran la predicción de la toxicidad, se han superpuesto gráficamente las rectas de regresión correspondientes a la correlación de las LC50 humanas con los valores de IC50 del ensayo NRU_T y con los valores de LOEC en el conjunto total de ensayos de la ECIV (Figura 20.A) o con los valores de LOEC en el subconjunto de Ensayos Funcionales de la ECIV (Figura 20B). Como puede verse, los ensayos de la ECIV lograron mejorar la correlación de un total de 11 de los 13 outliers del ensayo NRU_T y los resultados fueron muy similares al considerar la ECIV total o sólo los Ensayos Funcionales de la misma.

Cinco outliers fueron corregidos completamente: diazepam (#8), malatión (#11), clorhidrato de verapamilo (#29), ciclosporina (#46) y estricnina (#80). En otros cinco outliers: atropina (#3), nicotina (#33), lindane (#34), paratión (#38) y acetónitrilo (#92) se mejoró la correlación con la toxicidad *in vivo*. Por último el compuesto digoxina (#9) pasa de ser outlier en el ensayo NRU_T a considerarse como alerta en la ECIV. Sólo para los compuestos dimetilformamida (#51) y etilenglicol (#54) la predicción de la toxicidad fue mejor con el ensayo de NRU_T en las células 3T3.

Como se observa en la Figura 20B, la única diferencia entre la capacidad predictiva de los valores LOEC entre la ECIV y los Ensayos Funcionales se advirtió en el compuesto acetonitrilo donde el valor de LOEC en Ensayos Funcionales empeoraba la predicción de toxicidad con respecto al valor LOEC de la ECIV, pero aún así mejoraba la predicción que se observa con el ensayo de NRU_T . Estas observaciones sugieren que los Ensayos de Viabilidad (PI y NRU_L) son menos predictivos que los ensayos de punto final que miden parámetros relacionados con la funcionalidad de la célula, como son el calcio intracelular y el potencial de membrana plasmática y mitocondrial (Ensayos Funcionales).

Resultados similares se han publicado en estudios realizados en paralelo en laboratorios independientes dentro del proyecto ACuteTox (75). El ensayo de hematotoxicidad basado en la formación de colonias de granulocitos y monocitos (CFU-GM), consiguió correlacionar de forma correcta 5 de los 13 compuestos outlier en el ensayo NRU_T en las células 3T3: diazepam (#8), digoxina (#9), clorhidrato de verapamilo (#29), dimetilformamida (#51), y estricnina (#80). A diferencia a nuestro estudio el ensayo CFU-GM pudo correlacionar la dimetilformamida (#51) pero no el malatión (#11), que la ECIV sí consigue.

Otro grupo del proyecto ACuteTox aplicó el ensayo de la medida de la producción de citoquinas *in vitro* utilizando células mononucleadas de sangre periférica y consiguió correlacionar los compuestos

diazepam (#8), digoxina (#9), malatión (#11) y clorhidrato de verapamilo (#29). La ciclosporina (#46) se identificó como alerta y se mejoró la correlación para estircnina (#80), atropina (#3) y paratión (#38) (72). Por otra parte, los grupos de investigación de la Work Package 1 del proyecto ACuteTox compararon los valores de IC50 de seis ensayos *in vitro* de citotoxicidad basal. El ensayo de NRU en las células 3T3, NHK y Fa32, el ensayo de proteína total en las líneas HepG2 y Fa32 y el ensayo de punto final de ATP con la línea celular HL-60. Cuando se correlacionaban los 6 ensayos simultáneamente con los valores de LD50 de humano se obtenía una alta correlación ($R^2= 0,83$). En cambio, cuando se correlacionaba cada ensayo individualmente, ciertos compuestos se desviaban en más de un orden de magnitud con respecto a los valores de LD50 y además existía gran variabilidad entre los ensayos. Los valores de LOEC de la ECIV han conseguido correlacionar de manera correcta algunos de estos compuestos, como colchicina (#6), 5-Fluorouracilo (#17) y digoxina (#9), pero son los Ensayos Funcionales y no los Ensayos de Viabilidad los que lo logran. Como se observa en la Tabla 11, la colchicina (#6) muestra una buena correlación con los valores de LC50 en el ensayo HepG2-MMP. En el caso de la digoxina (#9) son los ensayos SH-SY5Y-PMP y HepG2-Ca²⁺ los que cuantifican una toxicidad *in vitro* del mismo orden que los valores en humano y los ensayos HepG2-PMP y MMP logran detectarla como alerta.

En el caso de la correlación entre los valores de toxicidad en rata (LD50) y los valores de toxicidad humana (LC50), un total de 12

compuestos de nuestra biblioteca de xenobióticos resultaron identificados como outliers, definidos como aquellos compuestos que mostraban un valor de LD50 (34) de al menos una unidad de logaritmo de diferencia en la recta de regresión con los valores de LC50 (37) en humanos. Para evaluar específicamente en cuáles de estos 12 compuestos los valores de LOEC de los ensayos de la ECIV mejoran la predicción de la toxicidad humana por la toxicidad en rata, se han superpuesto gráficamente las rectas de regresión correspondientes a la correlación de las LC50 humanas con los valores de LC50 del ensayo de toxicidad *in vivo* en rata y con los valores de LOEC en el conjunto total de ensayos de la ECIV (Figura 21A) o con los valores de LOEC en el subconjunto de Ensayos Funcionales de la ECIV (Figura 21B).

Al correlacionar los valores de LD50 en rata con los valores de LC50 en humanos, los valores LOEC de la ECIV (Figura 21A) logran correlacionar correctamente 7 de los 12 compuestos outliers: carbamazepina (#5), malatión (#11), cloruro de mercurio (II) (#12), cloruro de cadmio (II) (#21), rifampicina (#30), clorhidrato de amitriptilina (#53) y trióxido de arsénico (#64). En otros 4 outliers: atropina (#3), nicotina (#33), lindano (#34) y acetonitrilo (#92), la ECIV mejora la correlación respecto a los valores de LD50, aunque no consigue corregirlos totalmente. Por último, se identifica al compuesto clorhidrato de amitriptilina (#53) como alerta. El único de los 12 outliers donde la LD50 de rata se acerca más que la LOEC de la ECIV al valor de LC50 de humano es el paratión (#38).

Como se observa en la Figura 21B los valores LOEC del subconjunto de Ensayos Funcionales logran predecir mejor la toxicidad que los valores LOEC de la ECIV total, ya que de los 12 outliers, únicamente en el caso del acetonitrilo (#92) la IC50 obtenida con la ECIV completa se acerca más a la recta de regresión que la EC50 obtenida por los Ensayos Funcionales.

En el caso de la correlación entre los valores de toxicidad en ratón (LD50) y los valores de toxicidad humana (LC50), un total de 13 compuestos de nuestra biblioteca de xenobióticos resultaron identificados como outliers, definidos como aquellos compuestos que mostraban un valor de LD50 (34) de al menos una unidad de logaritmo de diferencia en la recta de regresión con los valores de LC50 (37) en humanos. Para evaluar específicamente en cuáles de estos 13 compuestos los valores de LOEC de los ensayos de la ECIV mejoran la predicción de la toxicidad humana por la toxicidad murina, se han superpuesto gráficamente las rectas de regresión correspondientes a la correlación de las LC50 humanas con los valores de LC50 del ensayo de toxicidad in vivo en ratón y con los valores de LOEC en el conjunto total de ensayos de la ECIV (Figura 22A) o con los valores de LOEC en el subconjunto de Ensayos Funcionales de la ECIV (Figura 22B).

De los 13 outliers generados al correlacionar los valores de LD50 en ratón con los valores de LC50 en humanos, la ECIV logra correlacionar 8 outliers de manera correcta: carbamazepina (#5),

colchicina (#6), diazepam (#8), malatión (#11), clorhidrato de propranolol (#63), trióxido de arsénico (#64) y warfarina (#67). Además, la ECIV detecta una alerta, correspondiente al compuesto clorhidrato de amitriptilina (#53), como se muestra en la Figura 22A. No se observó diferencias entre las mejoras introducidas en la correlación por la ECIV en total o por el subconjunto de sus Ensayos Funcionales.

Como se mostró en la comparación del valor predictivo de la LD50 de rata, los Ensayos Funcionales de la ECIV predicen mejor la toxicidad humana que los ensayos de viabilidad, consiguiendo reducir el número de outliers y detectando alertas respecto a los valores de LD50 *in vivo* en ratón.

De los 57 compuestos analizados, 11 son menos tóxicos en rata y ratón que en los ensayos *in vitro* NRU_T en las células 3T3 y los ensayos de la ECIV. Los cinco compuestos outliers: atropina (#3), nicotina (#33), lindano (#34), paratión (#38) y acetonitrilo (#92) no se correlacionan de forma correcta al compararlos con las LC50 de humano ni con los ensayos *in vitro* ni con los ensayos *in vivo* en rata y ratón. A la vista de los resultados, la ECIV consigue mejorar la predicción de la toxicidad de los compuestos outliers tanto comparándolos con el test *in vitro* con las células 3T3 como con los test *in vivo* en rata y ratón. Además de correlacionar estos compuestos, identifica una serie de compuestos como alertas, detecta

la toxicidad a concentraciones más bajas que las que se dan en humano.

Por último, con el fin de evaluar específicamente la capacidad de cada uno de los Ensayos Funcionales y las líneas celulares incluidas en la ECIV para corregir la correlación de los outliers y/o identificar alertas, en la Figura 23 se representan las correlaciones de los valores de EC50 de los ensayos funcional de la ECIV con los valores de LC50 en humanos.

La línea celular A704, de adenocarcinoma renal, es la que mayor número de alertas identifica, con un total de 6 compuestos indicados como alertas. De ellos, los compuestos Pentaclorofenol (#13), Glufosinato de amonio (#41), Dibromuro diquat (#44) y Clorhidrato de amitriptilina (#53) son identificados con el ensayo de PMP y los compuestos Pentaclorofenol (13), Diclorvos (39), Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (#77) lo son con el ensayo de calcio intracelular.

La línea HepG2, de hepatoma humano permite identificar como alerta el pentaclorofenol (#13), un compuesto clasificado como hepatotóxico (81), tanto en el ensayo de Ca^{2+} intracelular como el ensayo de potencial de membrana mitocondrial (MMP). El ensayo de potencial de membrana plasmática permite detectar como alertas la digoxina (#9), que era un compuesto outlier para el ensayo in vitro de referencia, además del alcohol isopropílico (#10) y el 5-fluorouracilo (#17).

En cuanto a la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, el ensayo de PMP ha permitido identificar como alertas a los compuestos clorhidrato de orfenadrina (#32) y dibromuro diquat (#44), y con el ensayo de Ca^{2+} intracelular ha identificado como alerta al cis-diaminoplatino (#42), ambos clasificados como compuestos neurotóxicos (81).

Tabla 11. Diagrama de colores para definir los compuestos outliers (rojos), alertas (naranjas) y los correlacionados correctamente (verdes) por la ECIV y por los valores de referencia respecto a la toxicidad aguda en humano. Al final de la tabla de colores se hace un resumen con el coeficiente de correlación (R^2), el número de compuestos con efecto (n), el número de outliers (N° Outliers) y el número de alertas (N° Alertas) para cada ensayo.

N° Acutobase	REFERENCIA			ESTRATEGIA CITÓMICA IN VITRO (ECIV)														
	3T3	Ratón	Rata	A-704				SH-SY5Y				HepG2						
				RNU _L	PI	PMP	Ca ²⁺	RNU _L	PI	PMP	Ca ²⁺	RNU _L	PI	PMP	Ca ²⁺	MMP		
1																		
2																		
3																		
4																		
5																		
6																		
8																		
9																		
10																		
11																		
12																		
13																		
14																		
16																		
17																		
21																		
28																		
29																		
30																		
32																		
33																		
34																		
37																		
38																		
39																		
41																		
42																		
44																		
46																		
48																		
51																		
53																		
54																		
55																		
57																		
60																		
63																		
64																		
66																		
67																		
76																		
77																		
80																		
91																		
92																		
R^2	0,56	0,65	0,59	0,6	0,59	0,56	0,59	0,56	0,7	0,58	0,59	0,56	0,71	0,77	0,58	0,58		
n	44	28	33	29	27	35	35	35	35	22	31	28	24	22	14	20		
N° Outliers	13	13	12	19	14	13	12	16	20	7	9	18	15	10	6	7		
N° Alertas	0	0	0	0	0	4	3	0	0	2	1	0	0	3	1	2		

Tabla 12. Diagrama de colores para definir los compuestos outliers (rojos), alertas (naranjas) y los correlacionados correctamente (verdes) de los valores de LOEC de la ECIV respecto a la toxicidad aguda en humano. Al final de la tabla de colores se hace un resumen con el coeficiente de correlación (R^2), el número de compuestos con efecto (n), el número de outliers (N° Outliers) y el número de alertas (N° Alertas) para cada ensayo.

N° Acutoxbase	LOEC							
	3 LÍNEAS		A-704		SHSY-5Y		HEPG2	
	ECIV	EF	ECIV	EF	ECIV	EF	ECIV	EF
1	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
2	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
3	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
4	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
5	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
6	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
8	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
9	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
10	Naranja	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
11	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
12	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
13	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
14	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
16	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
17	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
21	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
28	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
29	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
30	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
32	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
33	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
34	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
37	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
38	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
39	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
41	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
42	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
44	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
46	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
48	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
51	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
53	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
54	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
55	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
57	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
60	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
63	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
64	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
66	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
67	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
76	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
77	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
80	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
91	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
92	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
R^2	0,63	0,6	0,59	0,56	0,58	0,56	0,65	0,63
n	44	44	39	38	41	37	41	37
N° Outliers	8	10	12	12	10	8	13	12
N° Alertas	11	10	6	6	3	3	4	4

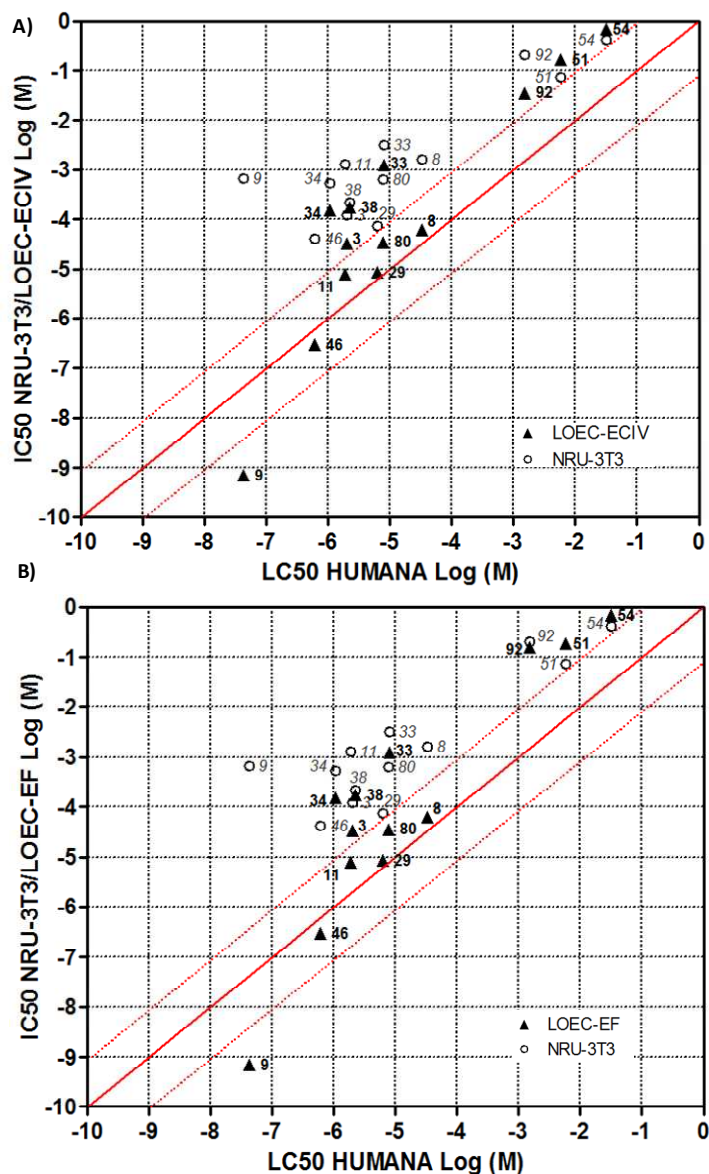


Figura 20. Correlación entre los valores de LC50 humana, los valores de IC50 del ensayo NRU_T (indicados mediante un círculo) y los valores de LOEC (indicados mediante un triángulo) de los 13 compuestos identificados como outliers por el ensayo NRU_T en las células 3T3. A) Valores de LOEC-ECIV; B) Valores de LOEC-EF.

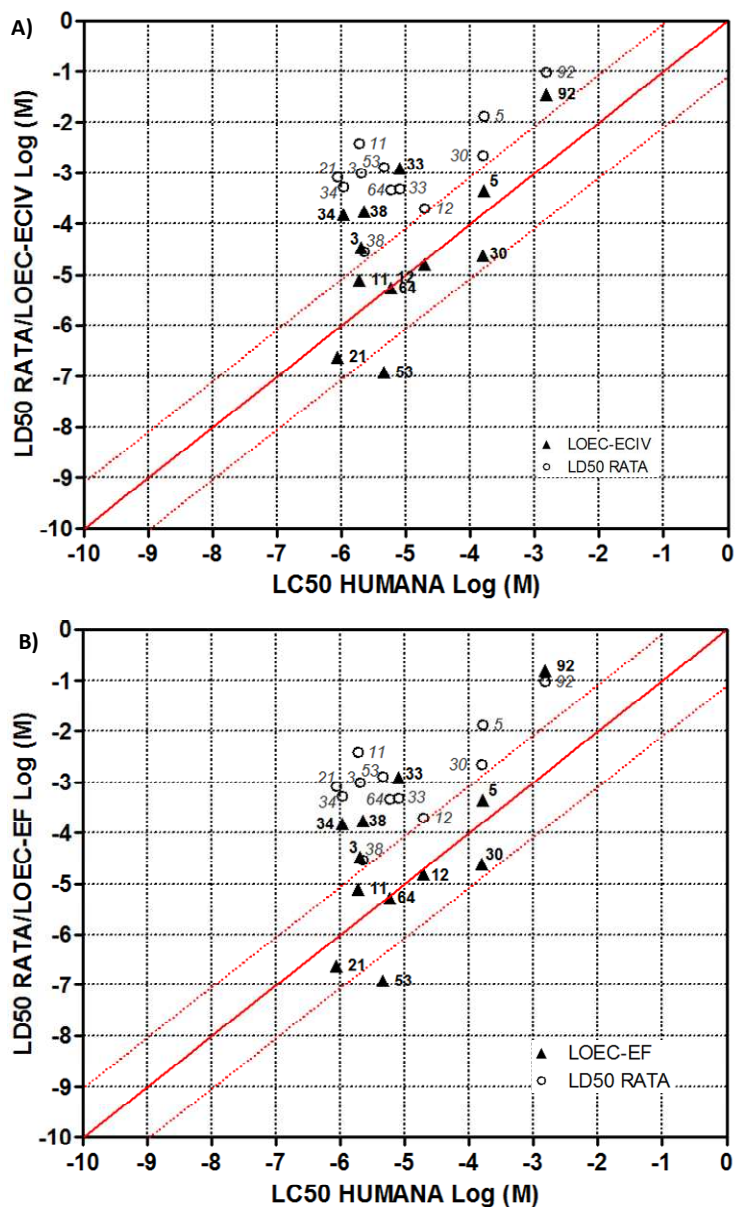


Figura 21. Correlación entre los valores de LC50 humana, los valores de LD50 en rata (indicados mediante un círculo) y los valores de LOEC (indicados mediante un triángulo) en los 12 compuestos identificados como outliers por el ensayo *in vivo* en rata. A) Valores de LOEC-ECIV; B) Valores de LOEC-EF.

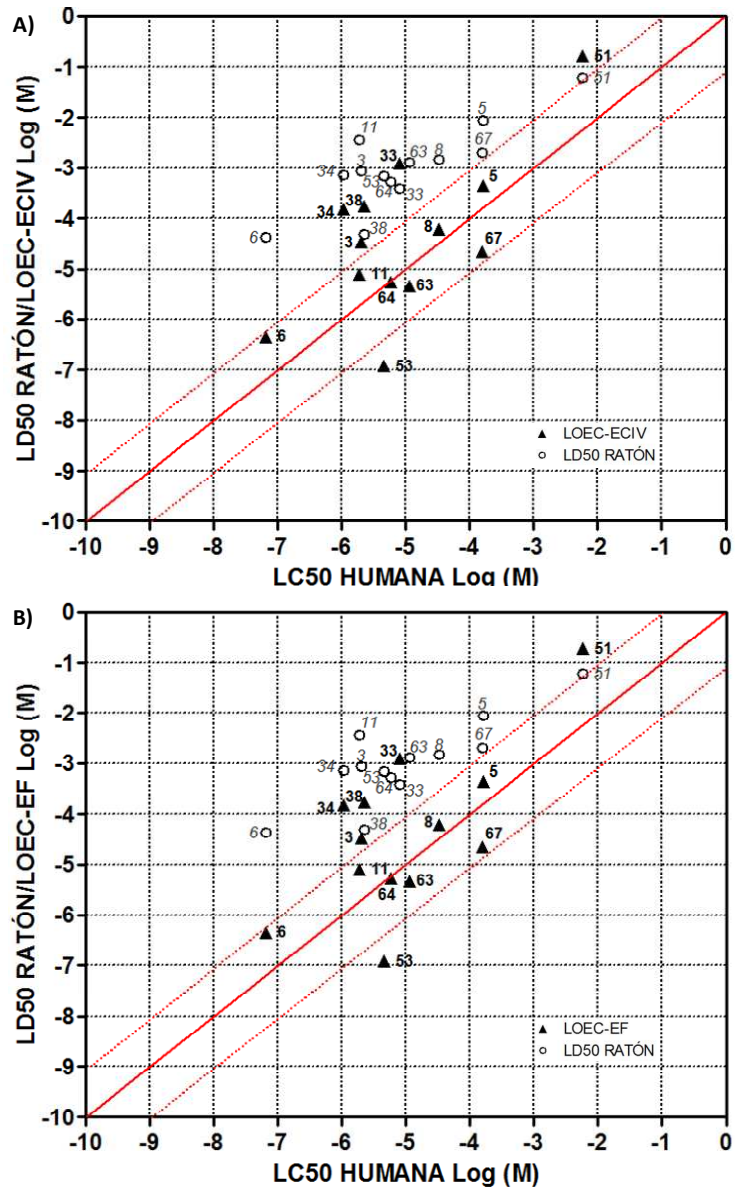


Figura 22. Correlación entre los valores de LC50 humana, los valores de LD50 en ratón (indicados mediante un círculo) y los valores de LOEC (indicados mediante un triángulo) en los 13 compuestos identificados como outliers por el ensayo *in vivo* en ratón. A) Valores de LOEC-ECIV; B) Valores de LOEC-EF.

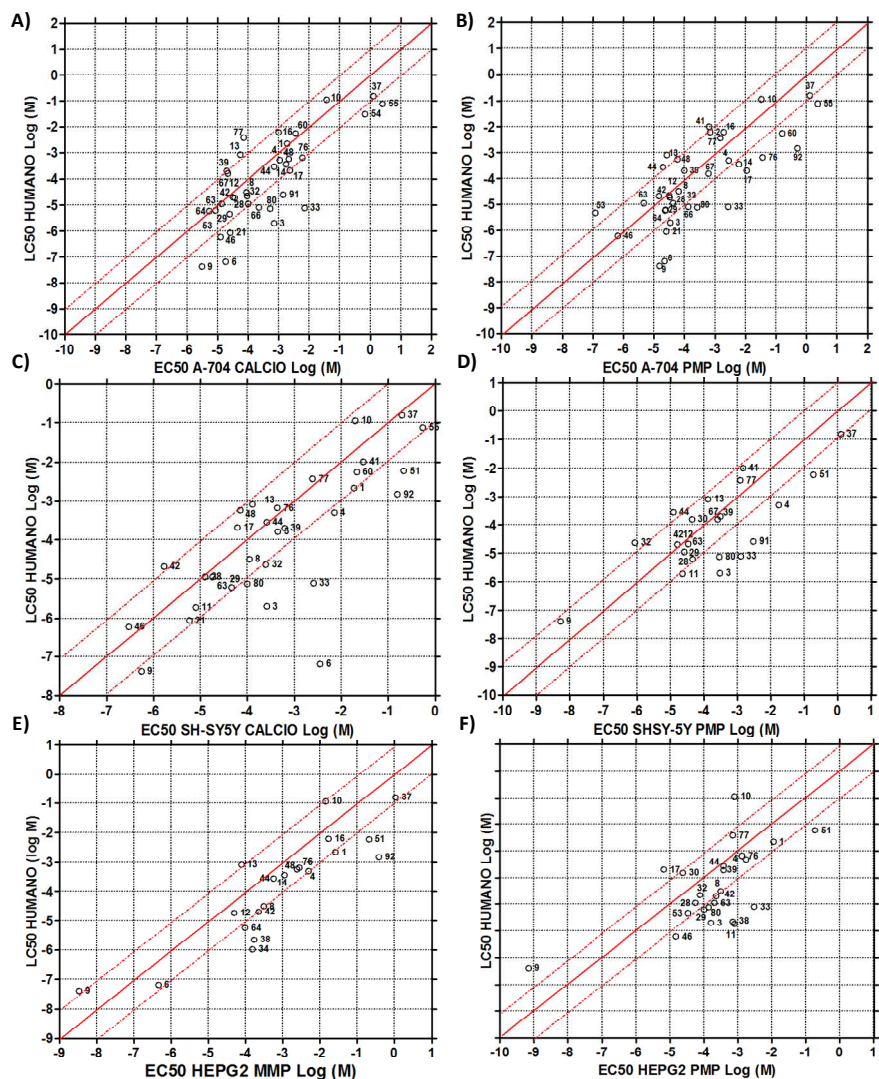


Figura 23. Correlación entre los valores de EC50 de los EF con los valores de LC50 de humano. (A) A-704 Ca²⁺ vs LC50, (B) A-704 PMP vs LC50 (C) HEPG2 MMP vs LC50. (D) HEPG2 PMP vs LC50. (E) SH-SY5Y Ca²⁺ vs LC50, (F) SH-SY5Y PMP vs LC50.

2.3.1. VALOR DE LAS LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE ÓRGANOS DIANA CON RESPECTO A LOS CULTIVOS PRIMARIOS.

Las líneas celulares son muy utilizadas como modelos *in vitro* en estudios toxicológicos. Presentan grandes ventajas como son la vida media casi ilimitada, el crecimiento continuo, fenotipo estable, fácil disponibilidad, condiciones de cultivo sencillas y estandarizables entre laboratorios. La robustez conferida al ensayo y la capacidad de transferencia (80) fueron las características decisivas para incorporarlas a la estrategia de nuestro estudio.

Muchas sustancias no son tóxicas originalmente sino a través de derivados surgidos por su metabolización en el hígado, y algunas sustancias tóxicas *in vitro* pueden ser detoxificadas por enzimas hepáticos. Un gran inconveniente es que las células de hepatoma humano expresan actividades de biotransformación en un grado muy limitado, e incluso si lo hacen, los niveles son muy bajos, con relación a la del hígado adulto normal. Los niveles de disminución de la actividad se encuentran particularmente para las reacciones del citocromo P450 involucradas en el metabolismo oxidativo de los fármacos y xenobióticos.

Utilizando cultivos primarios las alteraciones inherentes a la transformación de las líneas celulares no entran en juego, en cambio la gran desventaja es la gran variabilidad entre donantes.

Para nuestro estudio la desventaja fundamental de utilizar cultivos primarios fue el encarecimiento en costes, hubiera sido inviable trabajar con cultivos primarios por no poder expandir las células y la necesidad de sembrar un nuevo explante en cada experimento.

En estudios más recientes de nuestro laboratorio para el desarrollo de un proyecto coordinado con la industria farmacéutica (Proyecto Melius, <http://www.noscira.com/historia.php>) se puso a punto una estrategia citómica que incluía el uso de cultivos primarios. El objetivo del Proyecto Melius fue la búsqueda de biomarcadores y técnicas que permitieran una mejor predicción de la seguridad y de la toxicidad de nuevos fármacos antes de comenzar su desarrollo clínico en humanos. La estrategia citómica incluía un conjunto de análisis citómicos de estrés oxidativo, un ensayo convencional de toxicidad in vitro (MTT) y un ensayo por bioimagen de alto contenido en miniatura (InCell Analyzer1000), en hepatocitos de disponibilidad comercial, aislados de tres especies diferentes: humanos, mono *Cynomolgus* y rata (82), (83).

3. ANÁLISIS DE LA POTENCIA DE LA ECIV PARA CLASIFICAR LOS COMPUESTOS DE ACUERDO CON LOS CRITERIOS DEL SISTEMA GHS.

3.1 APLICACIÓN DE UNA ESTRATEGIA BASADA EN LA BIOINFORMÁTICA PARA LA ORDENACIÓN DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS EN CLASES DE TOXICIDAD HUMANA SIMILARES A LAS DEFINIDAS POR EL SISTEMA GHS.

El nuevo reglamento europeo CLP sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas químicas ha introducido en la Unión Europea el sistema global GHS de clasificación de compuestos según su posible riesgo de toxicidad para los seres humanos. Como se ha descrito en el apartado de Introducción, el sistema GHS aborda la clasificación de los productos químicos que pueden acceder al organismo por ingestión, según su riesgo de toxicidad aguda *in vivo*, estableciendo diferentes categorías basadas en los valores de LD50 en rata (36).

Para determinar si los indicadores de toxicidad *in vitro* definidos por la ECIV pueden ser de relevancia para establecer un sistema de clasificación tóxica, en consonancia con los criterios del sistema GHS, se ha procedido a establecer la capacidad de cada ensayo para clasificar correctamente un compuesto en su clase de toxicidad, definida por los intervalos del sistema GHS. Dado que el presente

estudio experimental se ha realizado sobre líneas celulares de origen humano, se han adaptado las categorías del sistema GHS, basadas en las LD50 en rata, a intervalos equivalentes, transformados por los valores de LC50 en humanos. Esta transformación ha supuesto que sólo se ha podido abordar la clasificación de los 45 compuestos (de la biblioteca de 57 xenobióticos estudiados inicialmente en este trabajo), para los que se encuentran disponibles los valores de referencia bibliográficos de LC50 en humanos.

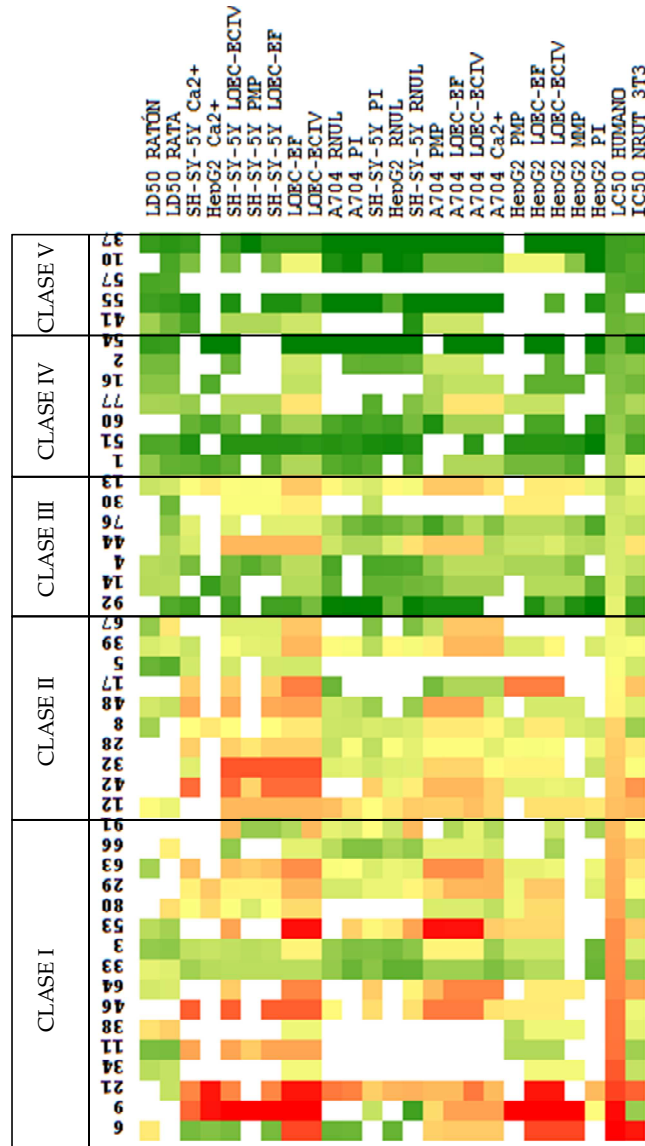
Para evaluar la capacidad de clasificación de los ensayos de la ECIV, comparándola con la de otros ensayos de referencia de toxicidad *in vitro* (NRU_T) e *in vivo* (ensayos de LD50 en rata y en ratón), se ha seguido una estrategia basada en herramientas bioinformáticas y algoritmos matemáticos. La gran cantidad de datos a comparar es difícil de analizar e integrar para su comprensión y aprovechamiento (“data mining”). Por ello, hemos aplicado en nuestro estudio la nueva herramienta del agrupamiento jerarquizado, como método de gran relevancia para la extracción de información de matrices de datos masivos.

En la práctica, se ha creado una matriz de datos, con los ensayos individuales dispuestos en filas y los compuestos individuales dispuestos en columnas. A continuación, se ha ordenado jerárquicamente la matriz de datos mediante el software bioinformático empleado, disponiendo los 45 compuestos por su orden creciente de LC50, es decir, de más tóxicos a menos tóxicos. Esta ordenación se ha visualizado mediante una escala de colores,

que va desde el color rojo para los compuestos más tóxicos, al color verde, para los menos tóxicos. De esta manera al comparar con las LC50 en humanos los valores de IC/EC50 obtenidos en los ensayos *in vitro*, o los valores de LD50 de los ensayos animales *in vivo*, se puede observar rápidamente, por las coincidencias o discrepancias en el color qué compuestos producen valores de IC50, EC50 o LD50 más próximos a sus correspondientes LC50 en humanos. Si aparecen compuestos identificados por el correspondiente ensayo con el color verde en una columna de LC50 de color rojo (clase 1), dichos compuestos estarán mal clasificados por el ensayo en cuestión y se identificarán como outliers. Pero si aparecen compuestos identificados por color rojo en columnas de LC50 de baja toxicidad, identificados por el color verde (clase 4 y 5) se estarán identificando como alertas y podrían revelar vías de toxicidad.

Como se observa en la Figura 24, al tomar como referencia los valores de LC50 en humanos (Sjöström et al. 2008), los compuestos aparecen clasificados según los criterios del sistema GHS, tal como se ha mostrado en la Tabla 7 del apartado de Metodología. A partir de este único análisis se puede obtener información directa sobre los compuestos correctamente correlacionados, así como sobre los compuestos identificados como outliers o alertas. Por otra parte, y como se comentará más adelante, este tipo de análisis basado en la Bioinformática permite análisis más específicos, centrados en subpoblaciones de compuestos (por ejemplo, outliers) o en aspectos mecanísticos (por ejemplo, procesos de toxicidad órgano-específica).

Figura 24. Ordenación de los compuestos del estudio según su valor creciente de LC50. Se muestran en rojo los compuestos más tóxicos; en verde los compuestos menos tóxicos y en blanco los compuestos sin efecto. En las columnas se colocan los compuestos y en las filas los valores de IC/EC50 de los 25 test del Ensayo Citómico, las IC50 del test *in vitro* NRU por 3T3, las LD50 de los test *in vivo* en rata y ratón y las LC50 de humano.



3.2. VALIDACIÓN ESTADÍSTICA DE LA ORDENACIÓN DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS EN CLASES DE TOXICIDAD HUMANA SIMILARES A LAS DEFINIDAS POR EL SISTEMA GHS.

La primera aproximación estadística a esta forma de ordenar los datos toxicológicos es comparar la capacidad de clasificación correcta por parte de la ECIV con la proporcionada por el resto de ensayos de referencia de toxicidad *in vivo* e *in vitro*.

Un modelo de clasificación es una función que permite decidir cuáles de un conjunto de datos están relacionados o no por pertenecer a un mismo tipo o clase. El resultado del clasificador o del diagnóstico puede ser un número real (valor continuo), en cuyo caso el límite del clasificador entre cada clase debe determinarse por un valor umbral (por ejemplo, para determinar si la toxicidad *in vitro* de un compuesto químico se encuentra dentro de los límites de las clases de toxicidad definidos por el sistema GHS), o puede ser un resultado discreto que indica directamente una de las clases (por ejemplo, si la toxicidad *in vitro* de un compuesto químico permite clasificarlo correctamente dentro de la correspondiente categoría GHS). Para este tipo de determinación hemos aplicado el concepto de curvas ROC. Las curvas ROC (acrónimo de Receiver Operating Characteristic) se desarrollaron durante la Segunda Guerra Mundial como un sistema

para evaluar la eficacia en la detección de objetos enemigos en campos de batalla mediante pantallas de radar (84).

El análisis ROC se aplica frecuentemente en Medicina en contextos de diagnóstico clínico o de estudios epidemiológicos. Por ejemplo, para comparar dos pruebas diagnósticas distintas, se recurre a las curvas ROC, ya que es una medida global e independiente del punto de corte.

El indicador más utilizado en muchos contextos es el área bajo la curva ROC o AUC. Este índice se puede interpretar como la probabilidad de que un clasificador ordene un resultado positivo elegido aleatoriamente mejor que un resultado negativo. Se puede demostrar que el área bajo la curva ROC es equivalente a la Prueba de Mann-Whitney, una prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes.

La comparación entre dos pruebas se realiza mediante la comparación de sus respectivas AUC de ambas pruebas. Este área posee un valor comprendido entre 0,5 y 1, donde 1 indica un valor diagnóstico perfecto y 0,5 es una prueba sin capacidad discriminatoria diagnóstica. Así, por ejemplo, si el AUC para una prueba diagnóstica es de 0,75 significa que existe un 75% de probabilidad de que el diagnóstico realizado a un enfermo sea más correcto que el de una persona sana escogida al azar. En una comparación entre pruebas diagnósticas o, como en nuestro caso,

entre ensayos de clasificación de toxicidad, la prueba o ensayo mejor, sería el que presente un AUC mayor.

En nuestro contexto, se ha reemplazado el sistema de clasificación binario típico (bien diagnosticado/mal diagnosticado), por un sistema binario adecuado a la clasificación de riesgo de toxicidad química en humanos, basado en el sistema GHS. Para ello se introducen los conceptos toxicológicos experimentales de compuesto bien clasificado en su clase tóxica GHS por el ensayo de toxicidad (Verdaderos Positivos, o VP), compuestos alerta en el ensayo de toxicidad (Falsos Positivos o FP), compuestos outliers en el ensayo de toxicidad (Falsos Negativos o FN) y compuestos bien clasificados como no tóxicos por el ensayo de toxicidad (Verdaderos Negativos o VN). De esta forma, la información que van a proporcionar las curvas ROC mediante la determinación de los índices AUC es la probabilidad que tiene un ensayo en concreto de clasificar el compuesto en la clase correcta según el Reglamento GHS. La razón de VP equivale a la sensibilidad de la prueba y se representa en el eje de las abscisas y la razón de FP equivale a 1-Especificidad de la prueba y se representa en el eje de ordenadas. En el espacio ROC los puntos en las coordenadas (0,1) corresponden a una clasificación perfecta, ningún falso negativo. La diagonal divide el espacio ROC y se denomina la línea de no discriminación, los puntos que quedan en la parte izquierda superior representan los puntos que clasifican mejor que al azar y los que quedan por debajo de la diagonal los que clasifican peor que al azar.

Una de las dificultades a la hora de analizar las curvas ROC de nuestros resultados fue que los datos bibliográficos para los valores de LC50 (humano) y de LD50 (rata y ratón) no estaban disponibles en los 57 compuestos a analizar. Por ello, al comparar los ensayos de la ECIV con el ensayo normativo *in vitro* de RNU_T se consideraron únicamente los 45 compuestos para los que se encontraban disponibles los valores de LC50. Por otra parte, para comparar los ensayos de la ECIV con los valores de LD50 en rata y ratón se tuvieron que eliminar del análisis los compuestos en los que no estaban disponibles los valores de LC50 o de LD50. En la Tabla 6 se detallan los valores disponibles en humano, en rata y ratón. De esta forma, se realizaron 3 análisis comparativos de curvas ROC.

3.2.1 COMPARACIÓN DE LA ECIV CON EL ENSAYO NORMATIVO *IN VITRO* NRU_T EN CUANTO A LA CAPACIDAD DE CLASIFICACIÓN DE COMPUESTOS SEGÚN SU TOXICIDAD EN HUMANOS MEDIANTE LOS CRITERIOS GHS.

En este primer análisis para un total de 45 compuestos (Tabla 13), el ensayo NRU_T en las células 3T3 muestra los índices de AUC más bajos (0,559-0,635) para la clasificación correcta en cada una de las clases 1-4 de las categorías GHS de riesgo adaptadas a los valores de toxicidad en humanos. Por el contrario, el índice AUC para la clasificación en la clase 5 de toxicidad alcanza un valor (0,964) muy

cercano al valor 1, indicando una excelente capacidad de clasificación. Los resultados de este análisis se entienden en la práctica como que el ensayo *in vitro* NRU_T tiene, por ejemplo, un 55,9% de probabilidades de clasificar correctamente un compuesto químico de la clase 1, mientras que hay una probabilidad del 95,7% de que dicho ensayo clasifique correctamente un compuesto de la clase 5.

En el reglamento GHS de etiquetado de compuestos químicos, las clases 1 y 2 comparten el pictograma de riesgo (una calavera), la palabra de señalización (peligro) y la calificación cualitativa de riesgo por ingestión (mortal). Cuando se consideran en conjunto las clases 1+2 se puede observar que el índice AUC mejora (0,743) los índices AUC para las clases individuales 1 o 2, pero no se acerca al valor excelente de la clasificación por el ensayo NRU_T para la clase 5.

Con respecto a los ensayos de la ECIV, los índices AUC se comportan de forma similar a los índices del ensayo NRU_T, en cuanto a la mejor capacidad de clasificación para la clase 5 que para las clases individuales 1 a 4, así como la mejor clasificación para las clases 1+2 que para cada una de ellas por separado. La mejor capacidad de clasificación es la que proporciona el valor de LOEC para el conjunto de Ensayos Funcionales de la ECIV, que supera incluso (AUC=0,964) al mejor valor del ensayo NRU_T (AUC=0,957). Igualmente, al considerar las clases 1+2 juntas, tanto el valor de LOEC de la ECIV completa (AUC=0,811) como el del conjunto de Ensayos Funcionales (AUC= 0,791) superan la capacidad de clasificación del ensayo de

NRU_T. La consideración de los valores de LOEC para la ECIV en cada una de las líneas celulares por separado mejora la del conjunto total de la ECIV. No es así para los Ensayos Funcionales en cada línea individual, que no mejoran la del conjunto de las tres líneas. Por último, los valores de IC50/EC50 de cada ensayo en cada línea presentan índices de AUC más bajos que los correspondientes índices de los ensayos agrupados por línea o por ECIV. Se mantiene la tendencia a clasificar mejor los compuestos en la clase 5 y la mejoría de clasificación de las clases 1+2 con respecto a la clasificación en cada una de dichas clases por separado. La Tabla 13 muestra en resumen los ensayos de la ECIV que mejoran la clasificación de los compuestos con respecto al ensayo NRU_T.

Para los compuestos de mayor toxicidad (clase 1), el 52% de los ensayos de la ECIV presentan una probabilidad mayor que el ensayo NRU_T de clasificar el compuesto de forma correcta. En la clase 2 se reduce a un 28,5% la probabilidad de clasificarlo. Los compuestos que pertenecen a las clases 3 y 4 se clasifican mejor utilizando el ensayo de NRUT en las células 3T3. En la clase 5, correspondiente a los compuestos no tóxicos, únicamente los valores de LOEC de los Ensayos Funcionales mejoran la probabilidad del 95,7% que obtiene el ensayo NRU_T, como se observa en la Tabla 14. Pero es en la clasificación de esta clase donde se obtienen índices AUC más altos. Aunque éstos no superan los del ensayo de referencia *in vitro*, se comprueba que el 90% de los ensayos de la ECIV clasificarían un compuesto de la clase 5 con una probabilidad mayor del 70%.




Estos resultados confirman que los indicadores de toxicidad LOEC de los Ensayos Funcionales, son los que mayor valor predictivo y de clasificación alcanzan dentro de la ECIV. Alcanzando un índice de determinación (R^2) ligeramente superior al ensayo de NRU_T en las células 3T3, reduciendo y mejorando un mayor número de outliers y clasificando mejor que el ensayo de NRU_T los compuestos de la clase 1, 5, y la clase 1+ 2.

Es importante resaltar que la ECIV alcanza su mayor capacidad de clasificación correcta en los compuestos agrupados en la clase de toxicidad 5 del sistema CLP, que incluye los compuestos con una toxicidad aguda en humanos (LD_{50}) superior a 2000 mg/Kg, es decir, compuestos químicos no tóxicos a los que no se asigna ningún pictograma ni mensaje de seguridad. El hecho de que la ECIV parece identificar con más eficacia los compuestos no tóxicos apoya su inclusión en las estrategias integradas para la predicción de toxicidad aguda humana (85), concretamente en las primeras etapas experimentales, para poder descartar los compuestos no tóxicos y no someterlos al conjunto total de ensayos y cálculos que requiere la aplicación de la estrategia completa.

Tabla 13. Valores de AUC para cada clase definida por la GHS. Además se muestra un índice de AUC agrupando las clases 1 y 2, que coinciden en el pictograma (calavera), la palabra de señalización (peligro) y tipo de riesgo en caso de ingestión (mortal).

		CLASE 1	CLASE 2	CLASE 3	CLASE 4	CLASE 5	CLASE 1+2
		0-5 mg/L	5-50 mg/L	50-300 mg/L	300-2000 mg/L	>2000 mg/L	0-50 mg/L
TEÓRICOS	NRU _{1-3T3}	0,559	0,614	0,654	0,635	0,957	0,743
LOEC	ECIV	0,692	0,536	0,622	0,558	0,863	0,811
	EF	0,661	0,536	0,609	0,571	0,964	0,791
A-704	LOEC-ECIV	0,667	0,679	0,479	0,519	0,895	0,748
	LOEC-EF	0,531	0,593	0,564	0,447	0,895	0,608
SH-SY5Y	LOEC-ECIV	0,539	0,579	0,479	0,447	0,889	0,690
	LOEC-EF	0,594	0,579	0,506	0,551	0,827	0,620
HEPG2	LOEC-ECIV	0,577	0,557	0,609	0,558	0,907	0,710
	LOEC-EF	0,531	0,593	0,506	0,447	0,870	0,608
A-704	NRU _L	0,531	0,557	0,551	0,461	0,725	0,570
	PI	0,531	0,621	0,577	0,434	0,725	0,615
	Ca ²⁺	0,639	0,679	0,551	0,506	0,888	0,717
	PMP	0,622	0,664	0,434	0,590	0,845	0,755
SH-SY5Y	NRU _L	0,594	0,579	0,447	0,564	0,788	0,620
	PI	0,500	0,529	0,622	0,434	0,775	0,635
	Ca ²⁺	0,591	0,593	0,590	0,519	0,782	0,704
	PMP	0,480	0,529	0,408	0,487	0,720	0,575
HEPG2	NRU _L	0,531	0,621	0,492	0,447	0,713	0,570
	PI	0,531	0,571	0,590	0,474	0,663	0,596
	Ca ²⁺	0,563	0,507	0,474	0,487	0,613	0,570
	PMP	0,514	0,514	0,538	0,545	0,770	0,601
	MMP	0,563	0,493	0,603	0,461	0,670	0,589

Tabla 14. Resumen de los ensayos de la ECIV que mejoran la clasificación de los compuestos según las clases del reglamento GHS, comparado con el ensayo NRU_T en las células 3T3.

 PELIGRO MORTAL	 PELIGRO MORTAL	 PELIGRO MORTAL	Sin pictograma Sin palabra de señalización Sin tipo de peligro
CLASE I [0-5] mg/L	CLASE II [5-50] mg/L	CLASE 1+2 [0-50] mg/L	CLASE V >2000 mg/L
LOEC-ECIV LOEC-EF A-704_LOEC-ECIV SH-SY5Y_LOEC-EF HEPG2_LOEC-ECIV A704 Ca ²⁺ A704 PMP SH-SY5Y NRU _L SH-SY5Y Ca ²⁺ HepG2 Ca ²⁺ HepG2 MMP	A704_LOEC-ECIV A704 PI A704 Ca ²⁺ A704 PMP HEPG2 NRUL HEPG2 PI	LOEC-ECIV LOEC-EF A-704_LOEC-ECIV A-704 PMP	LOEC-EF

3.2.2 COMPARACIÓN DE LA ECIV CON EL ENSAYO DE TOXICIDAD *IN VIVO* EN RATA EN CUANTO A LA CAPACIDAD DE CLASIFICACIÓN DE COMPUESTOS SEGÚN SU TOXICIDAD EN HUMANOS MEDIANTE LOS CRITERIOS GHS.

El segundo análisis comparativo, con un total de 33 compuestos para los que se dispone de los valores de LC50 en humano y de LD50 en rata, se dirige a evaluar qué ensayos de la ECIV logran clasificar mejor o peor que el test *in vivo* en rata con respecto a la toxicidad aguda en humano.





Como se deduce de la Tabla 15, el 95% de los ensayos de la ECIV tienen una probabilidad mayor que el test *in vivo* en rata de clasificar de manera correcta los compuestos de la clase 1. Los compuestos pertenecientes a la clase 2 también son clasificados con una probabilidad mayor que el test *in vitro* en rata por un 62% de los ensayos de la ECIV. De la misma forma que pasaba al comparar los índices de AUC con ensayo de NRU_T en las células 3T3, las clases 3 y 4 son las que peor clasifica la ECIV. En el caso concreto de la clase 3, el único ensayo que tiene un índice de AUC mayor que el obtenido por el ensayo *in vivo* en rata es el ensayo de yoduro de propidio en SH-SY5Y, con un valor de 0,695. Con respecto a la clase 5, mientras que la LD50 en rata tiene una probabilidad del 81% de clasificar correctamente un compuesto en esta clase, ningún ensayo de la ECIV alcanza dicho valor, pero más de la mitad de los ensayos (52%) obtienen un índice AUC superior o igual a 0,7. Por otra parte, el 33% de los ensayos de la ECIV clasifican los compuestos incluidos en las clases conjuntas 1+2, con una probabilidad mayor que la alcanzada utilizando las LD50 en rata.

La Tabla 16 resume los ensayos de la ECIV que mejoran la clasificación de los compuestos con respecto al ensayo de toxicidad *in vivo* en rata.

Tabla 15. Valores de AUC (tomando los valores de los 33 compuestos con datos bibliográficos disponibles en humano y rata) para cada clase definida por la GHS. Y un índice de AUC agrupando las clases 1 y 2, que coinciden en el pictograma (calavera), la palabra de señalización (peligro) y tipo de riesgo en caso de ingestión (mortal).

		CLASE 1 0-5 mg/L	CLASE 2 5-50 mg/L	CLASE 3 50-300 mg/L	CLASE 4 300-2000 mg/L	CLASE 5 >2000 mg/L	CLASE 1+2 0-50 mg/L
TEÓRICOS	LD50 RATA	0,500	0,546	0,651	0,639	0,811	0,633
LOEC	ECIV	0,613	0,457	0,580	0,500	0,746	0,761
	EF	0,600	0,646	0,604	0,491	0,804	0,611
A-704	LOEC-ECIV	0,607	0,629	0,456	0,444	0,757	0,683
	LOEC-EF	0,550	0,664	0,604	0,463	0,696	0,606
SH-SY5Y	LOEC-ECIV	0,535	0,446	0,437	0,463	0,586	0,583
	LOEC-EF	0,600	0,646	0,571	0,454	0,786	0,611
HEPG2	LOEC-ECIV	0,550	0,457	0,599	0,565	0,757	0,650
	LOEC-EF	0,550	0,664	0,571	0,426	0,679	0,606
A-704	NRU_L	0,550	0,682	0,604	0,463	0,679	0,572
	PI	0,550	0,682	0,624	0,426	0,696	0,633
	Ca²⁺	0,578	0,646	0,547	0,426	0,839	0,644
	PMP	0,628	0,646	0,404	0,611	0,721	0,678
SH-SY5Y	NRU_L	0,600	0,646	0,500	0,472	0,750	0,611
	PI	0,500	0,546	0,695	0,407	0,732	0,633
	Ca²⁺	0,578	0,464	0,585	0,528	0,632	0,606
	PMP	0,457	0,446	0,365	0,500	0,596	0,483
HEPG2	NRU_L	0,550	0,664	0,571	0,426	0,679	0,606
	PI	0,550	0,600	0,624	0,481	0,607	0,567
	Ca²⁺	0,550	0,464	0,462	0,500	0,589	0,539
	PMP	0,500	0,429	0,547	0,546	0,632	0,511
	MMP	0,500	0,529	0,624	0,444	0,579	0,606

Tabla 16. Resumen de los test del Ensayo Citómico que mejoran la clasificación de los compuestos según las clases del reglamento GHS, comparados con el test *in vivo* en rata (LD50).

 PELIGRO MORTAL	 PELIGRO MORTAL	 PELIGRO TÓXICO	 PELIGRO MORTAL
CLASE I [0-5] mg/L	CLASE II [5-50] mg/L	CLASE III [50-300] mg/L	CLASE 1+2 [0-50] mg/L
LOEC-ECIV LOEC-EF A704_LOEC-ECIV A704_LOEC-EF SH-SY5Y_LOEC-ECIV SH-SY5Y_LOEC-EF HEPG2_LOEC-ECIV HEPG2_LOEC-EF A704 NRUL A704 PI A704 Ca ²⁺ A704 PMP SH-SY5Y NRUL SH-SY5Y PI SH-SY5Y Ca ²⁺ HepG2 NRUL HepG2 PI HepG2 Ca ²⁺ HepG2 PMP HepG2 MMP	LOEC-ECIV A704_LOEC-ECIV A704_LOEC-EF SH-SY5Y_LOEC-EF HepG2_LOEC-EF A704 NRUL A704 PI A704 Ca ²⁺ A704 PMP SH-SY5Y NRUL SH-SY5Y PI HepG2 NRUL HepG2PI	SH-SY5Y PI	LOEC-ECIV A704_LOEC-ECIV HepG2_LOEC-ECIV A704 PI A704 Ca ²⁺ A704 PMP SH-SY5Y PI

3.2.3 COMPARACIÓN DE LA ECIV CON EL ENSAYO DE TOXICIDAD *IN VIVO* EN RATÓN EN CUANTO A LA CAPACIDAD DE CLASIFICACIÓN DE COMPUESTOS SEGÚN SU TOXICIDAD EN HUMANOS MEDIANTE LOS CRITERIOS GHS.

El tercer análisis con un total de 28 compuestos se dirige a evaluar qué ensayos de la ECIV logran clasificar mejor o peor que el test *in vivo* en ratón con respecto a la toxicidad aguda en humano.





De los datos de la Tabla 17, se deduce que los ensayos de la ECIV obtienen mejores índices de AUC con respecto a los alcanzados por el test *in vivo* en ratón en las clases 1 y 2. Así, en la clase 1 el 52% y en la clase 2 el 71% de los ensayos de la ECIV clasifican mejor los compuestos que el test *in vivo* en ratón. Sin embargo, y como sucedía en las comparaciones anteriores, en las clases 3 y 4 se obtienen mejores resultados con el test *in vivo*. En la clase 5 solo 2 ensayos mejoran a las LD50 en ratón, pero en general se obtienen buenos resultados y el 62% de los ensayos de la ECIV logran clasificar de forma correcta con una probabilidad superior al 70% los compuestos de dicha clase.

La Tabla 18 muestra en resumen los ensayos de la ECIV que mejoran la clasificación de los compuestos con respecto al ensayo de toxicidad *in vivo* en ratón.

Tabla 17. Valores de AUC (tomando los valores de los 28 compuestos con datos bibliográficos disponibles en humano y ratón) para cada clase definida por la GHS. Y un índice de AUC agrupando las clases 1 y 2, que coinciden en el pictograma (calavera), la palabra de señalización (peligro) y tipo de riesgo en caso de ingestión (mortal).

		CLASE 1 0-5 mg/L	CLASE 2 5-50 mg/L	CLASE 3 50-300 mg/L	CLASE 4 300-2000 mg/L	CLASE 5 >2000 mg/L	CLASE 1+2 0-50 mg/L
TEÓRICOS LD50 RATÓN		0,500	0,538	0,880	0,697	0,813	0,600
LOEC	ECIV	0,699	0,553	0,713	0,500	0,833	0,856
	EF	0,556	0,598	0,460	0,470	0,792	0,628
A-704	LOEC-ECIV	0,614	0,659	0,587	0,455	0,750	0,756
	LOEC-EF	0,500	0,598	0,460	0,432	0,708	0,595
SH-SY5Y	LOEC-ECIV	0,503	0,538	0,360	0,455	0,667	0,628
	LOEC-EF	0,556	0,621	0,460	0,470	0,771	0,595
HEPG2	LOEC-ECIV	0,556	0,553	0,527	0,561	0,875	0,695
	LOEC-EF	0,500	0,598	0,480	0,477	0,646	0,595
A-704	NRU _L	0,500	0,621	0,460	0,455	0,667	0,562
	PI	0,500	0,621	0,627	0,432	0,708	0,633
	Ca ²⁺	0,585	0,659	0,607	0,432	0,854	0,690
	PMP	0,640	0,682	0,440	0,598	0,729	0,762
SH-SY5Y	NRU _L	0,556	0,621	0,460	0,492	0,750	0,595
	PI	0,500	0,538	0,607	0,409	0,729	0,600
	Ca ²⁺	0,529	0,538	0,440	0,515	0,750	0,595
	PMP	0,474	0,432	0,380	0,500	0,563	0,562
HEPG2	NRU _L	0,500	0,621	0,460	0,477	0,646	0,562
	PI	0,500	0,561	0,627	0,477	0,625	0,567
	Ca ²⁺	0,500	0,561	0,460	0,477	0,604	0,495
	PMP	0,500	0,477	0,360	0,538	0,729	0,533
	MMP	0,556	0,492	0,627	0,477	0,708	0,628

Tabla 18. Resumen de los ensayos de la ECIV que mejoran la clasificación de los compuestos según las clases del reglamento GHS, comparados con el test *in vivo* en ratón (LD50).

 PELIGRO MORTAL	 PELIGRO MORTAL	 CUIDADO TÓXICO	 PELIGRO MORTAL
CLASE I [0-5] mg/L	CLASE II [5-50] mg/L	CLASE V >2000 mg/L	CLASE 1+2 [0-50] mg/L
LOEC-ECIV LOEC-EF A-704_LOEC-ECIV SH-SY5Y_LOEC-ECIV SH-SY5Y_LOEC-EF HepG2_LOEC-EF A-704 Ca ²⁺ A-704 PMP SH-SY5Y NRU _L SH-SY5Y Ca ²⁺ HepG2 MMP	LOEC-ECIV LOEC-EF A704_LOEC-ECIV A704_LOEC-EF SH-SY5Y_LOEC-EF HepG2_LOEC-ECIV HepG2_LOEC-EF A-704 RNU _L A-704 PI A-704 Ca ²⁺ A-704 PMP SH-SY5Y NRU _L HepG2 NRU _L HepG2 PI HepG2 Ca ²⁺	LOEC-ECIV HepG2_LOEC-ECIV	LOEC-ECIV LOEC-EF A704_LOEC-ECIV A704_LOEC-EF SH-SY5Y_LOEC-ECIV SH-SY5Y_LOEC-EF HEPG2_LOEC-ECIV A-704 PI A-704 Ca ²⁺ A-704 PMP HepG2 MMP

3.2.4 ANÁLISIS POR AGRUPAMIENTO JERÁRQUICO DE LOS 13 COMPUESTOS OUTLIERS POR EL ENSAYO NRU_T EN LAS CÉLULAS 3T3.

El análisis por agrupamiento jerarquizado muestra dos clúster diferenciados. En el principal sub-clúster se agrupan las LC50 de humano y los indicadores de toxicidad LOEC de la ECIV, quedando el ensayo de NRU_T en las células 3T3 disociado del resto. El indicador de toxicidad que más se aproxima a los valores de LC50 de humano es el valor LOEC en la línea celular HepG2, seguido de los valores de los indicadores de toxicidad en la línea A704 y SH-SY5Y (Figura 25).

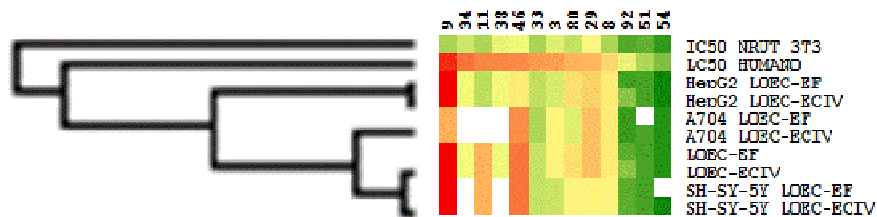


Figura 25. En las columnas se muestran los 13 compuestos outliers con el ensayo NRU_T en las células 3T3 y en las filas los valores LOEC de la ECIV, las LC50 de humano y las IC50 del ensayo NRU_T en las células 3T3.

3.2.5 ANÁLISIS POR AGRUPAMIENTO JERÁRQUICO DESCARTANDO LOS COMPUESTOS NO DETECTADOS POR LA ECIV.

Hemos realizado un análisis de agrupamiento jerárquico, descartando los 5 compuestos outliers en el ensayo NRU_T que no fueron detectados por la ECIV, en concreto monohidrato de sulfato de atropina (#5), nicotina (#3), lindano (#34), paratión (#38) y etileno glicol (#54). En este subconjunto de compuestos, el análisis del clúster revela 4 ramas del dendrograma, tal como se muestra en la Figura 26, agrupando los valores LOEC-ECIV, LOEC-EF y los valores de LC50 de humano en una rama. Es decir, que los indicadores de toxicidad LOEC son los valores que más se aproximan en la predicción de la toxicidad aguda en humanos. El segundo y tercer subconjunto corresponden a los valores de toxicidad *in vivo* e *in vitro* respectivamente, encontrándose a la misma distancia de la rama principal.

Si se desglosa el clúster y se observan exclusivamente los indicadores LOEC-ECIV y LOEC-EF, se observa (Figura 27) que todos los compuestos pertenecientes a la clase 1 y 2 están bien clasificados, exceptuando el selenato de sodio (#91) y la carbamazepina (#5) que aparecen con menor toxicidad *in vitro* que *in vivo*. El selenato de sodio (#91) aunque sea un outlier en el valor LOEC-EF, sí está bien clasificado por LOEC-ECIV.

Los compuestos pertenecientes a esta clase son los más críticos, ya que son los más tóxicos y los que deben de estar bien identificados para su correcto etiquetado. A partir de la clase 3 se pueden identificar diferentes alertas, correspondientes a los compuestos: dibromuro diquat (#44), pentaclorofenol (#13), ácido 2,4-diclofenoxiacético (#77) y alcohol isopropílico (#10). A la vista de los resultados son los indicadores de toxicidad LOEC-ECIV los que mejor clasifican los compuestos en relación al ensayo NRU_T en las células 3T3 y los ensayos *in vivo* en rata y ratón.

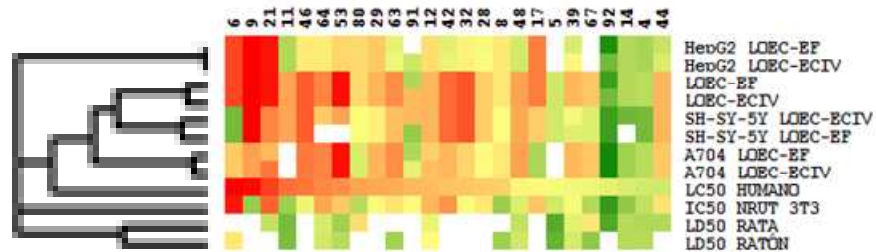


Figura 26. Análisis por agrupamiento jerárquico de las LD50 en rata y ratón, las IC50 del ensayo NRU_T en las células 3T3 y las LC50 de humano, los indicadores de toxicidad LOEC-ECIV y LOEC-EF de la ECIV.

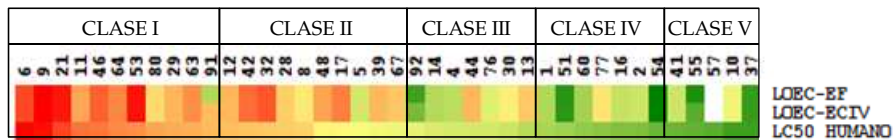


Figura 27. Análisis por agrupamiento jerárquico donde se muestra en las columnas los compuestos y en las filas los valores LOEC-ECIV, LOEC-EF y las LC50 de humano

3.2.6 ANÁLISIS POR AGRUPAMIENTO JERÁRQUICO DE LOS COMPUESTOS CON TOXICIDAD ÓRGANO-ESPECÍCA.

Al seleccionar los compuestos neurotóxicos se generan 4 ramas del dendrograma, donde el ensayo de NRU_T en las células 3T3, los indicadores LOEC de los Ensayos Funcionales en el hepatoma humano y los ensayos *in vivo* de rata y ratón no muestran similitud con los valores de LC50 en humano. Son los indicadores de toxicidad LOEC en la línea celular A704, seguidos de los indicadores de toxicidad LOEC de la ECIV completa y en la línea celular SH-SY5Y. Los valores de LOEC en la línea celular HepG2 y los valores *in vivo* e *in vitro* son los ensayos más alejados de los valores de humano.

Tampoco podemos afirmar con seguridad que la ECIV detecte toxicidad neurotóxica, ya que en este análisis se han descartado los 5 compuestos outlier en el ensayo NRU_T que la ECIV no consigue detectar. Pero sí se puede señalar que los indicadores LOEC de la ECIV en las líneas SH-SY5Y y A704 serían buenos candidatos para incluir como ensayos en un cribado de compuestos neurotóxicos.

Cuando se seleccionan en el análisis únicamente los compuestos hepatotóxicos, exceptuando lindano (#34) y paratión (#38), se observa que los valores de toxicidad *in vivo* en rata y ratón (LD50) se agrupan en una rama del árbol y las LC50 de humano y los valores de los ensayos *in vitro* se agrupan en una segunda rama. En el

agrupamiento de los compuestos hepatotóxicos, las líneas celulares que más se aproximan a los valores de toxicidad humana son A704 y Hep-G2, seguidas de la línea SH-SY5Y. Todos los indicadores de toxicidad de la ECIV mejoran el ensayo NRU_T en las células 3T3.

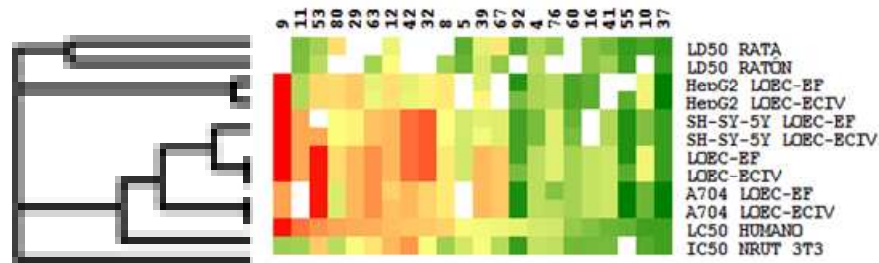


Figura 28. Análisis por agrupamiento jerárquico. En las columnas se muestran los compuestos neurotóxicos (81) y en las filas los valores de LD50 en rata y ratón, las IC50 del ensayo NRU_T en las células 3T3, las LC50 de humano y los indicadores de toxicidad LOEC-ECIV y LOEC-EF de las líneas celulares A-704, SH-SY5Y y HepG2.

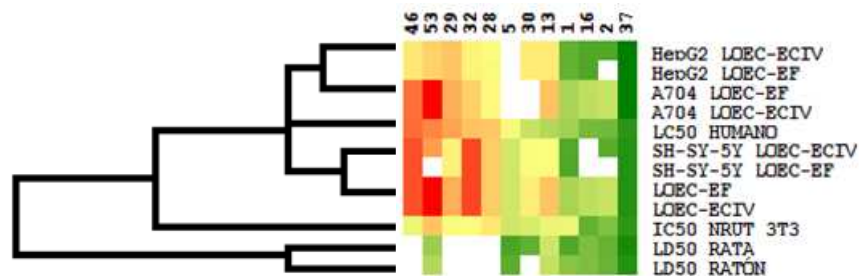


Figura 29. Análisis por agrupamiento jerárquico donde se muestra en las columnas los compuestos hepatotóxicos (81) y en las filas los valores de las LD50 en rata y ratón, las IC50 en 3T3, las LC50 de humano y los indicadores de toxicidad LOEC-ECIV y LOEC-EF de la ECIV en las líneas celulares A-704, SH-SY5Y y HepG2.

4. CONSIDERACIONES FINALES SOBRE EL VALOR PARA LA TOXICOLOGÍA DE LA PLATAFORMA CITÓMICA Y LA ESTRATEGIA CITÓMICA *IN VITRO*.

Una de las retos actuales en Toxicología Experimental es la identificación de una toxicidad potencial evitando el uso de animales de laboratorio, mediante cribado de alto rendimiento, aplicable a las etapas tempranas del desarrollo de fármacos o en el contexto de la Toxicología Reguladora (86), (87). Por ello, el desarrollo de métodos *in vitro* de análisis de toxicidad es una prioridad. Técnicas como la selección de plataformas de alto rendimiento (88), la citometría de flujo (89), (90) y nuevas herramientas de extracción de datos, tales como el análisis bioinformático (91) son esenciales y potencialmente efectivas para este tipo de análisis (92).

Para el desarrollo del presente estudio básico de toxicidad *in vitro* y de predicción de toxicidad aguda y clasificación de riesgo químico hemos utilizado la CMF por ser una tecnología basada en la fluorescencia, sensible y poco invasiva, que aprovecha el análisis sobre la célula individual para abordar la complejidad de los tejidos y organismos. Su potencia analítica para evaluar el daño subletal y letal en la poblaciones celulares de interés, junto con la alta velocidad de adquisición de datos, hace de la CMF una herramienta potente para desarrollar métodos alternativos *in vitro* para evaluar la toxicidad.

Por otra parte, la estrategia de análisis de los resultados utilizando la herramienta de agrupamiento jerárquico permite interpretar mejor cómo se comportan las células en un microambiente complejo (93). La experimentación tradicional no se acerca al ambiente natural de una célula y por lo tanto los resultados *in vitro* pueden no reflejar la situación *in vivo*. La agrupación jerárquica es un método común utilizado para determinar grupos de puntos de datos similares en espacios multidimensionales, que permite una fácil manipulación de grandes conjuntos de datos voluminosos. En lugar de limitarse a confirmar las relaciones ya conocidas, la agrupación jerárquica facilita la probabilidad de encontrar eventos lineales raros, inesperados o no, en conjuntos complejos de datos de alta dimensión. De esta forma, se podría llegar a entender el modo de acción y la vía de toxicidad, conceptos que representan un cambio hacia un enfoque basado en el conocimiento del peligro toxicológico y evaluación de riesgos (94), (95), (96), (97).

CONCLUSIONES FINALES

1. La primera aportación del presente estudio a la Toxicología *In Vitro* ha sido la aplicación de la CMF como estrategia única, normalizada y sistemática, para establecer un método *in vitro* alternativo de valoración y clasificación de riesgo químico.
2. La ECIV es muy reproducible, sensible y con coeficientes de variación intra- e interensayos muy bajos, lo que permite implementar procedimientos fácilmente automatizables y transferibles a otros laboratorios.
3. La ECIV no es significativamente diferente de las capacidades predictivas de los ensayos de referencia de toxicidad *in vivo* e *in vitro*, a pesar de obtener mejores coeficientes R².
4. Los Ensayos Funcionales de la ECIV predicen mejor la toxicidad humana que los Ensayos de Viabilidad, reduciendo el número de outliers y detectando alertas de los ensayos *in vitro* e *in vivo* de referencia.
5. La ECIV muestra mejor capacidad de clasificación que los test *in vitro* e *in vitro* de referencia para los compuestos pertenecientes a las clases 1, 2 y 1+2 del GHS. En las clases 3 y 4 se obtienen mejores resultados con los test *in vitro* e *in vivo* de referencia.

6. Su capacidad de clasificar los compuestos no tóxicos, hace de la ECIV una buena candidata para su inclusión en las estrategias para la predicción de toxicidad aguda humana.

BIBLIOGRAFÍA

1. OECD. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No 420: Acute Oral Toxicity–Fixed Dose Procedure*. 14 (2001).
2. OECD. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No 423: Acute Oral Toxicity–Acute Toxic Class Method*. 14 (2001).
3. OECD. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No 425: Acute Oral Toxicity–Up-and Down Procedure*. 26 (2001).
4. CE. REGLAMENTO (CE) nº 1907/2006 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 18 de diciembre de 2006 relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Su. 1–3 (2006).
5. CE. *Directive 2003/15/EC of the European parliament and the council of 27 February amending Directive 76/786/EEC on the approximation of the laws of the member states relating to cosmetic products*. 26–35 (2003).
6. CE. REGLAMENTO (CE) No 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 16 de diciembre de 2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Re. (2008).
7. CE. DIRECTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. *D. Of. la Unión Eur.* 33–79 (2010).
8. CE. REGLAMENTO (UE) No 900/2014 DE LA COMISIÓN de 15 de julio de 2014 que modifica, con vistas a su adaptación al progreso

técnico, el Reglamento (CE) no 440/2008, por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) no 1907/2006 del P. (2014).

9. Spielmann, H. *et al.* EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicol. In vitro* 8, 793–6 (1994).
10. Spielmann, H. *et al.* The International EU/COLIPA In vitro Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1: The 3T3 NRU Phototoxicity Test. *Toxicol. In vitro* 12, 305–27 (1998).
11. Balls, M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Lab. Anim.* 28, 193–211 (1994).
12. Kimber, I. *et al.* Alternative approaches to the identification and characterization of chemical allergens. *Toxicol. In vitro* 15, 307–12 (2001).
13. Hendriksen, C. F. M. Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert Rev. Vaccines* 8, 313–22 (2009).
14. Ranganatha, N. & Kuppast, I. J. A review on alternatives to animal testing methods in drug development. *Acad. Sci.* 4, (2012).
15. Zurlo, J., Rudacille, D. & Goldberg, A. M. The three Rs: the way forward. *Environ. Health Perspect.* 104, 878–80 (1996).
16. Balls, M. Future improvements: replacement in vitro methods. *ILAR J.* 43 Suppl, S69–73 (2002).

17. Gupta, S., Basant, N. & Singh, K. P. Predicting the hazardous dose of industrial chemicals in warm-blooded species using machine learning-based modelling approaches. *SAR QSAR Environ. Res.* 1–20 (2015).
18. Gupta, S., Basant, N. & Singh, K. P. Nonlinear QSAR modeling for predicting cytotoxicity of ionic liquids in leukemia rat cell line: an aid to green chemicals designing. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 12699–710 (2015).
19. Wedebye, E. B., Dybdahl, M., Nikolov, N. G., Jónsdóttir, S. Ó. & Niemelä, J. R. QSAR screening of 70,983 REACH substances for genotoxic carcinogenicity, mutagenicity and developmental toxicity in the ChemScreen project. *Reprod. Toxicol.* 55, 64–72 (2015).
20. Ekwall, B. Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 407, 64–77 (1983).
21. Walum, E. & Ekwall, B. Welcome to join the MEIC Programme. *MEIC Newsl.* vol. 1, No. 1 (1989).
22. Kolman, A. & Walum, E. Björn Ekwall, an outstanding Swedish cell toxicologist. *Toxicol. Vitro.* 24, 2060–2062 (2010).
23. Bondesson, I. *et al.* MEIC--a new international multicenter project to evaluate the relevance to human toxicity of in vitro cytotoxicity tests. *Cell Biol. Toxicol.* 5, 331–47 (1989).
24. Ekwall, B. *et al.* Validation of In vitro Cytotoxicity Tests- Past and Present Strategies. *ATLA* 226–233 (1991).
25. Clemedson, C. *et al.* 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 Altern. to Lab. Anim.* 26, 96–129

26. Clemedson, C. et al. 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 Altern. to Lab. Anim.* 26, 131–183
27. Clemedson, C. et al. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part I. Methodology of 68 in vitro toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals. *ATLA Altern. to Lab. Anim.* 24, 249–272
28. Clemedson, C. et al. 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 Altern. to Lab. Anim.* 24, 273–311.
29. B.O.E. ORDEN de 30 de junio de 1998 por la que se modifican los anexos I, III, V y VI del Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo. 22374–22487 (1998).
30. Ekwall, B. et al. MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity: Part VI. The Prediction of Human Toxicity by Rodent LD50 Values and Results From 61 In vitro Methods. *Altern. Lab. Anim.* 26 Suppl 2, 617–58 (1998).
31. Clemedson, C. et al. 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 Altern. to Lab. Anim.* 28, 161–200 (2000).

32. Prediction, G., Lethal, A. & Blood, P. MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity Part VIII . Multivariate Partial Least Squares Evaluation , Concentrations for 50 Chemicals. 201–234 (2000).
33. Vi, P. *et al.* MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity. 617–658 (1998).
34. Hoffmann, S. *et al.* Acute oral toxicity: Variability, reliability, relevance and interspecies comparison of rodent LD50 data from literature surveyed for the ACuteTox project. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 58, 395–407 (2010).
35. Ekwall, B. Overview of the final MEIC results: II. The in vitro -- in vivo evaluation, including the selection of a practical battery of cell tests for prediction of acute lethal blood concentrations in humans. *Toxicol. Vitr.* 13, 665–673 (1999).
36. Kinsner-Ovaskainen, A. *et al.* Acutoxbase, an innovative database for in vitro acute toxicity studies. *Toxicol. Vitr.* 23, 476–485 (2009).
37. Sjöström, M., Kolman, A., Clemedson, C. & Clothier, R. Estimation of human blood LC50 values for use in modeling of in vitro -in vivo data of the ACuteTox project. *Toxicol. Vitr.* 22, 1405–1411 (2008).
38. Clothier, R.H., . Phototoxicity and acute toxicity studies conducted by the FRAME : a brief review. *Altern. Lab. Anim.* 35, 515–519 (2007).
39. (IHCP), I. for H. and C. P. & Contact. *EURL ECVAM Recommendation on the 3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay for Acute Oral Toxicity Testing.* (2013).

40. O'Connor, J. E. *et al.* The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. *IUBMB Life* 51, 231–239 (2001).
41. Davies, E., Stankovic, B., Azama, K., Shibata, K. & Abe, S. Novel components of the plant cytoskeleton: a beginning to plant 'cytomics'. *Plant Sci.* 160, 185–196 (2001).
42. Álvarez-Barrientos, A., Enrique, J., Connor, O. & Callaghan, R. C. *Citómica : técnicas y estrategias en citometría de sistemas.*
43. Herrera, G. *et al.* Cytomics: A multiparametric, dynamic approach to cell research. *Toxicol. Vitr.* 21, 176–182 (2007).
44. Valet, G. Cytomics: An entry to biomedical cell systems biology. *Cytom. Part A* 63, 67–68 (2005).
45. Valet, G., Leary, J. F. & Tárnok, a. Cytomics--new technologies: towards a human cytome project. *Cytometry. A* 59, 167–171 (2004).
46. Shapiro, H. M. *Practical Flow Cytometry.* (2005).
47. Monteiro, M.-C., Martínez, M. & O'Connor, J. E. La citometría de flujo en el análisis funcional de las plaquetas: II. Aplicaciones clínicas. *Rev. Diagnóstico Biológico* 51, 87–99 (2002).
48. Givan, A. L. *Flow Cytometry: First Principles.* (2001).
49. Of, A. *et al.* Assessment of Cell Viability. *Cytometry* 1–14 (1997).
50. DeRenzis, F. A. & Schechtman, A. Staining by neutral red and trypan blue in sequence for assaying vital and nonvital

cultured cells. *Stain Technol.* 48, 135–6 (1973).

51. Voet, D. & Voet, J. G. *Biochemistry 4e.* *Zhurnal Eksp. i Teor. Fiz.* (2010).
52. Shapiro, H. M. Membrane potential estimation by flow cytometry. *Methods* 21, 271–279 (2000).
53. Alberts, B. *et al.* in *Biol. Mol. da Celula* 1269–1602 (2008).
54. Shapiro, H. M. Estimation of membrane potential by flow cytometry. *Curr. Protoc. Cytom.* Chapter 9, Unit 9.6 (2004).
55. Shapiro, H. M. Cell membrane potential analysis. *Methods Cell Biol.* 41, 121–33 (1994).
56. O'Connor, J.E., Alvarez, A.M., Corrochano, V. Callaghan, R. C. *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo .Estres oxidativo y homeostasis del calcio.* (1997).
57. Vinay Kumar, Abul K. Abbas, J. A. R. B. P. 9th edition. *Robbins Patologia humana.* Elseiver (2008).
58. Rabinovitch PS, J. C. y K. T. Measurements of cell physiology; Ionized calcium, pH and glutathione. *Manager* 119, 352–357 (1993).
59. Haughland RP, S. M. y J. I. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. *Ed. Mol. Probes* 503–550 (1996).
60. Perry, S. W., Norman, J. P., Barbieri, J., Brown, E. B. & Gelbard, H. a. Mitochondrial membrane potential probes and the proton

gradient: A practical usage guide. *Biotechniques* 50, 98–115 (2011).

61. Johnson, L. V, Walsh, M. L., Bockus, B. J. & Chen, L. B. Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* 88, 526–35 (1981).
62. Lemasters, J. J. & Ramshesh, V. K. Imaging of mitochondrial polarization and depolarization with cationic fluorophores. *Methods Cell Biol.* 80, 283–95 (2007).
63. Nicholls, D. G. & Ward, M. W. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci.* 23, 166–74 (2000).
64. Ehrenberg, B., Montana, V., Wei, M. D., Wuskell, J. P. & Loew, L. M. Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. *Biophys. J.* 53, 785–94 (1988).
65. Perry, S. W., Norman, J. P., Barbieri, J., Brown, E. B. & Gelbard, H. A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* 50, 98–115 (2011).
66. Borenfreund, E. & Puerner, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24, 119–24 (1985).
67. Hanley J.A., M. B. J. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 143, 29–36 (1982).

68. Alvarez-Barrientos, A., O'Connor, J.E., Nieto-Castillo, R., Moreno- Moreno, A.B., Prieto, P. Use of Flow cytometry and confocal microscopy techniques to investigate early CdCl₂-induced nephrotoxicity in vitro . *e. Toxicol. Vitro*. 15, 407–412 (2001).
69. Martínez-Romero, A., Alvarez-Barrientos, A., Callaghan, R.C., Coecke, S., Arza, E., Nieto, R., Prieto, P., Torralbo, P., O'Connor, J. E. Role of CYP2D6-dependent metabolism in the cytotoxicity of mianserin and imipramin. *Cytometry* 59A, 48–49. (2004).
70. Alvarez-Barrientos, A., Callaghan, R.C., Huerta, E., Coecke, S., Martínez, A., Nieto, R., O'Connor, J.E., Prieto, P., Torralbo, P. Drug- metabolism dependent cytotoxicity of mianserin in vitro : application of a primary toxicity cytotoxic panel. In: . *VIII Congr. Iber. Soc. Cytom. Madrid* (2003).
71. Ekwall, B., Clemedson, C., Crafoord, B., Ekwall, B., Hallander, S., Wallum, E., Bondenson, I. MEIC evaluation of acute systemic toxicity: part V. Rodent and human toxicity data for the 50 reference chemicals. *Altern. Lab. Anim* 26, 571–616 (1998).
72. Kooijman, R., Devos, S. & Hooghe-Peters, E. Inhibition of in vitro cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells treated with xenobiotics: implications for the prediction of general toxicity and immunotoxicity. *Toxicol. In vitro* 24, 1782–9 (2010).
73. Revelle, W. (2015) *psych: Procedures for Personality and Psychological Research*, Northwestern University, Evanston, Illinois, USA.
74. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

75. Cerrato, L., Valeri, A., Bueren, J. a. & Albella, B. In vitro sensitivity of granulo-monocytic progenitors as a new toxicological cell system and endpoint in the ACuteTox Project. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 111–119 (2009).
76. Ekwall, B. *et al.* MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity: Part V. Rodent and Human Toxicity Data for the 50 Reference Chemicals. *Altern. Lab. Anim.* 26 Suppl 2, 571–616 (1998).
77. Ekwall, B., Ekwall, B. & Sjöström, M. 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. *Altern. to Lab. Anim. ATLA* 28, 201–234 (2000).
78. Coder, D. M. Assessment of cell viability. *Curr. Protoc. Cytom.* Chapter 9, Unit 9.2 (2001).
79. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63 (1983).
80. Gomez-Lechon, M., Donato, M., Lahoz, A. & Castell, J. Cell Lines: A Tool for In vitro Drug Metabolism Studies. *Curr. Drug Metab.* 9, 1–11 (2008).
81. Clothier, R. *et al.* Comparative analysis of eight cytotoxicity assays evaluated within the ACuteTox Project. *Toxicol. Vitro.* 27, 1347–1356 (2013).
82. Díaz, L., Gumbau, L., Sequedo, D., Herrera, G., O'Connor, J.E., Fabre, N., Vericat, J. A. A strategy for extending the range of in vitro hepatotoxicity assessment of test compounds with low

toxic potency. An activity of the Melius project. *Toxicol. Lett.* 196S: S270. (2010).

83. Herrera, G., Díaz, L., Navarro, C., Fabre, N., Vericat, J.A., O'Connor, J. E. An integrated platform of cytomic in vitro assays for multiparametric profiling of toxicity mechanisms in drug discovery and preclinical safety. An activity of the Melius project. *Toxicol. Lett.* 196S: S270–271 (2010).
84. Hand, D. J. & Till, R. J. A Simple Generalisation of the Area Under the ROC Curve for Multiple Class Classification Problems. *Mach. Learn.* 45, 171–186 (2001).
85. Kinsner-Ovaskainen, A., Prieto, P., Stanzel, S. & Kopp-Schneider, A. 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. *Toxicol. In vitro* 27, 1377–94 (2013).
86. Antczak, P., Ortega, F., Chipman, J. K. & Falciani, F. Mapping drug physico-chemical features to pathway activity reveals molecular networks linked to toxicity outcome. *PLoS One* 5, (2010).
87. Mayr L, B. D. Novel trends in high-throughput screening. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 580–558 (2009).
88. Kariv, I., Rourick, R. A., Kassel, D. B. & Chung, T. D. Y. Improvement of 'hit-to-lead' optimization by integration of in vitro HTS experimental models for early determination of pharmacokinetic properties. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 5, 459–72 (2002).
89. Cox, B. *et al.* Application of high-throughput screening

- techniques to drug discovery. *Prog. Med. Chem.* 37, 83–133 (2000).
90. Herzenberg, L. A. *et al.* The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin. Chem.* 48, 1819–27 (2002).
 91. Gedye, C. A. *et al.* Cell surface profiling using high-throughput flow cytometry: a platform for biomarker discovery and analysis of cellular heterogeneity. *PLoS One* 9, e105602 (2014).
 92. Lugli, E., Roederer, M. & Cossarizza, A. Data analysis in flow cytometry: the future just started. *Cytometry. A* 77, 705–13 (2010).
 93. Kim, Y.-J., Brox, T., Feiden, W. & Weickert, J. Fully automated segmentation and morphometrical analysis of muscle fiber images. *Cytometry. A* 71, 8–15 (2006).
 94. Sonich-Mullin, C. *et al.* IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 34, 146–52 (2001).
 95. Julien, E., Boobis, A. R. & Olin, S. S. The Key Events Dose-Response Framework: a cross-disciplinary mode-of-action based approach to examining dose-response and thresholds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49, 682–9 (2009).
 96. Whelan, M. & Andersen, M. *Toxicity Pathways – from concepts to application in chemical safety assessment (EUR 26389 EN)*. *Jt. Res. Cent. Eur. Comm.* (2013).
 97. Ankley GT1, Bennett RS, Erickson RJ, Hoff DJ, Hornung MW,

Johnson RD, Mount DR, Nichols JW, Russom CL, Schmieder PK, Serrano JA, Tietge JE, V. D. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Env. Toxicol Chem.* 730–41 (2010).