



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO 3102 BIOMEDICINA Y  
BIOTECNOLOGÍA

**DESARROLLO DE ENSAYOS CITÓMICOS DE  
ALTO CONTENIDO Y ALTO RENDIMIENTO  
PARA LA PREDICCIÓN Y CLASIFICACIÓN DEL  
RIESGO TÓXICO DE COMPUESTOS QUÍMICOS**

TESIS DOCTORAL

SUSANA BALAGUER TIMOR

Director:

Dr. JOSÉ ENRIQUE O'CONNOR BLASCO

Tutora:

Dra. EULALIA ALONSO IGLESIAS





VNIVERSITAT D VALÈNCIA

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

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado "DESARROLLO DE ENSAYOS CITÓMICOS DE ALTO CONTENIDO Y ALTO RENDIMIENTO PARA LA PREDICCIÓN Y CLASIFICACIÓN DEL RIESGO TÓXICO DE COMPUESTOS QUÍMICOS" del que es autora Susana Balaguer Timor, Licenciada en Bioquímica y Máster Universitario en Aproximaciones Moleculares en Ciencias de la Salud, ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular bajo mi dirección, reuniendo en mi opinión todos los requisitos para ser presentado y defendido para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Valencia, a 4 de Abril de 2016.

Fdo. José Enrique O'Connor Blasco



Esta Tesis Doctoral se ha realizado en parte gracias a las ayudas concedidas a los siguientes Proyectos de Investigación:

Nuevas tecnologías para Toxicología in vitro: Diseño y validación de una plataforma integrada ADMETOX de ensayos celulares para predicción de riesgo químico en humanos. Ministerio de Ciencia e Innovación (BIO2010-19870).

Desarrollo de una nueva estrategia de ensayos citómicos para detección temprana y predicción de toxicidad crónica humana de fármacos y xenobióticos. Universitat de València, Convocatòria Accions Especials 2015 (UV-INV-AE15-349700).



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a mi director de Tesis, el Dr. José Enrique O'Connor, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por sus enseñanzas y su continuo apoyo. Gracias a su implicación y esfuerzo se ha hecho posible la realización de esta Tesis en el tiempo establecido. Además, quiero agradecer profundamente la oportunidad que me ha proporcionado de poder continuar con la Citometría de Flujo en una nueva etapa de mi vida. Por todo ello, gracias Enrique.

También quiero agradecer a dos personas no menos importantes para mí, la Dra. Guadalupe Herrera, que me ha ayudado en todo momento con sus consejos y enseñanzas y a la Dra. Alicia Martínez, que me acompañó y me formó en mis inicios y siempre me ha apoyado. Gracias por vuestro esfuerzo y por todos los momentos vividos, sin vosotras este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo.

Gracias a Domingo Gil y a todos los compañeros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular por su ayuda y apoyo, en especial a los compañeros de prácticas del Laboratorio de Citometría, que han colaborado a que este trabajo se haya desarrollado y por supuesto, a ti Bea, que hemos pasado tantas batallas juntas. Gracias por apoyarme, sin tu ayuda habría sido mucho más difícil terminar esta Tesis.

Quiero agradecer también a mis amigos, Lucia, Cristina, Paloma, Silvia, Lambert y Carlos, gracias por vuestro apoyo y ánimos incondicionales, gracias equipo!!

Finalmente, quiero agradecer especialmente a mi familia, mis padres, a mi hermano y a su mujer, por todo lo que han hecho, por la paciencia durante estos años y porque siempre están ahí.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Los compuestos químicos y su riesgo para la salud humana. ....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Evaluación del riesgo tóxico de compuestos químicos .....</b>	<b>16</b>
1.2.1 Normativas y Procedimientos para la Evaluación de Riesgo de Toxicidad .....	17
1.2.2 Normativa REACH.....	18
1.2.3 Sistema GHS .....	19
1.2.4 Reglamento CLP .....	23
<b>1.3 Uso de Animales de Laboratorio en la Evaluación Normativa de Toxicidad .....</b>	<b>31</b>
<b>1.4 Métodos Alternativos al Uso de Animales de Laboratorio .....</b>	<b>33</b>
1.4.1 El principio de las 3 R. ....	33
1.4.2 Desarrollo de Métodos Alternativos.....	34
1.4.3 Los Métodos Alternativos en Europa: El EURL-ECVAM.....	37
<b>1.5 Los Ensayos Celulares como Métodos Alternativos al Animal de Laboratorio .....</b>	<b>40</b>
1.5.1 Concepto de Citotoxicidad Basal.....	40
1.5.2 Estudios Multicéntricos de Citotoxicidad Basal .....	42
<b>1.6 Toxicología Mecánica: La Toxicología del Siglo XXI.....</b>	<b>44</b>
1.6.1. La Toxicología del Siglo XXI.....	44
1.6.2 Toxicología de Sistemas .....	46
1.6.3 El Proyecto Europeo A-Cute-Tox.....	46
1.6.4 El Proyecto Europeo EU ToxRisk .....	54
<b>1.7 La Citómica en el Desarrollo de Métodos Célulares en Toxicología .....</b>	<b>56</b>

1.7.1	Concepto y Fundamento de la Citómica .....	56
1.7.2	Parámetros Citómicos para la Evaluación de Citotoxicidad in Vitro.....	61
1.7.3	Capacidad Predictiva de los Ensayos Citómicos.....	75
<b>1.8</b>	<b>Introducción al Análisis Estadístico de Datos</b>	
	<b>Multiparamétricos .....</b>	<b>75</b>
1.8.1	Análisis de Componentes Principales.....	77
1.8.2	Asociación de Variables.....	79
2.	HIPÓTESIS.....	81
3.	OBJETIVOS.....	83
<b>4.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>85</b>
<b>4.1</b>	<b>LÍNEAS CELULARES .....</b>	<b>85</b>
<b>4.2</b>	<b>MEDIOS DE CULTIVO .....</b>	<b>86</b>
4.2.1	MEDIOS DE CULTIVO RUTINARIO.....	86
4.2.2	MEDIOS DE CULTIVO PARA EL TRATAMIENTO CON TÓXICOS .....	86
4.2.3	MEDIO DE CONGELACIÓN CELULAR.....	87
<b>4.3</b>	<b>CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR .....</b>	<b>87</b>
4.3.1	CONGELACIÓN.....	87
4.3.2	DESCONGELACIÓN .....	87
4.3.3	MANTENIMIENTO Y CULTIVO RUTINARIO .....	88
<b>4.4</b>	<b>PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES. ....</b>	<b>89</b>
<b>4.5</b>	<b>PREPARACIÓN DE LOS TÓXICOS.....</b>	<b>91</b>
<b>4.6</b>	<b>RANGO AMPLIO DE CONCENTRACIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA IC50 .....</b>	<b>92</b>
4.6.1	ENSAYO DE YODURO DE PROPIDIO.....	93
<b>4.7</b>	<b>ENSAYOS CITÓMICOS .....</b>	<b>94</b>

4.7.1	PREPARACIÓN DE LOS FLUOROCROMOS.....	95
4.7.2	TINCIÓN CELULAR Y ANÁLISIS EN EL CITÓMETRO.....	95
4.7.3	CONTROLES POSITIVOS .....	97
4.7.4	CÁLCULO DE IC50 .....	98
4.7.5	CÁLCULO DE EC50 .....	98
4.7.6	ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LOS ENSAYOS CITOMICOS PARA PREDECIR TOXICIDAD AGUDA EN RATA .....	99
4.7.7	ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LOS ENSAYOS CITOMICOS PARA CLASIFICAR LOS COMPUESTOS SEGÚN LA ESCALA DEL SISTEMA GHS Y LA REGULACIÓN CLP.....	100
<b>4.8</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>104</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>112</b>
<b>5.1</b>	<b>CONTROLES POSITIVOS .....</b>	<b>112</b>
<b>5.2</b>	<b>CÁLCULO DE IC50 Y EC50 .....</b>	<b>115</b>
<b>5.3</b>	<b>ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PREDICTIVA DE LOS ENSAYOS CITÓMICOS .....</b>	<b>123</b>
5.3.1	CAPACIDAD PREDICTIVA DE LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD EXISTENTES.....	124
5.3.2	CAPACIDAD PREDICTIVA DE TOXICIDAD AGUDA EN RATA DE LOS ENSAYOS CITÓMICOS.....	125
5.3.3	CAPACIDAD PREDICTIVA DE TOXICIDAD AGUDA EN HUMANO DE LOS ENSAYOS CITÓMICOS.....	127
5.3.4	CAPACIDAD PREDICTIVA DE TOXICIDAD AGUDA DE LOS ENSAYOS CITÓMICOS IN VITRO.....	128
5.3.5	CAPACIDAD PREDICTIVA DE EFECTOS TEMPRANOS DE TOXICIDAD AGUDA DE LOS ENSAYOS CITÓMICOS.....	131
<b>5.4</b>	<b>CAPACIDAD DE CLASIFICACIÓN .....</b>	<b>136</b>
5.4.1	CLASIFICACIÓN SEGÚN EL CRITERIO GHS/CLP .....	140

5.4.2 CLASIFICACIÓN SEGÚN EL CRITERIO BASADO EN LA TOXICIDAD HUMANA .....	150
5.4.3 CLASIFICACIÓN SEGÚN EL CRITERIO BASADO EN LA TOXICIDAD IN VITRO DE 3T3 .....	156
<b>5.5 MINERÍA DE DATOS E INTEGRACIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>163</b>
5.5.1 ANÁLISIS PCA.....	169
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>189</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>190</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Los compuestos químicos y su riesgo para la salud humana.

Durante la última década la producción de sustancias y preparados químicos se ha visto incrementada, ya que cada día dependemos más en nuestra vida cotidiana de los productos derivados de la industria química.

La gran expansión de la industria química y su diversificación han llegado a conferir una gran importancia a la Toxicología Industrial. Por otra parte, el reconocimiento gradual de los derechos del trabajador frente a posibles peligros tóxicos en el ámbito industrial ha cristalizado en la Toxicología Laboral u Ocupacional (Repetto y Repetto, 2009).

Es importante destacar que, ya en 1947, en España se promulgó el Decreto de Clasificación de Enfermedades Profesionales, que reguló el reconocimiento médico, diagnóstico y calificación de varias enfermedades profesionales, producidas por una amplia serie de productos y subproductos industriales, como ácido sulfúrico, sulfuroso y sulfhídrico, hidrocarburos alifáticos halogenados, sulfuro de carbono, nitroderivados, aminoderivados y derivados halogenados de hidrocarburos aromáticos, isocianatos, arsénico, vanadio, fósforo, mercurio, y los derivados de estos metales, etc. Dicha reglamentación, modificada por numerosas disposiciones posteriores, llevó a la creación en 1970 del Instituto Nacional de

Higiene y Seguridad en el Trabajo, dependiente del Instituto Nacional de Previsión del Ministerio de Trabajo, denominado después Servicio Social de Higiene y Seguridad en el Trabajo, integrado posteriormente en el Ministerio de Sanidad y Seguridad Social y, de nuevo en el Ministerio de Trabajo (Repetto y Repetto, 2009).

La exposición a compuestos químicos de origen industrial, potencialmente tóxicos, es cada vez más frecuente e intensa a través de la contaminación ambiental urbana, con su incidencia directa en la salud del ciudadano. Por otra parte, la contaminación de los espacios naturales y agrícolas, ejerce un impacto directo sobre la fauna y la flora, pero puede resultar en efectos nocivos en los humanos, que pueden verse expuestos a los contaminantes que se acumulan a lo largo de la cadena trófica. Estos procesos son la materia de la Toxicología Ambiental y de la Ecotoxicología. Ambas ramas se pueden diferenciar, considerando que la Toxicología Ambiental se centra en los procesos que conducen a la enfermedad o muerte de los individuos, mientras que la Ecotoxicología implica el estudio de los desequilibrios en el ecosistema (Repetto y Repetto, 2009). Una, por desgracia, concluyente demostración de la conexión entre ambos procesos la proporcionó la catástrofe de Minamata, debida a la intoxicación de los peces por metilmercurio procedente de aguas residuales de fábricas de papel en Japón (Gilbert, 2012).

En los últimos años la sociedad se enfrenta a un preocupante aumento de la contaminación de los alimentos por sustancias químicas añadidas, legal o ilegalmente, durante el proceso de fabricación. Los conservantes, acondicionadores organolépticos,

odorantes, colorantes, hormonas, antibióticos, antisépticos y otros aditivos pueden producir fenómenos tóxicos a corto o a largo plazo. Por otra parte, como consecuencia de la contaminación ambiental, los residuos de insecticidas (especialmente, los organoclorados) y ciertos subproductos industriales (como los bifenilos policlorados o BPCs), que por su persistencia se encuentran en los alimentos de procedencia vegetal y animal, se acumulan en los tejidos grasos humanos. En este contexto, grupos españoles de investigación en el área de la Toxicología Bromatológica han detectado la presencia de DDT y BFCs en las muestras del 100 % de los sujetos adultos estudiados, pero también en el 70% de las muestras de leche materna humana y en el 30% de las muestras de sangre de cordón umbilical, lo que demuestra, además, que muchos niños nacen ya contaminados años después de la retirada del DDT del mercado. (Repetto y Repetto, 2009).

Como consecuencia del estado de alerta toxicológica alimentaria, la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Unión Europea y el gobierno de los USA establecen listas positivas y negativas de aditivos alimentarios permitidos o prohibidos y definen las cantidades o ingestas diarias admisibles (IDA) para cada uno de ellos. Igualmente, cada vez se endurecen más la normativa que controla la presencia de metales, plaguicidas, medicamentos, y productos usados para el engorde fraudulento de animales de consumo humano.

Con respecto al impacto no deseado de los medicamentos en la salud humana, la Toxicología Farmacéutica se implica cada vez más

en el estudio de las propiedades tóxicas y riesgo de uso de los medicamentos, incluyendo las reacciones adversas inmediatas o a largo plazo y los efectos nocivos en la descendencia. En España, la Toxicología Farmacéutica depende oficialmente del Servicio de Farmacovigilancia, para el control de las reacciones adversas de los medicamentos. Es evidente que éstas son cada vez más frecuentes e intensas, a causa de la proliferación de fármacos humanos y veterinarios, y su empleo abusivo o indiscriminado, que genera sensibilizaciones y produce toxicidad por sobredosificaciones, sinergias o incompatibilidades (Repetto y Repetto, 2009).

## **1.2 Evaluación del riesgo tóxico de compuestos químicos**

En general, es muy complicado demostrar el efecto real que las sustancias químicas producen sobre el medio ambiente y la salud humana. Además, las sustancias químicas pueden estar presentes de manera simultánea en el medio ambiente, produciéndose exposiciones múltiples y a lo largo de la vida de la persona que pueden provocar efectos perjudiciales para la salud a corto y a largo plazo (EC, 2012).

A pesar de estas complicaciones, en la Unión Europea y en países tecnológicamente avanzados, como USA, Japón y Corea del Sur, se han implementado diferentes instrumentos legislativos que obligan a evaluar el riesgo que representan para la salud humana y la integridad del medio ambiente los compuestos químicos, fundamentalmente aquellos relacionados con las actividades industriales. Las distintas normativas de seguridad y evaluación de

riesgo están orientadas según el tipo o uso de los compuestos químicos. Así, la mayoría de productos químicos industriales están regulados por la normativa de la Unión Europea sobre productos químicos y su uso seguro, comúnmente conocida como REACH y que, por su especial relevancia para esta Tesis Doctoral, será comentada con más detalle en un apartado posterior. Por otra parte, se han establecido regulaciones específicas para los productos fitosanitarios, biocidas, productos medicinales para uso humano o veterinario, cosméticos y aditivos para piensos (Scholz et al., 2013).

La Toxicología Reguladora es la disciplina que proporciona la base científica a tales normativas legales. En Europa, la mayoría de la normativa toxicológica procede de las directrices de la Comisión Europea. El Comité Científico de Riesgos Sanitarios y Medioambientales, un comité científico asesor en materia de toxicología y ecotoxicología, integrado por un representante de cada país miembro estudia los problemas toxicológicos, consulta a especialistas en temas concretos y elabora informes que la Comisión Europea tendrá en cuenta al redactar sus directrices. Además, la UE creó en la Agencia Europea de Compuestos Químicos (ECHA), encargada de cumplimentar la Regulación REACH (Repetto y Repetto, 2009).

### **1.2.1 Normativas y Procedimientos para la Evaluación de Riesgo de Toxicidad**

Los programas de ensayos y directrices utilizados en los diferentes reglamentos europeos de toxicidad han sido impulsados por

actividades internacionales, destinadas a armonizar los ensayos y las regulaciones (Koëter, 2003). Desde hace muchos años, la OCDE proporciona directrices armonizadas como base para la aceptación internacional de los datos de toxicidad, evitando la duplicación de ensayos y reduciendo los costes de la valoración de riesgo. Más recientemente, la OMS, a través del Sistema de Armonización Global ha influido en la normativa europea y la experimentación con animales a través de la Directiva sobre Clasificación, Etiquetado y Envasado de Sustancias y Mezclas (Directiva CLP) (UE, 2009), estrechamente relacionada con la legislación REACH y con la regulación de los productos fitosanitarios y biocidas. En los diferentes reglamentos, todos los procedimientos de ensayo recomendados se refieren a las pertinentes directrices de la OCDE.

### **1.2.2 Normativa REACH**

A raíz de las nuevas políticas llevadas a cabo en la Unión Europea, se desarrolla el Reglamento (CE) nº 1907/2006, denominado REACH, un nuevo reglamento sobre Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas. Entró en vigor el 1 de junio de 2007, en sustitución del anterior marco legislativo para los productos químicos en la Unión Europea.

La normativa REACH traslada la responsabilidad de las autoridades públicas a la industria con respecto a la evaluación y gestión de los riesgos que plantean los productos químicos y el suministro de información de seguridad adecuado para sus usuarios. Afecta a una amplia gama de empresas de diversos sectores más allá de la

industria química. Se requiere de nuevas formas de cooperación entre las empresas, la mejora de la comunicación a lo largo de la cadena de suministro, así como el desarrollo de herramientas para orientar y ayudar a las empresas y las autoridades públicas en su aplicación (UE, 2006).

Los principales objetivos de REACH son garantizar un alto nivel de protección de la salud humana y el medio ambiente, incluyendo la promoción de métodos de ensayo alternativos, así como la libre circulación de sustancias en el mercado interior y la mejora de la competitividad y la innovación (Kinsner-Ovaskainen et al., 2009).

La implementación del registro, evaluación, autorización y restricción de los compuestos químicos dará lugar a la necesidad de una mayor evaluación de los 30.000 productos químicos existentes, que se comercializan en volúmenes superiores a 1 tonelada por año.

### **1.2.3 Sistema GHS**

Debido al gran volumen de compuestos químicos a evaluar, es necesario clasificarlos y etiquetarlos. Tanto la clasificación como el etiquetado sirven para identificar productos químicos peligrosos e informan a los usuarios acerca de sus riesgos a través de símbolos y frases estándar. Sin embargo, es necesaria una armonización a nivel global para garantizar la buena comprensión por parte de todo el mundo y así facilitar la libre circulación de estos compuestos (Eskes, 2013).

Tras una labor técnica intensiva para acordar los criterios armonizados, en el año 2002, las Naciones Unidas aprobaron el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos, (GHS), por el acrónimo de *Global Harmonized System* en inglés.

El sistema GHS proporciona las bases armonizadas globales en cuanto a la información en salud, seguridad y medio ambiente de las sustancias químicas y mezclas peligrosas. En él se establecen los criterios para la clasificación de las sustancias y mezclas químicas según sus propiedades físico-químicas, según los riesgos para la salud y los riesgos ambientales.

Proporciona la información estandarizada para facilitar el comercio mundial de estos productos químicos, mediante el etiquetado armonizado, es decir, la comunicación de los peligros potenciales mediante etiquetas y Fichas de Datos de Seguridad (FDS) de los productos y mezclas peligrosas, a los trabajadores y los consumidores.

En cuanto a la clasificación de los compuestos químicos referidos a la toxicidad aguda, tema del que trata la presente Tesis Doctoral, se clasifican en cinco categorías de toxicidad, basadas en la toxicidad aguda por ingestión, absorción cutánea o inhalación. Se establecen unos criterios numéricos expresados en rangos de valores umbral (Tabla 1).

Los valores de toxicidad aguda se expresan en valores (aproximados) de la LD50 en los casos de toxicidad por ingestión o

absorción cutánea, es decir, la dosis de una sustancia que resulta mortal para la mitad de un conjunto de animales de prueba. Se expresa en mg de sustancia tóxica por kg de peso del animal.

En el caso de la toxicidad por inhalación, se expresa en valores de LC50, es decir, la mitad de la muestra de población muere a causa de la exposición a través de la inhalación o la respiración. La medición LC50 se hace en microgramos o miligramos de material por litro, o partes por millón (ppm), de aire o agua (UNECE, 2013).

En caso de no conocer LD50 o LC50, los valores de toxicidad aguda se deducirán de la Estimación de la Toxicidad Aguda (ETA). Cuanto menor sea esa estimación numéricamente, mayor será la toxicidad para un compuesto, que formará parte de la categoría de mayor toxicidad (Categoría 1). Entre todas las categorías definidas de toxicidad aguda, la toxicidad que se va a tomar como referencia en la presente Tesis Doctoral es la toxicidad aguda por ingestión. La especie animal preferida para evaluar la toxicidad aguda por ingestión es la rata. Los datos obtenidos en ensayos destinados a clasificar los compuestos químicos, deben tener en cuenta el sistema armonizado, basado por tanto, en la LD50 de rata.

Vía de exposición	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4	Clase 5
<b>Oral</b> (mg/Kg. de peso corporal)	ETA ≤ 5	5 < ETA ≤ 50	50 < ETA ≤ 300	300 < ETA ≤ 2000	2000 < ETA ≤ 5000 (**)
<b>Cutánea</b> (mg/Kg. de peso corporal)	ETA ≤ 50	50 < ETA ≤ 200	200 < ETA ≤ 1000	1000 < ETA ≤ 2000	
<b>Inhalación de gases</b> (ppmV)*	ETA ≤ 100	100 < ETA ≤ 500	500 < ETA ≤ 2500	2500 < ETA ≤ 20000	
<b>Inhalación de vapores</b> (mg/L)	ETA ≤ 0,5	0,5 < ETA ≤ 2,0	2,0 < ETA ≤ 10,0	10,0 < ETA ≤ 20,0	
<b>Inhalación de polvos y nieblas</b> (mg/L)	ETA ≤ 0,05	0,05 < ETA ≤ 0,5	0,5 < ETA ≤ 1,0	1,0 < ETA ≤ 5,0	

(\*) La concentración de los gases se expresa en partes por millón en volumen (ppmV).

(\*\*) Se propone identificar las sustancias que presenten un peligro relativamente bajo de toxicidad aguda, pero que en determinadas circunstancias puedan suponer un peligro para poblaciones vulnerables. La DL<sub>50</sub> de esas sustancias se sitúa en el rango de 2000-5000 mg/Kg de peso corporal y en dosis equivalentes para la inhalación.

**Tabla 1:** Categorías de peligro de toxicidad aguda y estimaciones de la toxicidad aguda (ETA) que las definen, según la GHS (UNECE, 2013).

#### **1.2.4 Reglamento CLP**

El sistema GHS no es una legislación en vigor; es un acuerdo internacional vinculante y se actualiza periódicamente. Tiene que ser implementado por las regiones y países en sus legislaciones locales. En la Unión Europea, la Comisión Europea ha preparado la implementación del GHS y desarrollado el Reglamento CLP. Estas siglas corresponden al Reglamento (CE) N° 1272/2008 sobre Clasificación, Etiquetado y Envasado de Sustancias y Mezclas, que entró en vigor el 20 de enero de 2009, en sustitución del antiguo reglamento REACH.

Las disposiciones del Reglamento CLP sustituirán de una manera gradual a la anterior normativa sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias. Se han establecido ciertos plazos para que la industria clasifique y etiquete las sustancias y mezclas conforme al CLP. La fecha límite para la clasificación de sustancias de acuerdo con la nueva normativa fue el 1 de diciembre de 2010. En el caso de las mezclas o preparados, la fecha límite fue el pasado 1 de junio de 2015. Desde esta fecha en adelante, la CLP es la única legislación válida para la clasificación y etiquetado de sustancias y mezclas (UE, 2008).

Siguiendo la misma línea que el sistema GHS, la normativa CLP permite la identificación de los productos químicos peligrosos y la comunicación de estos peligros a los usuarios a través del etiquetado. También proporciona la base para las fichas de datos de seguridad (FDS) reguladas en virtud del Reglamento REACH, y establece los

requisitos para el envasado de productos químicos peligrosos (ECHA, 2015).

En cuanto a la clasificación de los compuestos químicos referidos a la toxicidad aguda, según el reglamento CLP (Tabla 2), se dividen en 4 categorías según los valores que presenten de Estimación de la Toxicidad Aguda (ETA) que se calcula o estima a partir de la LD50 oral, la LD50 cutánea, o la LC50 por inhalación en el caso de gases, vapores y polvos o nieblas.

Numéricamente, los rangos de la estimación de la toxicidad aguda para cada categoría, coinciden con los establecidos por el sistema GHS, pero en este caso, se ha suprimido la categoría 5 de menor toxicidad para todas las vías de exposición.

Tanto la LD50 oral como la cutánea, se expresan en mg de sustancia tóxica por kg de peso del animal, para poder ser extrapoladas a los humanos. Por su parte, la LC50 por inhalación se expresa en microgramos o miligramos de material por litro, o partes por millón (ppm), de aire o agua (UE, 2008).

De igual manera que en el caso de la clasificación GHS, al clasificar los compuestos según el reglamento CLP en el presente trabajo, se sigue empleando como referencia la toxicidad aguda por ingestión, basada en la LD50 de rata.

Vía de exposición	Categoría 1	Categoría 2	Categoría 3	Categoría 4
<b>Oral</b> (mg/Kg. de peso corporal)	ETA ≤ 5	5 < ETA ≤ 50	50 < ETA ≤ 300	300 < ETA ≤ 2000
<b>Cutánea</b> (mg/Kg. de peso corporal)	ETA ≤ 50	50 < ETA ≤ 200	200 < ETA ≤ 1000	1000 < ETA ≤ 2000
<b>Inhalación de gases</b> (ppmV)*	ETA ≤ 100	100 < ETA ≤ 500	500 < ETA ≤ 2500	2500 < ETA ≤ 20000
<b>Inhalación de vapores</b> (mg/L)	ETA ≤ 0,5	0,5 < ETA ≤ 2,0	2,0 < ETA ≤ 10,0	10,0 < ETA ≤ 20,0
<b>Inhalación de polvos y nieblas</b> (mg/L)	ETA ≤ 0,05	0,05 < ETA ≤ 0,5	0,5 < ETA ≤ 1,0	1,0 < ETA ≤ 5,0

(\*) La concentración de los gases se expresa en partes por millón en volumen (ppmV).

**Tabla 2:** Categorías de peligro de toxicidad aguda y estimaciones de la toxicidad aguda (ETA) que las definen, según la normativa CLP (UE, 2008).

Además de clasificar los compuestos químicos según su grado de toxicidad, el reglamento CLP ha aportado una nueva normativa en lo referente al etiquetado de los productos, introduciendo una nueva simbología basada en nuevos pictogramas (Figuras 1, 2 y 3).

Éstos se caracterizan por un fondo blanco con un borde rojo, mientras que en los antiguos símbolos de la antigua normativa de la UE el fondo era naranja y el borde negro. Además, el CLP incorpora palabras de advertencia para alertar del peligro potencial. A cada grupo de compuestos químicos se le ha asignado un pictograma asociado a una palabra de advertencia, dependiendo de su grado de toxicidad (INSHT, 2011).

También ha incluido cambios tanto en la codificación de las indicaciones de peligro como en los consejos de prudencia. Por indicación de peligro se entiende una frase que, asignada a una clase o categoría de peligro, describe la naturaleza del peligro que presenta un producto y, cuando corresponde, el grado de peligro.

Respecto a la codificación de las indicaciones de peligro, se asigna una clave alfanumérica que consiste en una letra y tres números. Reciben el nombre de “frases H” y son equivalentes a las antiguas “frases R”.

La letra H (del inglés “Hazard statement”), acompañada de un número que designa el tipo de peligro: “2” en el caso de los peligros físicos, “3” en el caso de los peligros para la salud y “4” en el caso de los peligros para el medio ambiente. Finalmente, presentan dos

números que corresponden a la numeración consecutiva de los peligros según las propiedades intrínsecas de la sustancia o mezcla.

Un consejo de prudencia es una frase, y/o un pictograma, que describe las medidas recomendadas para minimizar o prevenir los efectos adversos causados por la exposición a un producto peligroso, o debidos al almacenamiento o manipulación inapropiados de un producto peligroso. Hay cinco tipos de consejos de prudencia: de carácter general y los relativos a la prevención, la intervención (en caso de vertido o exposición accidentales, las intervenciones de emergencia y primeros auxilios), el almacenamiento y la eliminación.

Respecto a la codificación de los consejos de prudencia, se le asigna un código alfanumérico que consta de una letra y tres números. Reciben el nombre de “frases P” y reemplazan a las antiguas “frases S”.

La letra P (del inglés “Precautionary statement”), seguida de un número que designa un consejo de prudencia: “1” para los consejos de prudencia de carácter general, “2” para los consejos de prudencia relativos a la prevención, “3” para lo relativo a la intervención, “4” relacionado con el almacenamiento y “5” para los consejos relativos a la eliminación de los compuestos o mezclas peligrosas. Por último, acompañan dos números que corresponden a la numeración consecutiva de los consejos de prudencia (UNECE, 2008).

**Símbolo**  
Calavera y tibias cruzadas



Categoría de peligro	Palabra de advertencia	Indicación de peligro
1	Peligro	H300 Mortal en caso de ingestión
2	Peligro	H300 Mortal en caso de ingestión

Consejos de prudencia			
Prevención	Intervención	Almacenamiento	Eliminación
<p>P264 <b>Lavarse... cuidadosamente después de la manipulación.</b> ... partes del cuerpo que hayan de lavarse después de la manipulación, especificadas por el fabricante/proveedor o la autoridad competente.</p> <p>P270 <b>No comer, beber o fumar mientras se manipula este producto.</b></p>	<p>P301 + P310 <b>EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.</b></p> <p>P321 <b>Tratamiento específico (véase ... en esta etiqueta)</b> ... referencia a instrucciones adicionales de primeros auxilios <i>- si se requiere la administración inmediata de un antídoto.</i></p> <p>P330 <b>Enjuagarse la boca.</b></p>	<p>P405 <b>Guardar bajo llave.</b></p>	<p>P501 <b>Eliminar el contenido/recipiente... conforme a la reglamentación local/regional/nacional/internacional (especificúese).</b></p>

**Figura 1:** Cuadro donde se dan los consejos de prudencia recomendados para la toxicidad aguda por ingestión, clasificados por tipos, que corresponden a las categorías de peligro 1 y 2. En la parte superior se indican los códigos correspondientes en cuanto a indicaciones de peligro, palabra de advertencia y simbología asociada (UNECE, 2008).

**Símbolo**  
Calavera y tibias cruzadas

**Categoría de peligro**      **Palabra de advertencia**      **Indicación de peligro**  
3                                      Peligro                                      H301      Tóxico en caso de ingestión



Consejos de prudencia			
Prevención	Intervención	Almacenamiento	Eliminación
<p>P264 <b>Lavarse... cuidadosamente después de la manipulación.</b> ... partes del cuerpo que hayan de lavarse después de la manipulación, especificadas por el fabricante/proveedor o la autoridad competente.</p> <p>P270 <b>No comer, beber o fumar mientras se manipula este producto.</b></p>	<p>P301 + P310 <b>EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico</b></p> <p>P321 <b>Tratamiento específico (véase ... en esta etiqueta)</b> ... referencia a instrucciones adicionales de primeros auxilios <i>- si se requiere la administración inmediata de un antídoto.</i></p> <p>P330 <b>Enjuagarse la boca.</b></p>	<p>P405 <b>Guardar bajo llave.</b></p>	<p>P501 <b>Eliminar el contenido/recipiente...</b> ...conforme a la reglamentación local/regional/nacional/internacional (especificítese).</p>

**Figura 2:** Cuadro donde se dan los consejos de prudencia recomendados para la toxicidad aguda por ingestión, clasificados por tipos, que corresponden a la categoría de peligro 3. En la parte superior se indican los códigos correspondientes en cuanto a indicaciones de peligro, palabra de advertencia y simbología asociada (UNECE, 2008).

**Símbolo**  
Signo de exclamación



**Categoría de peligro**      **Palabra de advertencia**      **Indicación de peligro**  
4                                      Atención                                      H302      Nocivo en caso de ingestión

Consejos de prudencia			
Prevención	Intervención	Almacenamiento	Eliminación
<p>P264 Lavarse... cuidadosamente después de la manipulación. ... partes del cuerpo que hayan de lavarse después de la manipulación, especificadas por el fabricante/proveedor o la autoridad competente.</p> <p>P270 No comer, beber o fumar mientras se manipula este producto.</p>	<p>P301 + P312 EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico si la persona se encuentra mal.</p> <p>P330 Enjuagarse la boca</p>		<p>P501 Eliminar el contenido/recipiente... ... conforme a la reglamentación local/regional/nacional/internacional (especificuese)</p>

**Símbolo**  
*Sin símbolo*

**Categoría de peligro**      **Palabra de advertencia**      **Indicación de peligro**  
5                                      Atención                                      H303      Puede ser nocivo en caso de ingestión

Consejos de prudencia			
Prevención	Intervención	Almacenamiento	Eliminación
	<p>P312 Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico si la persona se encuentra mal</p>		

**Figura 3:** Cuadro donde se dan los consejos de prudencia recomendados para la toxicidad aguda por ingestión, clasificados por tipos, que corresponden a las categorías de peligro 4 y 5. En la parte superior se indican los códigos correspondientes en cuanto a indicaciones de peligro, palabra de advertencia y simbología asociada (UNECE, 2008).

### **1.3 Uso de Animales de Laboratorio en la Evaluación Normativa de Toxicidad**

En Europa y en los países industrializados, la incorporación de una nueva sustancia producto químico al mercado requiere en la mayoría de los casos que tanto el compuesto activo como el producto comercial final se demuestren seguros para el medio ambiente. Por ello, se debe incluir en el expediente de información presentada al organismo regulador competente una Evaluación del Riesgo Ambiental (ERA). Los ensayos de toxicidad son una parte importante en el proceso de evaluación de los peligros, la seguridad y el riesgo que estos productos químicos y otras sustancias representan para los seres humanos, animales y el medio ambiente.

Los primeros ensayos de toxicidad se desarrollaron en la primera mitad del siglo XX. Estos incluían la prueba LD50 para el estudio de la toxicidad aguda sistémica y la prueba de Draize de irritación ocular aguda. Estos procedimientos empleaban animales vertebrados, roedores o conejos principalmente, como sujetos de prueba.

A medida que avanzaron los años y la ciencia de la Toxicología se desarrolló, los ensayos de toxicidad con animales siguieron realizándose, empleando sobre todo roedores como modelos de ensayo, debido a la posibilidad de criarlos para la ciencia incrementando su número fácilmente, además de la baja estima que estos animales tenían en la sociedad (Stephens et al., 2013). Sin embargo, aunque las normas específicas de los distintos tipos de sustancias muchas veces requieren el ensayo en estos animales, las

regulaciones que se ocupan de la distribución de una sustancia química en diferentes compartimentos ambientales, como el suelo o las aguas superficiales, y las diferentes vías de exposición resultantes, pueden requerir el uso de otros tipos de animales. Así, los ensayos con peces son necesarios para evaluar la toxicidad acuática a corto y largo plazo y para evaluar la bioacumulación en peces. Para el medio ambiente terrestre, se requiere el ensayo de toxicidad reproductiva en aves para la evaluación de la toxicidad a corto y largo plazo de los productos fitosanitarios, así como en la normativa REACH aplicada a compuestos de alto tonelaje (> 1.000 t / año).

Aunque no existen estadísticas definitivas sobre el número de animales utilizados en estudios de evaluación de toxicidad química o ambiental, la UE informa periódicamente sobre el número de animales utilizados para fines científicos experimentales y de otro tipo en sus estados miembros. En informe del año 2010, se registraron cerca de 12 millones de animales vertebrados. De este total, casi dos millones eran peces, anfibios o aves, que son los vertebrados generalmente utilizados en la evaluación de riesgo ambiental. En ese año, alrededor de 250.000 peces y aves se utilizaron para estudios toxicológicos y otros procesos de evaluación de seguridad, con 140.000 animales utilizados para procedimientos de toxicología reguladora. Sin embargo, el número real de vertebrados utilizado para la evaluación del riesgo ambiental podría ser mayor, ya que los animales en las pruebas en otras áreas, como la investigación, el desarrollo de productos básicos pueden estar relacionados con investigaciones toxicológicas. Además, es difícil

calcular con precisión el número de animales utilizados en el contexto de diversas regulaciones para la evaluación del riesgo ambiental, ya que la UE no da a conocer el número de peces, anfibios y aves que se utilizan para ensayos de toxicidad aguda en cada reglamento específico.

## **1.4 Métodos Alternativos al Uso de Animales de Laboratorio**

### **1.4.1 El principio de las 3 R.**

A mediados del siglo XX, como consecuencia de los avances en las técnicas empleadas y de los mayores conocimientos respecto a la experimentación animal, la sociedad empezó a preocuparse por el bienestar de los animales en la investigación. En 1959, William Russell y Rex Burch, publicaron “The Principles of Humane Experimental Technique”, libro en el que se plantea por primera vez el concepto conocido como “Principio de las 3 Rs”.

Las tres Rs se refieren a Reemplazar los animales de experimentación por otros métodos que no impliquen su uso, asegurándose de que se utilizan sólo cuando está justificado científicamente. Reducir su número cuando sea necesario utilizarlos a la menor cantidad necesaria para obtener resultados científicamente válidos, y Refinar las técnicas para reducir o evitar el dolor y el sufrimiento, y mejorar el bienestar de los animales (Stokes, 2015).

Estos nuevos conceptos han dado lugar a leyes y políticas cuyo objetivo es llevar a cabo dichos principios. Durante los últimos 20 años, se han llevado a cabo grandes esfuerzos con el objetivo de

desarrollar métodos alternativos a la experimentación animal, validar y aplicar la reducción, el refinamiento y el reemplazo de los animales.

#### **1.4.2 Desarrollo de Métodos Alternativos**

En la actualidad, dos importantes y urgentes procesos biotecnológicos exigen métodos alternativos al animal de laboratorio para la detección y/o predicción de toxicidad humana: el descubrimiento de fármacos a partir de números ingentes de moléculas candidatas y la evaluación normativa del riesgo de toxicidad de miles de compuestos manejados en la Comunidad Europea (Tárnok, 2010).

El desarrollo de un nuevo fármaco, desde la identificación de la molécula diana hasta su autorización para la comercialización, es un proceso largo, laborioso y costoso. Las compañías farmacéuticas y biotecnológicas tratan de desarrollar nuevos fármacos que tengan altas probabilidades de llegar al mercado, invirtiendo gran cantidad de años y dinero.

Después del descubrimiento de los compuestos y del desarrollo preclínico, los fármacos ingresan en tres fases de ensayos clínicos, antes de que puedan ser sometidos a la aprobación por parte de las autoridades. Ahora bien, los modelos llevados a cabo, carecen de una fuerte correlación con la realidad clínica, lo que conduce a un porcentaje de éxito muy por debajo de lo esperado, de aproximadamente un 10%, lo que conlleva un aumento de los costes (Van Osta et al., 2006).

Una de las razones es la complejidad de la normativa a seguir para garantizar la calidad, seguridad y la eficacia de los fármacos. En vista de las condiciones dadas para el desarrollo de fármacos, urge desarrollar nuevos enfoques que permitan procedimientos más seguros y eficientes en las diferentes fases del desarrollo de fármacos (Ukelis et al., 2008).

Aunque el desarrollo de métodos in vitro de evaluación de toxicidad es una prioridad, son muy pocos los métodos alternativos que han sido oficialmente validados como métodos normativos de referencia por el URL-ECVAM, (Worth y Balls, 2002) o su homólogo americano, el ICCVAM (Hendriksen, Cussler, y Halder, 2002). Sin embargo, en los últimos cincuenta años se ha generado un amplio repertorio de técnicas sencillas, con aceptable capacidad de detección de efectos in vitro y de predicción de toxicidad aguda in vivo.

A lo largo de estos años se han desarrollado métodos alternativos que permitían el ensayo de la toxicidad sin elevar los costes del producto final, ya que la experimentación animal suponía un elevado coste, tanto a nivel de vidas animales como económico, debido al número tan elevado de animales que se requerirían. Mientras que algunas pruebas con animales para la toxicidad tópica se han sustituido con éxito por métodos alternativos, las toxicidades sistémicas requieren nuevas estrategias de prueba con el fin de lograr un nivel de seguridad adecuado.

Entre los métodos alternativos propuestos, se han desarrollado tres métodos que reducen el consumo de animales y el sufrimiento de los mismos: el método de la dosis fija, el de la clase tóxica aguda y el método arriba y abajo (Botham, 2002).

Los tres métodos citados, todos ellos in vivo, presentan un diseño secuencial, son sistemas en los que se elige una dosis inicial de acuerdo con la toxicidad teórica o prevista de la sustancia estudiada, y se ensaya una sola dosis cada vez; los resultados orientan al investigador sobre la dosis que debe emplear en la siguiente etapa (Rispin et al., 2002).

La toxicidad aguda de una sustancia química se refiere a los efectos adversos que se manifiestan tras la administración por vía oral o cutánea de una sola dosis de dicha sustancia, de dosis múltiples administradas a lo largo de 24 horas, o como consecuencia de una exposición por inhalación durante 4 horas.

Sin embargo, el término toxicidad oral aguda está estrechamente relacionado con las determinaciones de letalidad y LD50. Si la incidencia de letalidad dependiente de la dosis está determinada de forma precisa, se expresará como LD50.

El valor de la LD50, definida como la dosis que cuando se administra en un ensayo de toxicidad aguda, se espera que cause la muerte del 50% de los animales tratados en un periodo de tiempo determinado, es actualmente la base para la clasificación toxicológica de los productos químicos. Para los estudios de la LD50 clásicos, las

especies habitualmente seleccionadas son los ratones y las ratas (UNECE, 2013).

La toxicidad aguda sistémica puede ser consecuencia de la toxicidad a nivel celular, es decir, citotoxicidad, producida por la interacción de los tóxicos con estructuras que pueden desempeñar un papel clave en la función, proliferación y supervivencia de las células.

Los estudios de toxicidad aguda sistémica pretenden determinar los efectos adversos dependientes de la dosis que podrían ocurrir, lo que serviría para recopilar gran cantidad de información sobre los perfiles de toxicidad, sobre la actividad biológica y una perspectiva del mecanismo de acción de los productos químicos (Andrew, 2013).

La información sobre la toxicidad sistémica aguda generada se utiliza en la identificación de los peligros y para la gestión de riesgos en el contexto de la producción, manipulación y uso de estos compuestos químicos (Wallum, 1998).

#### **1.4.3 Los Métodos Alternativos en Europa: El EURL-ECVAM**

La participación de la Comisión Europea en el desarrollo de actividades dedicadas a la validación de métodos alternativos a los ensayos en animales se inició en 1991 con la creación del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM), ubicado en el Instituto de Sanidad y Protección al Consumidor (IHCP) en Ispra, Italia. En 2011 se estableció como Laboratorio de Referencia de la Unión Europea, pasando a denominarse EURL ECVAM.

El EURL ECVAM se encarga de promover el desarrollo, difundir y validar los métodos alternativos aportados por los laboratorios de investigación que impliquen los conceptos del “Principio de las 3R”, además de la aplicación de estos métodos a la industria y su aceptación por las entidades reguladoras.

La validación viene definida como el proceso por el cual se establecen la fiabilidad y la aplicabilidad de un método, proceso o evaluación para un objetivo determinado (OCDE, 2005). Dado que se lleva a cabo bajo unas condiciones estandarizadas y controladas, en general, se aceptan para facilitar y/o acelerar la aprobación por parte de las autoridades internacionales.

En 1995, el EURL ECVAM publicó una serie de recomendaciones relativas a los aspectos prácticos y logísticos de la validación. Posteriormente, en 2004, el ECVAM propuso un enfoque modular para la validación de métodos alternativos, donde el proceso de validación se divide en siete módulos independientes (Hartung et al., 2004).

Después de llevar a cabo los estudios de validación que demuestran la utilidad y la aplicabilidad de un método de ensayo propuesto, se puede considerar para su aceptación oficial por las autoridades reguladoras, que indican que dicho método puede utilizarse para proporcionar información que cumpla con un requisito reglamentario específico.

Los métodos normativos y de validación se proponen dependiendo de la temática que abarquen, toxicocinética, toxicidad tóxica, medioambiental, biológica y el campo de la presente Tesis Doctoral, la toxicidad sistémica.

Los métodos de ensayo alternativos desarrollados de cara a reducir o reemplazar la experimentación animal están basados principalmente en sistemas in vitro o modelos computacionales. Entre ellos se encuentran los ensayos validados por el ECVAM en el campo de la toxicidad aguda.

El ensayo citotóxico in vitro de captación de Rojo Neutro ensayado en fibroblastos de ratón (3T3) y queratinocitos humanos (NHK) es uno de los primeros ensayos validados por el NICEATM/ECVAM para estimar las dosis iniciales y los valores de LD50 in vivo en la toxicidad sistémica aguda. Se ensayaron un total de 72 compuestos de referencia. La conclusión final que se obtuvo fue que el ensayo podía ser útil para predecir dicha toxicidad, sin embargo, la clasificación de los compuestos de acuerdo con la clasificación por categorías de la GHS daba lugar a bajas correlaciones.

Otro de los ensayos alternativos al uso de la experimentación animal validados por el NICEATM/ECVAM es el ensayo de captación de Rojo Neutro en 3T3, especialmente dirigido a aquellos compuestos que tienen una toxicidad aguda oral con una LD50 > 2000 mg/kg, y por tanto se consideran como “negativos” debido a su baja toxicidad. Según la nueva normativa europea para la clasificación, el

etiquetado y el envasado de la Unión Europea (CLP), estos compuestos no requieren clasificación según su toxicidad aguda oral y pasan a ser considerados como no clasificados.

Además de los métodos validados por el NICEATM/ECVAM, también existen otras estrategias de desarrollo y de optimización de métodos alternativos a nivel de la Unión Europea, como es el proyecto ACuteTox, que constituye el primer intento de crear una estrategia de ensayos integrada basada en métodos in vitro y proporciona el punto de partida de esta Tesis Doctoral.

## **1.5 Los Ensayos Celulares como Métodos Alternativos al Animal de Laboratorio**

### **1.5.1 Concepto de Citotoxicidad Basal**

Según la clásica división de Ekwall (1983), se distinguen tres tipos de citotoxicidad:

- **Citotoxicidad basal:** afecta a una o varias estructuras y procesos celulares clave. Además, todos los tipos celulares estudiados muestran una susceptibilidad similar.

- **Citotoxicidad órgano-específica:** se produce cuando algunos tipos de células diferenciadas son más sensibles a los efectos de un tóxico determinado que otras, debido a los mecanismos dependientes de su captación, de su unión a receptores específicos o como consecuencia de su transformación.

- **Citotoxicidad extracelular:** sucede cuando un producto químico altera las funciones extracelulares, o afecta a la secreción de sustancias desde las células.

De acuerdo con el concepto de citotoxicidad basal, los productos químicos más tóxicos ejercen su acción fundamental por la interferencia con las funciones celulares básicas. Estas funciones son esenciales para todas las células, independientemente de si están en condiciones in vivo o in vitro. Por tanto, una gran cantidad de compuestos químicos podrán ser ensayados por sus efectos tóxicos agudos en los sistemas de cultivo celular (Wallum, 1998).

Como consecuencia, surge la necesidad de establecer estudios in vitro que permitan el estudio de la toxicidad aguda de los productos químicos existentes. Una posible forma de economizar tiempo y costes en el desarrollo de nuevos fármacos, principales objetivos de la industria farmacéutica, es la introducción de métodos in vitro en el desarrollo no clínico (Smith et al., 2007). Tales métodos alternativos contribuyen a la eliminación gradual de los ensayos en animales vertebrados en estudios dirigidos a proteger la salud humana en materia de medicamentos, productos cosméticos o químicos.

Los estudios de citotoxicidad in vitro son ensayos bien estructurados que pretenden evaluar la potencialidad citotóxica de fármacos y sustancias de uso humano, animal o medioambiental. También posibilitan conocer con detalle los mecanismos moleculares de la toxicidad celular y determinar las principales sustancias que han

demostrado alguna capacidad citotóxica, detectando los tipos celulares más sensibles.

Sin embargo, pueden existir inconvenientes al emplear métodos in vitro, ya que pueden acumularse metabolitos que den lugar a efectos que en condiciones in vivo no ocurren. Además, en el sistema de cultivo celular faltan las funciones toxico-cinéticas que ocurren en los organismos enteros. Todo ello puede provocar una falta de correlación entre ambas condiciones, que puede ser explicada por la citotoxicidad basal.

Por tanto, para lograr una aceptación por parte de los organismos reguladores, se deben poner a punto los métodos citotóxicos in vitro para que proporcionen información sobre todos aquellos factores que puedan influir en la expresión de la toxicidad in vivo, con el objetivo de que puedan ser validados frente a los métodos in vivo, todo ello de cara a evitar riesgos para los pacientes y el medio ambiente (Andrew, 2013).

### **1.5.2 Estudios Multicéntricos de Citotoxicidad Basal**

A mediados de los años 1980, Björn Ekwall inició el Proyecto Internacional Multicéntrico de Evaluación de la Citotoxicidad in Vitro (MEIC), para evaluar la utilidad de las pruebas in vitro en la estimación de la toxicidad sistémica aguda humana (Walum, Tähti, & Kolman, 2011).

El programa MEIC fue un estudio de 7 años coordinado por la Scandinavian Society for Cell Toxicology (SSCT), en el que

participaron de forma voluntaria 59 laboratorios de todo el mundo para testar 50 productos químicos de referencia seleccionados por el Centro de Información de Envenenamiento de Suecia, de acuerdo con sus protocolos internos (Walum, Tähti, & Kolman, 2011). Cada sustancia química fue respaldada por los datos relevantes de toxicidad y cinética humana (Monografía MEIC [MEMO]) para permitir la determinación de la concentración sanguínea letal (LC50) y su comparación con los datos in vitro.

La principal conclusión del estudio del MEIC fue que ciertas pruebas de citotoxicidad basal en humanos se correlacionan con los valores de la LC50 calculados a partir de los pacientes con sobredosis intencionales o accidentales de drogas y químicos. Por otra parte, la predicción aumentó considerablemente cuando se utilizaron datos toxicocinéticos (paso a través de la barrera hematoencefálica) para corregir los valores in vitro. Se reconoció además que existen otros mecanismos toxicológicos importantes que sólo puede ser medidos utilizando ensayos in vitro suplementarios (Gennari et al., 2004; Walum, 2014).

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

artículos en ATLA (Clemedson et al., 1998a; Clemedson et al., 1998b; Clemedson et al., 1996a; Clemedson et al., 1996b; Clemedson et al., 2000; Ekwall et al., 1998a; Ekwall et al., 1998b; Ekwall et al., 2000).

A pesar de que en la base de datos del URL-ECVAM se recogen alrededor de 20 ensayos de citotoxicidad basal, su aplicación en los anteriores estudios de correlación no ha logrado predecir la toxicidad humana en cerca del 30% de los casos (Gennari et al., 2004) y puede precisar de algoritmos correctores que tienen en cuenta la influencia de factores biocinéticos y metabólicos entre otros.

Los compuestos para los que no se logra predecir su toxicidad in vivo utilizando ensayos in vitro se denominan “outliers” (Kooijman, Devos, & Hooghe-Peters, 2010) y se identifican como tales cuando los valores de IC50 determinados presentan una diferencia de al menos una unidad de Logaritmo con respecto a los valores de LC50 estimados por Sjöström et al. (2008)

## **1.6 Toxicología Mecanística: La Toxicología del Siglo XXI**

### **1.6.1. La Toxicología del Siglo XXI**

En los últimos 20 años la nueva Toxicología se orienta sobre todo a la comprensión de los fenómenos en términos bioquímicos o moleculares y se denomina Toxicología Mecanística.

La Toxicología Mecanística busca la identificación de las interacciones moleculares que llevan desde la exposición inicial al tóxico hasta la última manifestación de alteración en el organismo. Pretende explicar a nivel molecular:

a) los procesos toxicocinéticos, por los que los xenobióticos penetran y se distribuyen en el organismo, se biotransforman y se excretan.

b) los procesos toxicodinámicos, por los que los xenobióticos o sus metabolitos ejercen sus efectos a través de interacciones moleculares.

c) las respuestas de las células y el organismo a los tóxicos, que pueden ser adaptativas, de tolerancia o de reparación o bien de sucumbir al daño.

Cada vez cobra una mayor importancia el concepto de ruta de toxicidad, es decir, entender las rutas implicadas en los mecanismos de acción de los tóxicos para poder evaluar los posibles peligros, trasladándolos a los procesos de evaluación definidos, empleando para ello métodos computacionales e in vitro.

Las rutas de toxicidad se definen como los mecanismos de respuesta celular que se desencadenan tras sufrir una alteración por parte de los tóxicos y los efectos adversos que conllevan para la salud. De esta definición se deducen tres propiedades clave. Primero, la biología fundamental de las rutas de toxicidad reside en los dominios celulares y moleculares. Segundo, describe unas condiciones particulares provocadas por el tóxico, que dan lugar al fallo de las funciones celulares. Por último, estas condiciones generadas y los cambios producidos a nivel celular desencadenan efectos adversos para el organismo bajo ciertas condiciones.

### **1.6.2 Toxicología de Sistemas**

La toxicología de sistemas (systems toxicology) consiste en un estudio integrado o multidimensional de la respuesta de los organismos frente a los tóxicos, aplicando tanto los métodos tradicionales como los modernos, es decir, la observación clínica, el análisis químico toxicológico, la toxicocinética, los análisis bioquímicos y biomarcadores (de exposición, de efecto y de susceptibilidad), los estudios histológicos, el análisis molecular de expresión de genes, toxicogenómica (transcriptómica), toxicoproteómica y metabonómica, etc. que puedan dilucidar nuevas vías y redes mecanísticas.

Es decir, mientras la toxicología tradicional y reciente utilizaba argumentos racionales, tratando, por ejemplo, de identificar el gen implicado en las patologías relacionadas con cierto producto, los nuevos planteamientos operan de forma más empírica, buscando los niveles de expresión de miles de genes, algunos de los cuales pudieran estar implicados aunque otros no lo estén y obtener la mayor información posible de carácter toxicodinámico (Boelsterli, 2007). En definitiva, la Toxicología de nuestros días es fundamentalmente mecanística apoyada en los avances de la Biología Molecular.

### **1.6.3 El Proyecto Europeo A-Cute-Tox**

Ante el nuevo panorama establecido de cambios, surge en el año 2005, dentro del sexto Programa Marco de la Unión Europea, un ambicioso proyecto llamado A-Cute-Tox, el primer intento de crear

una estrategia de ensayo integrada basada únicamente en métodos in vitro e in silico.

El proyecto desarrolla los conceptos necesarios para componer estrategias de ensayo a través de la implementación continua de las nuevas alternativas in vitro e in silico. Un enfoque que requiere la integración de los grupos de investigación, las aportaciones de la comunidad reguladora y de la dirección empresarial. A cambio ofrece la oportunidad de lograr una reducción sustancial de los experimentos con animales para evaluar la toxicidad sistémica aguda (Clemenson, 2008).

El proyecto contaba con la participación de un total de 35 grupos de investigación, procedentes de 13 países europeos, divididos en 9 grupos de trabajo. Cada grupo de trabajo se encontraba dirigido a la realización de las diferentes tareas: recopilación de datos bibliográficos, realización de la base de datos Acutoxbase con los datos obtenidos en el proyecto, optimización y prevalidación de la estrategia de ensayo (Kinsner-Ovaskainen et al., 2008).

El objetivo principal era desarrollar una estrategia in vitro simple y robusta para la predicción de la toxicidad sistémica aguda humana, lo que podría sustituir a los ensayos de toxicidad aguda en animales utilizados hasta la fecha.

Los objetivos metodológicos principales del proyecto A-Cute-Tox eran generar, recopilar y evaluar los datos de alta calidad in vitro e in vivo sobre un conjunto de productos químicos de referencia para realizar análisis comparativos e identificar los factores que influyen

en la correlación entre la toxicidad in vitro e in vivo, teniendo en cuenta la biocinética, el metabolismo y la toxicidad orgánica.

Por otra parte, se pretendía aplicar herramientas innovadoras como por ejemplo la citómica, técnica empleada en este trabajo y desarrollar nuevos sistemas celulares. El último objetivo era diseñar una estrategia de ensayo in vitro simple, robusto y fiable, con posibilidad de ser automatizado y asociada a los modelos predictivos de toxicidad aguda.

Por ello, el desarrollo de métodos in vitro de análisis de citotoxicidad es una prioridad y ha conducido a la disponibilidad de técnicas relativamente sencillas con aceptable capacidad de detección de efectos in vitro y de predicción de toxicidad aguda in vivo (Clemedson et al., 2007).

Se escogieron los compuestos químicos para el estudio de pre-validación del método, la mayoría de ellos tenían uso industrial pero también cosmético o farmacéutico. Inicialmente se seleccionaron un total de 100 productos químicos de prueba, pero finalmente se seleccionaron 97 compuestos.

El criterio principal para la selección era la disponibilidad de datos en animales y en humanos, aunque había otros criterios de selección como la disponibilidad comercial, la presencia de compuestos clasificados en grupos según su utilidad o compuestos con efectos específicos conocidos en los distintos tejidos in vivo. Además la selección de los compuestos debe tener una representación adecuada en las categorías de toxicidad establecidas a través de la

normativa CLP siguiendo los criterios del GHS (Hoffmann et al., 2010; Prieto et al., 2013).

Para poder evaluar los datos obtenidos y poder comparar las correlaciones entre los métodos ensayados se empleó un método de referencia in vitro, que consiste en el test de captación de rojo neutro por parte de fibroblastos 3T3. Los modelos de simulación realizados, validaron el uso del ensayo 3T3 NRU para seleccionar la dosis de partida para los correspondientes estudios contribuyendo además a una reducción en el uso de animales (Prieto et al., 2013).

El test está basado en la captación por parte de las células del colorante rojo neutro, tras la exposición con diversas dosis de concentración creciente de la sustancia tóxica, se produce la liberación gradual del colorante debido a la pérdida de la integridad de la membrana celular. Esta prueba es una medida de la toxicidad de un compuesto a corto o largo plazo, determinado por la liberación de un colorante, el rojo neutro, debido a la pérdida de la viabilidad celular (Zuang, 2001).

Para la recopilación de los datos, se trabajó con la IC50 para cada compuesto químico, es decir, la concentración que produce la inhibición del 50% de la viabilidad celular, obtenida a través del ensayo de Captación de Rojo Neutro (Neutral Red Uptake, NRU) realizado en fibroblastos de ratón, la línea celular 3T3 (Sjöström et al., 2008).

Los resultados obtenidos demostraron que existía una correlación entre la toxicidad in vitro (concentración) e in vivo (dosis). Sin

embargo, los métodos in vitro de referencia, no predecían la toxicidad humana en cerca del 30% de los casos y se basaban en la detección de efectos muy generales o ambiguos para cuantificar la citotoxicidad de un fármaco o xenobiótico. Presentaban un número relativamente alto de compuestos que se encontraban mal clasificados o con baja correlación.

El proyecto A-Cute-Tox permitió identificar los factores que influían en estas correlaciones, teniendo en cuenta la biocinética, el metabolismo y la toxicidad de órganos (hígado, cerebro y riñones) (Hoffmann et al., 2010).

En el estudio, se emplearon células de riñón, hepatocitos y neuronas ya que presentan características específicas de los tejidos de los que provienen. En este caso, los hepatocitos y las neuronas presentan actividades enzimáticas citocromo y funciones de detoxificación, por su parte, las células renales presentan las funciones de unión de las células que actúan como barrera para el transporte de sustancias y para el mantenimiento del balance osmótico.

Se pretende que la detección de la toxicidad específica de tejido revele la verdadera toxicidad de los compuestos con valores atípicos en los ensayos de citotoxicidad basal (Clothier et al., 2008).

También se emplean como referencia los valores de LD50 de rata in vivo para los compuestos empleados en el estudio. El conjunto de datos recopilados son la base para la comparación entre especies a través del grado de correlación entre los datos in vitro e in vivo. Las

LD50 se han obtenido de diversas bases de datos y publicados en la bibliografía (Hoffmann et al., 2010).

Por último, para la evaluación de la capacidad predictiva de las pruebas in vitro para la intoxicación aguda en humanos, se utilizó los datos de humano como estándar. Los valores de LC50 se obtuvieron a partir de las concentraciones sanguíneas letales, determinados a partir de los casos de intoxicación aguda en humanos y publicados en la bibliografía (Sjöström et al., 2008).

Los estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, dentro del proyecto A-Cute-Tox, fueron realizados in vitro empleando líneas celulares humanas. Se llevaron a cabo un conjunto de ensayos citómicos para una serie de compuestos químicos. Los resultados concluyeron que con el método in vitro llevado a cabo se obtenían mejores correlaciones comparándolo con los datos in vivo de toxicidad humana que con los datos de toxicidad in vivo en rata (Tolosa et al., 2012; Clothier et al., 2013).

Además se obtuvieron una serie de compuestos químicos que no se clasificaban correctamente según la escala GHS, escala basada en los datos de LD50 de rata.

Hay que tener en cuenta que al tratarse de especies distintas, existen diferencias en los procesos cinéticos de absorción, metabolización, distribución o eliminación, originadas por factores fisiológicos en respuesta a la acción de xenobióticos.

Las diferencias que existen en cuanto al metabolismo y la biodisponibilidad oral, pues no existe correlación entre los humanos y las ratas (Musther et al. 2014), se pueden explicar debido al diferente grado de expresión de las enzimas encargadas de metabolizar los compuestos químicos.

Por ejemplo, las enzimas del citocromo P450 (CYP) catalizan la mayor parte de las reacciones de biotransformación de fármacos, además, son las que más frecuentemente se encuentran involucradas en el metabolismo de xenobióticos y compuestos endógenos, junto con las UDP (uridin difosfato) glucuronil transferasas. Dentro de las enzimas CYP, el número de isoenzimas encontradas en algunos animales como la rata, no coincide con el de los humanos, lo que explica las diferentes susceptibilidades a ciertos tóxicos (Komura et al., 2011).

El siguiente paso, objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral, consiste en calcular las correlaciones de los datos obtenidos in vitro frente a los datos in vivo publicados en la bibliografía, todos ellos obtenidos de la misma especie, la rata. Se pretende observar si la correlación mejora al tratarse de la misma especie o si, por el contrario, no presenta mejoría, lo que sería indicativo de un problema del método in vitro empleado.

Siguiendo la misma línea, se persigue buscar una mejor clasificación de los compuestos, especialmente de aquellos que debido a su mecanismo de acción o a su metabolización, no coinciden con los criterios establecidos por la escala GHS en base a la LD50 de

rata. En este caso, la especie es la misma, la rata y permitirá evaluar exclusivamente el método empleado, el método in vitro.

En este caso, se han empleado tres líneas celulares de rata: B50 (neuroblastoma), NRK-52E (epitelio renal) y N13 (hepatoma). El objetivo es poder comparar datos pertenecientes a una misma especie y eliminar así, posibles interferencias entre especies.

Se han utilizado un total de 57 compuestos químicos, seleccionados de la lista elaborada en el proyecto A-Cute-Tox. Todos ellos cumplen los requisitos establecidos por el proyecto (Hoffmann et al., 2010): fácil disponibilidad por parte de las casas comerciales, todos los compuestos presentan datos bibliográficos in vivo de rata y una gran parte de los compuestos presentan datos en humanos. Químicamente se encuentran tanto compuestos orgánicos como inorgánicos. Dentro de los compuestos orgánicos se encuentran representados los ácidos carboxílicos, los compuestos heterocíclicos y alcoholes.

Todos los compuestos han sido ampliamente utilizados en la industria química y farmacéutica hasta la fecha, según su uso, los tóxicos pertenecen a diversas categorías como pesticidas, herbicidas, disolventes o fármacos comúnmente utilizados, entre otros usos.

Pueden presentar una toxicidad órgano específica, dependiendo de la línea celular empleada y se encuentran distribuidos homogéneamente según las cinco categorías de toxicidad establecidas por la GHS, basada en los valores de LD50 de rata.

Además se han realizado una serie de ensayos citómicos in vitro que pretenden obtener información adicional sobre la citotoxicidad específica de cada tejido, gracias a las propiedades que presenta la técnica empleada, la citometría de flujo, una técnica multiparamétrica, rápida y sencilla.

#### **1.6.4 El Proyecto Europeo EU ToxRisk**

Siguiendo la estela del proyecto ACuteTox, nace un nuevo proyecto europeo que busca convertirse en líder en evaluación del riesgo y la toxicidad de la exposición a fármacos y productos químicos: El proyecto EU ToxRisk. El proyecto viene financiado por la Comisión Europea a través del Programa Horizonte 2020 con un presupuesto de cerca de 30 millones de euros, para el abordaje integral e innovador de la toxicidad y seguridad de medicamentos y productos químicos, a través de métodos más eficientes y sin animales.

Formado por un consorcio internacional compuesto por 39 organizaciones que incluyen Universidades, Centros de Investigación, pequeñas y medianas empresas, grandes industrias y administración, todos ellos trabajarán en la integración de nuevos conceptos para la evaluación de la seguridad química y su regulación legislativa. Todo ello manteniendo el objetivo de desarrollar métodos in vitro sin animales y tecnologías computacionales in silico, para trasladar conocimiento obtenido sobre los mecanismos moleculares de la toxicidad a estrategias de ensayos de seguridad.

El proyecto EU-ToxRisk, coordinado por Bob van de Water, catedrático de Toxicología en la Universidad de Leiden (Holanda), integrará avances en biología celular, en las tecnologías ómicas, biología de sistemas y modelización computacional, con el objetivo de definir las complejas interacciones entre la exposición química y los efectos tóxicos que produce. El consorcio proporcionará una prueba de concepto para una nueva estrategia de evaluación de la seguridad de compuestos químicos, centrándose en la toxicidad sistémica por dosis repetida de tóxicos, así como la toxicidad que afecta al desarrollo y reproducción del ser humano.

Los nuevos métodos desarrollados en este proyecto serán integrados de acuerdo con la normativa vigente para que puedan ser aplicados en la industria. EU-ToxRisk pretende desarrollar nuevos enfoques para cuantificar los riesgos basados en la comprensión de las "Vías de Efectos Adversos", incorporando todos los datos disponibles de mecanismos de toxicidad conocidos hasta ahora.

El objetivo es conseguir también una mejora rápida de los métodos de extrapolación utilizados para predecir características de los químicos e incrementar los métodos alternativos al uso de animales. Así pues, el proyecto mejorará la evaluación de la seguridad de la mayoría de los químicos utilizados por la industria y la sociedad.

El consorcio EU-ToxRisk incluye muchos de los toxicólogos y expertos líderes en campos relacionados como la Biología Celular y del Desarrollo, Genómica, Biología Computacional,

Quimioinformática, Bioinformática, Bioestadística, legislación, así como gestión y diseminación, con gran experiencia en organización y gestión de proyectos en diversos campos y sectores industriales. Además colaborará estrechamente con laboratorios de referencia de la Unión Europea para el establecimiento de alternativas a los Ensayos con Animales (EURL-ECVAM), a cargo del Centro de Investigación Conjunta (JRC) del Instituto para la Protección de la Salud y el Consumidor (IHCP) que encajen con la normativa vigente.

El proyecto EU-ToxRisk se inició en enero de 2016 en Leiden (Holanda) y tendrá una duración de seis años. En definitiva, EU-ToxRisk tiene el objetivo de abrir una nueva era para las ciencias de seguridad europeas ya que espera tener un fuerte impacto en la legislación que regula la seguridad química y evaluación de riesgos en Europa, y en el resto del mundo.

## **1.7 La Citómica en el Desarrollo de Métodos Celulares en Toxicología**

### **1.7.1 Concepto y Fundamento de la Citómica**

Tanto en investigación básica como en el descubrimiento de fármacos, se han incrementado los ensayos basados en células. Estos estudios aportan abundante información y son técnicamente factibles. Con respecto a otras “-ómicas”, el objetivo de la citómica son los sistemas heterogéneos celulares conocidos como citomas. Los citomas son entendidos como componentes funcionales y sistemas celulares heterogéneos de los organismos pluricelulares.

La citómica puede ser considerada como una disciplina que une la genómica y la proteómica, permite resolver sistemas heterogéneos evitando la pérdida de información que caracterizan las otras tecnologías, donde los valores promedio se obtienen de un gran número de células o de tejido homogeneizado (Herrera et al., 2006).

En este contexto, donde las “-ómicas” engloban la Biología de Sistemas, la citómica estudia la función de la célula en el contexto de los descubrimientos llevados a cabo por la genómica y la proteómica. Se define como el estudio de los fenotipos unicelulares moleculares resultantes del genotipo, en combinación con los conocimientos extraídos de los análisis exhaustivos bioinformáticos (Bernas et al., 2006).

Relacionados con la citómica son los métodos basados en fluorescencia, mínimamente invasivos y sensibles, que integran el concepto del análisis celular individual para entender la complejidad y el comportamiento de los tejidos y organismos. Debido a la gran disponibilidad de marcadores fluorescentes y a la multiplicidad de los detectores de fluorescencia, los ensayos citómicos pueden ser considerados como multiparamétricos, policromáticos y multiplexados.

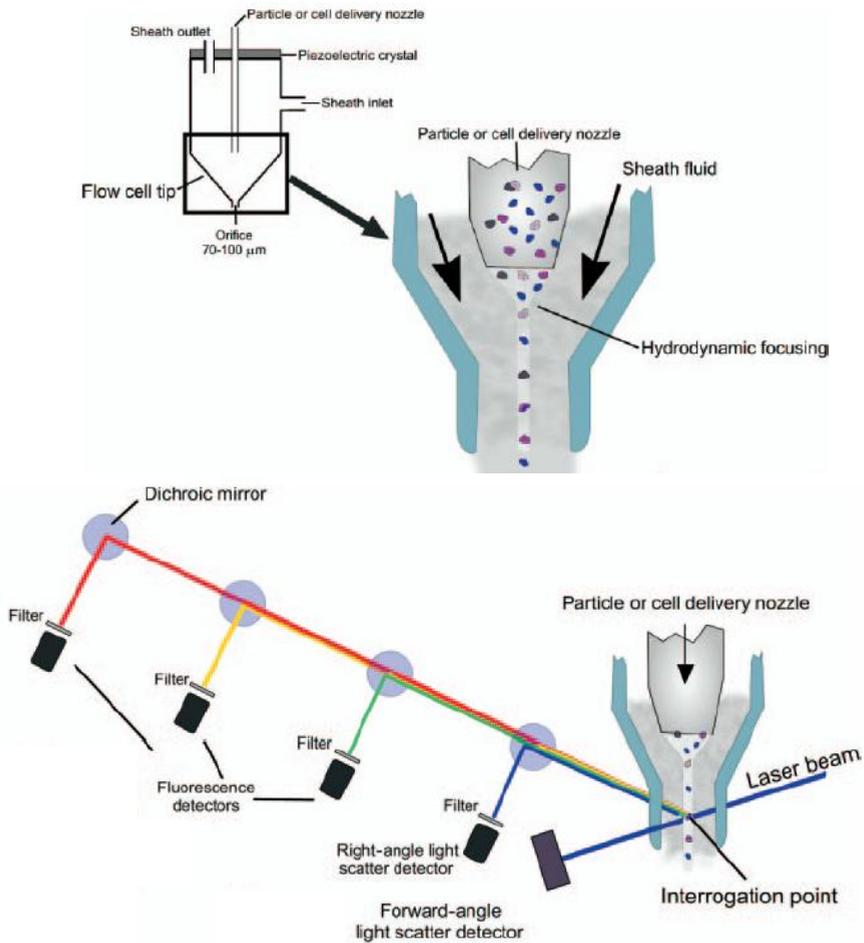
Los resultados obtenidos basados en técnicas fluorescentes pueden ser cualitativos o cuantitativos, y pueden ser obtenidos a partir de medidas del punto final o a través de medidas secuenciales, es decir, en modo cinético (Herrera et al., 2006).

Los citómetros de flujo funcionan sólo con partículas en suspensiones líquidas (Figura 4). Las células no deben formar agregados ni formar parte de tejidos. Una vez que las células están en suspensión, el citómetro aspira la muestra a través de una jeringa y gracias a un sistema de presiones y de vacío en la parte superior de la muestra. Las partículas son arrastradas a la cámara de flujo donde el líquido envolvente que acompaña a la muestra las acelera y las centra. Este fenómeno, llamado enfoque hidrodinámico, es responsable de la separación, alineación y el centrado de las partículas de la muestra, generando una corriente líquida laminar (Bernas et al., 2006).

Posteriormente, las partículas alineadas son presentadas de una en una y a gran velocidad frente a una fuente de iluminación de longitud de onda adecuada (O'Connor et al., 2001). Se registra la fluorescencia emitida después de la excitación por el láser. Esta fluorescencia puede ser natural (autofluorescencia) o inducida por moléculas fluorescentes añadidas a la muestra. El fluorocromo emite una señal de fluorescencia a una determinada longitud de onda específica y por lo tanto, ayuda a identificar células de interés por las características fenotípicas.

Las señales de dispersión, indicativas de los parámetros morfológicos, y las de fluorescencia se encuentran separadas entre ellas y se envían a fotodetectores específicos compuestos por un conjunto de espejos dicróicos y filtros que dividen las señales ópticas en rangos de longitud de onda espectral. Finalmente, los datos se

recopilan y se visualizan mediante el programa informático ofreciendo un análisis multiparamétrico (Bernas et al., 2006).



**Figura 4:** Esquema de la cámara de flujo y del principio de enfoque hidrodinámico donde las células se alinean una a una antes de que el láser incida sobre ellas y emitan fluorescencia (parte superior). Muestra un esquema general de la configuración óptica del citómetro, con los detectores para la dispersión frontal y en un ángulo de 90° separados e independientes de los detectores de fluorescencia (parte inferior). (T Bernas et al., 2006).

Esta metodología presenta importantes ventajas respecto a otras técnicas (O'Connor et al., 2001):

*Adquisición de datos multiparamétricos:* los citómetros de flujo permiten determinar de forma rutinaria dos parámetros morfológicos a través de la dispersión frontal y lateral de la luz, y se pueden determinar múltiples señales de fluorescencia, tantas como detectores presente el citómetro, para una sola partícula. De esta manera, en un único tubo de ensayo, se puede identificar y seleccionar subpoblaciones celulares empleando uno o varios parámetros a la vez y permite además determinar estructuras o funciones concretas a partir de las poblaciones previamente seleccionadas.

*Análisis de datos multivariado:* debido al diseño de los programas informáticos de los citómetros, la adquisición multiparamétrica está interconectada con el análisis de datos multivariado. La posibilidad de almacenar los archivos como una matriz de datos no correlacionados para cada célula analizada, permite definir nuevas correlaciones y selecciones de población mediante un posterior análisis de los archivos.

*Análisis rápido de un gran número de células vivas:* el uso de células vivas permite analizar múltiples parámetros bioquímicos en diversas condiciones. La rápida tasa de adquisición de datos y la posibilidad de examinar millones de partículas individuales en un tiempo razonable, permite la detección y el análisis preciso de poblaciones celulares infrecuentes. Algunos sistemas pueden adquirir

partículas con una velocidad aproximada de 100.000 partículas por segundo (Robinson, 2004).

Además los ensayos citómicos permiten identificar y purificar determinadas subpoblaciones celulares del citoma a través de los distintos marcadores de superficie fluorescentes, de las actividades funcionales intracelulares, de las propiedades morfológicas o a menudo, de una combinación de varias.

Estas características permiten que los análisis citómicos se integren fácilmente entre otras estrategias, para el estudio de la interacción entre los xenobióticos y las células, para el desarrollo industrial y la evaluación de efectos tóxicos y terapéuticos de los compuestos químicos (Herrera et al., 2006).

Como se puede observar, la citometría de flujo, la técnica empleada en este trabajo, es una muy buena alternativa en el campo de la Toxicología, ya que puede permitir observar los cambios producidos en la célula en respuesta a un agente tóxico y evaluar y cuantificar los daños producidos en las distintas subpoblaciones seleccionadas, todo ello de una forma no invasiva, rápida y sencilla.

### **1.7.2 Parámetros Citómicos para la Evaluación de Citotoxicidad in Vitro.**

Se pueden desarrollar ensayos simples que permitan evaluar los aspectos básicos de la citotoxicidad, es decir, todos aquellos parámetros básicos de la fisiología celular que puedan verse afectados por la interacción con los mecanismos de acción de los compuestos químicos y que afecten a la proliferación, viabilidad o

supervivencia celular. Estos ensayos aportan una razonable predictividad para la toxicidad aguda.

El grado de predictividad se puede incrementar llevando a cabo un número mayor de ensayos que permitan evaluar otros parámetros relacionados con el estrés generado por la formación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, además del ensayo del principal antioxidante que previene los efectos del estrés oxidativo, el glutatión.

Gracias a la capacidad multiparamétrica de la citometría de flujo, se puede cuantificar de una forma rápida y sencilla los efectos inducidos por la exposición de los agentes tóxicos, proporcionando una prueba directa de la susceptibilidad o resistencia celular (Herrera et al., 2006).

Se puede obtener una gran cantidad de información de aquellos compuestos que químicamente tengan un amplio rango de mecanismos tóxicos, a través del diseño de los ensayos citómicos en líneas celulares específicas de órganos, que sean especialmente sensibles a los efectos tóxicos provocados por los compuestos. Para ello, las células deben estar marcadas con sondas fluorescentes definidas de acuerdo con sus propiedades biológicas y ópticas (O'Connor et al., 2001).

En la presente Tesis Doctoral se han realizado una serie de ensayos citómicos que van a permitir evaluar tanto la citotoxicidad basal como la específica, en varias líneas celulares de rata. Entre los parámetros que forman los ensayos citómicos, se encuentran los

parámetros citotóxicos de viabilidad celular, niveles de calcio intracelular y el estudio de los potenciales de membrana, plasmático y mitocondrial.

Por otro lado, también se van a estudiar parámetros de estrés oxidativo y nitrosativo, entre los que se encuentran especies reactivas del oxígeno y nitrógeno como el radical superóxido, el óxido nítrico y los niveles de peróxidos. Finalmente se determinarán los niveles de glutatión que es el antioxidante de mayor importancia.

#### **- Viabilidad celular**

Este trabajo está basado en el estudio principalmente de las células vivas, ya que se pretende estudiar cambios en los parámetros bioquímicos provocados por la acción de los tóxicos. Un parámetro que varía en función de la concentración de tóxico empleada es la viabilidad, observándose un número mayor de células muertas con concentraciones crecientes de tóxico.

Para evaluar el porcentaje de células vivas se emplea el fluorocromo yoduro de propidio. El yoduro de propidio es un intercalante que se une principalmente al DNA, aunque también se une al RNA. Generalmente se excluye de las células vivas ya que es impermeable a la membrana celular, por lo que las células que tengan afectada la integración de la membrana ya sea por un proceso de apoptosis o necrosis emiten distinto grado de fluorescencia pudiendo discriminar la población de células vivas de interés (Zamai et al., 2001). El ensayo del yoduro de propidio, descrito en la

metodología, se emplea para la determinación de la viabilidad y los estudios citómicos.

### **- Potencial de Membrana Plasmática**

Los canales iónicos dependientes de voltaje o dependientes de ligando tienen cada vez una mayor importancia en la industria farmacéutica por su implicación en un gran número de enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y del sistema nervioso central entre otras. Los tóxicos pueden interactuar con estos canales provocando cambios en los potenciales de membrana que afectan a la actividad de estos canales (Wolff et al., 2003).

El potencial de membrana plasmática es una diferencia de potencial eléctrico entre el interior, cuyo potencial es negativo, y el exterior que presenta potencial positivo. Estas diferencias de potencial se deben a la permeabilidad selectiva que presenta la membrana plasmática como consecuencia del transporte activo de iones, en concreto de iones sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ) y cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), que son bombeados activamente para mantener las concentraciones constantes.

Cuando las concentraciones no se mantienen constantes hay incrementos o disminuciones de iones en la membrana, variando el potencial y dando lugar a la hiperpolarización o despolarización de la membrana. Estos procesos juegan un papel clave en procesos fisiológicos como son la transmisión nerviosa, transporte de iones a través de canales y contracción muscular (Alberts et al., 2002).

Para poder determinar el potencial de membrana plasmático en este trabajo se ha empleado el fluorocromo bis-(ácido 1,3-dibutilbarbitúrico) trimetina oxonol (DiBAC<sub>4</sub>(3)), fluorocromo aniónico y lipofílico, con una sensibilidad moderada hacia los cambios del potencial de membrana.

Presenta una muy baja fluorescencia en el medio extracelular pero aumenta su rendimiento cuántico al unirse al núcleo hidrofóbico de la membrana lipídica. Tras la despolarización de la membrana celular, el fluorocromo al tener carga negativa, se desplaza del medio extracelular al citosol. El incremento de la concentración intracelular resulta en un incremento de la unión a la membrana celular dando lugar a un aumento de la intensidad de fluorescencia. De forma contraria, una situación de hiperpolarización se indica por una disminución de la intensidad de fluorescencia (Wolff et al., 2003).

#### **- Potencial de Membrana Mitocondrial:**

La mitocondria es un orgánulo intracelular presentes en prácticamente todas las células eucariotas, encargadas del suministro de la energía necesaria para la actividad celular a través de la síntesis de ATP por medio de la fosforilación oxidativa.

Hasta hace poco tiempo se consideraba que la principal función de la mitocondria estaba limitada a la obtención de energía en forma de ATP. Sin embargo, se ha descrito una nueva función de la mitocondria, con un papel clave dentro del proceso de apoptosis

actuando de reservorio de proteínas apoptóticas como por ejemplo, el citocromo c (Christensen et al., 2013).

La energía que se obtiene a través de la transferencia de electrones a lo largo de la cadena transportadora se emplea para bombear protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, creando un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Este gradiente de protones permite a la ATP sintasa utilizar el flujo de protones generados para producir ATP a partir de adenosina difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Perry et al., 2011; Sánchez et al., 2008).

El proceso da como resultado un potencial de membrana con carga neta negativa dando lugar a la polarización de la mitocondria. El uso de desacoplantes de la fosforilación oxidativa mitocondrial, como el empleado en este trabajo como control positivo de este parámetro, el FCCP, permeabiliza la membrana mitocondrial interna provocando la pérdida del potencial y despolarizando la mitocondria.

En este caso, para determinar dicho potencial se empleará el fluorocromo tetrametilrodamina metil éster (TMRM), fluorocromo permeable, catiónico y lipofílico que es rápidamente secuestrado por la mitocondria activa. La distribución a través de la membrana mitocondrial es altamente selectiva y está directamente relacionada con el potencial de membrana, ya que no forman agregados en las membranas celulares ni interactúan con proteínas de membrana. Cuando el potencial de membrana se pierde, es decir, se despolariza, el fluorocromo sale de la mitocondria y de la célula y la intensidad de

fluorescencia disminuye (Kalbáčová et al., 2003; Cottet-Rousselle et al., 2011).

**- Nivel de Calcio intracelular:**

El calcio realiza importantes funciones para la supervivencia y el crecimiento celular en el organismo, actúa como mediador intracelular realizando la función de segundo mensajero, interviene en la contracción de los músculos, influye en la transmisión de iones a través de las membranas actuando como un estabilizador de la membrana y participa en la liberación de neurotransmisores.

La concentración intracelular de iones calcio, mantenido a través de los diversos mecanismos, juega un papel muy importante en la señalización celular. La desregulación de estos mecanismos debido a factores de estrés como los compuestos citotóxicos empleados en este trabajo, entre otros factores, pueden alterar la homeostasis del calcio y la influencia de las rutas de señalización dependientes de calcio en la célula (Clapham, 1995; Wojcik-Piotrowicz et al., 2016)

Estas perturbaciones del equilibrio electroquímico intracelular pueden desencadenar en la activación de diferentes moléculas implicadas en la regulación de la muerte celular, a través de sus distintas modalidades, apoptosis, necrosis o autofagia (Zhivotovsky et al., 2011).

Para poder determinar el nivel de calcio intracelular se emplea el fluorocromo Fluo-4 AM, permeable a la membrana debido a que se encuentra en su forma esterificada y no fluorescente en el

citoplasma. Una vez en el interior celular, las esterasas intracelulares convierten el éster en su forma activa, Fluo-4, que se une al calcio y emite fluorescencia (Gee et al., 2000).

#### - **Especies Reactivas del Oxígeno y Nitrógeno:**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son un conjunto de moléculas reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno. Entre las ROS se encuentran representadas tanto especies radicalarias como no radicalarias (Figura 5). Son generadas como subproductos del metabolismo celular en el proceso de la fosforilación oxidativa mitocondrial, aunque también pueden surgir de las interacciones con fuentes exógenas como los compuestos xenobióticos (Pisoschi et al., 2015).

Los radicales libres se definen como las especies atómicas o moleculares que contienen uno o más pares de electrones desapareados en uno de sus orbitales moleculares. Debido a esta condición presentan una gran inestabilidad, lo que los convierte en muy reactivos y pueden participar en distintos tipos de reacciones en los que pueden sufrir procesos de oxidación o reducción (Thannickal et al., 2000).

La principal fuente generadora de radicales libres en las células es la mitocondria, donde el oxígeno molecular es reducido parcialmente a través de la adición de un electrón dando lugar a la formación del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), especie que puede actuar tanto como un nucleófilo, capaz de atacar centros cargados positivamente, como actuar de agente oxidante reaccionando con dadores de hidrógeno.

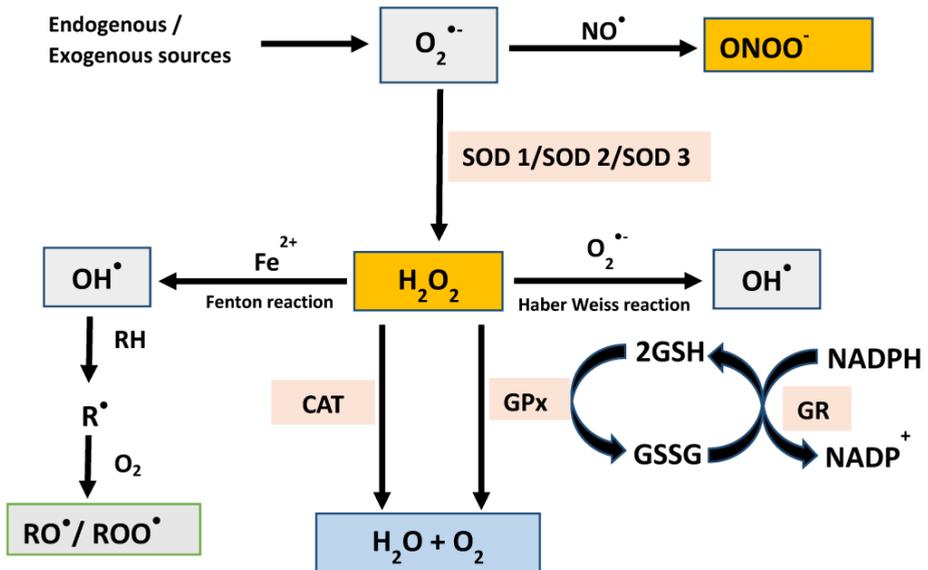
El radical superóxido puede dismutar dando como producto oxígeno molecular ( $O_2$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), reacción catalizada por la superóxido reductada (SOD).

A diferencia del anión superóxido, el  $H_2O_2$ , producto de la dismutación del superóxido, no es un radical libre, es más estable y difunde a través de las membranas biológicas pero es un agente oxidante más débil. Sin embargo, en presencia de metales de transición, como el hierro en su forma reducida, se produce otra reducción parcial del oxígeno generando el radical hidroxilo ( $OH\bullet$ ), reacción que recibe el nombre de “reacción de Fenton”.

El radical hidroxilo es el más reactivo de todos, extremadamente oxidante ya que ataca a la gran mayoría de moléculas, tanto orgánicas como inorgánicas, ADN, proteínas, lípidos, aminoácidos, azúcares y metales. En los organismos vivos la reacción que genera radicales hidroxilo además de la reacción de Fenton, es conocida como la reacción de Haber-Weiss, donde en presencia de superóxido y peróxido de hidrógeno se generan más radicales hidroxilo (Zorov et al., 2014; Pisoschi et al., 2015).

Además de estas especies también existen las especies reactivas del nitrógeno, familia de moléculas donde la más relevante es el óxido nítrico. El óxido nítrico endógeno, sintetizado a partir de L-arginina, oxígeno y NADPH en una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa o por reducción de nitrato inorgánico, es un radical libre que difunde a través de las células fácilmente, aunque su reactividad es menor que la de otros radicales. Reacciona fácilmente

con el radical anión superóxido dando una especie nitrogenada altamente reactiva, el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), un potente oxidante que por tratarse de una molécula no radical libre, es mucho más estable y puede generar efecto tóxico a largo plazo (Olmos et al., 2007).



**Figura 5:** Fuentes y generación de diferentes especies reactivas del oxígeno. CAT, catalasa; GPx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; SOD, superóxido dismutasa; RH, membrana lipídica; R., radical alquilo (Ajuwon et al., 2015).

Las especies reactivas se generan continuamente en los procesos celulares y son esenciales para la vida. Tanto las ROS como las RNS juegan un papel crucial en activación génica, crecimiento celular, reacciones químicas celulares y defensa frente a bacterias y virus. Sin embargo, un exceso de estas especies reactivas o una disminución de los sistemas antioxidantes pueden causar un estado que recibe el nombre de estrés oxidativo, provocando daño celular que puede ser irreversible.

El estrés oxidativo produce efectos dañinos sobre las células a distintos niveles, pudiendo causar daños a través de la interacción con lípidos, proteínas y DNA. El daño celular generado está asociado en numerosas patologías como enfermedades cardiovasculares, renales, cáncer, diabetes, Alzheimer, Parkinson o envejecimiento (Kumar et al., 2012; Valko et al., 2007; Saeidnia et al., 2013).

Debido al corto tiempo de vida de estas especies reactivas, resulta difícil poder detectarlas. El método de detección consiste en la utilización de distintos fluorocromos que presentan una alta sensibilidad y en la posterior medida de la intensidad de fluorescencia. Los fluorocromos utilizados en el presente trabajo son:

El compuesto fluorogénico MitoSOX™, reactivo permeable en las células vivas donde se dirige a las mitocondrias, principal orgánulo generador de radicales superóxido. Es altamente selectivo para la detección de superóxido mitocondrial en las células vivas.

El compuesto es oxidado rápidamente en presencia de radicales superóxido pero no por otras especies reactivas de oxígeno o nitrógeno. El producto resultante emite intensa fluorescencia roja (Cottet-Rousselle et al., 2011).

Otro compuesto empleado es el sustrato no fluorescente 2,7-diclorofluorescein-diacetato (DCF-DA). La forma esterificada, DCFDA, es capaz de atravesar la membrana celular y, a continuación, como resultado de la desacetilación por esterasas intracelulares, dar lugar a DCFH que queda retenido intracelularmente. Este producto no

fluorescente se convierte a DCF a través de su oxidación por los radicales libres derivados de los peróxidos, compuesto con una elevada intensidad de fluorescencia verde. El DCFDA solamente permite la detección de peróxidos celulares eficazmente si son descompuestos en radicales por ejemplo, por iones de metales de transición (Halliwell et al., 2004; Kalyanaraman et al., 2012).

El tercer compuesto empleado es el 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM DA), reactivo para cuantificar bajas concentraciones de óxido nítrico. Compuesto esencialmente no fluorescente, esterificado que le permite atravesar fácilmente la membrana celular, una vez dentro, el compuesto es desacetilado por las esterasas intracelulares dando lugar a DAF-FM que presenta una baja fluorescencia, pero que puede reaccionar con el óxido nítrico dando lugar a benzotriazol, compuesto que emite una intensidad de fluorescencia verde (Kojima et al., 1999).

#### **- Glutación:**

La exposición a las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno producidas por una cantidad de procesos biológicos ha llevado a desarrollar numerosos mecanismos de defensa en los organismos, con el fin de protegerlos del daño que ocasionan (Wu et al., 2004). Dichos mecanismos pueden ser de reparación, defensas físicas o defensas antioxidantes. Estos últimos juegan un papel fundamental y están compuestos tanto por enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la glutación peroxidasa (GPx) y la catalasa, como por

sustancias antioxidantes entre los que se encuentran la vitamina C, la vitamina E y el glutatión entre otros.

En condiciones normales, existe un equilibrio entre las especies reactivas del oxígeno y los sistemas antioxidantes que mantienen la salud del individuo, pero la alteración del balance en los mecanismos de producción y eliminación de las ROS hacia un incremento de la producción, da lugar a un estado de estrés oxidativo. Además de provocar daños celulares, el estrés oxidativo influye en la regulación de genes implicados en el proceso de envejecimiento y activación de rutas de apoptosis, además de estar implicado en numerosas enfermedades (Pisoschi et al., 2015).

El antioxidante de mayor importancia en las células es el glutatión, un tripéptido ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina), aunque su presencia es ubicua, es especialmente importante en aquellos órganos con una intensa exposición a toxinas exógenas como el hígado. Se caracteriza porque posee un grupo funcional -SH libre (tiol), responsable de las propiedades antioxidantes de este compuesto, protegiendo a las células del efecto de los peróxidos y los radicales libres.

Dentro de los sistemas biológicos el glutatión se encuentra presente de dos formas, en su forma reducida (G-SH) y en su forma oxidada (GS-SG). En su forma reducida el grupo SH es capaz de donar un electrón a otras moléculas inestables, volviéndose él, a su vez reactivo en forma de radical libre. Sin embargo, inmediatamente se combina con otra molécula de glutatión reactivo para originar el glutatión disulfuro (GS-SG), el cual ya es estable. Posteriormente, el

glutación disulfuro es regenerado a glutación (G-SH) mediante una enzima, la glutación-reductasa.

La principal característica del GSH es que puede servir de cofactor de diferentes enzimas detoxificantes contra el estrés oxidativo. El GSH participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática, reacciona directamente con el radical hidroxilo, detoxifica el peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos. El GSH también es capaz de regenerar moléculas antioxidantes muy importantes como las vitaminas C y E, participa en muchos procesos celulares como la detoxificación de xenobióticos, almacenamiento y transporte de cisteína, proliferación celular y regulación de la apoptosis (Yuan et al., 2008; Dickinson et al., 2002).

En condiciones de normalidad, aproximadamente el 90% del glutación se encuentra en su forma reducida y sólo el 10% en forma de glutación disulfuro. La presencia de este último en cantidades mayores refleja un estado de estrés oxidativo. Por otra parte, una deficiencia de glutación contribuye al estrés oxidativo pudiendo generar graves patologías (Wu et al., 2001).

Para determinar el nivel de glutación presente en las células en este trabajo, se ha empleado el compuesto no fluorescente monoclorobimano (MCB), que reacciona con tioles de bajo peso molecular, como el glutación, a través de una reacción catalizada por la glutación S-transferasa, dando lugar a la formación de aductos fluorescentes. El monoclorobimano conjugado con glutación emitirá fluorescencia azul (Skindersoe et al., 2013).

### **1.7.3 Capacidad Predictiva de los Ensayos Citómicos**

Estudios previos de nuestro laboratorio en el contexto del proyecto europeo A-Cute-Tox, demostraban que un conjunto de ensayos citómicos in vitro, basados en la determinación de parámetros de citotoxicidad general y de estrés oxidativo en líneas celulares humanas, predecían mejor la toxicidad aguda humana de compuestos químicos que el ensayo clásico de citotoxicidad in vitro.

Los ensayos lograban clasificar razonablemente los compuestos según su riesgo de toxicidad en una escala adaptada a los datos de toxicidad in vivo en humanos. Sin embargo, la comparación de los datos con el sistema internacional de clasificación (Global Harmonizing System, GHS), basado en los datos de toxicidad in vivo en rata, resultaba en una escasa capacidad de clasificación correcta.

Estos resultados negativos limitan la utilidad de los ensayos citómicos con líneas humanas en el área de la Toxicología normativa y su integración en las estrategias de evaluación de riesgo tóxico de productos químicos.

## **1.8 Introducción al Análisis Estadístico de Datos Multiparamétricos**

El análisis multivariante es la parte de la estadística y del análisis de datos que estudia, analiza, representa e interpreta los datos que resulten de observar un número de variables estadísticas sobre una muestra de individuos. Las variables observables son homogéneas y

correlacionadas, sin que alguna predomine sobre las demás (Cuadras, 2014).

La información estadística en el análisis multivariante es una matriz de datos y tiene carácter multidimensional. Presenta dos objetivos claros: proporcionar métodos cuya finalidad es el estudio conjunto de datos multivariantes que el análisis estadístico uni o bidimensional es incapaz de conseguir, y ayudar a tomar decisiones óptimas en el contexto en el que se encuentre, teniendo en cuenta la información disponible por el conjunto de datos analizado.

Un problema central en el análisis de datos multivariantes es la reducción de la dimensionalidad: si es posible describir con precisión los valores de las variables por un pequeño subconjunto de ellas, se habrá reducido la dimensión del problema a costa, eso sí, de una pequeña pérdida de información. Entre los métodos proporcionados, se pretende resumir el conjunto de variables en unas pocas variables nuevas, construidas como transformaciones de las originales, con la mínima pérdida de información (Peña, 2002).

Otros posibles objetivos que pretende el análisis de datos multivariantes en cuanto a la metodología consisten en: encontrar si existen grupos en los datos, clasificar nuevas observaciones en grupos definidos y relacionar dos conjuntos de variables. Todos ellos de cara a poder obtener la mayor información posible que pueda explicar el conjunto de datos obtenidos.

### **1.8.1 Análisis de Componentes Principales**

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es una técnica estadística de síntesis de la información o reducción de la dimensión, es decir, ante un banco de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible (Gurrea, 2012).

El PCA tiene este objetivo: dadas unas observaciones de unas variables, se analiza si es posible representar adecuadamente esta información con un número menor de variables construidas como combinaciones lineales de las originales.

La técnica de componentes principales es debida a Hotelling (1933), aunque sus orígenes se encuentran en los ajustes ortogonales por mínimos cuadrados introducidos por K. Pearson (1901). Su utilidad es doble: por un lado, permite representar óptimamente en un espacio de dimensión pequeña, observaciones de un espacio general  $p$ -dimensional. En este sentido, es el primer paso para identificar posibles variables latentes o no observadas, que están generando la variabilidad de los datos. Por otro lado, permite transformar las variables originales, en general correlacionadas, en nuevas variables no correlacionadas, facilitando la interpretación de los datos (Peña, 2002).

En el caso de este trabajo, se dispone de un total de 8 variables, donde están incluidos los parámetros de citotoxicidad y de estrés oxidativo, para los 57 tóxicos ensayados en cada una de las tres líneas celulares. En total, 171 objetos para ocho variables, dispuestos en

una matriz de datos donde las columnas contienen las variables y las filas los elementos u objetos.

Para trabajar con todos los objetos, previamente hay que restar a cada variable su media y dividir todos los valores de cada variable por su desviación media, es decir, los datos deben estar centrados y normalizados. Una variable centrada y reducida presenta una media nula y una desviación típica igual a uno. Así obtenemos variables que tienen misma dispersión y misma media, lo que permite comparaciones independientes de la unidad de medida, o de la escala escogida.

El espacio dimensional que mejor representa a los puntos viene definido por los vectores propios asociados. Estas direcciones se denominan direcciones principales de los datos y las nuevas variables generadas reciben el nombre de componentes principales. Existen tantas componentes principales como variables (Peña, 2002).

Se han sugerido distintas reglas para seleccionar el número de componentes a mantener a la hora de realizar el estudio estadístico. Cabe esperar que las primeras componentes expliquen un elevado porcentaje de la variabilidad total (Cuadras, 2014).

En este trabajo, se han seleccionado los componentes necesarios hasta cubrir una proporción determinada de varianza, cercana al 80%.

Cuando las escalas de medida de las variables son muy distintas, las variables con valores más grandes tendrán más peso en el análisis.

Para evitar este problema, conviene estandarizar las variables antes de calcular los componentes, de manera que las magnitudes de los valores numéricos de las variables sean similares. Además, la estandarización resuelve otro posible problema. Si las variabilidades de las variables son muy distintas, las que tengan mayor varianza influirán más en la determinación de la primera componente.

Para la interpretación de los componentes principales se representan las proyecciones de las observaciones sobre un espacio de dos dimensiones, definido por parejas de los componentes principales más importantes. La proyección de cualquier observación sobre un componente es directamente el valor del componente para esa observación.

La representación habitual es tomar dos ejes ortogonales que representen los dos componentes considerados, y situar cada punto sobre ese plano por sus coordenadas con relación a estos ejes, que son los valores de los dos componentes para esa observación. La interpretación se favorece representando en el mismo plano además de las observaciones las variables originales (Peña, 2002).

### **1.8.2 Asociación de Variables.**

Una vez considerado que uno de los objetivos del análisis de componentes principales consiste en encontrar agrupaciones naturales del conjunto de observaciones de la muestra, es necesario establecer el criterio para poder determinar cuando dos grupos son más o menos similares.

Para poder asociar variables es necesario tener algunas medidas numéricas que caractericen las relaciones entre variables. La base de trabajo de todas las técnicas clúster es que las medidas numéricas de asociación sean comparables. Es necesario elegir la medida apropiada en cada problema concreto (Gallardo, 2012).

El coseno del ángulo es una medida de similitud entre dos observaciones, con valores entre -1 y 1. En el presente trabajo, el estudio a través del PCA proporciona la información a través de vectores. La mejor medida para establecer el paralelismo entre dos vectores es mediante el coseno del ángulo que forman, ya que dos vectores son paralelos cuando el coseno del ángulo es uno en valor absoluto. Además esta medida es independiente, salvo signo, de la longitud de los vectores considerados.

Así, las variables estarán tanto más correlacionadas cuanto más se aproxime a  $\pm 1$  el coeficiente de similitud (Mongay, 2005), o 100 expresando el resultado en porcentaje como se ha realizado en este trabajo. Esta metodología nos permitirá relacionar los parámetros según sus propiedades bioquímicas y su mecanismo de acción.

## 2. HIPÓTESIS

Estudios previos de nuestro laboratorio en el contexto del proyecto europeo A-Cute-Tox, demostraban que un conjunto de ensayos citómicos in vitro, basados en la determinación de parámetros de citotoxicidad general y de estrés oxidativo en líneas celulares humanas, predecían mejor la toxicidad aguda humana de compuestos químicos que el ensayo clásico de citotoxicidad in vitro.

Los ensayos lograban clasificar razonablemente los compuestos según su riesgo de toxicidad en una escala adaptada a los datos de toxicidad in vivo en humanos. Sin embargo, la comparación de los datos con el sistema internacional de clasificación (Global Harmonizing System, GHS), basado en los datos de toxicidad in vivo en rata, resultaba en una escasa capacidad de clasificación correcta.

Estos resultados negativos limitan la utilidad de los ensayos citómicos con líneas humanas en el área de la Toxicología normativa y su integración en las estrategias de evaluación de riesgo tóxico de productos químicos.

Esta Tesis Doctoral se basa en la hipótesis de que la transferencia a líneas celulares de rata de los ensayos citómicos con líneas humanas permitiría mejorar la capacidad de dichos ensayos in vitro para la clasificación del riesgo tóxico de compuestos químicos con el sistema GHS, basado en valores de toxicidad aguda de compuestos químicos en rata.



### **3. OBJETIVOS**

Para demostrar la hipótesis de esta Tesis Doctoral, se han propuesto los siguientes objetivos metodológicos:

1. Poner a punto una plataforma de ensayos citómicos miniaturizados y de alto contenido para la determinación de parámetros generales de citotoxicidad y específicos de estrés oxidativo en tres líneas celulares de rata.
2. Validar la plataforma de ensayos citómicos mediante el análisis de compuestos de referencia (controles positivos) y la correlación de los valores de citotoxicidad (IC50, EC50) obtenidos en los ensayos citómicos, con los valores bibliográficos de citotoxicidad obtenidos en ensayos normativos in vitro e in vivo.
3. Determinar la capacidad de los ensayos citómicos de toxicidad in vitro para clasificar la toxicidad de compuestos químicos con el criterio del sistema global de armonización de la ONU (GHS), basado en la toxicidad in vivo en rata.
4. Cuantificar la capacidad de predicción y clasificación de la plataforma de ensayos mediante la determinación con técnicas estadísticas adecuadas del grado de asociación existente entre las variables que componen el modelo experimental.

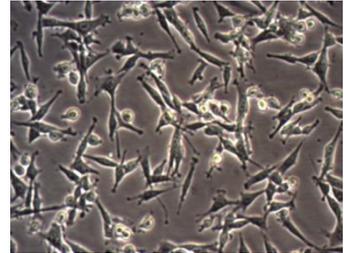


## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

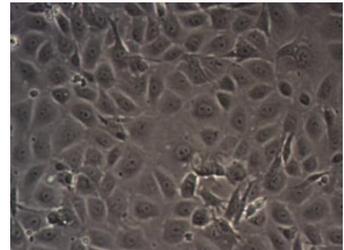
### 4.1 LÍNEAS CELULARES

En este trabajo se han empleado las siguientes líneas celulares establecidas de rata (ECACC, European Collection Cell Cultures, Salisbury, UK):

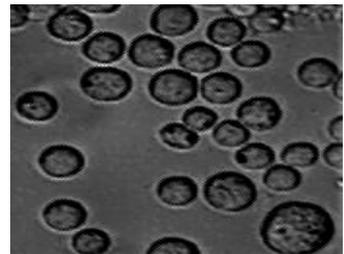
-B50 (ECACC No 85042302): Línea celular procedente de un tumor glial de rata inducido por etil nitrosourea. Tejido neuronal nervioso de rata. Tienen un modo de crecimiento adherente.



-NRK-52E (ECACC No 87012902): Línea epitelial renal de rata, clonada a partir de células renales normales de la línea NRK-49F, pero con morfología epitelial y con propiedades de crecimiento y transformación distintas. Tienen un modo de crecimiento adherente. Obtenida de ATCC (American Type Culture Collection, USA).



-N13: Línea celular derivada de un hepatoma de rata inducido en una rata Wistar con 4-dimetilaminoazobenceno. Crecen en suspensión (G Juan et al., 1996).



**Figura 6:** Fotografías de las tres líneas celulares empleadas: B50 (arriba) y NRK-52E (centro) y N13 (abajo).

## 4.2 MEDIOS DE CULTIVO

### 4.2.1 MEDIOS DE CULTIVO RUTINARIO

-**Cultivo de células B50:** medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) con L-Glutamina, suplementado con:

-10 % Suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor (Gibco, 16140-071)

-100 UI/mL Penicilina y 100 µg/mL Estreptomina (Gibco, 15140-031)

-**Cultivo de células NRK-52E:** medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) con L-Glutamina, suplementado con:

-10 % SBF inactivado por calor (Gibco, 16140-071)

-1% aminoácidos no esenciales (Gibco, 11140)

-100 UI/mL Penicilina y 100 µg/mL Estreptomina (Gibco, 15140-031)

-**Cultivo de células N13:** medio RPMI 1640 con L-Glutamina, suplementado con:

-10 % SBF inactivado por calor (Gibco, 16140-071)

-100 UI/mL Penicilina y 100 µg/mL Estreptomina (Gibco, 15140-031)

### 4.2.2 MEDIOS DE CULTIVO PARA EL TRATAMIENTO CON TÓXICOS

Para el tratamiento con tóxicos se emplea un medio de cultivo rutinario para cada línea celular, pero suplementado con SBF al 5%.

### **4.2.3 MEDIO DE CONGELACIÓN CELULAR**

El medio de congelación consiste en una mezcla de SBF al 90% y Dimetil sulfóxido (DMSO) al 10 %.

## **4.3 CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR**

### **4.3.1 CONGELACIÓN**

Cuando las células en cultivo alcanzan una confluencia del 70-80%, se procede a la disgregación con tripsina, necesaria tan sólo en las líneas celulares con un crecimiento adherente en monocapa (B50 y NRK-52E). Se realiza el contaje mediante cámara de Neubauer, se centrifuga, procedimiento común a todas las líneas celulares y se resuspenden en medio de congelación celular. Finalmente, se alicuotan en criotubos estériles para su posterior congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un recipiente "Mr Frosty", que permite una congelación gradual de la muestra preservando la viabilidad. Posteriormente se almacenan en nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) hasta su utilización.

### **4.3.2 DESCONGELACIÓN**

Para la descongelación de las células, se extraen los criotubos del nitrógeno líquido y se atemperan en baño a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta su total descongelación. Inmediatamente después se transfieren a un frasco de cultivo con el doble de volumen habitual del medio de rutina correspondiente a cada línea celular, dando lugar a la dilución del

DMSO, tóxico para las células. Al día siguiente se renueva el medio, añadiendo el volumen óptimo habitual (10-12mL).

### **4.3.3 MANTENIMIENTO Y CULTIVO RUTINARIO**

Las células B50 y NRK-52E crecen en monocapa (adheridas) en frascos de 75 cm<sup>2</sup> o en placas de 96 pocillos, a 37°C ± 1°C, 90% ± 5% de humedad y 5.0% ± 1% de mezcla de CO<sub>2</sub> en aire. Se deben observar cada día al microscopio de contraste de fases y anotar variaciones. Cuando la confluencia alcanza el 70-80% se subcultivan las líneas celulares. Se realiza el siguiente procedimiento en el caso de las líneas celulares adherentes (B50 y NRK-52E):

-Eliminar el medio de cultivo por absorción a vacío.

-Lavar con PBS y retirar por absorción a vacío.

-Añadir 3 mL de tripsina-EDTA 0,25 %.

-Incubar 5 minutos a 37°C ± 1°C, 90% ± 5% de humedad y 5.0% ± 1% CO<sub>2</sub>/aire.

Observar al microscopio que las células estén disgregadas, en caso afirmativo se añade medio de cultivo rutinario para inactivar la tripsina. A continuación se divide (B50 en 1:2 y NRK-52E en 1:3) en frascos de 75 cm<sup>2</sup> y se añade medio de rutina hasta un volumen final de 12mL por frasco.

Las células N13 crecen en suspensión en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, a 37°C ± 1°C, 90% ± 5% de humedad y 5.0% ± 1% de mezcla de CO<sub>2</sub> en aire.

Cuando la confluencia alcanza el 70-80% se subcultivan. Para poder dividir las células a un nuevo frasco se homogeniza la suspensión mediante agitación suave y se transfieren unos 6 mL de suspensión celular, añadiendo medio de rutina hasta el volumen final de 12mL por frasco.

#### **4.4 PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES.**

##### **LINEAS B50 Y NRK-52E:**

Las células crecen en monocapa (adheridas) en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, a 37°C ± 1°C, 90% ± 5% de humedad y 5.0% ± 1% de mezcla de CO<sub>2</sub> en aire. Para poder transferir las células a una placa de 96 pocillos se realiza el siguiente procedimiento, igual para ambas líneas:

- Eliminar el medio de cultivo por absorción a vacío.
- Lavar con PBS y retirar por absorción a vacío.
- Añadir 3 mL de tripsina-EDTA 0,25 %.
- Incubar 5 minutos a 37°C ± 1°C, 90% ± 5% de humedad y 5.0% ± 1% CO<sub>2</sub>/aire.
- Observar al microscopio que las células estén disgregadas, en cuyo caso se añade medio de cultivo rutinario para inactivar la tripsina y se homogeniza la suspensión mediante agitación suave.

Una vez disgregadas las células con tripsina, se realiza el conteo de las células vivas en la cámara de Neubauer. Para ello se pasan 10 µL con la pipeta a un tubo eppendorf y se añaden otros 10 µL del

colorante azul tripán que permite diferenciar células vivas de células muertas.

Una vez que las células se han contado, se prepara una suspensión donde haya un total de  $9 \cdot 10^5$  células para un total de 60 pocillos por placa (concentración de células por pocillo de  $1.5 \cdot 10^4$ ), y se añade medio de rutina con SBF al 10%. Se inocula 200  $\mu\text{L}$  de esa suspensión a cada pocillo y se deja incubar 24 horas a  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $90\% \pm 5\%$  de humedad y  $5.0\% \pm 1\% \text{CO}_2$ .

A continuación se retira el medio totalmente y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de medio de rutina con SBF al 5% y otros 100  $\mu\text{L}$  con el medio de rutina con SBF al 5% pero en este caso, conteniendo la concentración deseada del tóxico de interés, y se deja incubar otras 24 horas más.

### **LINEA N13:**

Las células crecen en suspensión en frascos de 75  $\text{cm}^2$ , a  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $90\% \pm 5\%$  de humedad y  $5.0\% \pm 1\%$  de mezcla de  $\text{CO}_2$  en aire. Para poder transferir las células a una placa de 96 pocillos se homogeniza la suspensión mediante agitación suave y se realiza el conteo de las células vivas en la cámara de Neubauer, para ello se pasan 10  $\mu\text{L}$  con la pipeta a un tubo eppendorf y se añaden otros 10  $\mu\text{L}$  del colorante azul tripán que permite diferenciar células vivas de células muertas.

Una vez que las células se han contado, se prepara una suspensión donde haya un total de  $9 \cdot 10^5$  células para un total de 60 pocillos por placa (concentración de células por pocillo de  $1.5 \cdot 10^4$ ), y

se añade medio de rutina con SBF al 10%. Se inocula 100  $\mu$ L de esa suspensión a cada pocillo y a continuación se añaden 100  $\mu$ L con el medio de rutina pero en este caso, conteniendo la concentración deseada del tóxico de interés. Se deja incubar 24 horas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $90\% \pm 5\%$  de humedad y  $5.0\% \pm 1\%$   $\text{CO}_2$ .

#### **4.5 PREPARACIÓN DE LOS TÓXICOS.**

Para la preparación de las distintas soluciones hay que tener en cuenta las propiedades de solubilidad de los compuestos tóxicos a estudiar. Dependiendo de su solubilidad se preparan de la siguiente forma, independientemente de la línea celular empleada:

##### **-Compuestos solubles en DMSO:**

Para los tóxicos solubles en DMSO se prepara una disolución inicial en DMSO de 200 veces la concentración más alta a probar. A partir de ésta, más concentrada, se realizan diluciones seriadas para obtener las soluciones 200x del resto de concentraciones menores que quieren probarse. A continuación se realiza una dilución 1/100 con el medio de cultivo de cada una de las concentraciones 200x, obteniéndose así una concentración de tóxico 2x. Finalmente se añade a cada pocillo 100  $\mu$ L de estas soluciones 2x, que junto con los 100  $\mu$ L de medio de rutina añadidos inicialmente al pocillo, resultan la concentración final deseada del tóxico.

### **- Compuestos solubles en medio de cultivo:**

Para los tóxicos solubles en medio, se prepara una disolución inicial en medio al doble de la concentración más alta a probar. A partir de ésta, más concentrada, se realizan diluciones seriadas para obtener las soluciones 2x del resto de concentraciones menores que quieren probarse. Finalmente se añade a cada pocillo 100  $\mu$ L de estas soluciones 2x, que junto con los 100  $\mu$ L de medio de rutina añadidos inicialmente al pocillo, resultan la concentración final deseada del tóxico.

### **4.6 RANGO AMPLIO DE CONCENTRACIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA IC50**

Para realizar los estudios citómicos, es necesario establecer un rango amplio de concentraciones que va desde la IC20 a la IC80, es decir, la concentración de tóxico que produce un 20 y un 80% de inhibición de la viabilidad, respectivamente. A partir de este rango, es necesario establecer la IC50, definida como la concentración de tóxico que produce un 50% de muerte celular. Para determinar la IC50 se realiza un rango de 5 concentraciones crecientes de tóxico observándose porcentajes crecientes de muerte celular. El ensayo utilizado es el de yoduro de propidio.

#### **4.6.1 ENSAYO DE YODURO DE PROPIDIO**

Después de las 24 horas de incubación con el tóxico, se procede a realizar el ensayo de yoduro de propidio que discrimina las células vivas de las células apoptóticas y necróticas. En el caso de B50 y NRK-52E se recoge el sobrenadante de cada pocillo, (200  $\mu$ L) que contiene las células apoptóticas y necróticas que se han despegado y se transfiere a los correspondientes tubos de polipropileno. A continuación se añaden 50  $\mu$ L de PBS para eliminar los restos de medio y se transfieren al tubo. Para disgregar las células de la monocapa adheridas a la superficie del pocillo se emplean 50  $\mu$ L de tripsina-EDTA 25% en cada pocillo, se deja incubar 5 minutos a 37°C en el incubador y se recoge. Se añaden 100  $\mu$ L de medio de rutina conteniendo el yoduro de propidio teniendo una concentración final de propidio en cada tubo de 2,5  $\mu$ g/mL.

En el caso de las células en suspensión se recogen los 200  $\mu$ L de cada pocillo y se transfieren a los tubos de polipropileno, se añaden 100  $\mu$ L de medio de rutina conteniendo el yoduro de propidio teniendo una concentración final de propidio en cada tubo de 2,5  $\mu$ g/mL. Finalmente se añaden otros 100  $\mu$ L de medio de rutina que garantiza en todo momento un volumen adecuado para la correcta toma de la muestra del citómetro.

En todos los casos se deja incubar en oscuridad 10 minutos a 37°C y se mide con el citómetro de flujo Gallios excitando con el láser azul a 488nm y emitiendo fluorescencia roja a 635nm.

## 4.7 ENSAYOS CITÓMICOS

A partir de la determinación de la IC50 para cada tóxico mediante el ensayo de yoduro de propidio, se emplea el ensayo citómico correspondiente para la determinación de la EC50, es decir, de la concentración molar de tóxico que produce el 50% del efecto máximo de un compuesto sobre el parámetro de citotoxicidad en estudio. El efecto del tóxico se cuantifica a través del cambio en la intensidad media de la fluorescencia emitida por el fluorocromo marcador del parámetro en estudio. La EC50 para cada tóxico se calcula como la intensidad de fluorescencia que corresponde al 50% de la intensidad de fluorescencia máxima detectada entre un rango de concentraciones del tóxico comprendidas entre la IC20 y la IC80.

El ensayo citómico consta de la medición de 7 parámetros celulares, cada uno de ellos medido a través del fluorocromo específico. Cada fluorocromo presenta una determinada longitud de onda de absorción y de emisión, aspecto importante a la hora de diseñar el experimento y poder medir varios parámetros simultáneamente (Tabla 3).

Dentro de los 7 parámetros a medir, éstos se han dividido en dos grupos, dando lugar a dos paneles citómicos. Por un lado se clasifican los parámetros relativos a la citotoxicidad dando lugar al panel citotóxico: calcio y potenciales de membrana plasmático y mitocondrial. Por otro lado, se encuentra el panel de estrés oxidativo, formado por los niveles de peróxidos, superóxido mitocondrial, óxido nítrico y el glutatión.

#### **4.7.1 PREPARACIÓN DE LOS FLUOROCROMOS**

El stock de cada fluorocromo empleado se prepara siguiendo las instrucciones del proveedor, y se almacenan en un congelador a -80°C. Tanto la concentración stock como la concentración final de cada uno de los fluorocromos sirven para las tres líneas celulares. La mayoría de compuestos se diluyen empleando el dimetilsulfóxido (DMSO), disolvente orgánico ampliamente utilizado, a excepción del yoduro de propidio, cuyo solvente es el agua desionizada (Tabla 4).

#### **4.7.2 TINCIÓN CELULAR Y ANÁLISIS EN EL CITÓMETRO**

Para realizar la tinción celular, para B50 y NRK-52E se recoge el sobrenadante de cada pocillo, (200 µL) que contiene las células apoptóticas que se han despegado y se transfiere a los correspondientes tubos de polipropileno. A continuación se añaden 50 µL de PBS para eliminar los restos de medio y se transfieren al mismo tubo. Para disgregar las células de la monocapa adheridas a la superficie del pocillo se emplean 50µL de tripsina-EDTA 25% en cada pocillo, se deja incubar 5 minutos a 37°C en el incubador y se recoge. En el caso de las células en suspensión se recogen los 200 µL de cada pocillo y se transfieren a los tubos de polipropileno, se añaden 100 µL de medio de rutina.

Finalmente se añaden 100 µL de una solución al 4x de la combinación de fluorocromos que se desee estudiar, siempre

teniendo presente que dichas combinaciones sean compatibles a nivel del espectro de fluorescencia de cada fluorocromo y de la compensación del solapamiento espectral de las fluorescencias de los distintos fluorocromos. Se deja incubar a 37°C en oscuridad durante 15 minutos para el fluorocromo DIBAC y 30 minutos para TMRM, Fluo-4, H<sub>2</sub>DCF, MITOSOX, DAF-FM y MCB.

Inmediatamente después se procede a medir en el citómetro de flujo Cytomics FC500 (Beckman-Coulter, Brea, CA) todos los fluorocromos excepto para el MCB, que se emplea el citómetro Gallios (Beckman-Coulter, Brea, CA) que dispone de láser violeta. En todas las medidas citométricas se recoge un número elevado de células, además de realizar los experimentos por triplicado para poder determinar la validez estadística de los datos y la significación de los resultados.

Los ensayos citómicos son distintas combinaciones multiparamétricas que incluyen indicadores de la estructura y viabilidad celular, como son el tamaño celular (estimado por la dispersión frontal de la luz) y la textura intracelular (estimado por dispersión ortogonal de la luz ), junto con indicadores del estado funcional de las células, como potencial de membrana plasmática y mitocondrial, niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup>, niveles de radical superóxido y actividad peroxidativa intracelular, niveles intracelulares de óxido nítrico y de glutatión.

La inclusión de los parámetros citómicos de viabilidad se utiliza para acotar informáticamente la población de células vivas (Figura 7),

por lo que los datos de carácter funcional pueden así ser referidos exclusivamente a las células vivas. Esta estrategia, que sólo la citómica permite, proporciona indicadores de efectos tempranos de los compuestos (análisis en células vivas), permite cuantificar la potencia citotóxica (porcentaje de células muertas) y estudiar mecanismos de toxicidad y resistencia (comparación de marcadores funcionales ente células vivas y muertas).

#### **4.7.3 CONTROLES POSITIVOS**

Para validar los procedimientos llevados a cabo en los ensayos citómicos, se diseñaron una serie de controles positivos, es decir, compuestos que producen un cambio en la intensidad de fluorescencia de los fluorocromos empleados debido a la modificación de la especie de interés. Los controles positivos pueden aumentar o disminuir el parámetro ensayado, después de actuar durante un tiempo determinado y a una concentración conocida (Tabla 5).

El tratamiento con las concentraciones de estos compuestos debe estar controlado, con el objetivo de producir el cambio deseado sin disminuir excesivamente la viabilidad celular. Como se ha comentado anteriormente, se trata de observar cambios en los parámetros funcionales y por tanto, debe referirse el dato exclusivamente a células vivas.

#### 4.7.4 CÁLCULO DE IC50

La IC50 es la concentración de tóxico a la cual se inhibe la viabilidad celular en un 50%, medida a través del ensayo del yoduro de propidio, descrito anteriormente. La IC50 se calcula con el programa informático Phototox (Figura 8).

#### 4.7.5 CÁLCULO DE EC50

- **EC50:** 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. La EC50 se calcula con el programa GraphPadPrism o Microsoft Office Excel 2007:

Para determinar la EC50 es necesario calcular los siguientes parámetros:

- **Media aritmética:** de las intensidades de fluorescencia para las réplicas 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 Relativa (%):** la desviación estándar no deberá ser superior al 15%.

- **MIF50:** es 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 basal.

- **RMF150:** es la mitad del valor máximo del ratio.

Una vez calculados todos los parámetros, se representa en el eje de abscisas los ratios de fluorescencias, y en el eje de ordenadas el logaritmo de las concentraciones del compuesto químico. A continuación se realiza el ajuste más apropiado y se obtiene la ecuación junto con el coeficiente de correlación.

Sobre la ecuación obtenida, se sustituye la x de la ecuación por la mitad del valor máximo del ratio, es decir, por RMF150, y se obtiene la concentración en logaritmo. Realizando la inversa del logaritmo se obtiene finalmente la EC50 de interés (Figura 9).

#### **4.7.6 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LOS ENSAYOS CITOMICOS PARA PREDECIR TOXICIDAD AGUDA EN RATA**

Para valorar la capacidad predictiva de la toxicidad aguda en rata en los ensayos de citotoxicidad realizados *in vitro*, se han establecido una serie de correlaciones comparando con los valores de IC50 *in vitro* en el test de captación de Rojo Neutro por 3T3 (Sjöström et al., 2008), con valores LD50 *in vivo* de rata, dato proporcionado por el Proyecto Europeo ACuteTox (Hoffmann et al., 2010) y con valores

LC50 en sangre determinados en casos de envenenamientos en humano (Sjöström et al., 2008).

También se han comparado los datos publicados en la bibliografía con la concentración mínima tóxica, es decir, la concentración a partir de la cual suelen aparecer efectos tóxicos dando lugar a un cambio en los parámetros de estudio. Se han realizado estudios empleando los coeficientes de correlación para cada línea celular y para el conjunto de las líneas. En cuanto al número de ensayos, se ha trabajado con los siete parámetros en estudio y por otro lado, incluyendo la IC50 teniendo presentes el total de los ensayos.

Partiendo de las concentraciones mínimas de tóxico, se han agrupado por parámetros para cada línea celular, permitiendo establecer una relación entre el tipo de línea celular y los parámetros citotóxicos. Se ha podido clasificar los compuestos según su sensibilidad frente a los cambios dependiendo el origen de la línea celular en que se ha realizado el ensayo.

#### **4.7.7 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LOS ENSAYOS CITOMICOS PARA CLASIFICAR LOS COMPUESTOS SEGÚN LA ESCALA DEL SISTEMA GHS Y LA REGULACIÓN CLP**

Para valorar la utilidad del ensayo citómico *in vitro* empleado, se distribuyen los patrones de toxicidad de los datos generados en forma de matriz, empleando para ello los programas informáticos “Cluster” y “Treeview”, ambos disponibles en <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>.

Los 57 compuestos testados se han distribuido en cinco clases de toxicidad, siguiendo los criterios del Global Harmonization System (GHS), una clasificación establecida por las Naciones Unidas para la clasificación y etiquetado de los compuestos basada en los valores de la LD50 en rata *in vivo*.

Las cinco clases establecidas por GHS son:

- Clase I: toxicidad aguda estimada  $\leq 5$  mg/kg.
- Clase II: toxicidad aguda estimada  $>5$  y  $\leq 50$  mg/kg.
- Clase III: toxicidad aguda estimada  $>50$  y  $\leq 300$  mg/kg.
- Clase IV: toxicidad aguda estimada  $>300$  y  $\leq 2000$  mg/kg.
- Clase V:  $>2000$  y  $\leq 5000$  mg/kg o no tóxico.

A continuación, se han clasificado los 57 compuestos siguiendo la aplicación de la escala GHS a nivel de la Unión Europea, que recibe el nombre de “Regulación CLP”. Esta normativa regula la clasificación, etiquetado y empaquetado de sustancias y mezclas, basada también en los valores de la LD50 en rata *in vivo*.

El criterio CLP establece 4 categorías:

- Categoría 1: toxicidad aguda estimada  $\leq 5$  mg/kg.
- Categoría 2: toxicidad aguda estimada  $>5$  y  $\leq 50$  mg/kg.
- Categoría 3: toxicidad aguda estimada  $>50$  y  $\leq 300$  mg/kg.
- Categoría 4: toxicidad aguda estimada  $>300$  y  $\leq 2000$  mg/kg.

En primer lugar, se han clasificado los 57 compuestos químicos ensayados siguiendo la clasificación GHS, basada en la LD50 de rata. Al presentar los mismos rangos de concentraciones en cada clase o

categoría, la clasificación de los compuestos tendrá el mismo resultado independientemente de la normativa seguida, GHS o CLP.

Al tratarse de un método *in vitro*, además de la clasificación basada en la LD50 de rata, los compuestos se han organizado también según la IC50 del ensayo de captación de Rojo Neutro en 3T3. Esta clasificación servirá para comprobar la robustez y la validez del método empleado ya que en este caso, se comparan dos métodos *in vitro*.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, con líneas celulares humanas homólogas a las empleadas en este estudio, demostraron que la clasificación de los compuestos basada en la LC50 en humano resultó ser un buen método para obtener resultados satisfactorios debido a la similitud entre especies. Para comprobarlo en el presente trabajo, se ha realizado la clasificación de los compuestos basada en la LC50 de humano (Prieto et al., 2013; Clothier et al., 2013).

En todos los casos se ha trabajado con los datos obtenidos debido al efecto de los tóxicos, pero también se ha realizado la clasificación de estos compuestos teniendo presente la dosis máxima ensayada, en aquellos casos donde había una ausencia de efecto por parte del tóxico.

#### **-Transformación de los resultados**

La IC50 y la EC50 son la concentración molar de tóxico que produce el 50% del efecto máximo. Para establecer el grado de

toxicidad de los compuestos utilizando la clasificación GHS, es necesario convertir los valores de concentración molar a unidades de peso por litro o kilogramo. Además para asegurar la escala requerida por el programa “Cluster” (son necesarios valores positivos y negativos), se realizó una transformación en logaritmo de base diez.

A continuación, se ordenaron los compuestos por orden decreciente de toxicidad, usando como referencia la LD50 *in vivo* de rata.

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 este criterio, 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 descrita anteriormente según el GHS, 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.

Usando la clasificación de toxicidad según la normativa CLP de la Unión Europea, se emplea el mismo código de colores pero aplicado a las cuatro categorías.

Además de la clasificación en las cinco clases o categorías según indica la escala GHS, también se han clasificado según el sistema europeo, la normativa CLP.

#### **4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En primer lugar, para evaluar si existen diferencias entre las distintas líneas celulares, se ha realizado la prueba T de dos muestras, el test de hipótesis nula por el cual se demuestra que la diferencia entre dos respuestas medidas en las mismas unidades científicas es cero, comparando las IC50 de las tres líneas celulares. El test estadístico se ha realizado con el programa “Minitab 15”.

En este trabajo se están estudiando un total de ocho variables que corresponden a los ocho parámetros citotóxicos y de estrés oxidativo medidos, en tres líneas celulares y para un total de 57 tóxicos por línea celular, es decir, 171 objetos para ocho variables.

Debido al gran volumen de datos generado, el análisis estadístico más adecuado es el análisis de componentes principales (PCA). Esta técnica facilitará la interpretación de los datos de una forma rápida y visual.

El análisis de componentes principales tiene como objetivo el analizar si es posible representar toda la información generada con un número menor de variables, construidas a partir de combinaciones lineales de las originales. El programa empleado para

el análisis de componentes principales es “The Unscrambler v7.6 (CAMO software AS, Norway)”.

Previamente, se ha trabajado con los ratios de fluorescencia que corresponde a cada IC50 o EC50 para aquellos tóxicos con dato. En el caso de que el tóxico no tuviera IC50 o EC50 se trabaja con el ratio de fluorescencia obtenido para la concentración de tóxico más alta probada. A continuación se realiza una normalización de los ratios de fluorescencia teniendo en cuenta las concentraciones, IC50 o la dosis más alta probada. La matriz de datos se ha obtenido con el programa Microsoft Office Excel 2007.

La matriz de datos generada se emplea para el PCA, de forma que todos los datos estén en la misma escala y tengan el mismo peso independientemente del valor. Los resultados obtenidos proporcionan dos tipos de gráficas:

- **Scores:** Representan las proyecciones de los objetos sobre un espacio de dos dimensiones definido por parejas de los componentes principales más importantes, es decir, aquellos que explican con una mayor varianza el modelo. Cada punto se sitúa sobre el plano por sus coordenadas con relación a estos ejes.
- **Loadings:** Para favorecer la interpretación de los componentes principales, se representa otra gráfica con las variables originales, sobre el mismo plano de dos dimensiones definido por los mismos componentes principales que para el gráfico de “scores”. Son vectores proyectados desde el 0 que proporcionan el peso de cada variable sobre cada uno de los ejes. El peso de cada variable

estará determinado por sus coordenadas sobre cada eje, cuanto mayores sean mejor explicado estará ese parámetro.

Para finalizar, una vez obtenido el gráfico final de “loadings”, se realiza un estudio de asociación entre variables, con el objetivo de establecer similitudes entre ellas y poder relacionarlas según el significado biológico. Para ello se emplea la medida del coseno del ángulo de vectores.

El coseno del ángulo es una medida para establecer el paralelismo entre dos vectores, ya que dos vectores son paralelos cuando el coseno del ángulo que forman es uno en valor absoluto. Esta medida es independiente, salvo el signo, de la longitud de los vectores considerados. Esta medida integrará los resultados estadísticos con el significado biológico de las observaciones.

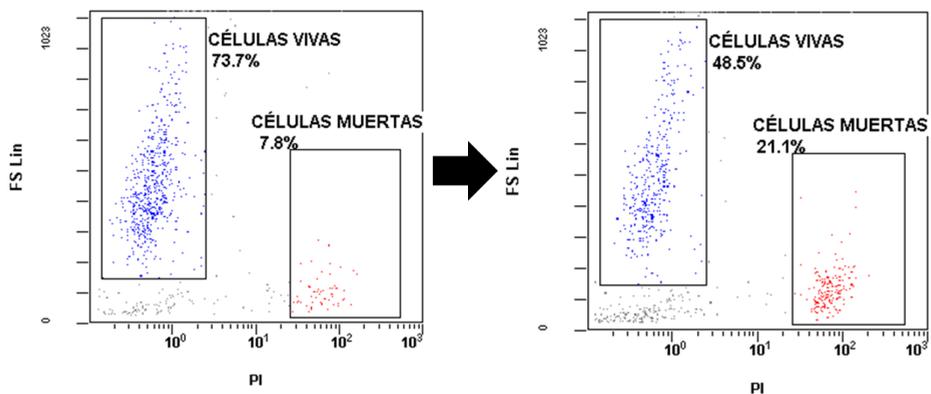
Para finalizar, se muestra el esquema de trabajo resumido llevado a cabo, en la Figura 10.

PARÁMETRO	FLUOROCROMO O SUSTRATO FLUOROGÉNICO	$\lambda_{ex}$	$\lambda_{em}$
Niveles intracelulares de $Ca^{2+}$	FLUO-4AM	488 nm	506 nm
Potencial de membrana plasmática	DIBAC	488 nm	516 nm
Potencial de membrana mitocondrial	TMRM	488 nm	625 nm
Niveles intracelulares radical superóxido	MITOSOX	488 nm	590 nm
Niveles intracelulares de peróxidos	H <sub>2</sub> DCFDA	488 nm	515 nm
Niveles intracelulares de óxido nítrico	DAF-FM DA	488 nm	515 nm
Niveles de glutatión	MCB	394 nm	461 nm

**Tabla 3:** Resumen de los parámetros que se van a medir, el fluorocromo que corresponde a cada parámetro y sus longitudes de onda de excitación y emisión.

Fluorocromo	Proveedor	Solvente	[ ] stock	[ ] final
DIBAC	INVITROGEN (B-438)	DMSO	1 mM	1,2 $\mu$ M
TMRM	INVITROGEN(T-668)	DMSO	1 mM	100 nM
FLUO-4	INVITROGEN (F-14201)	DMSO	500 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M
PI	SIGMA (P-4170)	H <sub>2</sub> O	1 mg/mL	2,5 $\mu$ g/mL
H <sub>2</sub> DCF	SIGMA (D-6886)	DMSO	1mg/mL	5 $\mu$ g/mL
MITOSOX	INVITROGEN (M36008)	DMSO	0,5 mM	5 $\mu$ M
DAF-FM DA	INVITROGEN (D-23842)	DMSO	5 mM	2 $\mu$ M
MCB	FLUKA-SIGMA (69899)	DMSO	40 mM	1 $\mu$ M

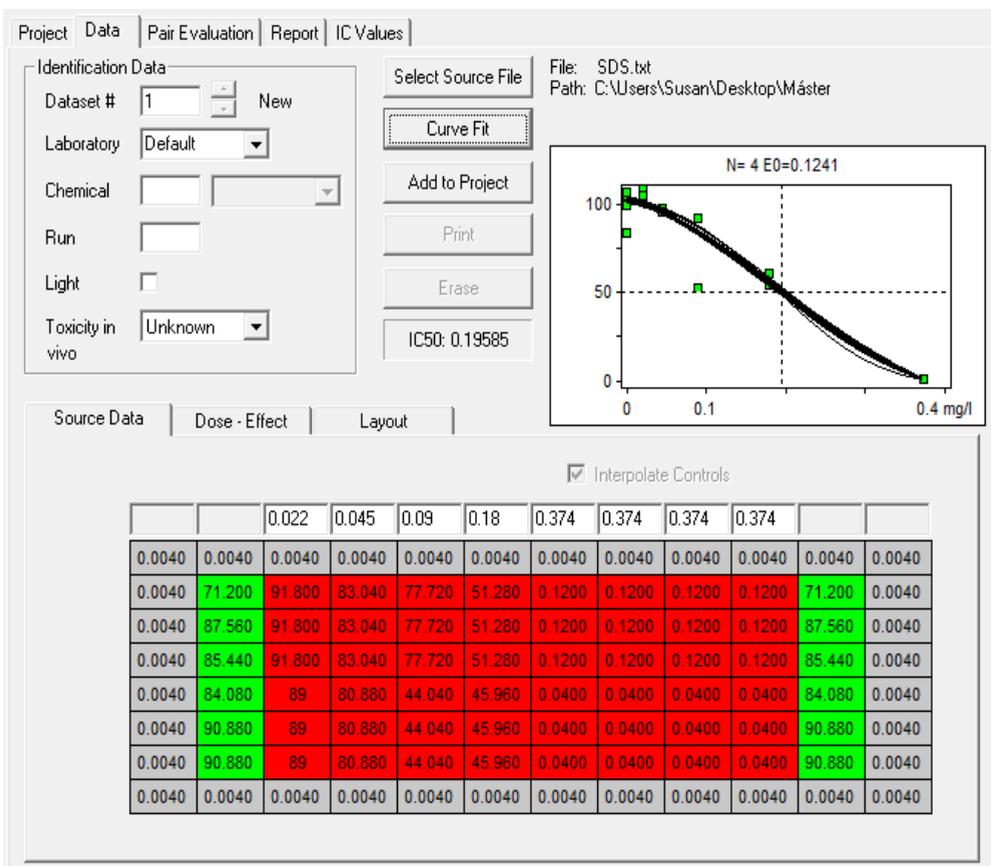
**Tabla 4:** Se indican las concentraciones finales y stock para el conjunto de fluorocromos, así como el solvente adecuado, la referencia y la casa comercial para cada uno de los fluorocromos empleados.



**Figura 7:** Ejemplo de la selección de la población de células vivas a través del marcador de viabilidad yoduro de propidio en ausencia y presencia de un compuesto tóxico.

Compuesto	Efecto	Proveedor	Tiempo incubación	[ ] <sub>final</sub>
Gramicidina	Ionóforo	SIGMA (G-5002)	5'	20 $\mu$ M
Ionicina	Ionóforo calcio	SIGMA (I0634)	5'	70 $\mu$ M
FCCP	Desacoplante mitocondrial	SIGMA (C2920)	5'	20 $\mu$ M
Plumbagina	Generación superóxido	SIGMA (P-7262)	1h	80 $\mu$ M
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Estrés oxidativo	SIGMA (H1009)	30'	100 $\mu$ M
NOR-1	Generación NO	CALBIOCHEM (489510)	5'	1 $\mu$ M
L-BSO	Inhibidor síntesis glutatión	SIGMA (B2515)	4h	200 $\mu$ M

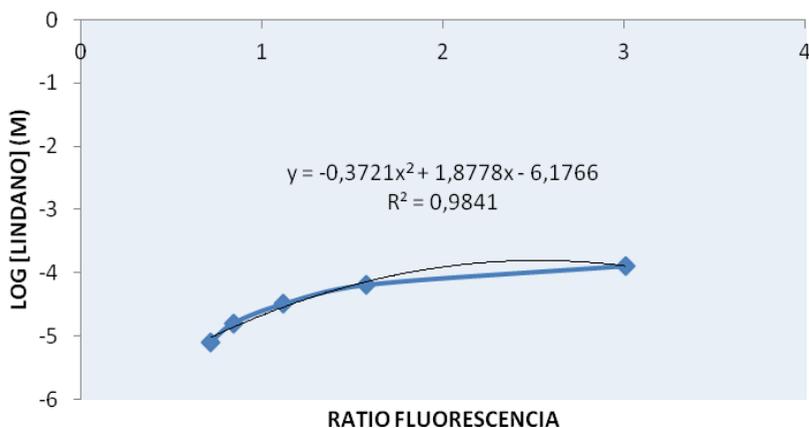
**Tabla 5:** Resumen de los compuestos empleados como controles positivos, efecto que producen, referencia y casa comercial. Tiempo de incubación y concentración final que se emplea para cada uno de ellos.



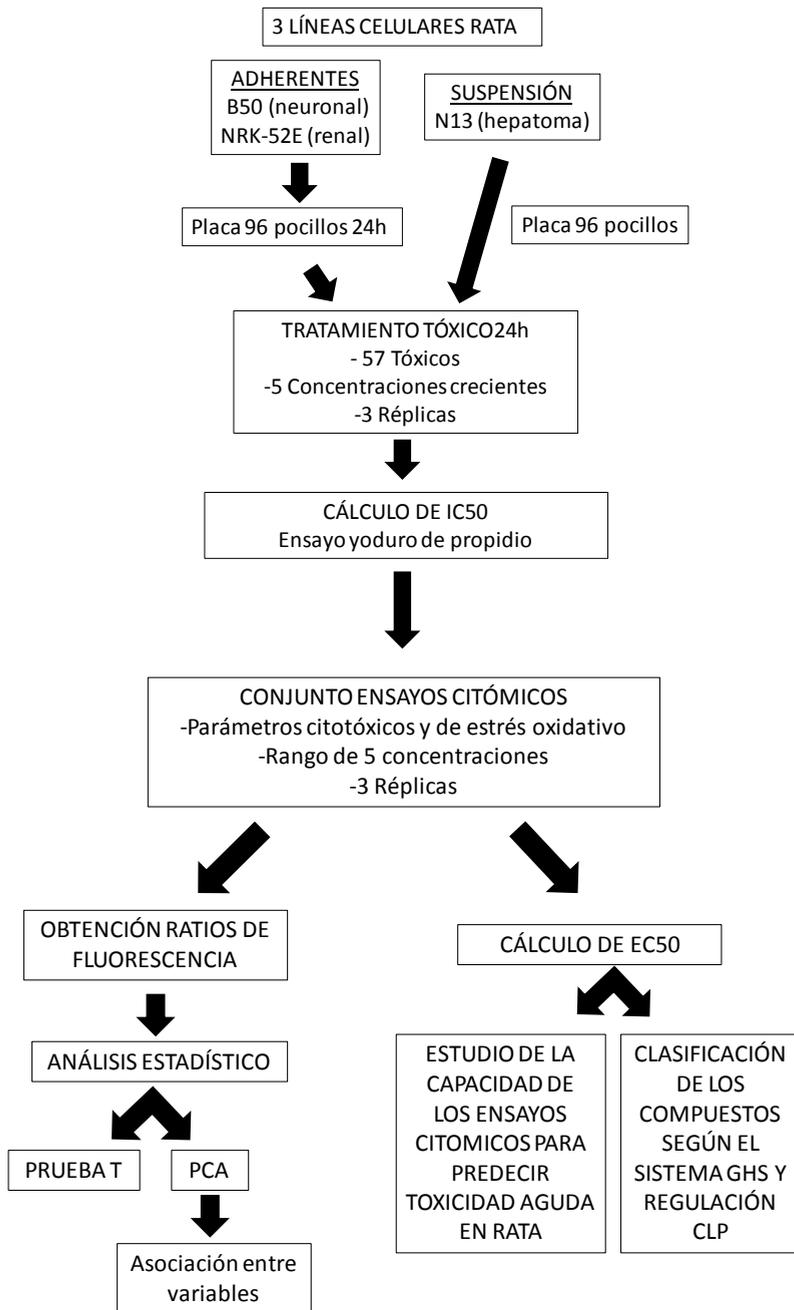
**Figura 8:** Ejemplo del cálculo de IC50 realizado con el programa Phototox. Se muestra la curva para las distintas concentraciones en función de los valores de viabilidad del ensayo yoduro de propidio, tomando como referencia los valores de viabilidad de los controles.

		CONCENTRACIONES (M)					
		CONTROL	8,00E-06	1,60E-05	3,20E-05	6,50E-05	1,29E-04
I. FLUORESCENCIA		1,04	0,752	0,811	1,07	1,31	2,47
		0,897	0,724	0,702	1,07	1,56	2,89
		0,937	0,583	0,906	1,06	1,66	3,28
<b>MEDIA</b>		0,96	0,69	0,81	1,07	1,51	2,88
<b>SD</b>		0,07	0,10	0,10	0,01	0,18	0,41
<b>SD%</b>		7,7	13,2	12,7	0,5	11,9	14,1
<b>DOSIS (M)</b>	<b>LOG DOSIS (M)</b>	<b>RATIO</b>	<b>MEDIA</b>	<b>SD</b>	<b>SD%</b>		
8,00E-06	-5,10	0,72	0,69	0,10	13,2		
1,60E-05	-4,80	0,84	0,81	0,10	12,7		
3,20E-05	-4,49	1,11	1,07	0,01	0,5		
6,50E-05	-4,19	1,58	1,51	0,18	11,9		
1,29E-04	-3,89	3,01	2,88	0,41	14,1		
	<b>MIF50</b>	<b>RMFI50</b>	<b>LOG DOSIS EC50</b>	<b>EC50 (M)</b>	<b>SD%</b>		
	1,44	1,5	-4,19	6,39E-05	14,1		

### N13 Lindano DiBAC



**Figura 9:** Ejemplo del cálculo de EC50 realizado con el programa Office Excel 2007. Se muestran los cálculos y la gráfica donde se representa en el eje X el ratio de fluorescencia y en el eje Y el logaritmo de la concentración de tóxico, aparece la ecuación del ajuste junto al coeficiente de correlación obtenido.



**Figura 10:** Esquema del diseño experimental y el trabajo completo llevado a cabo.

## **5. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL**

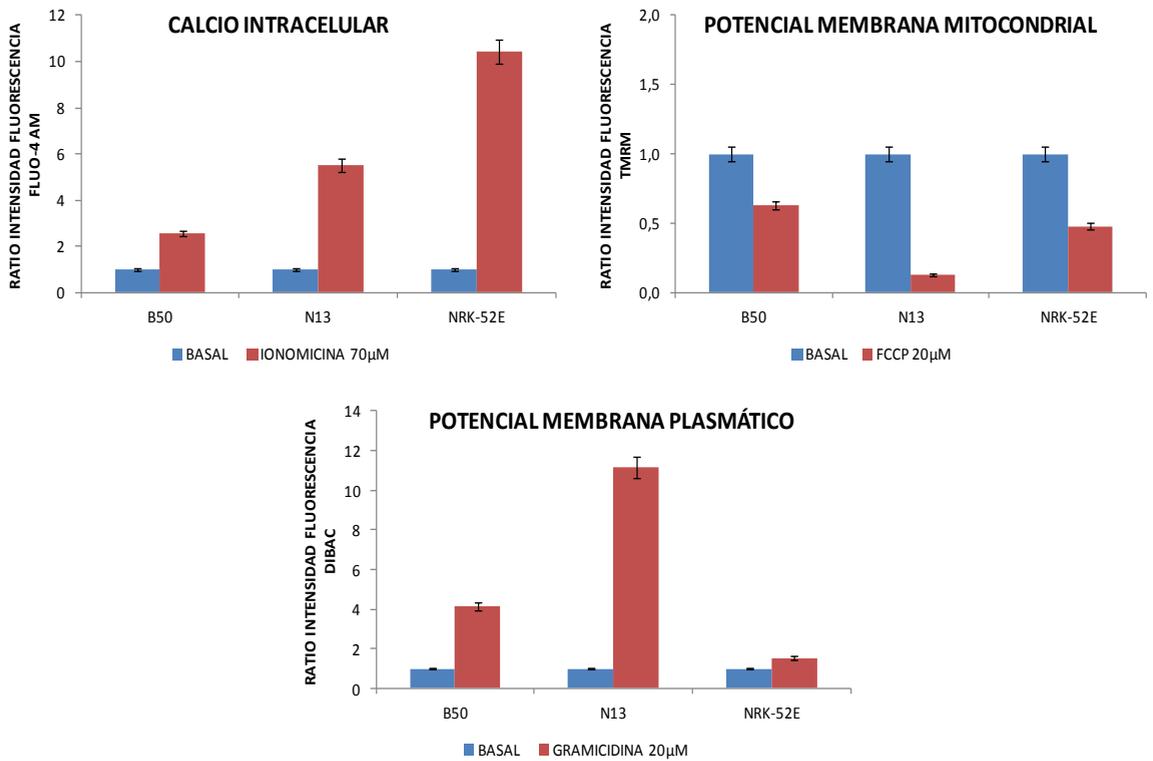
### **5.1 CONTROLES POSITIVOS**

Para validar los procedimientos llevados a cabo en los ensayos citómicos, se diseñaron una serie de controles positivos. Los resultados muestran los controles del panel citotóxico (Figura 11), y los controles del panel oxidativo (Figura 12).

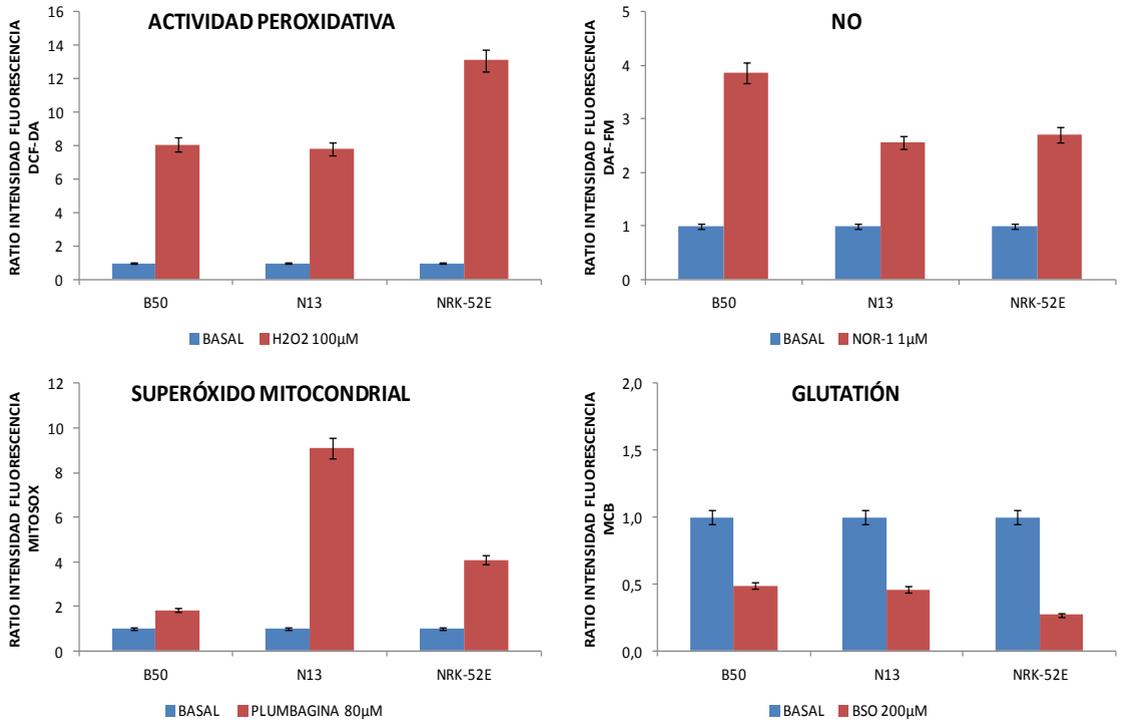
En el panel citotóxico (Figura 11), se puede observar que la ionomicina provoca el incremento de los niveles intracelulares de calcio, medidos a través de Fluo-4 AM. La gramicidina también incrementa la fluorescencia de DiBAC a través del cambio en la permeabilidad de la membrana celular. Por último, el desacoplante mitocondrial FCCP produce un descenso en la fluorescencia de TMRM.

Los controles positivos para el panel oxidativo comentados anteriormente, producen un incremento de los niveles de actividad peroxidativa, de óxido nítrico y superóxido, que se traduce en mayores niveles de fluorescencias para DCFH-DA, DAF-FM y MitoSox respectivamente. El BSO actúa como inhibidor de la síntesis de glutatión provocando la disminución de la fluorescencia del MCB (Figura 12).

Los comportamientos observados en todos los casos son comunes a las tres líneas celulares. Los resultados demuestran la validez y especificidad de los fluorocromos empleados en el estudio.



**Figura 11:** Controles positivos correspondientes al panel citotóxico realizados para las tres líneas celulares. Las gráficas muestran la media  $\pm$  DS de tres experimentos por triplicado.



**Figura 12:** Controles positivos correspondientes al panel de estrés oxidativo y el glutatión realizados para las tres líneas celulares. Las gráficas muestran la media  $\pm$  DS de tres experimentos por triplicado.

## 5.2 CÁLCULO DE IC50 Y EC50

Se ha calculado la IC50 para cada una de las tres líneas celulares y para los 57 compuestos químicos empleados. Para realizar el posterior análisis de la capacidad de los estudios para clasificar los compuestos según la escala del sistema GHS y la regulación CLP, se ha utilizado la concentración más alta probada, limitada por la solubilidad del compuesto en aquellos casos donde el compuesto no presentaba efecto (Tabla 6).

A partir de la IC50 se han establecido las concentraciones óptimas para realizar el estudio de los paneles citómicos. Se han calculado las EC50 de los parámetros de citotoxicidad (Tablas 7, 8 y 9), y de estrés oxidativo (Tablas 10, 11 y 12) estudiados para cada una de las tres líneas celulares y para los 57 compuestos tóxicos empleados. En los casos donde el compuesto no presentaba efecto, se ha utilizado la concentración más alta probada limitada por la solubilidad del compuesto.

Número AcuteTox	Compuesto químico	B50 IC50	NRK-52E IC50	N13 IC50
1	Acetaminofen	≥4,60E-02	1,21E-02 ± 1,22E-03	≥4,60E-02
2	Ácido acetilsalicílico	≥2,00E-02	≥2,00E-02	1,61E-02 ± 2,33E-04
3	Atropina sulfato monohidrato	2,53E-03 ± 6,94E-05	1,63E-03 ± 5,54E-05	3,17E-03 ± 2,44E-04
4	Cafeína	3,98E-02 ± 2,07E-03	7,55E-03 ± 6,16E-04	≥4,00E-02
5	Carbamazepina	≥1,25E-03	≥1,25E-03	≥1,25E-03
6	Colchicina	≥5,00E-04	3,30E-04 ± 1,41E-05	≥5,00E-04
7	Cicloheximida	3,06E-03 ± 5,04E-04	≥1,00E-02	≥1,00E-02
9	Digoxina	≥3,20E-04	≥3,20E-04	≥3,20E-04
10	Alcohol isopropílico	1,19E-02 ± 1,21E-03	8,46E-03 ± 8,13E-04	2,40E-02 ± 3,59E-04
11	Malatión	4,50E-04 ± 1,35E-05	7,63E-04 ± 2,37E-05	7,79E-04 ± 2,33E-05
12	Cloruro mercurio (II)	4,50E-05 ± 7,35E-06	9,50E-06 ± 1,15E-06	8,80E-06 ± 4,09E-08
13	Pentaclorofenol	1,86E-04 ± 7,93E-06	4,30E-05 ± 1,26E-06	≥3,80E-04
14	Fenobarbital	≥2,00E-02	≥2,52E-02	≥2,00E-02
15	Sodio lauril sulfato	1,96E-04 ± 2,49E-05	1,56E-04 ± 2,21E-05	5,44E-04 ± 1,96E-05
16	Valproato sódico	1,70E-01 ± 6,02E-03	7,74E-02 ± 5,46E-03	7,16E-02 ± 1,00E-02
17	5-fluorouracilo	≥3,60E-02	≥3,60E-02	≥3,60E-02
18	Benceno	≥2,00E-02	≥2,00E-02	≥2,00E-02
19	Tert butil hidroperóxido	4,29E-05 ± 4,48E-06	4,48E-05 ± 3,37E-06	2,61E-04 ± 4,73E-07
21	Cloruro cadmio (II)	6,00E-05 ± 1,83E-06	7,40E-05 ± 3,13E-06	6,40E-05 ± 7,66E-07
23	Pireno	≥6,25E-05	≥6,25E-05	≥6,25E-05
26	Hexaclorobenceno	≥3,80E-05	≥3,80E-05	≥3,80E-05
28	Amiodarona hidrocloreuro	2,30E-05 ± 2,73E-06	2,20E-05 ± 2,75E-06	5,10E-05 ± 1,60E-06
29	Verapamil hidrocloreuro	1,23E-04 ± 1,85E-05	1,99E-04 ± 1,43E-05	1,42E-04 ± 7,63E-06
30	Rifampicina	≥2,50E-04	≥2,50E-04	≥2,50E-04
31	Tetraciclina hidrocloreuro	≥2,50E-04	≥2,50E-04	≥2,50E-04
32	Orfenadrina hidrocloreuro	3,64E-04 ± 6,04E-05	3,74E-04 ± 3,73E-05	1,18E-03 ± 1,04E-04
33	Nicotina	7,85E-03 ± 4,53E-04	6,97E-03 ± 8,20E-04	1,01E-02 ± 3,44E-04
34	Lindano	≥1,29E-04	≥1,29E-04	≥1,29E-04
37	Etanol	1,21E+00 ± 3,50E-02	6,90E-01 ± 4,41E-02	1,82E+00 ± 2,41E-02
38	Paratión	≥1,00E-03	≥1,00E-03	≥1,00E-03
39	Diclorvos	1,68E-03 ± 8,86E-05	8,42E-04 ± 4,45E-06	1,45E-03 ± 1,85E-04
40	Fisostigmina	1,90E-03 ± 4,06E-04	1,80E-03 ± 2,40E-04	2,10E-03 ± 1,41E-04
41	Glufosinato amónico	4,70E-02 ± 4,24E-03	4,27E-02 ± 4,68E-04	≥6,00E-02
42	Cis-dicloro-diaminplatino (II)	≥3,50E-04	≥3,50E-04	≥3,50E-04
43	Dietilenglicol	3,81E-01 ± 3,88E-02	2,19E-01 ± 2,08E-02	3,22E+00 ± 1,00E-01
44	Diquat dibromuro	2,04E-04 ± 2,86E-06	1,83E-04 ± 1,19E-05	8,51E-03 ± 3,98E-04
45	Ocratoxina A	≥1,00E-04	≥1,00E-04	≥1,00E-04
46	Ciclosporina A	2,40E-05 ± 7,14E-07	1,30E-05 ± 5,68E-07	≥2,50E-05
47	17a-etinilestradiol	1,50E-04 ± 1,24E-05	1,21E-04 ± 2,25E-05	≥3,20E-04
48	Fluoruro sódico	2,89E-03 ± 3,00E-04	5,81E-03 ± 1,10E-03	3,82E-03 ± 3,40E-04
49	Paraquat dicloruro	4,55E-03 ± 1,42E-04	5,42E-04 ± 5,74E-05	2,92E-02 ± 3,59E-03
51	Dimetilformamida	6,22E-01 ± 2,31E-02	2,03E-01 ± 1,41E-02	7,20E-01 ± 3,76E-02
53	Amitriptilina hidrocloreuro	4,30E-05 ± 9,86E-07	3,60E-05 ± 2,69E-06	≥5,00E-05
54	Etilenglicol	2,28E+00 ± 3,25E-01	6,87E-01 ± 1,48E-02	3,29E+00 ± 9,20E-02
55	Metanol	2,20E+00 ± 1,57E-01	1,95E+00 ± 1,14E-01	2,17E+00 ± 3,31E-02
57	Cloruro sódico	3,05E-01 ± 3,66E-02	1,46E-01 ± 1,13E-02	1,85E-01 ± 8,75E-03
60	Sulfato litio	1,74E-01 ± 1,92E-03	5,87E-02 ± 1,93E-03	3,14E-01 ± 8,92E-03
63	Propranolol hidrocloreuro	1,12E-04 ± 1,31E-05	8,40E-05 ± 6,31E-06	6,30E-04 ± 6,74E-05
64	Trióxido de arsénico	1,14E-04 ± 3,56E-06	8,90E-05 ± 2,71E-06	≥1,26E-04
66	Sulfato de talio	3,97E-04 ± 4,55E-05	3,36E-04 ± 2,76E-05	4,31E-03 ± 8,36E-04
67	Warfarina	≥4,65E-03	≥4,65E-03	≥4,65E-03
76	Hidrato de cloral	2,32E-02 ± 2,70E-03	5,59E-03 ± 6,80E-04	3,86E-02 ± 1,12E-03
77	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2,46E-02 ± 1,78E-03	≥3,00E-02	9,78E-03 ± 1,64E-04
80	Estricnina	≥1,25E-03	≥1,25E-03	≥1,25E-03
91	Selenato sódico	2,70E-03 ± 2,38E-04	8,50E-03 ± 5,20E-04	2,90E-02 ± 1,15E-03
92	Acetonitrilo	8,67E-01 ± 5,11E-02	3,03E-01 ± 2,33E-02	1,21E+00 ± 1,67E-02
96	Epinefrina bitartrato	1,00E-04 ± 1,03E-05	2,18E-04 ± 6,88E-06	4,85E-04 ± 7,75E-06

**Tabla 6:** Valores de IC50 obtenidos a través de la realización del ensayo del yoduro de propidio, para cada una de las tres líneas celulares empleadas. Los datos son la media ± DS de tres experimentos por triplicado. En aquellos compuestos donde no se observa efecto, se muestra la dosis más alta probada.

B50				
Número AcuteTox	Compuesto químico	DIBAC	FLUO-4 AM	TMRM
1	Acetaminofen	≥4,60E-02	≥4,60E-02	≥4,60E-02
2	Ácido acetilsalicílico	1,80E-03 ± 1,88E-04	2,99E-02 ± 3,51E-03	≥2,00E-02
3	Atropina sulfato monohidrato	4,86E-04 ± 1,18E-04	1,19E-03 ± 2,03E-04	2,94E-04 ± 2,23E-05
4	Cafeína	5,87E-03 ± 6,32E-04	9,63E-03 ± 3,61E-03	6,45E-02 ± 6,63E-03
5	Carbamazepina	4,82E-04 ± 4,34E-05	≥1,25E-03	≥1,25E-03
6	Colchicina	6,63E-05 ± 7,91E-06	1,07E-03 ± 2,41E-04	≥5,00E-04
7	Cicloheximida	3,94E-03 ± 3,44E-04	≥1,00E-02	≥1,00E-02
9	Digoxina	7,00E-05 ± 1,21E-05	8,69E-05 ± 1,75E-05	≥3,20E-04
10	Alcohol isopropílico	≥1,19E-02	5,12E-03 ± 1,05E-03	2,32E-02 ± 2,27E-03
11	Malatión	1,21E-03 ± 1,54E-04	1,77E-03 ± 2,77E-04	≥4,50E-04
12	Cloruro mercurio (II)	6,30E-06 ± 4,56E-07	3,27E-05 ± 2,70E-06	≥4,50E-05
13	Pentaclorofenol	4,92E-05 ± 7,34E-06	1,52E-04 ± 5,04E-05	7,12E-05 ± 2,09E-05
14	Fenobarbital	7,42E-03 ± 9,91E-04	7,10E-03 ± 2,06E-03	≥2,00E-02
15	Sodio lauril sulfato	1,56E-04 ± 1,27E-05	5,43E-04 ± 1,05E-04	7,30E-04 ± 2,55E-04
16	Valproato sódico	4,16E-02 ± 6,92E-03	6,84E-02 ± 6,79E-03	1,07E-01 ± 7,98E-03
17	5-fluorouracilo	≥3,60E-02	≥3,60E-02	≥3,60E-02
18	Benceno	≥2,00E-02	≥2,00E-02	≥2,00E-02
19	Tert butil hidroperóxido	7,46E-05 ± 1,05E-05	≥4,29E-05	≥4,29E-05
21	Cloruro cadmio (II)	4,48E-02 ± 5,21E-03	6,14E-06 ± 3,37E-07	≥6,00E-05
23	Pireno	≥6,25E-05	≥6,25E-05	≥6,25E-05
26	Hexaclorobenceno	≥3,80E-05	≥3,80E-05	≥3,80E-05
28	Amiodarona hidrocioruro	3,82E-06 ± 5,63E-07	9,54E-06 ± 1,13E-06	≥2,30E-05
29	Verapamil hidrocioruro	1,51E-05 ± 3,47E-06	2,73E-05 ± 2,56E-06	≥1,23E-04
30	Rifampicina	5,89E-04 ± 1,06E-04	1,10E-04 ± 2,16E-05	≥2,50E-04
31	Tetraciclina hidrocioruro	≥2,50E-04	≥2,50E-04	≥2,50E-04
32	Orfenadrina hidrocioruro	5,37E-04 ± 5,40E-05	1,38E-04 ± 2,91E-05	≥3,64E-04
33	Nicotina	2,82E-03 ± 2,26E-04	5,05E-03 ± 1,01E-03	2,82E-03 ± 2,26E-04
34	Lindano	5,95E-05 ± 9,42E-06	3,31E-06 ± 4,22E-07	≥1,29E-04
37	Etanol	4,57E-01 ± 1,01E-01	1,95E-01 ± 4,10E-02	1,39E+00 ± 2,83E-01
38	Paratión	≥1,00E-03	≥1,00E-03	≥1,00E-03
39	Diclorvos	≥1,68E-03	9,52E-04 ± 1,48E-04	≥1,68E-03
40	Fisostigmina	2,23E-04 ± 4,32E-05	9,53E-04 ± 1,42E-04	≥1,90E-03
41	Glufosinato amónico	2,18E-04 ± 2,81E-05	≥4,70E-02	≥4,70E-02
42	Cis-dicloro-diaminplatino (II)	2,38E-05 ± 2,75E-06	2,68E-05 ± 3,71E-06	≥3,50E-04
43	Dietilenglicol	3,75E-01 ± 2,78E-02	1,96E-01 ± 2,59E-02	2,88E-01 ± 1,55E-02
44	Diquat dibromuro	1,80E-05 ± 1,29E-06	4,68E-05 ± 1,08E-05	4,76E-06 ± 6,20E-07
45	Ocratoxina A	9,08E-06 ± 1,02E-06	≥1,00E-04	≥1,00E-04
46	Ciclosporina A	3,04E-06 ± 7,12E-07	2,55E-05 ± 3,24E-06	≥2,40E-05
47	17a-etinilestradiol	6,20E-05 ± 6,66E-06	4,18E-05 ± 1,19E-05	1,71E-04 ± 1,49E-05
48	Fluoruro sódico	9,62E-03 ± 2,09E-03	≥2,89E-03	≥2,89E-03
49	Paraquat dicloruro	2,80E-01 ± 8,46E-02	≥4,55E-03	≥4,55E-03
51	Dimetilformamida	2,57E-01 ± 7,19E-02	1,94E+00 ± 1,65E-01	≥6,22E-01
53	Amitriptilina hidrocioruro	1,71E-06 ± 2,68E-07	≥4,30E-05	≥4,30E-05
54	Etilenglicol	≥2,28E+00	2,85E-01 ± 4,93E-02	≥2,28E+00
55	Metanol	3,06E-01 ± 5,68E-02	2,69E-01 ± 4,96E-02	≥2,20E+00
57	Cloruro sódico	≥3,05E-01	≥3,05E-01	≥3,05E-01
60	Sulfato litio	7,92E-02 ± 1,19E-02	2,15E-01 ± 2,20E-02	1,07E-01 ± 7,08E-03
63	Propranolol hidrocioruro	5,19E-05 ± 6,24E-06	1,38E-04 ± 1,22E-05	≥1,12E-04
64	Trióxido de arsénico	1,38E-04 ± 1,75E-05	1,26E-05 ± 2,25E-06	≥1,14E-04
66	Sulfato de talio	1,01E-03 ± 2,10E-04	1,45E-04 ± 9,90E-06	≥3,97E-04
67	Warfarina	4,65E-03	≥4,65E-03	≥4,65E-03
76	Hidrato de cloral	4,46E-03 ± 2,98E-04	2,15E-02 ± 3,67E-03	2,90E-03 ± 4,23E-04
77	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	3,22E-05 ± 3,53E-06	2,67E-02 ± 1,19E-02	≥2,46E-02
80	Estricnina	1,81E-04 ± 3,79E-05	1,01E-04 ± 1,61E-05	≥1,25E-03
91	Selenato sódico	2,16E-05 ± 2,09E-06	5,02E-04 ± 6,37E-05	1,90E-04 ± 1,19E-05
92	Acetonitrilo	2,41E-01 ± 6,49E-02	1,24E-01 ± 2,28E-02	1,85E+00 ± 3,03E-01
96	Epinefrina bitartrato	9,45E-06 ± 3,59E-06	1,30E-04 ± 5,00E-05	≥1,00E-04

**Tabla 7:** Valores de EC50 obtenidos para los parámetros citotóxicos, para la línea celular de neuroblastoma de rata, B50. Los datos son la media ± DS de tres experimentos por triplicado. En aquellos compuestos donde no se observa efecto, se muestra la dosis más alta probada.

NRK-52E				
Número AcuteTox	Compuesto químico	DiBAC	FLUO-4 AM	TMRM
1	Acetaminofen	1,41E-03 ± 2,85E-04	≥1,21E-02	≥1,21E-02
2	Ácido acetilsalicílico	9,86E-04 ± 1,07E-04	9,88E-03 ± 2,51E-03	≥2,00E-02
3	Atropina sulfato monohidrato	1,64E-03 ± 1,49E-04	1,46E-03 ± 1,82E-04	5,73E-02 ± 5,66E-03
4	Cafeína	6,92E-04 ± 9,90E-05	5,81E-03 ± 2,95E-04	≥7,55E-03
5	Carbamazepina	≥1,25E-03	3,40E-05 ± 4,59E-06	≥1,25E-03
6	Colchicina	≥3,30E-04	1,22E-04 ± 2,97E-05	≥3,30E-04
7	Cicloheximida	≥1,00E-02	≥1,00E-02	≥1,00E-02
9	Digoxina	≥3,20E-04	≥3,20E-04	≥3,20E-04
10	Alcohol isopropílico	≥8,46E-03	1,41E-03 ± 1,44E-04	6,45E-03 ± 7,45E-04
11	Malatión	3,95E-05 ± 4,87E-06	5,63E-04 ± 4,03E-05	1,07E-03 ± 9,55E-05
12	Cloruro mercurio (II)	1,17E-06 ± 2,71E-07	7,39E-06 ± 6,33E-07	9,76E-07 ± 1,02E-07
13	Pentaclorofenol	3,57E-05 ± 7,05E-06	1,18E-05 ± 1,82E-06	3,88E-05 ± 1,41E-06
14	Fenobarbital	2,97E-03 ± 4,38E-04	6,89E-03 ± 1,36E-03	2,27E-02 ± 2,09E-03
15	Sodio lauril sulfato	≥1,56E-04	≥1,56E-04	1,71E-05 ± 4,67E-07
16	Valproato sódico	9,26E-02 ± 1,84E-02	2,29E-02 ± 4,30E-03	7,92E-02 ± 9,13E-03
17	5-fluorouracilo	≥3,60E-02	≥3,60E-02	≥3,60E-02
18	Benceno	≥2,00E-02	≥2,00E-02	≥2,00E-02
19	Tert butil hidroperóxido	5,10E-06 ± 1,52E-06	≥4,48E-05	≥4,48E-05
21	Cloruro cadmio (II)	8,29E-05 ± 5,28E-06	1,22E-05 ± 1,10E-06	≥7,40E-05
23	Pireno	3,65E-06 ± 6,85E-07	≥6,25E-05	≥6,25E-05
26	Hexaclorobenceno	≥3,80E-05	≥3,80E-05	≥3,80E-05
28	Amiodarona hidrocloreuro	2,41E-05 ± 3,65E-06	2,23E-06 ± 4,32E-07	2,93E-06 ± 4,88E-07
29	Verapamil hidrocloreuro	2,33E-05 ± 5,14E-06	≥1,99E-04	1,19E-04 ± 1,89E-05
30	Rifampicina	≥2,50E-04	2,50E-05 ± 5,67E-06	2,64E-04 ± 5,05E-05
31	Tetraciclina hidrocloreuro	4,18E-04 ± 5,75E-05	7,07E-04 ± 6,27E-05	≥2,50E-04
32	Orfenadrina hidrocloreuro	2,18E-04 ± 2,95E-05	6,00E-05 ± 1,50E-05	2,49E-04 ± 2,82E-05
33	Nicotina	2,68E-03 ± 4,65E-04	1,49E-03 ± 2,57E-04	4,92E-03 ± 5,05E-04
34	Lindano	2,10E-05 ± 3,08E-06	3,98E-05 ± 9,63E-06	≥1,29E-04
37	Etanol	≥6,90E-01	4,32E-01 ± 4,25E-02	≥6,90E-01
38	Paratión	1,53E-05 ± 1,625E-06	7,11E-05 ± 1,23E-05	≥1,00E-03
39	Diclorvos	≥8,42E-04	3,47E-04 ± 1,01E-06	6,77E-04 ± 5,08E-05
40	Fisostigmina	1,14E-05 ± 2,63E-06	9,94E-04 ± 2,78E-04	1,79E-03 ± 1,86E-04
41	Glufosinato amónico	3,83E-03 ± 3,04E-04	≥4,27E-02	1,01E-03 ± 1,20E-04
42	Cis-dicloro-diaminplatino (II)	≥3,50E-04	≥3,50E-04	≥3,50E-04
43	Dietilenglicol	4,90E-02 ± 8,41E-03	8,02E-03 ± 1,96E-03	7,61E-02 ± 6,52E-03
44	Diquat dibromuro	5,79E-06 ± 7,51E-07	7,47E-05 ± 2,23E-05	≥1,83E-04
45	Ocratoxina A	3,76E-05 ± 2,63E-06	≥1,00E-04	≥1,00E-04
46	Ciclosporina A	1,51E-06 ± 1,20E-07	7,90E-07 ± 1,31E-07	≥1,30E-05
47	17a-etinilestradiol	1,20E-04 ± 2,93E-05	≥1,21E-04	1,20E-04 ± 7,27E-06
48	Fluoruro sódico	8,79E-03 ± 3,11E-03	2,29E-01 ± 3,73E-02	≥5,81E-03
49	Paraquat dicloruro	≥5,42E-04	2,13E-03 ± 3,56E-04	≥5,42E-04
51	Dimetilformamida	1,42E-01 ± 2,64E-02	≥2,03E-01	≥2,03E-01
53	Amitriptilina hidrocloreuro	1,11E-05 ± 1,43E-06	2,62E-06 ± 3,64E-07	5,70E-05 ± 5,90E-06
54	Etilenglicol	≥6,87E-01	8,32E-02 ± 1,00E-02	5,34E-01 ± 1,15E-01
55	Metanol	≥1,95E+00	9,95E-02 ± 1,25E-02	1,19E+00 ± 8,02E-02
57	Cloruro sódico	≥1,46E-01	≥1,46E-01	≥1,46E-01
60	Sulfato litio	5,34E-03 ± 6,96E-04	≥5,87E-02	≥5,87E-02
63	Propranolol hidrocloreuro	6,61E-05 ± 9,14E-06	4,96E-05 ± 7,84E-06	9,76E-05 ± 8,05E-06
64	Trióxido de arsénico	2,57E-06 ± 2,53E-07	8,03E-06 ± 4,09E-06	1,01E-04 ± 1,72E-05
66	Sulfato de talio	4,29E+00 ± 6,99E-01	2,66E-04 ± 9,06E-05	≥3,36E-04
67	Warfarina	≥4,65E-03	≥4,65E-03	≥4,65E-03
76	Hidrato de cloral	1,00E-02 ± 2,63E-03	≥5,59E-03	1,36E-02 ± 1,38E-03
77	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2,41E-04 ± 2,68E-05	3,09E-03 ± 4,64E-04	3,01E-02 ± 2,49E-03
80	Estricnina	2,73E-04 ± 4,24E-05	≥1,25E-03	≥1,25E-03
91	Selenato sódico	5,26E-03 ± 6,34E-04	2,43E-04 ± 1,84E-05	1,17E-02 ± 1,14E-03
92	Acetonitrilo	3,92E-02 ± 6,71E-03	4,83E-02 ± 7,55E-03	3,17E-01 ± 3,42E-02
96	Epinefrina bitartrato	≥2,18E-04	1,12E-04 ± 8,06E-06	≥2,18E-04

**Tabla 8:** Valores de EC50 obtenidos para los parámetros citotóxicos para la línea celular de epitelio renal de rata, NRK-52E. Los datos son la media ± DS de tres experimentos por triplicado. En aquellos compuestos donde no se observa efecto, se muestra la dosis más alta probada.

N13				
Número AcuteTox	Compuesto químico	DIBAC	FLUO-4 AM	TMRM
1	Acetaminofen	≥4,60E-02	1,82E-02 ± 2,00E-03	≥4,60E-02
2	Ácido acetilsalicílico	7,72E-03 ± 6,50E-04	4,80E-03 ± 6,61E-04	1,82E-02 ± 1,05E-03
3	Atropina sulfato monohidrato	8,92E-04 ± 6,75E-05	1,30E-03 ± 3,95E-04	4,52E-04 ± 3,23E-05
4	Cafeína	2,53E-03 ± 2,07E-04	3,12E-03 ± 3,74E-04	3,66E-02 ± 2,82E-03
5	Carbamazepina	≥1,25E-03	≥1,25E-03	≥1,25E-03
6	Colchicina	≥5,00E-04	9,51E-05 ± 1,71E-05	1,99E-04 ± 1,36E-05
7	Cicloheximida	3,02E-04 ± 3,73E-05	≥1,00E-02	5,06E-04 ± 4,07E-05
9	Digoxina	≥3,20E-04	≥3,20E-04	≥3,20E-04
10	Alcohol isopropílico	2,76E-03 ± 1,90E-04	1,08E-02 ± 2,50E-03	2,49E-02 ± 2,68E-03
11	Malatión	3,09E-04 ± 2,66E-05	5,75E-04 ± 1,30E-04	≥7,79E-04
12	Cloruro mercurio (II)	9,87E-06 ± 1,88E-06	7,95E-06 ± 1,03E-06	≥8,80E-06
13	Pentaclorofenol	1,62E-04 ± 1,22E-05	≥3,80E-04	2,53E-04 ± 1,34E-05
14	Fenobarbital	≥2,00E-02	≥2,00E-02	≥2,00E-02
15	Sodio lauril sulfato	1,39E-06 ± 1,72E-07	5,14E-05 ± 1,66E-05	1,84E-05 ± 3,25E-06
16	Valproato sódico	6,83E-02 ± 3,33E-03	1,89E-02 ± 1,88E-03	8,68E-02 ± 1,69E-02
17	5-fluorouracilo	1,58E-03 ± 1,04E-04	≥3,60E-02	≥3,60E-02
18	Benceno	≥2,00E-02	≥2,00E-02	≥2,00E-02
19	Tert butil hidroperóxido	9,13E-04 ± 2,74E-04	1,26E-04 ± 1,32E-05	≥2,61E-04
21	Cloruro cadmio (II)	8,29E-05 ± 6,09E-06	7,14E-05 ± 4,33E-06	5,75E-05 ± 5,27E-06
23	Pireno	≥6,25E-05	≥6,25E-05	≥6,25E-05
26	Hexaclorobenceno	≥3,80E-05	≥3,80E-05	≥3,80E-05
28	Amiodarona hidrocloreuro	1,45E-05 ± 1,48E-06	3,91E-05 ± 1,01E-05	2,97E-05 ± 2,88E-06
29	Verapamil hidrocloreuro	1,64E-05 ± 1,29E-06	≥1,42E-04	1,45E-06 ± 3,16E-08
30	Rifampicina	≥2,50E-04	1,79E-05 ± 1,66E-06	6,74E-05 ± 4,04E-06
31	Tetraciclina hidrocloreuro	2,70E-05 ± 2,08E-06	≥2,50E-04	≥2,50E-04
32	Orfenadrina hidrocloreuro	≥1,18E-03	4,11E-04 ± 6,01E-05	4,01E-04 ± 4,12E-05
33	Nicotina	5,26E-03 ± 8,13E-04	9,30E-03 ± 9,43E-04	1,84E-03 ± 2,08E-04
34	Lindano	6,39E-05 ± 6,69E-06	≥1,29E-04	≥1,29E-04
37	Etanol	7,27E-01 ± 4,81E-02	5,78E-01 ± 7,53E-02	≥1,82E+00
38	Paratión	≥1,00E-03	≥1,00E-03	5,24E-05 ± 5,44E-06
39	Diclorvos	1,09E-03 ± 1,01E-04	5,47E-04 ± 3,11E-05	4,32E-04 ± 3,62E-05
40	Fisostigmina	5,00E-04 ± 3,18E-05	5,46E-04 ± 6,49E-05	4,60E-04 ± 4,14E-05
41	Glufosinato amónico	2,36E-03 ± 1,90E-04	≥6,00E-02	≥6,00E-02
42	Cis-dicloro-diaminplatino (II)	≥3,50E-04	≥3,50E-04	≥3,50E-04
43	Dietilenglicol	1,21E+00 ± 1,10E-01	6,91E-01 ± 1,31E-01	4,26E-01 ± 8,96E-02
44	Diquat dibromuro	9,88E-04 ± 1,74E-04	5,26E-04 ± 3,82E-05	≥8,51E-03
45	Ocratoxina A	≥1,00E-04	2,64E-05 ± 2,80E-06	≥1,00E-04
46	Ciclosporina A	5,35E-06 ± 3,53E-07	1,84E-05 ± 1,23E-06	1,75E-05 ± 6,83E-07
47	17a-etinilestradiol	5,81E-05 ± 4,26E-06	1,39E-04 ± 1,77E-05	1,27E-05 ± 1,25E-06
48	Fluoruro sódico	4,91E-04 ± 1,47E-04	5,57E-03 ± 5,50E-04	1,57E-03 ± 1,88E-04
49	Paraquat dicloruro	6,45E-04 ± 3,48E-05	2,76E-03 ± 1,16E-04	1,71E-03 ± 1,05E-04
51	Dimetilformamida	3,52E-01 ± 4,71E-02	2,05E-01 ± 2,29E-02	2,96E-01 ± 4,03E-02
53	Amitriptilina hidrocloreuro	6,41E-06 ± 5,21E-07	1,53E-05 ± 2,61E-06	1,68E-05 ± 1,24E-06
54	Etilenglicol	≥3,29E+00	1,06E+00 ± 1,62E-01	≥3,29E+00
55	Metanol	1,11E+00 ± 1,28E-01	9,67E-01 ± 5,36E-02	≥2,17E+00
57	Cloruro sódico	≥1,85E-01	1,06E-01 ± 8,66E-03	≥1,85E-01
60	Sulfato litio	2,16E-01 ± 1,22E-02	2,52E-01 ± 5,85E-02	≥3,14E-01
63	Propranolol hidrocloreuro	≥6,30E-04	2,37E-04 ± 4,13E-05	4,65E-04 ± 4,24E-05
64	Trióxido de arsénico	≥1,26E-04	≥1,26E-04	6,24E-05 ± 3,83E-06
66	Sulfato de talio	≥4,31E-03	4,37E-04 ± 2,97E-05	5,03E-04 ± 6,05E-05
67	Warfarina	≥4,65E-03	≥4,65E-03	≥4,65E-03
76	Hidrato de cloral	1,35E-02 ± 4,35E-03	8,12E-03 ± 1,66E-03	4,67E-02 ± 6,80E-03
77	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	1,05E-02 ± 8,87E-04	9,81E-03 ± 1,75E-03	2,04E-03 ± 1,70E-04
80	Estricnina	1,17E-04 ± 1,09E-05	3,19E-04 ± 4,66E-05	≥1,25E-03
91	Selenato sódico	1,55E-02 ± 2,22E-03	7,83E-03 ± 2,11E-03	≥2,90E-02
92	Acetonitrilo	1,95E-01 ± 1,21E-02	5,10E-01 ± 1,13E-01	9,72E-01 ± 8,84E-02
96	Epinefrina bitartrato	≥4,85E-04	9,38E-05 ± 2,27E-05	6,64E-05 ± 8,25E-06

**Tabla 9:** Valores de EC50 obtenidos para los parámetros citotóxicos, acompañadas de la desviación estándar para la línea celular de hepatoma de rata, N13. Los datos son la media ± DS de tres experimentos por triplicado. En aquellos compuestos donde no se observa efecto, se muestra la dosis más alta probada.

B50					
Número AcuteTox	Compuesto químico	DCFH-DA	DAF-FM	MITOSOX	MCB
1	Acetaminofen	≥4,60E-02	≥4,60E-02	≥4,60E-02	≥4,60E-02
2	Ácido acetilsalicílico	7,65E-02 ± 1,98E-02	4,33E-03 ± 6,92E-04	1,57E-02 ± 5,63E-03	≥2,00E-02
3	Atropina sulfato monohidrato	2,52E-04 ± 8,56E-05	6,06E-04 ± 1,34E-04	1,17E-03 ± 3,20E-04	3,40E-04 ± 3,06E-05
4	Cafeína	6,32E-02 ± 6,83E-03	1,92E-02 ± 3,51E-03	8,51E-03 ± 1,87E-03	1,48E-02 ± 2,62E-03
5	Carbamazepina	≥1,25E-03	5,98E-05 ± 5,43E-06	4,42E-04 ± 3,46E-05	≥1,25E-03
6	Colchicina	≥5,00E-04	1,57E-03 ± 1,67E-04	1,84E-03 ± 4,43E-04	≥5,00E-04
7	Cicloheximida	≥1,00E-02	≥1,00E-02	≥1,00E-02	≥1,00E-02
9	Digoxina	3,63E-05 ± 7,48E-06	1,99E-04 ± 4,22E-05	1,02E-04 ± 2,10E-05	≥3,20E-04
10	Alcohol isopropílico	4,23E-03 ± 7,05E-04	3,84E-03 ± 2,76E-04	≥1,19E-02	8,52E-03 ± 8,89E-04
11	Malatión	1,22E-02 ± 1,24E-03	≥4,50E-04	2,14E-03 ± 5,27E-04	4,12E-03 ± 9,20E-04
12	Cloruro mercurio (II)	5,52E-05 ± 1,19E-05	2,65E-05 ± 3,14E-06	1,49E-06 ± 1,87E-07	1,54E-05 ± 2,95E-06
13	Pentaclorofenol	5,33E-05 ± 7,38E-06	5,14E-04 ± 6,89E-05	1,57E-04 ± 1,96E-05	≥1,86E-04
14	Fenobarbital	2,22E-02 ± 2,39E-03	≥2,00E-02	2,67E-03 ± 3,64E-04	8,25E-03 ± 1,46E-03
15	Sodio lauril sulfato	≥1,96E-04	2,14E-04 ± 2,57E-05	3,97E-05 ± 1,70E-06	1,91E-04 ± 4,62E-05
16	Valproato sódico	2,27E-02 ± 3,64E-03	2,73E-01 ± 2,35E-02	≥1,70E-01	5,50E-02 ± 1,44E-02
17	5-fluorouracilo	4,80E-04 ± 4,25E-05	≥3,60E-02	≥3,60E-02	≥3,60E-02
18	Benceno	≥2,00E-02	≥2,00E-02	≥2,00E-02	≥2,00E-02
19	Tert butil hidroperóxido	≥4,29E-05	≥4,29E-05	≥4,29E-05	1,34E-05 ± 2,74E-06
21	Cloruro cadmio (II)	8,38E-06 ± 5,86E-07	7,48E-01 ± 7,56E-02	3,01E-05 ± 4,03E-06	3,38E-05 ± 5,98E-06
23	Pireno	≥6,25E-05	≥6,25E-05	≥6,25E-05	≥6,25E-05
26	Hexaclorobenceno	2,83E-04 ± 2,79E-05	6,27E-06 ± 5,03E-07	8,74E-06 ± 1,40E-06	≥3,80E-05
28	Amiodarona hidrocloreuro	9,36E-06 ± 2,96E-06	6,00E-06 ± 3,71E-07	8,49E-06 ± 7,60E-07	1,20E-05 ± 1,82E-06
29	Verapamil hidrocloreuro	1,79E-04 ± 2,23E-05	4,20E-05 ± 8,81E-06	1,23E-04 ± 2,24E-05	2,17E-05 ± 2,88E-06
30	Rifampicina	5,14E-05 ± 7,92E-06	6,31E-05 ± 1,66E-05	≥2,50E-04	≥2,50E-04
31	Tetraciclina hidrocloreuro	≥2,50E-04	≥2,50E-04	≥2,50E-04	1,97E-04 ± 1,09E-05
32	Orfenadrina hidrocloreuro	7,41E-05 ± 1,62E-05	≥3,64E-04	≥3,64E-04	4,73E-05 ± 9,00E-06
33	Nicotina	9,51E-03 ± 1,78E-03	3,63E-03 ± 6,90E-04	9,83E-04 ± 6,85E-05	4,43E-03 ± 1,24E-03
34	Lindano	≥1,29E-04	≥1,29E-04	3,18E-05 ± 4,24E-06	1,44E-05 ± 8,99E-07
37	Etanol	9,24E-01 ± 8,55E-02	4,77E-01 ± 9,57E-02	≥1,21E+00	8,33E-01 ± 1,46E-01
38	Paratión	≥1,00E-03	≥1,00E-03	5,83E-06 ± 8,79E-07	1,60E-06 ± 2,05E-07
39	Diclorvos	4,08E-04 ± 5,64E-05	≥1,68E-03	≥1,68E-03	3,08E-04 ± 4,34E-05
40	Fisostigmina	1,16E-03 ± 1,65E-04	4,83E-04 ± 5,67E-05	1,25E-03 ± 1,45E-04	3,73E-04 ± 1,00E-04
41	Glufosinato amónico	3,37E-02 ± 2,45E-03	2,64E-02 ± 4,99E-03	2,24E-02 ± 4,08E-03	≥4,70E-02
42	Cis-dicloro-diaminplatino (II)	3,91E-05 ± 4,92E-06	1,11E-05 ± 1,08E-06	1,43E-05 ± 1,01E-06	1,92E-05 ± 1,37E-06
43	Dietilenglicol	2,00E-01 ± 2,86E-02	5,44E-02 ± 6,15E-03	1,23E-01 ± 3,11E-02	≥3,81E-01
44	Diquat dibromuro	1,25E-05 ± 2,36E-06	1,81E-05 ± 3,70E-06	4,26E-05 ± 9,34E-06	8,00E-05 ± 7,81E-06
45	Ocratoxina A	≥1,00E-04	≥1,00E-04	≥1,00E-04	6,10E-05 ± 2,76E-06
46	Ciclosporina A	3,44E-06 ± 5,38E-07	3,85E-06 ± 4,70E-07	1,41E-06 ± 1,05E-07	≥2,40E-05
47	17a-etinilestradiol	1,75E-05 ± 4,29E-06	1,49E-04 ± 3,14E-05	2,52E-05 ± 5,14E-06	≥1,50E-04
48	Fluoruro sódico	≥2,89E-03	1,84E-03 ± 1,26E-04	1,16E-03 ± 1,25E-04	5,95E-05 ± 7,49E-06
49	Paraquat dicloruro	≥4,55E-03	≥4,55E-03	5,62E-04 ± 2,21E-05	7,13E-04 ± 1,64E-04
51	Dimetilformamida	3,39E-01 ± 1,04E-01	≥6,22E-01	≥6,22E-01	≥6,22E-01
53	Amitriptilina hidrocloreuro	1,80E-05 ± 3,31E-06	≥4,30E-05	4,04E-06 ± 3,58E-07	1,11E-05 ± 1,52E-06
54	Etilenglicol	5,69E-01 ± 6,90E-02	2,34E-01 ± 4,54E-02	8,39E-01 ± 6,54E-02	8,89E-01 ± 4,70E-02
55	Metanol	1,02E-01 ± 2,67E-02	1,97E-01 ± 4,01E-02	3,30E-01 ± 4,53E-02	4,13E-01 ± 1,17E-01
57	Cloruro sódico	≥3,05E-01	≥3,05E-01	≥3,05E-01	≥3,05E-01
60	Sulfato litio	1,12E-01 ± 3,05E-02	1,08E-01 ± 1,97E-02	3,86E-02 ± 1,33E-02	6,00E-02 ± 9,49E-03
63	Propranolol hidrocloreuro	5,45E-05 ± 8,62E-06	9,15E-05 ± 1,66E-05	4,67E-05 ± 9,19E-06	2,89E-04 ± 2,27E-05
64	Trióxido de arsénico	1,57E-05 ± 4,60E-06	2,23E-05 ± 4,56E-06	6,51E-05 ± 7,39E-06	1,46E-05 ± 2,71E-06
66	Sulfato de talio	≥3,97E-04	≥3,97E-04	≥3,97E-04	9,99E-04 ± 2,41E-04
67	Warfarina	≥4,65E-03	≥4,65E-03	≥4,65E-03	≥4,65E-03
76	Hidrato de cloral	2,95E-03 ± 4,59E-04	2,03E-03 ± 2,49E-04	9,74E-03 ± 2,10E-03	9,19E-02 ± 1,59E-02
77	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	9,60E-03 ± 2,83E-03	1,69E-02 ± 1,09E-03	≥2,46E-02	≥2,46E-02
80	Estricnina	≥1,25E-03	≥1,25E-03	3,09E-04 ± 9,07E-05	6,67E-05 ± 9,81E-06
91	Selenato sódico	4,04E-04 ± 3,45E-05	6,03E-05 ± 4,12E-06	1,66E-04 ± 1,60E-05	9,13E-04 ± 1,49E-04
92	Acetonitrilo	3,63E-01 ± 6,24E-02	1,59E-02 ± 2,24E-03	1,51E-01 ± 2,50E-02	2,07E-01 ± 5,46E-02
96	Epinefrina bitartrato	≥1,00E-04	1,03E-05 ± 2,29E-06	≥1,00E-04	2,08E-05 ± 6,45E-06

**Tabla 10:** Valores de EC50 obtenidos para los parámetros de estrés oxidativo y glutatión para la línea celular de neuroblastoma de rata, B50. Los datos son la media ± DS de tres experimentos por triplicado. En aquellos compuestos donde no se observa efecto, se muestra la dosis más alta probada.

NRK-52E					
Número AcuteTox	Compuesto químico	DCFH-DA	DAF-FM	MITOSOX	MCB
1	Acetaminofen	2,71E-03 ± 6,77E-04	≥1,21E-02	≥1,21E-02	9,80E-02 ± 1,54E-02
2	Ácido acetilsalicílico	≥2,00E-02	≥2,00E-02	1,06E-03 ± 8,80E-05	3,23E-03 ± 3,39E-04
3	Atropina sulfato monohidrato	9,34E-05 ± 1,69E-05	2,78E-03 ± 8,78E-04	3,35E-04 ± 3,61E-05	1,87E-02 ± 2,70E-03
4	Cafeína	≥7,55E-03	≥7,55E-03	4,41E-05 ± 6,75E-06	2,56E-03 ± 3,75E-04
5	Carbamazepina	≥1,25E-03	3,69E-05 ± 6,79E-06	6,95E-05 ± 1,47E-05	≥1,25E-03
6	Colchicina	≥3,30E-04	7,59E-05 ± 1,11E-05	≥3,30E-04	3,11E-04 ± 3,88E-05
7	Cicloheximida	≥1,00E-02	≥1,00E-02	≥1,00E-02	≥1,00E-02
9	Digoxina	3,71E-05 ± 1,07E-05	3,61E-05 ± 3,47E-06	2,58E-05 ± 6,87E-06	≥3,20E-04
10	Alcohol isopropílico	≥8,46E-03	2,33E-03 ± 5,32E-04	3,14E-03 ± 1,29E-03	1,39E-03 ± 2,26E-04
11	Malatión	1,44E-04 ± 1,10E-05	≥7,63E-04	2,13E-04 ± 2,54E-05	3,15E-04 ± 4,06E-05
12	Cloruro mercurio (II)	1,33E-05 ± 2,36E-06	3,06E-07 ± 3,98E-08	1,41E-09 ± 1,25E-10	5,52E-06 ± 1,32E-06
13	Pentaclorofenol	4,88E-05 ± 7,28E-06	1,38E-05 ± 1,14E-06	3,85E-05 ± 7,48E-06	≥4,30E-05
14	Fenobarbital	1,25E-02 ± 1,72E-03	8,74E-03 ± 2,16E-03	3,08E-03 ± 1,03E-03	7,00E-03 ± 1,75E-03
15	Sodio lauril sulfato	≥1,56E-04	1,00E-06 ± 5,74E-08	≥1,56E-04	6,94E-05 ± 8,34E-06
16	Valproato sódico	1,44E-02 ± 2,56E-03	≥7,74E-02	2,55E-02 ± 5,86E-03	≥7,74E-02
17	5-fluorouracilo	≥3,60E-02	≥3,60E-02	≥3,60E-02	1,81E-02 ± 2,89E-03
18	Benceno	≥2,00E-02	≥2,00E-02	≥2,00E-02	≥2,00E-02
19	Tert butil hidroperóxido	≥4,48E-05	≥4,48E-05	≥4,48E-05	4,38E-06 ± 3,82E-07
21	Cloruro cadmio (II)	1,56E-05 ± 3,44E-06	7,80E-05 ± 1,42E-05	1,26E-05 ± 2,56E-06	7,80E-05 ± 1,15E-05
23	Pireno	≥6,25E-05	≥6,25E-05	≥6,25E-05	≥6,25E-05
26	Hexaclorobenceno	≥3,80E-05	≥3,80E-05	≥3,80E-05	≥3,80E-05
28	Amiodarona hidrocloreuro	4,90E-06 ± 1,66E-06	3,37E-06 ± 1,06E-06	≥2,20E-05	3,44E-06 ± 6,20E-07
29	Verapamil hidrocloreuro	1,03E-05 ± 1,72E-06	7,33E-09 ± 1,48E-09	1,80E-05 ± 6,64E-06	≥1,99E-04
30	Rifampicina	2,46E-05 ± 2,25E-06	4,14E-05 ± 4,29E-06	≥2,50E-04	≥2,50E-04
31	Tetraciclina hidrocloreuro	≥2,50E-04	≥2,50E-04	≥2,50E-04	9,35E-05 ± 1,44E-05
32	Orfenadrina hidrocloreuro	≥3,74E-04	≥3,74E-04	1,05E-04 ± 2,17E-05	≥3,74E-04
33	Nicotina	≥6,97E-03	6,72E-03 ± 9,97E-04	≥6,97E-03	1,24E-03 ± 1,33E-04
34	Lindano	≥1,29E-04	≥1,29E-04	2,42E-05 ± 4,82E-06	≥1,29E-04
37	Etanol	3,53E-01 ± 1,32E-01	2,80E-01 ± 4,83E-02	2,59E-01 ± 3,21E-02	2,51E-01 ± 4,24E-02
38	Paratión	1,66E-03 ± 1,73E-04	≥1,00E-03	8,12E-05 ± 3,88E-06	≥1,00E-03
39	Diclorvos	5,30E-04 ± 8,91E-05	≥8,42E-04	≥8,42E-04	≥8,42E-04
40	Fisostigmina	4,42E-04 ± 4,76E-05	1,61E-03 ± 3,52E-04	3,63E-04 ± 1,19E-04	3,60E-04 ± 6,86E-05
41	Glufosinato amónico	8,92E-03 ± 6,22E-03	2,08E-02 ± 1,32E-03	1,80E-02 ± 3,51E-03	≥4,27E-02
42	Cis-dicloro-diaminplatino (II)	≥3,50E-04	≥3,50E-04	≥3,50E-04	1,03E-05 ± 1,43E-06
43	Dietilenglicol	9,79E-02 ± 1,98E-02	≥2,19E-01	1,40E-01 ± 1,68E-02	≥2,19E-01
44	Diquat dibromuro	2,96E-05 ± 8,11E-06	7,53E-06 ± 4,24E-07	5,54E-07 ± 2,96E-08	4,44E-05 ± 4,50E-06
45	Ocratoxina A	≥1,00E-04	≥1,00E-04	≥1,00E-04	6,08E-05 ± 7,29E-06
46	Ciclosporina A	7,04E-06 ± 7,11E-07	≥1,30E-05	5,25E-06 ± 7,35E-07	≥1,30E-05
47	17a-etinilestradiol	4,21E-05 ± 5,00E-06	≥1,21E-04	3,15E-05 ± 4,89E-06	1,41E-05 ± 2,76E-06
48	Fluoruro sódico	≥5,81E-03	9,08E-05 ± 2,59E-06	≥5,81E-03	3,99E-03 ± 7,03E-04
49	Paraquat dicloruro	≥5,42E-04	≥5,42E-04	2,83E-04 ± 4,24E-05	4,40E-04 ± 1,17E-04
51	Dimetilformamida	1,95E-01 ± 3,07E-02	1,76E-01 ± 3,29E-02	≥2,03E-01	1,77E-02 ± 1,27E-03
53	Amitriptilina hidrocloreuro	≥3,60E-05	2,51E-05 ± 5,05E-06	4,68E-06 ± 8,58E-07	9,53E-06 ± 1,04E-06
54	Etilenglicol	≥6,87E-01	≥6,87E-01	≥6,87E-01	1,00E-01 ± 1,78E-02
55	Metanol	≥1,95E+00	≥1,95E+00	8,60E-02 ± 1,41E-02	≥1,95E+00
57	Cloruro sódico	≥1,46E-01	≥1,46E-01	≥1,46E-01	≥1,46E-01
60	Sulfato litio	4,51E-02 ± 5,63E-03	≥5,87E-02	4,53E-02 ± 4,51E-03	1,78E-02 ± 2,44E-03
63	Propranolol hidrocloreuro	7,58E-05 ± 9,97E-06	5,26E-05 ± 6,47E-06	3,53E-05 ± 9,50E-06	4,88E-05 ± 6,69E-06
64	Trióxido de arsénico	≥8,90E-05	8,72E-06 ± 5,58E-07	8,09E-06 ± 1,04E-06	≥8,90E-05
66	Sulfato de talio	≥3,36E-04	≥3,36E-04	≥3,36E-04	2,69E-04 ± 3,93E-05
67	Warfarina	≥4,65E-03	≥4,65E-03	≥4,65E-03	≥4,65E-03
76	Hidrato de cloral	2,70E-03 ± 4,48E-04	1,32E-04 ± 3,76E-05	9,64E-04 ± 2,01E-04	8,95E-04 ± 2,37E-04
77	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	5,02E-03 ± 8,94E-04	6,41E-03 ± 1,35E-03	≥3,00E-02	≥3,00E-02
80	Estricnina	≥1,25E-03	≥1,25E-03	2,39E-04 ± 2,77E-05	3,24E-04 ± 4,07E-05
91	Selenato sódico	1,23E-03 ± 1,51E-04	≥8,50E-03	1,28E-03 ± 2,75E-04	7,09E-03 ± 1,07E-03
92	Acetonitrilo	≥3,03E-01	9,96E-02 ± 2,41E-02	1,27E-01 ± 4,87E-02	≥3,03E-01
96	Epinefrina bitartrato	6,03E-05 ± 4,65E-06	5,78E-05 ± 1,07E-05	≥2,18E-04	8,72E-05 ± 1,96E-05

**Tabla 11:** Valores de EC50 obtenidos para los parámetros de estrés oxidativo y glutatión para la línea celular de epitelio renal de rata, NRK-52E. Los datos son la media ± DS de tres experimentos por triplicado. En aquellos compuestos donde no se observa efecto, se muestra la dosis más alta probada.

N13					
Número AcuteTox	Compuesto químico	DCFH-DA	DAF-FM	MITOSOX	MCB
1	Acetaminofen	≥4,60E-02	≥4,60E-02	1,09E-03 ± 1,46E-04	≥4,60E-02
2	Ácido acetilsalicílico	9,25E-03 ± 7,63E-04	1,38E-02 ± 8,10E-04	1,94E-03 ± 2,96E-04	3,10E-03 ± 1,46E-04
3	Atropina sulfato monohidrato	1,95E-03 ± 7,84E-05	3,25E-04 ± 3,47E-05	8,65E-04 ± 2,27E-04	6,48E-04 ± 6,98E-05
4	Cafeína	≥4,00E-02	1,73E-02 ± 2,41E-03	≥4,00E-02	≥4,00E-02
5	Carbamazepina	≥1,25E-03	≥1,25E-03	≥1,25E-03	≥1,25E-03
6	Colchicina	≥5,00E-04	≥5,00E-04	1,07E-04 ± 7,70E-06	7,81E-05 ± 1,02E-05
7	Cicloheximida	5,89E-07 ± 1,86E-08	≥1,00E-02	≥1,00E-02	≥1,00E-02
9	Digoxina	≥3,20E-04	≥3,20E-04	≥3,20E-04	≥3,20E-04
10	Alcohol isopropílico	≥2,40E-02	9,27E-03 ± 7,54E-04	3,54E-03 ± 4,36E-04	1,35E-02 ± 2,24E-03
11	Malatión	1,20E-04 ± 3,83E-05	3,78E-04 ± 3,36E-05	3,84E-04 ± 4,49E-05	1,79E-04 ± 1,54E-05
12	Cloruro mercurio (II)	2,10E-06 ± 1,99E-07	9,22E-06 ± 8,99E-07	3,67E-06 ± 5,77E-07	1,04E-05 ± 7,88E-07
13	Pentaclorofenol	5,26E-05 ± 4,05E-06	1,93E-04 ± 2,44E-05	1,75E-04 ± 2,40E-05	8,20E-05 ± 7,14E-06
14	Fenobarbital	≥2,00E-02	≥2,00E-02	≥2,00E-02	≥2,00E-02
15	Sodio lauril sulfato	1,47E-04 ± 2,33E-05	4,58E-04 ± 4,25E-05	1,12E-04 ± 1,82E-05	1,17E-04 ± 4,15E-05
16	Valproato sódico	3,28E-02 ± 3,28E-03	1,59E-02 ± 2,79E-03	9,63E-03 ± 8,08E-04	3,00E-02 ± 2,27E-03
17	5-fluorouracilo	≥3,60E-02	≥3,60E-02	≥3,60E-02	≥3,60E-02
18	Benceno	≥2,00E-02	≥2,00E-02	≥2,00E-02	≥2,00E-02
19	Tert butil hidroperóxido	≥2,61E-04	5,11E-05 ± 3,75E-06	2,20E-05 ± 2,72E-06	8,86E-05 ± 2,27E-05
21	Cloruro cadmio (II)	9,26E-06 ± 1,38E-06	3,53E-05 ± 7,09E-06	3,26E-05 ± 7,36E-06	1,33E-05 ± 1,18E-06
23	Pireno	≥6,25E-05	≥6,25E-05	≥6,25E-05	≥6,25E-05
26	Hexaclorobenceno	≥3,80E-05	≥3,80E-05	≥3,80E-05	≥3,80E-05
28	Amiodarona hidrocloreuro	≥5,10E-05	2,36E-05 ± 2,87E-06	7,28E-06 ± 8,01E-07	4,28E-06 ± 5,10E-07
29	Verapamil hidrocloreuro	≥1,42E-04	2,47E-05 ± 3,96E-06	7,48E-05 ± 1,24E-05	4,00E-05 ± 2,60E-06
30	Rifampicina	≥2,50E-04	≥2,50E-04	6,20E-05 ± 2,37E-06	≥2,50E-04
31	Tetraciclina hidrocloreuro	≥2,50E-04	≥2,50E-04	≥2,50E-04	1,20E-04 ± 9,48E-06
32	Orfenadrina hidrocloreuro	1,06E-04 ± 1,28E-05	3,13E-04 ± 5,93E-05	3,49E-04 ± 8,42E-05	2,40E-04 ± 2,47E-05
33	Nicotina	4,32E-03 ± 6,44E-04	5,57E-03 ± 9,39E-04	2,72E-03 ± 4,17E-04	6,37E-04 ± 7,27E-05
34	Lindano	≥1,29E-04	≥1,29E-04	≥1,29E-04	3,69E-06 ± 3,70E-07
37	Etanol	4,81E-01 ± 3,17E-02	9,56E-01 ± 7,33E-02	6,61E-01 ± 1,06E-01	2,57E-01 ± 1,42E-02
38	Paratión	≥1,00E-03	5,93E-05 ± 5,37E-06	≥1,00E-03	≥1,00E-03
39	Diclorvos	≥1,45E-03	8,54E-04 ± 1,29E-04	8,24E-04 ± 1,08E-04	5,52E-04 ± 9,30E-05
40	Fisostigmina	2,22E-04 ± 2,25E-05	5,87E-04 ± 8,16E-05	6,35E-04 ± 8,02E-05	1,20E-03 ± 2,51E-04
41	Glufosinato amónico	≥6,00E-02	≥6,00E-02	≥6,00E-02	≥6,00E-02
42	Cis-dicloro-diamplatino (II)	≥3,50E-04	≥3,50E-04	≥3,50E-04	≥3,50E-04
43	Dietilenglicol	1,20E+00 ± 1,11E-01	1,03E+00 ± 1,98E-01	6,66E-01 ± 7,41E-02	≥3,22E+00
44	Diquat dibromuro	6,98E-04 ± 1,39E-04	1,82E-03 ± 2,20E-04	1,38E-02 ± 1,27E-03	4,90E-04 ± 5,34E-05
45	Ocratoxina A	≥1,00E-04	≥1,00E-04	≥1,00E-04	4,60E-05 ± 3,01E-06
46	Ciclosporina A	≥2,50E-05	5,02E-06 ± 8,78E-07	1,90E-06 ± 1,39E-07	≥2,50E-05
47	17a-etinilestradiol	≥3,20E-04	7,28E-05 ± 1,30E-05	2,08E-04 ± 5,57E-05	2,20E-04 ± 4,26E-05
48	Fluoruro sódico	7,59E-03 ± 1,40E-03	2,97E-02 ± 5,41E-03	≥3,82E-03	3,12E-03 ± 3,75E-04
49	Paraquat dicloruro	2,75E-03 ± 4,10E-04	3,03E-03 ± 3,68E-04	5,30E-03 ± 8,49E-04	3,43E-03 ± 3,32E-04
51	Dimetilformamida	2,82E-01 ± 4,71E-02	5,99E-01 ± 7,03E-02	3,88E-01 ± 7,15E-02	1,53E-01 ± 2,33E-02
53	Amitriptilina hidrocloreuro	≥5,00E-05	1,84E-06 ± 2,27E-07	1,32E-05 ± 1,95E-06	2,04E-05 ± 2,51E-06
54	Etilenglicol	≥3,29E+00	1,77E+00 ± 1,30E-01	1,19E+00 ± 1,62E-01	1,25E+00 ± 1,90E-01
55	Metanol	1,60E+00 ± 1,75E-01	1,37E+00 ± 3,25E-01	1,31E+00 ± 9,03E-02	6,15E-01 ± 8,64E-02
57	Cloruro sódico	≥1,85E-01	≥1,85E-01	≥1,85E-01	8,58E-02 ± 1,47E-02
60	Sulfato litio	2,21E-01 ± 2,96E-02	2,78E-01 ± 2,19E-02	2,38E-01 ± 1,21E-02	1,68E-01 ± 2,78E-02
63	Propranolol hidrocloreuro	1,08E-04 ± 1,51E-05	1,21E-04 ± 2,74E-05	1,98E-04 ± 3,36E-05	2,58E-04 ± 3,55E-05
64	Trióxido de arsénico	≥1,26E-04	3,17E-05 ± 5,04E-06	1,57E-05 ± 1,95E-06	1,88E-05 ± 2,56E-06
66	Sulfato de talio	≥4,31E-03	2,89E-04 ± 3,49E-05	2,28E-04 ± 2,66E-05	1,03E-02 ± 8,21E-04
67	Warfarina	≥4,65E-03	≥4,65E-03	≥4,65E-03	≥4,65E-03
76	Hidrato de cloral	1,35E-02 ± 4,35E-03	3,07E-02 ± 5,08E-03	2,66E-03 ± 2,50E-04	2,63E-02 ± 2,25E-03
77	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	8,30E-03 ± 8,77E-04	1,47E-02 ± 1,14E-03	8,60E-03 ± 1,08E-03	8,78E-03 ± 1,46E-03
80	Estricnina	≥1,25E-03	≥1,25E-03	1,87E-04 ± 1,16E-05	1,00E-04 ± 1,61E-05
91	Selenato sódico	6,76E-03 ± 7,31E-04	5,28E-03 ± 6,44E-04	1,94E-02 ± 4,65E-03	5,03E-03 ± 4,33E-04
92	Acetonitrilo	≥1,21E+00	≥1,21E+00	7,34E-01 ± 1,48E-01	3,69E-01 ± 6,29E-02
96	Epinefrina bitartrato	7,80E-05 ± 7,90E-06	1,52E-04 ± 1,26E-05	6,77E-05 ± 4,37E-06	5,01E-05 ± 3,50E-06

**Tabla 12:** Valores de EC50 obtenidos para los parámetros de estrés oxidativo y glutatión para la línea celular de hepatoma de rata, N13. Los datos son la media ± DS de tres experimentos por triplicado. En aquellos compuestos donde no se observa efecto, se muestra la dosis más alta probada.

### **5.3 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PREDICTIVA DE LOS ENSAYOS CITÓMICOS**

A partir de un estudio de regresión lineal entre las IC50 y EC50 obtenidas anteriormente frente a los valores bibliográficos de toxicidad en rata, humano y 3T3, se han obtenido los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) para cada parámetro en cada una de las tres líneas celulares.

También se han obtenido los coeficientes de correlación empleando la concentración mínima de tóxico a la cual se ha producido efecto. Los resultados muestran por un lado, las correlaciones obtenidas empleando los siete parámetros en estudio. Por otro lado, se encuentra el coeficiente de correlación donde se incluye la IC50, teniendo presentes el total de los ensayos. Se han obtenido coeficientes de correlación de cada línea celular individualmente y de las tres líneas celulares juntas.

Empleando las concentraciones mínimas de tóxico, se ha podido establecer una relación entre el tipo de línea celular y los parámetros citotóxicos, permitiendo determinar efectos tempranos producidos por los compuestos químicos.

### 5.3.1 CAPACIDAD PREDICTIVA DE LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD EXISTENTES

Los resultados obtenidos en todos los casos se han comparado con los coeficientes de correlación obtenidos a partir de los datos publicados en la bibliografía, es decir, con los valores de IC50 *in vitro* en el test de captación de Rojo Neutro por 3T3 (Sjöström et al., 2008), con valores LD50 *in vivo* de rata y con valores LC50 en sangre determinados en casos de envenenamiento en humano.

Como se puede observar en la Tabla 13, la correlación más alta corresponde a la comparación entre la citotoxicidad *in vitro* (IC50 de 3T3 NRU) frente a la toxicidad en humano, con un  $R^2$  de 0,5454. El siguiente valor corresponde a un coeficiente de correlación más bajo, con un  $R^2$  de 0,5067 que corresponde a la comparación de los valores *in vitro* (IC50 de 3T3 NRU) e *in vivo* de rata (LD50).

Como el estudio está realizado en ensayos *in vitro* de rata, el valor de mayor interés es el correspondiente al coeficiente de correlación entre los valores *in vitro* del ensayo de viabilidad de 3T3 NRU e *in vivo* de rata, debido a la proximidad entre especies. El coeficiente de correlación entre el método *in vitro* 3T3 NRU y la toxicidad en humano también se ha comparado ya que se trata del mismo método empleado, el método *in vitro*, y por tanto, permite comprobar la robustez y la utilidad de dicho método. Estos dos valores se toman como referencia para valorar el ensayo citómico en el análisis estadístico.

<b>CORRELACIONES TEÓRICAS (57 tóxicos)</b>	
	<b>3T3 NRU (n=57)</b>
<b>RATA (n=57)</b>	<b>0,5067</b>
<b>HUMANO (n=46)</b>	<b>0,5454</b>

**Tabla 13:** Coeficientes de correlación obtenidos comparando los valores bibliográficos correspondientes a la IC50 del ensayo de captación del Rojo Neutro en 3T3 frente a la LD50 de rata y frente a la LC50 en humanos (Sjöström et al., 2008; Hoffmann et al., 2010).

### **5.3.2 CAPACIDAD PREDICTIVA DE TOXICIDAD AGUDA EN RATA DE LOS ENSAYOS CITÓMICOS**

El estudio de la capacidad predictiva de toxicidad aguda con respecto a rata in vivo de los resultados obtenidos en este estudio, muestran una muy baja correlación en la gran mayoría de parámetros (Tabla 14). El resultado es similar para las tres líneas celulares de rata, teniendo presente la correlación obtenida con los datos de rata in vivo frente a 3T3 de la bibliografía, con un coeficiente de correlación de referencia de 0,5067.

En general, se observa que de las tres líneas, hay dos con los coeficientes de correlación más altos, B50 y N13, las NRK-52E presenta los coeficientes de correlación más bajos. Por parámetros, la gran mayoría no son superiores al obtenido en la bibliografía, sólo mejora la correlación del potencial de membrana mitocondrial en B50 y los peróxidos en N13, con coeficientes de correlación de 0,546 y 0,509, respectivamente.

Esta falta de correlación entre el organismo in vivo y el método in vitro, es debida posiblemente a la diferente expresión de la toxicidad entre el organismo y las células en cultivo, ya que en este caso la especie es la misma. Además, pueden existir diferencias en la forma de actuación y la metabolización de algunos compuestos, provocando la acumulación de metabolitos intermedios y dando lugar a unos efectos no reproducibles en el ensayo citómico.

	<b>TOXICIDAD AGUDA RATA</b>					
	<b>B50</b>	<b>n</b>	<b>NRK-52E</b>	<b>n</b>	<b>N13</b>	<b>n</b>
<b>PMM</b>	0,546	15	0,209	27	0,281	32
<b>PMP</b>	0,311	45	0,074	38	0,256	37
<b>CALCIO</b>	0,433	40	0,261	37	0,428	40
<b>VIABILIDAD</b>	0,362	39	0,409	39	0,398	32
<b>PERÓXIDOS</b>	0,396	38	0,263	28	0,509	25
<b>NO</b>	0,271	36	0,24	27	0,379	37
<b>SUPERÓXIDO</b>	0,286	37	0,337	33	0,338	39
<b>GLUTATIÓN</b>	0,413	37	0,151	34	0,335	40

n= Número de valores empleados para el cálculo de la correlación.

**Tabla 14:** Coeficientes de correlación calculados comparando los valores de IC50 y EC50 obtenidos respecto al valor bibliográfico correspondiente a la LD50 de rata. Los coeficientes superiores al de la comparación entre la DL50 de rata in vivo y la IC50 del ensayo 3T3 NRU se encuentran resaltados en amarillo.

### 5.3.3 CAPACIDAD PREDICTIVA DE TOXICIDAD AGUDA EN HUMANO DE LOS ENSAYOS CITÓMICOS

Cuando se comparan los resultados obtenidos con la LC50 en sangre de humanos, los coeficientes de correlación mejoran y en algunos casos son más elevados que el valor de referencia (Tabla 15). En este caso, el valor de referencia que se utiliza es 0,5454, obtenido al comparar el método *in vitro* 3T3 y la LC50 en humanos.

Se puede observar que en las B50, la viabilidad, el calcio, la actividad peroxidativa y el glutatión tienen un coeficiente de correlación superior al valor de referencia. La línea celular NRK-52E tiene una baja capacidad predictiva de toxicidad ya que solamente presentan una correlación superior al valor bibliográfico los parámetros de viabilidad y la actividad peroxidativa. La línea celular con mayor capacidad predictiva es la de hepatoma de rata, N13, donde todos los parámetros tienen correlaciones más elevadas a excepción del potencial de membrana mitocondrial, ligeramente inferior a 0,5454.

Estos resultados aportan una buena capacidad predictiva en general, con buenos coeficientes de correlación para un gran número de parámetros en las tres líneas celulares. Sin embargo, estos resultados no son coherentes con los obtenidos cuando se comparan con la rata *in vivo*, ya que sería previsible obtener mejores correlaciones en la rata, debido a la proximidad entre especies. Una posible explicación sería la diferente metabolización de los

compuestos y la complejidad de los procesos bioquímicos en los humanos.

	<b>TOXICIDAD AGUDA HUMANO</b>					
	<b>B50</b>	<b>n</b>	<b>NRK-52E</b>	<b>n</b>	<b>N13</b>	<b>n</b>
<b>PMM</b>	0,377	12	0,365	23	0,535	26
<b>PMP</b>	0,311	37	0,263	31	0,635	30
<b>CALCIO</b>	0,602	35	0,504	33	0,648	33
<b>VIABILIDAD</b>	0,723	32	0,654	33	0,625	27
<b>PERÓXIDOS</b>	0,62	35	0,601	24	0,572	20
<b>NO</b>	0,384	31	0,313	24	0,748	31
<b>SUPERÓXIDO</b>	0,526	33	0,44	30	0,593	33
<b>GLUTATIÓN</b>	0,68	31	0,402	27	0,657	33

n= Número de valores empleados para el cálculo de la correlación.

**Tabla 15:** Coeficientes de correlación calculados comparando los valores de IC50 y EC50 obtenidos respecto al valor bibliográfico correspondiente a la LC50 en humanos. Los coeficientes superiores al de la comparación entre la LC50 humana *in vivo* y la IC50 del ensayo 3T3 NRU se encuentran resaltados en verde.

### 5.3.4 CAPACIDAD PREDICTIVA DE TOXICIDAD AGUDA DE LOS ENSAYOS CITÓMICOS *IN VITRO*

En general, los resultados muestran unas mejores correlaciones con respecto al método *in vitro* 3T3 NRU en la mayoría de parámetros (Tabla 16). En la línea celular B50, todos los parámetros correlacionan mejor a excepción del potencial de membrana plasmático y el óxido nítrico. Sin embargo, presenta los coeficientes de correlación más elevados de las tres líneas celulares, que se dan

en el potencial de membrana mitocondrial y los peróxidos con 0,86 y 0,84 respectivamente.

La línea NRK-52E también presenta mejores correlaciones en la mayoría de parámetros, exceptuando los mismos parámetros que en B50, el potencial de membrana plasmático, el óxido nítrico y en este caso, también el glutatión. Respecto al método *in vitro* de 3T3 NRU, se han obtenido elevadas correlaciones, especialmente en la línea celular N13 donde todos los parámetros tienen correlaciones más elevadas, con coeficientes de correlación superiores a 0,6, llegando a 0,8 en el caso de peróxidos y óxido nítrico.

Las correlaciones son superiores también cuando se compara los datos obtenidos en este trabajo con datos obtenidos en estudios previos en nuestro laboratorio, que empleaban líneas celulares homólogas humanas (Tabla 17). En este caso, también se comparan datos obtenidos solamente a través del método *in vitro*. Aunque algún parámetro como el glutatión y el potencial de membrana mitocondrial no se haya determinado y no pueda ser comparado con los datos *in vitro* de rata, los coeficientes de correlación restantes son más elevados que los publicados en la bibliografía.

Se da la misma situación que frente al ensayo 3T3 NRU para las tres líneas celulares. En las B50, los coeficientes de correlación del potencial de membrana plasmático y el del óxido nítrico son inferiores a 0,5454. Los mismos parámetros tampoco correlacionan mejor para la línea NRK-52E, ya que en la línea renal humana, A704,

el glutatión no se determinó. En las N13 todos los coeficientes de correlación de todos los parámetros también fueron superiores.

	<b>TOXICIDAD AGUDA IN VITRO</b>					
	<b>B50</b>	<b>n</b>	<b>NRK-52E</b>	<b>n</b>	<b>N13</b>	<b>n</b>
<b>PMM</b>	0,857	15	0,666	27	0,574	32
<b>PMP</b>	0,392	45	0,326	38	0,601	37
<b>CALCIO</b>	0,656	40	0,594	37	0,758	40
<b>VIABILIDAD</b>	0,764	39	0,764	39	0,763	32
<b>PERÓXIDOS</b>	0,842	38	0,757	28	0,803	25
<b>NO</b>	0,396	36	0,475	27	0,808	37
<b>SUPERÓXIDO</b>	0,568	37	0,712	33	0,691	39
<b>GLUTATIÓN</b>	0,699	37	0,436	34	0,615	40

n= Número de valores empleados para el cálculo de la correlación.

**Tabla 16:** Coeficientes de correlación calculados comparando los valores de IC50 y EC50 obtenidos respecto al valor bibliográfico correspondiente a la IC50 del ensayo de captación del Rojo Neutro en 3T3. Los coeficientes superiores al de la comparación entre la DL50 de rata in vivo y la IC50 del ensayo 3T3 NRU se encuentran resaltados en amarillo.

	<b>TOXICIDAD AGUDA IN VITRO</b>					
	<b>HUMANO IN VITRO (SH-SY5Y)</b>	<b>n</b>	<b>HUMANO IN VITRO (A704)</b>	<b>n</b>	<b>HUMANO IN VITRO (HEPG2)</b>	<b>n</b>
<b>PMM</b>	-	-	-	-	0,638	17
<b>PMP</b>	0,403	24	0,453	30	0,666	21
<b>CALCIO</b>	0,708	29	0,629	28	0,717	13
<b>VIABILIDAD</b>	0,923	35	0,854	32	0,841	30
<b>PERÓXIDOS</b>	0,742	22	0,84	22	0,783	20
<b>NO</b>	0,065	9	0,089	7	0,699	22
<b>SUPERÓXIDO</b>	0,835	31	0,544	28	0,714	21
<b>GLUTATIÓN</b>	-	-	-	-	-	-

n= Número de valores empleados para el cálculo de la correlación.

**Tabla 17:** Coeficientes de correlación calculados comparando los valores de IC50 y EC50 obtenidos en este trabajo, respecto a la línea celular humana homóloga empleada en estudios anteriores en nuestro laboratorio. Los coeficientes superiores al de la comparación entre la LC50 humana in vivo y la IC50 del ensayo 3T3 NRU se encuentran resaltados en verde.

### **5.3.5 CAPACIDAD PREDICTIVA DE EFECTOS TEMPRANOS DE TOXICIDAD AGUDA DE LOS ENSAYOS CITÓMICOS**

Respecto a la capacidad predictiva de efectos tempranos en los ensayos citómicos, se puede observar en la Tabla 18, cuando se tienen en cuenta las tres líneas celulares, que los coeficientes de correlación de las concentraciones mínimas tóxicas con el método *in vitro* 3T3 mejoran con respecto al valor de referencia. El coeficiente de correlación coincide para las EC50 y cuando se incluye la IC50, debido a que la concentración mínima no es la IC50 y, por tanto, no varía.

Cuando las líneas celulares se estudian individualmente, se puede observar que B50 y N13 tienen coeficientes de correlación superiores a los valores de referencia cuando se comparan con el ensayo *in vitro* 3T3 NRU y con la toxicidad en humanos, pero no con respecto a la rata *in vivo*. La línea NRK-52E no mejora ninguna correlación.

Aunque individualmente no se han obtenido resultados excesivamente satisfactorios, estos resultados corroboran la idoneidad del método empleado, ya que se obtienen mejores resultados que con el método *in vitro* de referencia basado en los valores de IC50 en el test de captación de Rojo Neutro por 3T3.

<b>B50</b>						
	<b>3T3 NRU</b>	<b>n</b>	<b>RATA</b>	<b>n</b>	<b>HUMANO</b>	<b>n</b>
<b>VALOR MÍNIMO EC50</b>	0,543	53	0,321	53	0,559	45
<b>VALOR MÍNIMO IC50/EC50</b>	0,543	53	0,319	53	0,565	45

n= Número de valores empleados para el cálculo de la correlación.

<b>NRK-52E</b>						
	<b>3T3 NRU</b>	<b>n</b>	<b>RATA</b>	<b>n</b>	<b>HUMANO</b>	<b>n</b>
<b>VALOR MÍNIMO EC50</b>	0,467	52	0,245	52	0,396	44
<b>VALOR MÍNIMO IC50/EC50</b>	0,492	53	0,271	53	0,428	45

n= Número de valores empleados para el cálculo de la correlación.

<b>N13</b>						
	<b>3T3 NRU</b>	<b>n</b>	<b>RATA</b>	<b>n</b>	<b>HUMANO</b>	<b>n</b>
<b>VALOR MÍNIMO EC50</b>	0,665	49	0,38	49	0,641	41
<b>VALOR MÍNIMO IC50/EC50</b>	0,665	49	0,38	49	0,641	41

n= Número de valores empleados para el cálculo de la correlación.

<b>3 LÍNEAS CELULARES</b>						
	<b>3T3 NRU</b>	<b>n</b>	<b>RATA</b>	<b>n</b>	<b>HUMANO</b>	<b>n</b>
<b>VALOR MÍNIMO EC50</b>	0,515	57	0,253	57	0,415	47
<b>VALOR MÍNIMO IC50/EC50</b>	0,515	57	0,253	57	0,415	47

n= Número de valores empleados para el cálculo de la correlación.

**Tabla 18:** Coeficientes de correlación para las concentraciones mínimas de cada línea celular y del conjunto. Se emplean las EC50 de los parámetros ensayados e incluyendo la IC50 teniendo presentes el total de los ensayos.

Además, se ha calculado el número de concentraciones mínimas a las que se produce el efecto tóxico en los parámetros de estudio, para el conjunto de las líneas celulares (Tabla 19). Para la línea celular neuronal B50, el potencial de membrana plasmático medido a través de DiBAC es el primer parámetro que cambia, normal para una línea celular neuronal que depende del potencial, el potencial de membrana plasmático es el parámetro más sensible, aunque el glutatión y el calcio también son bastante sensibles.

La línea neuronal tiene un total de 20 compuestos cuyas concentraciones mínimas se encuentran distribuidas entre seis de los ocho parámetros, exceptuando el potencial de membrana mitocondrial y la IC50 donde las concentraciones son más elevadas.

En la línea renal NRK-52E, el parámetro que cambia de forma más temprana y tiene mayor número de concentraciones mínimas es el superóxido mitocondrial, radical que puede ocasionar daño renal. Otros parámetros que cambian tempranamente y se encuentran muy igualados son el potencial de membrana plasmático y el nivel de calcio medido a través de Fluo-4 AM. Una de las principales funciones del riñón es el control homeostático, donde la mayoría de enzimas funcionan dependiendo del pH y de la concentración iónica, el potencial de membrana dependerá de esta concentración iónica donde el calcio cobra especial importancia.

En la línea celular renal NRK-52E, se encuentran el mayor número de compuestos con la concentración mínima a la que se produce el efecto. Un total de 27 de los 57 compuestos se encuentran en esta línea, especialmente sensible a los cambios. Igual que con las B50, los parámetros del potencial de membrana mitocondrial y la IC50 requieren concentraciones más elevadas y no presentan tóxicos con la concentración mínima en estos parámetros.

En la línea de hepatoma de rata N13, los primeros efectos tóxicos que se producen, se encuentran en los niveles de superóxido y en los niveles de glutatión medidos mediante el monoclorobimano (MCB). Resultado lógico ya que la forma reducida del glutatión (GSH) se

encuentra en mayor proporción en el hígado y participa en la detoxificación de sustancias xenobióticas. A su vez, éstas generan radicales superóxido que pueden provocar daño hepático.

Sin embargo, en esta línea celular se encuentran muy pocos compuestos que presentan la concentración mínima en alguno de los parámetros, tan sólo 8 de los 57 compuestos. Este resultado se debe a que las concentraciones que se requieren en esta línea celular son más elevadas.

En total, existen 55 compuestos de los 57 totales que presentan concentración mínima a la que se produce el efecto (Tabla 19). Hay dos compuestos, la warfarina y el benceno que no presentan efectos en ningún parámetro ensayado, debido al mecanismo de acción tóxico de estos compuestos.

A nivel general, para el conjunto de las tres líneas celulares, el parámetro que presenta un mayor número de concentraciones mínimas es el potencial de membrana plasmático, 14 compuestos entre las tres líneas, es el parámetro más sensible. El calcio y el glutatión son los siguientes más sensibles, con 11 compuestos cada uno, muy igualado con el nivel del radical superóxido con 10 compuestos. La IC50 no presenta ningún compuesto, en todos los casos la concentración empleada es más elevada que en los parámetros.

Por parámetros, el potencial de membrana plasmático y el nivel de glutatión son más sensibles en la línea celular neuronal, B50. El calcio intracelular, el óxido nítrico y el superóxido mitocondrial

presentan mayor sensibilidad en la línea renal NRK-52E. En las N13 el potencial de membrana mitocondrial es el único parámetro más sensible, aunque se observa la presencia de un único compuesto.

El marcaje de viabilidad mediante el ensayo del yoduro de propidio se utiliza para seleccionar la población de células vivas, por lo que los datos de carácter funcional pueden así ser referidos exclusivamente a las células vivas. Esta estrategia, que sólo la citómica permite, proporciona indicadores de efectos tempranos de los compuestos, permitiendo relacionar dichos efectos en función de la concentración mínima de los tóxicos. Además, al ser una técnica multiparamétrica permite evaluar y cuantificar los cambios producidos en la célula en respuesta a un agente tóxico proporcionando gran cantidad de información adicional.

El estudio de la capacidad para predecir toxicidad aguda en rata mediante regresión lineal y obtención de los coeficientes de correlación demuestra que el método empleado, basado en ensayos con líneas celulares de rata, aporta mejores resultados que el método *in vitro* de referencia, basado en los valores de IC50 en el test de captación de Rojo Neutro por 3T3. Proporciona una estrategia de ensayo simple y fiable, dando resultados reproducibles con buenos resultados a nivel estadístico, lo que demuestra la robustez del método.

	NÚMERO DE CONCENTRACIONES MÍNIMAS TÓXICAS								
	IC50	DiBAC	FLUO-4AM	TMRM	DCFH-DA	DAF-FM	MITOSOX	MCB	TÓXICOS
<b>B50</b>	0	7	4	0	1	2	1	5	20
<b>NRK-52E</b>	0	6	6	0	1	3	7	4	27
<b>N13</b>	0	1	1	1	1	0	2	2	8
<b>TOTAL</b>	0	14	11	1	3	5	10	11	55

**Tabla 19:** Número de concentraciones mínimas a las que se produce el efecto tóxico en los parámetros de estudio, para el conjunto de las líneas celulares empleadas.

## 5.4 CAPACIDAD DE CLASIFICACIÓN

Para valorar la capacidad de clasificar los compuestos siguiendo los criterios del Global Harmonization System (GHS) y la regulación CLP a nivel de la Unión Europea, clasificaciones basadas en los valores de la LD50 en rata *in vivo*, se distribuyen los patrones de toxicidad de los datos generados en forma de una matriz de datos jerarquizada, que permite visualizar, correlacionar y clasificar los compuestos.

Se han distribuido los 57 compuestos en las cinco clases según indica la GHS. Estas clases se reducen a cuatro categorías de toxicidad según la regulación a nivel de la Unión Europea, CLP, todas ellas descritas anteriormente. Para el análisis de datos se emplea la IC50 y la EC50. Para establecer el grado de toxicidad de los compuestos utilizando ambas clasificaciones, es necesario realizar una transformación de los resultados como ya se ha comentado anteriormente.

Numéricamente, después de realizar la transformación, se obtienen valores negativos que representan los compuestos más tóxicos, el cero los compuestos con una toxicidad intermedia, y finalmente, los valores positivos que corresponde a los compuestos menos tóxicos o no tóxicos. Basándonos en este criterio, el color rojo se aplica al más tóxico, el amarillo para los intermedios y el verde para los menos tóxicos, estableciéndose una gradación de colores según la toxicidad. El color blanco representa los tóxicos que no presentan efecto para las dosis ensayadas.

En la figura 13, se puede observar la ordenación de los compuestos por orden decreciente de toxicidad y su clasificación siguiendo la gradación de color, usando como referencia la LD50 *in vivo* de rata de la bibliografía, separados según las clases o categorías dependiendo de los diferentes criterios establecidos.

Clase I o categoría 1: $\leq 5\text{mg/Kg}$	<b>Cicloheximida</b> <b>Selenato sódico</b> <b>Fisostigmina</b>
Clase II o categoría 2: $>5 \text{ y } \leq 50\text{mg/Kg}$	<b>Paratión</b> <b>Estricnina</b> <b>Warfarina</b> <b>Sulfato de talio</b> <b>Ocratoxina A</b> <b>Colchicina</b> <b>Cis-dicloro-diaminplatino (II)</b> <b>Digoxina</b> <b>Epinefrina bitartrato</b>
Clase III o categoría 3: $>50 \text{ y } \leq 300\text{mg/Kg}$	<b>Cloruro mercurio (II)</b> <b>Diclorvos</b> <b>Micotina</b> <b>Trióxido de arsénico</b> <b>Pentaclorofenol</b> <b>Verapamil hidrocloreuro</b> <b>Paraquat dicloruro</b> <b>Cloruro cadmio (II)</b> <b>Lindano</b> <b>Fluoruro sódico</b> <b>Fenobarbital</b> <b>5-fluorouracilo</b> <b>Diquat dibromuro</b> <b>Cafeína</b>
Clase IV o categoría 4: $>300 \text{ y } \leq 2000\text{mg/Kg}$	<b>Orfenadrina hidrocloreuro</b> <b>Amtrintilina hidrocloreuro</b> <b>Ácido 2.4-diclorofenoxiacético</b> <b>Propranolol hidrocloreuro</b> <b>Tert butil hidroperóxido</b> <b>Atropina sulfato monohidrato</b> <b>Hidrato de cloral</b> <b>Valproato sódico</b> <b>Sulfato litio</b> <b>17<math>\alpha</math>-etinilestradiol</b> <b>Malatión</b> <b>Ciclosporina A</b> <b>Ácido acetilsalicílico</b> <b>Sodio lauril sulfato</b> <b>Glufosinato amónico</b> <b>Rifamicina</b>
Clase V: $>2000 \text{ y } \leq 5000\text{mg/Kg}$ o no tóxico	<b>Acetaminofen</b> <b>Pireno</b> <b>Amiodarona hidrocloreuro</b> <b>Carbamazepina</b> <b>Tetraciclina hidrocloreuro</b> <b>Acetonitrilo</b> <b>Dimetilformamida</b> <b>Cloruro sódico</b> <b>Alcohol isopropílico</b> <b>Benceno</b> <b>Etilenglicol</b> <b>Metanol</b> <b>Hexaclorobenceno</b> <b>Etanol</b> <b>Dietilenglicol</b>

**Figura 13:** Clasificación de los compuestos según su toxicidad decreciente siguiendo la gradación de color rojo (mayor toxicidad) hasta verde (menos tóxico o no tóxico). Clasificaciones según la GHS y CLP, basadas en la LD50 de rata con los rangos de concentraciones incluidos en cada clase o categoría.

En aquellos compuestos que no presentaban efecto, no se ha podido obtener la IC50 o EC50. Se ha realizado el mismo análisis de la matriz de datos empleando los valores correspondientes a la máxima concentración probada, y se le ha aplicado el color correspondiente según su grado de toxicidad, reemplazando el color blanco de las matrices de datos generadas.

Los resultados muestran el conjunto de ensayos citómicos llevados a cabo en cada una de las líneas celulares, teniendo como referencia la LD50 de rata, los valores de IC50 *in vitro* en el test de captación de Rojo Neutro por 3T3 (Sjöström et al., 2008) y con los valores de LC50 en sangre determinados en casos de envenenamientos en humano.

Para cada matriz de datos obtenida, se observa en la primera fila la media de color del total de los ensayos llevados a cabo y se aprecian las cinco clases de tóxicos teniendo en cuenta la clasificación según la GHS, y las cuatro clases al tomar como referencia la clasificación CLP a nivel de la Unión Europea. A la izquierda de cada matriz está representado el clúster jerarquizado con las correlaciones que existen entre los parámetros en los ensayos citómicos.

### 5.4.1 CLASIFICACIÓN SEGÚN EL CRITERIO GHS/CLP

Los resultados muestran la comparación con respecto a los valores de LD50 *in vivo* de rata, valores en los que se basa la escala GHS (Figura 14). Existe una parte de los compuestos que presentan la media de color que se corresponde con los valores de referencia y se clasifican correctamente, sin embargo, se aprecian bastantes diferencias en la clasificación de los compuestos. Hay compuestos clasificados como poco tóxicos (color verde) que en las líneas celulares de rata presentan una gran toxicidad (color rojo), y al revés, compuestos que están clasificados como muy tóxicos no presentan casi toxicidad en algunos parámetros.

Por ejemplo, los compuestos de la clase o categoría 1, cicloheximida, selenato sódico y fisostigmina, deberían encontrarse en el grupo 3 ya que presentan menos toxicidad en comparación con los valores bibliográficos. El sulfato de talio, la nicotina, el paraquat o el fenobarbital son compuestos que según la clasificación de los datos de referencia también presentan más toxicidad que en el ensayo *in vitro* y se deberían clasificar en otra categoría o clase de menor toxicidad.

También existen compuestos que presentan la situación opuesta, una mayor toxicidad en los ensayos *in vitro* que en la rata *in vivo*, el hexaclorobenceno, el SDS, el malatión, la amiodarona, el tert-butilhidroperóxido o la amitriptilina presentan una gran toxicidad y deberían encontrarse en una clase o categoría 2 o superior. Se puede

observar que hay dos compuestos, la warfarina y el benceno, que no se ha podido determinar ningún parámetro.

Estas diferencias en la clasificación pueden estar causadas por el mecanismo de acción y la metabolización de algunos compuestos. Por ejemplo, el sulfato de talio causa la muerte por parálisis respiratoria, la warfarina es un antagonista de la vitamina K y provoca la muerte por hemorragia o fallo circulatorio. El SDS es un detergente aniónico y provoca la muerte por lisis celular ya que rompen la barrera lipídica solubilizando las proteínas, el paraquat puede provocar la muerte debido a un fallo multiorgánico progresivo, más concretamente por asfixia y fibrosis pulmonar, y el malatión provoca fallo respiratorio acompañado de problemas cardiovasculares.

La fisostigmina actúa como inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa impidiendo que pueda eliminar la acetilcolina de la hendidura sináptica, provocando asfixia y convulsiones. El hexaclorobenceno puede causar efectos sobre el sistema nervioso tales como debilidad, temblores y convulsiones y daños en el hígado. El fenobarbital provoca insuficiencia respiratoria, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca y fallo renal agudo. La nicotina es un agonista del neurotransmisor acetilcolina y se une a los receptores colinérgicos de las neuronas en los ganglios autónomos, la corteza adrenal y el cerebro, afectando al sistema nervioso central, neurohormonal y cardiovascular.

Estos compuestos, entre otros, provocan la muerte del organismo *in vivo* mucho antes de que se puedan estudiar sus efectos tóxicos

dependientes de las concentraciones empleadas, lo que explicaría una mayor toxicidad en el organismo vivo que en la línea celular. El mecanismo de acción de algunos compuestos también explicaría la presencia de una mayor toxicidad en las líneas celulares que en el organismo vivo. La clasificación de estos compuestos variará respecto a los datos publicados en la bibliografía.

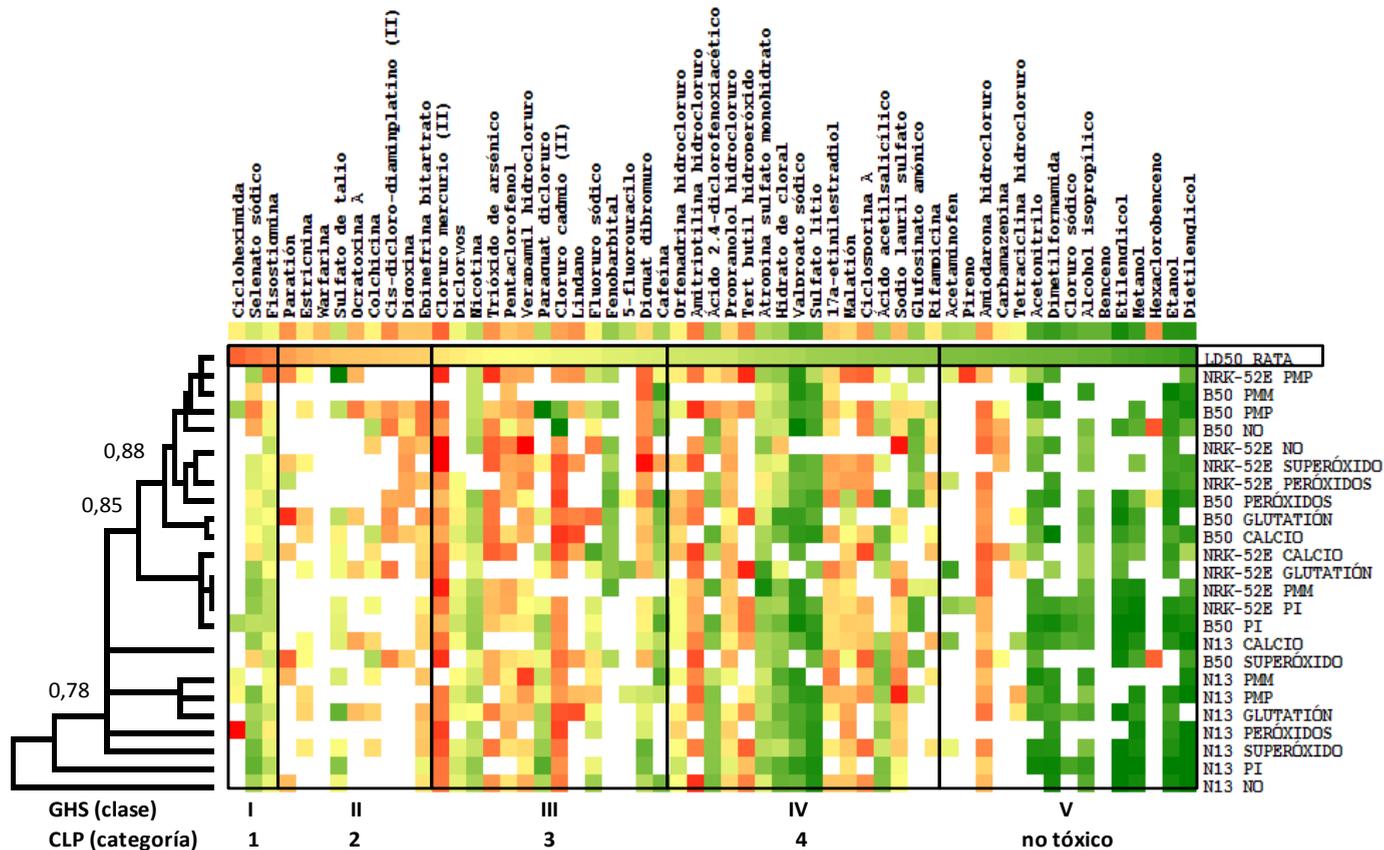
Los datos obtenidos para los parámetros de cada tóxico son bastante homogéneos, dan lugar a una escala de color similar para casi todos los parámetros, aunque hay excepciones como por ejemplo, el diquat dibromuro, identificado químicamente como bipiridilo, que presenta elevada toxicidad en los parámetros correspondientes a la línea celular renal y neuronal, NRK-52E y B50 respectivamente, representada con un color rojo intenso, y una baja toxicidad correspondiente al color verde para la línea de hepatoma N13 (Figura 14).

Este resultado está de acuerdo con el mecanismo de acción del diquat dibromuro ya que sus propiedades tóxicas se derivan de la capacidad de los bipiridilos de generar radicales libres en los tejidos, dando lugar a peroxidaciones de los fosfolípidos de las membranas celulares produciendo daño y muerte celular. El diquat causa daño renal pudiendo progresar a fallo renal, con evidencias de efectos neurotóxicos.

A la izquierda de la matriz de datos (Figura 14) está representado el clúster que muestra la relación existente entre todos los parámetros, a través del coeficiente de correlación. Los valores

confirman que los datos obtenidos para cada tóxico son homogéneos, con coeficientes de correlación de 0,78, 0,85 y 0,88 para los distintos clústers generados en la matriz de datos.

Estos valores demuestran que aunque la clasificación de algunos compuestos no se corresponda con los valores bibliográficos, el método propuesto basado en ensayos *in vitro* con líneas celulares de rata es robusto y comparable a la rata *in vivo*, ya que la proximidad entre especies mejora los datos obtenidos en estudios previos realizados en nuestro laboratorio, basados en líneas celulares humanas.



**Figura 14:** Clasificación de los compuestos según la GHS y CLP, basadas en la LD50 de rata con los rangos de concentraciones incluidos en cada clase o categoría. Se clasifican los 57 compuestos ensayados en las tres líneas celulares. A la izquierda se encuentra la matriz jerarquizada con las correlaciones para los distintos clústers.

Con el objetivo de aportar mayor información para lograr la clasificación de los compuestos químicos y evaluar el método propuesto, se ha realizado una matriz de datos exclusivamente de los datos publicados en la bibliografía. Se han comparado los valores de IC50 *in vitro* en el test de captación de Rojo Neutro por 3T3 (Sjöström et al., 2008) y los valores LC50 en sangre determinados en casos de envenenamientos en humano, tomando como referencia la LD50 de rata al igual que la escala GHS (Figura 15).

Los resultados muestran que los valores bibliográficos presentan diferencias en la clasificación de los compuestos. Los colores no coinciden con los datos de la LD50 de rata y no se clasifican según lo previsto. Existen compuestos que presentan poca toxicidad para la rata *in vivo*, pero que en humanos es muy tóxico, mientras que en 3T3 tiene una toxicidad intermedia. Otros compuestos presentan mayor toxicidad en rata que *in vitro* y en humanos. En general, los compuestos presentan mayor toxicidad en humanos y en el método *in vitro* que en la rata *in vivo*. Es por eso que en las clases 3, 4 y 5 hay una gran presencia de color rojo, cuando deberían ser de toxicidad intermedia (color amarillo) o baja (color verde).

Estos resultados coinciden con los obtenidos en este estudio, al comparar el método *in vitro* de líneas celulares de rata con la rata *in vivo* se han apreciado las mismas diferencias. La diferencia entre especies y la diferente metabolización y distribución de los compuestos químicos explicaría estas diferencias.

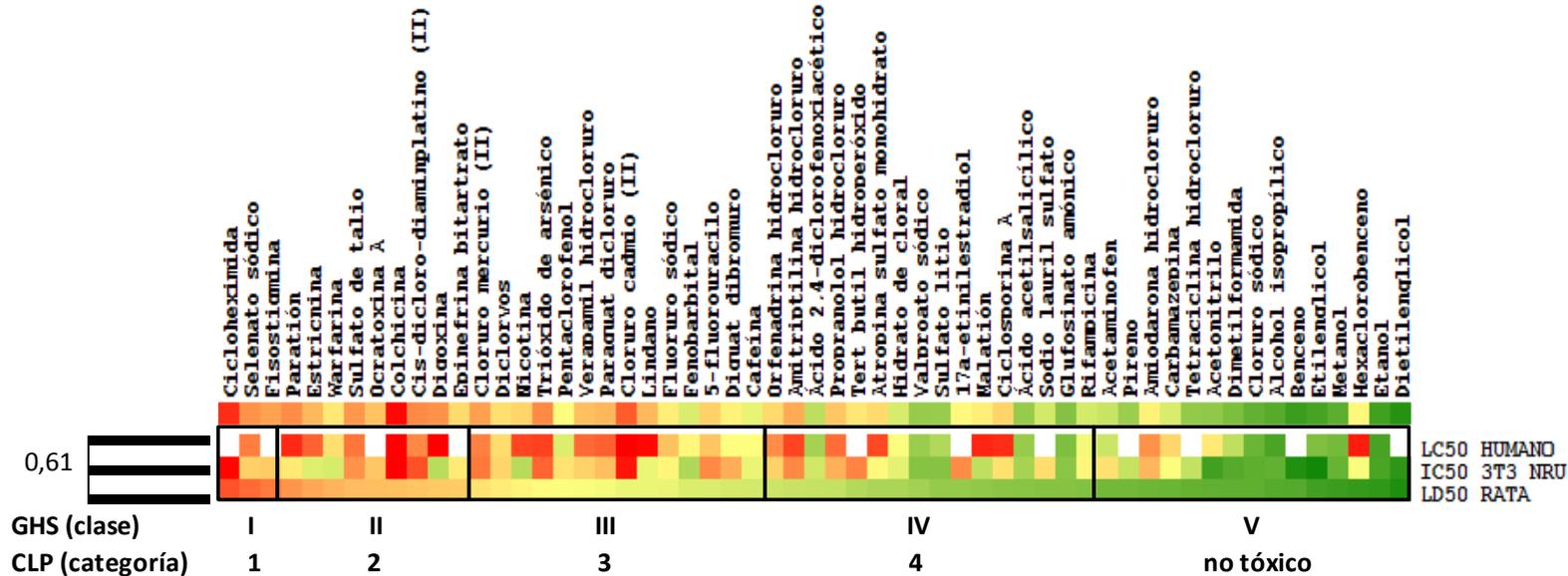


Figura 15: Clasificación de los compuestos según la GHS y CLP, basadas en la LD50 de rata con los rangos de concentraciones incluidos en cada clase o categoría. Se clasifican los compuestos según los valores obtenidos en la bibliografía. A la izquierda se encuentra la matriz jerarquizada con la correlación para los distintos clústers.

Para intentar obtener una mejor clasificación de estos compuestos, se ha trabajado con la concentración máxima probada, limitada por las propiedades de solubilidad de los compuestos. Se ha realizado la misma clasificación de los compuestos, pero sustituyendo los huecos en blanco por la concentración más elevada testada y su correspondiente color en función de su grado de toxicidad.

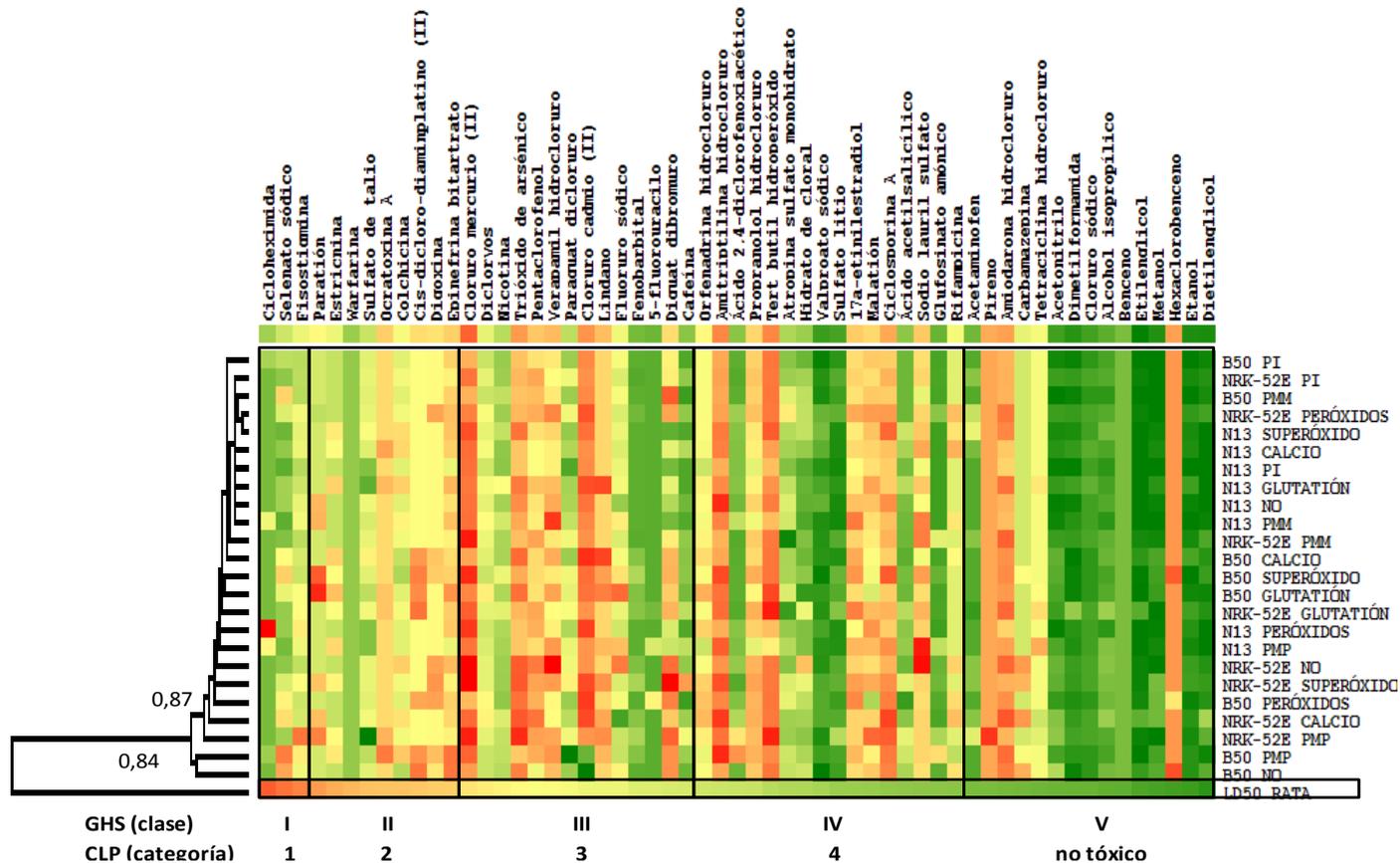
Según la clasificación GHS basada en la LD50 de rata (Figura 16), los resultados muestran que aquellos compuestos con ausencia de efectos en la gran mayoría de parámetros presentan un rango de color indicativo de una gran toxicidad, como el hexaclorobenceno o el pireno. La interpretación de estos resultados puede resultar errónea, ya que su baja solubilidad da lugar a una aparente elevada toxicidad.

También existen compuestos con ausencia de efecto que presentan menor toxicidad en comparación con los resultados bibliográficos, con un rango de color verde. Es el caso de la warfarina, cicloheximida o fenobarbital. Este resultado está de acuerdo con el mecanismo de acción tóxico de los compuestos como se ha explicado anteriormente, verificando los datos obtenidos y el método empleado.

La interpretación de los resultados es la misma que sin emplear la concentración máxima probada. Sin embargo, el análisis jerarquizado de la matriz de datos generada (Figura 16), proporciona coeficientes de correlación de 0,84 y 0,87. Estos coeficientes mejoran ligeramente respecto a la matriz de datos generada sin emplear la concentración

máxima probada, donde se obtenían coeficientes de correlación de 0,78 y 0,85 (Figura 14).

Esta mejora en los coeficientes de correlación indica que las concentraciones máximas probadas aportan una mayor homogeneidad al bloque de resultados, proporcionando mayor robustez al método empleado.



**Figura 16:** Clasificación de los compuestos según la GHS y CLP, basadas en la LD50 de rata con los rangos de concentraciones incluidos en cada clase o categoría. Se clasifican los 57 compuestos ensayados en las tres líneas celulares, con las dosis más altas ensayadas en el caso de no presentar efecto. A la izquierda se encuentra la matriz jerarquizada con las correlaciones para los distintos clústers.

## **5.4.2 CLASIFICACIÓN SEGÚN EL CRITERIO BASADO EN LA TOXICIDAD HUMANA**

Para apreciar posibles diferencias entre especies, se ha realizado una clasificación de los compuestos químicos basada en los valores de LC50 en sangre de humano (Figura 17). Al tratarse de datos obtenidos a través de envenenamientos, no todos los compuestos permiten la obtención de la LC50 y por tanto, no se han podido clasificar los 57 tóxicos del estudio. En este caso, se han obtenido datos bibliográficos de 46 compuestos químicos, y se han clasificado según la escala de toxicidad basada en la GHS.

Como muestra la figura 7, se puede apreciar una clasificación de los compuestos bastante buena, aunque existen casos puntuales que no corresponden con la clasificación. Con esta clasificación se observa que la clase o categoría 1 presenta el mayor número de compuestos. Teniendo en cuenta las clases o clasificaciones 1 y 2, más de la mitad de los compuestos químicos se clasifican en los dos grupos de mayor toxicidad, es decir, la mayoría de compuestos químicos aportan una gran toxicidad para el ser humano.

En la segunda categoría, igual que ocurre en la primera se observa bastante variabilidad, la gradación de colores no es coincidente con los valores bibliográficos, existen compuestos con una mayor toxicidad en algunos de los parámetros, como el cloruro de mercurio (II). Otros compuestos presentan menor toxicidad como el fluoruro sódico o el 5-fluorouracilo.

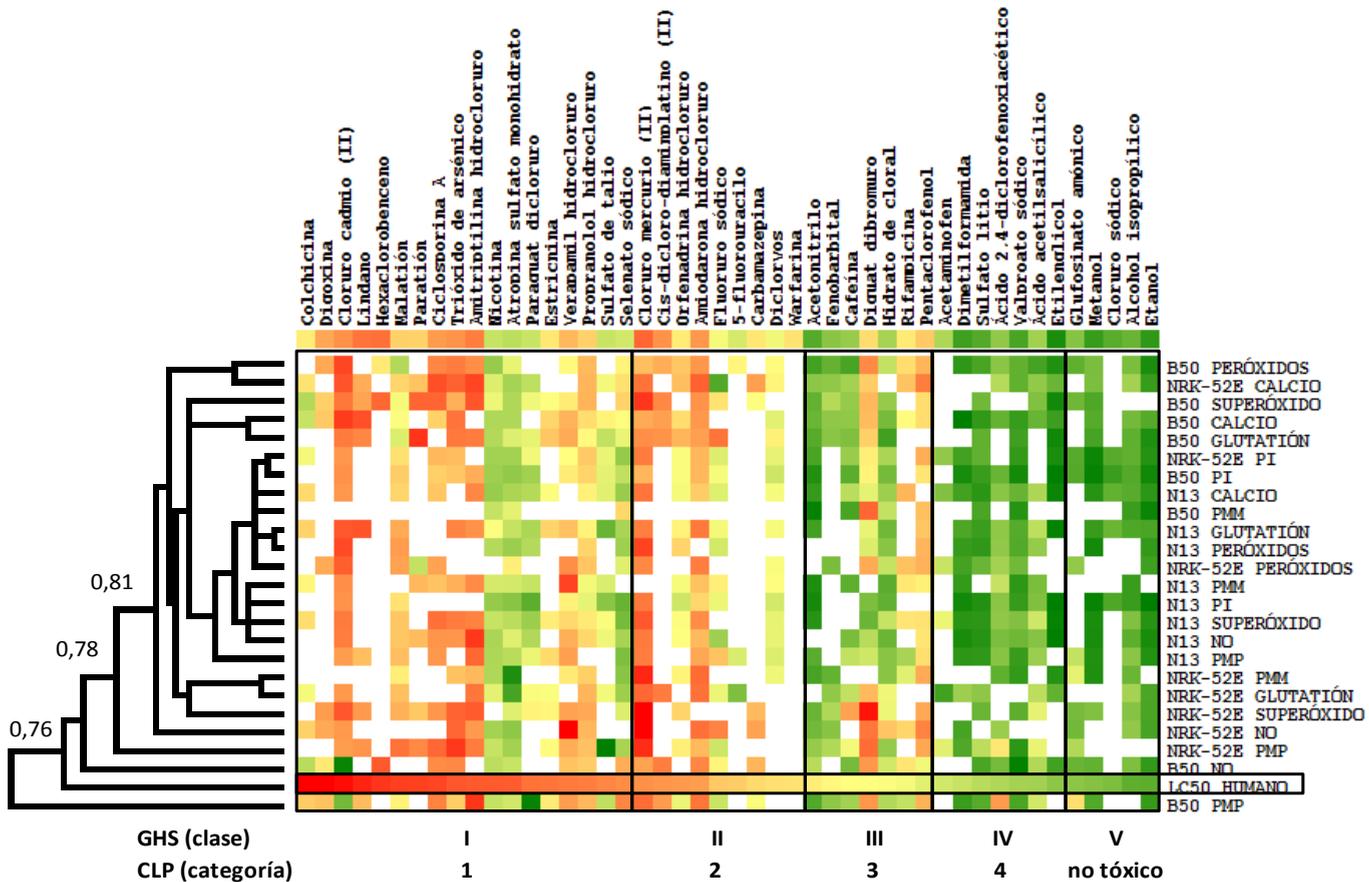
En el tercer grupo de toxicidad ocurre la misma situación, los compuestos no están bien clasificados. En este grupo se encuentra el diquat dibromuro, compuesto que según la línea celular sobre la que actúa presenta distinto grado de toxicidad, sin embargo, en humanos este compuesto se clasifica en un grupo intermedio de toxicidad. El resto de compuestos de este grupo tienen una menor toxicidad que los valores bibliográficos. Los dos últimos grupos son las clases o categorías de menor toxicidad, los tóxicos se clasifican de acuerdo a la escala establecida siguiendo los criterios de la GHS.

Las diferencias en la clasificación se deben a la diferencia entre especies, ya que los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, realizados con líneas celulares humanas muestran una mejor clasificación de los compuestos químicos. Además, el mecanismo de acción, la metabolización y la distribución de los compuestos difiere mucho en un organismo tan complejo como el ser humano, frente a líneas celulares de otra especie u organismos inferiores como la rata.

A la izquierda de la matriz de datos (Figura 17), se puede ver el clúster de los parámetros junto con los coeficientes de correlación. Se pueden apreciar coeficientes de correlación altos, 0,76 y 0,78, pero son inferiores a los obtenidos anteriormente en la clasificación basada en la LD50 de rata, donde son 0,78 y 0,85.

Los resultados globales muestran compuestos químicos que debido a su mecanismo de acción no provocan cambios en una gran

parte de los parámetros y no presentan valores de IC50 y/o de EC50, como por ejemplo el 5-fluorouracilo, cicloheximida, benceno, warfarina, pireno, carbamazepina o acetaminofen. La clasificación de estos compuestos según la escala GHS puede resultar errónea debido a la falta de información obtenida.



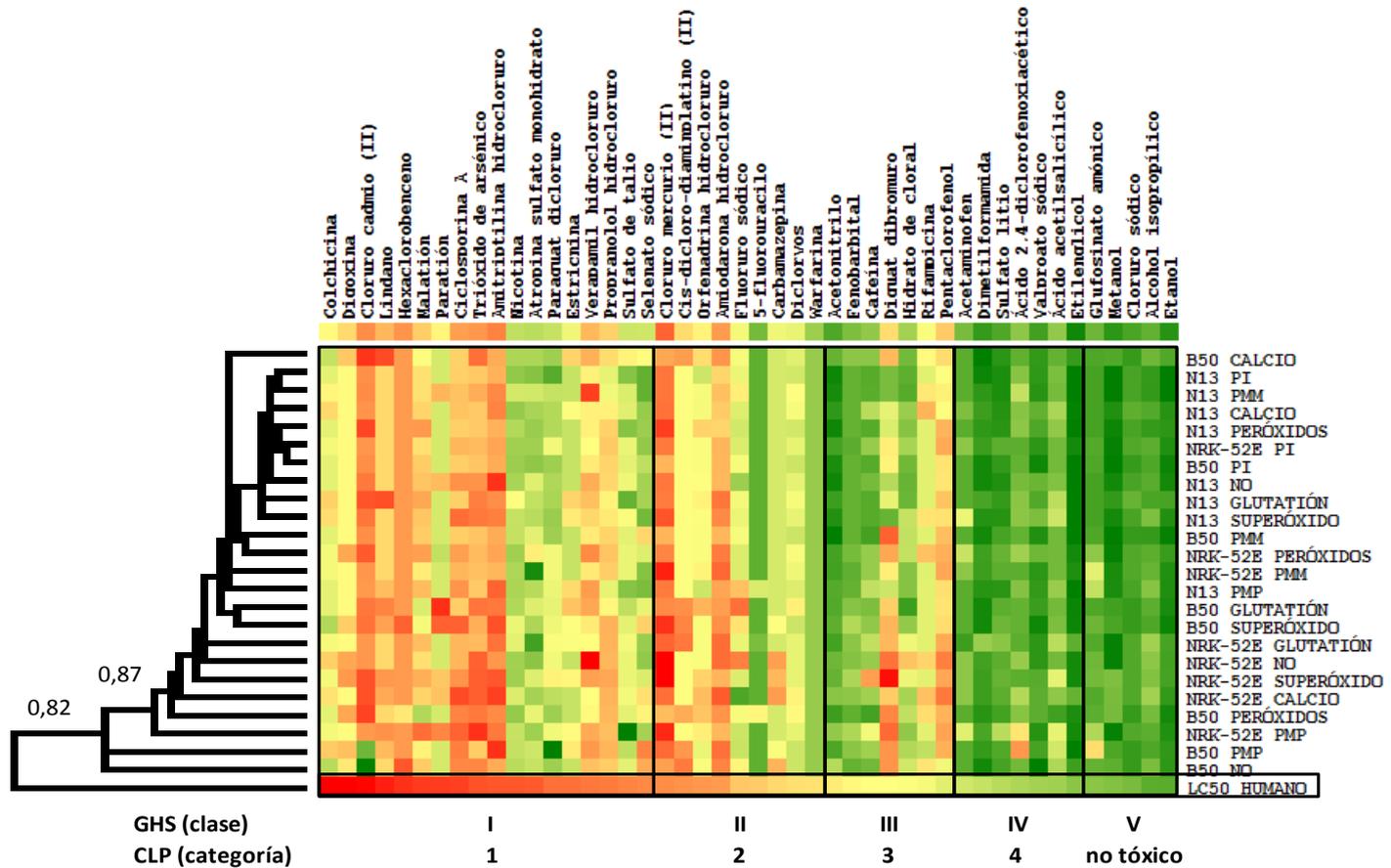
**Figura 17:** Clasificación de los compuestos según la GHS y CLP, con los rangos de concentraciones incluidos en cada clase o categoría, basada en la LC50 de humano. Se clasifican los 46 compuestos ensayados en las tres líneas celulares. A la izquierda se encuentra la matriz jerarquizada con las correlaciones para los distintos clústers.

Para intentar aportar mayor información, se procede de la misma forma que con la escala GHS, trabajando con las concentraciones máximas probadas en aquellos casos donde los compuestos ensayados no presentan efecto.

Las clasificaciones de los datos obtenidos teniendo en cuenta la LC50 en humanos (Figura 18), muestra también unas elevadas correlaciones, más elevadas que los datos sin la concentración máxima ensayada. Se produce un incremento del coeficiente de correlación, desde 0,76 y 0,78 (Figura 17), hasta 0,82 y 0,87.

Como se puede apreciar en la figura 18, la concentración máxima probada aporta una gran homogeneidad, especialmente para las categorías de menor toxicidad, la clase 4 y la 5, donde prácticamente la totalidad de los compuestos se clasifican correctamente, lo que explica las altas correlaciones en este caso y la robustez del método empleado.

Sin embargo, respecto a la clasificación individual de los compuestos, ocurre la misma situación que anteriormente, existen diferencias en las escalas de color habiendo tóxicos con mayor toxicidad que los valores bibliográficos, como el pentaclorofenol o el diquat dibromuro y un gran número de tóxicos con menor toxicidad, ya que las dos categorías de mayor toxicidad engloban más de la mitad de los compuestos, dando lugar a efectos no reproducibles en nuestros ensayos.



**Figura 18:** Clasificación de los compuestos según la GHS y CLP, con los rangos de concentraciones incluidos en cada clase o categoría, basada en la LC50 de humano. Se clasifican los 46 compuestos ensayados en las tres líneas celulares con las dosis más altas ensayadas en el caso de no presentar efecto. A la izquierda se encuentra la matriz jerarquizada con las correlaciones para los distintos clústers.

### **5.4.3 CLASIFICACIÓN SEGÚN EL CRITERIO BASADO EN LA TOXICIDAD IN VITRO DE 3T3**

A pesar de la baja capacidad de clasificación de algunos compuestos tanto en rata como en humano, para evaluar el método propuesto, también se han comparado los ensayos realizados en líneas celulares de rata con los ensayos in vitro del test de captación de Rojo Neutro en 3T3. Se ha empleado la misma metodología en que se basa la escala GHS pero clasificando los compuestos según el método in vitro de referencia (Figura 19).

Los resultados muestran en general una muy buena clasificación de los compuestos para las tres líneas celulares cuando se comparan con los valores de IC50 in vitro de 3T3 NRU, al tratarse de dos métodos in vitro, las condiciones de tratamiento y la metodología son similares.

Se observa una gradación de colores según la toxicidad creciente, la clase o categoría 5 de menor toxicidad, clasifica correctamente todos los compuestos, que presentan color verde intenso. En la clase o categoría 4, la gran mayoría de compuestos también están bien clasificados, salvo algún caso aislado como el pireno. En las clases o categorías 3 y 2 es donde se produce la mayor variabilidad, ya que hay algunos compuestos que presentan mayor toxicidad que en el ensayo in vitro de 3T3 NRU, como por ejemplo, el lindano, el hexaclorobenceno, el paratión o la amiodarona.

Otros compuestos dentro de los mismos grupos, en cambio, presentan menor toxicidad, por ejemplo el acetaminofen, el paraquat dicloruro, el sulfato de talio o la atropina. En el grupo 3 también se encuentra la warfarina, pero no se puede clasificar debido a que no presenta cambios en los parámetros medidos. Estos compuestos dan lugar a efectos no reproducibles debido posiblemente al mecanismo de acción de los compuestos y la variabilidad entre las líneas celulares.

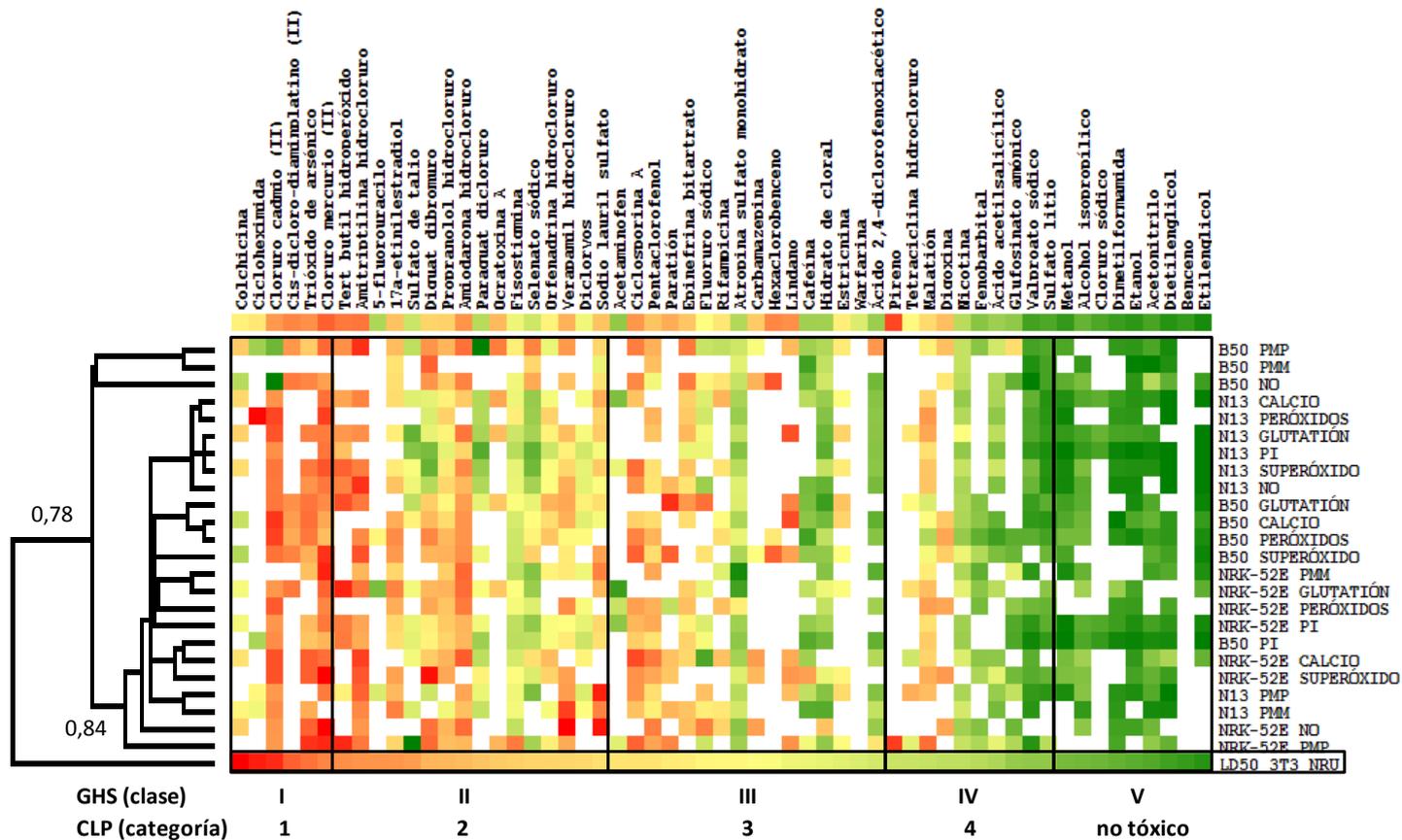
A pesar de las diferencias en estos dos grupos, se puede observar una tendencia hacia el color rojo a medida que se incrementa la toxicidad, principalmente en los compuestos cercanos al grupo 1. En la clase o categoría 1 prácticamente todos los compuestos presentan una gran toxicidad a excepción de la colchicina y la cicloheximida, debido igualmente a la variabilidad entre las líneas celulares.

A diferencia de la clasificación basada en los datos de LD50 de rata publicados en la bibliografía, la clasificación basada en la IC50 del ensayo de captación de Rojo Neutro en 3T3 presenta un mayor número de compuestos químicos en las clases o categorías 1, 2 y 3, mientras que las clases o categorías 4 y 5 de menor toxicidad tienen un número menor de compuestos.

Igual que cuando se compara con los datos de rata in vivo y con los datos de humano, los datos obtenidos cuando se compara con 3T3 para cada tóxico siguen siendo homogéneos, dan lugar a una escala de color similar para casi todos los parámetros. A excepción del diquat dibromuro, que presenta diferente rango de color

dependiendo de la línea celular a la que afecte como se ha comentado anteriormente. En este caso, el diquat dibromuro se clasifica en la clase o categoría 2, es decir, aumenta una categoría respecto a las clasificaciones basadas en LD50 de rata y LC50 de humano.

A la izquierda de la figura 19 aparece el clúster que agrupa los distintos parámetros en función de la similitud, medida a través del coeficiente de correlación entre las distintas agrupaciones. Se puede observar que presenta elevadas correlaciones, 0,78 y 0,84. Estas correlaciones son muy parecidas a las obtenidas basándose en la LD50 de rata y ligeramente superiores que las obtenidas para humano, lo que indica que el método in vitro propuesto es comparable y robusto aportando una alternativa fiable para la clasificación de los compuestos químicos.

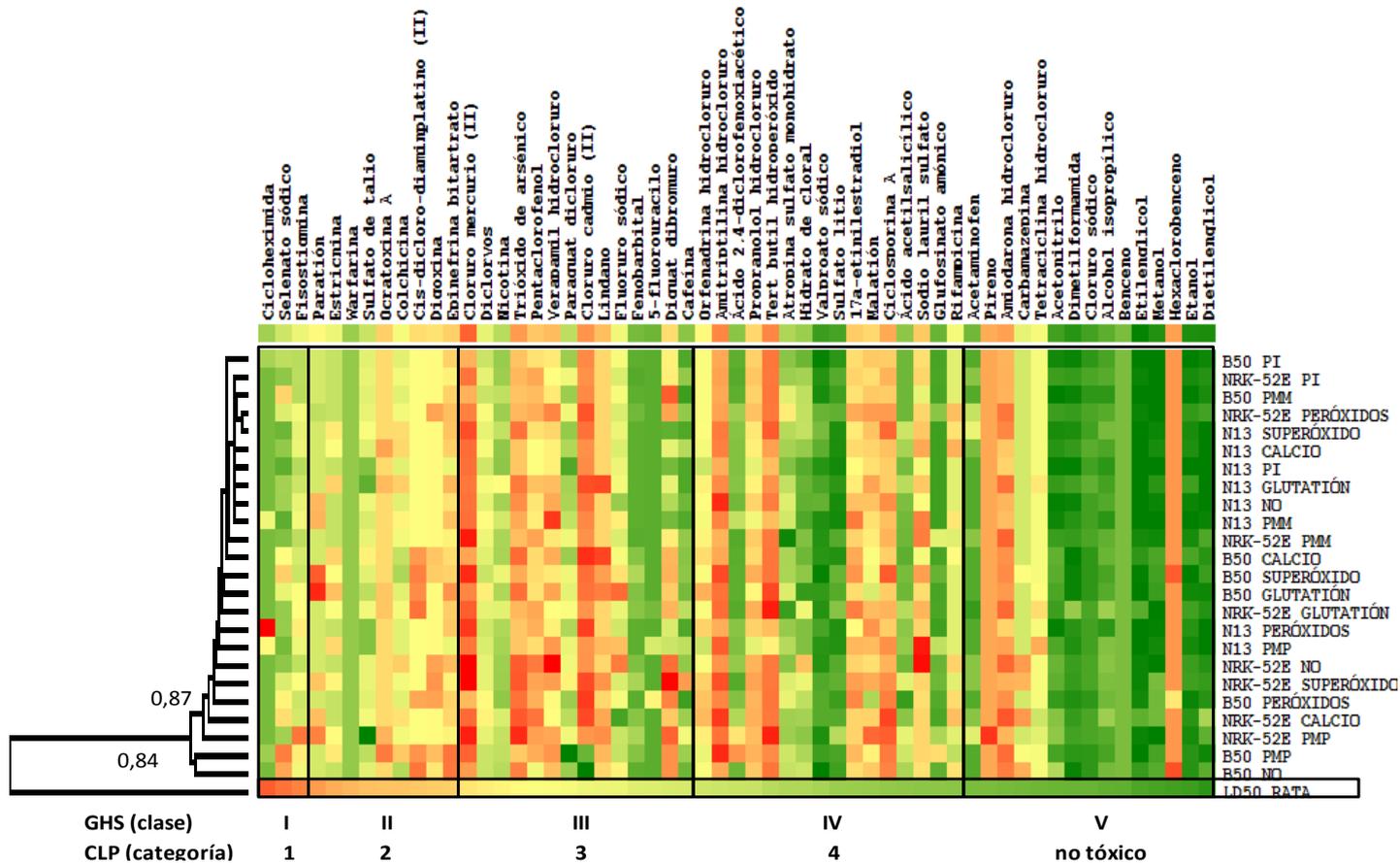


**Figura 19:** Clasificación de los compuestos según la GHS y CLP, con los rangos de concentraciones incluidos en cada clase o categoría, basada en la IC50 del ensayo de captación del Rojo Neutro en 3T3. Se clasifican los 57 compuestos ensayados en las tres líneas celulares. A la izquierda se encuentra la matriz jerarquizada con las correlaciones para los distintos clústers.

Al clasificar los compuestos empleando la concentración máxima ensayada, limitada por las propiedades de solubilidad de los compuestos, se observan también correlaciones más elevadas que en ausencia de la concentración máxima (Figura 20). En el caso del ensayo en 3T3 los coeficientes de correlación pasan de 0,78 y 0,84 anteriormente (Figura 19), a 0,83 y 0,87. Estos resultados indican la homogeneidad entre las distintas líneas celulares, ya que los compuestos presentan efectos tóxicos similares en todas ellas, dando coeficientes de correlación elevados.

Respecto a la clasificación de los compuestos, ocurre la misma situación que en los casos anteriores, existen diferencias en las escalas de color habiendo tóxicos con mayor toxicidad que los valores bibliográficos, como el hexaclorobenceno, el pireno, la tetraciclina o el malatión. En estos casos, la clasificación viene limitada por la solubilidad de los compuestos, ya que una escasa solubilidad como en este caso, puede dar lugar a interpretaciones erróneas y aparentar una mayor toxicidad que la que poseen realmente estos tóxicos.

También aparecen tóxicos con menor toxicidad que los valores de referencia, como por ejemplo, el 5-fluorouracilo, el acetaminofen, el sulfato de talio, la colchicina y la cicloheximida entre otros, presentando efectos no reproducibles en nuestros ensayos. Aún así, se puede observar una gradación de color dependiente del nivel de toxicidad a través de las diferentes clases o categorías.



**Figura 20:** Clasificación de los compuestos según la GHS y CLP, basadas en la LD50 de rata con los rangos de concentraciones incluidos en cada clase o categoría. Se clasifican los 57 compuestos ensayados en las tres líneas celulares, con las dosis más altas ensayadas en el caso de no presentar efecto. A la izquierda se encuentra la matriz jerarquizada con las correlaciones para los distintos clústers.

Los resultados globales muestran que la clasificación según la escala GHS, que está basada en la LD50 de rata, es una buena aproximación para clasificar los compuestos químicos. Con respecto a los estudios anteriores realizados en el laboratorio, empleando líneas celulares humanas, se mejoran los resultados obtenidos.

La clasificación de una gran mayoría de los compuestos se corresponde con los valores bibliográficos, aunque se pueden apreciar diferencias significativas en algunos compuestos. Esas diferencias vienen determinadas por el mecanismo de acción de los compuestos, ya que muchos de ellos provocan la muerte del organismo vivo antes de que se observen cambios en los parámetros.

La clasificación basada en el ensayo *in vitro* en 3T3, y en la LC50 en humanos, aporta buenas clasificaciones y correlaciones de los compuestos lo que nos confirma la robustez del método empleado. Además se ha obtenido una gran cantidad de información adicional gracias a la técnica empleada, la citometría, que al ser una técnica multiparamétrica, permite obtener gran cantidad de información de una forma rápida, sencilla y no invasiva.

## 5.5 MINERÍA DE DATOS E INTEGRACIÓN DE RESULTADOS

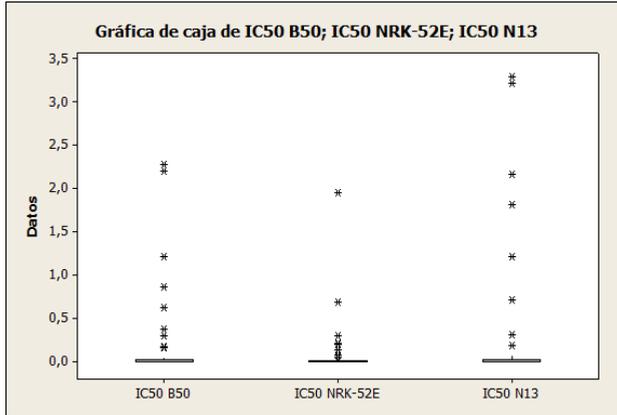
En primer lugar, se ha procedido a evaluar si existen diferencias entre las distintas líneas celulares empleadas en este trabajo. Para ello, se ha realizado la prueba T de dos muestras, para determinar si las medias de los dos grupos difieren, realizando una prueba de hipótesis de la diferencia de las medias de las dos muestras.

La hipótesis nula consiste en que la diferencia entre las medias de las poblaciones es igual a la diferencia hipotética, es decir, no existen diferencias entre las medias de las dos líneas celulares. La hipótesis alternativa aporta diferencias entre las medias de las poblaciones y por tanto, existen diferencias significativas entre las líneas celulares. En este caso se han comparado los valores de IC50 de las líneas celulares dos a dos.

Los resultados obtenidos (Figura 21), muestran la gráfica de caja con los valores de IC50 para cada línea celular. En la parte inferior se muestra la estadística obtenida, comparando los datos de las IC50 dos a dos. Se obtiene el intervalo de confianza al 95% y el valor estimado de la diferencia entre ambas líneas, ese valor se encuentra dentro de los intervalos de confianza en todos los casos comparados.

El dato obtenido de mayor relevancia es el valor P, que representa la probabilidad de rechazar incorrectamente una hipótesis nula que en realidad es verdadera. Los valores numéricos obtenidos son 0,335 en el caso de B50 vs NRK-52E, 0,445 para B50 vs N13 y 0,131 para NRK-52E vs N13. Todos ellos mayores al nivel de significancia de 0,05.

Los resultados indican que el valor P es superior al nivel de significancia, por tanto, la hipótesis nula no se puede rechazar. No existen diferencias entre las IC50 de las líneas celulares, bioquímicamente se puede decir que la IC50 no es órgano dependiente, sino que son líneas celulares equivalentes.



T de dos muestras para IC50 B50 vs. IC50 NRK-52E

	N	Media	Desv.Est.	Media del Error estándar
IC50 B50	57	0,150	0,456	0,060
IC50 NRK-52E	57	0,081	0,287	0,038

Diferencia =  $\mu$  (IC50 B50) -  $\mu$  (IC50 NRK-52E)

Estimado de la diferencia: 0,0692

IC de 95% para la diferencia: (-0,0726; 0,2110)

Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = 0,97 Valor P = 0,335 GL = 94

T de dos muestras para IC50 B50 vs. IC50 N13

	N	Media	Desv.Est.	Media del Error estándar
IC50 B50	57	0,150	0,456	0,060
IC50 N13	57	0,235	0,709	0,094

Diferencia =  $\mu$  (IC50 B50) -  $\mu$  (IC50 N13)

Estimado de la diferencia: -0,086

IC de 95% para la diferencia: (-0,307; 0,136)

Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -0,77 Valor P = 0,445 GL = 95

T de dos muestras para IC50 NRK-52E vs. IC50 N13

	N	Media	Desv.Est.	Media del Error estándar
IC50 NRK-52E	57	0,081	0,287	0,038
IC50 N13	57	0,235	0,709	0,094

Diferencia =  $\mu$  (IC50 NRK-52E) -  $\mu$  (IC50 N13)

Estimado de la diferencia: -0,155

IC de 95% para la diferencia: (-0,357; 0,047)

Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -1,53 Valor P = 0,131 GL = 73

**Figura 21:** Prueba T de dos muestras realizando una prueba de hipótesis de la diferencia de las medias de las dos muestras. Se ha realizado para las líneas celulares empleadas comparándolas dos a dos.

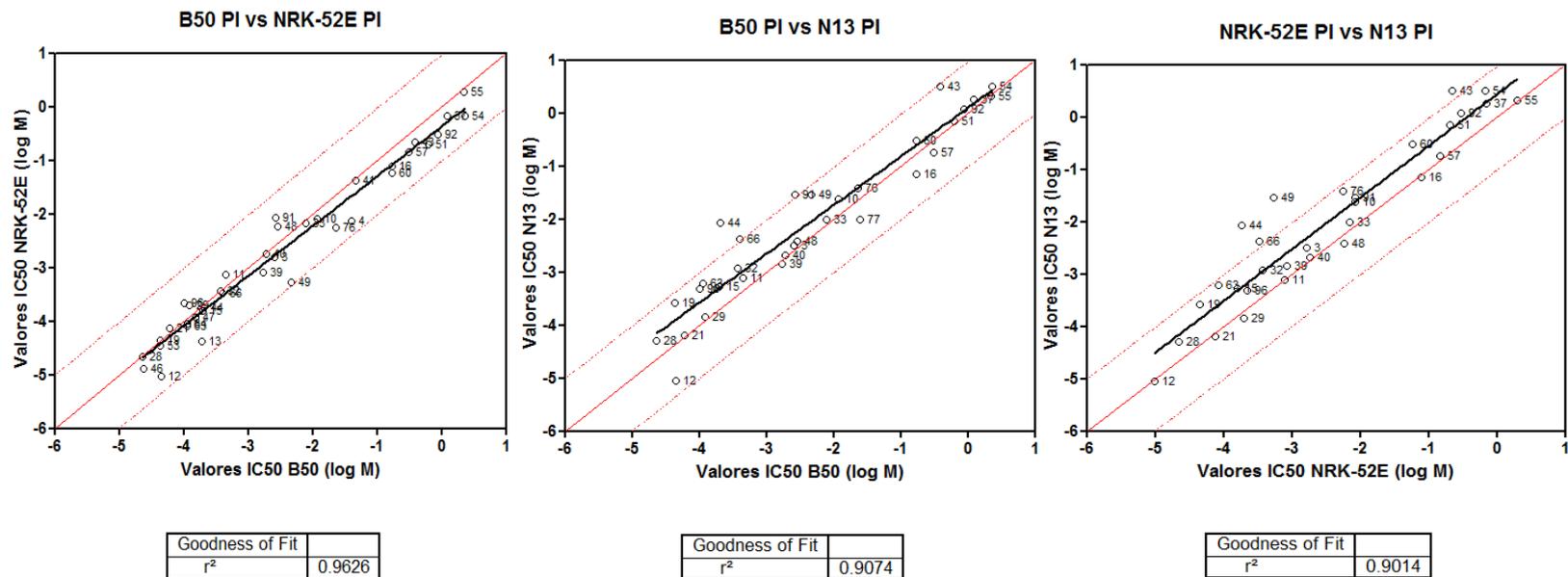
A continuación, se han representado en forma de gráfico biparamétrico las IC50 de las líneas celulares para comprobar si existe alguna diferencia entre los compuestos ensayados en las líneas celulares (Figura 22). Se puede observar que las IC50 de las B50 vs NRK-52E se mantienen en la diagonal, no existen diferencias, el coeficiente de correlación es de 0,96. Los compuestos presentan toxicidades equivalentes para estas dos líneas celulares.

La comparación entre B50 y N13 proporciona los mismos resultados, no existen diferencias entre las líneas celulares en general, la mayoría de compuestos se sitúan en la diagonal y presentan un coeficiente de correlación de 0,91. En cambio, se puede apreciar en la gráfica el compuesto número 44, correspondiente al dibromuro diquat, fuera del intervalo de error. Presenta mayor toxicidad para las B50 que en las N13, debido a su mecanismo de acción, corroborando la clasificación de este compuesto como se ha comentado anteriormente.

En la última gráfica (Figura 22), se comparan las líneas celulares NRK-52E y N13. A nivel general ocurre el mismo comportamiento que en los casos anteriores, el coeficiente de correlación es de 0,9. También se aprecia el comportamiento desigual entre las distintas líneas del dibromuro diquat junto con el paraquat, con mayor toxicidad para ambos en la línea renal NRK-52E que en N13.

Estos ensayos demuestran que las líneas celulares no son órgano-dependientes para la IC50, son equivalentes. Sin embargo, algunos compuestos químicos sí que presentan diferencias en los parámetros

de citotoxicidad y de estrés oxidativo ensayados, dependiendo del origen de la línea celular. La órgano dependencia de las líneas celulares empleadas aporta información adicional para explicar el comportamiento de algunos compuestos químicos y justifica su utilidad.



**Figura 22:** Correlaciones entre las IC50 de cada línea celular enfrentadas dos a dos. Las líneas rojas continuas representan la igualdad entre las IC50 de dos líneas celulares. Las líneas rojas discontinuas representan la desviación de una unidad de logaritmo que representa los límites para identificar compuestos con comportamientos anómalos. Regresión lineal del conjunto de compuestos con la obtención del coeficiente de correlación para cada conjunto.

### 5.5.1 ANÁLISIS PCA

Para el análisis estadístico de todos los valores obtenidos, se incluyen el total de los parámetros de citotoxicidad y de estrés oxidativo medidos, 8 variables en total, para cada una de las tres líneas celulares y para los 57 tóxicos por línea celular empleados, dando un total de 171 objetos para ocho variables.

El análisis más adecuado para este gran volumen de datos generado, que aporta información conjunta, es el análisis de componentes principales (PCA). Técnica multivariante que resuelve el problema de la dimensionalidad. El PCA analiza si es posible representar adecuadamente los datos generados con un número menor de variables, construidas como combinaciones lineales de las originales, a costa de una pequeña pérdida de información.

En este caso, se ha trabajado con los ratios de fluorescencia, es decir, la relación existente entre las intensidades de fluorescencia obtenidas para las distintas concentraciones de tóxico respecto a la intensidad de fluorescencia en ausencia de tóxico. El ratio de fluorescencia empleado en el PCA corresponde a la IC50 de cada tóxico (Tablas 20, 21 y 22). En el caso de no presentar IC50 el ratio corresponde a la máxima concentración probada. Los ratios de fluorescencia son proporcionales a los niveles de cada parámetro ensayado.

B50								
Número AcuteTox	Referencia química	DIBAC	FLUO-4 AM	TMRM	DCFH-DA	DAF-FM	MITOSOX	MCB
1	Acetaminofen	1,131	1,031	1,028	1,345	0,889	1,157	1,605
2	Ácido acetilsalicílico	4,710	1,279	1,182	9,172	4,607	0,909	1,253
3	Atropina sulfato monohidrato	2,965	24,339	2,032	5,616	6,854	7,405	0,643
4	Cafeína	2,489	5,466	0,309	15,037	3,371	2,366	0,774
5	Carbamazepina	0,679	1,428	1,717	0,720	1,691	0,247	0,710
6	Colchicina	4,514	3,603	1,273	1,096	1,076	1,836	0,949
7	Cicloheximida	0,384	0,868	0,983	1,036	1,131	0,800	0,689
9	Digoxina	2,483	7,137	1,007	4,468	1,025	1,153	1,444
10	Alcohol isopropílico	1,192	3,307	0,733	2,241	10,520	1,126	8,233
11	Malatión	2,158	3,814	1,267	3,819	0,923	2,218	0,672
12	Cloruro mercurio (II)	2,322	5,877	1,808	2,897	3,896	1,798	3,067
13	Pentaclorofenol	4,926	9,906	0,350	7,087	1,755	3,063	1,806
14	Fenobarbital	3,516	1,472	1,262	9,142	0,734	1,226	1,348
15	Sodio lauril sulfato	1,078	0,750	0,941	1,054	6,670	2,316	0,922
16	Valproato sódico	9,121	0,680	0,529	17,932	2,519	1,808	3,193
17	5-fluorouracilo	1,186	0,879	1,184	3,519	1,557	0,974	1,100
18	Benceno	0,945	0,761	0,480	1,655	1,720	1,032	0,917
19	Tert butil hidroperóxido	0,667	1,330	1,167	0,974	0,971	0,805	1,939
21	Cloruro cadmio (II)	1,473	4,913	1,033	6,181	1,858	0,318	3,915
23	Pireno	1,438	2,269	1,085	0,642	1,340	1,893	0,802
26	Hexaclorobenceno	1,417	1,170	1,419	0,822	0,598	1,015	0,609
28	Amiodarona hidrocloruro	11,339	4,313	0,720	4,200	0,720	2,736	2,959
29	Verapamil hidrocloruro	13,024	3,514	0,927	2,222	1,940	3,908	1,303
30	Rifampicina	2,359	1,444	1,388	2,170	3,853	0,929	1,581
31	Tetraciclina hidrocloruro	1,784	0,444	0,844	0,845	0,936	1,383	6,561
32	Orfenadrina hidrocloruro	1,562	18,056	1,141	3,080	1,303	1,715	2,169
33	Nicotina	2,838	28,814	3,579	2,449	6,171	1,909	4,908
34	Lindano	4,548	1,797	0,849	0,936	1,664	1,806	2,943
37	Etanol	1,446	14,222	0,277	7,869	10,638	0,949	1,919
38	Paratión	1,798	1,735	1,606	0,990	0,623	1,862	0,940
39	Diclorvos	1,082	0,456	0,708	1,047	1,542	0,928	1,761
40	Fisostigmina	5,347	3,897	0,999	3,713	9,426	5,535	2,649
41	Glufosinato amónico	2,004	0,921	1,191	0,912	1,944	1,440	1,036
42	Cis-dicloro-diaminplatino (II)	1,632	8,548	0,958	2,521	2,626	3,651	1,384
43	Dietilenglicol	0,782	3,214	0,796	1,224	2,713	8,423	0,942
44	Diquat dibromuro	2,291	2,065	1,568	6,946	1,630	3,496	2,110
45	Ocratoxina A	3,654	1,430	1,003	0,974	0,826	0,764	9,649
46	Ciclosporina A	2,583	1,735	1,313	1,382	1,753	1,299	1,049
47	17 $\alpha$ -etilnilestradiol	1,363	41,097	0,686	9,897	2,450	3,394	0,988
48	Fluoruro sódico	1,093	1,393	1,290	0,962	2,799	1,687	0,961
49	Paraquat dicloruro	1,347	0,960	1,044	0,883	1,292	2,599	2,285
51	Dimetilformamida	6,121	3,863	0,879	2,165	1,792	1,284	1,075
53	Amitriptilina hidrocloruro	5,327	1,677	1,003	4,751	1,739	2,442	2,463
54	Etilenglicol	0,558	1,734	0,887	1,241	2,541	0,862	3,135
55	Metanol	3,829	2,632	1,038	11,644	1,692	4,767	10,438
57	Cloruro sódico	1,326	1,276	0,655	0,877	0,617	1,173	1,349
60	Sulfato litio	1,020	0,399	0,531	7,337	2,717	3,514	3,160
63	Propranolol hidrocloruro	0,937	5,392	1,274	25,552	1,939	4,440	1,250
64	Trióxido de arsénico	2,190	51,620	0,866	15,690	2,492	0,886	12,440
66	Sulfato de talio	6,855	1,147	1,006	1,057	1,545	1,142	0,434
67	Warfarina	1,636	1,224	1,094	1,148	1,057	0,884	0,563
76	Hidrato de cloral	1,961	0,576	2,221	1,207	1,666	2,649	0,459
77	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	3,595	1,954	0,971	1,783	2,326	0,948	1,155
80	Estricnina	7,586	3,395	1,137	0,883	1,038	12,264	1,496
91	Selenato sódico	3,169	47,022	2,332	4,493	3,523	3,141	3,558
92	Acetonitrilo	3,724	2,947	0,981	6,440	1,706	9,853	7,311
96	Epinefrina bitartrato	1,884	1,462	0,750	0,982	1,847	1,448	3,000

**Tabla 20:** Ratios de fluorescencia obtenidos para cada parámetro, a partir de la dosis correspondiente a la IC50 o a la mayor dosis ensayada. Se han obtenido los ratios de fluorescencia para los 57 compuestos ensayados en la línea de neuroblastoma de rata, B50.

NRK-52E								
Número AcuteTox	Referencia química	DIBAC	FLUO-4 AM	TMRM	DCFH-DA	DAF-FM	MITOSOX	MCB
1	Acetaminofen	2,108	0,774	1,118	2,944	1,604	1,057	1,675
2	Ácido acetilsalicílico	4,268	0,615	1,221	1,002	0,833	1,956	1,136
3	Atropina sulfato monohidrato	12,997	0,757	3,182	38,844	2,713	1,999	1,184
4	Cafeína	2,749	1,563	0,870	0,829	0,996	2,819	7,656
5	Carbamazepina	1,091	0,818	0,936	0,778	2,284	2,771	1,341
6	Colchicina	1,010	2,398	0,904	1,551	2,091	0,869	1,019
7	Cicloheximida	1,440	1,568	1,162	0,812	0,849	0,983	1,371
9	Digoxina	0,843	0,861	0,788	6,396	7,774	3,953	1,239
10	Alcohol isopropílico	1,255	1,022	0,361	0,884	1,145	1,174	1,276
11	Malatión	1,858	1,680	0,942	3,020	1,388	4,817	1,094
12	Cloruro mercurio (II)	3,295	1,574	1,139	12,760	2,436	4,258	0,358
13	Pentaclorofenol	3,688	1,316	0,431	3,050	1,500	1,903	1,271
14	Fenobarbital	1,558	1,335	0,731	2,533	1,215	0,317	5,814
15	Sodio lauril sulfato	0,718	0,797	1,175	0,873	1,639	1,410	1,576
16	Valproato sódico	2,933	1,320	0,768	2,026	1,029	2,443	1,163
17	5-fluorouracilo	0,827	1,022	0,903	1,673	1,229	1,069	1,628
18	Benceno	0,803	0,654	0,840	0,936	0,939	0,596	1,042
19	Tert butil hidroperóxido	2,388	0,805	1,161	1,328	0,938	1,116	0,540
21	Cloruro cadmio (II)	1,494	1,202	1,078	6,323	0,653	0,341	1,656
23	Pireno	1,619	1,121	0,934	0,823	1,026	1,214	1,122
26	Hexaclorobenceno	1,123	0,719	0,989	1,024	0,986	0,914	1,233
28	Amiodarona hidrocloreuro	2,082	0,984	0,149	0,334	2,168	0,867	0,368
29	Verapamil hidrocloreuro	8,730	0,780	0,492	2,104	3,345	6,567	1,066
30	Rifampicina	0,912	1,985	0,924	1,194	2,093	1,288	1,508
31	Tetraciclina hidrocloreuro	1,506	0,689	0,935	0,576	0,975	1,136	2,033
32	Orfenadrina hidrocloreuro	4,627	1,881	0,516	1,230	0,907	2,386	1,147
33	Nicotina	0,765	2,586	0,226	1,465	2,041	1,507	29,924
34	Lindano	4,445	1,064	0,981	1,018	1,474	1,430	0,892
37	Etanol	0,683	4,871	1,018	1,549	5,069	6,176	1,869
38	Paratión	2,112	6,136	0,657	0,628	1,065	1,783	1,094
39	Diclorvos	1,159	0,194	0,621	1,230	1,385	1,457	1,450
40	Fisostigmina	1,920	6,273	0,653	3,073	3,236	4,782	3,253
41	Glufosinato amónico	2,445	0,939	2,121	2,350	1,312	13,368	1,096
42	Cis-dicloro-diaminplatino (II)	0,958	0,685	0,953	0,725	1,169	1,171	1,885
43	Dietilenglicol	0,925	1,808	0,533	1,508	0,980	0,103	0,711
44	Diquat dibromuro	2,126	3,653	0,852	12,742	2,983	3,975	2,150
45	Ocratoxina A	1,583	0,921	1,148	1,475	0,920	0,752	3,008
46	Ciclosporina A	2,584	2,218	0,667	1,493	1,163	1,595	1,175
47	17a-etinilestradiol	4,373	1,688	1,538	1,611	1,374	1,827	1,939
48	Fluoruro sódico	1,099	0,767	1,439	0,930	2,103	0,726	2,878
49	Paraquat dicloruro	1,022	1,267	1,198	1,051	1,761	4,448	2,875
51	Dimetilformamida	0,395	1,252	1,180	0,912	1,031	0,733	3,445
53	Amiripitilina hidrocloreuro	1,148	2,142	0,883	1,253	1,559	1,720	4,221
54	Etilenglicol	0,550	1,620	0,277	1,309	1,289	1,132	4,202
55	Metanol	0,485	1,501	0,514	0,845	1,080	1,260	1,407
57	Cloruro sódico	1,370	0,785	1,224	0,825	0,739	0,601	0,607
60	Sulfato litio	0,333	0,883	0,621	1,563	0,695	0,277	5,106
63	Propranolol hidrocloreuro	2,058	4,016	0,571	0,843	0,954	6,745	3,401
64	Trióxido de arsénico	1,795	2,202	0,907	1,408	3,927	4,945	1,535
66	Sulfato de talio	0,662	0,567	1,204	0,881	1,118	1,263	1,652
67	Warfarina	1,384	1,204	0,816	1,137	0,797	0,755	0,772
76	Hidrato de cloral	0,889	1,259	1,006	0,674	2,518	7,483	1,427
77	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	5,526	1,746	0,878	3,356	1,055	1,106	1,461
80	Estricnina	4,738	0,875	1,045	0,948	1,130	1,657	1,607
91	Selenato sódico	1,199	2,987	0,873	1,546	1,504	1,833	2,110
92	Acetonitrilo	1,277	1,081	1,121	1,513	1,880	1,319	1,177
96	Epinefrina bitartrato	1,024	2,227	1,226	3,171	2,731	1,541	5,518

**Tabla 21:** Ratios de fluorescencia obtenidos para cada parámetro, a partir de la dosis correspondiente a la IC50 o a la mayor dosis ensayada. Se han obtenido los ratios de fluorescencia para los 57 compuestos ensayados en la línea de epitelio renal de rata, NRK-52E.

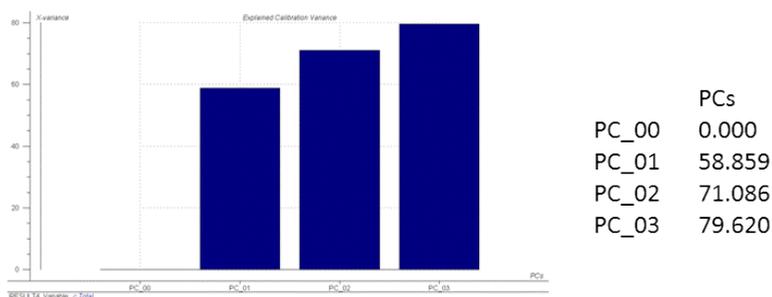
N13								
Número AcuteTox	Referencia química	DiBAC	FLUO-4 AM	TMRM	DCFH-DA	DAF-FM	MITOSOX	MCB
1	Acetaminofen	0,850	1,606	1,395	1,035	0,856	2,121	1,692
2	Ácido acetilsalicílico	2,944	6,421	0,597	2,224	1,386	2,124	0,674
3	Atropina sulfato monohidrato	8,060	10,145	2,773	2,259	2,215	1,594	3,421
4	Cafeína	1,952	1,525	0,649	1,484	1,138	0,875	1,874
5	Carbamazepina	0,922	1,543	1,000	1,182	0,881	1,307	1,094
6	Colchicina	1,046	2,734	2,263	0,713	1,248	1,837	1,424
7	Cicloheximida	1,808	1,617	0,911	2,749	0,735	1,342	1,465
9	Digoxina	0,978	0,752	1,028	0,985	0,833	1,223	1,055
10	Alcohol isopropílico	2,100	2,786	0,612	1,810	2,835	2,046	4,859
11	Malatión	3,688	4,134	1,065	1,518	3,158	5,173	1,349
12	Cloruro mercurio (II)	1,606	1,982	0,985	4,950	1,081	3,072	1,598
13	Pentaclorofenol	3,902	1,027	0,721	1,717	2,156	0,943	1,742
14	Fenobarbital	1,081	0,725	1,091	1,146	0,984	1,953	1,303
15	Sodio lauril sulfato	1,036	1,966	1,967	3,976	3,473	2,387	1,368
16	Valproato sódico	4,256	7,565	1,015	3,831	3,396	4,172	2,759
17	5-fluorouracilo	1,595	0,580	0,946	1,287	0,729	1,279	1,370
18	Benceno	0,705	0,719	1,745	1,516	1,010	0,879	1,247
19	Tert butil hidroperóxido	4,782	1,965	0,798	1,075	1,486	1,473	2,540
21	Cloruro cadmio (II)	1,389	8,890	0,584	2,011	1,427	0,738	5,771
23	Pireno	1,134	1,142	1,501	1,110	0,825	1,192	1,366
26	Hexaclorobenceno	0,612	0,683	0,831	1,072	0,990	1,266	0,983
28	Amiodarona hidrocloreuro	6,000	6,671	2,113	1,019	9,121	63,649	1,802
29	Verapamil hidrocloreuro	9,075	1,683	14,560	1,169	2,951	0,874	4,326
30	Rifampicina	1,353	0,969	3,591	0,973	0,725	3,748	0,922
31	Tetraciclina hidrocloreuro	1,002	1,251	0,876	1,087	0,814	1,299	13,552
32	Orfenadrina hidrocloreuro	1,683	78,693	1,568	2,048	4,233	17,225	8,482
33	Nicotina	1,728	6,944	5,316	1,859	5,825	9,143	2,097
34	Lindano	1,576	1,158	0,892	1,051	0,852	1,515	1,498
37	Etanol	2,170	22,155	0,968	1,124	41,368	23,772	5,120
38	Paratión	1,746	1,101	1,641	1,430	2,622	1,104	1,500
39	Diclorvos	3,789	3,697	1,642	1,434	6,170	11,464	5,297
40	Fisostigmina	2,800	2,957	8,771	1,217	2,411	5,762	7,487
41	Glufosinato amónico	1,551	0,702	0,948	1,024	1,317	1,461	1,661
42	Cis-dicloro-diaminplatino (II)	0,631	0,806	1,681	0,971	1,039	1,372	1,194
43	Dietilenglicol	6,512	30,521	2,653	9,023	141,876	11,672	1,503
44	Diquat dibromuro	1,679	31,937	1,088	4,584	3,728	9,248	6,982
45	Ocratoxina A	0,766	0,826	0,826	1,739	0,737	1,178	10,592
46	Ciclosporina A	1,457	3,123	2,979	0,938	1,449	7,015	1,720
47	17 $\alpha$ -etinilestradiol	3,404	15,206	3,582	1,625	3,767	0,609	1,401
48	Fluoruro sódico	2,106	3,009	1,165	3,906	1,443	1,312	2,231
49	Paraquat dicloruro	2,038	4,829	2,000	7,906	4,045	14,729	8,126
51	Dimetilformamida	3,220	4,864	0,263	3,364	26,547	4,454	2,857
53	Amitriptilina hidrocloreuro	1,474	2,758	3,765	0,998	1,864	4,993	1,068
54	Etilenglicol	0,852	6,154	0,599	1,151	4,134	2,750	4,708
55	Metanol	3,763	11,040	0,837	8,869	8,331	3,137	2,512
57	Cloruro sódico	1,909	5,096	0,616	0,880	1,449	1,127	2,974
60	Sulfato litio	3,639	5,689	1,002	3,711	33,997	5,642	5,121
63	Propranolol hidrocloreuro	1,777	71,796	3,418	1,977	3,118	25,848	11,196
64	Trióxido de arsénico	1,033	1,239	0,554	1,277	2,238	1,141	2,499
66	Sulfato de talio	1,819	2,860	0,298	1,338	1,303	0,936	17,155
67	Warfarina	1,235	1,187	0,967	1,265	1,306	1,689	0,964
76	Hidrato de cloral	0,429	4,000	0,790	0,429	0,782	0,789	0,544
77	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	3,051	2,984	2,356	3,482	3,180	1,602	3,369
80	Estricnina	3,138	2,891	1,182	0,717	1,214	18,631	0,984
91	Selenato sódico	1,716	5,831	0,850	1,494	4,012	19,921	1,414
92	Acetonitrilo	1,943	8,115	0,382	1,184	1,931	11,321	5,182
96	Epinefrina bitartrato	0,863	1,962	1,962	2,226	2,557	1,632	2,141

**Tabla 22:** Ratios de fluorescencia obtenidos para cada parámetro, a partir de la dosis correspondiente a la IC50 o a la mayor dosis ensayada. Se han obtenido los ratios de fluorescencia para los 57 compuestos ensayados en la línea de hepatoma de rata, N13.

Debido a la gran variabilidad en la escala de la IC50, se ha realizado una estandarización respecto a la IC50 o la dosis más alta probada, con el fin de minimizar el efecto producido por los valores tan elevados de IC50 en algunos casos. Se ha trabajado con una única matriz de datos con los ratios de fluorescencia estandarizados de las tres líneas celulares.

Todos los datos deben estar en la misma escala y centrados, lo que permite comparaciones independientes de la unidad de medida. Los datos tienen así el mismo peso estadístico independientemente del valor.

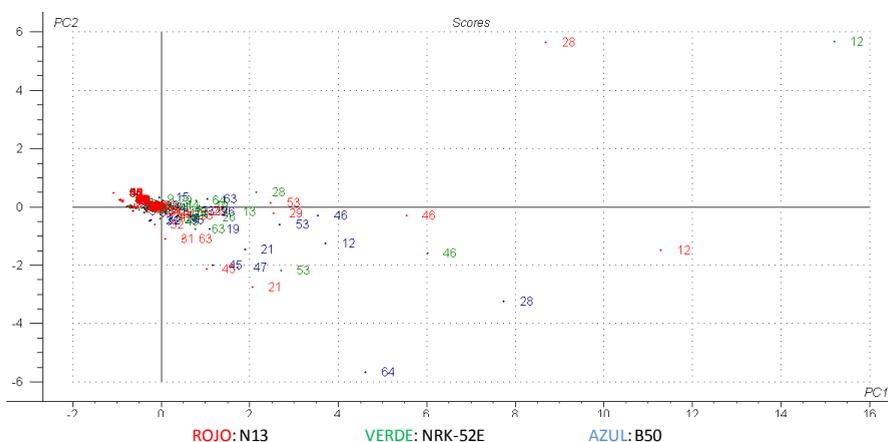
El modelo aplicado consta de tres componentes principales, donde se observa una estabilización de la varianza de casi el 80% (Figura 23). En este caso, al añadir una tercera componente, el modelo gana en complejidad pero se consigue explicar casi en un 80%, lo que supone una pérdida de información de tan sólo el 20%.



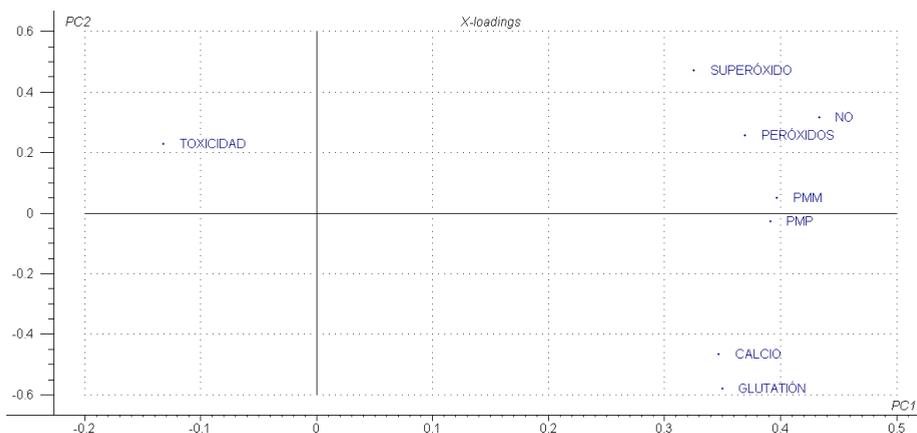
**Figura 23:** Componentes principales que explican el experimento, con la varianza para cada componente.

A continuación, se han obtenido los gráficos de “scores” que muestra la proyección de cada objeto sobre un plano en dos dimensiones, donde cada dimensión corresponde a cada una de las componentes que mayor varianza tienen. En este caso se muestran el total de los compuestos químicos numerados según la referencia del proyecto AcuteTox, ordenados en función de sus ratios de fluorescencia para cada parámetro y coloreados en función de la línea celular a la que pertenecen (Figura 24).

Simultáneamente, se ha obtenido el gráfico de “loadings” donde aparecen las variables que corresponden a los parámetros de citotoxicidad y de estrés oxidativo. Estas variables se proyectan sobre las mismas componentes donde se han proyectado los objetos del gráfico de “scores”. Cada una de las variables consiste en un vector que se proyecta desde el 0 y presenta una dirección y sentido (Figura 25).



**Figura 24:** Gráfico de “scores” que posiciona los compuestos según los niveles de los parámetros ensayados. Los compuestos químicos están numerados según los valores de referencia del proyecto AcuteTox y coloreados según la línea celular a la



**Figura 25:** Gráfico de “loadings” donde aparecen las variables que corresponden a los parámetros de citotoxicidad y de estrés oxidativo.

Además, cada variable presenta unas coordenadas con relación a los ejes, cuanto mayor sea ese dato en valor absoluto sobre un determinado componente más información aportará sobre ese parámetro, tendrá más peso sobre la componente. El parámetro se podrá explicar y tendrá significado cuanto mayor sean sus coordenadas sobre los ejes (Tabla 23).

Por ejemplo, la componente 1 aporta las coordenadas más elevadas en prácticamente todos los parámetros, con valores en valor absoluto entre 0,3 y 0,4. La componente tendrá una gran importancia y permitirá obtener gran parte de la información. La componente 2 proporciona mucha información sobre los parámetros toxicidad, calcio, óxido nítrico, superóxido y glutatión con valores entre 0,2 y 0,6. La tercera componente explica muy bien los

peróxidos y el superóxido con valores aproximados a 0,6 en valor absoluto.

	PC1	PC2	PC3
TOXICIDAD	-0,132	0,23	0,172
PMP	0,391	-0,028	0,311
CALCIO	0,347	-0,467	-0,191
PMM	0,397	0,052	0,08
PERÓXIDOS	0,369	0,257	0,598
NO	0,433	0,316	-0,065
SUPERÓXIDOS	0,325	0,472	-0,676
GLUTATIÓN	0,35	-0,581	-0,107

Tabla 23: **Coordenadas sobre los ejes para cada parámetro. Cada eje se corresponde con una componente.**

Para la interpretación de los resultados se deben usar las gráficas de “scores” y de “loadings” dependiendo del objeto de estudio.

Debido a que las IC50 tienen rangos de concentraciones muy diferentes, que van desde niveles muy bajos ( $\mu\text{M}$ ) a muy elevados (M), los resultados daban una gran variación y el modelo no resultaba fiable, ya que los compuestos no se situaban sobre las componentes correctamente, debido a la gran influencia del parámetro de la IC50.

Para conseguir resultados orientativos de los niveles de los parámetros de interés, se ha establecido una clasificación arbitraria

de los compuestos en tres categorías según su IC50. Cada categoría tiene asociada una numeración, es decir, los compuestos muy tóxicos tienen un 0, los intermedios un 1 y los poco o no tóxicos tienen un 2. A esta nueva clasificación empleada en el modelo se le ha etiquetado como “toxicidad” (Tabla 24).

CATEGORÍA TOXICIDAD	RANGO IC50 (M)
0	$>0,0000087$ y $\leq 0,003$
1	$>0,003$ y $\leq 0,1$
2	$>0,1$

Tabla 24: **Rangos de concentraciones IC50 (M) seleccionadas para cada una de los grupos creados dentro de la categoría toxicidad.**

Esta nueva clasificación permite ordenar los compuestos químicos en función de sus ratios de fluorescencia para cada parámetro de estudio y poder marcarlos en función de la categoría de toxicidad, estableciendo diferencias en cuanto a la citotoxicidad y la respuesta frente al estrés oxidativo.

Según la nueva clasificación establecida con las tres categorías, se puede apreciar claramente como los tres grupos de compuestos tienen comportamientos distintos frente a los parámetros de estudio (Figura 26 y 27). Los compuestos menos tóxicos que están situados más alejados del origen de las coordenadas y siguiendo la dirección

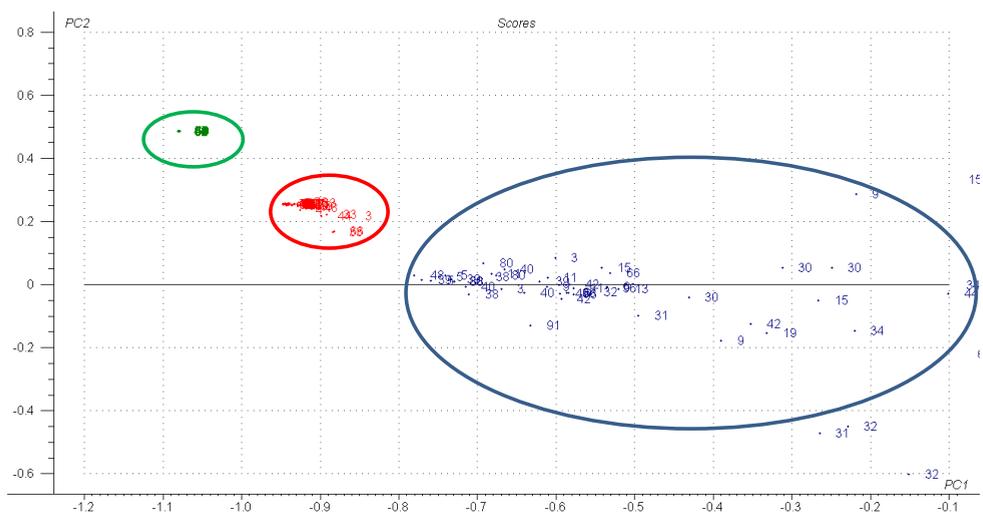
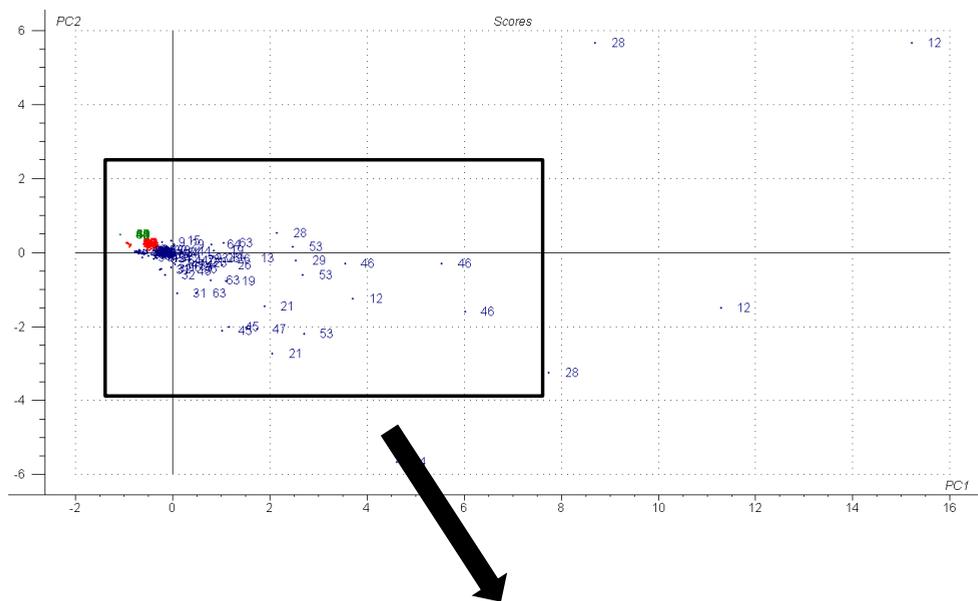
del vector llamado toxicidad, coloreados en verde, requieren concentraciones de tóxico más elevadas. Además, aunque presenten EC50 en algunos parámetros, éstas son muy elevadas y los ratios de fluorescencia para cada uno de los parámetros son similares, no hay diferencias entre ellos.

Dentro de ese grupo se encuentran compuestos comunes para las tres líneas celulares, como son el etanol, dietilenglicol, dimetilformamida, etilenglicol, metanol, cloruro sódico y acetonitrilo, todos ellos requieren elevadas concentraciones y son muy poco tóxicos.

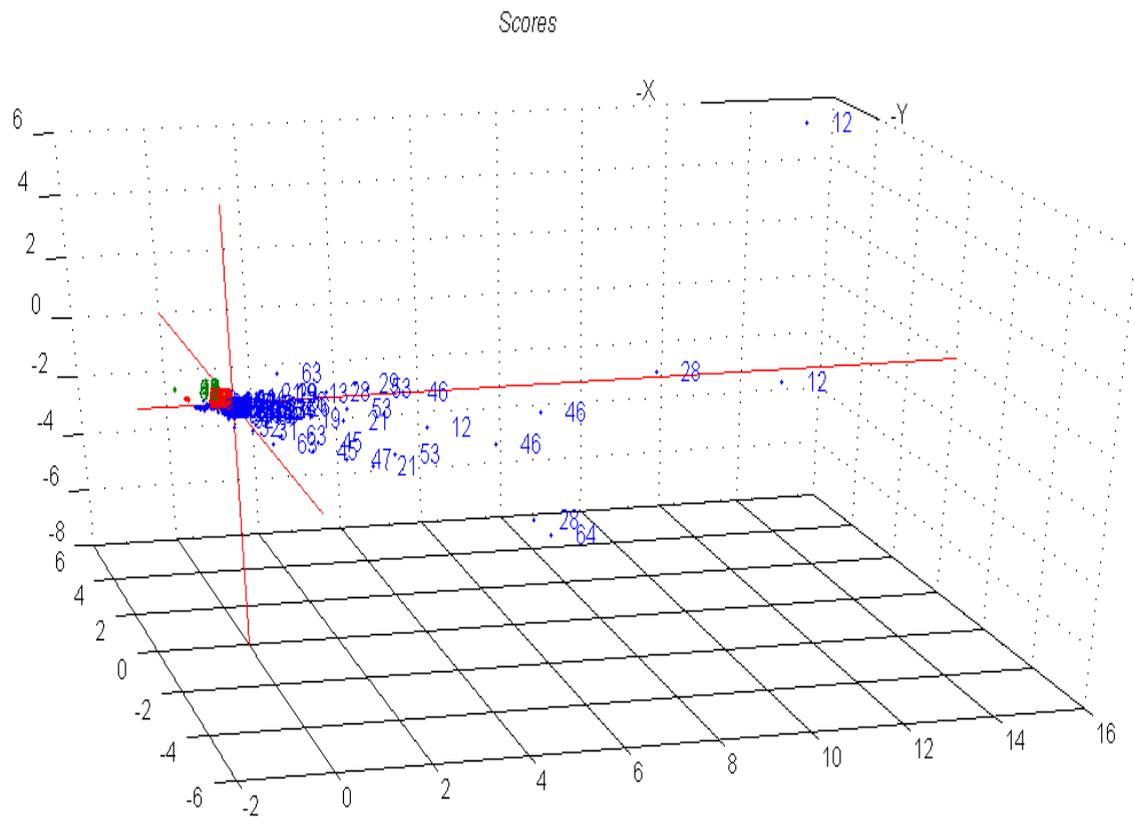
Los compuestos clasificados con una toxicidad intermedia, situados a una distancia media del origen de las coordenadas y siguiendo la misma dirección del vector llamado toxicidad, coloreados en rojo, presentan el mismo comportamiento. No hay diferencias entre los compuestos debido a las elevadas concentraciones empleadas, que dan lugar a ratios de fluorescencia similares en los parámetros. Prácticamente todos los compuestos presentan las mismas coordenadas.

Son ejemplos de este grupo el benceno, la cicloheximida, el alcohol isopropílico, el acetaminofen, el ácido acetilsalicílico o la cafeína entre otros. Estos compuestos son comunes para las tres líneas celulares y requieren concentraciones elevadas pero inferiores a los compuestos del grupo de mayor toxicidad representado en color verde.

En cambio, en los compuestos con una toxicidad más elevada situados próximos al origen, coloreados en azul, se observa una gran variación en la posición de los compuestos. Las concentraciones empleadas de tóxico son muy bajas y los parámetros son muy sensibles a la concentración. Existen compuestos con una gran variación en los ratios de fluorescencia. Los compuestos se distribuyen según sus niveles de los diversos parámetros ensayados.



**Figura 26:** Gráfico de “scores” con los compuestos ordenados según la categoría toxicidad. En el gráfico inferior (zoom del superior) se aprecian las diferencias entre los tres grupos diferenciados en tres colores distintos.

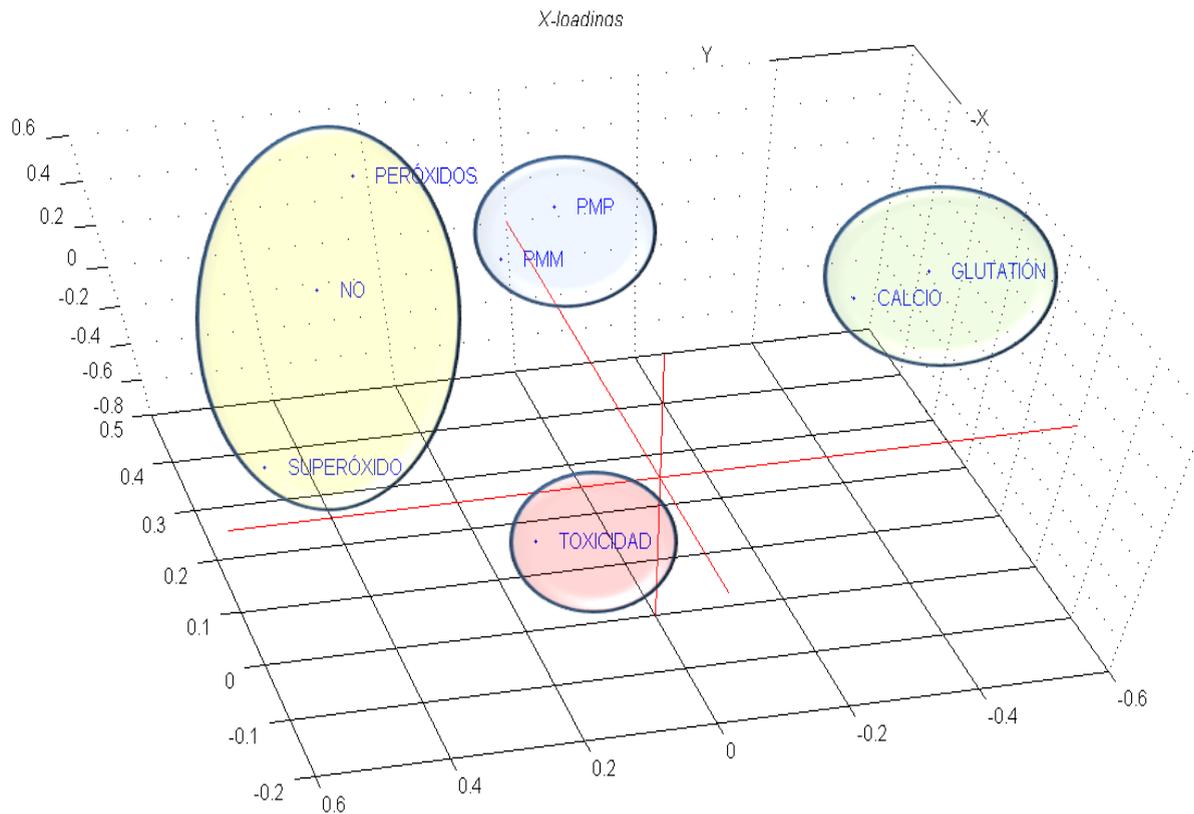


**Figura 27:** Gráfico de “scores” con los compuestos ordenados según la categoría toxicidad, realizado sobre las tres componentes principales del modelo. Se aprecian los tres grupos creados diferenciados en tres colores.

Simultáneamente, en la representación en 3D del gráfico de “loadings” (Figura 28), los resultados muestran una agrupación de los parámetros indicadores de estrés oxidativo, superóxido, peróxidos y óxido nítrico. Por otro lado, se agrupan los parámetros indicadores de los potenciales, plasmático y mitocondrial y finalmente se ha establecido otro grupo donde se encuentra al calcio y el glutatión. En el lado opuesto, teniendo como referencia el origen de coordenadas, se encuentra el parámetro toxicidad transformado anteriormente.

Para obtener una explicación global, se debe combinar la posición de los compuestos sobre las variables. Los compuestos se situarán de acuerdo con los niveles de aquellos parámetros que tengan más elevados.

El resultado obtenido es lógico, ya que los compuestos que presenten cambios significativos en los parámetros ensayados, se situarán alejados del origen de coordenadas y en la dirección que indican los parámetros. Por su parte, requerirán concentraciones muy bajas, es decir, tendrán una IC50 baja dada su elevada toxicidad. Según la nueva clasificación establecida, los compuestos muy tóxicos tienen asignado un 0, lo que corresponde al origen de coordenadas para el vector toxicidad.



**Figura 28:** Gráfico de “loadings” donde aparecen las variables que corresponden a los parámetros de citotoxicidad y de estrés oxidativo, realizado sobre las tres componentes principales del modelo. Se han agrupado según su naturaleza bioquímica.

Por último, para estudiar la relación existente entre las variables, se ha realizado un estudio de asociación entre variables, que determina si dos variables pueden ser comparables. Al tratarse de vectores, la mejor opción es a través del coseno del ángulo que forman. Es la mejor medida para establecer el paralelismo entre dos vectores, ya que dos vectores son paralelos cuando el coseno del ángulo que forman es uno en valor absoluto.

Esta medida es independiente, salvo signo, de la longitud de los vectores considerados. El coseno del ángulo es una medida de similaridad con valores entre -1 y 1.

Para calcular el ángulo entre los parámetros se parte de las coordenadas que presentan sobre dos de las tres componentes, es decir, sobre los ejes x e y. Empleando las funciones trigonométricas se ha determinado el coseno del ángulo de dos vectores y finalmente se ha obtenido el grado de asociación en porcentaje.

Los resultados muestran una asociación muy elevada, resaltada en color amarillo, entre algunos parámetros. Esta asociación permite relacionar los resultados obtenidos con el metabolismo bioquímico (Tabla 25).

El parámetro de la toxicidad, que en realidad consiste en la viabilidad a través de la IC50, está asociado con los niveles de calcio y glutatión en un porcentaje muy próximo al 100%. Esto es debido a que niveles altos de calcio intracelular pueden ocasionar muerte celular o apoptosis, desencadenada a través de la pérdida del control homeostático del calcio, o también a través de cambios en la

distribución del calcio en los compartimentos intracelulares, que ocasionan la activación de las caspasas. Además el calcio también está implicado en otros procesos de muerte celular como la necrosis o la autofagia (Boris Zhivotovsky et al., 2011).

El glutatión es el antioxidante no enzimático más abundante en las células que actúa como regulador redox y de la señalización celular, y protege contra el daño oxidativo y nitrosativo (Liyun Yuan et al., 2008). Una depleción del glutatión ocasionada por los compuestos químicos produce el aumento de los radicales y junto al aumento de los niveles de calcio intracelular ocasionan la muerte celular inducida.

El metabolismo del calcio también está relacionado con el potencial de membrana plasmático, en la membrana plasmática se encuentran canales de calcio dependientes de ATP que bombean calcio del exterior hacia el interior generando un potencial. La acumulación de calcio intracelular es el resultado de la inactivación de la ATPasa de calcio en la membrana plasmática, provocando que las concentraciones de calcio se igualen y el potencial de membrana se pierda, despolarizando la membrana y activando la apoptosis (Boris Zhivotovsky et al., 2011).

También se puede observar que existe una asociación muy elevada, 98%, entre los potenciales de membrana plasmática y mitocondrial. El potencial de membrana mitocondrial es importante para el mantenimiento de la función fisiológica de la cadena respiratoria para generar ATP, el efecto de los compuestos tóxicos

provoca variaciones en los gradientes de iones, las membranas se despolarizan, hay una disminución en la generación de ATP y dan lugar a la activación de la apoptosis.

Otros parámetros muy relacionados con un grado de asociación superior al 90% y cercano al 100%, son los relacionados con el estrés oxidativo y nitrosativo, superóxido, óxido nítrico y peróxidos. Como se ha comentado anteriormente, el radical superóxido es una molécula muy pequeña altamente reactiva debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada, formada a partir de la reducción parcial del oxígeno. A partir de la reducción de dos electrones del oxígeno molecular se forma el peróxido de hidrógeno, especie más estable ya que no es un radical libre.

Además de estas especies también existen las especies reactivas del nitrógeno, familia de moléculas derivadas del óxido nítrico, cuyo efecto tóxico ocurre cuando se une al radical superóxido dando lugar a peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), también muy estable ya que no es radical libre. La presencia del compuesto tóxico puede provocar un incremento en los niveles de estas especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno provocando efectos dañinos sobre las células a distintos niveles, pudiendo causar daños a través de la interacción con lípidos, proteínas y DNA.

### MEDIDAS DE ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES EN PORCENTAJE

	TOXICIDAD	CALCIO	PMP	PMM	PERÓXIDOS	NO	SUPERÓXIDO	GLUTATIÓN
TOXICIDAD	-	99,3	55,9	38,1	8,7	10,9	43,2	99,98
CALCIO	99,3	-	65,2	48,7	3,1	0,86	32,3	99,53
PMP	55,9	65,2	-	98	77,8	76,4	50,7	57,6
PMM	38,1	48,7	98	-	88,8	87,7	66,9	40,1
PERÓXIDOS	8,7	3,1	77,8	88,8	-	99,98	93,6	6,6
NO	10,9	0,86	76,4	87,7	99,98	-	94,4	8,8
SUPERÓXIDO	43,2	32,3	50,7	66,9	93,6	94,4	-	41,3
GLUTATIÓN	99,98	99,53	57,6	40,1	6,6	8,8	41,3	-

**Tabla 20:** Indica el grado de asociación entre todas las variables ensayadas en porcentaje. Los valores elevados se han resaltado en amarillo.

Los resultados obtenidos del estudio de asociación de variables muestran resultados acordes con el metabolismo bioquímico a nivel celular y demuestran que el método estadístico es útil para realizar el estudio de una gran cantidad de datos. Permite obtener información a nivel general sobre el mecanismo de acción de los tóxicos y su efecto sobre el metabolismo.

## 6. CONCLUSIONES

1. La puesta a punto de un conjunto de ensayos citómicos miniaturizados y de alto contenido ha sido útil para la determinación de parámetros generales de citotoxicidad y específicos de estrés oxidativo en tres líneas celulares de rata, proporcionando un método rápido, sencillo y robusto.
2. Se ha validado la plataforma de ensayos citómicos in vitro diseñados, obteniendo buenas correlaciones para los valores de citotoxicidad y de estrés oxidativo ensayados, superiores a los valores bibliográficos in vitro basados en el test de captación de Rojo Neutro por 3T3, así como en líneas celulares humanas empleadas previamente en nuestro laboratorio.
3. Aunque no se han obtenido resultados excesivamente satisfactorios, los ensayos citómicos clasifican correctamente la toxicidad de un gran número de compuestos químicos con el criterio del sistema global de armonización (GHS), basado en la toxicidad in vivo en rata. La capacidad de clasificación mejora respecto al método in vitro de referencia, basado en los valores de IC50 en el test de captación de Rojo Neutro por 3T3.
4. Estadísticamente, el método propuesto proporciona una buena capacidad de predicción de los distintos parámetros ensayados, así como su grado de asociación dependiente de los mecanismos biológicos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA). Guía introductoria al Reglamento CLP. Versión 2.1. Agosto de 2015. ECHA-15-G -06.1-ES. ISBN: 978-92-9247-429-4.
2. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, JD. *Biología Molecular de la Célula*. Traducción al español de la 3ra. edición. Editorial Omega, Barcelona (2002).
3. Andrew DJ. Acute Systemic Toxicity: Oral, Dermal and Inhalation Exposures. Reducing, Refining and Replacing the Use of Animals in Toxicity Testing, 2013, 183-214
4. Bernas T, Grégori G, Asem EK, Robinson JP. Integrating cytomics and proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Jan; 5(1):2-13.
5. Boelsterli UA. *Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets*, Second Edition. March 23, 2007 by CRC Press. ISBN 9780849372728.
6. Botham PA. Acute systemic toxicity. *ILAR Journal*. 2002; 43 Suppl: S27-30.
7. Cuadras CM. *Nuevos Métodos de Análisis Multivariante*. CMC Editions, Barcelona, 2014.
8. CAMO software AS. "The Unscrambler. User manual" 1998.
9. Eskes C. Efforts Towards International Harmonization of Acceptable Alternatives to Animal Testing. Reducing, Refining

and Replacing the Use of Animals in Toxicity Testing, 2013, 99-118

10. Christensen ME, Jansen ES, Sanchez W, Waterhouse NJ. Flow cytometry based assays for the measurement of apoptosis-associated mitochondrial membrane depolarisation and cytochrome c release. *Methods*. 2013; 61(2):138-45.
11. Clapham, DE. Calcium Signaling. *Cell, Cell*. 1995 Jan 27; 80 (2):259–268.
12. Clemedson C, Kolman A, Forsby A. The integrated acute systemic toxicity project (ACuteTox) for the optimisation and validation of alternative in vitro tests. *Altern Lab Anim*. 2007; 35(1):33-8.
13. Clemedson C. The European ACuteTox project: a modern integrative in vitro approach to better prediction of acute toxicity. *Clin Pharmacol Ther*. 2008; 84(2):200-2.
14. Clemedson, C, Andersson, M, Aoki, Y 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* 1998; 26: 131-183.
15. Clemedson, C, Barile, FA, Chesne, C et al.; 'MEIC evaluation of acute systemic toxicity: part VII: prediction of human toxicity by results from testing the first 30 reference chemicals with 27 further in vitro assays' *ATLA*, 2000; 28: 161-200.

16. Clemedson, C, Barile, FA, Ekwall, B 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, 1998; 26: 93-129
17. Clemedson, C, E. McFarlane-Abdulla, M. Andersson 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, 1996; 24: 249-272.
18. Clemedson, C, McFarlane-Abdulla, E, Andersson, M et al.; 'MEIC evaluation of acute systemic toxicity: part II: in vitro results from 68 toxicity assays used to test the first 30 referece chemicals and a comparative cytotoxicity' ATLA, 1996; 24: 273-206.
19. Clothier R, Dierickx P, Lakhanisky T et al. A database of IC50 values and principal component analysis of results from six basal cytotoxicity assays, for use in the modelling of the in vivo and in vitro data of the EU ACuteTox project. Altern Lab Anim. 2008; 36(5):503-19.
20. Clothier R, Gómez-Lechón MJ, Kinsner-Ovaskainen A, Kopp-Schneider A, O'Connor JE, Prieto P, Stanzel S. Comparative analysis of eight cytotoxicity assays evaluated within the ACuteTox Project. Toxicol In Vitro. 2013; 27(4):1347-56.
21. Comisión Económica de las Naciones Unidas para Europa (UNECE). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y

etiquetado de productos químicos (SGA). Cuarta edición revisada (2011).ST/SG/AC.10/30/Rev.4.ISBN: 978-92-1-316013-8

22. Cottet-Rousselle C, Ronot X, Leverve X, Mayol JF. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry A*. 2011; 79(6):405-25.
23. Dickinson DA, Forman HJ. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 973:488-504.
24. Ekwall, B., B. Ekwall, and M. Sjostrom. MEIC evaluation of acute systemic toxicity: Part VIII. Multivariate partial least squares evaluation, including the selection of a battery cell line tests with a good prediction of human acute lethal peak blood concentrations for 50 chemicals. *ATLA*, 2000; 28: 201-234.
25. Ekwall, B., Barile, A. Castano, C et al.; MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part VI. Prediction of human toxicity by rodent LD50 values and results from 61 in vitro tests. *ATLA*, 1998; 26: 617-658.
26. Ekwall, B., Ekwall, K. Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1983) 407, 64-77.
27. Ekwall, E, Clemedson, C, Crafoord, B et al.; MEIC evaluation of acute systemic toxicity: part V: rodent and human toxicity data for the 50 reference chemicals. *ATLA*, 1998; 26: 571-616.

28. European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), a Culture Collection of Public Health England. B50. CODE: 85042302
29. European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), a Culture Collection of Public Health England. NRK-52E. CODE: 87012902
30. European Commission (EC). Chemicals in the Environment and their Health Implications. April 2012.
31. Gallardo JA. Asociación de variables. Universidad de Granada. <http://www.ugr.es/~gallardo/pdf/cluster-2.pdf>; 2012.
32. Gee KR, Brown KA, Chen WN et al. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca<sup>2+</sup>-indicator dyes. *Cell Calcium*. 2000; 27(2):97-106.
33. Gennari A, van den Berghe C, Casati S, et al.; ECVAM Workshop 50. Strategies to replace in vivo acute systemic toxicity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 50. *Altern Lab Anim*. 2004; 32 (4):437-59.
34. Gilbert SG. *A Small Dose of Toxicology*, 2<sup>nd</sup> Edition. Healthy World Press, Institute of Neurotoxicology and Neurological Disorders, Seattle, USA, 2012.
35. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do

- it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2):231-55.
36. Hartung T, Bremer S, Casati S et al. A modular approach to the ECVAM principles on test validity. *Altern Lab Anim.* 2004; 32(5):467-72.
  37. Hendriksen C, Cussler K, Halder M. ECVAM's role in the implementation of the Three Rs concept in the field of biologicals. *Altern Lab Anim.* 2002; 30:41-6.
  38. Herrera G, Diaz L, Martinez-Romero A et al. Cytomics: A multiparametric, dynamic approach to cell research. *Toxicol In Vitro.* 2007; 21:176-82.
  39. Hoffmann S, Kinsner-Ovaskainen A, Prieto P 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.* 2010; 58(3):395-407
  40. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos. Cartel SGA/CLP, 2011.
  41. Robinson JP. Flow cytometry. *Encyclopaedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Marcel Dekker, Inc., New York. 2004: 630–640
  42. Juan G, Gil-Benso R, O'Connor JE, Callaghan RC. Oxidative metabolism in a rat hepatoma (N13) and isolated rat

- hepatocytes: a flow cytometric comparative study. *Hepatology*. 1996; 24(2):385-90.
43. Kalbáčová M, Vrbacký M, Drahotka Z, Melková Z. Comparison of the effect of mitochondrial inhibitors on mitochondrial membrane potential in two different cell lines using flow cytometry and spectrofluorometry. *Cytometry A*. 2003; 52(2):110-6.
  44. Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJ et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52(1):1-6.
  45. Kinsner-Ovaskainen A, Bulgheroni A, Hartung T, Prieto P. ECVAM's ongoing activities in the area of acute oral toxicity. *Toxicol In Vitro*. 2009; 23(8):1535-40.
  46. Kinsner-Ovaskainen A, Rzepka R, Rudowski R et al. Acutoxbase, an innovative database for in vitro acute toxicity studies. *Toxicol In Vitro*. 2009; 23(3):476-85.
  47. Koëter HB. Mutual acceptance of data: harmonised test methods and quality assurance of data--the process explained. *Toxicol Lett*. 2003; 140-141:11-20.
  48. Kojima H, Urano Y, Kikuchi K et al. Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1999; 38(21):3209-3212.

49. Komura H, Iwaki M. In vitro and in vivo small intestinal metabolism of CYP3A and UGT substrates in preclinical animals species and humans: species differences. *Drug Metab Rev.* 2011; 43(4):476-98.
50. 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.* 2010; 24(6):1782-9.
51. Kumar H, Lim HW, More SV et al. The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's Disease: convergence and parallelism. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(8):10478-504.
52. Stephens ML, Mak NS. History of the 3Rs in Toxicity Testing: From Russell and Burch to 21st Century Toxicology. Reducing, Refining and Replacing the Use of Animals in Toxicity Testing, 2013, 1-43.
53. Mongay C. Quimiometría. Universitat de Valencia. Servei de publicacions, 2005. ISBN 9788437059235.
54. Musther H, Olivares-Morales A, Hatley OJ et al. Animal versus human oral drug bioavailability: do they correlate? *Eur J Pharm Sci.* 2014; 57: 280-91.
55. O'Connor JE, Callaghan RC, Escudero M et al. The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. *IUBMB Life.* 2001; 51(4):231-9.

56. Olmos A, Giner RM, Máñez S. Drugs modulating the biological effects of peroxy-nitrite and related nitrogen species. *Med Res Rev.* 2007; 27(1):1-64.
57. Peña, D. *Análisis de Datos Multivariantes*. McGraw-Hill, Madrid, 2002. ISBN: 84-481-3610-1.
58. Perry SW, Norman JP, Barbieri J et al. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques.* 2011; 50(2):98-115.
59. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015; 97:55-74.
60. Prieto P, Kinsner-Ovaskainen A, Stanzel S et al. The value of selected in vitro and in silico methods to predict acute oral toxicity in a regulatory context: results from the European Project ACuteTox. *Toxicol In Vitro.* 2013; 27(4):1357-76.
61. Repetto, M y Repetto, G. *Toxicología Fundamental*, Cuarta edición, Ed. Díaz de Santos, Madrid, 2009.
62. Rispin A, Farrar D, Margosches E, Gupta K, Stitzel K, Carr G, Greene M, Meyer W, McCall D. Alternative methods for the median lethal dose (LD(50)) test: the up-and-down procedure for acute oral toxicity. *ILAR J.* 2002; 43(4):233-43.
63. Saeidnia S, Abdollahi M. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 273(3):442-55.

64. Sanchez R, Arboleda G. Mitocondria y muerte celular. NOVA - Publicación Científica EN CIENCIAS BIOMÉDICAS - ISSN: 1794-2470. 2008:101-236.
65. Scholz S, Sela E, Blaha L et al.. A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. Regul Toxicol Pharmacol. 2013; 67(3):506-30.
66. 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. Toxicology in Vitro. 2008; 22: 1405–1411.
67. Skindersoe ME, Kjaerulff S. Comparison of three thiol probes for determination of apoptosis-related changes in cellular redox status. Cytometry A. 2014; 85(2):179-87.
68. Smith PJ, Khan IA, Errington RJ. Cytomics and drug development. Cytometry A. 2007; 71(6):349-51.
69. Stokes WS. Animals and the 3Rs in toxicology research and testing: The way forward. Hum Exp Toxicol. 2015; 34(12):1297-303.
70. Tárnok A. Cytomics for discovering drugs. Cytometry A. 2010; 77(1):1-2.
71. Terrádez-Gurrea M. Análisis de componentes principales. Barcelona: Universitat Oberta de Catalunya (UOC).

[http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/Componentes\\_principales.pdf](http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/Componentes_principales.pdf) , 2012.

72. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279(6):L1005-28.
73. Tolosa L, Pinto S, Donato MT et al. Development of a multiparametric cell-based protocol to screen and classify the hepatotoxicity potential of drugs. *Toxicol Sci.* 2012; 127(1):187-98.
74. Ukelis U, Kramer PJ, Olejniczak K, Mueller SO. Replacement of in vivo acute oral toxicity studies by in vitro cytotoxicity methods: opportunities, limits and regulatory status. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2008; 51(1):108-18.
75. Unión Europea (UE): Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, 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 Reglamento (CE) nº 1907/2006. DOUE-L-2008-82637.
76. Unión Europea (UE): 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). DOUE-L-2006-82750. «DOUE» núm. 396, de 30 de diciembre de 2006.

77. United Nations Economic Commission for Europe (UNECE). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition (2013). ST/SG/AC.10/30/Rev.5. ISBN 978-92-1-117067-2
78. Valko M, Leibfritz D, Moncol J et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1):44-84.
79. Van Osta P, Ver Donck K, Bols L, Geysen J. Cytomics and drug discovery. *Cytometry A.* 2006; 69(3):117-8.
80. Walum E, Tähti H, Kolman A. The tenth anniversary of the Björn Ekwall memorial foundation. *Altern Lab Anim.* 2011; 39(4):389-402.
81. Walum E. Acute oral toxicity. *Environ Health Perspect.* 1998; 106 Suppl 2:497-503.
82. Walum E. Scandinavian Society for Cell Toxicology--thirty years of scientific pioneering. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2014; 115(1):88-92.
83. Wójcik-Piotrowicz K, Kaszuba-Zwoińska J, Rokita E, Thor P. Cell viability modulation through changes of Ca<sup>2+</sup>-dependent signalling pathways. *Prog Biophys Mol Biol.* 2016.
84. Wolff C, Fuks B, Chatelain P. Comparative study of membrane potential-sensitive fluorescent probes and their use in ion channel screening assays. *J Biomol Screen.* 2003; 8(5):533-43.

85. Worth AP, Balls M. The principles of validation and the ECVAM validation process. *Altern Lab Anim.* 2002; 30 Suppl 2:15-21.
86. Wu D, Cederbaum AI. Removal of glutathione produces apoptosis and necrosis in HepG2 cells overexpressing CYP2E1. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001; 25(4):619-28.
87. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 2004; 134(3):489-92.
88. Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol Aspects Med.* 2009; 30(1-2):29-41.
89. Zamai L, Canonico B, Luchetti F et al. Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptosis on adherent cells. *Cytometry.* 2001; 44(1):57-64.
90. Zhivotovsky B, Orrenius S. Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. *Cell Calcium.* 2011; 50(3):211-21.
91. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 2014; 94(3):909-50.
92. Zuang V. The neutral red release assay: a review. *Altern Lab Anim.* 2001; 29(5):575-99.