CITÓMICA EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS*

José Enrique O'Connor¹, Alberto M. Alvarez², Robert C. Callaghan³,
Guadalupe Herrera¹, Alicia Martínez¹, Pilar Prieto⁴

¹ Centro de Citometría y Citómica, Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Valencia; ² Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid; ³ Departamento de Patología, Universidad de Valencia; ⁴ ECVAM, EC Joint Research Center, Ispra, Italia

***) Presentado en la II Jornada sobre Genómica, Proteómica y Citómica en el desarrollo de cosméticos y medicamentos. Red Española de Métodos Alternativos (REMA). Madrid, 1 de Marzo de 2004**

Citomas y Citómica:

Se asume que la secuenciación del genoma, en conjunción con un mejor conocimiento de las proteínas y sus funciones (proteoma), será el requisito más decisivo para comprender la complejidad de los sistemas celulares complejos (citomas). Sin embargo, esta visión se complica cuando se considera, por ejemplo, los problemas surgidos al predecir la estructura tridimensional de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos y se compara con la posible complejidad de las interacciones biomoleculares de los productos de 30.000 a 40.000 genes. Por ello, el conocimiento molecular es una condición necesaria, pero no suficiente para comprender la compleja arquitectura molecular de los citomas y sus respuestas frente a los estímulos o agresiones externas.

La citómica, o citometría de sistemas complejos, es una disciplina que se orienta a la investigación molecular en células individuales y que permite acceder a múltiples características bioquímicas de los sistemas celulares heterogéneos (1). La capacidad única de estudiar de esta forma citomas complejos, en condiciones similares a su situación fisiológica o patológica *in vivo*, ha conducido al desarrollo del concepto de medicina predictiva basada en la Citómica (2-4). La información sobre el futuro desarrollo de una enfermedad en un paciente individual supone una importante adición al concepto actual de

evaluación pronóstica de una enfermedad basada en la estadística, cuya representación más conocida son las curvas de Kaplan-Meier y que suele ser insuficiente para establecer un patrón terapéutico individual. Es evidente que la extrapolación de la capacidad predictiva de la citómica al campo de la investigación de los efectos celulares de fármacos y xenobióticos, incluyendo la predicción de toxicidad, es, cuando menos, muy sugerente.

Citómica y Citometría:

Los citomas están compuestos por varios tipos de células individuales, que forman las unidades de órganos y organismos. El análisis citómico se basa en la determinación del fenotipo molecular en cada célula individual, como producto resultante del genotipo y la exposición a factores externos. Esta estrategia resuelve el problema de la interpretación de datos promediados, obtenidos a partir de homogenados celulares o tisulares, en los que los efectos pueden ser atribuidos a cambios uniformes en todas las células en lugar de en subpoblaciones determinadas. Por otra parte, las alteraciones en subpoblaciones escasas pueden ser indetectadas por un efecto de dilución.

El progreso de la Citómica ha sido posible por la evolución de las tecnologías de análisis celular individual, fundamentalmente la citometría de flujo (5, 6) y la microscopía confocal y de barrido laser (7). En los últimos años, las técnicas de flujo e imagen se han visto potenciadas por el desarrollo de conceptos como el análisis de imagen multicolor o espectral, la excitación multifotón, la transferencia de energía resonante de fluorescencia (FRET), el análisis rápido de imagen fluorescente en flujo, la captura óptica en flujo, la microdissección laser de tejidos y la miniaturización de citómetros de flujo en chip. A estas metodologías, hay que añadir otras mejoras del análisis biomolecular, como el análisis multiplexado basado en microesferas, la PCR en células individuales, la amplificación de señales de tiramida, el marcaje de biomoléculas mediante puntos cuánticos, las nanoesferas magnéticas y los aptámeros (8).

La aplicación de las técnicas citómicas puede generar matrices de datos de alto contenido. La citometría de flujo permite, por ejemplo, realizar múltiples protocolos de marcaje fluorescente multicolor en diferentes poblaciones celulares. Las células vivas se pueden teñir inicialmente para revelar funciones como el pH intracelular, los potenciales de membrana, los niveles de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno o los niveles de Ca^{2+} . Tras la fijación para eliminar los colorantes funcionales, se puede volver a teñir para revelar componentes estructurales, como ácidos nucleicos específicos, antígenos, lípidos o estructuras de azúcares complejos. Los sistemas modernos de microscopía, con la capacidad de relocalización de células individuales favorecen estos procesos de tinción secuencial múltiple.

Estas nuevas aproximaciones de alto contenido están provocando que las formas tradicionales de visualizar y cuantificar la información en microscopía y citometría de flujo sean reemplazadas por sistemas algorítmicos, automatizados, estandarizables y expertos de recolección, análisis e interpretación de datos.

Si a tal complejidad analítica se añade la implementación de sistemas de alta velocidad de adquisición de datos, capaces de adaptarse a la problemática del screening de alto rendimiento, esencial en el área de la industria farmacéutica y verosíblemente requerida en el área de la detección de toxicidad, se puede suponer el beneficio de la aplicación de las estrategias citómicas en los procesos de investigación, desarrollo y evaluación de medicamentos (9).

Aplicaciones de la Citómica en la Investigación y Desarrollo de Fármacos:

Las disciplinas de la citómica, y especialmente la citometría de flujo, pueden ser aplicadas en todas las etapas de la interacción entre un fármaco (o, en general, un xenobiótico) y sus células diana, específicas o inespecíficas.

De forma secuencial, se pueden esquematizar los siguientes fenómenos biológicos susceptibles de ser analizados por metodologías citómicas:

- Detección y cuantificación de receptores de superficie.
- Detección y cuantificación de receptores intracelulares.
- Detección de respuestas mediadas por receptores de fármacos.
- Análisis de los fenómenos de transporte y difusión de solutos a través de membrana.
- Análisis del metabolismo intracelular de xenobióticos.
- Análisis de los efectos intracelulares de fármacos y xenobióticos.
- Detección y cuantificación de alteración metabólica y muerte celular.

Los principales objetivos de las estrategias citómicas indicadas representan estrategias esenciales en el análisis de la interacción xenobiótico-célula, tanto a nivel de la investigación básica como del desarrollo industrial y la evaluación de efectos terapéuticos y tóxicos de productos químicos y biológicos. Así, las áreas de aplicación citómica que se pueden considerar incluyen:

- Identificación y selección de subpoblaciones celulares específicas por su genotipo o fenotipo.
- Identificación de células diana de fármacos o susceptibles a xenobióticos.
- Análisis multiplexado, basado en microesferas, de analitos solubles.
- Cribado (Screening) de fármacos o precursores, tanto de alto rendimiento (High-throughput) como de alto contenido (High-content).
- Caracterización de mecanismos relacionados con la acción de fármacos y xenobióticos.
- Detección y cuantificación de toxicidad.

En esta presentación se pretende ofrecer una panorámica, basada en datos reales, de las aplicaciones de la citómica en el campo de la investigación de medicamentos y

xenobióticos. En gran parte, los ejemplos corresponden a estudios de nuestros laboratorios, obtenidos *ex vivo* en pacientes humanos o *in vitro*, en modelos de células eucarióticas y procarióticas, de acuerdo con las consideraciones que siguen.

- a) Detección y cuantificación de receptores de superficie: Permite la identificación de subpoblaciones celulares específicas, tanto de tipo salvaje como producto de modificaciones genómicas (transfectantes y knock-outs). Se aplica a la identificación de dianas potenciales para la acción de fármacos que actúan a través de receptores y, al mismo tiempo, proporciona poblaciones modelo para testar la interacción fármaco-receptor y los fenómenos de unión e internalización de ligandos.
- b) Detección y cuantificación de receptores intracelulares: Esta aplicación es de relevancia práctica, sobre todo, en el estudio de los receptores nucleares de esteroides y ha permitido la identificación de subpoblaciones celulares tumorales dependientes de hormona y la monitorización terapéutica en distintos tipos de tumores.
- c) Detección de respuestas mediadas por receptores de fármacos: Permite el análisis funcional de receptores. Una parte importante de los estudios en esta área se refieren a la detección de respuestas rápidas de movilización de Ca^{2+} intracelular, un parámetro de gran interés en la caracterización de receptores y en el descubrimiento y desarrollo de fármacos relacionados, por ejemplo, con receptores acoplados con proteínas G o con canales iónicos. Asimismo, es posible analizar las modificaciones funcionales intracelulares o los fenómenos proliferativos inducidos por la activación de receptores, una estrategia de gran interés en los estudios inmunofarmacológicos.
- d) Análisis de los fenómenos de transporte y difusión de solutos a través de membrana: Es de relevancia en la caracterización de fármacos de bajo peso molecular o de proteínas bioactivas, que no actúan a través de receptores específicos y son transportadas o internalizadas a través de la membrana plasmática. En otro sentido, la

citómica se aplica al estudio de los fenómenos de extrusión activa o difusión pasiva de solutos al exterior de la célula, incluyendo la detección y caracterización funcional de bombas de expulsión de fármacos, un parámetro muy relacionado con los mecanismos de resistencia múltiple a fármacos (fenotipo MDR) en la terapia antitumoral o antiinfecciosa.

- e) Análisis del metabolismo intracelular de xenobióticos: La citómica dispone de metodologías para caracterizar los procesos de biotransformación de xenobióticos. Así, la existencia de sustratos fluorogénicos específicos o las técnicas de ensayo competitivo con sustratos no fluorescentes permite detectar la actividad de isoformas de CYP450. Otros procesos de biotransformación, como la formación de aductos con el glutatión han sido también frecuentemente estudiados con técnicas citómicas.
- f) Análisis de los efectos intracelulares de fármacos y xenobióticos: La citometría de flujo multiparamétrica es, probablemente, la disciplina analítica potencialmente más poderosa para el estudio de los efectos biológicos inducidos por fármacos y xenobióticos en células diana o, en general, en poblaciones celulares susceptibles. La sensibilidad y la capacidad de resolución temporal de la citometría, junto con el elevado número de parámetros moleculares accesibles a ella, proporcionan una visión integradora de la función celular (análisis de alto contenido). Por otra parte, la elevada velocidad de análisis y la existencia de sistemas citométricos automáticos y autoestandarizables están introduciendo esta tecnología entre los sistemas analíticos de alto rendimiento. Un ejemplo que apunta al interés de esta aproximación citómica como método alternativo para la caracterización de la toxicidad *in vitro* de fármacos es el proyecto de investigación, patrocinado por ECVAM, y recientemente completado en nuestros laboratorios (10). Por otra parte, el carácter no invasivo de la citometría de flujo y la fácil accesibilidad a tipos celulares de relevancia, como leucocitos de sangre

periférica o espermatozoides, o a seres unicelulares en su propio entorno, como el plankton, permiten su aplicación a la monitorización fenotípica de los efectos de fármacos y xenobióticos sobre el organismo entero, proporcionando abundantes biomarcadores de exposición y de efecto.

- g) Detección y cuantificación de alteración metabólica y muerte celular: Al igual que en la aplicación anterior, la citometría de flujo multiparamétrica es, la disciplina analítica más ventajosa (y tal vez la más utilizada) para el estudio experimental de la muerte celular inducida por fármacos y xenobióticos. La resolución temporal de la citometría, junto con el elevado número de parámetros biológicos, permite su aplicación a la detección y cuantificación de la apoptosis, el estudio de los mecanismos moleculares implicados en su inducción, ejecución o inhibición, y su distinción de la necrosis. De esta forma, la aplicación de la citómica en este campo se extiende desde la simple cuantificación de la potencia tóxica de un fármaco al estudio de los mecanismos específicos por los que ésta se manifiesta.

REFERENCIAS

1. <http://www.cytomics.info/>
2. <http://www.biochem.mpg.de/valet/cytomics.html>
3. G.Valet (2002). Predictive Medicine by Cytomics: Potential and Challenges. J. Biol. Regulators 16:164-167.
4. G.Valet, A.Tárnok (2003) Cytomics in predictive medicine. Cytometry 53B: 1-3.
5. O'Connor, J.E., Callaghan, R.C., Escudero, M., Herrera, G., Martínez, A., Monteiro, M.C., Montolíu, H. (2001) The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. IUBMB Life 51: 231-239.
6. <http://www.uv.es/cytomics>

7. Callaghan R.C., O'Connor, J.E., Alvarez A.M. (1997) "Microscopía Confocal y Estrés Oxidativo en Células". En: *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo* (Cascales, M., Ed.). Real Academia de Farmacia, Madrid, pp. 365-380.
8. FL Kiechle and CA Holland-Staley (2003) Genomics, transcriptomics, proteomics, and numbers. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 127: 1089-97.
9. A Waller, P Simons, ER Prossnitz, BS Edwards, and LA Sklar (2003). High throughput screening of G-protein coupled receptors via flow cytometry. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 6: 389-97.
10. An evaluation of the reproducibility and transferability of flow cytometric and confocal microscopic endpoints in an in vitro nephrotoxicity and in vitro metabolism models. European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), Institute for Health and Consumer Protection, Joint Research Center, Commission of the European Communities (15348-1999-10FIED ISP ES)